

相補的水素結合を介した共集合型超分子の階層構造 制御と機能創発に関する研究

大林, 洋貴

<https://hdl.handle.net/2324/6787578>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (工学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

氏 名 : 大林 洋貴

論 文 名 : 相補的水素結合を介した共集合型超分子の階層構造制御と機能創発に関する研究

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

超分子化学は分子間の非共有結合的な相互作用とそれにより形成する分子集合体を扱う学問である。超分子化学は、生体機能の創発に不可欠であるため、その発展は生命現象の理解や、生命に匹敵する高機能システムの開発に寄与することが期待できる。本研究では、生体超分子が示す階層構造に応じた多様な機能を人工超分子が担えるのか、更には超えることが可能なのか、という点の検証を目的に研究を行った。

第1章では、超分子化学の歴史と近年の進展についてまとめた。なかでも、生体超分子が示す階層構造に応じた機能創発の例を示し、人工超分子を用いた関連研究の現状を述べた。

第2章では、生体適合性・高いデザイン性を有する自己集合材料として注目を集める両親媒性ペプチド (PA) を主骨格として用い、相補的相互作用を利用することで、階層構造制御と蛍光分子導入量の制御が可能な共集合型超分子を構築した。具体的には、PA と蛍光小分子である nitrobenzofurazan (NBD) に対して、相補的水素結合ペアである Cyanuric acid (Cya) と Melamine (Mel) とをそれぞれ導入した Cya-PA と Mel-NBD を設計した。なお、Cya-PA は、C₆アルキルリンカーを 0-3 個導入した Cya-PA0-Cya-PA3 (Cya-(C₆)_n-FEFEGRGD, n = 0-3) を合成した。各種顕微鏡観察を行ったところ、Cya-PA あるいは Mel-NBD 単独は明確な構造を形成しないが、Cya-PA と Mel-NBD を混合した場合には明確な集合体を形成することが確認された。また、Cya-PA の設計に応じた共集合型超分子の階層構造について比較したところ、Cya-PA0/Mel-NBD は直径 30 nm 程度の球状構造、Cya-PA1/Mel-NBD は長さ 300 nm 程度のロッド状構造、Cya-PA2/Mel-NBD はマイクロメートルスケールのファイバー状構造、Cya-PA3/Mel-NBD はファイバー状構造が束になったバンドル状構造と、異なる階層構造を有することが分かった。つまり、本共集合型超分子は、アルキルリンカー長の連続的な改変によって、階層構造を改変可能であることが示された。さらに、フーリエ変換赤外分光法および分子動力学シミュレーションによって分子間相互作用を評価したところ、アルキルリンカー長の延長に伴って、相補的水素結合およびペプチド間水素結合が増加しており、この分子間相互作用の変化が階層構造変化の要因であることが示唆された。

第3章では、共集合型超分子の階層構造が細胞内移行性に与える影響を評価した。Mel-NBD 単独または Cya-PA0-Cya-PA3 との共集合型超分子を子宮頸がん由来 HeLa 細胞に作用させた後の内在性について、NBD 由来の蛍光を指標にしてフローサイトメトリーを用いて定量的に評価した。結果として、階層構造に応じて細胞内移行性が変化し、Mel-NBD 単独と比べて共集合型超分子の

細胞内移行性が高いこと、球状構造を有する Cya-PA0/Mel-NBD およびロッド状構造を有する Cya-PA1/Mel-NBD がファイバー状に発達した構造を持つ Cya-PA2/Mel-NBD および Cya-PA3/Mel-NBD と比べて高い細胞内移行性を持つことが示された。続いて、Cya-PA/Mel-NBD の細胞内移行メカニズムを調べたところ、共集合型超分子がエネルギー非依存的かつ直接細胞膜を透過する非エンドサイトーシス経路によって細胞内移行することが示唆された。さらに、これらの集合体は細胞内移行後、ミトコンドリアや小胞体などの細胞内の有膜小器官に共集合状態を維持したまま局在していることが示唆された。最後に、共集合型超分子が示す脂質膜透過性の対象が生体膜に限定されるのかを確かめるため、人工脂質膜を用いた評価を行った。結果として、人工脂質膜構造体に対しても、球状構造を有する Cya-PA0/Mel-NBD やロッド状構造を有する Cya-PA1/Me-NBD が、ファイバー状に発達した Cya-PA2/Mel-NBD や Cya-PA3/Mel-NBD と比較して優れた透過性を示した。つまり、本共集合型超分子は、生体膜に限定されず脂質膜に対して、階層構造に応じた相互作用および透過性を示すことが確かめられた。

第 4 章では、Polyethylene glycol (PEG) と Dextran (Dex) を溶解した水溶液が生じる液-液相分離 (LLPS) 環境下における共集合型超分子の相選択性とカスケード反応への応用可能性を評価した。Mel-NBD 単独および Cya-PA/Mel-NBD の相選択性を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による直接観察により評価した結果、バンドル状構造を形成する Cya-PA3/Mel-NBD のみ Dex に富む液滴相への局在性を示し、共集合型超分子が階層構造に応じた相選択性を示すことが確かめられた。続いて、カスケード酵素反応ペアである glucose oxidase (GOx) と horseradish peroxidase (HRP) を用いて、共集合型超分子上へのタンパク質吸着を評価した。バイオレイヤー干渉法によって両酵素に対する Cya-PA3 単独、Mel-NBD 単独、あるいは Cya-PA3/Mel-NBD の吸着挙動を評価したところ、Cya-PA3/Mel-NBD のみが吸着を示し、分子の性質ではなく階層構造に由来したタンパク質吸着を示すことが確かめられた。続いて、Cya-PA3/Mel-NBD の液滴選択性およびタンパク質吸着性という 2 つの性質を活用することで、タンパク質の液滴中への濃縮が可能かどうか確かめた。蛍光修飾 GOx と HRP の LLPS 環境下における局在を CLSM 観察により評価したところ、GOx は Dex 相に HRP は PEG 相に局在するが、Cya-PA3/Mel-NBD 存在下においては、GOx と HRP のいずれの酵素も Dex 相中に局在した Cya-PA3/Mel-NBD 上に吸着していた。この結果を受け、共集合型超分子を用いた GOx と HRP の液滴中の超分子上への濃縮がカスケード反応へ与える影響について評価した。結果として、希薄溶液条件下、あるいは Cya-PA3/Mel-NBD 非存在下での LLPS 環境下と比較して、Cya-PA3/Mel-NBD 存在下での LLPS 環境下においてカスケード反応が向上した。以上より、共集合型超分子の液滴選択性とタンパク質吸着性を利用することでタンパク質の局在を制御し、連続酵素反応に活用可能であることが確認された。

第 5 章では、各章の総括と今後の展望について述べた。