

京都大学	博士 (工学)	氏名	奥野 陽太
------	---------	----	-------

論文題目	Self-assembly of peptoid-based materials and biomedical application (ペプトイド基盤材料の自己組織化とバイオ医療応用)
------	--

(論文内容の要旨)

N-アルキルグリシンのポリマーであるペプトイドは、生体適合性の高いバイオマテリアルとして近年注目を集めている。本論文は、ペプトイドを構成要素とする新規ブロックコポリマーを設計、合成し、それらの高分子の自己組織化挙動と分子集合体の機能、及び医用分野への応用について報告したものである。ペプトイドはペプチド類縁体でありながらアミド基の水素が存在しないために、水素結合形成能を持たず、 α -ヘリックスや β -シートのような二次構造をとらない。そのためポリマーの構造や物理化学的性質は側鎖の影響を大きく受ける。これまで確立されている固相重合や NCA 重合などのペプチド重合法を用いることで、単分散かつ狭小な分子量分布のペプトイドが得られることから、物理化学的性質を制御したペプトイドを合成可能である。ペプトイドの側鎖がメチルまたはエチルの場合には親水性ポリマーであるが、側鎖の炭素数が 4 以上になると疎水性ポリマーとなる。また、炭素数が 3 の場合には下限臨界溶液温度 (Lower Critical Solution Temperature, LCST) を有する温度応答性を示すポリマーとなる。このような特性を活かして近年ペプトイドを構成要素としたブロックコポリマー、またその分子集合体の研究が進んでおり、生体適合性を活かして医療への応用が期待されている。

本論文は緒論と本論 4 章から構成されている。緒論では、ペプトイドの特徴や、ペプトイドを構成要素とするブロックコポリマー、及びその分子集合体に関するこれまでの研究を概説している。その後、本論文の研究目的を述べ、最後に本論文の構成及び概要について論じた。

第 1 章では、親水部に三糖の maltotriose、疎水部には温度応答性ペプトイドである poly(*N*-*n*-propyl glycine) を有する両親媒性ブロックコポリマーを合成した。この糖鎖-温度応答性ペプトイドは水中で LCST を有し、冷水に溶解したのちに室温まで昇温することでポリマー鎖の温度誘起相分離に伴い会合して、粒径 150 nm 程度の高分子ベシクルが形成した。また、糖鎖ペプチドの薄膜を形成後水和することで、直径 5 μ m 程のジャイアントベシクルが形成することを見出した。このジャイアントベシクルの外液に蛍光色素を添加し、ベシクル内部に膜透過する挙動を共焦点蛍光顕微鏡により観察した。疎水性及び電荷の異なる色素で透過性を評価した結果、アニオン性色素は疎水性を増減しても透過しなかった一方、カチオン性色素は非常に良好な透過性を示した。電荷が中性の色素は疎水性に応じて透過性が向上することが明らかになった。ベシクル表面の電位が -39 mV であり、アニオン性色素が静電反発により排除される一方で、カチオン性色素の吸着と透過の促進が見られたものと考えられた。これらの結果から糖鎖ペプトイド高分子ベシクルは、水溶性蛍光色素に対して、その電荷と疎水性に依存した選択的な分子透過性を示す新規な物質透過性高分子ベシクルであることが明らかになった。

第 2 章では、五糖の maltopentaose に親水性ペプトイドである poly(sarcosine) を付加した親水性糖鎖ペプトイドを合成した。Poly(sarcosine) は PEG に比べて高い親水性を有しながら

京都大学	博士 (工学)	氏名	奥野 陽太
<p>免疫原性が低く、生体適合性かつ生分解性であることから医用応用に向けて非常に注目を集めている。Poly(sarcosine)単独では水中で会合体を形成しないが、糖鎖を末端に付加することで、液-液相分離（コアセルベーション）によりマイクロメートルサイズ微粒子や粒径 150 nm 程度のナノ微粒子の形成が誘起されるという新しい現象を見出した。近年、生体高分子である RNA やタンパクの細胞内液-液相分離現象が、膜構造を有しないオルガネラとして注目されている。これら生体系も含めコアセルベート研究のほとんどは電荷を有するイオン性高分子の会合現象であるが、本研究のように非イオン性高分子単独におけるコアセルベート形成は極めて稀な例である。生体適合性の高い糖鎖ペプチドコアセルベートは、新しいナノバイオマテリアルとしての利用が期待される。</p> <p>第 3 章では、三糖と五糖を末端に有し、種々の分子量を有する糖鎖-poly(sarcosine)を合成し、それらの会合挙動を検討した。TEM 観察により本検討におけるいずれの糖鎖と poly(sarcosine)鎖長の組み合わせにおいても、サイズ分布は異なるものの球状の微粒子が確認された。DLS 測定における散乱強度の比較から糖鎖及びポリサルコシン鎖長が長いほど会合体を形成しやすいことが明らかとなった。また、共焦点蛍光顕微鏡観察や蛍光プローブ法により微粒子内の微小環境の評価を行ったところ、内部に親水性と疎水性のドメインがモザイク状に混在しており、糖鎖の導入による poly(sarcosine)鎖の脱水和がコアセルベート形成に重要であることが示唆された。</p> <p>第 4 章では、疎水部に Leu と Aib の交互配列 12 量体の α-ヘリックス形成性ペプチド、親水部には poly(sarcosine)を有し、その親水鎖末端はフェニルボロン酸及びジアジリンを結合した両親媒性ブロックコポリマーを合成した。この高分子は水中で自己組織化し、片面にジアジリン、もう片面にフェニルボロン酸を表出したナノシート状の分子集合体を形成した。このナノシートを光反応によりポリプロピレン不織布表面に固定化したのち、さらに固定化したナノシートを足場に抗体を固定化した新規細胞除去用フィルタを作製した。免疫系の抑制を司る制御性 T 細胞(Treg 細胞)を認識する抗体を固定化したフィルタは、Treg 細胞を 90%以上除去した。一方、その他の細胞の非特異的吸着は 15%以下に抑制することができ、血液中から病原となっている細胞を選択的に除去するアフェシス療法への応用が期待される。</p> <p>以上のように、本論文ではペプチドを基盤材料としたブロックコポリマーを新規に設計、合成し、そのブロックコポリマーが水中で形成する分子集合体について評価を行った。その結果、適切なペプチドを設計することで分子透過性ベシクル、非イオン性コアセルベート、また細胞選択除去用のフィルタの開発に成功した。これらの成果は、ペプチドを基盤とした新規自己組織化材料開発の設計指針を提供し、医療分野への更なる応用が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ペプチドを基盤材料とした分子集合体の評価及び医用応用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. 第1章では、親水部に三糖の maltotriose、疎水部には温度応答性ペプチドである poly(*N*-*n*-propyl glycine)を有する両親媒性ブロックコポリマーを合成した。この糖鎖ペプチドは、水中、室温雰囲気中で温度応答性高分子ベシクルを形成した。また、従来の高分子ベシクルでは得られない、水溶性物質を透過する特性を有する新規な糖鎖ペプチドベシクルであることが明らかとなった。さらに、物質の電荷や疎水性の違いにより物質透過性の制御が可能であり、酵素封入型ナノリアクターとしての利用が期待される。
2. 第2章では、五糖の maltopentaose と poly(sarcosine)を結合した非イオン性糖ペプチドを合成した。親水性高分子である poly(sarcosine)にわずかに五糖を結合することで、コアセルベートと言える分子集合体微粒子形成 (約 150 nm) が誘起されるという新しい現象を見出している。近年注目されている生体高分子による細胞内液-液相分離のモデル系としても興味深い。
3. 第3章では、第2章で検討した糖ペプチド系に関して、糖鎖及びポリサルコシン鎖長 (分子量) を変化させた際の会合体形成挙動を評価した。糖鎖の数や poly(sarcosine)の分子量に依存して分子集合体のサイズやコアセルベート内部のドメイン構造が変化した。糖鎖の導入による poly(sarcosine)鎖の脱水和が会合体形成に重要であり、糖鎖間や poly(sarcosine)鎖間の水素結合がその安定に寄与していることが示唆された。構造特性を活かした新規ナノキャリアとしての応用が期待される。
4. 第4章では、疎水部には (Leu-Aib)₆、親水部には poly(sarcosine)を有し、親水鎖末端にはフェニルボロン酸及びジアジリンを有するブロックポリペプチドを合成した。この両親媒性高分子は水中でナノシート状の分子集合体を形成した。このナノシートを不織布表面に光固定化し、さらに、このナノシートを足場に抗体を結合させた新規細胞除去用不織布フィルタを作製した。免疫系の抑制を司る制御性 T 細胞 (Treg 細胞)を認識する抗体を固定化したフィルタは、Treg 細胞を 90%以上除去した。一方、その他の細胞の非特異的吸着は 15%以下に抑制することができ、血液中から病原となっている細胞を選択的に除去するアフェシス療法への応用が期待される。

以上、本論文はペプチドを有するブロックコポリマー及びその分子集合体の有用性を明らかにしたものであり、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、令和 4 年 2 月 22 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、京都大学学位規定第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、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。

要旨公開可能日: 令和 4 年 6 月 22 日以降