



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional modification of mussel adhesive proteins for environmental applications [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Pilakka Veedu, Anju
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15631号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90827
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Anju_Pilakka_Veedu_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (工学)	氏名	Anju Pilakka Veedu
審査担当者 主査 准教授	中島 一紀		
副査 教授	川崎 了		
副査 教授	廣吉 直樹		
副査 教授	佐藤 久		

学位論文題名

Functional modification of mussel adhesive proteins for environmental applications

(イガイ接着タンパク質の機能改変と環境分野への応用)

イガイは自身の足を使って海洋中で岩礁帯や船底などに強固に付着しており、その接着に関与しているのがイガイ接着タンパク質 (Mussel adhesive protein: MAP) である。MAP は強い接着力を示し、激しい水流、温度変化、高塩濃度という環境下においてもイガイを岩や金属等に固定するために重要な役割を果たしている。MAP は重金属や有機系の汚染物質に対しても高い親和性を示すため、水や土壌からの汚染物質の除去への応用研究も行われている。MAP を模倣した合成ポリマーの研究も非常に活発に行われているが、自然環境中で利用することを考えると、本来のタンパク質である MAP の方が環境負荷は小さく、持続可能な材料開発という面でも重要な意味をもつ。そのため、組換えタンパク質としての MAP の生産が必要になるが、本来 MAP は接着性・凝集性が非常に高く、そのハンドリングや効率的な生産は非常に困難であった。また、強力かつ水中で利用できる天然由来の接着剤である MAP の接着性を任意にコントロールすることが可能になれば、MAP の応用範囲は飛躍的に拡大すると思われる。

本論文は、MAP の機能改変と環境分野への応用について研究を行ったものである。特に、遺伝子工学的手法により MAP の接着特性をコントロールすることで、ハンドリング性向上とスケールアップ生産における改良を目的とした。具体的には、高い水溶性を示し、外部刺激に応答して接着挙動が変わる機能化 MAP を開発し、無機微粒子の凝集、および無機-有機微粒子の複合体形成、およびその機能を用いた新しい概念の環境浄化技術を提案している。

第 1 章では、研究背景、MAP の特徴と接着メカニズム、研究の目的と意義について述べた。

第 2 章では、遺伝子組換え MAP に関する先行研究をレビューし、目的や用途に応じた機能改変について議論した。

第 3 章では、MAP に水溶性タンパク質タグを融合することにより、溶解性の向上やタンパク質の凝集の抑制、接着性の制御について検討した。本研究では、代表的な MAP の一つである Fp1(デカペプチドの 12 回繰り返し配列からなる) を用いて検討を行った。可溶性タンパク質として、これまでの研究において高い水溶性が確認されている InaKC を用い、Fp1 との融合タンパク質 InaKC-Fp1 を作製した。InaKC-Fp1 は不溶性として発現したが、リフォールディングをすることにより可溶化し、長期間安定であることが示された。また、InaKC-Fp1 の接着特性を調査するため本来 Fp1 が接着性を示すマグネタイト (磁鉄鉱) 微粒子を用いた。部位特異的タンパク質分解酵素を用いて融合タンパク質 InaKC-Fp1 から InaKC 部位を除去することにより Fp1 の接着性が回復し、水溶液中で

マグネタイト微粒子の凝集が確認された。以上より、水溶液中で安定に存在し、外部刺激に応答して接着性が回復する機能性 MAP の開発に成功した。

第 4 章では、MAP を用いたマイクロプラスチックの回収について検討した。MAP は水中で無機物および有機物のいずれの表面にも付着することができるため、そのような MAP の特異的な性質を利用してマグネタイト (無機物) とマイクロプラスチック (有機物) の複合体を形成し、それを磁力により回収する研究アプローチである。マイクロプラスチックのモデル物質であるポリスチレン (PS) 微粒子が分散した溶液に融合タンパク質 InaKC-Fp1 を添加し、切断酵素により融合タンパク質から InaKC 部分を取り除いたところ、Fp1 の接着性が回復し、PS 微粒子の凝集が確認された。次に、PS 微粒子とマグネタイト微粒子が分散した溶液に InaKC-Fp1 を添加し、同様に切断酵素で InaKC 部分を除去すると、PS とマグネタイトの複合体が形成された。複合体は磁力により回収することができ、水溶液中の PS 微粒子の 99.6 % を回収することができた。

さらに、外部刺激に応答して接着性のスイッチングが可能な刺激応答性 MAP を開発した。Fp1 を分断した接着ユニットの末端にシステイン (-SH 基) を導入し、還元的環境では接着性の低い分離した状態であるが、酸化的環境ではジスルフィド結合の形成により接着ユニットが連結されることで本来の Fp1 となるアプローチである。種々のプラスチック材料 (PS, PE, PET, PTFE) を用いて接着性を確認したところ、還元的環境では接着性を示さず、酸化的環境で高い接着性を示すことが明らかとなった。

第 5 章では、各章で得られた研究成果を総括し、本研究の展望について述べた。

以上を要するに、筆者はイガイ接着タンパク質の溶解性と接着性のコントロール、それをを用いた無機-有機複合体の形成、および磁力を用いた新たなマイクロプラスチック回収法の開発に成功した。これらは、次世代型の環境浄化技術や新規バイオベース材料の開発において新たな知見を与えるものであり、環境バイオ工学の発展に貢献するところ大なるものがある。よって筆者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格があるものと認める。