

学位論文の要旨

氏名

宇都 甲一郎

学位論文題目

ケージ型タンパク質をベースとしたナノ構造制御された新規ソフトマテリアルの設計と機能評価に関する研究

本論文は、ケージ型タンパク質をベースとしたナノ構造制御された新規ソフトマテリアルの設計及び機能評価についてまとめたものである。ケージ型タンパク質として、鉄貯蔵タンパク質として知られるフェリチンに着目し、高分子を用いた自己集合挙動を制御することで二次元あるいは三次元構造を有するフェリチンタンパク質/高分子複合体を創製した。またフェリチンの界面（外部・内部・サブユニット間）の特性を利用あるいは制御することで複合体の高機能化と新規なソフトマテリアル創製法について検討した。

第1章は、高分子薄膜、ケージ型タンパク質、タンパク質集積に関する研究背景及び本論文の目的について述べた。

第2章は、様々な金属を含有可能であるフェリチンタンパク質と高分子電解質多層膜表面の静電的吸着について述べた。高分子電解質多層膜の最表面あるいはフェリチン表面の荷電状態を制御することでフェリチンタンパク質の二次元単層配列に成功した。さらに二次元での高密度集積に対し、タンパク質吸着時の化学的因子（pH、濃度あるいはイオン強度）に加え物理的因子（洗浄/乾燥プロセス）の重要性を議論した。

第3章では、前章で明らかにしたタンパク質の吸着特性を利用して、鉄コアを保持するフェリチンと保持しないアポフェリチンのブレンド吸着について評価した。ブレンド吸着挙動は水晶発振子マイクロバランス、X線光電子分光法さらには走査型電子顕微鏡による鉄コアの直接観察により検討した。その結果、これらタンパク質の原子レベルで同じ構

造は溶液中の溶液組成を反映した理想的なブレンド吸着挙動を起こすことを明らかとし、従来法では困難である単層レベルで複数金属を組成制御できる可能性を示した。

第4章は、高分子電解質多層膜上に固定化されたフェリチンタンパク質の内部空間を利用したバイオミネラリゼーションについて述べた。生体内での鉄貯蔵をモデルとし、酸化鉄コア形成について検討した結果、フェリチンタンパク質は固定化されているにも関わらずバイオミネラリゼーション能を維持していることが確認され、高分子電解質多層膜はタンパク質の機能を損なうことなく集積可能な界面を提供することが示唆された。

第5章は、前章でのバイオミネラリゼーションの応用展開として非天然型酸化コバルトコアの形成について述べた。酸化鉄形成と異なり酸化コバルト形成は(アポ)フェリチンの内部空間体積に依存せず、フェリチン酸化鉄コアにより促進されることが示唆され、基板上への固定化の有無によりミネラリゼーション挙動に差異が確認された。この特徴的なミネラリゼーション挙動にフェリチン/アポフェリチンブレンド膜を適用した結果、単一ケージ内で鉄/コバルト二元酸化物を位置選択的に析出することに成功した。

第6章は、静電相互作用を駆動力としたフェリチンタンパク質の三次元集積について述べた。分子内にカルボキシル基を均一に含有する高分子との静電相互作用によりフェリチンタンパク質の三次元集積が可能であり、カルボキシル基含量により集積プロセスを制御できることが示唆された。さらに共有結合による三次元集積膜の安定化にも成功した。

第7章は、溶液中での自己集合制御を目的としたフェリチンタンパク質の異方的高分子修飾について述べた。高分子電解質多層膜表面上に単層で固定化された状態で高分子修飾することで高分子を異方的に導入可能であることが示唆された。また異方的に高分子修飾されたフェリチンタンパク質は未修飾とは異なり等電点付近で安定な集合体を形成し、高分子鎖の導入量をコントロールすることで自己集合挙動を制御することに成功した。

第8章は、本研究全体(1章-7章)を総括した。

論文審査の要旨

報告番号	理工研 第325号	氏名	宇都 甲一郎
審査委員	主査	青柳 隆夫	
	副査	門川 淳一	橋本 雅仁
<p>学位論文題目 Studies on Design and Characterization of Protein Cage-Based Novel Soft Materials with Controlled Nanostructures (ケージ型タンパク質をベースとしたナノ構造制御された新規ソフトマテリアルの設計と機能評価に関する研究)</p> <p>審査要旨</p> <p>提出された学位論文及び論文目録等を基に学位論文審査を実施した。本論文は、ケージ型タンパク質をベースとしてナノ構造制御された新規ソフトマテリアルの設計及び機能評価についてまとめたものであり、全8章より構成されている。</p> <p>第1章は序章である。高分子薄膜、ケージ型タンパク質、タンパク質集積に関する研究背景及び本論文の目的について述べている。</p> <p>第2章では、様々な金属を含有可能であるフェリチンタンパク質と高分子電解質多層膜表面の静電的吸着について述べている。高分子電解質多層膜の最表面あるいはフェリチン表面の荷電状態を制御することでフェリチンタンパク質の二次元単層配列制御の可能性を検討している。</p> <p>第3章では前章で明らかにしたタンパク質の吸着特性を利用して、鉄コアを保持するフェリチンと、保持しないアポフェリチンのブレンド吸着について評価している。</p> <p>第4章では、高分子電解質多層膜上に固定化されたフェリチンタンパク質の内部空間を利用したバイオミネラリゼーションについて検討している。生体内での鉄貯蔵をモデルとし、酸化鉄コア形成について検討した結果、フェリチンタンパク質は固定化されているにも関わらずバイオミネラリゼーション能を維持していることを見いだしている。</p> <p>第5章では、前章でのバイオミネラリゼーションの応用展開として非天然型酸化コバルトコアの形成について述べている。酸化鉄形成と異なり酸化コバルト形成は(アポ)フェリチンの内部空間体積に依存せず、フェリチン酸化鉄コアにより促進されることが示唆され、基板上への固定化の有無によりミネラリゼーション挙動に差異が生じることを確認している。</p> <p>第6章は、静電相互作用を駆動力としたフェリチンタンパク質の三次元集積について述べている。分子内にカルボキシル基を均一に含有する高分子との静電相互作用によりフェリチンタンパク質の三次元集積が可能であることを見いだしている。</p> <p>第7章は、溶液中での自己集合制御を目的としたフェリチンタンパク質の異方的高分子修飾について述べている。高分子電解質多層膜表面上に単層で固定化された状態で高分子修飾することで、高分子を異方的に導入可能であることを見いだしている。また異方的に高分子修飾されたフェリチンタンパク質は未修飾とは異なり等電点付近で安定な集合体を形成し、高分子鎖の導入量をコントロールすることで自己集合挙動を制御することに成功している。</p> <p>第8章は結論である。</p> <p>以上、本論文はケージ型タンパク質であるフェリチンを用いてナノ構造制御された新規ソフトマテリアルへの展開を目的に、その材料設計及び機能についてまとめたものである。得られた成果は、生体関連領域に応用可能な新材料創製のために大きく寄与する。よって、審査委員会は博士(工学)の学位論文として合格と判定する。</p>			

最終試験結果の要旨

報告番号	理工研 第325号	氏名	宇都 甲一郎
審査委員	主査	青柳 隆夫	
	副査	門川 淳一	橋本 雅仁
<p>2010年2月3日15時00分より理工系総合研究棟2階のプレゼンテーションルームにおいて、学位論文発表会が開催された。32名の出席者があり、本研究の背景、実際の研究の経過について詳細な説明と質疑応答が行われた。具体的には、研究の背景、吸着層となる高分子薄膜の形成、フェリチンの構造や性質、薄膜への積層およびバイオミネラリゼーション挙動、さらにソフトマテリアルへの展開を目的とした高分子修飾について系統的に説明が行われた。その後、両副査を含め会場から研究全般にわたる質疑応答が行われた。おもな内容は以下の通りである。</p> <p>【質問】ポリエチレングリコール修飾サンプルを大量に調製するのにシリカ微粒子を用いているが、その際フェリチンの吸着量の制御は行っているのか。</p> <p>【回答】QCM基板では吸着量の制御は行っているが、シリカ微粒子は凝集しやすいために、シリカ微粒子の場合は最大吸着量の条件で行っている。</p> <p>【質問】ポリエチレングリコールの導入量とその反応の均一性についての見解は。</p> <p>【回答】フェリチン分子中の一つのサブユニットに3つのリシン残基を有している。その中でも83番目のリシンのアミノ基の反応性が高いという報告がある。いずれにせよ、トータルとしてフェリチン分子あたり数本という結果であるが、これはあくまで平均値である。</p> <p>【質問】フェリチンの当電点がポリエチレングリコール修飾によって変化する懸念はないのか。結果として凝集挙動が変化してしまうのでは。</p> <p>【回答】可能性はある。しかし、修飾後も修飾前の当電点付近での凝集が起こっており、当電点自身はそれほど変化していないと考えている。</p> <p>【質問】フェリチンとポリマーの交互積層膜の詳細について、フェリチン同士の反応の可能性は、ポリマーを用いずにフェリチンの積層は可能か、ポリマーとして温度応答性の高分子を用いているが、交互積層膜の温度応答性は発現するのか。</p> <p>【回答】フェリチン分子同士の架橋も全くないとはいえない。ポリマーを用いずに積層しようとする、その積層構造の均一性が得られない。カルボキシル基を持った温度応答性高分子を用いたが、積層膜の温度応答性は得られていない。これは、フェリチン分子の大きさと用いたポリマー分子の大きさが違いすぎるためである。今回用いたポリマーは均一にカルボキシル基が導入されているので積層膜の均一性が保たれている。</p> <p>【質問】AFMによるフェリチンおよびアポフェリチンの大きさを比較すると、アポフェリチンがやや小さくなって観察されているが、その理由は。</p> <p>【回答】測定精度の問題も考えられる。しかし、アポフェリチンは内部に鉄を含んでいないので、全体としてつぶれている可能性はある。柔らかい性質のために密に固定化され小さく見積もっている可能性はある。</p> <p>【質問】ポリエチレングリコールを異方性修飾したフェリチンの会合・凝集挙動はどのように調べるのか。</p> <p>【回答】TEM観察あるいは、動的散乱挙動を調べれば、凝集体の大きさを見積もることができる。静的散乱挙動を調べれば会合数を評価できる。</p> <p>以上のように各質問に対して的確な回答が得られ、審査委員会は申請者が博士課程の修了者としての学力ならびに見識を有するものと認め、博士(工学)の学位を与えるに足りる資格を有するものと判定した。</p>			