

[37]

氏名	中橋 今日子
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	博第 472 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	<b>Molecular-integrated Surface for Recognition of Specific Biomolecules</b>
論文審査委員	主査 教授 宮田 隆志 副査 教授 大矢 裕一 副査 教授 岩崎 泰彦

## 論文内容の要旨

特定のバイオ分子を選択的に認識する表面・界面は、合成化学、医薬品、環境分析といった様々な分野で求められている。通常このような選択的認識は、抗体や酵素などのタンパク質、核酸、あるいはアプタマーなどのバイオ分子を用いて行われる。しかし、バイオ分子は温度や pH といった外部環境の影響を受けて構造が変化するため、その分子認識能も変動しやすい。そこで、このバイオ分子の分子認識機能を抽出し、化学的に安定な合成高分子で再現する方法としてモレキュラーインプリンティングが提案されている。その原理は、標的分子を鋳型として用い、それと相互作用させた状態のリガンドモノマーと架橋剤を共重合させてネットワーク形成した後、標的分子を取り除くことにより、その分子に相補的な結合部位をポリマー内に形成させるというものである。これまでに、薬物やアミノ酸誘導体など低分子を標的分子に用いたモレキュラーインプリンティングによって、高い選択性を示すポリマーが得られている。一方で、タンパク質のような高分子量のバイオ分子を標的分子とした場合、認識部位を構築することが困難であり、材料への非特異的吸着のために選択性は低くなってしまふ。論文提出者は、特定のバイオ分子を選択的に認識する表面を化学的に安定な合成高分子で創製するため、バイオ分子の非特異的な吸着を抑制する表面を設計し、モレキュラーインプリンティングによって標的分子の認識部位を構築する方法を見出した。本論文では、これらに必要となる基盤材料の設計、選択的なタンパク質認識部位を有する表面の構築、この表面を利用した細胞の捕捉について記述し、高分子量のバイオ分子を標的分子とするモレキュラーインプリンティング表面の創製に関する新設計指針を提案した。

第 1 章は研究の背景と意義を述べ、さらに本論文を理解するための基本的な知識をまとめた。生体内における分子認識システムとその機能を人工的に構築する既存の手法についてまとめ、本研究における特定のバイオ分子を認識するための材料設計を提示した。また、材料表面におけるタンパク質吸着現象や構造変化の過程、細胞接着の機構についてまとめ、バイオ分子の非特異的吸着を抑制する表面の創製が特定のバイオ分子を認識するためには必要であることを述べた。

第 2 章はバイオ分子の非特異的吸着を抑制するための表面処理について述べた。具体的には、光反応性のフェニルアジド基を有する 2-methacryloyloxyethyl-4-azidebenzoate (MPAz) とバイオ分子の非特異的吸着を抑制する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) との光応答性リ

ン脂質ポリマー (PMPAz) を合成し、プラスチックやガラス、セラミックス、金属などの様々な基材の表面処理を行った。表面処理により基材表面は親水化され、タンパク質吸着および細胞接着は有効に抑制された。PMPAz はタンパク質の非特異的吸着を抑制する表面を創製するために有用であると結論された。

第3章は標的タンパク質の認識部位を構築する新しいモレキュラーインプリンティング法を提示した。シリカビーズに標的タンパク質を固定化したタンパク質スタンプビーズを鋳型とし、アニオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) をリガンドとして用いたモレキュラーインプリンティングにより、PMPAz に標的タンパク質の認識部位を形成させた。さらに、インプリント過程において標的タンパク質のウシ血清アルブミン (BSA) の二次構造は変化しないことも確認され、バイオ分子に対して穏やかな条件でインプリントできることが明らかとなった。

第4章は構造が似ている BSA と卵白アルブミン (OVA) を標的分子に選定し、その選択性および分子認識部位を構築しているリガンドの有効性に関して示された。再吸着した標的分子の評価には、タンパク質のトリプトファン残基に起因する自家蛍光を高感度検出する遠紫外光蛍光イメージ顕微鏡 (Deep-UV fluorescence imaging microscope: UVFLIM) を使用した。BSA をインプリントした基板に BSA を接触させた場合にはインプリント部位に蛍光が観察されたが、OVA では蛍光は検出されなかった。また、タンパク質吸着リガンドとして SDS を用いずに BSA をインプリントした基板では、BSA を接触させても蛍光は観察されなかった。BSA と OVA はほぼ同じ等電点を有するにもかかわらず、高い選択性が得られたことから、リガンドが標的分子に対して最適な位置・密度で配向することが認識部位の構築に重要であることが示唆された。

第5章は細胞接着因子であるフィブロネクチン (FN) を標的分子とし、選択的に細胞接着を誘起する表面の創製に関して記述されている。FN をインプリントした基板にはインプリントした場所のみ選択的に細胞が接着したが、FN をインプリントしていない基板や BSA をインプリントした基板には接着しなかった。これは、細胞培養液中の FN がインプリントした場所に再吸着し、細胞接着を誘起したためであった。タンパク質の非特異的吸着を抑制する表面に特定のタンパク質に対する認識部位を構築することにより、高い選択性が得られた。さらに、フォトマスクを用いて任意の場所に FN をインプリントすることにより、細胞を所定の場所に接着誘導することができた。

第6章は本論文の総括である。リガンドを用いて標的分子を多点で捕え、光反応性リン脂質ポリマーで架橋するという新しいモレキュラーインプリンティング手法により、従来困難であったバイオ分子を認識する表面を創製できた。この手法はバイオ分子の種類を選ばず、様々な基板に利用できるため、分離・分析用のツールとしてだけでなく、バイオマーカーの探索・診断、創薬スクリーニング、センシング素子、細胞工学デバイスとして幅広い利用が期待できる。

## 論文審査結果の要旨

特定の生体分子や細胞を選択的に認識する表面や界面の設計は、医用材料や医薬品の開発において極めて重要な課題である。本論文では、特定のタンパク質を認識する表面を化学的に安定な合成高分子を用いて創製することを目的に、タンパク質の非特異的吸着を抑制する表面を形成する方法を検討し、さらに標的タンパク質に対するリガンドを最適配置させた認識部位を構築する方法を提案している。具体的には、まずタンパク質の非特異的吸着を抑制することができる光反応性リン脂質ポリマーを合成し、プラスチックやガラス、セラミックス、金属などの様々な材料表面の

表面改質法を提案した。この技術は、生体分子の非特異的吸着表面や生体適合性表面を簡易形成させる表面改質方法として幅広い応用が期待できる。また、シリカビーズに標的タンパク質を固定化したタンパク質スタンプビーズを鋳型、アニオン性界面活性剤をリガンド、さらに光反応性部位を有する光反応性リン脂質ポリマーをマトリックスとして用いたモレキュラーインプリンティングにより、標的タンパク質を特異的に認識する表面の創製に成功した。さらに、この技術を応用して細胞接着因子であるフィブロネクチンに対する認識サイトを形成させた表面を創製し、選択的に細胞接着を誘起できることも示した。このように論文提出者は、高分子化学を基盤としてモレキュラーインプリンティングと光反応性リン脂質ポリマーとを融合させることにより、生体分子に比較して安定な合成高分子を用いて特定の生体分子を認識する表面を創製することに成功した。本研究で得られた成果は、特定タンパク質の検出や分離を可能にする材料として、バイオマーカーの探索や診断、創薬スクリーニング、細胞工学デバイスなどへ新たな展開が大いに期待できる。さらに、これらの研究成果は、査読有り論文 7 報、総説 2 報、国際学会発表 6 件、国内学会発表 3 件として公表されており、国内外においても高く評価されている。

よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。