

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18277

研究課題名(和文)新規ヘテロ接合型分子集合体の創製による自己集合材料の新しい機能化法の提案

研究課題名(英文)Functionalization of self-assembled materials with hetero-junction

研究代表者

若林 里衣 (Wakabayashi, Rie)

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：60595148

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、両親媒性ペプチド(PA)自己組織化材料に着目し、複数種類のPAが構造体内で局在化したマルチドメイン型PA共集合体の創製を目的とした。互いに非相溶な疎水性置換基を導入したPAを用いて、PAが集合し形成する疎水性空間中での相溶性を利用した共集合構造の制御を目指した。非相溶な疎水性置換基ペアとしてアルキル基とフルオロアルキル基を導入したPAは互いに別個に自己集合した。しかし、アルキル基とフルオロアルキル基の両方を有するPAを混合すると共集合し、その比によりドメインサイズを制御可能であることが示された。さらに集合体表面に機能性素子として蛍光基を導入し、蛍光基間の距離制御に成功した。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at fabricating multi-domained co-assembly of peptide amphiphiles (PAs) by segregating each PA in one structure. Immiscible hydrophobic substituents, alkyl and fluoroalkyl chains, were employed to generate the segregation in the hydrophobic core of the PA assembly. PAs bearing alkyl chain (H-PA) and fluoroalkyl chain (F-PA) formed segregated, self-sorted assemblies when mixed. However, under the presence of HF-PA bearing both alkyl and fluoroalkyl chains, the formation of co-assembly was observed. The domain size of H-PA and F-PA could be controlled by the amount of mixed HF-PA. Moreover, when fluorescent probe was introduced to each PA, the distance between probes was controllable. The results obtained here offer the novel methodology to fabricate a multifunctional biomaterial based on molecular assembly.

研究分野：自己組織化材料

キーワード：自己組織化 ペプチド ナノ材料 ドメイン

1. 研究開始当初の背景

小分子が様々な分子間相互作用により自発的に集積し特定の構造体を形成する自己組織化材料は、集積化による機能の増強や小分子にはない新たな機能発現が可能になる魅力的な材料として盛んに研究されている。数ある自己組織化分子の中でも、我々は両親媒性ペプチド (PA) に注目した。PA は一般に、親水性配列を含むペプチドに疎水性置換基が結合した分子であり、水中で疎水性相互作用や水素結合等の分子間相互作用により自己組織化、ミセルやナノファイバー等、多様な構造体を形成する。PA はペプチド由来の生体適合性や刺激応答性、生理活性等の特性を示すことから、様々なバイオ材料への応用が期待されている。最近、PA 自己組織化材料の多機能化を目指し、複数種類の PA からなる材料が報告されてきている。しかし、各 PA の分布や共集合の様式に関してはほとんど検討されておらず、制御する手法に乏しい状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、複数種類の PA の共集合様式を制御することで、各 PA が集合体内で局在化したマルチドメイン構造を持つ二次元 PA 集合体の創製を目指した。その手法として PA の疎水部に注目し、疎水性かつ互いに非相溶性な疎水性置換基を各 PA に導入することで、PA が集合し形成する疎水性空間中での相溶性を制御できれば、共集合の制御に繋がると考えた (図 1)。さらにペプチド鎖に機能性部位を導入し、複数の機能性ドメインを持つ自己組織化材料の創製を目指した。

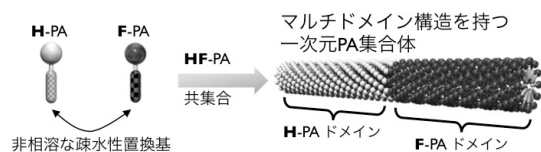


図 1. 本研究の概念図。非相溶性な疎水性置換基を利用して、複数のドメイン部位を持つ二次元 PA 集合体を創製する。

3. 研究の方法

疎水性かつ非相溶性な置換基として、アルキル基 (CH 基) とフルオロアルキル基 (CF 基) を利用した。疎水部に CH 基を導入した PA (H-PA) と CF 基を導入した PA (F-PA)、さらに両 PA を接合する分子として、CH 基と CF 基の両方を有する PA (HF-PA) を設計・合成した。H-PA と F-PA の共集合様式を、HF-PA の混合比に応じて制御可能であるかを調査した。さらに、機能性部位として各 PA に蛍光色素を導入し、色素間距離の制御を試みた。

4. 研究成果

(1) 各 PA の自己集合と設計最適化

CH 基としてラウリン酸、CF 基として 4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,9,9,10,10,11,11,11-ヘプタデ

カフルオロウンデカン酸を導入した各 PA を合成した。それぞれの PA の自己集合挙動は、FT-IR や蛍光スペクトル測定、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察により行った。いずれの疎水性置換基を導入した場合にも二次元に集合するペプチド配列として、側鎖に芳香族置換基を有する Phe、Tyr 等を N 末端側に有する配列が有効であることを見出した (図 2)。

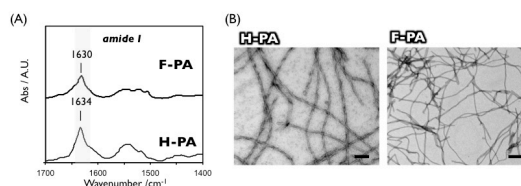


図 2. H-PA と F-PA 自己集合体の (A) FT-IR スペクトルおよび (B) TEM 画像。Phe, Tyr を配列中に持つ PA がペプチド間水素結合により二次元に集合することが示された。スケールバー: 200 nm。

(2) 共集合様式の制御

各 PA を混合した際の共集合の様式を、TEM-EDS を用いた元素マッピングにより解析した。H-PA、F-PA はいずれも構造体上から C、N が検出されるが、F-PA からのみ F が検出される (図 3A, B)。これを用いて、PA を混合させた際の混合様式の解析を行った。その結果、H-PA と F-PA のみを混合した場合には、F が検出されるファイバーと検出されないファイバーが別個に観察された (図 3C 中、それぞれ黒とピンクの矢印で表示)。これに対し、HF-PA を混合すると、全体が均一化したような像が得られた (図 3D)。以上より、H-PA と F-PA は互いに混ざり合わず別個の集合体を形成すること、HF-PA は両者を接合できることが示され、本戦略の有効性が示唆された。

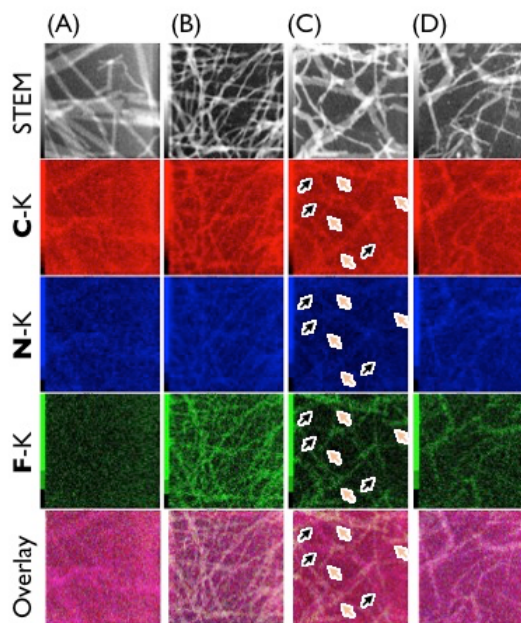


図 3. 各 PA 単独および混合した際の TEM-EDS 像。(A) H-PA, (B) F-PA, (C) H-PA + F-PA, (D) H-PA + F-PA + HF-PA。

(3) 蛍光基修飾 PA を用いたドメインの直接観察と各ドメインサイズの評価

機能性部位として蛍光基を導入した PA、フルオレセイン修飾 H-PA (FITC-H-PA)、テトラメチルローダミン修飾 F-PA (TMR-F-PA) を合成し、蛍光顕微鏡により共集合様式の直接観察を試みた (図 4)。結果、HF-PA 非存在下では H-PA と F-PA は各々の PA 同士で自己集合し混ざり合わない (図 4C) が、HF-PA の存在により共集合することが示された (図 4D, E)。HF-PA の比率が高いときには、H-PA と F-PA が均一に混合したような像が観察された (図 4E)。

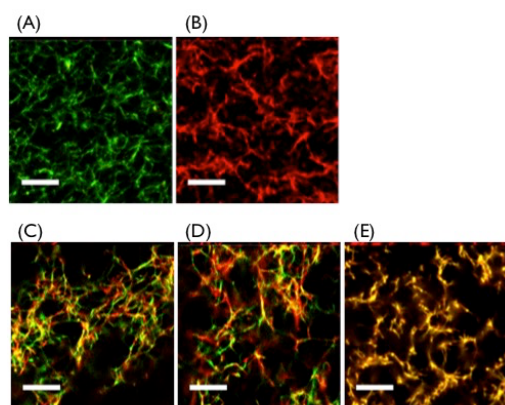


図 4. 各 PA 単独および混合した際の CLSM 像. (A) H-PA 単独, (B) F-PA 単独, (C) H-PA + F-PA, (D) H-PA + F-PA + HF-PA (比: 1:1:0.2), (E) H-PA + F-PA + HF-PA (比: 1:1:1). いずれも 5 μ M の FITC-H-PA と TMR-F-PA を含む. スケールバー: 5 μ m.

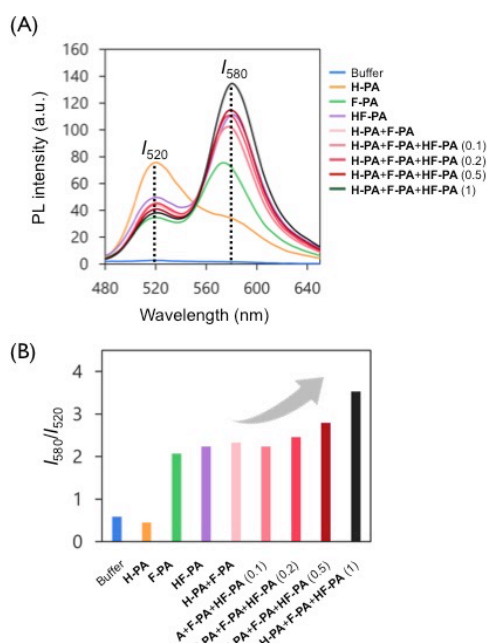


図 5. 蛍光共鳴エネルギー移動を用いた蛍光色素間距離の変化の評価. PA 混合比を変化させたときの (A) 蛍光スペクトル変化と (B) 520 nm と 580 nm の蛍光強度比. $\lambda_{ex} = 420$ nm.

共集合の際のドメインサイズに関する知見を得るため、蛍光共鳴エネルギー移動を用いた評価を行った。結果、各 PA を混合したサンプルに関しては、HF-PA の比率を上げるに従い、520 nm (フルオレセイン由来の蛍光) と 580 nm (テトラメチルローダミン由来の蛍光) の蛍光強度比 I_{580}/I_{520} が上昇した (図 5)。すなわち、HF-PA の比率に応じて各蛍光色素の存在するドメインサイズの制御が可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 28 件)

- (1) 若林里衣, ペプチド構造体へのタンパク質集積化, 日本化学会第 98 春季年会, 2018 年 3 月.
- (2) 大林洋貴, 若林里衣, 後藤雅宏, 神谷典穂, 異種混合分子集合システムを利用した小分子薬物キャリアの開発, 第 20 回化学工学会学生発表会, 2018 年 3 月.
- (3) R. Wakabayashi, M. Katsuya, N. Kamiya, M. Goto, Multi-block fibrous assembly of peptide amphiphiles based on intrinsic immiscibility, The Second International Symposium on Biofunctional Chemistry (ISBC2017), Dec. 2017.
- (4) 勝家睦洋, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, マルチドメイン構造を有する両親媒性ペプチド集合体の創製, 第 7 回日本バイオマテリアル学会九州ブロック講演会, 2017 年 12 月.
- (5) M. Katsuya, R. Wakabayashi, N. Kamiya, M. Goto, Fabrication of supramolecular peptide assembly with multiple domains, The 30th International Symposium on Chemical Engineering, Dec. 2017.
- (6) 若林里衣, 自己認識を利用したドメイン型集合の試み, 2nd Symposium on New Trends of Nano- or Bio-Materials Design in Supramolecular Chemistry, Oct. 2017.
- (7) 勝家睦洋, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 疎水部のマイクロ相分離を利用した両親媒性ペプチドの集合体内局在化, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017 年 9 月.
- (8) 若林里衣, 橋本龍一朗, 大林洋貴, 神谷典穂, 後藤雅宏, 相補的相互作用を活用した小分子薬物のデリバリーキャリア開発, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2017 年 9 月.
- (9) 若林里衣, 後藤雅宏, 神谷典穂, 酵素反応性ペプチドを用いたタンパク質の集積化, 第 66 回高分子学会年次大会, 2017 年 5 月.
- (10) 勝家睦洋, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 複数のドメイン構造を有する両親媒性ペプチド集合体の創製, 化学工学会第 82 年会, 2017 年 3 月.

- (11) M. Katsuya, R. Wakabayashi, N. Kamiya, M. Goto, Formation of supramolecular peptide assembly with heterojunction, The 29th International Symposium on Chemical Engineering, Dec. 2016.
- (12) R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, Enzyme-Reactive Self-Assembling Peptides for Biomacromolecular Functionalization, 2016 AIChE Annual Meeting, Nov. 2016.
- (13) R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, Biomolecular Assembly on a Self-Assembling Peptide Scaffold, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community, Oct. 2016.
- (14) 若林里衣, ペプチド自己集合材料の開発, 超分子化学合同研究会 2016, 2016年9月.
- (15) 勝家睦洋, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 両親媒性ペプチドの集合体内局在化に向けた分子設計戦略, 第10回バイオ関連化学シンポジウム, 2016年9月.
- (16) 橋本龍一朗, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 両親媒性ペプチドとの相補的相互作用による機能性分子のナノ構造体化, 第10回バイオ関連化学シンポジウム, 2016年9月.
- (17) 若林里衣, 後藤雅宏, 神谷典穂, 酵素的架橋反応を用いたペプチド足場上への生体高分子の集積化, 第10回バイオ関連化学シンポジウム, 2016年9月.
- (18) 勝家睦洋, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 複数の両親媒性ペプチドからなるヘテロ接合型ナノ構造体の創製, 第27回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会, 2016年7月.
- (19) 勝家睦洋, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, ヘテロ接合型超分子ペプチド集合体の創製, 第53回化学関連支部合同九州大会, 2016年7月.
- (20) 橋本龍一朗, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 両親媒性ペプチドを用いた多成分集合システムの構築, 化学工学会第81年会, 2016年3月.
- (21) 勝家睦洋, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, フッ素含有置換基を導入した超分子ペプチド集合体の創製, 第18回化学工学会学生発表会, 2016年3月.
- (22) R. Wakabayashi, A. Suehiro, M. Goto, N. Kamiya, Enzyme-mediated assembly of biomolecules on a designer scaffold based on self-assembled peptides, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Dec. 2015.
- (23) A. Suehiro, R. Wakabayashi, M. Goto, N. Kamiya, Supramolecular Peptide Scaffold for an Enzymatic Assembly of Functional Molecules, The 28th International

Symposium on Chemical Engineering, Dec. 2015.

- (24) R. Wakabayashi, K. Yahiro, T. Saeki, M. Goto, N. Kamiya, Transglutaminase-mediated fabrication of multi-protein-labeled polyacrylamide for molecular biosensing, The 21st Symposium of Young Asian Biochemical Engineer's Community, Oct. 2015.
- (25) 若林里衣, 酵素を利用した自己集合ペプチドの構造・機能変換, 第3回九州バイオ若手の会, 2014年9月.
- (26) 橋本龍一朗, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 両親媒性ペプチドとの共集合による機能性分子の集合構造制御, 第9回バイオ関連化学シンポジウム, 2015年9月.
- (27) 橋本龍一朗, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 相補的水素結合による二成分混合自己集合システムの開発, 第26回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会, 2015年7月.
- (28) 橋本龍一朗, 若林里衣, 神谷典穂, 後藤雅宏, 相補的水素結合による二成分混合自己集合システムの開発, 第52回化学関連支部合同九州大会, 2015年6月.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioeng.cstm.kyushu-u.ac.jp/index.htm>

(公社) 新化学技術推進協会 第6回 JACI/GSC シンポジウムにて本成果を発表。(2017年7月)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 里衣 (WAKABAYASHI, Rie)
九州大学・大学院工学研究院・助教
研究者番号: 60595148

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

後藤 雅宏 (GOTO, Masahiro)
神谷 典穂 (KAMIYA, Noriho)
橋本 龍一朗 (HASHIMOTO, Ryuichiro)
勝家 睦洋 (KATSUYA, Mutsuhiro)
大林 洋貴 (OBAYASHI, Hiroki)