

研究課題別評価

1 研究課題名:

テララーメイド分子集積による機能性三次元空間創製

2 研究者氏名: 竹内 俊文

研究員: Fernando Navarro Villoslada (研究期間 H.15.2~H.15.10)

研究員: 高瀬 雅祥 (研究期間 H.15.4~H.16.10)

研究員: Woo-Sang Lee (研究期間 H.16.11~H.17.3)

研究員: 菱谷 隆行 (研究期間 H.17.4~H.18.3)

3 研究のねらい:

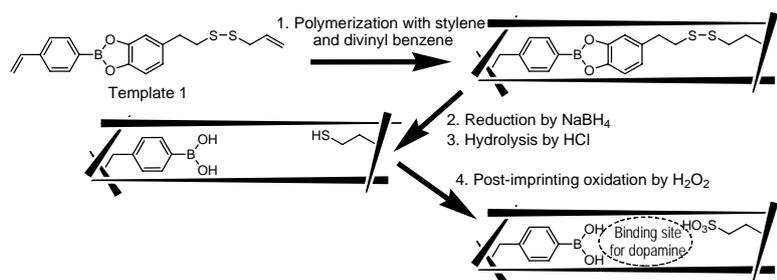
生体高分子が機能を発揮するためには、生体高分子が折れ曲がり、標的分子が結合するのに都合のよい三次元空間を創り出すことが必要である。生体高分子と同じように三次元空間をテララーメイド的に設計・合成することが出来れば、原理的には生体高分子がもっているすべての機能を人工的に再現できる。この生体機能の人工的再現を現実のものとし、ナノテクノロジーの基盤技術にしようというのが本研究のねらいである。

本研究では、分子インプリンティングの技術を駆使して望みの三次元空間を創出する。ここで用いる鑄型分子は、1) 作りたい三次元空間に匹敵するような大きさをもたせ、2) 触媒活性やセカンドメッセンジャー発信機能をもつモノマーを意図どおりの順番や位置に結合させ、3) 重合して構造体が出来た後に、抽出や分解により構造体内から消失させるように設計し、各種機能性モノマーと自己集合・組織化させることで、バイオ、環境から分子デバイスなどの情報関連分野にいたる様々な分野で応用可能なインプリント機能性構造体を創製する。

4 研究成果:

1) 分子インプリンティングとポストインプリント化学修飾を組み合わせた新しい分子認識高分子の合成法の開発

本研究では、ドーパミンを標的分子にした人工レセプターをポストインプリント化学修飾を併用した分子インプリンティングの手法で開発した。ドーパミンはカテコール骨格とアミンをもち、そのシスジオールがホウ酸と環状ジエステルを作ることが知られている。また、アミノ基はスルホン酸などの強酸基と静電的相互作用をすると期待される。そこで、ポリマー内の結合部位中に、ドーパミンが結合するのに都合のよい位置にホウ酸基とスルホン酸基を配置したインプリントポリマーを合成するために、ドーパミンに構造が類似した新規ジスルフィド鑄



型分子を設計した。この鑄型分子に、架橋剤加え重合しポリマーを得た。引き続き、鑄型分子を切り出すため、ジスルフィドを還元し、ホウ酸エステルを加水分解した。この時点で、ドーパミンを認識するための空間と、カテコール骨格を結合するためのホウ酸基が、適切な位置に配置される。さらに、ジスルフィドを還元した時に結合部以内に残ったチオール基を、ポストインプリント処理として酸化し、安定でアミノ基と静電的相互作用の期待されるスルホン酸基に変化させた。

得られたインプリントポリマーは、ドーパミンを選択的に結合した。アミノ基の代わりにカルボキシル基をもつ 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸やホモバニリン酸はほとんど吸着しないことから、ポリマー中のスルホン酸基がドーパミンのアミノ基と強く相互作用していると考えられる。また、ドーパミンから水酸基を一つ除いた構造のチラミンはドーパミンに比べ弱い吸着を示したので、ホウ酸残基とカテコールのシスジオールによる環状エステルの生成も同時に起こり、結合部位として機能していると思われる。架橋剤のみの対象ポリマーはこの条件ではほとんど吸着せず、鑄型分子による結合部位の構築が確認された。

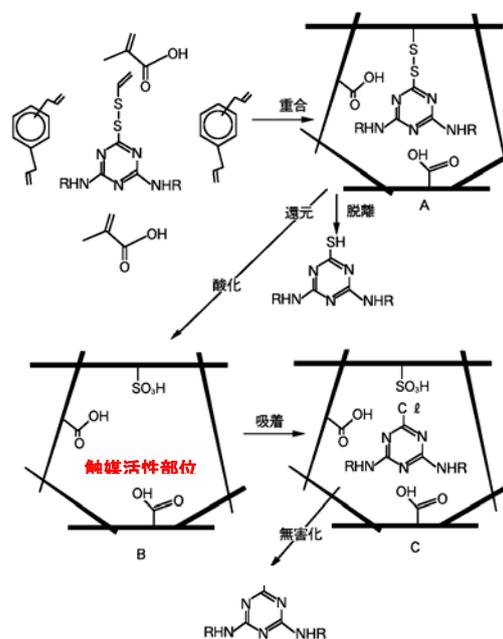
ジスルフィド結合を持つテンプレートモノマーを利用してインプリントポリマーを合成、還元反応を利用したテンプレートの除去、さらにポストインプリント処理によって官能基を変更するという、一連のチオールの酸化還元システムの利用は、これまでの分子インプリンティング法の中でも新しい手法であり、これからの応用が期待される。

2) アトラジン分解能をもつインプリントポリマーの設計と合成

1) の手法を展開し、内分泌かく乱性のあるアトラジンを選択的に吸着し、分解反応を触媒するポリマーの設計と合成を行った。今回は、ジスルフィド結合(S-S結合)によりアトラジンの6位の位置にアリルジスルフィド基が連結した新規な鑄型分子を設計・合成した。

この鑄型分子と水素結合により結合部位を形成するメタクリル酸を用いてポリマーを重合し、S-S結合を NaBH_4 でSH基に還元してアトラジン骨格をポリマーから除去した。その後、鑄型分子除去後の官能基変換であるポストインプリント処理として、 H_2O_2 で酸化を行いSH基から SO_3H 基に変換した。以上の方法により、アトラジンがポリマー内の結合部位に結合した際、触媒に必要な酸性の SO_3H 基がその近傍のみに配置された新規アトラジン分解ポリマーを合成した。

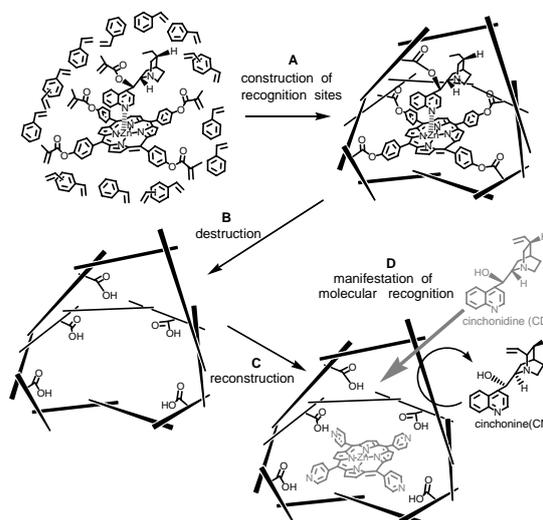
得られたポリマーをメタノールを含むアトラジン溶液に加えて攪拌すると、基質であるアトラジンのCl基がOMe基に置換した毒性の低いアトラトンの生成が確認された。種々の類似化合物に対して触媒活性を評価したところ、トリアジン系除草剤に対し特異性があった。重合時は、鑄型とな



る部分と触媒活性部位となる部分はジスルフィド結合でつながれているため、確実に結合部位中にひとつだけ触媒活性部位を導入することが可能となり、アトラジンを選択的に結合して分解する部位のポリマー中における均一性は高くなり、基質特異性や触媒活性が発現したと思われる。

3) 認識場の再構築が可能なインプリントポリマーの開発

複数の分子の存在により機能発現(ターゲット分子の特異的な認識)が可能な人工レセプターの創製について検討した。本研究では、ターゲット分子に対する認識場を構築後、一旦、その認識場を破壊し、再度構築することで、結合部位が再生するか検討した。分子認識場の合成法として、テラーメイド的に認識場を構築できる分子インプリント法を用い、シンコニジン(CD)をモデルターゲット分子、金属ポルフィリンを認識場構成分子として、認識場の再構築が可能なインプリントポリマーの合成を行った。



ターゲット分子(二重結合を還元し、メタクリロイル化した CD)、認識場構成分子(側鎖をメタクリロイル化したポルフィリン亜鉛錯体(II))、架橋剤を加え重合を行った(A)。その後、加水分解と洗浄により、ポルフィリンと CD の切り出しを行った(B)。得られたポリマーをピリジルポルフィリンとともに攪拌し、認識場の再構築を行った(C)。CD とそのジアステレオマーであるシンコニン(CN)を用いて吸着量の違いを比較し、再構築された認識場の精密性を確認した(D)。

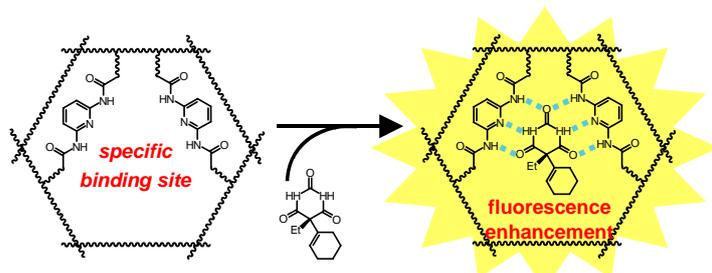
ポルフィリンと CD を切り出した後のインプリントポリマーは、再度ポルフィリンを吸着したことから、ピリジルポルフィリンが、加水分解によってできた4つのカルボキシル基と水素結合し、CD 認識場を再構築していることが示唆された。さらにこのポリマーは CN よりターゲットである CD を多く吸着し、ジアステレオ選択性が再現されていた。ランダムにピリジルポルフィリンを吸着させた場合はジアステレオ選択性が見られないことから、再結合したポルフィリンとポリマーに結合しているメタクリル酸の位置関係が CD の認識に都合よく配置され、ポルフィリンへの軸配位とメタクリル酸残基との水素結合により、CD をジアステレオ選択的に認識したと考えられる。可逆的な人工分子認識場の再構築の初めての例である。

4) 情報発信型インプリントポリマーによる薬物の蛍光検出

本研究では、我々のところで開発したモノマー、2,6-ビス(アクリルアミド)ピリジンが、催眠薬シクロバルビタールと多点水素結合を形成することにより、その蛍光強度を増加させる効果を持つ蛍光機能性モノマーであることを見出し、分子インプリントポリマーによるシクロバルビタールの蛍光検出を行った。

得られたシクロバルビタールインプリントポリマーを液体クロマトグラフィーやバッチ結合法によ

り評価したところ、シクロバルビタールに対して選択的な結合を示すことが確認された。また、ポリマー粒子を分散させた試料溶液の直接蛍光測定によって得られた蛍光スペクトルから、シクロバルビタールの結合に伴って蛍光機能性モノマー由来の蛍光強度が増加する

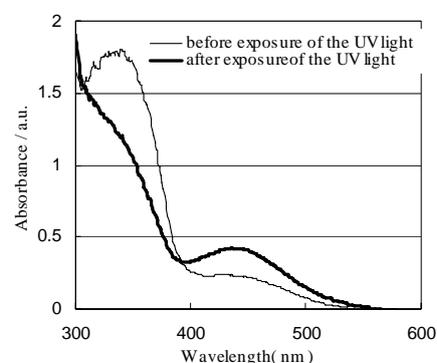


ことを見出し、蛍光によるシクロバルビタールの検出が可能であることが示された。すなわち、ポリマー自体がセンサーとなる情報発信型ポリマーを実証した。

5) アゾベンゼン骨格をもつインプリントポリマーの光機能制御

本研究では、光応答性を持つポリマーとして、アゾベンゼン骨格をもつポリマーを構築し、その吸着機能を光制御することを目的とした。ポリマーの合成には、ターゲット分子に特異的な結合部位をポリマー中に容易に形成させることができる分子インプリンティング法を用いた。ターゲット分子には、4-ニトロフェニル- α -D-マンノピラノシドを用いた。

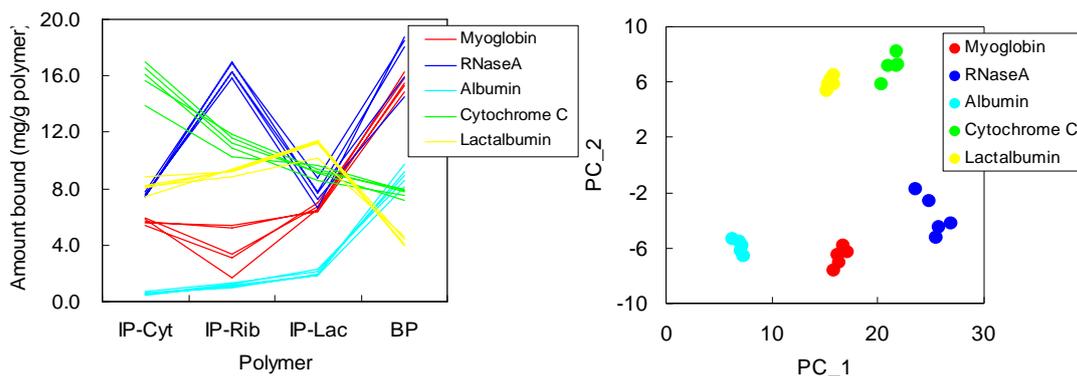
今回合成したポリマーは、紫外光照射によって、アゾベンゼン骨格が光異性化挙動を示すことが確認され、吸着特性が変化することが示された。すなわち、光応答性分子認識場の構築に成功した。



6) プロテインチップのためのタンパク質インプリント材料の合成

本研究では、分子インプリンティング法を用いてタンパク質を認識するインプリントポリマーを合成することを目的とした。機能性モノマーとしてアクリル酸を用いて、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、それぞれのポリマーについて、シトクローム C、ミオグロビン、リボヌクレアーゼ A、ラクトアルブミン、アルブミン 5 種類のタンパク質の吸着量をみた。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、インプリント効果が認められた。

このデータを多変量解析のひとつである主成分分析により解析し、結果をプロットした。その結果、それぞれのタンパク質が、3D グラフ上できれいに分割できることが分かった。このことから、これらのインプリントポリマーをアレイ化して、同様のデータ処理をすることで、人工材料を用いた新しいコンセプトのプロテインチップが出来ると思われる。



IP-Cyt: Cytochrome C インプリントポリマー; IP-Rib: Ribonuclease A インプリントポリマー;

IP-Lac: α -Lactalbumin インプリントポリマー

5 自己評価:

本研究では、分子インプリンティングの技術を駆使して、望みの三次元空間を創出することを目的とした。当初、1)ポストインプリント処理インプリントポリマーによる環境負荷物質の吸着と分解、2)情報発信型インプリントポリマーを用いるセンシングシステム、3)ペプチドを用いる光感応性分子インプリントドラッグデリバリーシステム、4)光感応性インプリントポリマーによる光応答性固相抽出、5)フラーレンインプリントポリマーによる新しい分子デバイス、6)シミュレーションによる構造-機能相関の推定、の6サブテーマを計画した。

3年の研究期間で1)、2)、4)は当初の目的を達したが、3)はペプチドの固相合成に問題があり、現在までに十分な成果があがっていない。また、5)のフラーレンインプリンティングは、新たなクレフト型分子を、6)のシミュレーションで発見したところで時間切れになったので残念である。しかしながら、当初予定していなかったタンパク質の分子インプリンティングに着手し、多変量解析を組み合わせることで、新しい概念のプロテインチップの可能性が示唆されたことは収穫であった。

これまで、系統的な研究がほとんどなく、方法論としては未熟であった分子インプリンティングが、本研究の結果、よく考えられてデザインされた鋳型分子を用いることで、テーラーメイドにナノスケールの分子の鋳型を人工高分子内に構築できる手法であることが示された。さらに、情報発信機能、光応答機能、認識場の再構築機能、触媒活性機能など新たな機能を思いのままに付与できることを例示し、分子レベルでデザインされた新しいテーラーメイド機能性人工高分子のコンセプトを実証できた点が、本研究の大きな成果であるといえる。また、慎重に選考したポスドク研究員の研究参加が、本研究の成果に拡がりを与えたことは、特筆すべきことである。

6 研究総括の見解:

インプリントポリマーによる鋳型形成、機能性を持った3次元空間の創製、それを使った特定物質の検出あるいは合成といった期待は完全には実現しなかったが、鋳型形成後の修飾などで、「鋳型形成の有用性」を示したことが評価できる。特にポストインプリント処理によって所望の官能基を鋳型内に固定する手法は有用だと考えられる。当初の目標に沿って着実に研究を進め目標の内のいくつかを達成したが、研究のさらなる進展が期待される。

7 主な論文等:

【論文】(14 件+4 件投稿中)

1. Takeuchi, T., Murase, N., Maki, H., Mukawa, T., Shinmori, H. Dopamine Selective Molecularly Imprinted Polymers via Post-imprinting Modification, *Org. Biomol. Chem.* 2006, in press (表紙に採用).
2. Takeuchi, T., Minato, Y., Takase, M., Shinmori, H. Molecularly Imprinted Polymers with Halogen Bonding-based Molecular Recognition Sites, *Tetrahedron Lett.* 2005, 46, 9025-9027.
3. Kubo, H., Yoshioka, N., Takeuchi, T. Fluorescent Imprinted Polymers Prepared with 2-Acrylamidoquinoline as a Signaling Monomer, *Org. Lett.* 2005, 7, 359 - 362.
4. Takeuchi, T., Ugata, S., Masuda, S., Matsui, J., Yane, T., Takase, M. Atrazine Transformation Using Synthetic Enzymes Prepared by Molecular Imprinting, *Org. Biomol. Chem.* 2004, 2, 2563-2566.
5. Kubo, H., Nariai, H., Takeuchi, T. Multiple Hydrogen Bonding-based Fluorescent Imprinted Polymers for Cyclobarbitol Prepared with 2,6-Bis(acrylamido)pyridine, *Chem. Commun.* 2003, 2792-2793.



【特許】(3 件)

1. 竹内俊文、菱谷隆行、特願 2005-246863「インプリントポリマーおよびその利用」
2. 竹内俊文、特願 2004-139046「標的分子の認識場が再構築可能な分子認識ポリマー及びその製造方法」
3. 竹内俊文、特願 2004-139040「分子認識ポリマーおよびその製造方法」

【招待講演】(9 件)

1. 竹内俊文「インプリントポリマーによる分子認識」第 53 回高分子学会年次大会招待講演 (平成 17 年 5 月、パシフィコ横浜)
2. 竹内俊文、「分子の鑄型を取る - モレキュラーインプリント機能性ナノ空間創製 -」第 2 回ナノテクノロジー総合シンポジウム (平成 16 年 3 月、東京ビッグサイト)
3. Takeuchi, T., "Molecularly Imprinted Polymers with Post-imprinting Conversion of the Binding Sites" Material Research Society (MRS) Fall Meeting (Boston, MA, December, 2003).
4. Takeuchi, T., "Molecularly Imprinted Polymers for Biorecognition", 2nd Asian European Symposium on Biomolecular Recognition in Downstream Processing (Vienna, Austria, October, 2003).