

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)	鈴木星冨
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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	鈴木 星冨	
論文審査 審査員		氏名	職名		
	主査	芹澤 武	教授	齋藤 礼子	准教授
	審査員	石曾根 隆	教授		
		中嶋 健	教授		
古屋 秀峰		准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「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」と題し、全七章から構成されており、日本語で書かれている。本論文は、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) に特異的に結合するペプチドを新たに創製して分子ツールとして用いることで、ペプチドの特異的な相互作用に基づいた材料機能を開拓することを目的としている。

第一章「序論」では本論文の背景と目的について述べている。

第二章「温度応答性高分子結合性ペプチドのスクリーニングと相互作用の評価」では、PNIPAM に結合するペプチドを創製することを目的としている。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ている。得られた 30-c2 ペプチド (H-HQIAHKAEHRLR-NH₂) 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を明らかにしている。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していることを明らかにしている。

第三章「蛍光を指標とした高分子-ペプチド間相互作用の解析と水溶性高分子の検出」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ている。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を明らかにしている。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ている。

第四章「ペプチドの結合による PNIPAM の相転移誘起」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ている。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を見出している。熱量変化測定の結果、この PTT の低下はペプチドが PNIPAM 鎖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を明らかにしている。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ている。

第五章「ペプチドで修飾したタンパク質の温度応答的な共沈殿」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ている。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 倍増大することを見出している。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ている。

第六章「高分子水性二相系におけるペプチドを融合したタンパク質の分配制御」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ている。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を見出している。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を明らかにしている。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、コイル状態とグロビ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ている。

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ている。

これを要するに、本論文はこれまで固体表面に限られていた高分子結合性ペプチドの利用を高分子の水溶液系へと拡張できることをはじめ明らかにし、高分子材料科学におけるペプチドの分子認識の有用性を新たに開拓していることから、工学上ならびに工業上貢献するところが大きい。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意: 「論文審査の要旨及び審査員」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。