



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Structural Analyses of Helices of Poly-Oligo(lactic acid) in Solution-State [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	本元, 貴大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13161号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/69968
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Hongen_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名 本元 貴大

審査担当者	主査	教 授	門出 健次
	副査	教 授	出村 誠
	副査	教 授	西村 紳一郎
	副査	助 教	谷口 透

学 位 論 文 題 名

Structural Analyses of Helices of Poly- Oligo(lactic acid) in Solution-State
(液相中ポリ・オリゴ乳酸のらせん構造解析)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

生体高分子であるタンパク質・核酸・糖鎖において、らせん構造は共通して見られる構造であり、その構造を通して様々な機能が発現される。そのため、生体高分子のらせん構造の解明は生体高分子の立体構造解析は生命現象を正しく理解するうえで非常に重要であり、生体機能を模倣させた新規人工高分子創製の足掛かりになると期待される。人工高分子の中でらせん構造を形成しているとされているポリ L 乳酸は生分解性を持つ人工高分子の 1 つであり、体内で分解される性質を利用して手術用縫合糸や DDS に用いられている。ポリ L 乳酸の固相状態における立体構造は X 線結晶構造解析法により明らかにされており、異なる 3 相の状態を持つポリ乳酸が、左巻きの 3_1 もしくは 3_2 らせん構造を形成している。また、左巻き 3_1 らせん構造はタンパク質の二次構造である polyproline type II(PPII)構造にも共通している。そのため、ポリ L 乳酸は類似したポリペプチド構造を形成するポリアラニンのアナログとして構造解析の比較がなされていた。しかしながら、液相中におけるポリ L 乳酸の詳細な立体構造解析法は現在まで報告されていなかった。液相中でポリ L 乳酸の立体構造が PPII 構造のような左巻きらせん構造を有していることが判明すれば、同じく PPII 構造を形成するペプチドと組み合わせることにより、PPII 構造を持つ生体分子の機能を模倣した新規人工高分子の創製に繋がると考えられる。そこで、本学位論文では液相中におけるポリ L 乳酸の詳細な立体構造解析及び、ポリ L 乳酸-ポリペプチド誘導体の二次構造解析への応用を目的とした。

2 章では液相中におけるポリ L 乳酸の立体構造解析について報告する。液相中生体高分子の立体構造を解析する手法として ECD(electronic circular dichroism)が挙げられるが、ポリ乳酸の持つエステル結合は CD の吸収強度が小さいため解析にあまり適していない。そこで、エステル結合の C=O 基に特に強い吸収を持つ IR に着目し VCD(vibrational circular dichroism)による立体構造解析を行った。構造解析にあたり、ポリ L 乳酸をモデル化合物として理論計算と当研究室で開発した VCD 励起子キラリティー法の両者を用いることによる液相中ポリエステルの立体構造解析法の確立を行うこととした。まず、ポリ L 乳酸を有機溶媒に溶かして VCD スペクトルを測定したところ、溶媒の種類・溶媒効果に関わらず低波数から高波数にかけて負から正に移る VCD スペクトルが観測された。このことから、VCD 励起子キラリティー法に基づいてポリ L 乳酸は異なる液相条件下でも安定な左巻きらせん構造を形成していることが示された。次に L 乳酸の鎖長と VCD スペクトル強度における相関性を検証するために、鎖長が 2・4・6 の L 乳酸オリゴマーを合成して VCD スペクトルを測定した。その結果、L 乳酸が 2 つ繋がったオリゴマーはポリ乳酸と比較すると強度は小さくなるものの低波数から高波数にかけて負から正に移る VCD スペク

トルが観測され、左巻きのらせん構造を形成する傾向があることを見出した。そして、鎖長が伸びるにつれてポリ L 乳酸のような VCD スペクトルに収束されていき、6 量体の VCD スペクトルとポリ L 乳酸の VCD スペクトルがほぼ同様の VCD スペクトルを示すことを明らかにした。そこで、より詳細な立体構造解析を行うために理論計算により乳酸 6 量体の計算スペクトルを算出し、実測スペクトルとの比較を行うこととした。その結果、実測・計算スペクトル両者で非常に良い一致を示しており、液相状態のオリゴマーを正しく反映されていると示唆され、その結果をポリ L 乳酸に適用可能だと考えた。以上より、ポリ L 乳酸は液相中でピッチ 3.0 Å、カルボニル基間の二面角が約-106°の 10_3 ヘリックス構造のような左巻きのらせん構造を形成しているということを明らかにした。

3 章ではポリ L 乳酸の導入によるオリゴアラニンのらせん構造の制御について報告する。PPII 構造はタンパク質・ペプチドの二次構造の 1 つであるため、PPII 構造を制御できれば人工高分子にこれらのタンパク質のような機能を付与させることが可能になる。しかしながら、タンパク質・ペプチドは同じ一次配列でも複数の二次構造を形成することがある。例えば、ペプチドの 1 つであるポリアラニンは PPII 構造を形成する一方で、別の条件では α -ヘリックス・ β -シート・ β -ストランド構造といった異なる構造もとる。そのため、何らかの方法で特定の二次構造に誘導化させる必要が求められる。そこで筆者は左巻きのらせん構造を形成しているオリゴ L 乳酸をオリゴアラニンに結合させることで、アラニン鎖が乳酸の左巻きのらせん構造の影響を受けて PPII 構造のような左巻きのらせん構造に誘導されるのではないかと考えた。二次構造解析にあたり、VCD とペプチドの二次構造解析に用いられる ECD(electronic circular dichroism)を利用し、その両者のスペクトルを比較することでオリゴアラニンの二次構造解析を行うこととした。始めに、アラニン 6 量体の ECD スペクトルを測定したところ、低波長に移るにつれて負の吸収が増大するスペクトルが観測された。高波長から低波長にかけて正から負に移る PPII 構造特有のスペクトルが観測されなかったことから、アラニン 6 量体は特定の二次構造をもたないことが示された。次にアラニン 6 量体のうち、N 末端側または C 末端側の 3 残基のアラニンを L 乳酸に置き換えた化合物を合成した。まず、それら化合物の VCD スペクトルを測定するとアミド I 領域のカルボニル基において低波数から高波数にかけて負から正に移る VCD スペクトルが観測され、アラニン鎖が左巻きのらせん構造を形成することが示唆された。続いて、ECD スペクトルを測定すると、217nm で正の極大値、193nm で負の極小値をとる PPII 構造特有のスペクトルが観測された。両スペクトルの結果から、アラニン 3 残基が L 乳酸の影響を受けて PPII 構造のような左巻きのらせん構造を形成していることが明らかにした。その一方で、鏡像異性体の D 乳酸に置換した誘導体の ECD スペクトルは 217nm で正の極大値を持つスペクトルが観測されず、アラニン鎖は PPII を形成していないことが判明した。このことから、L 乳酸 3 置換誘導体の左巻きのらせん構造がアラニンの立体構造に伝播され、アラニン鎖の二次構造が PPII 構造のような左巻きのらせん構造を形成することが示唆された。また、生体応用への展開のために水相への溶解を検討したが乳酸-アラニン 6 量体は溶けなかった。今後、生体への利用を実現させるためにも構造を変更して検討する必要があると考えられる。

本研究を通して、VCD によりポリ L 乳酸の詳細ならせん構造解析を行うことに成功し VCD の適用可能な化合物の範囲をポリエステルにまで拡大させたこと、又、L 乳酸の左巻きのらせん構造を導入させることによってアラニン鎖の立体構造を PPII 構造のような左巻きのらせん構造に誘導し制御させることに成功した。

これを要するに、著者は、ポリ乳酸についての構造の新知見を得たものであり、生体高分子に対してその立体構造解析に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。