

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	撥水性高分子に結合するペプチドの同定と分子糊としての利用
Title(English)	
著者(和文)	木田 勇一
Author(English)	Yuichi Kida
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12412号, 授与年月日:2023年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:芹澤 武,原 正彦,古屋 秀峰,田中 祐圭,澤田 敏樹
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12412号, Conferred date:2023/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

撥水性高分子に結合するペプチドの同定と分子糊としての利用

物質理工学院 応用化学系 応用化学コース 博士後期課程五年 木田勇一

代表的な撥水性高分子である PTFE は、その高い撥水性に加えて、他の分子からの相互作用を受けにくく安定であることに由来する低摩擦性、耐薬品性をもち、それらに基づいて塗装剤やギアといった工業的な利用が様々展開されてきた。さらに、単なる撥水性材料にとどまらず、生体不活性や血液適合性といって生体適合性を生かして細胞パターンニングのための非接着基材や人工血管の基材といったバイオマテリアルとしての利用が様々展開されてきた。PTFE を自在に機能化する手法を確立することができれば、その応用範囲は大きく拡張できるものと期待され、その機能化に向けて金属ナトリウムやプラズマ処理による官能基導入、高強度のレーザー処理による微細構造の形成、表面におけるポリドーパミンの生成といった様々な手法で表面処理が検討されてきた。いずれも機能化を達成できるが、化学処理やプラズマ処理ではいずれも PTFE 表面に対して官能基がフッ素原子の置換によって導入されるため、PTFE 固有の性質が損なわれることが懸念され、また化学処理では煩雑なプロセスが必要であり、プラズマ処理やレーザー処理では複雑な装置を必要とするのに加えて表面の微細構造も変化することが知られているため、PTFE 表面の機能を損なうことなく簡便に修飾することは未だに困難である。一方で、これまでにマテリアルがもつ構造を認識して特異的に結合するペプチドを用いることで非共有結合でありながら強固にマテリアルと機能性分子を、ペプチドを介して結合させることができ、結果としてマテリアル自身の特性を損なうことなく表面を簡便に機能化できることが報告されている。本研究では、PTFE に対して非共有結合的に結合するペプチドを同定し、さらに PTFE を表面修飾するための分子糊としての利用の可能性を明らかにすることを目的とした。

第一章では、代表的な撥水性高分子である PTFE に対して結合するペプチドを同定する意義、ならびにそれらを PTFE の表面修飾のための分子糊として利用する意義について概観した後に本論文の目的を述べた。

第二章「撥水性高分子に対するペプチドのスクリーニングと特性評価」では撥水性高分子である PTFE に結合するペプチドを同定することを目的として、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 PTFE に結合する12残基ペプチドをスクリーニングした。5ラウンドのバイオパニング後において、同じペプチド配列を提示したファージクローンが複数存在しており、また配列に相同性をもつファージクローンが多数確認されたことから PTFE フィルムに結合するファージの集団へと濃縮されたことが示唆された。ファージクローンに提示されたペプチドを構成するアミノ酸の割合をファージライブラリーと比較すると、一部のアミノ酸の割合が高くなっており、それらのアミノ酸が PTFE に対する相互作用やペプチドの構造の安定化に寄与していると考えられる。ファージクローンあるいは WT ファージを修飾したフィルムの濡れ性について評価した結果、ファージの固定化によって PTFE フィルムが親水化されることがわかった。ファージクローンに提示されたペプチド配列によって接触角の値に差が見られ、ファージに提示されたペプチドが PTFE との相互作用に寄与していることが示唆された。中でも、最も PTFE フィルムを親水化させたファージクローンの12-c1では接触角が WT ファージと比較して20°程度小さくなり、ファージに提示されたペプチドが PTFE との相互作用に寄与することが示唆された。ファージを修飾した PTFE フィルムを原子間力顕微鏡により観察すると、未修飾の PTFE フィルム表面上では見られなかった繊維状の構造体が確認された。また、12-c1を修飾した際には WT ファージを用いた場合にはあまり見られない扁平状の構造体が多数確認され、この構造体はファージが PTFE フィルム上に多数存在することで部分的に集合、凝集したものであると考えられる。フィルム上に存在するファージの長さの合計を算出した結果、ファージ

クローンが WT ファージと比較して PTFE フィルム上により多く存在していることが明らかとなった。ファージの結合量を抗 M13ファージ抗体による ELISA で定量化することを試みたが、12-c1と WT ファージの吸光度に差は見られなかった。これは、乾燥によりファージが凝集あるいは変性した可能性が考えられ、結果として抗体が十分にファージを認識できていないためであると考えられる。ファージクローン12-c1に提示されたペプチドの CD スペクトルを測定した結果、その二次構造も α ヘリックスを一部含むランダムコイルであることが明らかとなった。また、12-c1ペプチドに含まれる一部の配列は両親媒性の α ヘリックス構造を形成し PTFE フィルムに対する相互作用に寄与していると考えられる。さらに、PTFE 表面への12-c1ペプチドの結合様式を明らかにするために、分子動力学シミュレーションにより室温での平衡状態を解析した結果、PTFE 表面上の12-c1ペプチドは平坦な形状を示し接触面積の広さが PTFE との相互作用に寄与していると考えられる。また、12-c1ペプチドの配列を置換したペプチドの分子動力学シミュレーションの結果から、12-c1ペプチドは各性質のアミノ酸が適切な位置に存在することによって、反りや絡み合いを生じることなく平坦な構造で安定化されていることが示された。以上の結果から、ファージライブラリーを用い、標的である PTFE フィルムに対するスクリーニングにより、PTFE に結合するペプチドを獲得することに成功した。

第三章「ペプチド融合 NanoLuc による PTFE 表面の修飾」では、スクリーニングにより獲得したペプチドの結合能を評価するとともに、機能性タンパク質により PTFE を機能化するための分子糊として有用であることを明らかにすることを目的として、低分子量の発光タンパク質である NanoLuc (Nluc) に対してペプチドを遺伝子工学的的手法により融合し、基質を添加後の発光強度を測定することで、Nluc を用いたペプチドの結合を評価した。小型の発光タンパク質である Nluc に対して遺伝子工学的的手法によりペプチドを融合したタンパク質を様々な濃度で PTFE と相互作用させ、基質を添加後に測定された発光強度に対して Langmuir 型吸着等温式でフィッティングすることで見かけの結合定数 K_d を決定した結果、ペプチドの融合により確かにより大きな K_d の値を示すことが分かり、タンパク質に融合されたペプチドが PTFE に対して結合能をもつことが示され、獲得したペプチドが PTFE をタンパク質により機能化するための分子糊として有用であることを見出した。

第四章「ファージ修飾した PTFE フィルムの交互積層法による機能化」では、ファージで修飾した PTFE フィルムに対して交互積層法により合成高分子あるいは酵素を積層させることにより PTFE 表面を機能化することを目的とした。カチオン性高分子およびアニオン性高分子を用いて積層させると、ファージを修飾した PTFE フィルムは未修飾の PTFE フィルムと比較して早い積層段階から表面が親水化され、高分子膜が容易に形成されることが明らかとなった。さらに、カチオン性合成高分子と酵素を積層させると、ファージを修飾した PTFE フィルムでは、酵素の固定化量が増大することが見出された。このように、PTFE 表面を機能化するうえで、ペプチドを提示したファージクローンを利用することが有用であることが示された。

第五章「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。