

## 審査の結果の要旨

氏名 高江 誓詞

近年ヒトゲノムプロジェクトに代表されるようにバイオテクノロジーの発展には目覚ましいものがある。その発展において非常に重要な役割を果たしているのがバイオマテリアルである。申請者は本学位請求論文において、バイオマテリアルとしてのポリエチレングリコール(PEG)の機能性に着目して、研究を展開している。PEGは低毒性および低免疫原性であり、生体適合性の高いバイオマテリアルとして認知されている。PEG末端に官能基を修飾することでその機能化が可能となるが、本論文では末端にメルカプト基を導入したPEG (PEG-SH)を利用して新たなバイオマテリアルの構築を試みている。

第1章は序論であり、まずバイオマテリアルとしてのPEGの重要性、およびメルカプト基の特性がまとめられている。また、バイオマテリアルの設計において、生体分子と直に接する界面の設計は極めて重要となるが、PEGはその立体反発効果からタンパク質などの非特異的な吸着を著しく抑制することが可能であることに言及している。そのような特性を利用して、表面をPEGで修飾した「金ナノ粒子」、および「ポリプレックスミセル型遺伝子ベクター」への展開を本研究で行ったことが、それぞれの背景や目的と共に的確にまとめられている。

第2章は金ナノ粒子を診断材料として利用する際に極めて重要となってくる表層のリガンド密度の影響について詳細に明らかにしている。生理的塩濃度下において金ナノ粒子は凝集しやすいという欠点があったため、これまでリガンド密度に関する系統的な研究はなされていなかった。そこで申請者は金ナノ粒子表層をPEGで修飾したPEG化金ナノ粒子が生理的条件下でも安定に分散できることに着目した。表層リガンドとしてラクトースを導入し、様々なラクトース導入率(20~65%)を有するPEG化金ナノ粒子を調製し、レクチンを介した金ナノ粒子の凝集に基づいて評価している。その結果ラクトース導入率が20%の粒子はどのレクチン濃度でも凝集しなかったことから、レクチン認識に関してラクトース密度の臨界値が20~40%に存在することが確認されている。このような非線形的な応答が確認された理由としては、多価結合が関与していると結論づけ、金ナノ粒子の凝集によるセンシングを正確に行うためには、リガンド密度をコントロールすることが極めて重要であることを証明している。

続けて第3章でもPEG化金ナノ粒子を利用して、表面プラズモン共鳴装置(SPR)と組み合わせた低分子アナライトの新規定量法を提案している。その方法としては、まずレクチンを固定化したセンサーチップに対してラクトースを有するPEG化金ナノ粒子を結合させた後、直ちにガラクトースを注入することにより、ガラクトース濃度に依存した粒子の溶出が起こるというものである。実際、0.1-50 ppmという濃度域でガラクトース濃度と線形的な関係で金ナノ粒子が溶出することが確認されている。今後適切なリガンド固定化金ナノ粒子とSPRを組み合わせることで、種々の低分子アナライトの高感度定量への応用が期待できる。この方法は Colloidal-Au replacement assay と命名されている。

第4章では PEG-SH を利用した、細胞内環境で応答する遺伝子ベクターについての研究がまとめられている。メルカプト基同士は酸化反応によりジスルフィド結合を形成する性質があるが、ジスルフィド結合は細胞内が還元的環境のために切断する。そのような特性を利用した遺伝子ベクターとして、PEG-SH とポリカチオンをジスルフィド結合でつなげたブロック共重合体を合成し、プラスミド DNA (pDNA) との静電相互作用により形成するポリプレックスミセルを設計している。このポリプレックスミセルは細胞外では PEG がミセルの表層を覆うことにより、pDNA を安定に内包できる一方で、細胞内では PEG が離脱することから、細胞内のポリアニオンと pDNA との置き換わりが促進され、遺伝子発現効率が上昇することが期待される。目的のブロック共重合体のポリカチオンセグメントとしてはポリアスパラギン酸の側鎖にエチレンジアミンユニットを導入した分子設計を行っている。ジスルフィド結合を安定に保ちつつ、側鎖にカチオンを導入する合成について詳細な条件検討を行った結果、定量的な合成に至る道筋の確立に成功している。また、ゼータ電位を還元剤が共存する条件で測定するという実験を行い、明確なゼータ電位の上昇の確認を通じて、ジスルフィド結合が切断された結果、PEG が脱離したということを証明している。さらにこのポリマーを用いて *in vitro* での遺伝子発現効率を測定し、ジスルフィド結合がないものよりも 1-3 桁高い遺伝子発現効率を達成することに成功している。このようなジスルフィド結合の効果により還元環境に応答して PEG が脱離するインテリジェントミセルの作成は本研究で初めて達成されたものであり、有用な遺伝子キャリアとしての展開が期待される。

第5章は総括である。一連の研究のまとめと今後の PEG を主体とするバイオマテリアルの展望についてまとめている。

以上のように、申請者は PEG-SH を利用して、有用性の高いバイオマテリアルの構築に成功している。ここでの成果は今後、診断用微粒子の設計や遺伝子ベクターの開発において、重要な知見を与えるものと確信される。よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。