



Title	Construction of Stimuli-Responsive Hydrogels Containing Hexameric Hemoprotein and $\beta$ -Lactoglobulin
Author(s)	影山, 和希
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/96038">https://doi.org/10.18910/96038</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 影 山 和 希 )	
論文題名	Construction of Stimuli-Responsive Hydrogels Containing Hexameric Hemoprotein and $\beta$ -Lactoglobulin (ヘムタンパク質六量体および $\beta$ -ラクトグロブリンを構成要素とする刺激応答性ゲルの開発)
論文内容の要旨	
<p>ハイドロゲルは、その生体適合性や刺激応答性から医療材料やセンサー、薬物輸送システムなどの素材として盛んに研究されている。特に刺激応答性ゲルは、温度やpH、塩強度、酸化還元状態、特定の化学物質の有無などに応答して、ゲル自身のサイズや力学物性を変化させる。近年では、刺激応答性を発現する機能性分子をゲルを構成するネットワーク構造に組み込むことで、合理的な設計が可能になってきている。しかしながら、機能性分子としてタンパク質を組み込んだゲルは、タンパク質に特徴的な刺激応答性や力学物性が期待される一方で、その報告例は限定的である。本博士論文では、ヘムタンパク質六量体を架橋ユニットとする酸化還元応答性ゲルおよび<math>\beta</math>-ラクトグロブリンを構成要素とする圧縮に応答して反応性を変化させるゲルの開発に取り組んだ。</p> <p>第一章では、ヘムタンパク質六量体に注目し、そのヘム結合能の酸化還元応答性の評価とこの応答性を利用した刺激応答性ゲルの開発を実施した。ヘムタンパク質六量体として、Tyrosine-coordinated Hexameric Heme Protein (HTHP)を選択した。HTHPは鉄ポルフィリン錯体であるヘムを六つのポリペプチド鎖の一つずつ含むタンパク質である。グアニジン滴定における円二色性スペクトル変化を評価することで、鉄三価および鉄二価におけるヘムの結合の自由エネルギーを決定し、鉄三価が鉄二価に比べて安定であることを見出した。HTHPをゲルの架橋ユニットとするために、HTHP中のヘムを、重合反応に活性なアクリロイル基をヘムのプロピオン酸鎖末端に有する合成ヘムに置換し、再構成HTHP (rHTHP)を調製した。アクリルアミドと鉄三価のrHTHPを共重合することで鉄三価のrHTHPを含むゲルを得た。このゲルは、HTHPと同様の吸収スペクトルを有し、対照実験や鉄二価のヘムをより強く結合するタンパク質を還元剤と共に加えることでゾル化するなどの性質から、rHTHPがゲルの架橋ユニットとして機能し、高分子鎖はヘムとタンパク質の相互作用を介して、架橋していることを明らかにした。さらに、メチレンビスアクリルアミドを加え、アクリルアミド、rHTHPを共重合したゲルにおいて力学物性を評価したところ、鉄三価のrHTHPを含むゲルは含まないゲルよりも大きなヤング率を示した。また鉄二価に還元することで圧縮弾性が低下することを見出し、酸化還元に応答して力学物性が変化することを明らかにした。</p> <p>第二章では、第一章で開発したrHTHPを架橋ユニットとするゲルにおいて、タンパク質への変異導入の影響を評価した。ヘムとタンパク質間の相互作用は、タンパク質への変異導入により変化することが知られている。しかしながら、HTHPにおいて、変異導入によるヘム結合能への影響は調査されていない。そこで、ヘム結合部位に位置する二つのアルギニン残基に注目して、それぞれをアラニンに置換した一重変異体を調製した。これらの変異体において、ヘム結合能の低下が、グアニジン滴定実験により示された。この変異体のヘムをアクリロイル基を有する合成ヘムに置換し、rHTHP変異体を得た。rHTHP変異体を含むポリアクリルアミドゲルを調製し、引張り試験により評価したところ、変異を導入していない場合に比べて30%ヤング率が低下することを示した。HTHPを架橋ユニットとするゲルは、タンパク質への変異導入により、力学物性が調製可能であることを明らかにした。</p> <p>第三章では、生乳に含まれるタンパク質である<math>\beta</math>-ラクトグロブリンをポリエチレングリコールで架橋したゲルを開発した。<math>\beta</math>-ラクトグロブリンはタンパク質内部に反応性のシステイン残基を有しているが、正常な折り畳み構造では反応しない。一方で、変性状態ではマレイミド基等の官能基と反応することが知られている。ゲルを圧縮することで、内部の<math>\beta</math>-ラクトグロブリンが機械的に変性し、さらにマレイミド基を有する蛍光色素やジスルフィド結合を形成する蛍光タンパク質と<math>\beta</math>-ラクトグロブリンのシステインが化学結合を形成することを明らかにした。このゲルが、新しいタイプの力学刺激応答性ゲルとして機能することを示した。</p> <p>以上、本博士論文では、ヘムタンパク質六量体や<math>\beta</math>-ラクトグロブリンを含むゲルが、それぞれの性質に独特な刺激応答性を示すことを明らかにした。本研究において得られた結果は、タンパク質を基盤とする刺激応答性ゲルに関する知見を与え、将来、アクチュエーターや応力センサーなどの開発に寄与することが期待される。</p>	

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 影 山 和 希 )			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	林 高史
	副 査	教授	宇山 浩
	副 査	教授	能木 雅也 (産業科学研究所)
	副 査	教授	桑畑 進
	副 査	教授	藤内 謙光
	副 査	教授	櫻井 英博
	副 査	教授	南方 聖司
	副 査	教授	今中 信人
	副 査	教授	佐伯 昭紀
	副 査	教授	中山 健一
	副 査	教授	古川 森也
	副 査	教授	古澤 孝弘 (産業科学研究所)

## 論文審査の結果の要旨

ハイドロゲルは、その生体適合性や刺激応答性から医療材料やセンサー、薬物輸送システムなどの素材として盛んに研究されている。本博士論文では、ヘムタンパク質六量体を架橋ユニットとする酸化還元応答性ゲルおよび $\beta$ -ラクトグロブリンを構成要素とする圧縮に応答して反応性を变化させるゲルの開発について記述している。

第一章では、ヘムタンパク質六量体に注目し、そのヘム結合能の酸化還元応答性の評価とこの応答性を利用した刺激応答性ゲルの開発について記述している。ヘムタンパク質六量体として、Tyrosine-coordinated Hexameric Heme Protein (HTHP) を選択している。このHTHPは鉄ポルフィリン錯体であるヘムを六つのポリペプチド鎖の一つずつ含むタンパク質である。グアニジン滴定における円二色性スペクトル変化を評価することで、鉄三価および鉄二価におけるヘムの結合の自由エネルギー値を決定し、鉄三価が鉄二価に比べて安定であることを見出している。HTHPをゲルの架橋ユニットとするために、HTHP中のヘムを、重合反応に活性なアクリロイル基をヘムのプロピオン酸鎖末端に有する合成ヘムに置換し、再構成HTHP (rHTHP) の調製が実施されている。アクリルアミドと鉄三価のrHTHPを共重合することで鉄三価のrHTHPを含むゲルを得ている。このゲルは、HTHPと同様の吸収スペクトルを有し、対照実験や鉄二価のヘムをより強く結合するタンパク質を還元剤と共に加えることでゾル化するなどの性質から、rHTHPがゲルの架橋ユニットとして機能し、高分子鎖はヘムとタンパク質の相互作用を介して、架橋していることを明らかにしている。さらに、メチレンビスアクリルアミドを加え、アクリルアミド、rHTHPを共重合したゲルにおける力学物性の評価から、鉄三価のrHTHPを含むゲルは、rHTHPを含まないゲルよりも大きなヤング率を有することを示している。また鉄二価に還元することで圧縮弾性が低下することを見出し、酸化還元に応答して力学物性が変化することを明らかにしている。

第二章では、第一章で開発したrHTHPを架橋ユニットとするゲルにおいて、タンパク質への変異導入の影響を評価している。ヘムとタンパク質間の相互作用は、タンパク質への変異導入により変化することが知られている。しかしながら、HTHPにおいて、変異導入によるヘム結合能への影響は報告されていない。そこで、ヘム結合部位に位置する二つのアルギニン残基に注目して、それぞれをアラニンに置換した一重変異体を調製している。これらの変異体におけるヘム結合能の低下については、グアニジン滴定実験により示している。この変異体のヘムをアクリロイル基を有する合成ヘムに置換し、rHTHP変異体を得ている。rHTHP変異体を含むポリアクリルアミドゲルを調製し、引張り試験により評価したところ、変異を導入していない場合に比べてヤング率が30%低下することが示されている。HTHPを架橋ユニットとするゲルは、タンパク質への変異導入により、力学物性が調製可能であることを明らかにしている。

第三章では、生乳に含まれるタンパク質である $\beta$ -ラクトグロブリンをポリエチレングリコールで架橋したゲルの開発について記述している。 $\beta$ -ラクトグロブリンはタンパク質内部に反応性のシステイン残基を有しているが、正常な折り畳み構造では反応しないが、変性状態ではマレイミド基等の官能基と反応することが知られている。ゲルを圧縮することで、内部の $\beta$ -ラクトグロブリンが機械的に変性し、さらにマレイミド基を有する蛍光色素やジスルフィド結合を形成する蛍光タンパク質と $\beta$ -ラクトグロブリンのシステインが化学結合を形成することを明らかにしている。このゲルが、新しいタイプの力学刺激応答性ゲルとして機能することを示している。

以上のように、本論文はヘムタンパク質六量体や $\beta$ -ラクトグロブリンを含むゲルが、それぞれの性質に独特な刺激応答性を示すことを明らかにしている。

よって本論文は博士論文として十分に価値あるものと認める。