

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	ペプチドの分子認識を基盤とする温度応答性高分子-生体分子間相互作用の制御と材料機能の開拓
Title(English)	
著者(和文)	鈴木星冴
Author(English)	Seigo Suzuki
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11471号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:芹澤 武,石曾根 隆,中嶋 健,古屋 秀峰,斎藤 礼子
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11471号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	応用化学 応用化学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 (工学)	Doctor of
学生氏名： Student's Name	鈴木 星冴		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	芹澤 武	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

温度応答性高分子であるポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) は、均一溶液中やグラフト表面、ハイドロゲルなど様々な形態で機能し、温度に応答して機能を発現するスマートマテリアルとしての応用が広く展開されている。さらにタンパク質やペプチドなどの生体分子に PNIPAM を結合させることで、生体分子由来の緻密な機能と PNIPAM の温度応答性が組み合わさったドラッグ・デリバリー・システムやタンパク質の分離・精製システムなどの新たな機能性材料を構築することが可能となる。しかしながら、合成高分子である PNIPAM を生体分子に結合させるためには、生体分子表面の官能基を介して PNIPAM を合成化学的に修飾する必要や、標的の生体分子に結合するリガンドを PNIPAM にその都度導入する必要があり、これらの手法では共有結合により生体分子の構造や機能自体に影響を与える可能性や PNIPAM へのリガンドの導入に手間や制限があるという問題があった。一方で、人工マテリアルに特異的に結合するペプチドを用いることで、金属や無機結晶のミネラルゼーションを制御できることやマテリアル表面を簡単に機能化できるなど、非共有結合的にマテリアルと生体分子を結合させ、新たな材料機能を発現させることが可能となる。本研究では、PNIPAM に結合するペプチドを創製し、分子ツールとして用いることで、生体分子と PNIPAM をより簡単に結合させて温度応答的な材料機能を新たに開拓し、これまで固液界面に限られていた高分子結合性ペプチドの利用範囲を水溶性高分子水溶液の均一系へと拡張できること目的とした。

第一章では、本論文の背景と目的について述べた。

第二章では、PNIPAM に結合するペプチドを創製することを目的とした。ファージディスプレイ法により構築されたペプチドライブラリーからフィルム状態の PNIPAM のメソ配列に結合する12残基ペプチドをスクリーニングした。得られた30-c2ペプチド (HQIAHKAEHRLR) は、PNIPAM フィルムに対して、 $2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ の結合定数を示し、この値は、リファレンスとして用いたポリメタクリル酸メチルフィルムに対する30-c2ペプチドの結合定数よりも約10倍大きく、30-c2ペプチドは PNIPAM フィルムに特異的に結合することが明らかとなった。さらに、ペプチドの赤外吸収および¹H NMR スペクトルが PNIPAM 水溶液中で変化することがわかり、水に溶解している PNIPAM の構造をペプチドが認識して相互作用できることを見出した。

第三章では、蛍光プローブ法を用い、PNIPAM に対するペプチドの特異的な相互作用を蛍光シグナルの変化として取り出し、水に溶解している水溶性高分子を検出することを目的とした。30-c2ペプチドの C 末端側に環境応答型の蛍光プローブであるアニリノナフチルマレイミド (ANM) を導入し、高分子水溶液中で蛍光スペクトルを測定した。その結果、ペプチドの蛍光強度は PNIPAM 存在下で大きく増大し、その蛍光強度は他の水溶性高分子存在下の場合よりも明らかに高く、水に溶解している PNIPAM に対するペプチドの特異的な相互作用を蛍光シグナル変化として出力できることがわかった。さらに、ペプチドはタンパク質や疎水性高分子/無機ナノ粒子の存在下では水溶性高分子存在下とは異なる蛍光スペクトルを示し、得られた蛍光データを統計学的に解析することで、PNIPAM をはじめとする水溶性高分子を精度よく識別、同定できることを見出した。

第四章では、ペプチドの相互作用を利用して PNIPAM の温度応答性を制御することを目的とした。30-c2ペプチド存在下では、PNIPAM の相転移温度 (PTT) はペプチド濃度に依存して大きく低下することがわかった。熱量変化測定の結果、この PTT の低下はペプチドが PNIPAM と相互作用したことで、PNIPAM の脱水和が促進されたためであることが明らかとなった。PNIPAM 末端に導入した蛍光プローブの蛍光変化を指標とすることで、透過率が変化しない希薄溶液中の PNIPAM の相転移もペプチドの相互作用に基づいて制御でき、ペプチドの相互作用を利用して PNIPAM の温度応答性を一般に制御できることを見出した。

第五章では、PNIPAM に対するペプチドの特異的な相互作用に基づいて、ペプチドで修飾したタンパク質を PNIPAM と温度応答的に共沈殿させて分離することを目的とした。モデルタンパク質としてヒト血清アルブミン (HSA) を用い、HSA に一分子の 30-c2ペプチドを化学的に修飾でき、ペプチドで修飾した HSA は未修飾の HSA と比較して PNIPAM フィルムに対する結合定数が約17倍増大することがわかった。ペプチドで修飾した HSA と PNIPAM を含む水溶液を PTT 以上まで加熱し、遠心することで水に不溶化した PNIPAM を沈殿させた結果、ペプチドで修飾した HSA のほぼ全てが PNIPAM とともに沈殿し、タンパク質表面に修飾したペプチドの PNIPAM への相互作用を利用してタンパク質を溶液中から高効率に分離できることを見出した。

第六章では、ペプチドの特異的な相互作用に基づいて、PNIPAM を含む水性二相系 (ATPS) 中でのペプチド融合タンパク質の分配を制御することを目的とした。モデルタンパク質として Superfolder 緑色蛍光タンパク質 (sfGFP) を用い、sfGFP の N 末端に30-c2ペプチドを遺伝子工学的に融合でき、ポリエチレングリコール (PEG) およびデキストラン (Dex) からなる ATPS 中で、PNIPAM は PEG リッチ相に分配され、sfGFP はペプチド融合の有無に関わらず Dex リッチ相へ分配されることが明らかとなった。PTT 以上でペプチド融合 sfGFP と PNIPAM を相互作用させることで、通常であれば Dex リッチ相へと分配される sfGFP が PNIPAM とともに PEG リッチ相へと分配されることがわかった。一方で、PNIPAM の PTT 以下では、PNIPAM 存在下であってもペプチド融合 sfGFP は Dex リッチ相へと分配され、コイル状態とグロブュール状態に対するペプチドの相互作用の違いを利用することで、ペプチドを融合した望みのタンパク質の分配特性を能動的に制御できることを見出した。

第七章「結論および今後の展望」では、本論文の結論と今後の展望について述べた。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	応用化学 応用化学	系 コース	申請学位(専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	鈴木 星冴		指導教員(主)： Academic Supervisor(main)	芹澤 武
			指導教員(副)： Academic Supervisor(sub)	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Molecular recognition-based interactions of peptides with synthetic polymers are attractive events to non-covalently introduce functionalities onto the polymer surfaces. Despite the widespread use of various water-soluble synthetic polymers, the target polymers for the peptides have been limited in water-insoluble polymers. In this thesis, the peptide with an affinity for water-soluble thermoresponsive polymer (*i.e.* poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)) was identified and applied to expand the applicability of the polymer-binding peptides in the fields of water-soluble polymers.

In chapter 1, the backgrounds and the purposes of this thesis were described.

In chapter 2, the PNIPAM-binding peptide (sequence: His-Gln-Ile-Ala-His-Lys-Ala-Glu-His-Arg-Leu-Arg) was screened from a phage-displayed peptide library against films of PNIPAM with a high meso-diad sequence. The peptide showed a specific affinity with target PNIPAM films and water-soluble PNIPAM dissolved in an aqueous phase.

In chapter 3, the interactions between the peptide and PNIPAM chains were outputted into fluorescence signals of the environmentally-sensitive fluorescence probe conjugated with the *C*-terminus at the PNIPAM-binding peptide. The unique patterns of multivalent discriminative fluorescence signals were generated for various water-soluble synthetic polymers based on peptide-polymers interactions, which allowed precise discrimination and identification of target water-soluble polymers including PNIPAM.

In chapter 4, wide-ranging control of the phase transition behavior of PNIPAM was demonstrated by the specific interaction of peptides to the PNIPAM chains.

In chapter 5, affinity-based co-precipitation of a model protein (*i.e.*, human serum albumin) chemically modified with the peptide with PNIPAM above the phase transition temperature of PNIPAM was demonstrated.

In chapter 6, it was demonstrated that thermodependent peptide affinity with coil-state or globule-state PNIPAM had a potential to control the partitioning of a model protein (*i.e.*, superfolder green fluorescent protein) genetically fused with the peptide in PNIPAM-incorporated aqueous two-phase systems composed of polyethylene glycol and dextran.

In chapter 7, conclusions and future perspectives of this thesis were described.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).