

1. 氏名	久保 拓也
2. 所属機関	京都大学大学院工学研究科
3. 研究題目	(糖)タンパク質の高感度検出及び三次構造解析のためのヒドロゲル開発

4. 研究の目的:

タンパク質は、それぞれが独自の三次構造を形成し、離合集散をくりかえしながら多様な生命現象を支配している。特に、これらの生体反応では、タンパク質の三次構造が重要であり、アミノ酸配列や場合によっては糖鎖の立体的な配置を正確に理解する必要がある。同様の情報は、昨今のSARS-CoV-2等の抗体検出、解析においても重要であり、with/post コロナ時代を戦うための新たなタンパク質解析の手段が必要不可欠である。

分子認識材料の合成手法として知られる分子インプリント法は、目的物質を鋳型分子として用いて、架橋高分子内部に分子レベルの「鍵と鍵穴」を構築する手法である。近年の研究においては、ポリエチレングリコール (PEG) を基材とするヒドロゲルの柔軟性に基づく分子認識能に着目し、生体高分子の選択的分子認識能を目的としたタンパク質インプリントゲルの開発、競合酵素免疫測定法 (ELISA) と同様の機能を有するタンパク質検出ゲル、糖鎖及び糖タンパク質検出ゲルの開発にも成功した。さらに、分子認識応答型の膨潤収縮ヒドロゲルと生体高分子の選択的分子認識能を目的としたタンパク質インプリントゲルにも成功している。以上の背景から、糖・タンパク質の三次構造を含む選択的な検出及び高次構造解析を目的としたインプリントヒドロゲルの開発を着想した (Figure 1)。

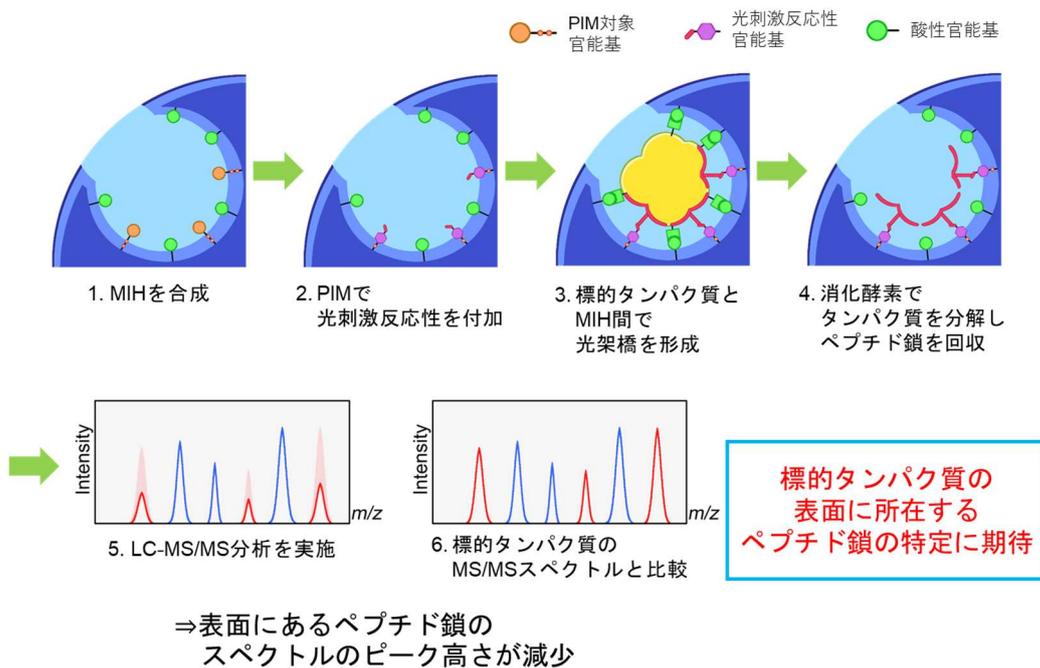
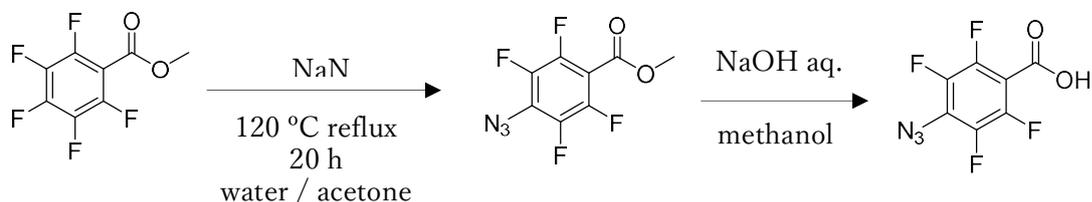


Figure 1. 本研究の概要.

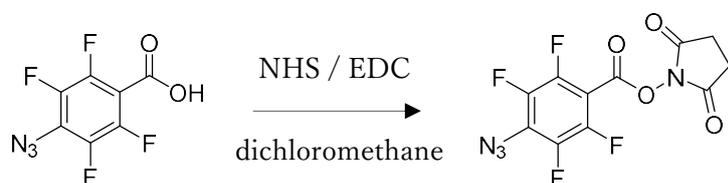
5. 研究の内容(手法、経過、評価など。描ききれない場合には、同一様式のページを追加してください。):

実験

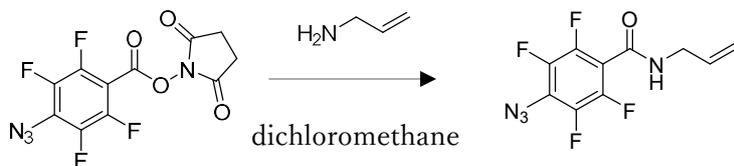
本研究では、Scheme 1~3 に従い、新規のモノマーを合成した。FT-IR, NMR の結果から、目的のモノマーの合成に成功した。



Scheme 1.



Scheme 2.

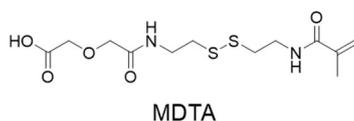
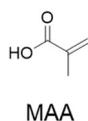
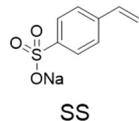
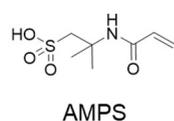


Scheme 3.

次に、Table 1 に従い、タンパク質インプリントゲルト合成した。

Table 1. 合成したインプリントゲルの組成

	Cross linker	AMPS (μmol)	SS (μmol)	MAA (μmol)	MDTA (μmol)	Template	Initiator	Solvent
MIH-1	14G-DMA (256 μmol)	17.1	3.40	0	0	Lysozyme (1.14 μmol)	AIZP (6.19 μmol)	tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.3, 3.0 mL)
MIH-2		16.0	3.17	1.37	0			
MIH-3		14.8	2.95	2.73	0			
MIH-4		13.7	2.72	4.10	0			
MIH-5		11.4	2.27	6.83	0			
MIH-6		9.12	1.81	9.57	0			
MIH-7		5.70	1.13	13.7	0			
MIH-8		0	0	20.5	0			
MIH-9		11.4	2.27	0	6.83			



結果と考察

合成したMIHに対するタンパク質の吸着選択性を評価した。その結果を Figure 2 に示す。すべての組成において、高い吸着選択性を確認した。また、塩濃度の違いによって、選択性が大きく変化し、特に 50 mM の NaCl を用いた場合に、高い選択性が得られた。さらに、タンパク質の違いについても評価した結果、鑄型分子である Lysozyme に高い選択性を示したことから、理想通りの MIH の合成に成功した。

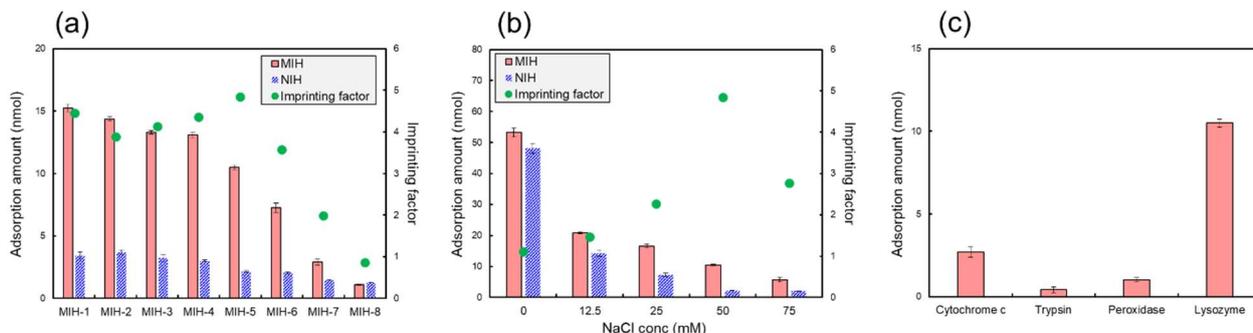


Figure 2. タンパク質の吸着実験. (a) 各 MIH に対する Lysozyme の吸着量, (b) 塩濃度の異なる溶液中での Lysozyme の吸着量, (c) 各種タンパク質に対する吸着量変化.

次に、MDTAを含むインプリントゲル(MIH-9)に対して、吸着実験及び、還元反応によるアジド化合物の挿入について、評価した。その際に、スキームと結果を Figure 3 に示した。結果から、Figure 1 に想定した化学反応が進行したことが明らかとなった。

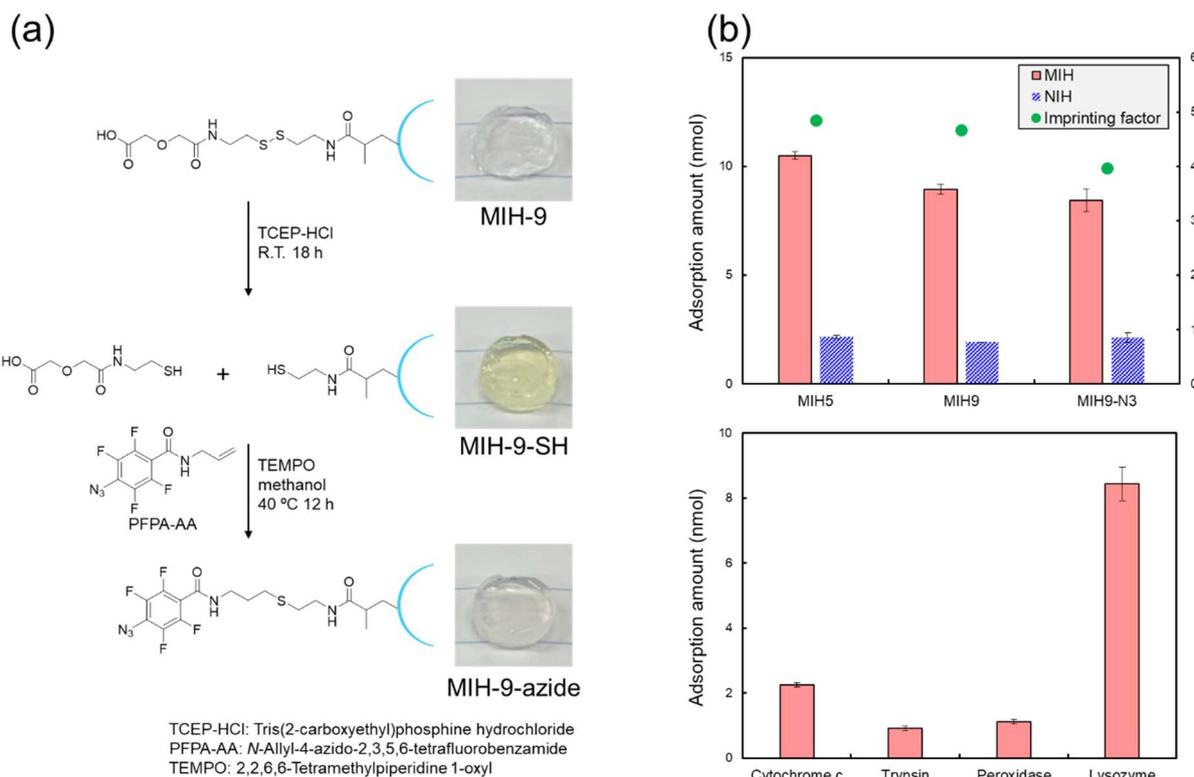


Figure 3. MDTA を含む MIH におけるアジド化合物挿入スキーム (a), 及び吸着実験 (b).

最後に、作成したインプリントゲルにおける機能を評価した。その結果、Figure 4 に示す。Figure 4 (a)では Lysozyme 溶液に浸漬した際の吸着量、また、UV 照射の後に 1.0 M の NaCl で洗浄した際の回収量を示している。この結果から、UV 照射によってゲルと Lysozyme が共有結合によって結合したと考えられる。

また、Figure 4 (b)では、標品のリゾチームをゲルに取り込ませ、UV 照射してトリプシン分解したものと、UV 照射なしでトリプシン分解したものを LC/MS/MS で分析し、Maxquant で解析した際のペプチドインテンシティーを比較している。(横軸)、UV 照射なしの場合、外側のペプチド配列(赤色)が優位に増加し、UV 照射ありだと内側のペプチド配列(青色)が優位に増加している様子が見える。LC/MS/MS で分析する時、打ち込むペプチドの濃度は Nanodrop によって調整しており、この結果から、ゲルに取り込まれて UV 照射をすると、PFPA を介して、タンパク質の外側が優先的にゲルと共有結合していることがわかる。

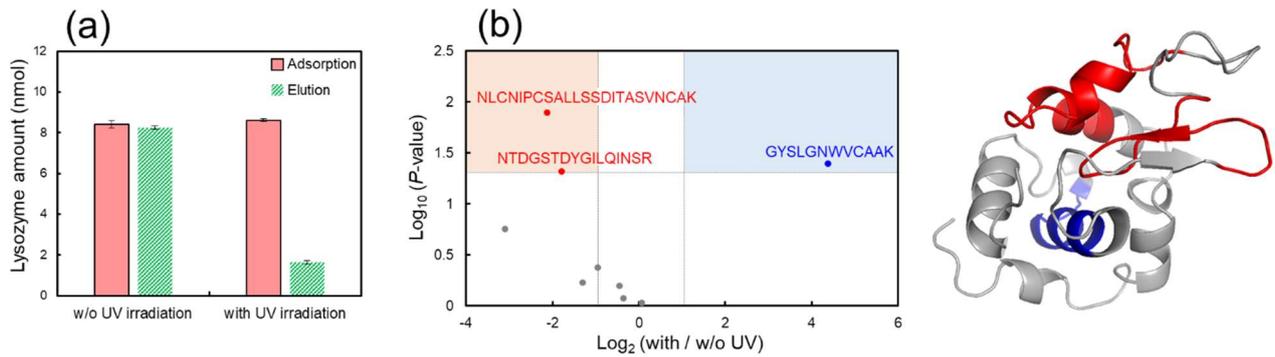


Figure 4. MIH-9 における Lysozyme の吸着と脱着 (a), UV 照射の有無によるトリプシン消化ペプチドのマッピングと Lysozyme の立体構造.

以上の結果から、タンパク質の立体構造のうち、表面付近に存在するペプチド群の同定法として、本法が有効であることが示された。

6. 研究の成果と結論、今後の課題:

本研究では、ターゲットとなるタンパク質を選択的に捕捉し、さらにタンパク質表面に存在するペプチド鎖と特異的結合能を有する光刺激反応性ヒドロゲルを創製し、LC/MS/MS 分析と組み合わせることでペプチド鎖のアミノ酸配列を決定するタンパク質高次構造解析法の開発を目指した。

その結果、新規モノマーの合成に成功し、さらに、本研究において用いる各種化合物を合成した。標的タンパク質 (lysozyme) を選択的に吸着する MIH の最適な合成方法に関して検討した。ゲル合成の際の光照射方法、反応溶液の組成を含め検討した結果、最適な合成方法の特定に成功した。当該条件は吸着に寄与するスルホ基に加えてカルボキシ基を有しており、MDTA の組成はこのカルボキシ基を置換する形で採用した。

また、上記の最適な合成方法に従い、MDTA を用いた MIH (MDTA-MIH) を合成し、ジスルフィド結合切断、PFPA 導入を評価した。MDTA-MIH に対する一連の処理の進行は、Ellman 試薬を用いて評価することに成功した。また、光照射によって標的タンパク質と MIH との間に光架橋を形成し、ゲルを粉碎して LC/MS/MS 測定を行った。得られた MS スペクトルを lysozyme と比較し、ピーク高さが低下しているペプチド鎖の構造上の位置を確認したところ、構造の外側に位置していることが確認された。したがって、当手法を用いることで、標的タンパク質の外側に位置しているペプチド鎖が容易に特定できる可能性が示唆された。

当手法の特徴的な点として、MIH(の浸透液)中におけるタンパク質の構造に対応した構造解析を対象としていることが挙げられる。当手法を用いることで、変性したタンパク質や基質と複合体を形成したタンパク質などが溶液中でどのように構造を変化させるかを観察できる可能性があると考えられる。

7. 成果の価値

7.1_学術的価値:

本研究は、タンパク質の選択的な吸着を実現するだけでなく、タンパク質の構造解析の新たな手段として、有用な手法である。今後、未知タンパク質や複合体の構造解析のツールとして、広く利用されることが期待できる。

7.2 社会的価値:

本研究の成果は、既存のX線構造解析を用いた手法や、複雑な操作と長時間の評価を要するNMRを用いた手法などに代わる、安価で簡便なタンパク質構造解析手法として有用であり、特に医薬品分野における応用が期待できることから、社会的な価値が高い。

7.3_研究成果:

○Selective Fluorescence Detection of Proteins Using Molecularly Imprinted Hydrogels with Aggregation-Induced Emission, K. Kako, E. Kanao, Y. Ishihama, S. K-Yamada, T. Kubo, Journal of Materials Chemistry B, Accepted.

Development of a protein higher-order structure analysis method using hydrogels using photoresponsive molecular imprinting, E. Kanao, T. Nihei, Y. Ishihama, T. Kubo, submitted