

論文内容要旨 (和文)

2017年度入学 大学院博士後期課程

有機材料システム専攻

氏 名 今村 龍太郎



論文題目

三級スルホニウム基含有両性イオンポリマーの合成とタンパク質安定化効果

近年、医薬品、臨床検査、診断薬の分野において、抗体、酵素、サイトカイン等の生理活性を有するタンパク質が広く利用されている。医薬品としてタンパク質・抗体を投与する場合や、抗体を用いた高感度なタンパク検出を行うためには、タンパク質の構造または酵素活性を長期間保持することが必要となる。しかしながら、ほとんどのタンパク質は温度、凍結、pH、振動、塩濃度などのストレスによって容易に変性、失活する。なかでもタンパク質を医薬品分野、診断薬分野で用いる場合、冷蔵保存、凍結、高温といったストレスに多くさらされる。本研究の目的は冷蔵保存、凍結、高温のストレスに対する合成高分子のタンパク質安定化剤を提供することである。

タンパク質安定化効果を有する高分子の設計にあたり、海洋性藻類が自身のタンパク質を保護するために放出している DMSP (Dimethylsulfonio propionate) に注目し、DMSP をミミックしたポリマーとして poly(*N*-acryloyl-L-methionine methyl sulfonium salt) : poly(A-Met(S⁺)-OH) を設計し、タンパク質安定化効果の評価を行った。

新規の三級スルホニウムポリマーである poly(A-Met(S⁺)-OH) はモノマーとして *N*-acryloyl-L-methionine (A-Met-OH) を RAFT 重合し、その後三級化反応を行うことで合成した。また、A-Met-OH の重合前に三級化反応を行い、親水性モノマーである A-Met(S⁺)-OH としてから水中で重合を行うことで、poly(A-Met(S⁺)-OH) を合成することも可能となった。

この DMSP を模倣した poly(A-Met(S⁺)-OH) ホモポリマーは細胞毒性を示さない一方、高いタンパク質安定化効果を有することがわかった。酵素として HRP (Horseradish peroxidase) に合成した各種 poly(A-Met(S⁺)-OH) 溶液を添加することで、4℃で5日間保存した後もほとんど酵素活性の低下は見られず、冷蔵保存ストレスに対する安定化効果を確認した。さらに、凍結ストレスや、異なる酵素、抗体についても高い安定化効果を有することがわかった。

次に冷蔵条件で長期的な安定化を目標とし、A-Met(S⁺)-OH と生体適合性のある疎水性モノマーである BA (*n*-butyl acrylate) とのランダム共重合合成されたランダムコポリマーは poly(A-Met(S⁺)-OH) ホモポリマーに比べ、より長期間のタンパク質安定化効果を示したことから、ポリマー中の疎水部がタンパク質安定化効果に大きな影響を与えることがわかった。

次に高温ストレスに対しての安定化を目的として両親媒性ブロックコポリマーの合成を行なった。疎水性ユニットである BA を集積することでたんぱく質との相互作用を強め、安定化効果を高める設

計である。ブロックコポリマー($\text{poly}(\text{A-Met}(\text{S}^+)-\text{OH})-b\text{-poly}(\text{BA}))$)についても RAFT 重合により合成した。得られたブロックコポリマーを HRP に添加することで 37°C 、5 日間の加速劣化試験においても活性を維持することができた。またタンパク質安定化効果は適切な $\text{A-Met}(\text{S}^+)-\text{OH}/\text{BA}$ 比をとるときに最大になることが明らかになり、同様の組成のランダムコポリマーに比べ、より高い安定化効果を示すことが明らかになった。この傾向は他種のタンパク質についても観察された。

Zeta 電位測定など各種物性測定から、ブロックコポリマーを用いた場合、疎水性ユニットである BA とタンパク質の疎水性ドメインと強く相互作用することで高いタンパク質安定化効果を発揮できることが明らかになった。

また、ブロックコポリマーと糖の両方を添加することで、 37°C 、5 日後も活性はほとんど減少しなかったことから、高温ストレスに対しても安定化効果を発揮することが分かった。

最後に工業化を見据え、 $\text{poly}(\text{A-Met}(\text{S}^+)-\text{OH})$ の水中での重合について検討した。水中での重合が可能になることにより工業的なメリットがある。例えば、重合中の熱の管理が容易になるほか、危険物の使用量の低減や重合終了後煩雑な精製工程を経ることなく、製品化することも可能である。

まず、水溶性である両性イオンモノマー $\text{A-Met}(\text{S}^+)-\text{OH}$ は $\text{A-Met}-\text{OH}$ から副生成物を生じることなく合成した。

水中での重合条件についてはラジカル開始剤、重合温度の最適化を行った結果、ラジカル開始剤として VA-044 を用い、 45°C で重合することで副反応なく重合が進行することが分かった。水中 RAFT 重合については水溶性の CTA である CSSA を用いることで、分子量及び分子量分布の制御されたポリマーを得ることができた。

本研究により新規の両性イオンポリマーである $\text{poly}(\text{A-Met}(\text{S}^+)-\text{OH})$ を用いることで冷蔵保存、凍結ストレスに対する安定化効果を確認できた。さらに BA との両親媒性ブロックコポリマーを合成することで、高温ストレスに対してもタンパク質安定化効果を発揮することがわかった。さらに $\text{A-Met}(\text{S}^+)-\text{OH}$ モノマーの水中RAFT重合により分子量、分子量分布の制御されたポリマーの合成が可能となり、工業的な応用も可能となった。

論文内容要旨 (英文)

2017年度入学 大学院博士後期課程

有機材料システム専攻

氏 名 今村 龍太郎



論文題目 Synthesis and Functional Evaluation of Zwitterionic Polymers Containing Tertiary Sulfonium Groups

This study demonstrates the controlled synthesis and biological potential of poly(*N*-acryloyl-L-methionine methyl sulfonium salt)s (poly(A-Met(S⁺)-OH)s), which mimic dimethylsulfoniopropionate (DMSP), a compound produced by marine algae to protect their proteins. The novel sulfonium-containing zwitterionic polymers were synthesized by reversible addition-fragmentation chain transfer (RAFT) polymerization of *N*-acryloyl-L-methionine (A-Met-OH) followed by a post-modification process in which the sulfide groups were reacted with iodomethane. The DMSP-mimic zwitterionic macromolecules were shown for the first time to exhibit low cytotoxicity and the ability to stabilize proteins. By adding the resulting poly(A-Met(S⁺)-OH)s to horse radish peroxidase (HRP) solution, the activity of HRP was maintained even after storage at 4 °C for several days. In addition, the protein stabilization effect was shown after freeze-thaw cycles. Amphiphilic random copolymers, poly(A-Met(S⁺)-OH-*co*-BA)s, also exhibited excellent properties for protein stabilization.

Next, Amphiphilic zwitterionic block copolymers consisting of A-Met(S⁺)-OH and BA were newly synthesized to enhance the relationship between polymer architecture and protein stabilizing effect. The zwitterionic block copolymers stabilized HRP during storage at 37 °C for 5 days, and the protein stabilizing effect was enhanced with increase in the A-Met(S⁺)-OH content. In particular, the block copolymer with ~85 % A-Met(S⁺)-OH content showed significant protein stabilizing effect at a temperature (37 °C) higher than a room temperature, which is highly desirable for practical and industrial applications. The addition of sucrose into the zwitterionic block copolymer-protein solution led to a considerable increase in the HRP activity under the same conditions. The effect of the comonomer sequence (block or random) on protein stability was also investigated. The zwitterionic block copolymers, poly(A-Met(S⁺)-OH)-*b*-poly(BA)s, with the optimal hydrophilic/hydrophobic (zwitterionic A-Met(S⁺)-OH/non-ionic BA) balance were found to serve as efficient protein stabilizing agents, in comparison with the corresponding homopolymer and random copolymers, poly(A-Met(S⁺)-OH) and poly(A-Met(S⁺)-OH-*co*-BA)s. DLS, Zeta potential, TEM and CD spectra measurement revealed that the zwitterionic block copolymer stabilizes enzyme by wrapping with a slight change in the size, whereas the secondary and ordered structures of the enzyme are maintained.

Finally, RAFT polymerization of hydrophilic monomer, A-Met(S⁺)-OH) was performed in water in the presence of water-soluble CTA. Several parameters, such as the temperature, the nature of salt used as an additive, the polymerization solvent (water or buffer solution) were studied. Polymerization of A-Met(S⁺)-OH in acetate buffer using a water-soluble trithiocarbonate-type CTA proceeded in a controlled fashion at 45 °C, as confirmed by the relatively narrow polydispersity of the product and a molecular weight that could be controlled by the monomer-to-CTA molar ratio.

学位論文の審査及び最終試験の結果の要旨

令和 2 年 1 月 31 日

有機材料システム研究科長 殿

課程博士論文審査委員会

主査 森 秀晴 印
副査 川口 正剛 印
副査 熊木 治郎 印
副査 長峯 邦明 印
副査 印

学位論文の審査及び最終試験の結果を下記のとおり報告します。

記

論文申請者	有機材料システム専攻 氏名 今村龍太郎		
論文題目	三級スルホニウム基含有両性イオンポリマーの合成とタンパク質安定化効果		
学位論文審査結果	合格	論文審査年月日	令和 2 年 1 月 24 日～ 令和 2 年 1 月 30 日
論文公聴会	令和 2 年 1 月 30 日	場 所	工学部百周年記念会館セミナー室
最終試験結果	合格	最終試験年月日	令和 2 年 1 月 30 日

学位論文の審査結果の要旨 (1,000 字程度)

本学位論文は、タンパク質安定化剤として機能する三級スルホニウム基含有両性イオンポリマーの設計・精密合成と、冷蔵、凍結、高温といったストレスに対するタンパク質安定化効果と制御因子との相関について論じたものである。この成果について 5 章構成で論じている。

1 章では、研究の背景として、抗体、酵素、サイトカイン等の生理活性を有するタンパク質の有用性や、タンパク質の構造または酵素活性を長期間保持するためのタンパク質安定化剤の重要性を論じている。

2 章ではタンパク質安定化剤の分子設計とホモポリマーおよびランダムコポリマーの合成と機能評価について述べている。分子設計としては、海洋性藻類が自身のタンパク質を保護するために放出している DMSP (Dimethylsulfonio propionate) に注目し、DMSP を模倣したポリマーとして poly(N-acryloyl-L-methionine methyl sulfonium salt) : poly(A-Met(S⁺)-OH) を設計した。その後、ホモポリマーおよび n-ブチルアクリレートとのランダム共重合体の合成と機能評価について論じている。

3 章では両親媒性ブロックコポリマーの合成と高温条件でのタンパク質安定化効果の評価について論じている。両親媒性ブロック共重合体は同様の組成であるランダム共重合体に比べタンパク質安定化効果が高く、高温条件での安定化が可能であることを見出している。

4 章では工業的な応用を目指し、水中での A-Met(S⁺)-OH の RAFT 重合について述べている。A-Met(S⁺)-OH の水中 RAFT 重合において重合溶媒や重合温度の検討を行い最適条件を確立している。

5 章では三級スルホニウム基含有両性イオンポリマーを用いたタンパク質安定化剤について総括し、今後の展望を述べている。

本研究成果は、申請者を筆頭著者とした学術論文 (2 報掲載済み) によってまとめられており、当該専攻の審査基準も満たしている。以上を総合的に判定し、研究成果および研究内容ともに工学的貢献が十分に認められたため合格と判定した。なお本論文は、研究倫理または利益相反等に係る学内規則に基づく手続きは必要ありません。

最終試験の結果の要旨

最終試験は、60 分の学位論文の口頭発表と 30 分の質疑応答により実施した。発表内容はわかりやすく整理され、実験結果に関する考察も十分になされていた。質疑応答に関しても適切に回答がなされた。これらの結果、学位論文の内容ならびに関連分野に関する理解は十分であり、博士の学位を授与するのに十分な専門知識と研究能力を有していると判断された。以上より、最終試験を合格と判定した。