

審査の結果の要旨

氏名 宋 士輝

天然抗体のように目的分子を非共有結合により特異的に認識する人工レセプター (=人工抗体) はバイオテクノロジーや医療をはじめとする様々な分野への応用が期待されることから、その開発が望まれている。しかしながら、これまで報告されている人工レセプターは、有機溶媒中で小分子に対して機能するものがほとんどであった。本論文では、水系において、ナノスケールの生体高分子、特にペプチド (タンパク質) の精密な認識に着目し、シクロデキストリン (CyD) を配向・架橋固定化したインプリント高分子を用いた、水中で特定の立体構造をとる天然ペプチドの特異的認識について述べている。本学位論文は、第 1 章の序論、第 9 章の結論を含む全 9 章より構成されている。

第 1 章では、序論として人工レセプター開発の必要性と意義、これまでに報告されている水系における人工レセプターによるペプチドの認識とその問題点、小宮山研究室において開発された CyD の分子鑄型法によるペプチドの認識について概説し、本研究の背景及び目的を述べている。

第 2 章は実験方法に関する章であり、ビニル基修飾 β -CyD (機能性モノマー)、テンプレート分子とするペプチド、及びそれらを使用したインプリント CyD 高分子の合成法が述べられている。

第 3 章では、生理活性物質であるオクタペプチド (アンジオテンシン II) をテンプレートに用いて、シリカゲル表面上でインプリント CyD 高分子を合成し、それを HPLC カラムに充填し保持時間を測定することでインプリント CyD 高分子の機能を評価している。その結果、鑄型ペプチドの保持能はインプリンティングによって飛躍的に向上することを明らかにした。これに対して、鑄型ペプチドとアミノ酸残基が一つだけ異なる非鑄型ペプチドに対する保持能は、鑄型ペプチドの保持能より小さいことを明らかにした。以上のように、インプリント CyD 高分子は 8 mer の鑄型ペプチドに対して特異的な基質選択性を持つこと示した。

第 4 章では、アンジオテンシン II の前駆体であるアンジオテンシン I (10 mer, デカペプチド) の精密な認識について述べている。鑄型ペプチドはそれをインプリントしたカラムにおいて保持時間が飛躍的に伸び、顕著なインプリント効果が観測されることを明らかにした。また、アミノ酸配列が鑄型ペプチドと一つだけ異なる非鑄型ペプチドの保持時間の伸びはほとんど観測されなかったことから、インプリント CyD 高分子は一つのアミノ酸残基だけ異なる基質も精確に識別できること示した。

第 5 章では、第 4 章で作製したインプリント CyD 高分子 (pH 8.0 で作製) を用いて、インプリント時と異なる pH 3.0 で測定した際のインプリント効果についての検討を行っている。その結果、pH 8.0 で測定したときに観測された高いインプリント効果が pH 3.0 では消失する

ことを明らかにした。これは、インプリント CyD 高分子は測定 pH によって、鑄型分子に対する認識能が変化することを示している。また、pH 3.0 では高いインプリント効果の消失だけではなく、pH 8.0 で観測されたインプリント高分子の高い分子認識能（基質特異性）の消失も観測される（測定 pH の変化によってインプリント高分子の基質特異性も影響を大きく受ける）ことを見いだした。さらにこれらの結果から、インプリント効果や分子認識能が消失したのは、測定条件をインプリント時の pH 8.0 と異なる pH 3.0 としたことによるペプチドの高次構造の変化が原因であると考察している。

第 6 章では、インプリント CyD 高分子を用いて、より大きな生理活性ペプチド (γ -endorphin) の認識を試みている。その結果、従来の場合と同様に pH 8.0 でのインプリントを行った場合には、予想に反して明白なインプリント効果が得られないことが示されている。また、この原因を、高次構造をとっている γ -endorphin が何らかの障害で CyD と包接複合体が形成できずインプリントポリマー中に γ -endorphin の認識サイトが構築されていないためであると推定している。一方、第 5 章で得られた「pH 変化によるペプチドの立体構造の変化は、インプリント CyD 高分子のインプリント効果に大きな影響を与える」という知見に基づき、pH を 3.0 に変えて γ -endorphin のインプリントを行っている。その結果、明らかなインプリント効果が得られ、この原因を pH 3.0 では γ -endorphin が pH 8.0 と異なる高次構造をとるため CyD との相互作用が有利になっているからであると考察している。

第 7 章では、インプリント効果に影響を及ぼす諸因子について検討がなされている。具体的には、機能性モノマーの種類、テンプレート分子、及びインプリント CyD 高分子を固定化するビニル基修飾シリカゲルの三つの方面からインプリント効果への影響が述べられている。

第 8 章では、鑄型として使用したオクタペプチドならびにデカペプチドの水溶液中における構造を円偏光二色性 (CD) スペクトルにより検討するとともに、NMR を用いてペプチドと CyD との相互作用について解析を行っている。更に、これらの情報に基づいて、前章までに報告したインプリント CyD 高分子の高い分子認識について、以下のような機構を提案している。(1) 水中において、CyD は鑄型ペプチドの側鎖と疎水性相互作用により安定な包接複合体を形成。(2) インプリント過程において、架橋剤を加えることで CyD 同士を架橋し、包接複合体を固定化。(3) 配向制御された CyD から構成されるインプリント高分子はペプチドの立体構造を正確に認識するだけでなく、ペプチド側鎖に関する微細な違いの精密な識別を実現。

第 9 章では、第 2 章から第 8 章までの研究を総括し、本論文の成果を含めて今後の展望について論じている。

以上のように、本論文により、インプリント CyD 高分子を用いることで、水中における天然ペプチドの立体構造の認識に成功した。さらに、分光学的な手法を用いることにより、その認識機構について詳細に検討をしている。本論文は、分子認識化学の発展に寄与するところが大きく、さらに、今後のタンパク質の認識、分離及び精製の展開に大きく貢献するものであり、生命科学や医療など様々な分野への応用が期待される。

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。