

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	生体材料開発に向けた蛋白質結晶エンジニアリング
Title(English)	Engineering of protein crystals for development of artificial biomaterials
著者(和文)	ティエンカーングエン
Author(English)	tien Khanh Nguyen
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11623号, 授与年月日:2020年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:上野 隆史,丸山 厚,金原 数,小島 英理,松田 知子
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11623号, Conferred date:2020/9/25, 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	Tien Khanh Nguyen	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	上野隆史	教授	松田知子	准教授
	審査員	丸山厚	教授		
		小島英理	教授		
	金原数	教授			

## 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「Engineering of protein crystals for development of artificial biomaterials」と題し、英語で書かれ、5章より構成されている。蛋白質結晶を利用し、結晶中の蛋白質構造や、外来蛋白質の集積反応を制御することにより、機能性材料の創製を目指している。

第一章「General Introduction」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述べている。近年、新たな材料として人工的に蛋白質超分子構造体を構築する研究が進められている。本申請者らは、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いる。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る固体分子材料であり、溶液中の蛋白質とは異なる機能的特徴を有している。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、安定な蛋白質結晶作成法として、注目されている。本研究では、蛋白質結晶の形成反応や結晶の溶解反応を利用した超分子構造体の創製や細胞内蛋白質結晶化反応を用いた異なる外来酵素の集積制御による機能材料の作成を試みている。

第二章「Construction of supramolecular nanotubes from protein crystals」では、Rubisco を利用し、試験管内で得られる結晶内で形成される特有チューブ構造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ている。具体的には、Rubisco 結晶内の 10 量体リング集合体同士をジスルフィド結合により架橋化し、構造体を安定化することで、結晶溶解後も溶液中でチューブ型構造体を保持させている。初めに、Rubisco 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、結晶化させている。続いて、変異体結晶を酸化し、結晶をバッファー溶液で溶解させることだけでは、予想したチューブ構造を検出することはできなかった。そこで、リンカー分子で架橋したところ、結晶内特有のチューブ構造体が構築できることが示されている。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ている。

第三章「In-cell immobilization of cascade enzymes into polyhedral protein crystals for construction of solid-biocatalysts」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、細胞内で多角体変異体の結晶化と異なる種類の酵素を同時に内包し、カスケード反応を駆動することに成功している。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している。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、多角体結晶に大きな空孔を形成し、酵素の集積とその反応を試みたところ、変異体結晶は、野生型の多角体結晶に比べ、外来酵素の取り込み量が4倍、触媒活性で2倍程の向上が見られている。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複合結晶を固体触媒として利用することに成功し、酵素材料としての有用性が示された。

第四章「Engineering of polyhedral protein crystals within *E. coli* for construction of multi-layered solid materials」では、第三章で確立した手法を他の蛋白質の集積へ適用し、多角体結晶への外来蛋白質の精密積層構造体の構築について述べられている。具体的には、細胞内で結晶化する多角体と H1 タグを有する二種類の蛍光蛋白質を異なるプロモーターで発現するシステムを構築し、発現タイミングを変えることによって、多角体結晶への集積反応のタイミングを制御することを試みている。共焦点蛍光顕微鏡観察から、結晶の外側と内側で二種類の蛍光蛋白質の存在比が異なることが明らかとなっている。以上より、細胞内結晶化により多層構造が制御された多角体の複合結晶の構築を達成している。

第五章「General Conclusion」では、第二章から第四章までの成果とその意義がまとめられている。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ている。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ている。本論文の手法を様々な蛋白質結晶に適用することで、多段階反応を触媒する蛋白質結晶や、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。

以上を要するに、本論文は蛋白質結晶を利用した機能性バイオ材料の創製に関する多くの成果や知見が得られるものであり、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。