

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

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
学生氏名： Student's Name	木田 勇一	

申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 (工学) Doctor of
指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	芹澤 武
指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	澤田 敏樹

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「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」と題し、全五章で構成されている。本論文は、撥水性高分子であるポリ(テトラフルオロエチレン) (PTFE) に対して非共有結合により結合するペプチドを同定し、PTFE 材料を表面修飾するための分子糊としての利用可能性を明らかにすることを目的とした。

第一章「序論」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、PTFE に結合するペプチドをペプチドライブラリーからスクリーニングした。ファージディスプレイ法により構築された 12 残基のペプチドライブラリーを用い、5 ラウンドのスクリーニング操作を行った。同じペプチド配列を提示した複数のファージクローンが同定され、また配列に相同性をもつファージクローンを多数確認されたことから、PTFE 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。ファージクローンあるいは野生型 (WT) ファージを修飾した PTFE フィルムの濡れ性について評価した結果、ファージの修飾によって PTFE フィルムが親水化されることが明らかとなった。また、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された。PTFE フィルムを最も親水化させたファージクローン (12-c1) について、12-c1 で修飾した PTFE フィルムの表面を原子間力顕微鏡により観察した結果、ファージと考えられる繊維状の構造体を多数確認され、その数は WT ファージで修飾した場合よりも多いことが明らかとなった。さらに、PTFE 表面への 12-c1 に提示されたペプチド (12-c1 ペプチド、アミノ酸配列: Val-His-Phe-Pro-Thr-Lys-Ile-Ser-Glu-Gly-Asp-Met) 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結合の平衡状態や剥離エネルギーを解析した。解析結果から、PTFE 表面にペプチドが強く結合するためには、平坦な形状のペプチドが広い接触面積で相互作用することが重要であると考えられる。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 ペプチドは各アミノ酸の適切な配置によって、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と推察され、以上のように、ファージに提示されたペプチドライブラリーを用いたスクリーニングにより、PTFE に結合するペプチドを同定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、タンパク質により PTFE を機能化するための分子糊としてペプチドが有用であることを明らかにすることを目的とした。低分子量の発光タンパク質である NanoLuc (Nluc) に PTFE 結合性ペプチドを融合し、Nluc による発光を利用して結合能ならびに機能化について評価した。ペプチドの融合により Nluc の発光は変化せず、ペプチドの融合が Nluc の機能そのものに影響を及ぼさないことが明らかとなった。ペプチド融合 Nluc を PTFE と相互作用させた後に Nluc の基質を添加し、引き続き発光強度を測定することで、Nluc の濃度依存的な発光強度を測定した。この濃度依存性を Langmuir 型吸着等温式にフィッティングすることで見かけの結合定数を決定した結果、ペプチドの融合により見かけの結合定数が増大することが明らかとなった。このように、タンパク質に融合したペプチドが PTFE に対して結合能をもつことが示されたとともに、PTFE をタンパク質により機能化するための分子糊として、獲得したペプチドが有用であることが見出された。

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、PTFE 結合性ペプチドを提示したファージを修飾した PTFE フィルムに対して、交互積層法により合成高分子や酵素を積層させて PTFE 表面を機能化することを目的とした。カチオン性ならびにアニオン性の合成高分子を積層させると、ファージを修飾した PTFE フィルムでは未修飾の PTFE フィルムと比較して早い積層段階からフィルム表面が親水化され、高分子薄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「結論と今後の展望」では、本論文を総括し、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：	応用化学	系
Department of, Graduate major in	応用化学	コース
学生氏名：	木田 勇一	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(工学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	芹澤 武	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：	澤田 敏樹	
Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

This thesis aimed to identify peptides that bind to poly(tetrafluoroethylene) (PTFE), a water-repellent polymer, through non-covalent bonds, and their potential use as molecular glues for surface modification of PTFE materials.

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

In chapter 2, Affinity-based screening against PTFE resulted in an M13 phage clone with 12-mer peptides with affinity for PTFE (sequence: Val-His-Phe-Pro-Thr-Lys-Ile-Ser-Glu-Gly-Asp-Met). The static contact angle value of the PTFE film modified with the phage clone was smaller than that of the film modified with wild type (WT) phage. It was therefore indicated that the modified PTFE became hydrophilic through the binding of the phage clone. Furthermore, atomic force microscopy observations revealed that the bound amount of the phage clone was relatively greater than that of WT phage. To obtain insight into the binding state of the peptide to the PTFE surface, the equilibrium state of the peptide/PTFE interface at room temperature was simulated by molecular dynamics. As a result, the flat shape and structural stability caused by the balanced sequence and proline effect appeared to be dominant factors in the strong affinity of the peptide to PTFE.

In chapter 3, fusion proteins consisting of the identified peptide and NanoLuc (Nluc), a bioluminescent protein, were prepared by using genetic engineering techniques. The luminescence intensity of the prepared fusion protein (Peptide-Nluc) and WT Nluc bound onto the PTFE surface was measured under various concentration conditions, and the results were fitted to a Langmuir adsorption model. The apparent binding constant of the Peptide-Nluc was more than 4.1 times greater than that of WT Nluc.

In chapter 4, PTFE surfaces modified with the phage clone can be functionalized more efficiently by synthetic polymers and enzymes by using the Layer-by-Layer method.

In chapter 5 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).