

## 論文の内容の要旨

論文題目： Preparation of Stable Protein Carrier Systems with Oppositely Charged Block Copolymers and Their Utilities as Functional Materials  
(荷電性ブロックコポリマーからの安定化タンパク質キャリアシステムの形成及びその機能性材料としての応用)

氏名 原 暁非

酵素は、高い反応選択性及び高い触媒活性を持つ特別なタンパク質として、現在、食品加工、医薬製品、廃棄物処理など多義にわたる分野で応用が成されているが、周囲環境の変化に極めて敏感であり、失活し易いことがその利用を制限することが問題点となっている。この問題を解決するため、酵素内包ポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルが挙げられる。PIC ミセルはコア-シェル構造を有するため、内包した酵素が外界から保護され、周囲環境による構造や機能の変化を克服することが可能である。実際、これまでの研究結果により、酵素内包 PIC ミセルが酵素反応のオン-オフ制御、ならびに、酵素反応場として、高い機能性を有することが確認されている。しかし、このような酵素内包 PIC ミセルは、表面電荷が不均一に分布するという酵素自身の特徴のため、コア凝集力(静電力)が非常に弱まるという欠点があり、生理的塩濃度(0.15M)においてもミセルが不安定化になってしまうことが問題となっている。

本研究では、このような酵素内包 PIC ミセルの安定性を改善することを目指し、二つの方法を試した。一つ目は、反対電荷性を有するポリエチレングリコール-ポリアスパラギン酸ブロック共重合体(PEG-P(Asp))のアスパラギン酸末端に、様々な芳香族疎水基を導入した。そして、モデル酵素としての鶏卵白リゾチーム(Lysozyme)とそれぞれ PIC ミセルを形成し、ミセル構造の安定化に及ぼす疎水基の導入効果に関して、物理化学的に評価した。二つ目は、Lysozyme/PEG-P(Asp) PIC ミセルのコア部分をグルタルアルデヒド(Glutaraldehyde)により架橋した。このコア架橋操作が、ミセルの安定性及び内包したリゾチームの酵素活性への影響を具体的に討論した。本論文は、主にこの二つの研究結果の纏めである。

第一章では、本研究の背景を記述した。その内、タンパク質の特徴や、タンパク質キャリアの種類や、特に、安定化したタンパク質キャリアの重要性及び機能性を明記した。

第二章では、一つ目方法の場合得た研究結果、すなわち、酵素内包 PIC ミセルの安定性に及ぼす疎水基の導入効果を詳しく紹介した。各ミセルの臨界面会濃度を比べ、疎水基を導入した PIC ミセルは、水溶液中における希釈安定性が明らかに向上したことを確認した。特に、1-pyrenylacetyl 基[Py]を導入

した PIC ミセルは、疎水基を導入していない lysozyme/PEG-P(Asp) PIC ミセルよりその安定性がおよそ 10 倍増加した。また、塩濃度或はイオン強度の増加に対する安定性でも、0.1M の塩濃度まで解離せず、水溶液中でこのミセルが安定に分散されることを判明した。従って、強いコア凝集力を付与させれば、ミセルの安定性が高まることは可能である。しかし、生理的イオン強度 0.15M における安定化したミセルの調製を達成していなかった。安定化したリゾチーム内包 PIC ミセルに対して、一層強いコア凝集力が必要と考えられる。

第三章では、二つ目方法：塩濃度の影響を受けない化学架橋により、PIC ミセルのコア-シェル構造を維持することを試した。架橋剤は、タンパク質の固定によく使われるグルタルアルデヒドの水溶液であり、ミセル水溶液に添加されると、速やかにミセルのコア部分に浸透し、リゾチーム表面に存在するリシン残基、及び PEG-P(Asp) 末端のアミノ基と両方とも反応し、ミセルの構造を維持することができる。実際の結果は、ミセルの希釈安定性、塩、有機溶媒及び pH に対する安定性が、明らかに向上した。一方、円二色性偏光測定、UV 吸収と蛍光スペクトルにより、架橋後、リゾチームのトリプトファン残基 (Trp) の周囲環境が変化したことを確認した。これらの現象は、グルタルアルデヒドにより架橋した蛋白質に関する先行研究の実験結果と完全に一致し、グルタルアルデヒドの架橋反応中に、ピリジニウム(Pyridinium)と類似する環状構造が形成された可能性を示唆した。

第四章では、実用性を注目し、コア架橋ミセルに内包されたリゾチームの酵素活性を評価した。コア架橋ミセルは、架橋度の増加に伴い最大酵素反応速度が落とした。これは、ピリジニウム構造がリゾチームの Trp 62 残基の近傍、すなわち基質とリゾチームの結合部位に存在し、基質とリゾチームの結合に立体障害を及ぼす可能性であった。しかし、 $\text{NaBH}_4$  の還元によりこの最大酵素反応速度の回復 (増大) を認め、ピリジニウム構造を別の構造へ変化させると、基質とリゾチームの結合への立体障害が無くなったと考えられる。また、低い基質濃度において、コア架橋ミセルの見かけ酵素反応速度がフリーリゾチームよりおよそ 3 倍程度に高くなった。かつ、架橋度が大きくなればなるほど、その見かけ酵素反応速度が増大した。

第五章では、以上の研究成果に基づき、新しい研究を展開した。ポリエチレングリコール-ポリリジンブロック共重合体 (PEG-P(Lys)) とポリリンゴ酸ポリマー (PMA) から形成された PIC ミセルに対し、グルタルアルデヒドによるコアの架橋を行った。その後、PMA の加水分解し易い特性を利用し、ミセルから PMA を完全に取り除き、架橋した PEG-P(Lys) だけミセルの形で残った。このように得たミセルの特徴としては、コア部分に高い荷電密度を有することであるが、この高い静電反発力を見事に化学架橋及び塩の静電遮蔽効果により抑え、ミセルが安定化された。従って、このミセルは、色んな反対電荷性を有するものと安定的な凝集体、特に他の方法で簡単に作れない凝集体に成れると考えられる。

以上のように、本論文では、コア架橋により酵素内包 PIC ミセルを安定化させることを実証した。別のタンパク質或は架橋剤を使用すれば、このようなコア架橋酵素内包 PIC ミセルは、新たな蛋白質キ

キャリアやナノリアクトルとしての応用が期待される。更に、安定化機能性構造体を構築しており、今後、様々な分野で新たな用途をもたらすことに注目を集めると予想できる。