OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Syntheses of Mouse Crystallin Proteins and Their Optical Analyses and Applications
Author(s)	古山, 文穂
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69558
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　　古山　文穂　　）	
論文題名	Syntheses of Mouse Crystallin Proteins and Their Optical Analyses and Applications （マウスクリスタリンタンパク質の合成とその光学的解析と応用）

論文内容の要旨

本研究の目的は、タンパク質を基本骨格とする高生体親和性の光学材料を見出すことである。その背景には、バイオセンサーにおける生体親和性材料のニーズの高さや、センシングにおいて、従来の電位状態や電子の検出ではなく、蛍光やレーザーといった電磁波が検出の主役となってきていることがある。

哺乳類の眼の水晶体は、網膜に光を集光する機能を有する器官である。その内部のタンパク質濃度は600 mg / mLにのぼり、水晶体中心部の屈折率はn = 1.66と特異的に高い。水晶体を構成するタンパク質はクリスタリンと呼ばれ、水晶体内において高濃度で安定に存在し、生物の一生をとおして代謝されることがない。我々はこのクリスタリンタンパク質が、光学的にユニークな特徴を示すに違いないと考え、前述の光学材料としての可能性に期待し、ターゲットタンパク質として選定した。クリスタリンの材料応用を目指した研究例は殆どなく、本研究は独自性が高い。第一章では、これら研究の背景について述べた。

第二章では、マウスクリスタリンタンパク質の遺伝子組み換え技術を用いた合成と、その構造確認を実施、そしてその他の実験について、方法論を述べた。マウスのDNAより、3種のクリスタリン遺伝子をクローニングし、各種合成条件を検討のうえ、宿主大腸菌（BL21(DE3)）を用いて目的のタンパク質を効率的に合成した。得られたタンパク質をアフィニティーゲルカラムクロマトグラフィーに供することで、高純度のクリスタリンを溶液として調製した。Native-PAGEにより、クリスタリンが四量体や八量体を形成すること、CDスペクトルより二次構造としてβ-ストランドを多く有することを見出した。

第三章では、クリスタリン溶液の屈折率の測定を行った。合成したクリスタリンは3種とも、比較タンパク質に対して高い屈折率を有することを明らかにした。タンパク質の屈折率は、構成アミノ酸に大きく依存することが知られているが、得られた結果は構成アミノ酸による屈折率の総和平均としての説明のみでは不十分であり、二次構造以上の屈折率への寄与が示唆された。また、クリスタリンは外部環境のpHが変化することで屈折率が大きく変化することも明らかにした。Native-PAGEより、クリスタリンの会合状態はpHが変化しても維持されていることも明らかにしており、会合体内、会合体間の分子間相互作用の屈折率への影響が示唆された。

第四章では、屈折率が分子の双極子モーメントの平方根に比例することに着目し、クリスタリンの構成アミノ酸（一次構造）だけでなく、二次構造、高次構造（会合状態など）と段階的に構造因子の屈折率へ及ぼす影響を検討した。双極子モーメントは、誘起双極子と永久双極子の和であり、クリスタリンにおいては分子内の電荷移動による誘起双極子がその高い屈折率に寄与していると考えた。構成アミノ酸レベルでは、芳香族アミノ酸の寄与が知られている。ホモロジー解析から、クリスタリンは二次構造として逆並行のβシート構造からなるギリシャキーモチーフを有することが予想された。さらに、芳香族アミノ酸はβシートに局在していることが考察され、ギリシャキーモチーフにおいてはβシート間にπ軌道の重なりが生じていると推測された。より高次な構造の観点では、分子間相互作用に着目し、クリスタリンのホモロジーモデリング結果についてシミュレーションを行い、クリスタリンの会合状態が、双極子-双極子相互作用により形成されていると推測した。双極子-双極子相互作用は酸性下で強くなると考えられ、四量体内における電荷移動が促進され、モノマーレベルよりもさらに屈折率が大きくなることを考察した。

第五章では、クリスタリンタンパク質の利用可能性について、初期の検討を行った結果を述べた。高屈折率タンパク質材料への応用展開として、金属ナノ構造や量子ドットの表面にタンパク質を固定化することによる高感度化の可能性を検討した。また、光捕捉技術を用いて大腸菌におけるクリスタリンタンパク質産生の有無を判別できる可能性を示した。

最後に全体を総括、また、将来のタンパク質を基本骨格とする光学材料の設計について提案し、第六章とした。

以上

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（古山　文穂）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	民谷　栄一
	副 査	教授	小林　慶裕
	副 査	教授	井上　康志
	副 査	教授	内山　進
	副 査	教授	植田　充美（京都大学大学院農学研究科）

論文審査の結果の要旨

本論文では、水晶体タンパク質クリスタリンの高屈折率な生体材料に着目し、大腸菌によるタンパク質合成、その物性評価、物性発現のメカニズムの考察、応用展開への検討などを行っており、以下に示す結果を得ている。

(1)　水晶体はクリスタリンタンパク質を高濃度で保有し、高屈折率を有することが知られている。そのなかでもマウスの水晶体はとりわけ高い屈折率を有することが知られており、ここでは、マウスのクリスタリンを用いることとした。マウスの DNA より、3 種のクリスタリン遺伝子をクローニングし、各種合成条件を検討のうえ、大腸菌（BL21(DE3)）を用いて目的のタンパク質を効率的に合成することができた。得られたタンパク質をアフィニティーゲルカラムクロマトグラフィーに供することで、高純度のクリスタリンを溶液として調製し、Native-PAGE により、クリスタリンが四量体を形成することを見出した。

(2)　得られたクリスタリン溶液の屈折率測定を行った結果、合成したクリスタリン 3 種とも、比較タンパク質に対して高い屈折率を有することを明らかにした。タンパク質の屈折率は、構成アミノ酸に大きく依存することが知られているが、得られた結果は構成アミノ酸による屈折率の総和平均としての説明のみでは不十分であることを示唆した。また、クリスタリンは外部環境の pH が変化することで屈折率が大きく変化することも明らかにできた。

(3)　屈折率が分子の双極子モーメントの平方根に比例することに着目し、構成アミノ酸（一次構造）だけでなく、二次構造、高次構造（会合状態など）と段階的に構造因子の屈折率へ及ぼす影響を検討した。ホモロジー解析から、クリスタリンは二次構造として逆並行のβシート構造からなるギリシャキーモチーフを有することが予想された。さらに、芳香族アミノ酸はβシートに局在していることが考察され、ギリシャキーモチーフにおいてはβシート間にπ軌道の重なりが生じていると推測された。クリスタリンの会合状態は、双極子-双極子相互作用により形成され、酸性下での会合が進むと電荷移動が促進され、モノマーレベルよりもさらに屈折率が大きくなることを考察した。

(4)　高屈折率タンパク質材料の応用展開として、金属ナノ構造や量子ドットの表面にタンパク質を固定化することによる高感度化の可能性を検討した。また、光捕捉技術を用いて大腸菌におけるクリスタリンタンパク質産生の有無を判別できる可能性を示した。

以上のように、本論文はクリスタリンタンパク質を遺伝子から設計合成を行い、その屈折率を計測するとともに屈折率発現に関する理解を深めた。また、今後の高屈折率生体材料の設計と用途展開についても検討を行っており、関連する応用物理学研究に貢献するものである。本論文は博士学位論文として価値あるものと認める。