

氏名(本籍)	スモン ガングリ (バングラディシュ)			
学位の種類	博士(工学)			
学位記番号	博 甲 第 5643 号			
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 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	数理物質科学研究科			
学位論文題目	<b>Improving the Heat Resistance of Enzymes Based on Enzyme/Smart Polymer Complex Formation</b> (酵素/機能性高分子複合化による酵素熱耐性の向上に関する研究)			
主査	筑波大学教授	工学博士	長崎 幸夫	
副査	筑波大学教授	博士(工学)	神原 貴樹	
副査	筑波大学准教授	博士(理学)	白木 賢太郎	
副査	東京大学准教授	博士(理学)	吉本 敬太郎	

### 論文の内容の要旨

酵素は化学反応に比べて基質特異性が高く、光学異性体の合成や分離、位置特異的選択反応などの合成反応だけでなく、酒類の発酵などの食品工業、洗剤、医薬、診断、環境浄化、化粧品、家畜用資料配合剤、繊維表面処理など様々な分野で実用化されている。酵素を基盤とした産業では遺伝子工学による酵素の大量生産が可能になっただけでなく、タンパク質工学によるタンパク質の改変や分子進化工学を利用した酵素の改変を行うことにより、工学的に有用な酵素を利用することが可能となったため、産業として大きな発展を続けている。しかしながら、タンパク質の従来持つ問題点(凝集性、失活、回収性)はなかなか解決されず、たとえば工業用酵素回収のためにはすでに数十年前に開発された、基材に酵素を固定する固定化酵素の考え方によって行われているにすぎない。このように酵素を基材に固定化すると、せっかくの酵素自身の性質や活性が低下する等の問題が多いが、酵素の有用性が勝っているため、目をつぶって利用しているのが現状である。

本研究では抗菌活性の高いカチオン性タンパク質、リゾチームがカチオン性ポリマーによって高度に安定化されることを見いだした。この結果、分散性や活性の高いリゾチーム複合体の創出が可能である。この現象と機構に関する研究を行った。

論文の第一章では緒言として酵素とその失活、安定化、構造解析に関する最近の経口をまとめ、本研究の意義を述べている。

第二章では本研究で用いた安定剤、ポリアミン系高分子の合成法に関してまとめている。水溶性ポリエチレングリコール末端に重合性官能基を導入し、アミン系モノマーとしてメタクリル酸 2-(N,N-ジエチルアミノ)エチル (EAMA) との共重合を行い、グラフトポリマーを合成した。この重合反応は EAMA がレドックス開始剤となるため、室温下で容易にグラフト高分子が合成される。未反応の PEG を分別するため、沈殿剤に沈殿させたポリマーをゲルろ過カラムで分別した。このようにして合成したグラフトポリマーの解析を核磁気共鳴スペクトル (NMR)、サイズ分画クロマトグラフィー (SEC) 等によって解析し、

構造確認を行った。

第三章では合成したポリ〔メタクリル酸 2- (N,N- ジエチルアミノ) エチル〕-g-PEG (PEAMA-g-PEG) を利用し、リゾチームの酵素活性および耐熱性に関して検討を行った。リゾチームの活性中心にアニオン性アミノ酸残基が局在していることに着目し、リゾチームに対する PEAMA-g-PEG グラフトポリマーの添加効果を調べた。リゾチーム溶液にグラフトポリマーを添加することでリゾチームの活性は著しく低下した。特に EAMA (アミン) 含有量の多いグラフトポリマーほど、活性の低下が顕著であった。この混合系の円偏光二色性スペクトル (CD) 測定を行った結果、グラフトポリマーの添加量を増加させても CD スペクトルは殆ど変化していないことがわかった。この様にリゾチーム溶液に PEAMA-g-PEG を添加すると酵素活性は著しく減少するもののその立体構造には大きな影響を与えていないことが示唆される。リゾチームはカチオン性タンパクであり、今回の実験条件下では大きく正に帯電している。また、グラフトポリマーもアミノ基を含み、ポリカチオンとして正に帯電している。このため両者が静電的に相互作用していると考え難い。しかしながら上述したようにポリアミン混合系ではイオン強度の上昇に伴いリゾチームの活性が上昇したことを考えると、何らかの静電相互作用が関与していることが期待される。本研究ではリゾチームの活性ポケット内に負電荷をもつアスパラギン酸、グルタミン酸、疎水性のトリプトファン残基が露出していることに着目し、この活性ポケットとグラフトポリマーが相互作用していることを想定した。そこで、グラフトポリマー／リゾチーム混合系内にポリアニオンとしてポリアクリル酸 (PAAc) を添加し、リゾチームの活性を評価した。もし活性ポケットとグラフトポリマーとの静電相互作用であれば PAAc によってグラフトポリマーが解離し、活性が復活するものと期待した訳である。

PEAMA-g-PEG + リゾチーム溶液にポリアクリル酸 10mM 添加したところ、期待したようにポリアクリル酸の添加により、活性が回復し、これは上述したメカニズムを支持した。驚いたことに、グラフトポリマー／リゾチーム複合体を 98℃ で 20 分間加熱した後に室温に戻し、PAAc を添加してもほぼ定量的に活性が回復することが確認された。これらは PEAMA-g-PEG がリゾチームに相互作用することにより、98℃ でさえタンパク間の凝集を抑え、変成させることなく立体構造を保持しているためと結論づけられる。これらの結果から PEAMA-g-PEG は熱変性によるリゾチームの凝集を完全に抑制し、高度に活性を維持する複合体を提供する材料であり、タンパク質安定剤として期待される。

第四章ではリボヌクレアーゼを用い、同様に検討を行った。この場合、混合系で酵素活性が低下することは無いものの、高熱処理において酵素活性が維持されることが確認された。

第五章では様々なポリアミンおよびその四級化体を合成し、酵素に対する相互作用の機構解明に関して検討した結果をまとめている。上述したように酵素活性ポケットとポリマーの静電相互作用に加えて疎水性相互作用が酵素活性の安定化に大きく寄与する機構を想定した。

このように本論文ではこれまでにないポリエチレングリコールをグラフト鎖とするポリアミン誘導体が、単に混合するだけで著しい酵素耐熱性を向上させる系を見いだしており、酵素工業に於ける発展に大いに寄与する成果として期待できる。

## 審査の結果の要旨

論文審査及び質疑応答に関して、

1. 材料合成、リゾチーム安定化、リブヌクレアーゼ安定化とそれらの機構に関して段階を踏んで研究を分けて検討を進めており、高く評価された。
2. メカニズムに関する検討では様々な材料を利用して真実に近づきつつあり、評価される。
3. 受け答えがはっきりしており、高い評価を得ている。
4. メカニズムに関する論文は早々にまとめて外部発表の予定である。

論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。