

コエダ シュウヘイ

氏 名 小枝 周平

学位の種類 博士 (ナノメディシン科学)

学位記番号 博第1096号

学位授与の日付 平成29年3月23日

学位授与の条件 学位規則第4条第1項該当 課程博士

学位論文題目 新規界面活性剤PG-surfactantの合成と機能評価
(Synthesis and characterization of novel Peptide Gemini Surfactant)

論文審査委員 主査 教授 山下 啓司
教授 出羽 毅久
准教授 水野 稔久
教授 尾関 哲也
(名古屋市立大学)

論文内容の要旨

界面活性剤研究の歴史は長く、食品・生活・工業など多岐に渡る分野でその検討がなされている。また近年では、ナノテクノロジー分野や生体模倣工学の分野においても、人工的に設計された界面活性剤 (両親媒性分子) を用いたボトムアップ的手法の研究が進んでおり、生体由来分子のペプチドを用いた両親媒性分子の開発も検討されている。ペプチドは複数のアミノ酸が特定の順番で縮合し繋がった分子であり、アミド結合同士の水素結合、側鎖同士の特異的な相互作用により、 α -ヘリックスや β -シートなどの立体構造を形成だけではなく、細胞表面や蛋白質、無機材料などといった非自己分子に対する特異的な相互作用も可能とする。このようなことから、これらペプチド部位を含む界面活性剤の開発は、バイオテクノロジー分野において利用可能な、様々な機能分子の創出が期待される。そこで私は、特に膜蛋白質の可溶化、あるいは膜蛋白質を用いた半人工分子素子構築をサポートする新規試薬の開発に、ペプチド配列を含む新規の界面活性剤を利用することに着想した。本論文ではこれまでに報告の限られていた、ペプチド配列を含むジェミニ型界面活性剤(PG-surfactant)の新規合成とその機能評価、さらに膜蛋白質可溶化試薬への応用、膜蛋白質を内包可能な新規二分子膜形成分子への応用、また膜蛋白質を用いた半人工分子素子構築をサポートする新規試薬開発への応用について論じた。各章は次のようにまとめられる。

第1章は、序論であり、本研究の有用性をまとめた。

第2章では、二分子膜形成分子としてリンカーペプチド部分にオリゴアスパラギン酸の配列を持つ PG-surfactant DnC_{12} , $Cr-DnC_{12}$ を合成し、これらの二分子膜形成挙動の評価を行った。その結果、分子内にジスルフィド結合を有し、分子の動きを制限させた $Cr-D_2C_{12}$ が、膜蛋白質である LH2 (Light-Harvesting Complex 2) を、自身の形成する二分子膜中に安定に

固定化出来ることを見出した。

第3章では、PG-surfactantの分子骨格を持つ新規膜蛋白質可溶化試薬の開発を行った。ペプチド部位の配列スクリーニングにより、中性で安定に溶解できる誘導体としてDKDKC₁₂K及びDKDKC₁₂Dを取得し、これらの膜蛋白質可溶化能を、PSI、II (photosystem I, II) といった膜蛋白質を用いて検討した。その結果、これら試薬が膜蛋白質を変性させることなく可溶化できる、可溶化試薬としての能力を備えていることを見出した。また、膜蛋白質に対する表面修飾試薬としての機能評価のため、電子受容体(メチルビオロゲン、MV)をペンダントした、MV修飾誘導体MV-DKDKC₁₂Kも設計した。この試薬により可溶化することで、光照射時にPSI内部からの電子引き抜き効率の向上が見られた。

第4章では、PG-surfactantの分子骨格を持つ新規の膜蛋白質抽出試薬の開発を行った。二分子膜からの膜蛋白質抽出能の向上のためには、界面活性剤そのものの疎水性の増加とともに、アルキル鎖の脂質膜への挿入効率の上昇が必要と推測された。そこでリンカーペプチド部位に、β-ターン構造をとるペプチドモチーフを導入し、PG-surfactant NPDGC₁₂KKを開発した。シアノバクテリアのチラコイド膜を用いた膜蛋白質の抽出実験を検討したところ、PSI、PSIIなどに対して、効率の良い抽出に成功した。

第5章では、第二章で少し検討したPG-surfactantの膜蛋白質表面への官能基修飾試薬の土台分子としての機能向上の為、可溶化試薬として使用可能なDKDKC₁₂DおよびDKDKC₁₂Kのコア配列部分を柔軟な(Gly)₄リンカーにより二量化、三量化したPG-surfactant Bis-D₃-DKDKC₁₂ (Mw ~3 kDa)、Bis-K₃-DKDKC₁₂ (Mw ~3 kDa)、Tris-D₃-DKDKC₁₂ (Mw ~4.3 kDa)の設計を行った。これらの多量化PG-surfactantは、その多量化の効果により、それぞれの試薬のCACよりも低い濃度であっても、膜蛋白質を可溶化させることが可能という、特異な機能の発現も見られた。この結果は、これら可溶化試薬が、膜蛋白質の膜貫通領域と高い親和性を持つことを意味し、膜蛋白質表面への様々な官能基修飾を可能とする試薬の土台分子として有効であることを示唆するものであった。

第6章では、高分子ゲル中での膜蛋白質安定性を向上させる界面活性剤として多量化PG-surfactantにPEGを修飾したPEG修飾多量化PG-surfactantの設計合成を行った。この試薬を用いて可溶化を行うことで、膜蛋白質がPEGで安定に被覆されることにより、膜蛋白質のハイドロゲル内での長期安定性の向上が確認された。

第7章では、膜タンパク質の集合組織化をサポートする試薬開発として、生体直行反応の1つである銅触媒下におけるアジド基-アルキン間の特異付加環化反応(Huisgen環化反応)の応用を目指し、アルキニル基を導入したPG-surfactantの設計合成を行った。これらの試薬で膜蛋白質を可溶化している状態で、ビスアジドPEGとHuisgen環化反応を行うことで、膜蛋白質を変性させることなくゲル化させることに成功した。さらに、3Dプリントの技術を用いることで膜蛋白質ゲルの3次元構造化にも成功した。

第8章は、総括であり、本研究の成果をまとめた。

以上のように、本論文では新規のペプチド配列を含むジェミニ型界面活性剤PG-surfactantの合成と機能評価から始まり、膜蛋白質可溶化試薬への応用、膜蛋白質を内包可能な新規二分子膜形成分子への応用、また膜蛋白質を用いた半人工分子素子構築をサポートする新規試薬開発への応用についてまとめた。

これらは、5編の有審査論文(うち、第1著者3編)としてまとめられている。よって、本論文は、学位論文として十分価値あるものと認められる。

論文審査結果の要旨

界面活性剤研究の歴史は長く、食品・生活・工業など多岐に渡る分野でその検討がなされている。また近年では、ボトムアップナノテクノロジー的な手法を構造材料、生体材料などの開発に応用するのに、人工的に設計された界面活性剤（両親媒性分子）を用いた検討が進んでおり、生体由来分子のペプチドを用いた両親媒性分子の利用も検討されている。ペプチドは複数のアミノ酸が特定の順番で縮合し繋がった分子であり、アミド結合同士の水素結合、側鎖同士の特異的な相互作用により、 α -ヘリックスや β -シートなどの立体構造を形成するだけではなく、細胞表面や蛋白質、無機材料などといった様々な物質に対する特異的な相互作用も可能とする。このようなことから、ペプチド部位を含む界面活性剤の開発は、バイオテクノロジー分野において利用可能な、様々な機能分子の創出が期待されている。

本論文では、この新規界面活性剤開発の基本となる分子骨格に、これまでに報告例の殆ど無かった、ペプチド配列を含むジェミニ型界面活性剤を採用し検討を行っていた。またこの利用対象として膜蛋白質に着目し、膜蛋白質の可溶化、抽出などを可能とする新規界面活性剤の開発から、ここで見出された新規界面活性剤を、膜蛋白質を用いた分子デバイス構築に応用できるような誘導体化の検討、更にこれを用いた膜蛋白質固定化ゲルの作製と機能評価まで、幅広い研究展開を行っていた。扱っている界面活性剤の新規性ととも、学術的にオリジナリティーの高い研究内容であり、これら研究成果は、第一著者論文4報、第二著者論文2報と十分な論文数をもって外部報告は済まされていた（一部未発表の内容に関しては今後報告予定とのことであった）。

論文審査の試問は、主査1名（名古屋工業大学 山下啓司教授）、副査3名（名古屋工業大学 出羽毅久教授、名古屋市立大学 尾関哲也教授、名古屋工業大学 水野稔久准教授）により行い、専攻内審査会（平成28年11月28日）、論文公聴会（平成29年2月16日）において、時間の都合上一部の内容となったが発表をさせ、これに対して行った。質疑応答においては、たどたどしい部分も一部見られたが、博士の学位を与えるのに必要な研究成果と能力は備えていると判断され、本論文が学位授与（博士（ナノメディシン科学））の要件と満たすとの結論に至った。