

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	蛋白質結晶の分子設計による超分子構造体の創製
Title(English)	
著者(和文)	根岸走
Author(English)	Hashiru Negishi
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10917号, 授与年月日:2018年6月30日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上野 隆史,櫻井 実,丸山 厚,小島 英理,金原 数
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10917号, Conferred date:2018/6/30, 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

専攻： Department of	生体分子機能工学	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（工学）
学生氏名： Student's Name	根岸 走		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	上野 隆史	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)	田口 英樹	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文では、「蛋白質結晶の分子設計による超分子構造体の創製」と題し、細胞内蛋白質結晶を利用し、結晶の溶解性や溶解後の構造を制御することにより、機能性材料の創製を目指した。

第一章の緒言では、蛋白質超分子構造体の構築手法や蛋白質結晶の機能性材料としての利用について記した。近年、人工的に蛋白質超分子構造体を構築し、新たな材料として利用する研究が進められている。我々は、これまで蛋白質結晶の特異な構造に着目し、新規材料を開発してきた。蛋白質結晶は、蛋白質分子が規則正しく配列することにより形成され、溶液中の蛋白質とは異なる機能的特徴を有する。特に、細胞内で蛋白質が自発的に集積し、結晶化する細胞内蛋白質結晶は、安定な蛋白質結晶が簡便に得られるため、注目されている。本研究では、細胞内結晶化現象による蛋白質結晶の形成反応や結晶の溶解反応を利用し、新規酵素保存材料の開発や機能性超分子構造体の創製を試みた。

第二章では、多角体と呼ばれる昆虫細胞内で結晶化する蛋白質結晶を利用し、細胞内で多角体結晶へ酵素を内包すること、結晶溶解による活性を維持したまま内包酵素を放出することを達成した。多角体結晶は、乾燥、凍結、酸などに対して結晶性を維持する高い安定性を有するが、pH 10 以上の塩基性溶液中では溶解する。また、H1 ヘリックスと呼ばれるタグペプチドを融合した外来蛋白質は、多角体蛋白質と昆虫細胞内で共発現すると外来蛋白質が内包された多角体結晶が細胞内で合成される。これらの特徴を活かし、多角体結晶を利用した酵素保存材料の構築を試みたが、野生型の多角体結晶は、pH 10 以上の塩基性溶液にしか溶解しないため、結晶溶解により放出される酵素がほとんど失活する問題点がある。そこで、野生型の多角体結晶より低い pH で溶解可能な変異体結晶を設計した。変異体結晶は、野生型の多角体結晶では溶解できない pH 8.5 で溶解し、内包酵素は活性を維持したまま結晶から放出された。また、酵素を内包した変異体結晶を 1 週間乾燥保存し、酵素活性を評価した結果、乾燥による酵素の著しい活性低下を防ぐことができた。以上より、多角体の変異体結晶を利用することで細胞内 one-pot で酵素を内包した結晶が合成され、酵素の安定保存と活性を維持したまま結晶からの放出が達成され、酵素保存材料としての有用性が示された。

第三章では、多角体結晶を利用し、結晶内特有な三量体からなる超分子かご型構造体を結晶溶解後も溶液中で保持させ、蛋白質超分子構造体の新たな構築手法を確立した。具体的には、多角体結晶内の単量体同士をジスルフィド結合により架橋化し、かご型構造体を安定化することで、結晶溶解後も溶液中でかご型構造体を保持させた。初めに、多角体結晶内の単量体分子界面ヘシステインを導入した変異体を設計し、昆虫細胞内で結晶化させた。続いて、変異体結晶を酸化し、結晶内ジスルフィド結合を形成させた後、塩基性溶液で溶解させることでかご型構造体を溶液中へ切り出すことを達成した。一方、溶液中において酸化による単量体同士の架橋化では、ランダムな会合による凝集体が形成され、かご型構造体が構築できなかった。以上より、結晶内でジスルフィド結合を形成した後、結晶を溶解することにより結晶内特有のかご型構造体が構築できることが示された。この手法を利用することで、数万種類に及ぶ蛋白質結晶から多種多様な超分子構造体が構築できることが示唆された。

第四章では、第三章で確立した手法を他の蛋白質結晶へ適用し、フィラメント構造体を構築した。具体的には、昆虫細胞内で結晶化する TbCatB 蛋白質を利用し、TbCatB 結晶内に存在する特有のフィラメント構造体の構築を試みた。そのために、結晶内の単量体分子界面ヘシステインを導入した変異体を設計し、昆虫細胞内で結晶化させた。変異体結晶は、導入したシステインが自発的にジスルフィド結合を形成し、酸化処理をしなくても単量体同士が架橋化された。従って、変異体結晶を溶解するだけでフィラメント構造を構築することができた。以上より、細胞内結晶化により単量体同士が自発的にジスルフィド結合で架橋化し、変異体結晶を溶解するだけでフィラメント構造体の構築を達成した。

第五章では、第二章から第四章までの成果とその意義をまとめた。細胞内結晶化現象による分子内包や特異な集積構造の形成を利用することで、機能的な蛋白質結晶の構築を達成した。また、細胞内蛋白質結晶の分子界面を設計することにより、結晶の溶解性や溶解後の蛋白質の構造を制御することができ、新たな機能を付与することができた。本論文の手法を様々な蛋白質結晶に適用することで、特定の環境にตอบสนองして溶解する蛋白質結晶や、目的の超分子構造体を切り出せる蛋白質結晶を構築でき、機能性材料としての応用が期待される。

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).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	生体分子機能工学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名 : Student's Name	根岸 走		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	上野 隆史	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	田口 英樹	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

In this thesis, I have constructed novel biomaterials by utilizing in cell protein crystallization and dissolution of protein crystals.

In chapter II, I have succeeded in construction of protein crystals, which can be used as enzyme containers for long-term storage of enzymes with retention of activity. To construct enzyme containers utilizing protein crystals, we focused on polyhedra crystals, which crystallize in insect cells. Polyhedra crystals have the ability to encapsulate exogenous enzymes in insect cells and retain activity of encapsulated enzymes against harsh conditions, such as dryness, freezing and acid. By engineering the interfaces between monomers in polyhedra crystals to control solubility of the crystals, we can construct mutant polyhedra crystals, which can be dissolved and release encapsulated enzymes with retention of activity.

Chapter III describes a method for construction of supramolecular protein assemblies within protein crystals. Recently, supramolecular protein assemblies have been rationally designed via chemical engineering of protein-protein interactions. However, it remains challenging to construct protein assemblies with higher ordered structures in solution. Here we propose a strategy for the construction of protein assemblies utilizing protein crystal, which have highly ordered arrangements of protein molecules. Polyhedra crystals have unique protein cages composed of trimers within the crystals. To construct the protein cages, we introduced cysteine residues at interfaces between monomers. By oxidation of the cysteine mutant crystals for cross-linking between monomers through disulfide bonds and dissolution of the crystals, we have succeeded in construction of supramolecular protein cages from the crystals.

Chapter IV describes the construction of one-dimensional extended structures utilizing protein crystals. By applying the method of chapter III to TbCatB crystals, which are formed in insect cells, we also have succeed in construction of filament structures from TbCatB mutant crystals without oxidation treatment.

In conclusion, we can construct various protein-based materials utilizing in cell protein crystals by design of protein-protein interfaces within protein crystals in order to control dissolution of protein crystals and supramolecular structures dissolved from the crystals.

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).