

学位論文 博士（理学）

疎水性小分子の水中分散を実現する
タンパク質ナノケージ材料の開発と応用展開

2025 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

山下 舞佳

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号	○甲 乙 第	号	氏 名	山下舞佳
主 論 文 題 名： 疎水性小分子の水中分散を実現するタンパク質ナノケージ材料の開発と応用展開				
(内容の要旨) 色素、香料、医薬品、農薬など、多くの機能性分子は高い疎水性を示し、水中での分散性に課題がある。これを解決するため、各種分散剤が開発されてきた。中でも、タンパク質を基盤とした分散剤は、その構造の均質性の高さから有用な分散剤として注目されている。従来は扱いが容易な比較的小型のタンパク質が用いられてきたが、近年では、利用されるタンパク質も拡張されている。一例として、中空の構造を持つタンパク質ナノケージの利用が挙げられる。その構造的特徴から、内部空間に化合物を内包できるため、これを疎水性化合物の分散剤として利用する研究が徐々に始まっている。しかし、天然のタンパク質ナノケージは密なパッキングを有することで、化合物の内包効率が低い課題があった。 本研究では、この課題を克服するため、人工タンパク質ナノケージ TIP60 を用いた分散剤の開発を行った。TIP60 はサッカーボール型の構造を持ち、直径 2.3 nm の孔を 20 箇所にも有する多孔質構造体である。この構造により、内部空間の化学的性質を化学修飾によって改変でき、かつ、機能性分子の効率的な取り込みが可能となる。 第一章では、緒言として、疎水性小分子の水中分散に関する背景と課題を包括的に概説している。続いて、タンパク質、とりわけナノケージを用いた分散設計の可能性を整理し、最後に、本研究で用いる TIP60 の位置づけを明確化し、本論文の目的について述べている。 第二章では、TIP60 を疎水性小分子の分散剤として設計するためのモデル系構築について述べている。具体的には、内側表面を4種類の疎水性化合物で化学修飾した疎水化 TIP60 群を作成し、ナイルレッド (NR) の内包能を比較した結果、ピレン修飾 TIP60 が最も高い内包効率を示すことを見いだした。蛍光測定から、内包 NR のオリゴマー化が抑制されていることも明らかにした。これらの知見に基づき、光増感剤亜鉛フタロシアニン (ZnPC) の内包と機能評価についても行った。 第三章では、内包効率のさらなる向上を目的に、修飾ピレンの数と配置を最適化した複数の変異体設計について述べている。結果として、約 90 個のピレンを修飾した変異体において、NR の内包数が飛躍的に増加することを見出した。クライオ電子顕微鏡による構造解析では、五芒星状に配置されたピレン分子が相互作用し、NR の結合部位として機能していることが示唆された。このピレン間相互作用は、ナノケージ全体の耐熱性向上にも寄与していた。さらに、NR が環境応答的な色変化特性を持つことから着想を得て、NR 内包 TIP60 がナノケージの解離・再構築に応答して色が変わる刺激応答型インク材料として機能することを実証した。 第四章では、本研究で得られた一連の成果を総括し、その意義と今後の展望について述べている。				

Thesis Abstract

No. 1

Registration Number	☒ "KOU" ☐ "OTSU" No. _____ *Office use only	Name	Maika Yamashita
Thesis Title A Protein Nanocage-Based Material for Efficient Aqueous Dispersion of Hydrophobic Compounds			
Thesis Summary Many functional molecules such as dyes, fragrances, pharmaceuticals, and agrochemicals are poorly soluble in water. To overcome the problem, various dispersants have been developed. Protein nanocages, such as ferritin and virus-like capsids, are one of the promising platforms for the development of dispersants. By encapsulating hydrophobic compounds within their inner space, these nanocages enable the dispersion of such compounds in aqueous media. However, natural protein nanocages often face limitations in encapsulation efficiency due to their densely packed structures. To overcome this limitation, I developed a novel dispersant based on the artificial protein nanocage TIP60. TIP60 is a soccer ball-like nanocage with 20 large pores, which act as the tunnels for small-molecule shuttle between inside and outside. This structure allows both the tuning of the chemical properties of the inner space through chemical modification and the efficient incorporation of hydrophobic molecules in the nanocage. In Chapter 1, I described the background and challenges of dispersing hydrophobic small molecules in water. I then summarized the potential of proteins, particularly nanocages, for dispersion design, and concluded with the objective of the thesis, highlighting the role of TIP60. In Chapter 2, I constructed a TIP60-based dispersant system. A TIP60 mutant with 60 cysteine residues on the interior surface was purified and chemically modified using four different hydrophobic compounds. These modified nanocages successfully encapsulated several hydrophobic fluorescent molecules and dispersed them in aqueous solution. Among the variants, the pyrene-modified nanocage exhibited the highest encapsulation efficiency. I also found that the encapsulated molecules were protected from oligomerization. In Chapter 3, I sought to enhance the encapsulation efficiency by altering the number and position of pyrene modifications. As a result, a mutant with 120 cysteine residues on the interior surface exhibited a significant increase in the number of Nile Red (NR) molecules encapsulated. Cryogenic electron microscopy analysis suggested that the binding site for NR was formed by pyrenes arranged in a pentagram configuration. The pyrene modification improved the stability of the 60-mer structure. Finally, I demonstrated that modified TIP60-encapsulated NR functions as a reversible, color-changing ink material on cellulose-based paper in response to heating and cooling. In Chapter 4, I summarized the findings of this research.			