

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年9月5日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02279

研究課題名(和文)膜融合と切断によりモルフォロジーを変化させるペプチド分子集合体の構築と機能化

研究課題名(英文) Construction and Functionalization of Peptide Molecular Assemblies Changing Morphologies by Membrane Fusion and Fission

研究代表者

木村 俊作 (Kimura, Shunsaku)

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：80150324

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,100,000円

研究成果の概要(和文)：両親媒性ポリペプチドおよび環状ペプチドの自己組織化により、一次構造から四次構造までに分類できる分子集合体の調製および物性の解析を示すことができた。分子集合体の一次構造とは、シート、チューブ、ベシクルなどの単一モルフォロジーを示す分子集合体。二次構造とは、複数の一次構造を組み合わせたキメラモルフォロジーを示す分子集合体。三次構造とは、単一モルフォロジーでありながら、膜の表裏を識別できたり、膜の相分離を伴う分子集合体。四次構造とは、分子集合体がさらに組織化された分子集合体。分子の一次構造を設計することで、これらの階層構造を調製できる分子システムを提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

合成分子を用いた分子集合体の調製については、非常に多くの報告がある。例えば、チューブモルフォロジーの報告は多々あるが、本研究での進歩は、重量平均長さと数平均長さの比が1.1に満たない、ディメンジョンの分散が極めて狭い分子集合体を調製できる点にある。さらに、これまでに調製されたことのないキメラモルフォロジーの分子集合体や、相分離チューブ、チューブが規則的に集合化したバンドルなどの調製にも成功している。これまでになかった階層構造を有する分子集合体の調製により、その学術基盤を大きく広めると共に、それらの応用についても期待が大きく、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have successfully demonstrated preparations and physical analyses of novel molecular assemblies composed of amphiphilic block polypeptides and cyclic peptides. The structures of the molecular assemblies are categorized from primary to quaternary structures. Primary structure: single morphology including sheet, tube, and vesicle etc. Secondary structure: chimera morphology like a round-bottom-flask shape and a test-tube shape. Tertiary structure: single morphology showing a hierarchical structure like an unsymmetric vesicle and a phase-separated tube. Quaternary structure: Ordered assembling of molecular assemblies like a bundle of tubes. Strategies for the molecular designs for these hierarchical molecular assemblies have been demonstrated in this research.

研究分野：高分子化学、高分子・機能材料

キーワード：Molecular Assembly Nano Materials Polypeptide Self-Organization Cyclic Peptide Hierarchical Structure

## 1. 研究開始当初の背景

有機分子の自己組織化は、生体における脂質やタンパク質、核酸などに幅広く観察されるだけでなく、分子レベルで構造が規制された機能性材料の開発においても、中核となるナノテクノロジーを支える現象の一つである。これまでに、様々な低分子および高分子の両親媒性化合物が合成され、それらの分子集合体のモルフォロジーと分子構造との関係について、分子充填パラメータなどを用いて理解することが可能となっている。この関係の概要は、両親媒性化合物の親水性部位と疎水性部位との体積比率を考えたとき、親水性部位が大きいものから小さいものへと変化すると、モルフォロジーはミセル、ひも状ミセル、ラメラ、ベシクルへと変わる、と纏められる。また、構成分子にキラルな部位があると、シートが屈曲し、ヘリカルリボンやチューブ構造が形成される。一見すると、分子集合体の科学は成熟したかに見えるが、細胞の中におけるオルガネラをみってみると、実に多様な構造が自己組織化により構築されており、このような構造を人工的に作り出すことは、まだ容易ではない。例えば、脂質膜においてベシクルからチューブ構造を伸ばすことが、相分離により実現できるが、外部からのエネルギーを必要とする。これに対して、我々のグループは、右巻きのらせん形成ペプチドと左巻きのらせん形成ペプチドを疎水性部位に有する両親媒性ヘリックスペプチドが、それぞれ単独ではチューブ構造をとるのに対し (*Macromol. Biosci.*, **8**, 1026 (2008))、両者が共存すると水中でベシクル構造をとることを見出した (*Chem. Commun.*, **47**, 3204 (2011))。さらに、どちらかのヘリックスが多く存在すると、ベシクルとチューブとが繋がった丸底フラスコ型分子集合体が自己組織化により形成され、このキメラモルフォロジーが熱力学的に安定な構造であることを示した (*Soft Matter*, **7**, 4143 (2011))。これは、右巻きらせんと左巻きらせんとは、1:1 (モル比) で安定なステレオコンプレックスを形成し、この領域はベシクル構造を誘導するのに対し、右巻きか、左巻きかのどちらかが過剰に存在すると、過剰なものが相分離により異なる領域を形成し、この領域はチューブ構造をとるためであることがわかった。水溶液中での分子集合体形成について、集合化のドライビングフォースに、疎水性相互作用、 $\pi$ - $\pi$  相互作用、水素結合、イオンコンプレックスなどを用いた例は多く報告されているが、ステレオコンプレックスを用いて、精密にモルフォロジーを制御した例はこれが初めてである。また、キメラモルフォロジーについては、これまでに、脂質膜での相分離 (ラフト) により、2種類のベシクルが繋がった Janus 構造や、上述したように、ベシクルからチューブが伸びた構造は報告されているが、脂質を用いずに、らせん形成両親媒性ペプチドのステレオコンプレックス形成による相分離に基づいて、化学量論的に、且つ、熱力学的に安定な状態として、ベシクルとチューブとの異なるモルフォロジーが繋がった丸底フラスコ型のモルフォロジーを (図 1) 自己組織化で作製した初めての例でもある。

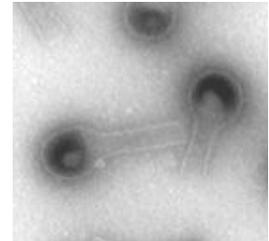


図 1 Round-bottom-flask shape morphology composed of a vesicle and a tube by a continuous single interdigitated monolayer (TEM).

## 2. 研究の目的

単一のモルフォロジーを有する分子集合体については、基礎から応用まで多くの研究、応用例の集積が既にある。しかしながら、複数の異なるモルフォロジーで構成される一枚膜の分子集合体の例は、Janus 構造の脂質膜と我々の構築した丸底フラスコ型の分子集合体の例しかない。本研究ではさらに進めて、ベシクル、チューブ、シートの素構造をモジュールとして、それらを組み合わせてダイナミックに形状変化が可能な分子集合体システムを構築する。このようなダイナミクスを示すキメラモルフォロジーを構築するための原理を確立することが目的である。これにより、細胞内オルガネラなどの自然界に見られる複雑なモルフォロジーを模倣できる分子集合体の構築手法を手中に収めることができ、分子集合体の学術基盤を深化できる。本研究で調製するキメラモルフォロジーを示す分子集合体は、熱力学的に安定な状態であり、キネティックコントロールにより不安定状態を取り出したものではないことが特色である。キメラモルフォロジーは、ステレオコンプレックス形成による膜の相分離に対応するものであり、基本的には調製方法に依存せず得られる特長を有する。このような精緻なデザインが可能なナノ構造体は、それ自身に機能を持たせることで様々な分野において機能材料として用いることが可能である。また、ナノ構造体を鋳型として、金属あるいは無機ナノ構造体を作製することも可能であり、ナノ材料としての応用範囲は極めて広く、材料科学に大いに寄与するものと期待される。

## 3. 研究の方法

本研究で用いた両親媒性ブロックポリペプチドの殆どは、poly(sarcosine)-*b*-(Leu-Aib)<sub>n</sub> の構造をもっており、疎水性ブロックはフラグメント縮合による鎖長延長を行う液相法で合成した。環状ペプチドについても、液相法で直鎖状ペプチドを得た後、両末端保護基を除去して環化反応を行って合成した。分子集合体の解析は、光散乱を用いる DLS および NanoSight 測定、TEM 観察により行った。ベシクルについては、液中 AFM 観察が可能であり、弾性率も求めることができた。環状ペプチドで調製したナノチューブは、AFM 観察により形状、表面電位、圧電性、弾性率、伝導性などを評価した。

## 4. 研究成果

様々な分子集合体の調製に成功したことから、分子集合体のカテゴリー化を提案することができた。Primary から Quaternary まで、分子集合体のカテゴリー分けを図 2 に示す。

分子集合体の primary structure には、モルフォロジーにて分類できる構造が対応する。本研究で展開した、Leu-Aib をベースとするペプチドを用いた分子集合体では、curved sheet、rolled sheet、helical ribbon、twisted ribbon、planar sheet、tube、vesicle 等のモルフォロジーが primary structure に属する。

secondary structure には、複数の primary structure が組み合わさったキメラモルフォロジーが分類される。具体的には、ベシクルとチューブとのキメラモルフォロジーである丸底フラスコ型分子集合体や試験管型分子集合体、電球型分子集合体などが分類される。一方、tertiary structure には、分子集合体全体のモルフォロジーは primary structure にて記述できるものの、構造には階層性があり、相分離やコンポーネントが規則正しく配置されていたりする分子集合体が属する。例えば、表面と裏面との化学成分がことなる非対称性ベシクルや、長軸方向でコンポーネントの分布が違う相分離チューブなど、tertiary structure での記述が必要となる。環状ペプチドがスタックして形成される環状ペプチドナノチューブについて、その表面に配置される官能基が規則正しく配列している場合も、tertiary structure としての記述が必要となる。このような分子集合体がさらに組織化された構造は、quaternary structure として記述される。例えば、環状ペプチドナノチューブが 4 本会合したバンドルや、環状ペプチドナノチューブが平行型でバンドル化した分子集合体などが、quaternary structure に分類される。

上述した primary から quaternary までの構造が記述可能になったのは、これらの構造を有する分子集合体の調製に成功したためである。分子集合体の構成成分は、 $(\text{poly}(\text{sarcosine}))_n\text{-}b\text{-}(\text{L- or D-Leu-Aib})_m$  の両親媒性ポリペプチドおよび アミノ酸を含む環状ペプチドである。前者の両親媒性ポリペプチドの特色は、疎水性ブロックがヘリックス構造をとり、側鎖のイソブチル基がヘリックス間で空間充填されるようにヘリックスの会合が強固に起こる点である。

水中での分子集合体形成では、疎水性ブロック同士の疎水性相互作用が会合のドライビングフォースとなり、疎水性ヘリックスブロックの分子設計が分子集合体のモルフォロジーに大きな影響を及ぼす。一方、親水性ブロックも、分子集合体の成長過程において、膜のエッジを水和から遮蔽することで成長を抑制するドーマント状態に深く関わっており、やはり分子集合体のモルフォロジーに大きな影響を及ぼす。さらに、親水性ポリマーには曇点を有するものがあるが、 $\text{poly}(\text{N-ethyl glycine})$  は単独では曇点を示さないものの、 $\text{poly}(\text{N-ethyl glycine})\text{-}b\text{-}(\text{L-Leu-Aib})_6$  を合成してチューブの分子集合体にすると、70 あたりに曇点を示すようになる。 $\text{poly}(\text{sarcosine})\text{-}b\text{-}(\text{L-Leu-Aib})_6$  も疎水性ブロックが同じであるのでチューブの分子集合体を形成する。 $\text{poly}(\text{N-ethyl glycine})\text{-}b\text{-}(\text{L-Leu-Aib})_6$  と  $\text{poly}(\text{sarcosine})\text{-}b\text{-}(\text{L-Leu-Aib})_6$  との混合物も、チューブの分子集合体となる。90 の温度処理してもチューブのモルフォロジーが維持され、 $\text{poly}(\text{N-ethyl glycine})$  が曇点を示す性質の基つき、チューブ内で 2 成分それぞれの領域に相分離する。

具体的な研究成果の概要は以下の通りである。

1) 側鎖に導入したベンジルエステル基の数が、3 個、1 個、0 個の環状トリβ - ペプチドをそれぞれ合成し、それらの分子集合体であるペプチドナノチューブバンドルを調製した。バンドルの表面電位はベンジルエステル基の数と共に上昇し、圧電係数はベンジルエステル基を 1 個もつものが高くなった。コンダクタンスはベンジルエステル基の数に応じて高くなった。これらの結果は、ベンジルエステル基の配置や配向を考えることで説明できた。

2)  $\text{poly}(\text{N-ethyl glycine})\text{-}b\text{-}(\text{L-Leu-Aib})_6$  と  $\text{poly}(\text{sarcosine})\text{-}b\text{-}(\text{L-Leu-Aib})_6$  との混合物からチューブ状分子集合体を調製し、90 で熱処理することで両者が相分離した tertiary structure を導くことができることを示した。

3)  $\text{poly}(\text{sarcosine})\text{-}b\text{-}(\text{L-Leu-Aib})_6\text{-Ecz}$  (Ecz は エチルカルバゾール) と  $\text{poly}(\text{sarcosine})\text{-}b\text{-}(\text{D-Leu-Aib})_8\text{-Npi}$  (Npi はナフタルイミド)のそれぞれを用いてチューブ分子集合体を

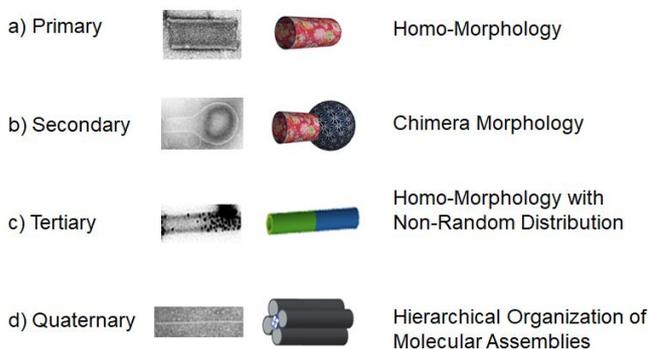


図 2 Primary to quaternary structures of molecular assemblies in light of phase separation.

調製し、両者が接合して相分離チューブ構造(tertiary structure)を維持できることを示した。

4) poly(sarcosine)-*b*-(L-Leu-Aib)<sub>8</sub>を用いてベシクルを調製し、内包した KCl やフルオレセインのベシクルからの漏れを調べたところ、このベシクルは高い浸透圧抵抗性を示すことがわかった。ヘリックスペプチド間のイソブチル基の空間充填様式を提案している。

5) 両親媒性ブロックポリペプチドの poly(sarcosine) ブロックの末端に、アデニンおよびチミンを結合し、それぞれのチューブを調製した。両者のチューブは、相補的水素結合を形成する塩基を呈示しているにも拘わらず、チューブの会合は抑制された。一方、アデニンを呈示したチューブは、チューブ同士の結合が起こり、チューブ長が長くなることがわかった。

6) アミノ酸と アミノ酸とを組み合わせさせた環状ペプチドが、スタックしてペプチドナノチューブになるとき、アミノ酸の側鎖がナノチューブ表面に直線上に並ぶことを示すことに成功した。官能基が規則的に並んだナノチューブは、バンドル化して quaternary structure をとり、大きな表面電位を示した。

7) ヘリックスペプチド - 芳香環 - ヘリックスペプチドの分子を合成し、分子集合体がシートになることを示した。このシートの膜の中央層にはホスト空間が存在し、芳香環ゲスト分子を取り込むことができることを示した。興味深いことに、取り込まれた複数のゲスト分子はキラルな配置をシートの中でとっていた。

8) (Ala-Aib)<sub>n</sub> と (Leu-Aib)<sub>n</sub> の固体について、テラヘルツ領域のスペクトル測定を行い、ヘリックスペプチド全体にわたるアコーディオン様振動がこの周波数領域に存在し、前者の方がアコーディオン様振動のよく起こることを見出した。前者の方が、ペプチドを介して電子移動速度が大きい理由として、このアコーディオン様振動を指摘した。

9) 両親媒性ブロックポリペプチドの分子集合体の膜は、疎水性ヘリックスブロックが interdigitate 型に集合した単分子膜であることを、液中 AFM 観察より明らかにした。一方、疎水性ヘリックスブロックに大きな芳香族基を結合した場合、二分子膜に変化することを見出した。

10) poly(sarcosine)-*b*-(L-Leu-Aib)<sub>6</sub> と poly(sarcosine)-*b*-(D-Leu-Aib)<sub>6</sub> あるいは poly(sarcosine)-*b*-(D-Val-Aib)<sub>6</sub> の混合物からベシクルを調製し、液中 AFM により弾性率を評価した。前者の組み合わせの弾性率は後者の組み合わせの 3 倍程度大きかったことから、分子集合体中で隣接するヘリックスブロックのイソブチル基同士の空間充填が良好なため、膜がリジッドになることがわかった。

11) kinetic control により、60 nm の直径のベシクルを調整する方法を見出した。50 nm の直径を有するチューブの開口部にシート状分子集合体を融合し、温度により切断することで、ナノチューブの直径に応じたベシクルサイズとなる。従って、ナノチューブがベシクルの鋳型になっている。

具体的内容は、項目 5 . の 11 報の論文にそれぞれ報告されている。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Tabata, Y.; Kamano, Y.; Uji, H.; Imai, T.; Kimura, S., Electronic Properties of Cyclic  $\beta$ -Peptide Nanobue Bundles Reflecting Structural Arrangement. *Chem. Lett.* 2019, 48, 322-324. DOI: 10.1246/cl.181007
2. Hattori, T.; Itagaki, T.; Uji, H.; Kimura, S., Temperature-Induced Phase Separation in Molecular Assembly of Nanotubes Comprising Amphiphilic Polypeptoid with Poly(N-ethyl glycine) in Water by a Hydrophilic-Region-Driven-Type Mechanism. *J. Phys. Chem. B* **2018**, 122 (28), 7178-7184. DOI: 10.1021/acs.jpcc.8b03419
3. Itagaki, T.; Kurauchi, S.; Uebayashi, T.; Uji, H.; Kimura, S., Phase-Separated Molecular Assembly of a Nanotube Composed of Amphiphilic Polypeptides Having a Helical Hydrophobic Block. *ACS Omega* **2018**, 3 (7), 7158-7164. DOI: 10.1021/acsomega.8b01073
4. Itagaki, T.; Nobe, W.; Uji, H.; Kimura, S., Osmotic-shock-resistant vesicle comprising interdigitated monolayer of block polypeptides. *Chem. Lett.* **2018**, 47 (6), 726-728. DOI: 10.1246/cl.180168
5. Itagaki, T.; Ueda, Y.; Itabashi, K.; Uji, H.; Kimura, S., Joining Nanotubes Comprising Nucleobase-carrying Amphiphilic Polypeptides. *Chimia* **2018**, 72 (12), 842-847. DOI: 10.2533/chimia.2018.842
6. Tabata, Y.; Uji, H.; Imai, T.; Kimura, S., Two one-dimensional arrays of naphthyl and anthryl groups along peptide nanotubes prepared from cyclic peptides comprising alpha- and beta-amino acids. *Soft Matter* **2018**, 14 (37), 7597-7604. DOI: 10.1039/c8sm01627e

7. Uji, H.; Ogawa, J.; Itabashi, K.; Imai, T.; Kimura, S., Compartmentalized host spaces accommodating guest aromatic molecules in a chiral way in a helix-peptide-aromatic framework. *Chem Commun (Camb)* **2018**, 54 (88), 12483-12486. DOI: 10.1039/c8cc07380e
8. Itagaki, T.; Matsushita, D.; Uji, H.; Fujii, T.; Heidy, V.; Hirao, K.; Kimura, S., Accordion-like oscillation mode of helical peptides analyzed by terahertz time-domain spectroscopy. *Chem. Lett.* **2017**, 46 (10), 1576-1579. DOI: 10.1246/cl.170655
9. Kim, C. J.; Kurauchi, S.; Uebayashi, T.; Fujisaki, A.; Kimura, S., Morphology change from nanotube to vesicle and monolayer/bilayer alteration by amphiphilic block polypeptides having aromatic groups at C terminal. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2017**, 90 (5), 568-573. DOI: 10.1246/bcsj.20170044
10. Kim, C. J.; Ueda, M.; Imai, T.; Sugiyama, J.; Kimura, S., Tuning the Viscoelasticity of Peptide Vesicles by Adjusting Hydrophobic Helical Blocks Comprising Amphiphilic Polypeptides. *Langmuir* **2017**, 33 (22), 5423-5429. DOI: 10.1021/acs.langmuir.7b00289
11. Watabe, N.; Joo Kim, C.; Kimura, S., Fusion and fission of molecular assemblies of amphiphilic polypeptides generating small vesicles from nanotubes. *Biopolymers* **2017**, 108 (2), e22903. DOI: 10.1002/bip.22903

〔学会発表〕(計 15 件)

- 倉内 咲 二種類の官能基が長軸方向で相分離したペプチドナノチューブの構築 第 57 回高分子学会年次大会 2016
- 野辺 若菜 ヘリックスペプチドを疎水性領域に有するベシクルのイオン透過性 第 57 回高分子学会年次大会 2016
- 田畑 有基 側鎖の配向を規制した環状ペプチドナノチューブ 第 65 回高分子討論会 2016
- 板垣 亮 二種類の芳香族官能基が長軸方向に相分離したペプチドナノチューブの構築 第 66 回高分子年次大会 2017
- 板垣 亮 ヘリックスペプチドを疎水性領域に有するベシクル膜のイオン透過性 第 66 回高分子年次大会 2017
- 高垣 和志 Dielectric Properties of Organic Nanotubes Comprising  $\beta$ -peptides 第 9 回エレクトロニクス国際会議 2017
- 鈴木 祐矢 両親媒性ポリペプチド分子集合体に組み込んだ D- $\pi$ -A 官能基の電気的および分光学的特性 第 66 回高分子討論会 2017
- 服部 哲也 異なる親水部ブロックを有する両親媒性ポリペプチドによる相分離分子集合体の構築第 66 回高分子討論会 2017
- 田畑 有基 環状ペプチドの分子集合体であるペプチドナノチューブを AFM 測定により解析した圧電特性 第 67 回高分子討論会 2018
- 大村 紘司 官能基を導入した環状 $\beta$ -ペプチドナノチューブの c-AFM を用いて求めた電流 - 時間特性の  $1/f$  揺らぎの解析第 67 回高分子討論会 2018
- 魚谷 拓矢 Dual Conversion System of Photocurrent Generation and Electro-Luminescence by D- $\pi$ -A Chromophore with Help of Helical Peptide Scaffold 第 55 回ペプチド討論会 2018
- 釜野 雄哉 Electronic Properties of Peptide Nanotubes Displaying One-Dimensional Array of Flavin 第 55 回ペプチド討論会 2018
- 佐々木 亮太 Honeycomb Structure Composed of Peptide Nanotubes via Directionally Orthogonal Hydrogen Bond Networks 第 55 回ペプチド討論会 2018
- 大村 紘司 クロラニル修飾環状トリ- $\alpha$ -ペプチドを用いるペプチドナノチューブの構築と電子的特性 第 67 回高分子年次大会 2018/5/23
- 釜野 雄輔 芳香族で修飾した環状トリ- $\alpha$ -ペプチドを用いるペプチドナノチューブの構築と誘電体特性 第 67 回高分子年次大会 2018/5/23

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当なし

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## **6. 研究組織**

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし