

氏 名	の 野 村 雄 太
学位(専攻分野)	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	工 博 第 2446 号
学位授与の日付	平 成 17 年 1 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	工 学 研 究 科 合 成 ・ 生 物 化 学 専 攻
学位論文題目	Nanogel Artificial Molecular Chaperone : Design and Application (ナノゲル人工分子シャペロン : 設計と応用)

論文調査委員	(主 査) 教 授 青 山 安 宏	教 授 森 泰 生	教 授 木 村 俊 作
--------	----------------------	-----------	-------------

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、生体におけるタンパク質の折りたたみ（巻き戻り，フォールディング）に関与するシャペロンの機能を念頭に，疎水化高分子ナノゲルを用いた人工分子シャペロンシステムの構築について研究した成果をまとめたものであり，序論，本論6章，結論から構成されている。

序論ではインビボあるいはインビトロのタンパク質合成系における変性・凝集の問題点と，それを阻止するシャペロン，特に研究の進んだシャペロニンの作用機構，および人工分子シャペロンシステム構築の重要性についてまとめている。

第1章では疎水化高分子（多糖やポリアミノ酸に疎水基を数%グラフト状に付加したもの）がナノサイズのゲル（ナノゲル）を形成することを各種測定手段から明らかにするとともに，これがタンパク質をとりこむこと，および，疎水性ホストであるシクロデキストリンの添加により疎水性架橋を壊すとナノゲルも崩壊することを示している。

第2章ではコレステロール置換プルランナノゲルを用いたタンパク質巻き戻りについて述べている。化学的に変性させた炭酸脱水酵素やクエン酸合成酵素にナノゲルを作用させると変性タンパク質がナノゲルにとりこまれることをゲルろ過クロマトグラフィー（GPC）や円二色性（CD）スペクトルから明らかにし，これにより変性タンパク質の凝集体形成が抑制され，さらにシクロデキストリンを添加すると高効率（ $\geq 70\%$ ）でタンパク質の巻き戻りを介して酵素活性が回復することを明らかにしている。

第3章は熱変性タンパク質を扱っている。西洋わさびペルオキシダーゼなどのタンパク質は容易に熱変性をうける。ナノゲルの存在下では変性状態のタンパクが選択的にとりこまれることを GPC や CD から明らかにし，白濁現象（変性タンパク質の凝集）も抑制され，シクロデキストリンの添加によるナノゲルの崩壊とともにタンパク質の巻き戻りが起こり，酵素活性も80%以上回復することが示されている。

第4章では熱変性タンパク・ナノゲル・シクロデキストリンの動的平衡を検討している。シクロデキストリンの添加により生成した動的ナノゲルが炭酸脱水酵素を変性温度以上で複合化し，冷却により巻き戻りタンパクを放出する機構を提案し，本系がタンパク質の熱相転移現象とナノゲルの動的平衡をうまく連動させたシステムであることを明らかにしている。

第5章では無細胞タンパク質合成系への応用を検討している。緑色蛍光タンパク（GFP）の合成をインビトロのタンパク合成系を用いて行くと，ナノゲルが折りたたみ過程の無蛍光性 GFP を捕捉し，シクロデキストリンの添加により巻き戻りが起こり，正常な蛍光性 GFP が放出されることが示されている。これにより，ナノゲルが確かに変性状態のタンパク質に親和性を有することを実証するとともに，本系がインクルージョンボディ（包接体）の生成抑制に有効であることを示している。

第6章は光応答性ナノゲルとしてスピロピラン置換プルランナノゲルを用いたタンパク質巻き戻りの光制御を扱っている。上記ナノゲル（メロシアニン型）が塩酸グアニジン変性したクエン酸合成酵素に対して顕著な（60%）シャペロン活性を示し，光照射によるスピロ型への変換により活性がさらに向上（80%）することを明らかにしている。第5章までの系と異なる

り、本系はシクロデキストリンのような付加物を必要とせず、よりシャペロン機能に近いものであることを強調している。結論では、本論文で得られた成果について要約している。

論文審査の結果の要旨

本論文は、疎水化高分子ナノゲルを用いた人工分子シャペロンシステムの構築について研究した成果をまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 疎水化高分子がナノサイズのゲル（ナノゲル）を形成し、シクロデキストリンの添加により疎水性架橋を壊すとナノゲルも崩壊することを示した。
2. 化学的に変性させた酵素タンパク質にコレステロール置換プルランナノゲルを作用させると変性タンパク質の凝集体形成が抑制され、さらにシクロデキストリンを添加すると高効率（ $\geq 70\%$ ）でタンパク質の巻き戻りを介して酵素活性が回復することを明らかにした。
3. 熱変性した酵素タンパク質はナノゲルに容易にとりこまれ、シクロデキストリンの添加により巻き戻りが起こり、酵素活性も80%以上回復することを見出した。
4. シクロデキストリンの添加により生成した動的ナノゲルがタンパク質の熱相転移現象とナノゲルの動的平衡をうまく連動させることによりシャペロン機能を発揮することを明らかにした。
5. ナノゲルがインビトロ合成された折りたたみ過程のタンパク質を選択的にとみ、シクロデキストリンの添加により正常タンパク質を与えることを示した。
6. スピロピラン置換プルランナノゲルがタンパク質の巻き戻りを光制御できることを見出した。

以上、本論文はシャペロン機能が人工ナノゲルを用いて再現できることを示したものであり、両親媒性高分子に新たな知見を与えるのみならず、タンパク質制御技術としてのバイオナノテクノロジーの可能性を裏付けるものであり、学術上、実際に寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成16年12月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。