

京都大学	博士 (工学)	氏名	板垣 亮
論文題目	Investigation on Structural High-Order Organization of Molecular Assemblies Composed of Amphiphilic Polypeptides Having a Hydrophobic Helical Block (疎水性ヘリックスブロックを有する両親媒性ポリペプチド分子集合体の構造高次組織化に関する研究)		
<p>本論文は、疎水性ヘリックスブロックを有する両親媒性ポリペプチドから構成される分子集合体について、疎水性ヘリックスペプチドの側鎖が分子集合体の物理的特性に与える影響について調べ、より高度に分子組織化された分子集合体の創出に向けて、分子集合体内における相分離誘導および階層構造の構築を行った研究についてまとめたものであり、序論、2編6章、および結論から構成されている。</p> <p>序論では、従来の分子集合体システムについて概略を記し、疎水性ヘリックスブロックを有する両親媒性ポリペプチドを用いた研究に至る背景について述べている。</p> <p>第一編では、アミノ酸側鎖がヘリックスペプチドの物性、あるいはヘリックスペプチドで構成される単分子膜の物性に与える影響について調べている。アミノ酸側鎖は、ヘリックスペプチドを用いた分子集合体を扱う上でヘリックス間の相互作用に影響するため、側鎖の異なるアミノ酸を用いて、ヘリックスやヘリックスペプチドからなる単分子膜の物性について詳細に検討している。</p> <p>第一章では、THz-TD(Terahertz time-domain) 分光法を用いて、側鎖の異なるヘリックスペプチドの分子振動について解析した。アラニン(L-Ala)とアミノイソ酪酸(Aib)の交互配列、あるいはロイシン(L-Leu)と Aib の交互配列を有する 8 種類のペプチドを合成した。それぞれについて CD(円偏光二色性)スペクトルを用いてペプチドの二次構造を決定した。いずれの場合も 8 量体では 3_{10}ヘリックス、12 量体や 16 量体では α-ヘリックス構造を取っていた。さらに、THz-TD スペクトルから、2THz から 3THz 付近にヘリックスペプチドに特有のシグナルが観察された。DFT 計算によってヘリックス分子の振動状態を解析した結果、ヘリックスの軸方向に沿ったアコーディオン様の伸縮振動であることを明らかにしている。(L-Ala-Aib)₈ のほうが(L-Leu-Aib)₈ よりも大きな吸収を示したことから、(L-Ala-Aib)₈ ではアコーディオン様伸縮振動がより強く存在していると結論している。</p> <p>第二章では、Leu-Aib の交互配列 16 量体を基本としたペプチド膜について、ベシクル内部からのイオンや低分子の透過性を調べている。親水部にポリサルコシンを、疎水性ヘリックス部位として Leu-Aib の交互配列 16 量体を有する両親媒性ブロックポリペプチド(SL16)を合成し、ベシクル内部に KCl あるいは 5(6)-カルボキシフルオレセイン(CF)を内包したベシクルを調製した。ベシクル内部からのカリウムイオンの漏れをカリウム選択イオン電極により測定したところ、30°Cにおいては、15分で4%程度しか漏れておらず、非常に安定な膜であることを示した。分子集合体に Ala-Aib の交互配列 16 量体のヘリックスペプチドを混合すると、膜のパッキングが緩み、カリウムイオンの漏れは大きくなった。さらに、蛍光測定により異なる浸透圧下で CF の漏れを観察したところ、50°Cでは漏れが見られず、90°Cで加熱することで浸透圧に応じて徐々に漏れてくることを見出した。このように非常に安定な膜構造が得られたことから、単分子膜中で疎水性ヘリックス部位が傾き、Leu 側鎖が互いに噛み合うように配列していることを提案している。</p> <p>第三章では、第二章で用いた SL16 に対し、ヘリックスの二量体化を誘導する配列を組み込むことで、分子集合体の物性に与える影響について調べている。二量体化を誘導する配列としてグリシンが 4 残基間隔であられる GxxxG モチーフを導入した両親媒性分子(SG16)を合成した。溶液状態の CD スペクトルを測定すると、エタノール中、高濃度領域において温度の上昇に伴う CD 強度の減少が見られ、SG16 が二量化していることが示唆された。SG16 分子集合体の形状を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところベシクル構造が観察された。これについて、CF を内包させたベシクルを調製し、界面活性剤によるベシクルの破壊実験を行ったところ、SL16 ベシクルでは破壊が見られなかったのに対し、SG16 ベシクルでは 2%程度で崩壊することを見出した。これらは、リポソームと比べると非常に安定な構造であることを示している。このような安定な構造が得られたのは、二量体化したヘリックス面において、Leu 側鎖同士の相互作用が有効に働いたためであると考えている。</p> <p>第二編では、相分離構造を有するペプチドナノチューブの構築と、ペプチドナノチューブの階層構</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	板垣 亮
------	---------	----	------

造の構築について検討している。

第四章では、二種類の異なるナノチューブを接合することにより、相分離ナノチューブを構築した。親水部にポリサルコシンを、疎水性ヘリックス部位として L-Leu-Aib あるいは D-Leu-Aib の交互配列を有する両親媒性ブロックポリペプチドを計 7 種類合成し、水中で自己組織化させることでナノチューブ構造を得た。右巻き、左巻きのヘリックスを用いて個別に得られたナノチューブを混合し、加熱処理後に TEM 観察を行うと、ナノチューブの伸長が見られた。ステレオコンプレックス形成によるナノチューブの接合に成功している。これらのナノチューブについて、異なる蛍光分子を導入した両親媒性分子を混合し、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法により相分離状態の評価を行ったところ、15°Cにおいて、2 種類の芳香族官能基がナノチューブの長軸方向に相分離したナノチューブが形成したことを示唆する結果を得ている。

第五章では、異なる親水部を有する両親媒性ブロックポリペプチドで構成されるナノチューブについて、加熱処理による相分離の誘導について二種類の方法で検討し、相分離のメカニズムについて考察している。疎水性ヘリックス部位として Leu-Aib の交互配列 12 量体を、親水部にポリサルコシンあるいはポリ N-エチルグリシンを有する両親媒性ブロックポリペプチドを合成し、それぞれの分子からナノチューブ構造を得た。親水部にポリ N-エチルグリシンを持つナノチューブのみが加熱によって凝集し、曇点の存在を明らかにしている。それぞれの分子単独で調製したナノチューブの混合物、あるいは両者を混合して得られた単一のナノチューブについて、トリフルオロエタノール(TFE)を添加して加熱することでナノチューブが形成する様子を観察した。これらについて、TFE 存在下で曇点以上の温度で加熱することにより、相分離構造を有するナノチューブの調製に成功した。相分離状態は、金ナノ粒子による修飾と FRET 法により評価した。TFE の存在によってヘリックスペプチドのパッキングが緩み、加熱によってポリ N-エチルグリシンが凝集することで相分離が起こることを明らかにしている。

第六章では、ナノチューブが会合した高次構造構築のため、核酸塩基を修飾したナノチューブの接合について検討している。親水部にポリサルコシンを、疎水性ヘリックス部に Leu-Aib の交互配列 12 量体を、親水部末端には、核酸塩基として自己集合化能の高いアデニンと、アデニンと相補的な塩基対を形成するチミン、そして参照化合物としてグリコール酸を選択した。これらの分子からナノチューブ構造を有する分子集合体を調製し、TFE 存在下でナノチューブを伸長した。この際、末端にアデニンを修飾したものが最も伸長しやすく、次いでグリコール酸、チミンを修飾したものという順であった。アデニンを修飾したナノチューブに対し、グリコール酸あるいはチミンを修飾したナノチューブを混合すると、アデニン修飾ナノチューブの伸長が阻害されたことから、集合体間ではアデニン間の相互作用がアデニン-チミン間の相互作用よりも強いことを明らかにしている。

最後に、結論では本論文で得られた成果について要約している。

氏名	板垣 亮
----	------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、疎水性ヘリックスブロックを有する両親媒性ポリペプチドから構成される分子集

氏名	板垣 亮
----	------

合体について、疎水性ヘリックスペプチドの側鎖が分子集合体の物理的特性に与える影響について調べ、より高度に分子組織化された分子集合体の創出に向けて、分子集合体内における相分離誘導および階層構造の構築を行った研究についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

- 1.側鎖の異なる疎水性ヘリックスペプチドについて、テラヘルツ時間領域分光法および DFT 計算により、ヘリックスの軸方向に対するアコーディオン様伸縮振動の存在を明らかにした。また、ペプチド側鎖が小さくなると振動強度が強くなることを示した。
- 2.疎水性ヘリックスブロックを有する両親媒性ポリペプチドで構成される分子集合体について、大きな浸透圧ショックにも耐えうる非常に安定な膜を形成していることを明らかにした。
- 3.ヘリックスブロック二量化を誘導する配列を組み込んだ両親媒性ポリペプチドを合成して、有機溶媒中においてもヘリックスの二量化が起こることを明らかにした。また、得られた分子集合体が界面活性剤に対して、従来のリポソームと比べて強い耐性を示すことを明らかにした。
- 4.ヘリックスの巻き方が異なる二種類のナノチューブを接合することで、異なる芳香族官能基が軸方向に相分離した相分離ナノチューブの調製に成功した。
- 5.親水部にポリ N-エチルグリシンを有する両親媒性ポリペプチドから得られたナノチューブが曇点を有することを明らかにした。また、親水部にポリサルコシンを有する両親媒性ポリペプチドとの混合物をトリフルオロエタノール(TFE)存在下で加熱することにより、相分離ナノチューブの調製に成功した。
- 6.親水鎖末端に核酸塩基を修飾したナノチューブが、TFE 存在下で伸長することを明らかにした。伸長度合いについては、アデニンが最も高いことを明らかにした。

本論文は、高次の分子組織化による分子集合体の創出に向けて、疎水性ヘリックスブロックを有する両親媒性ポリペプチドに着目し、疎水性ヘリックスペプチドの側鎖および親水性ブロックのポリペプトイドの変化が分子集合体の特性に及ぼす影響を明らかにし、さらに、分子集合体の相分離構造の誘導と分子集合体の階層的組織化の例を提示している。今回得られた成果は、ペプチド分子で構成された機能性分子集合体の開発に寄与するだけでなく、その他の分子集合体についても機能化や階層構造の構築に関する指針を与え、より高度な機能性分子集合体の創出に貢献すると考えられ、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 2 月 25 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、無期限で当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。