

氏名(本籍)	まつ なみ ひろ し (富山県) 松 波 裕 志 (富山県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 4344 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<b>Light Scattering Study on Complex Formation of Proteins with Water-soluble Synthetic Polymers</b> (光散乱法を用いたタンパク質と水溶性合成高分子の複合体形成に関する研究)		
主 査	筑波大学教授	工学博士	國府田 悦 男
副 査	筑波大学教授	農学博士	佐 藤 誠 吾
副 査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授	工学博士	王 碧 昭

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

タンパク質と水溶性合成高分子の複合体形成に関して、その形成機構および構造を解明することは、タンパク質の分離回収、固定化酵素への応用、ドラッグキャリアーの分子設計、DNA や RNA 結合タンパク質のスクリーニングなど、応用技術開発の基盤確立に直結する重要な研究課題である。さらに、この分野の研究は、農学、特に農芸化学分野における新たな研究手法の開発にもつながる。そこで、本研究では、タンパク質と水溶性合成高分子の複合体形成に関する研究において、レーザー光散乱を用いる実験手法を取り入れ、複合体の形成機構と構造の解析を試みた。

まず、最初に、電荷を有する水溶性合成高分子（高分子電解質）とタンパク質との複合体形成に注目した。具体的には、タンパク質が水溶液中で正電荷を持つ条件下で、ウシ血清アルブミン（BSA）と強酸型高分子電解質であるポリビニルアルコール硫酸エステルカリウム（KPVS）が、静電的相互作用により複合体を形成する場合に、イオン強度が複合体の巨視的構造に如何なる影響を与えるかに焦点を当てた。そのための実験として、動的光散乱法（DLS）と電気泳動光散乱法（ELS）をコロイド滴定法と組み合わせる新たな手法を用いた。すなわち、複合体の流体力学半径（ $R_h$ ）を DLS から決定し、ELS データの解析では複合体が (a) 素抜け分子として挙動した場合（電気泳動単位はタンパク質の  $R_h$ ）と (b) 非素抜け分子として挙動した場合（電気泳動単位は複合体の  $R_h$ ）に分けて、電気移動度から各イオン強度における複合体の電荷数（ $Z_{PPC}$ ）を計算した。この値を、コロイド的定から求めた複合体当たりのタンパク質結合数に基づく  $Z_{PPC}$  と比較した。その結果、低イオン強度における複合体形成は、BSA の正電荷と KPVS の負電荷が 1 : 1 に結合する化学量論的電荷中和に従うことを示した。一方、高イオン強度下では、KPVS の負電荷を中和するのに必要な BSA 分子数（計算値）よりも過剰に結合することが明らかになった。さらに、詳しく電荷数の比較を行うと、高イオン強度下での電気泳動では、複合体は素抜け分子として挙動することがわかり、複合体の構造に関する重要な手掛かりを与えた。

次に、タンパク質が中性高分子と複合体形成する系を取り上げた。そこで、三種類のタンパク質、すなわちヒト血清アルブミン（HSA）、オバルブミン（OVA）、リゾチーム（LYZ）を選び、親水・疎水基の構造

バランスが良く知られているポリ *N*-イソプロピルアクリルアミド(PNIPA)との複合体形成について調べた。実験では、重量平均分子量が170万のPNIPAを使用し、タンパク質に対する高分子のモル比 ( $r_m$ ) を変化させて複合体を調製した。静的光散乱 (SLS) では、既に確立されているデータ解析法 [E. Kokufuta et al., *Langmuir*, 15 940-947 (1999) and *Biomacromolecules*, 4, 728-735 (2003)] によって、複合体の分子量、慣性半径、複合体当たりのタンパク結合数を求めた。その結果、広い範囲の  $r_m$  において、複合体は一本の高分子 (PNIPA) 鎖に数個のタンパク質が結合した分子内複合体であることを示した。さらに、タンパク質結合数は、OVA が LYZ と HSA よりも多くなることがわかった。そこで、この実験結果は、タンパク質分子表面の疎水基と親水基の分布に関係すると考え、各タンパク質分子のアミノ酸配列に基づく hydrophathy index (疎水性度) と比較した。その結果、HSA と LYZ は親水性と疎水性のアミノ酸残基が均一・連続して分布するのに対し、OVA では不均一性が高く、疎水的なアミノ酸残基から成るクラスターが表面に存在することが明らかになった。従って、疎水性を示す PNIPA のイソプロピル基とタンパク質表面の疎水性アミノ酸クラスターとの相互作用 (疎水性相互作用) が、複合体形成に重要な役割を演じていると結論した。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文の著者は、光散乱法を用いることにより、タンパク質とイオン性および中性高分子との複合体に関して、その形成機構と構造を研究した。特に、タンパク質とイオン性高分子 (高分子電解質) の複合体形成については、動的光散乱法と電気泳動光散乱法をコロイド滴定法と巧みに組み合わせ、複合体が“素抜け”又は“非素抜け”分子として挙動した場合の電荷数をイオン強度の関数として正確に求め、その結果を比較検討することから、流体力学特性を基本として複合体の巨視的構造を調べるユニークな方法を用いた。他方、タンパク質と中性高分子間の複合体形成については、静的光散乱データから複合体の分子量と慣性半径を求め、複合体が一本の高分子鎖と複数のタンパク質から成ること、さらに hydrophathy index を利用してタンパク質結合数が疎水性アミノ酸のクラスター数と相関することを明確にした。

これらの成果は、高分子化学や生物工学分野のみならず、両分野の境界領域として発展している生体模倣化学の分野において、独創的であり、高く評価できる。また、本論文で述べられた実験法と実験結果の解析手法は、生物化学や農芸化学分野で、今後汎用的に利用できる可能性を含むと判断できる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。