

分子インプリント法を用いたアミノ酸吸着ゲルの開発

日大生産工（院）○中村 圭介

日大生産工 高橋 大輔, 和泉 剛

1. まえがき

人体のおよそ 20% を構成しているタンパク質はアミノ酸である。アミノ酸は生体内で合成されるものや食事から摂取しなければならないものもある。このため、近年では健康食品やサプリメントなどの原材料として幅広く利用されてきている。中でもアスパラギン酸は人間のエネルギー源として最も利用されやすいアミノ酸の一つである。好機的代謝に関して最も重要であるクエン酸回路においても重要な役割を果たしている。更に、体内に存在しているアンモニアを体外に排除し、中枢神経系などを守る働きがある。この他にもカリウム、マグネシウム、カルシウムなどのミネラルを運搬する作用があり栄養剤や薬剤などの原料としても多く用いられている。このような効果のあるアスパラギン酸を捕集することには多くのメリットがある。特定の物質を認識させる手法として分子インプリント法がある。分子インプリント法とは認識させる分子を機能性モノマーと反応させ複合体を形成させる。この複合体に架橋剤と重合開始剤を混合し、重合させる。この重合反応によって認識する分子を含んだポリマーが調整される。ポリマーから認識した分子を除去すると特定の分子を認識する鑄型が形成される。この鑄型は目的物質に対して相互作用する官能基が含まれている空間なため目的物質と特異的に反応することができる。¹⁾⁻²⁾ この手法を用いてアスパラギン酸を吸着する

ゲルの開発を目的とした。

2. 実験方法および測定方法

＜単層分子アクリルアミドゲルの調整＞

pH 3.73 に調整したクエン酸/NaOH 緩衝溶液 12.0 cm³ に目的物質であるアスパラギン酸 3.757×10⁻⁴ mol を溶解させた。この溶液にモノマーであるアクリルアミド (AAm), アリルアミン (AA), アクリル酸 (AAc) をそれぞれ 0.0140 mol, 3.757×10⁻⁴ mol, 3.757×10⁻⁴ mol 加えて、攪拌した。架橋剤として *N,N'*-メチレンビスアクリルアミド (BIS) 1.297×10⁻³ mol, 重合促進剤として *N,N,N',N'*-テトラエチルメチレンジアミン (TEMED) 1.006×10⁻³ mol を加えて攪拌した。その後、重合促進剤である 20%の過硫酸アンモニウム水溶液 (APS) 450μl を加えシャーレに溶液を移し重合させた。重合後、直径 3.50 cm の円柱の型によって抜き取った。抜き取ったゲルは pH 12.0 に調整した KCl/NaOH 緩衝溶液に浸してゲルに存在するアスパラギン酸を除去した。

＜二層分子アクリルアミドゲルの調整＞

pH 3.73 に調整したクエン酸/NaOH 緩衝溶液 12.0 cm³ に目的物質であるアスパラギン酸 3.757×10⁻⁴ mol を溶解させた。モノマーである AAm 0.0140 mol を加えて攪拌した。架橋剤である BIS, TEMED をそれぞれ 1.297×10⁻³ mol, 1.006×10⁻³ mol 加え攪拌した。攪拌後、重合

Development of the Amino Acid Adsorption Gel by Molecular Imprinting Method
Keisuke NAKAMURA, Daisuke TAKAHASHI, Tsuyoshi IZUMI

促進剤である 20% APS を 450 μ l 加えシャーレに溶液を移し替え、重合した。

pH 3.73 に調整したクエン酸 / NaOH 緩衝溶液 12.0 cm³ にモノマーである AAm, AA をそれぞれ 0.0140 mol , 3.757 $\times 10^{-4}$ mol 加えて攪拌させた。その後、架橋剤として BIS 1.297 $\times 10^{-3}$ mol を完全に溶解させた。この溶液を上記で調整したゲルに加えた。溶液をゲルに浸漬させるため 2 時間放置した。その後 AAc 3.757 $\times 10^{-4}$ mol, TEMED 1.006 $\times 10^{-3}$ mol を加えて更に 2 時間放置した。放置した溶液に 20% APS を 450 μ l 加えて重合させた。重合後、直径 3.50 cm の型によって抜き取った。抜き取ったゲルは pH 12.0 に調整した KCl / NaOH 緩衝溶液に浸してゲルに存在するアスパラギン酸を 2 日間かけてゲルから放出させた。

<アクリルアミドゲルによるアスパラギン酸の吸光度測定>

調整したアクリルアミドゲルによるアスパラギン酸の吸着を評価した。pH 3.73 に調整したクエン酸/NaOH 緩衝溶液 20.0 cm³ にアスパラギン酸 7.513 $\times 10^{-4}$ mol 加えて溶液を調整した。この溶液にゲルを浸透させて吸着評価を行った。測定は波長 250 nm に設定した紫外可視 (UV-vis) 吸光光度計で毎時間ごとの吸光度を測定した。

3. 結果および考察

<アクリルアミドゲルによるアスパラギン酸の吸着評価>

単層アクリルアミドゲルと二層アクリルアミドゲルのアスパラギン酸に対する吸光度変化を Fig.1 に示す。単層アクリルアミドゲルは測定を始めてまもなく吸光度は上昇した。0 min の吸光度よりも上昇してきていることからゲルが崩壊している可能性もある。二層アクリルアミドゲルは単層アクリルアミドゲルに比べて中の架橋度が高く、低分子のターゲット

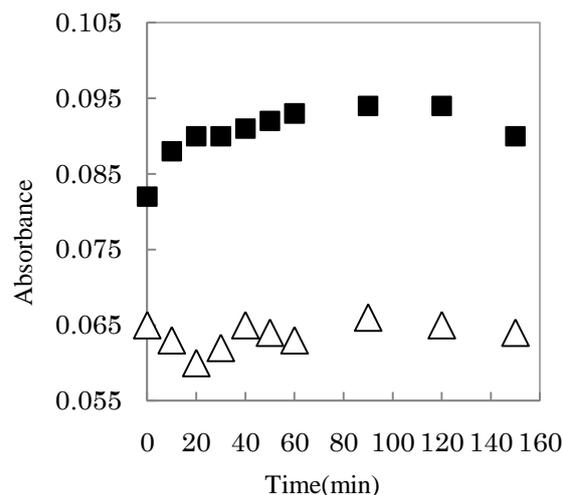


Fig.1 Changes in adsorbance of Aspartic acid to Acrylamide gel with time

△bilaminar Gel ■ Monostratal Gel

を認識しやすくしたゲルである。Fig.1 より、最初の吸光度は減少が見られたがすぐに上昇し平衡に達した。吸着しない原因としては重合したゲル内のアスパラギン酸が放出されていないこと。また、ゲル内に存在しているアスパラギン酸を認識する官能基や鑄型が少ないことが考えられる。

4. 展望

ゲルの網目を狭くするため、架橋剤の量を増加させ目的分子を定着させやすくする。また、目的物質と相互作用するモノマーなどを検討し、アスパラギン酸の吸着を目指す。

5. 参考文献

- 1) 軽部征夫, 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」 松井淳編 「分子インプリント高分子」 株式会社テクノシステム, (2007), pp. 63-69
- 2) DANIEL J.O'SHANNESY, RECENT ADVANCES IN THE PREPARATION AND USE OF MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS FOR ENANTIOMERIC RESOLUTION OF AMINO ACID DERIVATIVES, *Journal of Chromatography*, 470(1989) 391-399