

# 主 論 文 要 旨

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	田中 裕之
主 論 文 題 目： タンパク質と反応性高分子からなる機能性ハイドロゲルの 創製及びマイクロアレイへの応用			
(内容の要旨) 個別化医療の具現化には、複数の因子を同時に解析するマイクロアレイの技術が必要不可欠である。プロテインマイクロアレイの場合、固定化によりタンパク質が失活したりするなど問題があるため、解決すべき点が多く残っているのが現状である。現在、様々なタンパク質の固定化法の検討が行われている中で、基板表面に高分子からなるハイドロゲルを形成し、その中にリガンドタンパク質を固定化する試みが多数報告されているが、種々の問題から実用には至っていない。本論文では、基板表面にタンパク質と反応性高分子から構成されるナノ粒子が主体である3次元ナノ構造体(“3-Dimensional Nano-structured Protein Hydrogel” (3-D NPH))を創製し、それを用いてタンパク質固定化を行った場合タンパク質間相互作用の検出感度が大幅に向上することを実現し、それについてまとめた。さらに、3-D NPH の構造との相関と、これをマイクロアレイに応用しタンパク質間相互作用の検出について検討した内容をまとめた。 [第1章]：プロテインマイクロアレイとタンパク質の固定化方法の現状と課題、さらにタンパク質固定化方法の分類と開発動向について概説し、本論文の研究目的と位置付けを示した。 [第2章]：3-D NPH は、固定化するタンパク質と反応性高分子の混合溶液を、基板の所望の領域に滴下濃縮することで作製できる。反応性高分子として poly( <i>N</i> -Acryloylmorpholine-co- <i>N</i> -Acryloxysuccinimide)を使用した。3-D NPH の加水分解産物をアミノ酸分析法と熱分解ガスクロマトグラフィーにて分析することで、3-D NPH を構成している IgG の単位面積あたりの固定化量は $26 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり 14 から 93 層に相当する IgG から構成されていた。タンパク質間相互作用を検出したところ顕著にシグナルが向上した。 [第3章]：3-D NPH の構造を解析した。3-D NPH 内にアナライト分子が拡散するかを明らかにするために、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、プロテイン A 金コロイド(粒径 10nm)を用いて染色し、3-D NPH-IgG の断面を観察し、プロテイン A 金コロイドが 3-D NPH の最下部にまで浸透したことから、アナライト分子が浸透するのに十分な空隙が、3-D NPH 内に存在することが見出された。走査型電子顕微鏡(SEM)によって、3-D NPH の断面には、粒径 100nm 程度のほぼ均一な粒子状塊が観察された。3-D NPH の表面形状を観察するために原子間力顕微鏡(AFM)にて測定を行った。その結果、3-D NPH の表層には、SEM の観察結果と同様に 100nm 程度の粒子状塊が観察され、その塊と塊の間には空隙があることが判明した。 [第4章]：マイクロアレイに適用するためには、微小な領域にハイドロゲルを形成させる必要がある。そのため、マイクロアレイ用のマイクロスポッター(1 スポットあたりの液量:3nL)を用いて 3-D NPH を作製し、アナライトタンパク質との相互作用を評価した。その結果、3-D NPH の場合、仕込みのタンパク質濃度に応じて検出シグナルが増加した。一方、2D 法で固定した場合、検出シグナルはいずれの条件の場合もシグナルが検出されなかった。このようなことから、作製条件により反応性の制御が可能であることが示唆された。さらに 3-D NPH に対する非特異吸着はほぼ生じないことが見出された。 [第5章]：本研究を総括し、今後の展望について述べた。			