

博士学位論文審査要旨

2019年1月22日

論文題目：ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド型高分子の精密合成とその特性に関する研究

学位申請者：西村慎之介

審査委員：

主査：同志社大学大学院理工学研究科 教授 東 信行

副査：同志社大学大学院理工学研究科 教授 水谷 義

副査：同志社大学大学院理工学研究科 教授 小寺政人

要 旨：

生体高分子の代表例であるタンパク質は、精密に制御されたアミノ酸配列により特異な立体構造を形成し、それに基づいて様々な優れた機能を発現している。このような立体構造形成能や高度な生体機能は、材料化学の観点からも分子素材として大変興味深い。一方、環境耐性の低さや合成スケールの観点からは問題が残る。他方、ビニルポリマーなどの合成高分子は合成スケール面の有位性だけでなく力学特性や化学的安定性、加工性に優れ、材料としてのポテンシャルが高い。また、タンパク質に比べて鎖長が短く単純な構造の人工ペプチドは環境耐性が高く、容易に配列制御ができ、その特異な二次構造に基づくナノ構造体の形成や生体機能の導入も容易である。本論文は、これらの点に鑑み、新しいソフトマテリアルの設計戦略として配列制御ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド型高分子に焦点を当て、その機能設計と新しい精密合成法について論じたものである。まず第一章では、研究の背景と分子設計ならびにその合成戦略について述べている。第二章、第三章では細胞認識性のペプチドを、光切断部位を介してグラフト鎖とするハイブリッドポリマーの2通りの合成法を提案し、これらフィルムを利用して、光による細胞の2次元ならびに3次元パターン化を達成している。第四章では、ブロック型ペプチド-ポリマー・ハイブリッドによる緑色蛍光タンパク質のモデル化を検討し、中央ブロックに蛍光種形成ペプチドを配したブロック型ハイブリッドが熱刺激による構造形成に伴って蛍光発光現象を示すことを見出した。第五章ではブロック型ハイブリッドをより発展させたマルチブロック・ハイブリッド高分子の1段階合成を提案し、新しく考案した環状ニトロキシド介在重合開始剤の利用により見事に目的を達成した。第六章では、全てのユニットにアミノ酸部位を含む高い生体適合性の期待されるマルチブロック・ハイブリッドの合成に成功し、水中で自発的に単鎖フォールディングして、タンパク質の高次構造に匹敵するナノサイズの集合形態を形成することを明らかにした。

以上のように本論文の内容は、ペプチド-合成高分子・ハイブリッドの新しい精密合成法の開拓とその生体材料への応用に関する先駆的な研究であり、これらの成果は、この分野の発展に多大なる貢献をなすものである。よって本論文は博士（工学）（同志社大学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。

総合試験結果の要旨

2019年1月22日

論文題目：ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド型高分子の精密合成とその特性に関する研究

学位申請者：西村慎之介

審査委員：

主査：同志社大学大学院理工学研究科 教授 東 信行

副査：同志社大学大学院理工学研究科 教授 水谷 義

副査：同志社大学大学院理工学研究科 教授 小寺政人

要 旨：

本論文提出者は、現在、理工学研究科応用化学専攻博士課程（後期課程）3年次に在学中である。

本論文の主たる内容は、*Chem. Eur. J.*, **23**, 15050-15058 (2017) (1編)、*Colloid. Surf. B Biointerface*, **159**, 39-46 (2017) (1編)、*Materials*, **11**, 424 (2018) (1編)、*Chem. Lett.*, **47**, 555-558 (2018) (1編)、*臨床バイオメカニクス*, **39**, 321-326 (2018) (1編)、*Polym. Chem.*, **10**, 71-76 (2019) (1編) にすでに掲載され、十分な評価を得ている。

2019年1月19日午前9時30分より約1時間30分にわたって提出論文に対する学術講演会（博士論文公聴会）が開催され活発な質疑応答がなされたが、提出者の説明によりいずれも十分な理解が得られた。さらに講演会終了後、審査員により論文に関する諸問題につき口頭試問を実施した結果、十分な学力を確認できた。提出者は英語による論文発表を行っていることや語学試験にも合格しており、十分な語学力を有すると認められる。

よって総合試験の結果は合格であると認める。

博士学位論文要旨

論文題目： ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド型高分子の精密合成とその特性に関する研究

氏名： 西村 慎之介

要旨：

タンパク質は精密に制御されたモノマー (アミノ酸) 配列に基づいて特異な立体構造を形成し、様々な優れた機能を発現している。このような立体構造形成能や高度な生体機能は、材料化学の観点から分子素材として大変魅力的であるが、外部環境耐性の低さや合成スケール面に問題がある。一方で、ビニルポリマーは合成スケール面の有位性だけでなく力学特性や化学的安定性、加工性が高く、材料としてのポテンシャルが高い。また、タンパク質と比較して、鎖長が短く単純な構造の人工ペプチドは環境耐性が高く、安価に配列制御が可能であり、二次構造形成に基づくナノ構造体や生理機能も容易にデザインできる。ペプチドとビニルポリマーをハイブリッド化させることで、ビニルポリマーの優れた力学特性とペプチドに由来する特異的機能を併せ持つ優れた機能性材料となろう。本論文では、新しいソフトマテリアルの設計戦略として、配列制御ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド型高分子の合目的な機能設計とその精密合成法の確立を目指した。グラフト型、トリブロック型、マルチブロック型など多様な高分子形状のハイブリッドポリマーの開発に成功し、それらのナノバイオマテリアルとしての高いポテンシャルを明らかにした。得られた高分子合成技術やその機能特性に関する知見は、工業材料から医用材料、ナノテクノロジーの分野の進展に大きく貢献する。以下に各章の概要について述べる。

第二章では、マクロモノマー法によるグラフト型ハイブリッドの合成と機能性細胞足場材料への応用性について検討した。グラフト型ハイブリッドの特徴であるグラフト鎖の脱離に伴う機能のON→OFF制御に着目し、光分解性リンカーを介してRGDSペプチドグラフト鎖を有するビニルポリマーを設計した。末端に重合性のメタクリロイル基を有するRGDSペプチドマクロモノマーは固相合成 (SPPS) 法により合成し、その光分解性について検討した。3-アミノ-(2-ニトロフェニル)プロパン酸 (ANP) 部位の光分解はUV照射により速やかに進行した。RGDSマクロモノマーとスチレン (St)、メタクリル酸メチル (MMA) および メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA) の共重合をフリーラジカル重合法により行い、種々のグラフト型ハイブリッドの合成に成功した。Poly(HEMA-*g*- β A-ANP-K(RhB))- β A-RGDS-*Am*において光切分解反応は進行し、ペプチドグラフト鎖がポリマー主鎖から切断可能であることを明らかにした。NIH3T3細胞を用いて細胞接着性を検討したところ、RGDSペプチドをグラフト鎖に持たないPHEMAフィルム上では接着細胞が全く見られなかった。一方、ハイブリッドフィルム上では細胞接着が確認され、また、フォトマスクを介してUV光を照射することでRGDSエピトープならびに接着細胞の二次元パターン化が実現できた。

第三章では、クリック反応を用いた重合後修飾によるグラフト型ハイブリッドの合成と機能性細胞足場材料への応用性について検討した。第二章で得られた知見をもとに、クリックアブルRGDSペプチドおよびアルキン基を有するPHEMAとアクリル酸プロパルギル (PgA) のランダム共重合体 (poly(HEMA-*ran*-PgA)) を新規に設計した。Poly(HEMA-*ran*-PgA) の合成はRAFT重合法によるHEMAとPgAの共重合によって行い、重合はリビング的に進行することを明らかにした。クリックアブルペプチドはSPPS法により合成し、スピコート法により作製したpoly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム上でのクリック反応により、RGDSペプチドの重合後修飾が可能なことを示した。MC3T3-E1細胞のRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルムへの接着性を検討したところ、RGDS

修飾フィルムの表面の接着細胞数は未修飾と比較して約4倍であった。さらに、UV照射前後の細胞接着特性を検討したところ、接着細胞数は3倍程度の差があり、光照射によるペプチドグラフト鎖の切断により細胞接着性を任意に制御できることが明らかとなった。また、NIH3T3細胞をRGDS修飾poly(HEMA-*ran*-PgA)フィルム上で培養した後、UV光を照射することで細胞をシート状に回収することも可能であった。さらに、フォトマスクを介して光照射を行うことで、マイクロパターン化にも成功した。これらの特性から、細胞シート工学基板やセルチップなどへの利用が期待できるだろう。それだけでなく、高分子薄膜を用いる本手法は、複雑な三次元構造体の表面もディップコート法という簡便な方法で改質可能であった。3Dプリンターで作製したPLLA構造物にpoly(HEMA-*ran*-PgA)を被膜し、クリック反応によりRGDSペプチド修飾を行った。細胞接着性を示さないPLLA表面にRGDS修飾を行うことで、細胞接着性を付与することに成功した。

第四章では、トリブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッド (ビニルポリマー-配列制御ペプチド-ビニルポリマー型) を設計し、ユニマーミセル構造形成に基づくタンパク質様の内部疎水性空間を構築と機能発現の可能性を模索した。様々なビニルポリマー種を組み合わせたハイブリッドポリマーを設計し、その蛍光発光特性について詳細に検討した。SPPS 法によりFSYGV ペプチド ATRP 開始剤およびRAFT 剤を合成した。これらのペプチドを用いた ATRP およびRAFT 重合法により、様々なビニルポリマーブロックを有するトリブロック型ハイブリッドの合成に成功した。特に、ポリアクリル酸 (PAA)-ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) ブロックを有するハイブリッドは、GFP 様の緑色蛍光の発光を示した。さらに、加熱-冷却サイクルを経ることで、PNIPAM セグメントの緩和と凝集の繰り返しにより蛍光強度が増加することもわかった。PNIPAM セグメントの緩和-凝集が、FSYGV ペプチドに適切な歪みを与え、分子内環化反応を促進していることを示唆した。温度応答性高分子である PNIPAM を用いることで、温度に応答した蛍光発光の OFF→ON スイッチを可能とし、GFP 様の緑色蛍光の発現に成功した。

第五章では、ペプチドとビニルポリマーからなるマルチブロック型ハイブリッドの新しい合成法を確立した。NMPの重合機構に着目し、ワンステップでビニルポリマーベースのマルチブロック型ハイブリッドが合成可能なTEMPO型環状ペプチド開始剤を新規に設計・合成した。TEMPO型(Leu)₄ NMP開始剤を用いたStの重合により、(Leu)₄-*b*-PStユニットが3-4回繰り返した構造を有するマルチブロック型ハイブリッドを得ることに成功し、モノマー転化率を変化させることでPStブロックの長さを任意に調節できることを明らかにした。また、重合はアミノ酸配列が異なるペプチドNMP開始剤を用いた場合でも良好に進行した。さらに、TEMPO型 (Leu)₄ NMP開始剤を用いてSt以外の芳香族モノマー (*p*-クロロスチレン (*p*-ClSt) と4-ビニルピリジン (4VP)) の単独重合およびSt/アクリロニトリル (AN) の共重合を試みた。全てのハイブリッドポリマーはマルチブロック構造を有しており、それらのポリマーブロックは良く制御されていることを明らかにした。TEMPO由来アルコキシアミンを用いた場合、重合可能なモノマーは芳香族モノマーに限られるため、TIPNO型(Leu)₄ NMP開始剤を設計・合成し、適用可能モノマー種の拡張を試みた。この開始剤を用いることで、スチレンに加えてアクリルアミド系、アクリレート系およびアクリロニトリルの重合が可能であり、また、モノマー転化率を変化させることでビニルポリマーの鎖長を制御することができた。以上、マルチブロック型ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの新しい合成手法の開発に成功した。

第六章では、マルチブロック型ハイブリッドのタンパク質様単鎖フォールディングの形成を目指し、全ユニットがアミノ酸で構成された温度応答性マルチブロック型ハイブリッドを設計・合成した。まず、アミノ酸由来ビニルポリマーとしてアラニンおよびグリシン由来ビニルポリマー (PNAAMe, PNAGMe) およびその共重合体の生体親和性および生体材料としてのポテンシャルを検討した。表面開始 ATRP によりガラス表面にアミノ酸由来ポリマーブラシを修飾することができ、この基板は細胞培養温度において細胞接着性を示した。また、LCST 以下に冷却することで細胞をシート状に回収することができた。このことから、アミノ酸由来ビニルモノマーはリビ

ングラジカル重合法に適用可能であり、また、基板表面に固定されたアミノ酸由来ポリマーブラシは細胞毒性を示さないことが明らかとなった。さらに、ATRPによりブロック共重合が可能であり、得られた ABA 型の PNAAMe-*b*-PNAGMe-*b*-PNAAMe は溶液状態においても細胞毒性を示さなかった。これらの結果から、アミノ酸由来ビニルポリマーは高い生体親和性を有することが明らかとなった。第五章で見出した TIPNO 型環状ペプチド NMP 開始剤を用いたワンステップ合成法により、ペプチドとアミノ酸由来ビニルモノマーからなる全ユニットがアミノ酸で構成された温度応答性マルチブロック型ハイブリッドの合成に成功した。(Leu)₄ と PNAGMe からなるマルチブロック型ハイブリッドは水中で LCST 型の温度応答性を示し、昇温-降温サイクルを繰り返すことで β -シート構造形成が促進され、それに基づくナノ粒子形状への単鎖フォールディングが起こることを明らかにした。

以上、本論文では、配列制御ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドの合目的的な機能設計とその精密合成法の確立を目指し、グラフト型、トリブロック型、マルチブロック型など多様な高分子形状のハイブリッドポリマーの設計およびその合成法について明らかにした。ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドは、各構成成分の種類 (一次構造) やその組み合わせ方 (高分子形状) により無限の機能・構造設計が可能な新しいスマートバイオマテリアルであり、そのハイブリッド化の組み合わせ方は機能発現の鍵を握る重要な因子である。特に、ペプチド-ビニルポリマー・ハイブリッドによる GFP 様の蛍光発現の再現、および全ユニットがアミノ酸で構成されたハイブリッドポリマーによる単鎖フォールディング形成の実現は、合成高分子化学の究極の目標の一つである人工タンパク質開発において大変意義深く、新しい設計・合成指針を提供する。