

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 清水 雅史

情報化社会の高度化に伴い、電子デバイスの高密度化が求められ、機能性分子を集積化した分子素子の研究が進められている。分子素子としては、ダイオード、スイッチ、光電変換、メモリーなどの機能の実現が求められる。生体内においては電子伝達系、光合成反応中心、イオンポンプ、バクテリオロドプシンなどの蛋白質や蛋白質複合体において、同様の機能が分子スケールの空間で実現されており、これらを利用した分子素子、すなわち生体分子素子開発への期待は高い。蛋白質を素子として利用するには、蛋白質の集積化が必要となるが、Langmuir-Blodgett 法をはじめとした既存の分子集積化技術では、蛋白質分子を3次元空間の所定の位置に配向性を制御しつつ集積化することは難しい。そこで、任意の位置に蛋白質分子を配置するためには、構成分子に自己組織化能を付与する必要があると考えられる。このような自己組織化能を利用することにより、蛋白質分子の集積化を1ステップで、かつ短時間に行うことができる生体分子素子生産プロセスの構築が可能になると期待される。

本研究では機能性蛋白質分子として大腸菌由来の水溶性蛋白質シトクロム b562 を用いている。シトクロム b562 は可逆的に脱着可能なヘムを1つ保持している電子伝達性蛋白質であり、このヘムを他の金属ポルフィリンと置換することによって様々な酸化還元電位や光応答性を有する変異体を調製することが可能である。本論文では、このシトクロム b562 をアポ蛋白質-金属ポルフィリン間のアフィニティや、シトクロム b562 に部位特異的に化学修飾したオリゴヌクレオチドとその相補鎖とのハイブリダイゼーション、チオール基の金表面への化学吸着などの相互作用を利用して、自己組織的に集積化する方法を開発している。さらに、ここで開発した集積化方法を利用して実際に金電極上に亜鉛ポルフィリン置換シトクロム b562 を DNA 鎖を介して集積化し、光電変換素子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、既往の研究及び研究の目的について述べている。

第2章では金表面におけるシトクロム b562 の単分子膜の形成とその再構成過程を表面プラズモン共鳴法を用いて観察した結果について述べている。ここではシトクロム b562 の単分子膜を形成するためにジスルフィド基を導入したヘムを合成し、アポシトクロム b562 と再構成させることによってシトクロム b562 にジスルフィド基を導入している。こうして導入したジスルフィド基の金表面に対する化学吸着によってシトクロム b562 が金基板上に自己組織的に集積化する様子を表面プラズモン共鳴法を用いてリアルタイムで観察している。また、このようにしてシトクロム b562 を集積化した基板表面の様子を原子間力顕微鏡を用いて液中において観察している。これらの測定結果から、未修飾の金基板を用いた場合には蛋白質が金基板上に非特異的に吸着して変性するが、金表面をあらかじめメルカプト酢酸で修飾しておくことで蛋白質の金基板への吸着が抑制され、導入したジスルフィド基を介して金基板表面に未変性状態でシトクロム b562 を集積化できることを明らかにしている。また、このようにシトクロム b562 を集積化した基板表面において、アポ蛋白質部分を可逆的に脱離、再構成させ、その様子を表面プラズモン共鳴法を用いて観察している。また、金電極上に集積化されたシトクロム b562 のサイクリックボルタングラムを測定し、シトクロム b562 と金電極との間の電子移動過程が可逆的であることを示している。

第3章では金表面におけるシトクロム b562 単分子膜の2次構造の解析結果について述べている。すなわち、第2章と同様に、未修飾金基板およびメルカプト酢酸修飾金基板上に野生型シトクロム b562、

ジスルフィド基導入ヘムを再構成したシトクロム b562(RC-シトクロム b562)をそれぞれ自己組織的集積化し、その単分子膜の水中、空気中での2次構造を CD スペクトルによって評価している。その結果、未修飾金基板上で作製した2種のシトクロム b562の単分子膜にはいずれも明瞭な2次構造が観察されなかったため、金基板上で変性しているものと結論付けている。一方、メルカプト酢酸修飾金基板上に自己組織的に集積化した RC-シトクロム b562 の単分子膜については、水中のみならず空気中でも α ヘリックスに富むシトクロム b562 の2次構造に特有の CD スペクトルを示し、その α ヘリックス含量は水中で55%、空気中で42%であった。これに対して、修飾金基板上に静電的相互作用によって集積化された野生型シトクロム b562 の場合には、その α ヘリックス含量は水中で51%、空気中で33%であった。以上の結果に基づき、メルカプト酢酸修飾金基板上にジスルフィド基の金表面に対する化学吸着によって自己組織的に蛋白質を集積化する方法は、機能性蛋白質をその高次構造を維持したまま固定化する手法として優れていると結論付けている。

第4章では、カルボキシルメチルデキストランのマトリクス中において、オリゴヌクレオチドとその相補鎖とのハイブリダイゼーションを利用した、シトクロム b562 の自己組織的集積化について述べている。まず、システイン残基を1つも含まないシトクロム b562 に遺伝子工学的に1つだけシステイン残基を導入し、さらに二価性試薬を用いてそのシステイン残基に部位特異的にオリゴヌクレオチドを付加したシトクロム b562 を作製している。このオリゴヌクレオチドを付加したアポシトクロム b562 が、マトリクス中に予め固定化した相補鎖に対してハイブリダイゼーションによって集積化される様子を表面プラズモン共鳴法により観察している。次に、相補鎖を付加したヘムをヘム-アポ蛋白質相互作用によってこの集積化されたアポシトクロム b562 に再構成している。さらに、このヘムに付加した相補鎖とオリゴヌクレオチド修飾シトクロム b562 のハイブリダイゼーションによって、マトリクス中においてシトクロム b562 を2層目まで自己組織的に集積化することに成功している。

第5章では本論文の総括と展望を述べている。

以上、本論文は電子伝達性蛋白質を自己組織的に集積化する技術の開発を行い、この技術を用いて基板上に集積化した亜鉛ポルフィリン置換シトクロム b562 の単分子膜が光電変換素子機能を有することを示したものである。これらの成果は化学生命工学、特に生体分子素子の開発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。

「審査の結果の要旨」の概要

1. 課程・論文博士の別 課程博士
2. 申請者氏名(ふりがな) 清水 雅史(しみず まさふみ)
3. 学位の種類 博士(工学)
4. 学位記番号 博工 第5634号
5. 学位授与年月日 平成 15年10月16日
6. 論文題目 電子伝達性蛋白質の自己組織的集積化に関する研究
7. 審査委員会委員 (主査)東京大学 教授 長棟 輝行
教授加藤 隆史
助教授上田 宏
講師新海 政重
東京工科大学 教授 軽部 征夫
8. 提出ファイルの仕様等
提出ファイル名 使用アプリケーション OS
使用文書ファイル 清水雅史.doc MSWord 2001 Mac OS 9.2
テキストファイル 清水雅史.txt