

京都大学	博士 (工学)	氏名	田中 航
論文題目	Development of stimuli-responsive supramolecular hydrogels relying on self-sorting		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>複数種の分子がそれぞれ自己認識・他者排除して独立な超分子集合体を形成する現象を self-sorting と呼ぶ。究極の機能性ヒドロゲルである細胞内では、self-sorting によって様々な超分子集合体が形成されている。それらが物理・化学・生物刺激に対して独立に応答する事で、細胞は驚くべき高次機能を発現している。人工系においても機能性超分子を self-sorting 型で複合できれば、それぞれの刺激応答挙動を干渉させずに合理的に統合化可能と考えられるため、多機能性ソフトマテリアルの創出につながる期待される。しかし、水中での人工有機分子の self-sorting 制御は困難であるため、そのような材料の報告例は非常に少ない。申請者は博士課程研究において、self-sorting を基軸とした刺激応答性超分子ヒドロゲルの開発を行なった。本論文はこれらの研究結果についてまとめたものであり、序論及び本論 (三章) から構成される。以下にその概要を示す。</p> <p>(第一章)</p> <p>会合駆動力の異なるペプチド型とリン脂質型のゲル化剤が、水中で加熱分散・冷却するだけで self-sorting double network (SDN) ヒドロゲルを形成する分子モチーフとなる事が報告された。しかし、その機能に着目した研究は行われていなかった。申請者は、特定の化学刺激によって崩壊あるいは強化される超分子ファイバーを self-sorting を利用して直交的に複合化する事で、与える刺激に応じて柔らかくなったり硬くなったりするヒドロゲルを開発した。具体的には、$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 添加によって還元・脱離反応が進行して分子が分解する事でゾルへと転移するペプチドゲルと、脱リン酸化酵素添加によってリン酸エステルの加水分解が進行し疎水性が向上する事で強度上昇するリン脂質粘性液体を複合化した。CD スペクトル及び共焦点顕微鏡観察によって、SDN ヒドロゲルが構築している事を確認できた。得られた SDN ヒドロゲルの刺激応答性をレオロジー測定によって評価した。刺激分子添加前の貯蔵弾性率が 187 Pa であったのに対して、$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 添加で 2 Pa まで減少し、脱リン酸化酵素添加では 1450 Pa に増加して、刺激に応じた力学的強度の双方向制御に成功した。この刺激応答性を利用する事で、種々のタンパク質の放出率も双方向に制御する事が可能であった。本研究では、self-sorting が 2 種類の超分子ファイバーの刺激応答性を合理的に統合化するための有力な戦略である事を実証した。</p> <p>(第二章)</p> <p>既知の self-sorting するゲル化剤ペアを利用するだけでは刺激応答能に限られる。また、新しく刺激応答性ゲル化剤を合成しても self-sorting しない事も多い。そこで、既存の SDN ヒドロゲルを鋳型とし、後から機能拡張する post-assembly fabrication (PAF) 戦略を用いて、新たな刺激応答性ヒドロゲルを開発した。具体的には、過酸化水素に応答してゾル化するペプチドゲルと Ca^{2+} イオンに応答してゲル化するリン脂質粘性液体からなる SDN ゲルを調整後、サルコシンオキシダーゼ (SOx) と Ca^{2+} イオンを加える事で、生体分子であるサルコシンと ATP を両方添加した場合のみゾル化するヒドロゲルを設計した。過酸化水素応答性ペプチドゲルは、SOx を内包することによって標的をサルコシンへと拡張できる。また、リン脂質粘性液体は、Ca^{2+} イオンとリン酸基の配位結合形成によりヒドロゲルとなるが、このゲルに Ca^{2+} イオンに対し</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	田中 航
------	---------	----	------

て高い親和性を示す ATP を添加する事でゾル化した。これら 2 種類の生体分子応答ゾル化システムを PAF 戦略によってゲル内で直交的に構築した。共焦点顕微鏡観察で Ca^{2+} イオン・SOx 添加によるネットワーク構造への影響を評価したところ、添加前後で殆ど違いが見られず self-sorting を維持していた。一方、PAF 戦略を用いなかった場合、SDN 構造でなく主に球状共凝集体が観察され、巨視的にもゲルを形成しなかった。この結果は PAF 戦略の重要性を端的に示している。得られたヒドロゲルの刺激応答性を目視評価すると、期待通りサルコシンと ATP を両方添加した場合のみゾル化する AND 型応答を示した。さらに、この応答を利用してバイオ医薬品である抗体の AND 型での放出制御に成功した。特定の環境下でのみ薬剤放出するマトリックスとして応用が期待できる。

(第三章)

光パターンニングは超分子ヒドロゲルの機能を空間制御する上で優れている。SDN ヒドロゲルでも光パターンニングが行われており、空間選択的にシングルネットワークゲルと SDN ゲルが作り分けられてきた。可逆的な SDN ヒドロゲルのパターンニングは、特定位置でヒドロゲルの機能を可逆的あるいは一過的に制御するために有用であると考えられるが、報告例はない。最近、ベンズアルデヒドを N 末端に有するペプチド型ゲル化剤とリン脂質型ゲル化剤が self-sorting する事が報告された。申請者は、この SDN ヒドロゲルを鋳型として、PAF 戦略でペプチド型ゲル化剤のアルデヒド部位を可逆光スイッチであるアシルヒドラゾンへと変換する事で、光応答性 SDN ヒドロゲルを作成できると考えた。また、このヒドロゲルにフォトマスク下で照射した後、暗所で静置する事で SDN ヒドロゲルの可逆パターンニングが可能になると考えた。まず、リン脂質型ゲル化剤非存在下において、PAF 戦略を用いてアシルヒドラゾンを有したペプチドゲルを作成した。このヒドロゲル全体に UV 光 (325 nm) を照射するとゾル化が進行し、UV/Vis スペクトルからアシルヒドラゾン部位の *E-Z* 異性化が確認できた。その後、暗所で静置する事で再ゲル化とアシルヒドラゾン部位の *E* 体への完全回復が確認できた。次に、リン脂質ファイバー存在下において、PAF 戦略によって光応答性 SDN ヒドロゲルを実際に作成した。この SDN ヒドロゲルにフォトマスク下で UV 光を照射し、低倍率共焦点顕微鏡観察を行ったところ、脂質ファイバーに影響を与える事なく照射部位のペプチドファイバーだけが選択的に破壊されている様子が観察できた。また、このゲルを暗所静置する事で、照射部でペプチドファイバーの再形成が達成された。SDN ヒドロゲルの可逆パターンニングに成功した。驚くべき事に、さらに静置時間を延ばすと、照射部でペプチドファイバーの濃縮現象が見られた。一方、リン脂質ファイバー非存在下では、フォトマスク光応答後のペプチドファイバー再形成は進行しなかった。照射直後、照射部で高倍率共焦点顕微鏡観察を行った。その結果、SDN ヒドロゲル中では、ペプチドシングルネットワークゲル中とは異なり、光崩壊により生じたペプチド凝集体が照射部にトラップされている事が分かった。このリン脂質ファイバーによるペプチド凝集体の拡散抑制効果が、照射部でのペプチドファイバー再形成に重要である事が示唆された。また、CD スペクトル測定から、光応答前の as-prepared ペプチドファイバーと再形成後の reconstructed ペプチドファイバーは異なる分子間パッキングをとっており、後者の方が熱力学的に安定である事が分かった。予想外であったペプチドファイバー濃縮現象は、照射部で生じた reconstructed ファイバーが周囲の as-prepared ファイバーから供給されたペプチドゲル化剤を使用して成長する事によって達成されている事が示唆された。このように、SDN ヒドロゲル中において、単独系では不可能なペプチドファイバーの非平衡パターン制御に成功した。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ペプチド型ゲル化剤とリン脂質型ゲル化剤からなる self-sorting double network (SDN) ヒドロゲルの機能開発を行った成果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. 還元剤に応答してゾルへと転移するペプチドゲルと脱リン酸化酵素に応答して強度上昇するリン脂質粘性液体を self-sorting によって複合化した。得られた SDN ヒドロゲルは、与える刺激に応じて柔らかくなったり硬くなったりする適応材料となった。self-sorting が 2 種類の超分子ファイバーの刺激応答性を合理的に統合化するための有力な戦略である事を実証した。
2. 既存の SDN ヒドロゲルを鋳型とし後から機能拡張する post-assembly fabrication (PAF) 戦略を用いて、新たな刺激応答性ヒドロゲルを開発した。具体的には、加熱・冷却により調整した SDN ヒドロゲルに対して Ca^{2+} イオンと酵素を添加する事で、ATP と癌バイオマーカーであるサルコシンを両方処置した場合のみゾル化するヒドロゲルの構築に成功した。特定の疾病環境下でのみ薬剤放出する材料としての応用が期待できる。重要な事に、PAF 戦略を利用しなかった場合、このようなヒドロゲルを調整する事は不可能であることが明確に示された。
3. 可逆光スイッチであるアシルヒドラゾンをも有したペプチドファイバーとリン脂質ファイバーを self-sorting 及び PAF 戦略を利用して複合化した。得られた SDN ヒドロゲルにフォトマスク下で UV 光を照射すると、アシルヒドラゾン部位の *E-Z* 異性化が進行し光照射部位のペプチドファイバーのみが破壊された。また、このゲルを暗所静置する事でアシルヒドラゾン部位が *E* 体へと回復し、照射部でペプチドファイバーが再形成した。驚くべき事に、さらに静置時間を延ばすと照射部でペプチドファイバーの濃縮現象が見られた。一方、リン脂質ファイバー非存在下では、ペプチドファイバー再形成・濃縮は進行しなかった。超分子ダブルネットワーク化によって、単独系では不可能なペプチドファイバーの非平衡パターン制御に成功した。

本論文は上記の通り、SDN ヒドロゲルの機能開発を行っており、学術上、実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 3 年 2 月 19 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、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。