

京都大学	博士（工学）	氏名	上坂 晃弘
論文題目	Precise Structural and Functional Control of Molecular Assemblies Composed of Amphiphilic Peptides Having a Hydrophobic Helical Block (疎水性ヘリックスをもつ両親媒性ペプチド分子集合体の構造および機能の精密制御)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、両親媒性ペプチドが自己組織化することで形成される分子集合体のモルフォロジー制御や生体材料としての応用を見据えた機能化に関する研究についてまとめたものであって、序論と5章および結論からなっている。 序論では、本研究に至る歴史的な背景と目的、ならびに本研究の概要についても述べている。 第1章では、疎水部と親水部の間に pH 応答部を1残基導入した A₂B 型分子から形成される分子集合体のモルフォロジーを、pH 変化に応じて精密かつ可逆的に変化させることについて検討している。疎水部である L-Leu と Aib の交互配列 12 量体のヘリックスは、一定の角度で傾きながらパッキングすることで、屈曲したシート構造を形成し、さらに加熱によってシート側面が閉じることでチューブ構造を形成することが報告されている。本章では親水鎖を2本に増やすことで、シート側面が閉じることなく成長し、ロールシート構造を形成することを明らかにした。外部 pH が酸性条件では、pH 応答部がプロトン化することにより構成分子間で静電反発が働く。これによってヘリックスの強固なパッキングが緩み、ロールシートの膜間距離が広がることを電子線回折と CD スペクトルから明らかにした。また、このモルフォロジー変化は、ナノオーダーレベルで可逆的に変化することを明らかにしている。 第2章では、疎水部と親水部の間に pH 応答部を1または2残基導入した A₃B 型分子を様々な pH 条件化で自己組織化させ、得られるモルフォロジーの違いを分子パッキングの観点から検討している。pH 応答部が2残基の場合、pH 7.4 ではチューブ構造、pH 5.0 ではヘリカルリボン構造、pH 3.0 ではツイストリボン構造に作り分けることに成功した。これは、pH が低いほど静電反発の効果が強くなり、分子パッキングが緩むことが原因であることを、赤外分光分析により明らかにした。また、金属シャドウイング法によって、調製したヘリカルリボン構造が左巻きであることを明らかにした。この事は、L-Leu のイソプロピル基がヘリックス軸方向に斜めに並んでおり、ヘリックスがパッキングする際にこの嵩高い側鎖が噛み合うように反時計回りに傾きながら配列するためと考察している。 第3章では、丸底フラスコ型の構造を持つヤヌス型分子集合体を、pH に応じて部分的に構造破壊することについて検討している。右巻きと左巻きのヘリックスから形成される平面シート構造と、いずれか一方のヘリックスから形成されるチューブ構造を混合して加熱することで、チューブ構造の末端にベシクル構造が融合し、丸底フラスコ型の分子集合体を形成できることが報告されている（パッチワーク自己組織化）。また、この丸底フラスコ型の分子集合体は、球体部とネック部で相分離していることが報告されている。本章では、パッチワーク自己組織化の際に、pH 応答性分子を平面シート構造に組み込んだ場合は丸底フラスコの球体部を、またチューブ構造に組み込んだ場合はネック部を、外部刺激に応じて選択的に構造破壊することに成功した。また			

京都大学	博士（工学）	氏名	上坂 晃弘
丸底フラスコ構造を形成する際の加熱処理によって構成分子が膜中を側方拡散することで、熱力学的により安定な相分離状態へ移行するように、構成分子が膜中で再配置することを明らかにしている。 第4章では、ベシクル膜の内側と外側の構成分子を制御した非対称ベシクルの調製について検討している。ヘリックス構造の特徴であるダイポール-ダイポール相互作用とステレオコンプレックス形成を組み合わせることで、表裏のある非対称平面シート構造を形成した。また、両親媒性ペプチドの疎水性ブロックが右巻きのヘリックスには親水鎖を3本（A₃B型）、疎水性ブロックが左巻きのヘリックスには親水鎖を1本（AB型）結合し、親水鎖の本数に違いをつけることで、立体障害の大きなA₃B型分子を選択的にベシクルの外側に配向した非対称ベシクルの調製に成功している。さらに、このベシクルは、構成分子を純水中に分散させて加熱するという非常に簡便な手法で調製できることを示した。このとき、イオン強度の高い水溶液（TBS）を用いると、イオンがダイポールを遮蔽するため、ダイポール-ダイポール相互作用が減弱し、非対称ベシクルを形成できないことを明らかにしている。また、イオン強度の変化や加熱に対して安定であることを、動的光散乱測定と蛍光分析から明らかにした。また、機能性分子を修飾したヘリックスの螺旋方向に応じて、非対称ベシクルの外側面あるいは内側面を選択的に機能化することに成功している。 第5章では、第4章で述べた非対称ベシクルを調製するための重要な要素である立体効果について評価し、さらに DDS ナノキャリアとして応用することについて検討している。A₃B型の右巻きのヘリックスとAB型の左巻きのヘリックスに、さらにAB型の右巻きのヘリックスを加えてベシクルを調製したところ、右巻きのヘリックスの60%以上がA₃B型分子のときに非対称ベシクルを形成することが明らかとなった。このことは、機能性分子を修飾したAB型分子を最大40%まで組み込んで非対称ベシクルを調製できることを意味する。次に、近赤外蛍光分子をベシクル膜の内側または外側に選択的に修飾した非対称ベシクルを担癌マウスに投与し、体内動態と抗体産生について比較した。蛍光プローブをベシクルの内側に配置することで、抗体の産出量を抑制し、また癌組織への集積量が増加することを明らかにしている。これは、蛍光プローブをベシクルの内部に配置することで、外側はA₃B型分子のみが配向し、ナノキャリア表面の親水鎖密度が向上したことが原因であると説明している。 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。			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、疎水性ヘリックスを有する両親媒性ペプチドから構成される分子集合体のモルフォロジー制御や、DDS ナノキャリアとしての応用に関する研究についてまとめたものであり、得られた主な結果は以下の通りである。

1. pH 応答性 A_2B 型分子を用いてロールシート状の分子集合体を調製した。外部 pH 変化に応じてパッキングの強さを制御することで、モルフォロジーをナノオーダーレベルで可逆的に変化させることに成功した。

2. pH 応答部を 1 または 2 残基有する A_3B 型分子を用いて、pH に応じて分子パッキングの強さを制御することで 3 種類の分子集合体を作り分けることに成功した。また、疎水性ヘリックスは反時計回りに傾きながらパッキングして、分子集合体を形成していることを明らかにした。

3. 丸底フラスコ型分子集合体を外部刺激に応じて部分的に構造破壊することに成功した。また加熱によって、構成分子が膜内を拡散し熱力学的により安定な状態に移行することを明らかにした。

4. ヘリックス構造に特徴的であるダイポールに基づいた相互作用とステレオコンプレックス膜形成、さらに立体効果を利用することで、非対称ベシクルを容易に調製することに成功した。また、機能性分子を修飾したヘリックスの螺旋方向に応じて、ベシクルの内外に選択的に機能性分子を配置することに成功した。

5. 非対称ベシクルを調製するのに十分な立体効果を得るには、右巻きヘリックスの 60% 以上が A_3B 型分子である必要があることを明らかにした。また担癌マウスを用いた実験から、蛍光分子をベシクルの内側に配置することで、抗体の産出量を抑制し、また癌組織への集積量を増加できることを明らかにした。

以上要するに、本論文は、ヘリックス構造の特徴を巧みに利用することで、分子パッキングを制御し、さらに分子集合体のモルフォロジーをより精密に、かつ高次元に制御することに成功し、さらに DDS ナノキャリアとしての有用性について評価した研究であり、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、平成 27 年 1 月 21 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。

要旨公開可能日： 年 月 日以降