

多点認識分子インプリント空間による標的糖タンパク質の特異的検出

Recognition of tumor maker glycoproteins by molecular imprinted nanocavities bearing orthogonal interaction sites

神戸大工¹, 安田女子大薬² °高野 恵里¹, 砂山 博文^{1,2}, 北山 雄己哉¹, 竹内 俊文¹
 Kobe Univ.¹, Yasuda Women's Univ.², °Eri Takano¹, Hirobumi Sunayama^{1,2}, Yukiya Kitayama¹,
 Toshifumi Takeuchi¹
 E-mail: takeuchi@gold.kobe-u.ac.jp

タンパク質の認識素子の一つである抗体は、タンパク質を構成するアミノ酸残基の部分構造を認識することが可能だが、糖鎖構造を含めた糖タンパク質の認識は難しい。そこで、糖鎖もアミノ酸残基も認識可能な糖タンパク質認識材料の開発に注目が集まっている。我々は、標的分子に対する特異的認識能をもつ人工高分子材料である分子インプリントポリマー (MIPs) の創出を行ってきた[1-3]。本研究では、肝臓がんのバイオマーカー糖タンパク質である α -フェトプロテイン (AFP) を標的とし、ボロン酸による糖鎖認識に加え、我々の独自技術であるポストインプリンティング修飾(PIM)を用いて鋳型空間内に導入した官能基による認識効果をあわせもつAFP認識インプリント空間を構築し、AFPの高感度検出を試みた。

AFP の lysine 残基にジスルフィド結合を介して重合官能基を修飾した m-SS-AFP を鋳型分子として用いた。表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定用金基板に、末端にアミノ基とブロモ基を有する混成自己組織化単分子膜を形成した後、縮合剤を用いてアミノ基に 4-carboxy-3-fluorophenylboronic acid を反応させ、ボロン酸を導入した。ボロン酸を介して鋳型 AFP を基板上に固定化後、親水性モノマーと架橋剤を含む 10 mM phosphate buffer (pH7.4) に浸漬させ、表面開始原子移動ラジカル重合を行い、ポリマー薄膜を形成させた。還元剤、酸、界面活性剤処理を行うことで鋳型 AFP を除去し、AFP インプリント空間を形成し、そこに PIM 処理を行うことで MIP 薄膜を得た。SPR 測定により、得られた MIP 薄膜の AFP 認識能を評価した。

SPR 測定により、鋳型分子であるメタクリロイル基を修飾した AFP の、ボロン酸修飾基板への吸着実験を行ったところ、解離定数は 1.0×10^{-10} M であると見積もられ、鋳型 AFP は高い親和性でボロン酸と相互作用することを確認した。さらに作製した MIP 薄膜について AFP 認識能を評価したところ、解離定数は 3.5×10^{-11} M であると見積もられ、糖鎖と可逆的共有結合を形成可能なボロン酸と、アミノ酸残基と相互作用可能な官能基を鋳型空間内に配置した多点認識インプリント空間により AFP を高感度検出可能であることがわかった。

[1] Takeuchi, T. et al. *Chromatography* **2016**, 37, 43-64

[2] Horikawa, R. et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13023-13027.

[3] Takeuchi, T. et al. *Chem. Commun.* **2016**, 54, 6243-6251 (Feature article)