

論文の内容の要旨

論文題目：インプリント・シクロデキストリン高分子によるペプチドの立体構造の認識

氏名： 宋 士輝

1. 緒言

分子が分子を認識する。それは古くから生体内での特異的反応の基本となっている機構である。例えば、酵素はかずある基質分子の中から特異的基質だけを選び出して結合し、選択的な触媒作用をする。しかし、天然抗体はターゲットとなる生体分子に対して非常に高い基質特異性を持つが、生体からの抽出が難しくて入手が困難、量が少ない、また保存しにくいなどの欠点がある。それで、天然抗体に匹敵する特異的認識能を持つだけでなく、短時間で多量生産ができる、より過酷な環境にも耐えうる、更に天然抗体には見られない機能を持つと期待できる人工レセプター (=人工抗体) の開発が注目されている。

これまでに主に有機溶媒で小分子に機能する人工レセプターの合成が数多く報告されてきたが天然抗体が示す高度な生理活性機能を模倣するためには、水系で働きかけることが必要である。また、タンパク質のような生体高分子の選択的認識に成功できれば生命科学、医療などで非常に有意であるため、近年ますます研究の進展が期待されるようになってくる。本研究では、シクロデキストリン (CyD) を機能性モノマーとする「分子鋳型法」(Molecular Imprinting) を用いて、水系で生理活性物質であるオリゴペプチドを特異的に認識する人工レセプターの構築を目指している。

CyD の分子鋳型法は Figure 1 に示す。まず、ターゲットとなる分子 (鋳型分子) の認識部位に対して複数個の CyD を相補的に配向し、その配向のまま機能性モノマーを固定化する。そして、鋳型分子を取り除けば、鋳型分子に対して特異的な結合サイトを持つインプリント CyD 高分子が構築される。

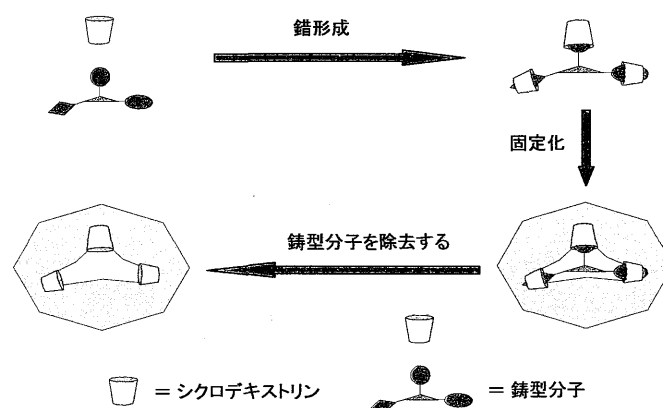


Figure 1. Molecular Imprinting of CyD

2. 実験

シリカゲル表面にビニル基を導入した後、この修飾シリカゲルを pH 8.0 のトリスバッファー溶

液中に分散させる。その後、1級水酸基側にビニル基を導入した修飾 β -CyD、メチレンビスアクリルアミド (架橋剤)、および鑄型分子のバッファー溶液を加えて 35 °C で 5 分間攪拌した。その後、ラジカル開始剤と促進剤 (過硫酸カリウム/TEMED) を加えて 35 °C で 20 時間重合させることで、シリカゲル粒子表面上へインプリント高分子を固定化した。インプリントに用いた鑄型としては以下に示すオリゴペプチドを使用した。

[Ile ⁵]-angiotensin-II ([Ile ⁵]-AII):	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe
[Gly ⁵]-angiotensin-II ([Gly ⁵]-AII):	Asp-Arg-Val-Tyr-Gly-His-Pro-Phe
[Val ⁵]-angiotensin-II ([Val ⁵]-AII):	Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe
[Ile ⁵]-angiotensin-I ([Ile ⁵]-AI):	Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu
[Val ⁵]-angiotensin-I ([Val ⁵]-AI):	Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-His-Leu

得られた高分子固定化シリカゲル粒子から未反応のモノマーや鑄型分子を除去した後、これらを HPLC カラムに充填した。基質の保持時間を測定することによりインプリント高分子の機能を評価した。

3. 結果と考察

(1) オクトペプチドの[Ile⁵]-AII と[Gly⁵]-AII のインプリント効果

CyD を機能性モノマーとして、それぞれ生理活性物質であるオクトペプチドの[Ile⁵]-AII と [Gly⁵]-AII を鑄型に用いてインプリントカラムを作製した。また、コントロールとして鑄型不在下でノンインプリントカラム (Non-Imp) も作製した。各カラムでは、各基質の溶出パターン (HPLC チャート) を Figure 2 に示す。

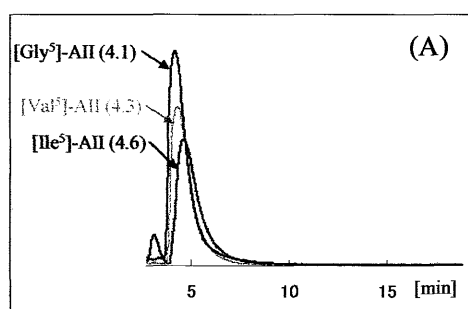
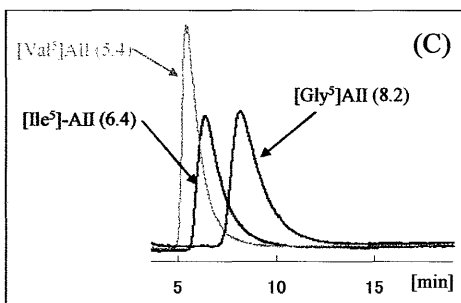
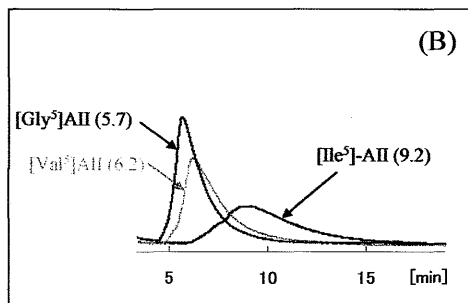


Figure 2. Typical HPLC patterns using (A) non- (B) [Ile⁵]-AII- and (C) [Gly⁵]-AII-imprinted β -CyD polymers as stationary phase for [Ile⁵]-AII, [Gly⁵]-AII and [Val⁵]-AII. The retention times of guest molecules (in min) are presented in parentheses. All the polymers were prepared at pH 8, and the binding activities were assayed at pH 8.



明らかに、Non-Imp カラムでは、各基質の保持時間はほぼ同じであるため、それらを識別できなかった (Figure 2A)。しかし、[Ile⁵]-AII-Imp カラムでは、鑄型の [Ile⁵]-AII が正確に認識された。

Non-Imp カラムでの場合に比べ、[Ile⁵]-AII がそれを鋳型に用いた[Ile⁵]-AII-Imp カラムでの保持時間は 4.6 分ほど延びた (Figure 2B)。それは CyD がばらばらの状態でシリカゲル表面に並んだ Non-Imp カラムに比べ、CyD が配向的にテンプレートとなる[Ile⁵]-AII の形に合わせてシリカゲル表面に並んだ[Ile⁵]-AII-Imp カラムのほうが [Ile⁵]-AII を効率的に認識したためである。

一方、非鋳型物質の[Gly⁵]-AII と[Val⁵]-AII をアッセイしたところ、そのアミノ酸配列が鋳型の [Ile⁵]-AII によく似ていて、ただ N-末端から数え第 5 番目のアミノ酸だけ異なるが、それほど強く保持されなく鋳型の [Ile⁵]-AII より先に溶出された。[Ile⁵]-AII・インプリント高分子は高い基質特異性を有することが示唆された。

また、[Gly⁵]-AII においても、顕著なインプリント効果が見られた (Figure 2C)。Non-Imp カラムでは、[Gly⁵]-AII の保持時間は 4.1 分であるに対し、[Gly⁵]-AII-Imp カラムではその保持時間は 8.2 分になり、4.1 分ほど遅くなった。さらに、他の非鋳型物質を分析したところ、各基質の中でも [Gly⁵]-AII が一番遅く溶出されたことが分かった。すなわち、[Gly⁵]-AII・インプリント高分子も高い基質特異性を示した。

(2) デカペプチドの [Ile⁵]-AI と [Val⁵]-AI のインプリント効果

長さ 10 マーのデカペプチド、[Ile⁵]-AI と [Val⁵]-AI を鋳型に用いて合成したインプリント高分子の機能を評価した。その結果、いずれも高いインプリント効果と基質特異性が観測された。例えば、Non-Imp カラムの場合に比べ、[Ile⁵]-AI の保持時間は [Ile⁵]-AI-Imp カラムで、16 分ほど飛躍的に延びて、各ゲスト分子 ([Val⁵]-AI、[Ile⁵]-AII と [Val⁵]-AII) の中でも最も遅く溶出された。計算してみると、インプリンティングによって、[Ile⁵]-AI の保持能が 110 % 向上された。一方で、他のゲスト分子の保持能向上率はわずか 30-50 % であった。

また、[Ile⁵]-AI-Imp カラムにおいて最も強く保持された [Ile⁵]-AI に次いで、二番目に溶出された [Val⁵]-AI は [Val⁵]-AI-Imp カラムでは最も強く保持されて最後に溶出されるようになった。インプリント高分子の中に [Val⁵]-AI を精密に認識できる結合サイトが形成されていることが示唆された。

更に、観測された高いインプリント効果が、オリゴペプチドの立体構造を反映しているかを検討するために、鋳型分子であるオリゴペプチドの立体構造が重合時とは異なると予想される pH 3 においてゲスト認識能を評価した。すると、[Ile⁵]-AI-Imp および [Val⁵]-AI-Imp のいずれのカラムにおいても、pH 8 で観測されたインプリント効果は pH 3 では完全に消滅した。これらの結果は、インプリント CyD 高分子は、単にオリゴペプチドのアミノ酸残基を認識しているのではなく、オリゴペプチドの高次構造をも正確に認識していることを示す。

本論文では、円二色 (CD) などを用いてペプチドの立体構造を調べてみた。また、NMR にて水中でインプリンティングによる分子認識機構の解明を目指している。それに、インプリント効果に影響を及ぼす諸因子も検討した。

4. 結論と展望

CyD・インプリント高分子を用いて、水中で生理活性オリゴペプチドを正確に認識することに成功した。特定分子の形状を記憶しているインプリントポリマーを HPLC カラムに充填し、簡便に基質選択性を評価できるため、分離・精製材料として使われることが可能である。また、将来 CyD のインプリント法を用いてタンパク質への認識に応用することが期待されている。