

氏名	RAHMAN MD. MOFIZUR
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学位記号番号	博理工甲第 1120 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 20 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Spontaneously Formed Higher-Order Architectures of Amphiphilic Polypeptides with Other Components (異種成分との混合による両親媒性ポリペプチドの自発的高次構造形成)
論文審査委員	委員長 教授 廣瀬 卓司 委員 教授 三浦 勝清 委員 准教授 幡野 健 委員 准教授 小玉 康一 委員 学外委員 伊藤 嘉浩

## 論文の内容の要旨

The current thesis contains four chapters. Chapter 1 describes background, motivation, and the purpose of the study. The hydrophobic helical block of polypeptides formed self-assembled structures with a block of hydrophilic components. Chapter 2 demonstrates that the hybrid vesicular assembly, having phase-separated membrane was prepared from a combination of amphiphilic polypeptide and phospholipid. Chapter 3 shows the network-like branched tubular assembly by fusing several nanotubes, which were composed of two different types of amphiphilic polypeptides having different hydrophilic chains. Finally, Chapter 4 summarizes the achievements, conclusion and perspective of this research.

Chapter 1 describes the general introduction on the self-assembled structures made of amphiphilic polypeptides and the composite with other components. Especially amphiphilic polypeptides composed of hydrophobic helical structure and hydrophilic parts were designed and their investigation was reviewed. Different lengths of hydrophobic helical polypeptides were conjugated with different types of amphiphilic molecules such as poly(sarcosine), polyethylene glycol (PEG), and the self-assembled structures were investigated. The helical structure-forming hydrophobic sequence was composed of leucine- and aminoisobutyric acid-alternating sequence. When the hydrophobic part composed of 8 residues was conjugated with poly(sarcosine)(SL8), it formed a  $3_{10}$  helix structure. When the parts composed of more than 12 residues (SL12), (SL14, SL16, SL18, and SL20), they formed an  $\alpha$ -helix structure. Transmission electron microscope (TEM) observation showed that SL8 formed a fiber structure and SL12, SL14, SL16, SL18 and SL20 had sheet-based structures (SL12, SL14: tube, SL16: vesicle, SL18, SL20: sheet). The tube and vesicle were considered to be formed by rolling up of sheet. The parameters affecting the structures of tubes, vesicles and sheets in the assemblies of SL12 to SL20 were discussed and the different packing pattern and interaction between the neighbor helices were also considered. When co-assembly of SL12 and SL16 was prepared, it did not form a homogeneous miscible membrane but formed a co-assembled structure composed of a phase-separated membrane. TEM observation showed the SL12 tube was capped with the L16 vesicle. In order to investigate the influence of the hydrophilic part, the hydrophobic part

composed of 12 residues was conjugated with PEG (PL12). Like SL12 with poly(sarcosine), TEM observation showed nanotube structure with a diameter of 80 nm was formed. This result demonstrated that the influence of hydrophilic part on the assembly shape was not so large as hydrophobic helical block, and that the hydrophobic helix determined the assembled structure. Co-assembly with phospholipids was performed and it formed phase-separated membrane composed of polypeptides and phospholipids.

In Chapter 2, based on the findings in Chapter 1, the phase-separated co-assembly of phospholipids and amphiphilic polypeptides was developed. The co-assembly had a temperature-responsive drug release ability. A mixture of L14 and phospholipid 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DMPC) formed a 75 nm diameter co-assembled vesicle (peptide-lipid hybrid vesicle (PLHV)) in saline at a mixing ratio of 4:1 to 1:1, which was confirmed by TEM observation and dynamic light scattering measurement. Spectroscopic analysis using the fluorescence resonance energy transfer phenomenon revealed that PLHV was composed of a phase-separated membrane with independent peptidic and lipidic membranes, not a homogeneous miscible membrane of peptide and lipid. The lipid membrane in the vesicle showed the phase-transition behavior similar to liposome composed of pure lipid membrane. The phase-transition temperature of PLHV was 38 °C, which was higher than the phase-transition temperature (25 °C) of the pure DMPC membrane. This shift was considered to be induced by the smaller size of the lipid membrane and surrounding with the harder peptide membrane. Because PLHV was a closed structure, it can encapsulate hydrophilic molecules, retain them at 37 °C, and show the release of inclusions at 42 °C. Lipid membrane in PLHV worked as a temperature-responsive gate. The control of the release rate of inclusion in response to the size of the lipid membrane was also suggested.

Chapter 3 summarized the research on hybrid tubular network structure formation by co-assembling of PL12 and SL12. As shown in Chapter 1, both PL12 and SL12 formed nanotubes, but the elongation (fusion) speeds of their nanotubes by heating were different from each other. When the membrane fluidity of their nanotubes was measured, PL12 membrane was more fluidic than the SL12 membrane, because a lot of water molecules involved in the hydrophilic/hydrophobic interface of PL12. This was considered to affect the difference in elongation rates. When PL12 and SL12 were co-assembled at the mixing ratio of 7:3, 6:4, and 5:5, they formed three-way open ends and formed tubular networks as a result. Excessive amount of PL12 was considered to promote the networks formation because of the higher fluidity.

Chapter 4 summarizes the conclusions obtained in this research and describes future research developments of self-assembled amphiphilic polypeptides with other components.

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文の審査委員会は、2019年1月17日に論文発表会を開催した。その発表に対する質疑応答と学位論文の審査をおこなった。以下に、質疑。研究の概要ならびに審査結果は以下のとおりである。

本学位論文では、第1章で研究背景、第2章と第3章で研究成果、第4章で総括と展望が述べられている。

第1章では、研究の背景として分子集合体、ペプチド集合体について述べた後、ポリペプチドの二次構造である $\alpha$ ヘリックス、さらに疎水部にヘリックス構造を有する両親媒性ポリペプチドの分子設計とそのヘリックス構造が分子集合体形態に与える影響についてまとめている。加えて、ヘリックス構造を有する両親媒性ポリペプチドの複数種の混合、あるいは脂質などの異なるタイプの両親媒性分子との混合によるハイブリッド集合体の、特に形状に注目した基礎的研究を俯瞰的にまとめている。具体的には、親水部にポリサルコシン、疎水部にロイシンとアミノイソ酪酸交互配列を有する両親媒性ポリペプチドについて、疎水部が $3_{10}$ ヘリックス構造か $\alpha$ ヘリックス構造によって、集合体中の分子配向が変化し、 $3_{10}$ ヘリックスを有する両親媒性ポリペプチドL8がファイバーを形成し、 $\alpha$ ヘリックスを持つ両親媒性ポリペプチドL12, L14, L16, L18, L20はシートを基本形状とする構造体（L12, L14：チューブ、L16：ベシクル、L18, L20：シート）を形成する先行研究を紹介しており、集合体形態を合目的に調製する上での両親媒性ポリペプチドにおける疎水性ヘリックス部位の設計の重要性について議論している。加えて、ヘリックス鎖長によってヘリックス間の相互作用形態が異なり、L12～L20の集合体においてチューブ、ベシクル、シートと異なる形態をとる要因として紹介しており、ヘリックスの種類（ $3_{10}$ 、 $\alpha$ ）だけでなくその長さ（12, 14, 16, 18, 20残基）も形態を制御する要因であることをまとめている。

次に、分子集合体の形態に対する親水部の影響についても述べている。ポリサルコシンの代わりにポリエチレングリコール（PEG）を導入した両親媒性ポリペプチドP750-L12の分子集合体は、L12の集合体と同様、直径80 nmのナノチューブ構造を形成する例を紹介しており、親水部の集合体形状への影響は大きくなく、疎水性ヘリックスが大きく構造体の形状を決定しているとまとめている。

混合系では、同じ両親媒性ポリペプチド同士の共集合体であっても、疎水性ヘリックス鎖長が異なる場合、均一混和膜を形成せず相分離膜による集合体形態となることを述べている。（L12とL16の共集合体では、L12からなるチューブとL16からなるベシクルが結合したような構造となる。）脂質などの異なる両親媒性分子と共集合させた場合も、脂質膜とペプチド膜が相分離した構造体を形成することを明らかにしており、両親媒性ポリペプチドの同一分子選択的な自己集合化能としてまとめている。この章でまとめた先行文献の分子設計や知見を元に第2章・第3章の機能性ハイブリッド構造体の調製に成功している。

第2章では、ドラッグデリバリーシステムを目指した温度応答性薬剤徐放能を有するリン脂質と両親媒性ポリペプチドの相分離型共集合体の設計、機能性の評価を行っている。両親媒性ポリペプチドL14とリン脂質DMPCの混合物が、4:1～1:1の混合比にて水中で直径75 nmの共集合ベシクル（PLHV）を形成することを透過型電子顕微鏡および動的光散乱測定により示している。さらにFRET現象を用いた分光学的分析により、PLHVがペプチドと脂質の均一混和膜ではなく、ペプチド膜と脂質膜が独立して存在する相分離膜によって構成されていることを明らかにしている。また、このベシクル上の脂質膜が、一般的な脂質膜であるリポソームと同様に相転移挙動を示すことを明らかにしている。このとき、相転移温度は一般的なDMPC膜の相転移温度（25℃）より高温の38℃であったことから、脂質膜のサイズ、脂質膜周辺のペプチド膜の硬さ、脂質膜に混ざり込んだ微小なペプチドが相転移温度の上昇の原因であると議論している。PLHVは閉じた構造であるため、親水性分子を内包することができ、更に相転移温度以下ではこれを保持し、相転移温度以上

に加熱することで内包物が外部に放出される機能を有することを明らかにしている。最後に、脂質膜のサイズによって、徐放速度が制御できる可能性について提案している。

第3章では、L12にPEGが結合した両親媒性ポリペプチド(PL12)とポリサルコシンが結合した両親媒性ポリペプチド(SL12)の共集合によるハイブリッドチューブネットワーク構造形成の研究についてまとめている。PL12もSL12も互いにナノチューブを形成するが、本章では、加熱によってチューブの伸長(融合)速度が異なることに注目している。この原因の調査として、膜流動性評価を行った結果、PL12膜がSL12膜に比べ、流動的であること、さらに水分子が親疎水界面まで多く侵入していることを明らかにし、膜表面の乱れの差がナノチューブ構造体の伸長速度の違いの原因の一つであると提案している。次に、このPL12とSL12の共集合体について透過型電子顕微鏡を用いて網羅的に形態学的に調査している。結果として7:3、6:4、5:5の混合比のとき、3つのチューブが開口部で互いに結合した三方管構造、そして、それが発達したチューブネットワーク構造が形成することを明らかにしている。チューブ径も膜厚も均一であることからチューブ構造が結合することでネットワーク化していると議論している。このチューブネットワークができる混合比において膜流動性が高くなっていることを実験により明らかにしており、PL12がSL12より過剰になることで、膜が流動的になり、チューブ間の融合が加速され、開口部の直径にゆらぎをもたせたことで三方管構造が形成されたと結論づけている。

最後に、第4章では、本研究で得られた結果を総括し、今後の研究展開について述べている。

本論文の研究内容は、両親媒性ポリペプチドと異なる両親媒性分子(PEG化ペプチドやリン脂質など)を共集合化することで、単一系集合体では見られないような独自の性質を有する新規ハイブリッド集合体の開発・評価を緻密に行っている。

これらは、2編の論文として査読付き学術雑誌に掲載され、関連する論文1篇を投稿予定である。以上のように、本研究は新しいポリペプチド複合材料の開発に成功し、今後の学術的及び技術的展開をも示していることから、当審査委員会は本論文が博士(学術)の学位授与に十分値する内容を有するものであると判断した。