

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名

李 範煥

生体高分子(酵素、抗体、受容体、DNA 等々)を基板に固定化する技術は様々な分野で用いられ、有用物質の分離や生産、生体分子の検出などにおいて幅広く応用されている。これらの応用分野の中で、特に生体高分子の特異的分子認識能を活用したバイオセンサー、DNA チップ、プロテインチップなどの作製においては、それぞれの生体高分子の活性や構造をできるだけ保持したまま固定化あるいは製膜化する必要がある。

本研究では、electrospray deposition(ESD)法と金-チオール相互作用を利用した自己組織化法を用いて機能性蛋白質の膜を作製し、その構造や機能性を評価するとともに、機能性蛋白質膜のバイオチップやバイオ分子素子などへの応用の可能性を検討している。

第 1 章では研究の背景、研究目的について述べている。

第 2 章では ESD 法と glutaraldehyde 蒸気処理による乾式蛋白質架橋法を用いて不溶性の蛋白質膜を作製し、photochemical hole burning (PHB)法によって測定した温度緩和パラメーターに基づいて、蛋白質中の光異性化発色団周辺のマトリックス構造の安定性を評価した結果について述べている。ESD 法はキャピラリー中の蛋白質溶液をキャピラリーと基板の間に印可した電圧により微粒化し、電気力線に沿って飛行させて基板上に集積化する方法であり、粒子の大きさが数 $\mu\text{m}$ と極めて小さいため乾燥が早く、均一な蛋白質膜形成が可能である。ここでは、ESD 法と glutaraldehyde ガス処理による乾式蛋白質架橋法で作製した膜中の蛋白質分子の、製膜操作に伴うマトリックス構造の変化やその安定性を評価することを目的として、鉄を除去した C 型ヘムを有する cytochrome c 膜を ESD 法で作製し、蛋白質分子中の porphyrin 周辺の蛋白質マトリックスの温度緩和に伴う構造変化とその安定性を PHB 法によって評価している。すなわち、cytochrome c に共有結合している C 型ヘムから鉄原子をフッ酸処理により除去して得られる porphyrin cytochrome c を、ESD した後に glutaraldehyde 蒸気で架橋し、透明性を確保するため glycerol 溶液を膜の上に滴下して乾燥させることにより、PHB 測定に利用可能な蛋白質膜を作製している。この蛋白質膜を 20K に冷却後、レーザーを照射により porphyrin の光異性化を誘起し、吸収スペクトル上に 624nm 付近のホール形成をさせた後、temperature cycling に伴うホール幅の広がり、深さの減少を測定することで porphyrin 周辺の蛋白質マトリックス構造の温度緩和を観測している。また、この測定結果を porphyrin cytochrome c を glycerol 溶液中に溶解して 20K に冷却した試料、ならびに proto-porphyrin IX を Poly(propyl) methacrylate などの高分子膜中に分散して 20K に冷却した試料の測定結果と比較している。その結果、proto-porphyrin IX 高分子膜と比較して glycerol 溶液中の porphyrin cytochrome c や porphyrin cytochrome c 膜の方が、温度緩和に伴うホール幅の広がり、ホール深さの減少が大幅に抑えられたことから、porphyrin 周りの蛋白質マトリックスの構造はランダムコイル状の高分子マトリックスと比較して極めて安定な構造を維持していると述べている。また、porphyrin cytochrome c 膜は glycerol 溶液中の porphyrin cytochrome c と比較して、温度緩和に伴うホール深さの減少にはわずかな差が見られるものの、ホール幅の広がりには差が見られないため、ESD 操作や glutaraldehyde ガス処理による乾式蛋白質架橋操作などの製膜操作が蛋白質構造やその

安定性に及ぼす影響は少ないと結論づけている。

第 3 章では ESD 法と乾式蛋白質架橋法により ITO ガラス基板上に直径 150 $\mu\text{m}$  程度のスポットの抗体膜のアレイを作製し、抗体膜の抗原認識特異性や抗原結合活性の評価を行っている。すなわち、6 種類の動物由来(mouse, human, bovine, chicken, rabbit, guinea pig)の IgG に対する抗 IgG 抗体膜アレイを用いた enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)を行い、非特異的結合及び cross-activity は生じないことを確認している。また、この抗体膜アレイを用いた ELISA 法による抗原濃度の検出感度は、物理的吸着法によって抗 IgG 抗体を固相上に固定化した従来の ELISA 法による抗原濃度の検出感度とほぼ同じ 1ng/ml であった。これらの結果より、ESD 法と乾式蛋白質架橋法によって基板上に作製した不溶性の抗体膜は、抗原に対する認識特異性や結合活性を従来の物理的吸着法で基板上に固定化された抗体と同程度に維持しており、実用化に耐える十分な性能を有していると結論づけている。また、このような抗体膜アレイを用いて、ヒトの 8 種類のサイトカイン(IL-2, 4, 5, 6, 10, 12, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ )の検出を試み、非特異的結合や cross-activity 無く、それぞれ 100pg/ml 程度の抗原濃度の検出に成功している。以上の結果に基づいて、抗体膜アレイを用いた様々な生体物質の同時多項目検出が可能であると結論づけている。

第 4 章では enhanced green fluorescence protein (EGFP)と cytochrome  $b_{562}$  のキメラ蛋白質の自己組織化膜 (self-assembled monolayer (SAM))を作製し、その光電変換能について評価している。22 番と 82 番のアミノ酸をそれぞれシステインに置換した cytochrome  $b_{562}$  と EGFP のキメラ蛋白質の溶液に Au(111)基板を浸漬し、金基板上でのキメラ蛋白質の SAM 形成を AFM および表面プラズモン共鳴法を用いた膜厚測定によって評価し、キメラ蛋白質の立体構造と予想される配向性から推算される膜厚とほぼ同程度であることを示している。また、キメラ蛋白質 SAM の金基板上での EGFP 部位の蛍光機能、cytochrome  $b_{562}$  部位の電子伝達機能を評価するために、EGFP の励起波長帯で光照射 STM 測定とハイブリッド SNOM/STM 測定を行い、キメラ蛋白質の分子レベルでの整流特性を有する光電流の検出に成功している。また、cytochrome  $b_{562}$  あるいは EGFP 単独の SAM では光電流が観測されないことから、cytochrome  $b_{562}$  と EGFP 両方のユニットが光電流発生に必要であることを明らかにしている。この結果は、金-チオール相互作用を利用した自己組織化法を用いて金基板上に作製されたキメラ蛋白質のそれぞれのユニットが、蛍光機能、電子伝達能を保持していることを示していると同時に、光増感剤としての蛍光蛋白質、電子供与体あるいは電子受容体としての電子伝達蛋白質の配向性や立体的相互配置を制御できるキメラ蛋白質の分子素子への応用の可能性を示唆するものであり、自己組織的蛋白質分子素子創製技術開発の端緒となる成果であると述べている。

第 5 章では本論文の総括と展望を述べている。

以上、本論文は ESD 法と金-チオール相互作用を利用した自己組織化法を用いて基板上に機能性蛋白質の膜を作製し、その構造や機能性を評価するとともに、機能性蛋白質膜の抗体チップや蛋白質分子素子などへの応用の可能性を検討したものである。これらの成果は今後の化学生命工学、特に生体分子工学の発展に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格であると認められる。