

氏名（本籍地）	栗之丸 隆章			
学位の種類	博士（工学）			
学位記番号	博甲第 7253 号			
学位授与年月日	平成 27 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	数理解物質科学研究科			
学位論文題目	Protein-Polyelectrolyte Complex: Versatile Techniques for Protein Handling (タンパク質-高分子電解質複合体：タンパク質ハンドリングのための多様な技術)			
主査	筑波大学准教授	博士（理学）	白木 賢太郎	
副査	筑波大学教授	理学博士	服部 利明	
副査	筑波大学教授	工学博士	長崎 幸夫	
副査	筑波大学准教授	博士（工学）	長谷 宗明	

論 文 の 要 旨

タンパク質は代謝や免疫、シグナル伝達などの生命現象の根幹を担う優れた物質である。しかし、タンパク質は本質的に不安定であるため、溶液中で様々なストレスを受け、容易に機能を失う。これまでに、私たちは溶液中のタンパク質を安定化・機能化するための高分子添加剤を探索してきた。なかでも、高分子電解質はタンパク質に結合する性質があり、様々な形態の複合体（Protein-polyelectrolyte complex: PPC）を形成する興味深い性質をもっている。当該論文では、タンパク質の産業応用の拡張を見据えた、PPC によるタンパク質のハンドリング技術の開発を目的とした。以下に各研究の概要を記載する。

(1) PEG 化高分子電解質を利用した酵素活性スイッチング法の改良

先行研究にて、酵素表面に+/-電荷の官能基が存在していることに着目し、高分子電解質を利用して、簡便かつ汎用的に酵素活性を制御できる技術（Complementary Polymer Pair System: CPPS）が開発された。しかし、この CPPS は不安定な酵素の触媒活性を制御することができないという課題が残されていた。そこで、不安定な酵素でも活性を制御できる新しい CPPS の開発を試みた。本研究では、酵素間の反発力を生み出す PEG 化高分子電解質を用いることで、酵素活性を制御できると仮定した。そこで、ポリメタクリル酸ジエチルアミノエチル（PEAMA）とポリエチレングリコール（PEG）のブロック共重合体（PEAMA-*b*-PEG）を新たに合成し、それを用いて酵素活性制御を試みた。モデル酵素には陰イオン性の α -アミラーゼと β -ガラクトシダーゼを用いた。予想通り、これらの酵素は PEAMA-*b*-PEG を共存させることでほぼ完全に不活性化した。これに、リアクリル酸（PAAc）を加えると、 α -アミラーゼの酵素活性が回復した。動的な光散乱測定より、

α -アミラーゼとポリアリルアミン (PAA) は凝集性の PPC を形成したが、 α -アミラーゼ/PEAMA-*b*-PEG 複合体は凝集していなかったことが分かった。つまり、可溶性の PPC の形成を抑制することによって、PEAMA-*b*-PEG は α -アミラーゼの酵素活性を可逆に制御できた。さらに、 β -ガラクトシダーゼでも同様に酵素機能を可逆にスイッチングに成功した。以上より、PEG 化高分子電解質を利用することで、CPPS を改良することに成功した。

(2) PEG 化高分子電解質を利用したタンパク質の非共有結合的 PEG 化

タンパク質表面にポリエチレングリコール (PEG) を修飾する手法 (PEG 化) は、タンパク質製剤の物理化学的・薬剤学的安定性を向上させるために広く用いられている。一般的に、PEG 化はタンパク質の表面に共有結合的に PEG を化学修飾する方法を取る。しかし、これには有機溶媒中での化学反応や未反応の PEG の除去などの工程を含んでおり、非常に手間がかかる。そこで本研究では、PEG 化高分子電解質からなる PPC がタンパク質の安定化効果を示すことかを検証した。モデルタンパク質として白血病の治療薬として用いられる L-アスパラギナーゼ (ASNase) を使用した。PEG 化高分子電解質としてポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル (PAMA) と PEG のブロック共重合体 (PEG-*b*-PAMA) を用いた。予想通り、アニオン性の ASNase とカチオン性の PEG-*b*-PAMA は可溶性の PPC を形成した。ASNase の二次構造と酵素活性は PPC の形成によらず一定であった。驚くべきことに、PEG-*b*-PAMA からなる PPC は振とうやプロテアーゼが誘起する凝集や失活を大幅に抑制した。一連の実験結果を共有結合的な PEG 化 ASNase と比較したが、PEG 化高分子電解質からなる PPC は PEG 化 ASNase と同等の安定化効果を持つことが明らかとなった。以上より、PEG 化高分子電解質による非共有結合的な PEG 化によってタンパク質製剤を安定化することに成功した。本手法は非常にシンプルであるため、抗体医薬品の安定化やドラッグデリバリーシステムなどの応用が期待できるだろう。

(3) 荷電相補的な基質-高分子電解質を用いた酵素超活性化現象

一般的に、酵素の触媒活性は pH や酸などの外部刺激に影響されやすい。本研究では、高分子電解質が外部刺激となって酵素活性を著しく増加させる現象 (酵素超活性化現象) の機構を解明することを目的に研究を行った。高分子電解質による酵素超活性化現象が生じる法則を見いだすべく、電荷の異なる基質と高分子電解質を用いて ChT の酵素活性を測定した。高分子電解質としてアニオン性のポリアクリル酸 (PAAc) とカチオン性のポリアリルアミン (PAA) を使用した。基質として電荷の異なる三種類の L-フェニルアラニン-*p*-ニトロアニリド誘導体を使用した。ChT 溶液にアニオン性の PAAc を加えると、カチオン性基質に対する酵素活性は約 7 倍増加した。一方、ChT 溶液にカチオン性の PAA を加えると、アニオン性基質に対する酵素活性は約 18 倍増加した。以上より、基質に対して反対の電荷を持つ高分子電解質を添加すると ChT が超活性化することが示唆された。さらに、数百 mM NaCl 共存下で超活性化現象が観察されなかったことから、高分子電解質による ChT の超活性化は静電相互作用に起因することが示唆された。さらに、高分子電解質から低分子量のアミン化合物を使用した結果、アニオン基質に対する ChT の酵素活性が著しく増加した。12 種類のポリアミン誘導体を用いて系統的に調べた結果、ポリアミンのアミノ

基の個数と疎水性に依存して活性の増加傾向が確認された。酵素反応速度論的解析から、ポリアミンは酵素反応の回転数 (k_{cat}) に大きく影響したが、酵素-基質親和性 (K_M) にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。さらに、分子動力学シミュレーションから ChT の周りにポリアミン分子が数個集まる様子が観察された。以上より、ポリアミンによる酵素超活性化はポリアミンと ChT の弱い相互作用に起因することが示唆された。詳細な機構は今後解明していく予定であるが、本研究では基質と添加剤の組み合わせ次第で酵素活性を自在に活性化する指標が得られたと言える。

(4) ポリアミノ酸を用いたタンパク質沈殿-再溶解法

PPC は温度や pH、濃度比などに依存して沈殿することがある。この沈殿性 PPC は生理的な塩濃度にさらすと解離する性質がある。この沈殿性 PPC の性質を応用し、高分子電解質によるタンパク質の沈殿-再溶解法を開発した。高分子電解質として生体適合性のあるポリアミノ酸を使用した。適量のポリアミノ酸を加えてタンパク質を意図的に沈殿させ、上清を塩含有溶媒と交換することで再溶解させる。この原理を利用して、酵素や抗体、ホルモンを含む 10 種類のタンパク質製剤の沈殿-再溶解に成功した。再溶解後のタンパク質の二次構造や活性は保持されていた。再溶解の溶媒量を調節することで、希薄な抗体溶液から高濃度の抗体溶液を調製することができた。再溶解した抗体溶液をラットに注射して毒性試験や薬物動態試験を行った結果、従来の抗体製剤と同様の結果が得られた。以上より、高濃度のタンパク質製剤を簡便に調製するためのタンパク質沈殿-再溶解法の確立に成功した。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

タンパク質は生命現象を生み出すに足るあらゆる働きを担う生体分子である。しかしタンパク質は、本質的に不安定であり熱や震盪などによって容易に活性を失ってしまう。そこで、自在にハンドリングする技術の確立が期待されている。

第一章では、タンパク質の構造と機能の関係と応用の可能性が述べた。高分子電解質を用いることでタンパク質の機能や安定性を制御する方法を系統的に確立することは価値が高いと考えられる。

第二章では、PEG 化高分子電解質とタンパク質の複合体の性質について述べた。従来技術では不可能だった複合体を形成することができ、しかも、薬剤として使われるアスパラギナーゼも非共有結合的に安定化が実現した。

第三章では、高分子電解質を用いることで酵素機能が増強することを述べた。酵素に高分子電解質をまとわせることで、反対荷電を持つ基質に対して酵素活性が一桁以上も増強する現象は興味深く、生体内での酵素の振る舞いを理解する上でも価値が高い。

第四章では、高分子電解質を用いることで抗体と沈殿体を形成できることを述べた。この方法によって、抗体を簡便に濃縮でき、しかも沈殿体の状態では震盪などの外部ストレスにも強いことが示された。応用の可能性が極めて高い成果である。

このように、一連の成果は、高分子電解質・タンパク質複合体の形成の発見から、機構の解明、さらに産業への応用につながる系統的なものであると考えられた。

〔最終試験結果〕

平成 27 年 2 月 16 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の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。