

論文の内容の要旨

論文題目 共役系高分子結合性ペプチドの探索と応用

氏名 江島 広貴

共役系高分子は高分子としての性質に加えて優れた発光特性と電気的特性を併せもっている。そのため、電池の電極、ディスプレイ、有機電界効果トランジスタ、太陽電池などを含むデバイス分野において有望な材料である。近年バイオセンシング用の蛍光プローブとしての応用研究もされ始めているが、その際に最も基本的な情報である、共役系高分子と生体分子間の相互作用はこれまで全く調べられてこなかった。そこで本研究ではファージディスプレイ法によって代表的な共役系高分子ポリフェニレンビニレン(PPV)に特異的に結合するペプチドを探索し、得られたペプチドとPPVの相互作用を解析することを目的とした。また人工材料である共役系高分子に生体材料(ペプチド)の機能を取り入れて、融合させることにより(ペプチド/高分子ハイブリッド材料)、新たな相互作用を生み出し、これまで共役系高分子のみでは困難であった新しい機能を開拓することを目指した。

第一章では本研究の背景(共役系高分子, 高分子結合性ペプチド等)を概説し、また本研究の目的を記した。

第二章ではファージディスプレイ法によるPPV結合性ペプチドの探索に関して述べた。三種類のPPV, すなわち樹状PPV(hypPPV), 直鎖状PPV(linPPV), 水溶性PPV(mpsPPV)を標的高分子とした。12残基のランダムペプチドを提示したファージライブラリーを用い、各PPVに対する結合性ペプチドを同定した。セレクションされたペプチドを提示するファージクローンの標的PPVに対する結合能を力価測定によって評価した。得られた配列中には芳香族性のアミノ酸が濃縮していた。また結合能の高い配列ほど芳香族性アミノ酸が多く含まれており、出現頻度も高い傾向があった。また得られた配列の等電点には明確な傾向は見られず、結合能の最も高かったhypPPV結合性ペプチド(Hyp01), linPPV結合性ペプチド(Lin01), mpsPPV結合性ペプチド(Mps01)の等電点は中性であった。さらに、配列中の各アミノ酸の含有率を計算したところ、TrpとHisが顕

著に濃縮していた。このことから、 π - π 相互作用がペプチド-PPV 間の相互作用においてメインのものであることがわかった。

第三章では、Hyp01 と Lin01 の hypPPV と linPPV に対する特異性を評価した。ペプチドを提示したファージクローンと化学合成したペプチドレベルでの結合能評価を行った。その結果、Hyp01/Lin01 はファージレベル・ペプチドレベル双方で、標的である hypPPV/linPPV に対してそれぞれ特異的に結合した。つまり、わずか 12 残基のペプチドが PPV の樹状または直鎖状構造を識別することがわかった。大きな特異性を示した Hyp01 において、Ala スキャニング実験の結果より、二つの Trp が結合において特に重要であることがわかった。また CD スペクトルより Hyp01 は P_{II} コンフォメーションをとっていることがわかった。以上の結果と分子モデリングより、Hyp01 の二つの Trp 残基が適切な位置に配置され、hypPPV への特異性が発現していることが示唆された。今回得られた結果は、ペプチドによって共役系高分子の微妙な構造の差異を識別した初めての例である。さらに電荷をもたない中性の高分子に対してペプチドが π - π 相互作用をメインとした駆動力によって結合可能であることを明らかにした。本知見は、共役系高分子をバイオ分野へ応用する際や、また共役系高分子のみならずカーボンナノマテリアルに特異的に結合するペプチドのスクリーニングを行う際に有用な指針を与える。

第四章では、Hyp01 を hypPPV の水溶化剤へ応用した。Hyp01 と hypPPV を水中で混合し超音波処理したところ、Hyp01 は濃度依存的に hypPPV を水中に分散させた。その際 hypPPV の蛍光波長は短波長シフトし、水中において効率的に分散していることが示された。Hyp01 の水中分散に重要なアミノ酸を同定した。さらに、分散体の構造を動的光散乱法、原子間力顕微鏡、透過型電子顕微鏡によって評価した。その結果直径約 50 ナノメートルの微粒子が生成していることを見出した。本手法を用いれば機能性ペプチドで保護された水中分散性の共役系高分子ナノ粒子をワンステップで簡単に調製することができる。得られた微粒子は蛍光性であるから、センシング能を備えたドラッグデリバリーのキャリアとしての応用が期待される。

第五章では、Mps01を用いて、mpsPPV の蛍光を変調できることを述べた。Mps01は交互積層フィルムの mpsPPV 表面に特異的に結合した。また水溶液中でも mpsPPV と混合すると複合体を形成し、蛍光強度を最大で2.8倍に増強した。Mps01をサーモリシンにより加水分解すると蛍光強度はほぼもとの値まで減少した。このように、mpsPPV とその結合性ペプチドを組み合わせることによって、酵素反応が検出できた。この方法は、複雑なラベリングや特殊な操作を必要としない。また既存の方法に見られる静電相互作用のみを利用した系とは異なり、多様で特異的な相互作用を用いているため、偽のシグナルを与える可能性が少ない。高分子-ペプチド間の特異的な結合を利用した本センシング系は、ケミカル/バイオセンシングの新しいシステムに成り得る。酵素によって蛍光が減少したところに新たに Mps01を加えると再び蛍光は増強した。この蛍光の増減は繰り返し再現性良く起こった。超分子的でダイナミックな相互作用を利用したことによ

って mpsPPV の蛍光スイッチングが可能となった。

第六章では、PPV 結合性ペプチドによる PPV フィルムの表面修飾について述べた。RGD 配列を融合させた PPV 結合性ペプチドで PPV フィルムを表面処理することでフィルム表面を細胞接着性に改変した。このように PPV 結合性ペプチドを用いてバルクの電子・光学的性質を変えることなく、表面に望みの機能を付与できることが示された。

第七章では本研究のまとめと展望を述べた。本論文では、前半で代表的な共役系高分子である PPV に特異的に結合するペプチドを探索し、その結合能評価について記した。また後半ではそのペプチドを水溶化剤、蛍光変調剤、表面処理剤へ応用した。これらの応用はペプチドという生体分子を人口材料とハイブリッドさせることで初めて成し得た事である。それによって、PPV の物理的性質を活かしながら、PPV をバイオ分野へ応用展開することを可能にした。本手法は PPV に留まらず、様々な共役系高分子に展開可能な汎用性を備えており、今後共役系高分子のバイオ分野での用途をますます拡大させることが期待される。