

九州工業大学大学院  
博士学位論文

界面活性剤と生体関連物質との相互作用に関する研究

2005 年 3 月

栞原 順子

九州工業大学附属図書館



\*0010607976\*

# 目次

<b>第1章 序論</b>	1
1・1 本研究の背景	1
1・2 本研究の目的と方針	4
1・3 本論文の構成	5
参考文献	6
<b>第2章 リシンを位置変化したデカペプチド界面活性剤との相互作用</b>	9
2・1 はじめに	9
2・2 実験	11
2・2・1 デカペプチドの設計	11
2・2・2 ペプチド合成および精製	13
2・2・3 界面活性剤溶液の調製	20
2・2・4 CD スペクトル測定	22
2・2・5 チオフラビンTによるアミロイド形成能評価	22
2・2・6 CF-leakage 活性測定	24
2・2・7 透過型電子顕微鏡観察	26
2・3 結果および考察	27
2・3・1 デカペプチドの CD スペクトル変化	27
2・3・2 アミロイド形成能評価	34
2・3・3 透過型電子顕微鏡観察	38
2・3・4 リポソームに対する CF-leakage 能評価	40
2・4 結言	44
参考文献	45
<b>第3章 多様な疎水性アミノ酸をもつデカペプチドと界面活性剤との相互作用</b>	49
3・1 はじめに	49
3・2 実験	51
3・2・1 デカペプチドの設計	51
3・2・2 アミノ酸合成	52
3・2・3 ペプチド合成および精製	54
3・2・4 界面活性剤溶液の調製	59
3・2・5 CD スペクトル測定	59
3・2・6 チオフラビン T 蛍光測定	60
3・2・7 CF-leakage 活性測定	60
3・3 結果および考察	61
3・3・1 水およびメタノール系でのデカペプチドの CD スペクトル	61
3・3・2 ミセル系でのデカペプチドの CD スペクトル	64



3・3・3	デカペプチドのコンホメーション変化と Hydrophobic scale との関係	66
3・3・4	デカペプチドのコンホメーションに与えるミセル表面電荷の影響	68
3・3・5	デカペプチドのコンホメーションに与えるミセル濃度の影響	70
3・3・6	様々な疎水性アミノ酸を含むデカペプチドの CF-leakage 活性	74
3・3・7	様々な疎水性アミノ酸を含むデカペプチドの会合特性	78
3・4	結言	80
	参考文献	81
<b>第4章</b>	<b>ノルロイシンを位置変化したデカペプチドと界面活性剤との相互作用</b>	<b>83</b>
4・1	はじめに	83
4・2	実験	85
4・2・1	デカペプチドの設計	85
4・2・2	デカペプチドの合成	86
4・2・3	ミセルおよびリポソーム溶液の調製	91
4・2・4	CD スペクトル測定	91
4・2・5	チオフラビンTによるアミロイド形成能評価	92
4・2・6	CF-leakage 活性測定	92
4・2・7	透過型電子顕微鏡観察	93
4・3	結果および考察	94
4・3・1	デカペプチドの CD スペクトル変化	94
4・3・2	チオフラビンTによるアミロイド形成能評	100
4・3・3	アミロイド様線維の TEM 観察	102
4・3・4	ミセル系における $\beta$ -シート構造のFTIRスペクトル解析	104
4・3・5	リポソームに対する CF-leakage 能評価	106
4・3・6	デカペプチド 8X4K の会合挙動	112
4・3・7	デカペプチド 8X4K の温度変化による会合挙動	114
4・4	結言	117
	参考文献	118
<b>第5章</b>	<b>円偏光二色性による <i>n</i>-decanoyl-<i>N</i>-methylgulcamide と添加物との相互作用に関する研究</b>	<b>119</b>
5・1	はじめに	119
5・2	実験	121
5・2・1	MEGA-10 および界面活性剤の合成・精製	121
5・2・2	サンプル溶液の調製	125
5・2・3	CD スペクトル測定	125
5・3	結果および考察	126
5・3・1	MEGA-10 の CD スペクトル	126
5・3・2	CD スペクトルの添加物による影響	128
5・3・3	添加物の親水基電荷の影響	130
5・3・4	添加物の親水基イオン種の影響	132

5・3・5	アンモニウム基の影響	134
5・4	結言	137
	参考文献	138
<b>第6章</b>	<b>結論</b>	<b>139</b>
6・1	本研究のまとめ	139
6・2	今後の課題	140
	論文目録	141
	略号	143
	謝辞	145



# 第1章 序論

## 1.1 本研究の背景

分子や粒子間には、様々な相互作用（静電、溶媒和、疎水性）が働くことが知られている。このような相互作用を利用した技術は、医薬品、化粧品、食品、工業製品などのあらゆる分野で応用されている。また、多くの生体系では静電相互作用や疎水性相互作用などが大切な役割を担っている。

一般的に、分子間相互作用のなかでも疎水性相互作用は、タンパク質の立体構造形成やリガンドへの結合能に深く関与している (1, 2)。例えば、水溶性タンパク質の炭化水素基（疎水基）は、ほとんどがタンパク質構造の内部に集合している(3)。また、疎水性相互作用が酵素反応の重要なファクターとなる場合もある(4)。

では、疎水性相互作用とはどのようなものか。水中に露呈した炭化水素鎖を例に挙げると、まず、水分子の水素結合からなる網目構造に炭化水素鎖が入ることによって、元から存在していた網目構造の水素結合は一旦切断される。通常、炭化水素鎖は水分子と水素結合しないので、水との相互作用は弱くなる。炭化水素鎖周辺の水分子は、一旦破壊された水素結合を修復しようとするため、より秩序化した構造をとるようになる。水素結合の数はほとんど変化しないのでエンタルピー変化はほとんど無い。しかし、炭化水素鎖周辺の水分子が秩序化した構造 (iceberg) を形成するため、著しくエントロピーが減少し、自由エネルギーが増大する。従って、この状態を解消するためには、秩序化された水の構造をバラバラにする必要がある。すなわち、炭化水素鎖同士が互いに会合すればエントロピーが増大し、自由エネルギーは負になる。実際に、疎水性相互作用とみられる炭素鎖長はブチル基より長い炭化水素鎖で出現することが、ミセルの体積変化や NMR 測定より明らかとなっている (5, 6)。

このように、疎水性相互作用は Gibbs エネルギーを最小にする作用であり、ミセルやベシクル形成、水溶性タンパク質の高次構造形成などの様々な現象と深いつながりがある。

一方、静電相互作用は、荷電を持つ化学種の固体内で生じる作用であり、主にミセルの対イオン結合 (7) や、タンパク質の塩橋形成 (8) に関与している。

高分子量のタンパク質と比較すると、アミノ酸残基数 30~40 程度のペプチドの場合、アミノ酸側鎖の物性がコンホメーションに大きな影響を与える。例えば、脳内にはアミロイド $\beta$ ペプチド ( $A\beta$ ) とよばれる約 40 残基のペプチドが存在する。この  $A\beta$  は、様々な要因によって $\beta$ -シート構造を形成し、さらに会合を繰り返すことにより、不溶性の繊維状会合体「アミロイド」を形成する。このアミロイド線維は、アルツハイマー病患者の脳に堆積する。 $A\beta$  の N-末端側は親水性アミノ酸が多く、C-末端側は疎水性アミノ酸が多い。このような親水性アミノ酸と疎水性アミノ酸の偏在が、隣接する側鎖間の静電あるいは疎水性相互作用の原因となることが考えられる。さらに、規則的に並んだ  $A\beta$  は  $\beta$ -シート構造を形成し、遂にアミロイド線維の伸長に及ぶ (9, 10)。この不溶化したアミロイド線維が脳内の海馬や大脳皮質へ堆積することで神経細胞が死滅し、アルツハイマー病が発症すると考えられている (11)。これまで  $A\beta$  に限らず、 $\beta$ -シートを形成するペプチドは、側鎖間の疎水性相互作用と深く関わっていることが指摘されている。

一方、 $\alpha$ -ヘリックス構造形成は、主鎖アミノ酸側鎖の溶媒和相互作用に大きく影響されると考えられている (12)。現在に至るまで、タンパク質のアミノ酸配列から $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シート等の二次構造を予測する方法として、Chou-Fasman 法 (13) や Gibrat-Garinier-Robson 法 (14) など様々な手法が報告されている。この手法を応用すれば、親水性および疎水性アミノ酸の配列変化によりペプチドの立体構造を適度にコントロールすることが出来るだろう (15, 16, 17)。

しかし、細胞膜近傍や細胞間質に存在するタンパク質は、様々な相互作用

が生じるため、膜貫通やチャネル形成などが行われる。例えば、アルギニンリッチペプチドは僅か8残基程度で細胞膜を貫通する(18)。また、ハチ毒のメリチンは塩基性アミノ酸リッチな配列を持ち、イオンチャネルを形成する(19)。さらに他の膜貫通型ペプチドには、疎水性アミノ酸が多く存在する。

このように、タンパク質やペプチドは、様々な環境変化によって、分子間あるいは分子内相互作用を生じ、構造を変えてゆく。ペプチドのコンホメーション変化と分子間相互作用の関係について知ることは、体内で起こる様々な現象を解明するための足掛かりになるのかもしれない。

## 1・2 本研究の目的と方針

タンパク質は、生理的条件下においては、アミノ酸配列に従った特定のネイティブ構造を形成すると考えられてきた。しかし、アミロイド線維形成のように何らかの原因によりネイティブ構造は崩壊し、本来の姿とはまったく別の構造をとる。このような、奇異なコンホメーション変化は、細胞膜近傍あるいは細胞間質で起こっている場合が多くみられる。タンパク質（ペプチド）と細胞膜間の相互作用を考慮せず、タンパク質（ペプチド）のコンホメーションについて議論するのはそう容易なことではない。また、現在に至っても、コンピュータ上の理論計算では、細胞膜とタンパク質間の相互作用についての解析は困難を要する状況である。

実際に、細胞内で起こる現象を直接観察するのは難しい。また、生細胞を使用した実験系は機構が複雑であるため、分子レベルでの解析は困難である。よって、分子レベルで起こる相互作用について明らかにするためには、よりシンプルなモデル系での実験が望まれる。

以上の観点から、ペプチド-細胞膜間相互作用の研究を展開する上で、よりシンプルなモデルペプチド、および球状のミセルやリポソームを擬似細胞モデルとすることが必要不可欠であった。もし、タンパク質のような巨大分子であれば、構成するアミノ酸の種類が増え、必然と分子間で相互作用するサイトが増えるからである。また、細胞モデルとしてミセルやリポソームを選んだのは、複雑な細胞内外の動的挙動を理解するための基礎的データが得られることを期待したからである。

本研究では、ペプチド-ミセル間、ペプチド-リポソーム間、糖鎖-ミセル間に生じる様々な相互作用と立体構造との関係について調べることを目的とした。

### 1・3 本論文の構成

第1章序論では、本論文の研究背景となる分子間相互作用の種類および定義を紹介した。そして、疎水性相互作用が関係するタンパク質やペプチドの構造変化、様々な現象について述べた。次に、分子間あるいは分子内相互作用によって細胞内外での構造変化が生じることに言及し、今後取り組む課題の目的について述べた。

第2章では、まず、タンパク質の *de novo design* に基づき設計したモデルペプチド、および、細胞モデルとしてのミセルやリポソームの利点について述べる。分光学的手法による測定データをもとに、リシンスキャンを施したペプチドの側鎖とミセルとの相互作用について検証する。また、相互作用と構造変化との関連性について考察する。リポソーム系も同様に評価し、考察する。

第3章では、モデルペプチドへ導入した疎水性アミノ酸の違いとミセル系で立体構造が転移する傾向との関連性について述べる。また、ミセル表面の荷電や濃度がペプチドの構造に影響を与えた結果について考察する。

第4章では、第2章で用いたアミノ酸スキャンの手法を応用し、疎水性アミノ酸の最適化を行った。ミセル系では、顕著な構造転移が見出され、アミロイド様線維が観察された結果について述べる。また、リポソームに対する leakage 活性とペプチド多量体形成、立体構造との関連性について考察する。

第5章では、糖結合型活性剤と添加物の官能基との相互作用について述べる。糖結合型活性剤の親水基部位は光学活性であり、円二色性を示す。添加物の官能基に対して特異的に現れた相互作用について結果を整理し、新たな知見について述べる。

第6章結論では、第2章、第3章、第4章、第5章で述べた結果について総括し、本研究の成果と今後の課題についてまとめる。



## 参考文献

1. C.A. Fierke, T.L. Calderone and J.F. Krebs, *Biochemistry*, Vol. **30**, 11054-11063 (1991).
2. D.K. Tadaki and S.K. Niyogi, *J. Biol. Chem.*, Vol. **268**, 10114-10119 (1993).
3. C. Lawrence, I. Auger and C. Mannella, *Proteins*, Vol. **2**, 153-161 (1987).
4. R.E. Beal, D. Toscano-Cantaffa, P. Young, M. Rechsteiner and C. M. Pickart, *Biochemistry*, Vol. **37**, 2925-2934 (1998).
5. H. Akisada, S. Kinoshita and H. Wakita, *Colloids and Surfaces*, Vol. **66**, 121-127 (1992).
6. H. Akisada, M. Ishihara, M. Nishi, M. Higake, S. Ishimaru and J. Nishida, *Colloid. Polym. Sci.*, Vol. **281**, 993-997 (2003).
7. B.W. Williamson and I.W. Percy-Robb, *Biochem. J.*, Vol. **181**, 61-66 (1979).
8. D. Sahal and P. Balaram, *Biochemistry*, Vol. **25**, 6004-6013 (1986).
9. O.N. Antzutkin, R.D. Leapman, J.J. Balbach and R. Tycko, *Biochemistry*, Vol. **41**, 15436-15450 (2002).
10. R. Tycko, *Biochemistry*, Vol. **42**, 3151-3159 (2003).
11. C. Haass and D.J. Selkoe, *Nature*, Vol. **391**, 339-340 (1998).
12. J.A. Vila, D.R. Ripoll and H.A. Scheraga, *Biopolymers*, Vol. **58**, 235-246 (2001).
13. P.Y. Chou and G.D. Fasman, *Biochemistry*, Vol. **13**, 211-222 (1974).
14. J.F. Gibrat, B. Robson and J. Garnier, *Biochemistry*, Vol. **30**, 1578-1586 (1991).
15. H. Mihara, J. Hayashida, H. Hasegawa, H.I. Ogawa, T. Fujimoto and N. Nishino, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 517-522 (1997).
16. S. Futaki, M. Aoki, T. Ishikawa, F. Kondo, T. Asahara, M. Niwa, Y. Nakaya, T. Yagami and K. Kitagawa, *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. **7**, 187-192 (1999).
17. T. Kiyota, S. Lee and G. Sugihara, *Biochemistry*, Vol. **35**, 13196-13204 (1996).

18. S. Futaki, W. Ohashi, T. Suzuki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda, H. Harashima and Y. Sugiura, *Bioconjug. Chem.*, Vol. **12**, 1005-1011 (2001).
19. M.T. Tosteson and D.C. Tosteson, *Biophys. J.*, Vol. **36**, 109-116 (1981).



## 第2章 リシンを位置変化したデカペプチドと界面活性剤との相互作用

### 2.1 はじめに

タンパク質・ペプチドは 20 種類のアミノ酸がそれぞれ縮合した高分子であり、固有の立体構造と機能を持つ。この立体構造は、アミノ酸配列により決定されると考えられている。しかし、現在のところ、アミノ酸配列と立体構造、そして機能の関係はほとんど明らかにされていない。最近では、プリオン病に代表されるように、アミノ酸配列から立体構造が一義的に定まらないという現象が多数報告されている (1, 2, 3)。

$\alpha$ -ヘリックス構造の場合、Chou-Fasman 法の二次構造頻出パラメータによると、側鎖にメチル基を持つアラニンの出現頻度が高い (4)。Scheraga をはじめ多くの研究者らは、アラニンリッチペプチドについて分子シミュレーションによる立体構造の研究を行っており (5, 6, 7)、計算化学の領域において、アラニンリッチペプチドの構造に関する研究報告は特に多い。実在するタンパク質のなかで、アラニン残基はヘリックス部位で多く見られ、 $\beta$ -シート部位に多数偏在することはないと考えられてきた。しかしながら、最近、Inouye らは X 線回折によって、ハムスタープリオンタンパクの 113-120 番目のアラニンリッチ部位 AGAAAAGA が、計算で予期されたような  $\alpha$ -ヘリックス構造でなく、 $\beta$ -シート構造であったことを明らかにした (8)。ヒトプリオンと同様にハムスタープリオンは、正常型 PrPc が蛋白分解酵素に抵抗性の異常型 PrPsc に変わり、神経細胞内で凝集・蓄積し、空胞変性を起こす (9, 10)。このようなタンパク質の変性は、アミノ酸変異によるものでなく、立体構造が  $\alpha$ -ヘリックスから  $\beta$ -シートへ転移し、凝集するためであると考えられている。現在では、正常型から異常型への変換、および異常型が増大するメカニズムに関するモデルがいくつか提唱されているが、直接的原因、理由については未だ明らかでない。Inouye らは、初期の凝集過程で見られる核形成について、

正常型 PrPc と異常型 PrPsc のアラニンリッチ部位間の水素結合が原因であることを明らかにした(11)。また、Nussinov らは、ハムスタープリオンタンパク由来のオクタペプチド AGAAAAGA に関して、6~8 量体が最安定状態であることを、分子シミュレーション実験より明らかにした(7)。アラニンリッチペプチドの多量体形成は、アラニン側鎖のメチル基が高密度で凝集するので炭化水素鎖と同じような性質を持つと考えられる。実際に、体内では、様々な分子がうごめいており、常に分子間で静電相互作用や疎水性相互作用が起こっている。したがって、分子間相互作用とペプチドの立体構造との関係を調べるのは重要であると考えられる。

著者は、本章で、イオン性ミセル存在下、特定の立体構造を形成しうるアラニンリッチペプチドに焦点を当て、アミノ酸配列と立体構造との関係を明らかにする。ミセル表面荷電やミセル内疎水領域との相互作用によって、特定の二次構造が形成されることを期待し、ペプチド配列中にイオン性アミノ酸や疎水性アミノ酸を導入する。そのために、疎水性アミノ酸として、側鎖に *n*-butyl 基をもつノルロイシンを選んだ。理由は、炭化水素鎖同士の疎水性相互作用は *n*-butyl 基以上で有効であるという Akisada らの実験結果に基づくものである(12, 13)。また、イオン性アミノ酸として、側鎖にブチルアンモニウム基をもつリシンを選んだ。リシンは、陰イオン性ミセル存在下、リシン側鎖のアンモニウム基 ( $\epsilon\text{-NH}_3^+$ ) がミセル表面と静電相互作用すると考えられる。

水溶液中での物性評価は、主に分光学的手法で行う。円二色性 (CD) スペクトルからペプチドの立体構造を、また、蛍光プローブを用いた蛍光測定からペプチドの会合特性を評価することができる。一方、会合体の形態観察は、透過型電子顕微鏡 (TEM) が有用である。また、ミセルの他に、酸性リポソームを荷電粒子として使用し、ペプチドとの相互作用についても評価した。

## 2・2 実験

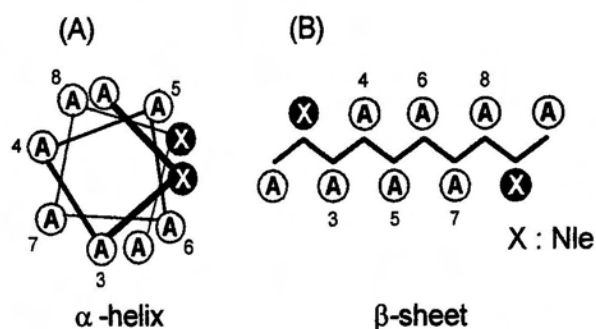
### 2・2・1 デカペプチドの設計

ペプチドの設計は、機能性の付加や、立体構造構築のために重要なプロセスである。タンパク質・ペプチドが形成する二次構造のなかで、 $\beta$ -シート構造は、主として主鎖アミド基の分子間水素結合によって形成される。一方、 $\alpha$ -ヘリックス構造は、アミド基の分子内水素結合によって主鎖骨格が形成される。ペプチド二次構造の *de novo design* (14) によると $\alpha$ -ヘリックス構造は通常 15 残基程度のアミノ酸残基数が必要とされる。これは、 $\alpha$ -ヘリックス構造には、1 回転あたり 3.5 残基のアミノ酸が必要であるからである。しかし、ペプチド両末端の 2~3 残基は分子内水素結合に関与することができない (15)。そのために、多くの残基数が必要とされるのである。そこで、著者は、ミセルとペプチドとの分子間相互作用を利用し、短いペプチドで二次構造形成を可能にすることを考えた。イオン性アミノ酸のリシンや疎水性アミノ酸のノルロイシンをペプチドに導入し、荷電を帯びたミセル表面とペプチドとの $\alpha$ -ヘリックス形成や $\beta$ -シート形成を試みた。

一般的なミセルの粒径 (5~10 nm) よりペプチド分子が小さくなるように、10 個のアミノ酸からなるデカペプチドを設計した。デカペプチドの長さは、条件次第で $\beta$ -構造、あるいは $\alpha$ -ヘリックス構造をとることができる。 $\beta$ -構造、または $\alpha$ -ヘリックス構造をとるときの理論上の長さは、それぞれ約 3.5 nm および 1.5 nm である。デカペプチドにはアラニン (Ala; A), ノルロイシン (Nle; X), リシン (Lys; K) を使用した。疎水性アミノ酸のノルロイシンは、 $\alpha$ -ヘリックス形成時に同じ向きになるように 2 および 9 残基目に導入した (Fig. 2. 1-A)。一方、 $\beta$ -構造形成時は、ノルロイシン側鎖は互いにシート構造の反対に位置する (Fig. 2. 1-B)。

アミノ酸の位置と立体構造との関係について明らかにするために、ノルロイシンを 2 および 9 残基目に固定してリシンの位置をそれぞれ 3~8 残基目ま

で変えた（リシンスキャンした）デカペプチドを6種類合成した。合成した全てのアミノ酸配列を **Table 2. 1** に示す。



**Fig. 2. 1** Helical wheel (A) and  $\beta$ -structure (B) representations of Lys scanning peptides. Lys is substituted for alanine of the number of 3 to 8.

**Table 2. 1** Amino acid sequences of Lys scanning decapeptides.

Abbreviation	Amino acid sequence	Position of Lys <sup>a</sup>
2-9X3K	AXKAAAAAXA	3
2-9X4K	AXAKAAAAXA	4
2-9X5K	AXAAKAAAXA	5
2-9X6K	AXAAAKAAXA	6
2-9X7K	AXAAAAKAXA	7
2-9X8K	AXAAAAAKXA	8

<sup>a</sup> The substituted position from Ala to Lys in Figure 2. 1.

## 2・2・2 ペプチド合成および精製

アミノ酸誘導体、合成試薬は渡辺化学工業（株）および和光純薬工業（株）より購入した。ペプチド合成は Wang 樹脂を用いた Fmoc 固相合成法で行った（16）。以下にペプチド固相合成の一般的な合成手順を記す。

### ペプチド固相合成・精製のプロトコル

#### ① 第一アミノ酸(Fmoc アミノ酸)の Wang-resin への導入

ベッセルに Wang-resin 約 500 mg (0.35 mmol) および DCM 4 mL を加え、樹脂を膨潤させる。溶媒を吸引後、樹脂を DMF (4 mL, 3 回) で洗浄する。ベッセルに Fmoc-アミノ酸 X mg (1.05 mmol), DMAP 11 mg (0.105 mmol) を入れ、DMF 4 mL を加える。さらに、DCC 217 mg +  $\alpha$  (1.05 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌する。反応溶液を吸引後、DMF (3 mL, 3 回), 50% DCM / EtOH (3 mL, 3 回), DCM (3 mL, 3 回), DMF (3 mL, 3 回) で洗浄する。未反応アミノ基保護のために DMF 4 mL, 無水酢酸 0.35 mL (3.5 mmol), DIEA 0.64 mL (3.5 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌する。DMF (3 mL, 4 回), DCM (3 mL, 4 回) で樹脂を洗浄した後、減圧乾燥する。

#### ② アミノ酸導入量の算出

正確に秤量した Fmoc-アミノ酸-resin (15 ~ 20 mg) をサンプル管に入れ、20% ピペリジン / DMF 2 mL を加える。室温で 20 分間静置する。その後、ホールピペットで 0.5 mL とり、DMF で 50 倍に希釈する。(希釈率は導入量と秤量値による) 紫外可視分光光度計で 301 nm (Fmoc-基のモル吸光係数は 7800) における吸光度 (A) を求める。樹脂重量当たりの導入率は以下の通りである。

$$\text{導入率 [mmol / g resin]} = (\text{Abs.} \times 100) / (7800 \times \text{樹脂重量 [mg]})$$



### ③ ペプチド鎖の伸長 [0.33 mmol スケールの場合]

プロトコル②で定量した Fmoc-アミノ酸-resin (0.33 mmol) をベッセルに入れ、DCM 3 mL で膨潤させる。DMF で溶媒置換した後、20% ピペリジン / DMF (3 mL, 1 回) で洗浄後、再び 20% ピペリジン / DMF を加えて、30 分間振とうする。溶媒を吸引後、DMF (3 mL, 5 回) で洗浄する。少量の樹脂をテストチューブにとり、Kaiser Test (プロトコル④) を行う。陽性である事を確認する (Fmoc 基除去の終了)。DMF 3 mL を加えた Fmoc-アミノ酸 (X mg, 1 mmol), HBTU (1 mmol), HOBt · H<sub>2</sub>O (3 mmol) を DIEA (5 mmol) と混合し、ベッセルに移して室温で 30 分間振とうする。溶媒を吸引後、樹脂を DMF (3 mL, 3 回), DCM (3 mL, 5 回) で洗浄する。少量の樹脂をテストチューブにとり、Kaiser Test (プロトコル④) を行う。陰性である事を確認する (カップリング終了)。以下、上記操作を繰り返し、ペプチド鎖の伸長を行う。

### ④ Kaiser Test

テストチューブに少量の樹脂を入れ、0.2 mM KCN / ピリジン, 0.3 M ニンヒドリン / EtOH, 43 M フェノール / EtOH の各試薬を 1 滴加える。攪拌後、沸騰水で 2 分間加熱する。Fmoc 基の除去後は深青色 (陽性), カップリング後は薄黄色 (陰性) になる事を確認する。

### ⑤ 樹脂からの切り出し・脱保護

プロトコル④の操作で得られた保護ペプチド樹脂を 50 mL ナス型フラスコに入れる。TFA 2.7 mL, H<sub>2</sub>O 0.3 mL を加えて、室温でゆっくりと攪拌する。樹脂を含む溶液を濾過し、濾液を回収する。さらに、TFA (0.5 mL, 4 回) で樹脂を洗浄し、洗浄液を回収する (樹脂からのペプチドの切り出し、及び脱保護の終了)。冷却下、濾液を減圧濃縮し、ジエチルエーテル / 石油エーテルで固化した後、減圧乾燥を行う (粗生成物)。

### ⑥ 逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) によるペプチド精製

粗生成物を溶媒に溶かし、RP-HPLC (UV 検出波長 : 220 nm) および分取用 ODS カラムを用いて、分取を行う。分取された溶液を減圧濃縮後、凍結乾燥する。

### H-Ala-Nle-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (2-9X3K) の合成・精製

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.56 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (589 mg, 0.56 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Nle-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (314 mg, 0.285 mmol, 収率 86%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 14.8 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### **H-Ala-Nle-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (2-9X4K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は, 0.68 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (485 mg, 0.68 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い, 各アミノ酸の脱保護, および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に, プロトコル⑤に従い, 得られた Fmoc-Ala-Nle-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後, エーテル/ジエチルエーテルで固化し, 白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (325 mg, 0.338 mmol, 収率 100%) を得た。次に, プロトコル⑥に従い, RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 11% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し, 凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 13.7 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### **H-Ala-Nle-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (2-9X5K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は, 0.55 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (600 mg, 0.55 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), および Fmoc-Lys(Boc)-OH (469

mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Nle-Ala-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (329 mg, 0.300 mmol, 収率 91%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 15.9 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### **H-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (2-9X6K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.55 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (589 mg, 0.56 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (320 mg, 0.291 mmol, 収率 88%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液

の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA)とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 13.4 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### **H-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Nle-Ala-OH (2-9X7K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.57 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (579 mg, 0.57 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Ala-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Nle-Ala-OH (326 mg, 0.296 mmol, 収率 90%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 15.6 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### **H-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Nle-Ala-OH (2-9X8K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は, 0.57 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (579 mg, 0.57 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い, 各アミノ酸の脱保護, および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に, プロトコル⑤に従い, 得られた Fmoc-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後, エーテル/ジエチルエーテルで固化し, 白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Nle-Ala-OH (308 mg, 0.280 mmol, 収率 85%) を得た。次に, プロトコル⑥に従い, RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し, 凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 15.4 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### 2・2・3 界面活性剤溶液の調製

#### 界面活性剤の合成および溶液調製

陰イオン性界面活性剤 Ammonium tetradecanesulfonate (C14SA) の合成は、1-アルカンスルホン酸銀と塩化アンモニウムをメタノール中で加熱還流する複分解法 (17) で行った。副反応物の塩化銀をガラスフィルターで除去した後、濾液を濃縮し、白色結晶の粗生成物を得た。粗生成物は、エタノール-アセトンによって5回再結晶を繰り返し、目的化合物を得た。

陰イオン性界面活性剤 C14SA の臨界ミセル濃度 (CMC) は 2.36 mM (18) である。加えるペプチド濃度は 1 mM であるため、活性剤濃度は活性剤モノマーの影響が少ない高濃度域に設定した。ここでの活性剤モノマーとは、ミセル形成に関与していないバルク層の活性剤分子を指す。すなわち、CD スペクトル測定、および蛍光測定時の C14SA 濃度を 17 mM とした。サンプル溶液の調製には、二次蒸留水を使用した。

#### リポソーム溶液の調製

リポソームの脂質として、市販品である卵黄フォスファチジルコリン (EYPC, シグマ社製) および、卵黄フォスファチジルグリセロール (EYPG, シグマ社製) を使用し、混合比を EYPC/EYPG (3/1) とした。

下記のプロトコル(a), (b) および (c) に従い、leakage 測定用の酸性リポソームを調製した。その結果、脂質濃度 [lipid] は 149 mg / dL であった。

#### (a) 酸性リポソーム調製のプロトコル

CD スペクトル測定用のリポソーム Small unilamellar vesicle (SUV) 調製は次の手順で行う。

まず、20 mL 梨型フラスコに EYPC/CH<sub>3</sub>Cl (56 μL, 100 mg/mL), および EYPG/CH<sub>3</sub>Cl (190 μL, 10 mg/mL)を加え、さらに CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (2/1, 2 mL)を加

え、溶解させる。窒素ガスで溶媒を除去しながら、脂質をフラスコ内壁に均一になるように固定化する。溶媒を完全に除去するため、6 時間以上、減圧乾燥を行う。これに 20 mM TES/150 mM NaCl 緩衝溶液 (pH 7.4) を 10 mL 加え、室温にてチューブミキサーで 30 分間処理する。さらに、窒素雰囲気下、ホモジナイザー (Sonifier 250 ; BRANSON 社製) で 25°C 下、30 分間超音波処理を行う。得られた SUV を氷浴中で 30 分間放置後、CD スペクトル測定に使用する。

### **(b) 蛍光色素内包リポソーム調製のプロトコル**

leakage 活性テストには、蛍光色素である 5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) を内水相に取り込ませたリポソームを使用する (19, 20)。調製の手順を以下に示す。まず、10 mL 梨型フラスコに EYPC/CH<sub>3</sub>Cl (150 μL, 100 mg/mL), および EYPG/CH<sub>3</sub>Cl (500 μL, 10 mg/mL) を混合し、CH<sub>3</sub>Cl/MeOH (2/1, 2 mL) でよく溶解させる。窒素ガスで溶媒を除去し、脂質をフラスコ内壁に均一になるように固定化する。溶媒を完全に除去するため、減圧乾燥を 6 時間以上行う。さらに、CF (75 mg, 200 μmol) を含む 20 mM TES/150 mM NaCl 緩衝溶液 (pH 7.4) を 2 mL 加え、チューブミキサーを使用して 25°C 下 30 分間処理する。さらに、ホモジナイザーを用いて窒素ガス雰囲気下、25°C で 30 分間、超音波処理を行う。その後、懸濁溶液をゲル濾過 (Sephacryl™ 4B, Amersham bioscience 社製, 1.5 x 45 cm) 処理すると、CF を内包した Large unilamellar vesicle (LUV) が得られる。CF 内包リポソームを含む分画を氷浴中で 30 分間放置後、leakage 活性テストに使用する。

### **(c) リン脂質定量のプロトコル**

脂質濃度はリン脂質テストキット (和光純薬株式会社製) を用いて定量する。まず、試験管に試料 0.1 mL を正確にとり、5%トリクロロ酢酸 3.0 mL を加える。それを、2500 r.p.m. にて 5 分間、遠心分離操作を行った後、上清を捨てる。さらに、硫酸 0.4 mL を正確に加え、沸騰水浴中約 10 分間加熱する。



振りながら過マンガン酸カリウムを含む酸化剤 2.0 mL を加える。付属のガラス球を試験管口にのせ、沸騰水浴中、約 30 分間加熱後、室温に約 10 分間放置する。12 mmol/L モリブデン酸アンモニウム溶液（脱色溶液）を 2.0 mL 加え、ボルテックスミキサーで混合する。亜硫酸ナトリウムとヒドロキノンを含む発色試液を 0.5 mL を加え、良く混合する。37°C に恒温設定した水浴中で約 20 分間加温し、流水冷却下で約 5 分間放冷する。その溶液を、1 cm 角型石英セルに入れて吸光度測定を行う。リン脂質濃度は以下に示す式から算出する。

$$\text{リン脂質濃度 [lipid]} = 600 \cdot E_s/E_{\text{std}} \text{ (mg / dL)}$$

#### 2・2・4 CD スペクトル測定

CD スペクトル測定は円二色性分散計（J-720, 日本分光株式会社製）を使用して 30°C 下で行った。光路長 1 または 0.1 mm 円筒型石英セルを使用した。ミセル系での CD スペクトル測定時のペプチド濃度は 1 mM とし、リポソーム系では 150  $\mu$ M とした。得られたデータは平均残基モル楕円率  $[\theta]$  に換算した。

#### 2・2・5 チオフラビンTによるアミロイド形成能評価

##### チオフラビンTを用いたアミロイド形成能評価法の概要

1993 年 Levine らは、溶液中のアミロイド形成性ペプチドの会合を調べる有用な試薬としてチオフラビンT (ThT) を報告した (21)。ThT は、アミロイド様線維を検出する蛍光プローブである。アミロイド様線維が形成されると、ThT の蛍光強度が増大するため、定性に限らず、定量性を示す蛍光プローブとして多用されている (22)。ThT は、ペプチドの線維状会合体には結合する

が、モノマーやオリゴマーには結合しない (23)。ThT の構造式を Fig. 2. 2 に示す。

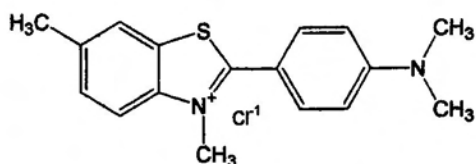


Fig. 2. 2 Structure of thioflavine T.

また、Fig. 2. 3 で示されるように、アミロイド線維が形成されていれば、435 nm の励起波長に対し、482 nm 付近に極大を持つ蛍光スペクトルが出現する。

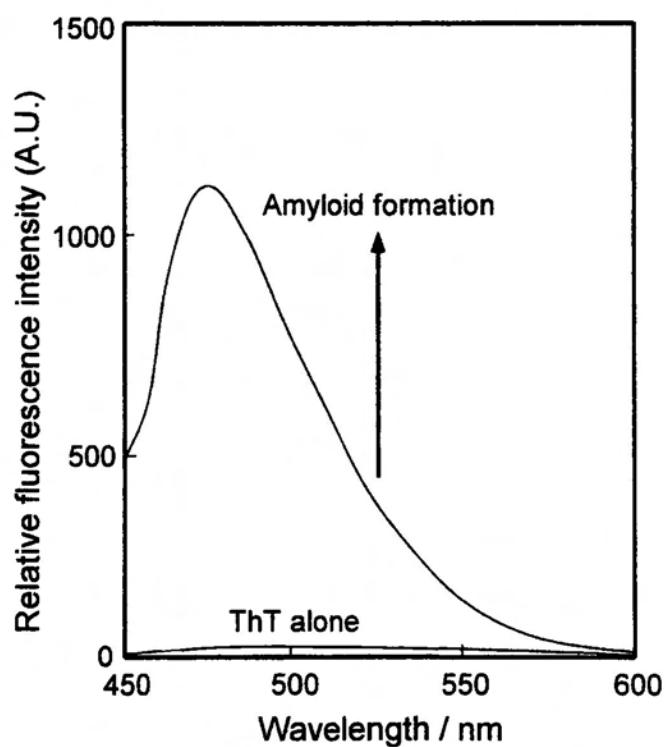


Fig. 2. 3 Fluorescence spectra of ThT in the presence and absence of aggregated amyloid peptides.

### チオフラビン T 蛍光測定

測定サンプルの調製は以下の手順で行った。サンプル管にペプチドストック溶液 (15 mM, 200  $\mu$ L) と HCl 水溶液 (80 mM, 150  $\mu$ L) を加え、混合した。これに、C14SA ストック溶液 (20 mM, 1.6 mL) および、ThT ストック溶液 (240  $\mu$ M, 50  $\mu$ L) を加えた。この混合溶液を 1 cm 角型石英セルに移し、30°C 下、励起波長 435 nm で 480 nm における蛍光強度を測定した。装置は分光光度計 (F-2500 ; 日立製作所株式会社製) を使用した。

また、異種ペプチド間のアミロイド形成能評価は、以下の手順で行った。ペプチド 6 種全ての組み合わせを調べるため、6 種類 (2-9X3K, 2-9X4K, 2-9X5K, 2-9X6K, 2-9X7K, 2-9X8K)  $\times$  6 種類 (2-9X3K, 2-9X4K, 2-9X5K, 2-9X6K, 2-9X7K, 2-9X8K), 計 36 種類の組み合わせにおける ThT 蛍光強度を測定した。まず、96 ウェルプレートにペプチド、C14SA、および ThT の各ストック溶液を総ペプチド濃度が 1 mM になるように加え、攪拌した。測定は、マルチラベルプレートリーダー Wallac 1420 ARVOsx (PerkinElmer 社製) を使用し、96 ウェルプレート上サンプルの蛍光強度を測定した。光源および検出器の波長フィルターはそれぞれ 405 nm と 460 nm の付属品を使用した。

### 2・2・6 CF-leakage 活性測定

#### 蛍光色素内包リポソーム leakage 活性測定の概要

ペプチドと脂質二分子膜の相互作用を評価する方法として、蛍光色素 (Dye) 内包リポソームを用いた leakage 活性測定法が知られている。リポソームとは、脂質二分子膜一層からなる中空ボール状の小胞である。また、内水相に様々な分子を封入することができるため、薬物等の運搬体としての研究が多く行われている。脂質二分子膜 1 層からなるリポソーム [Small unilamellar

vesicle (SUV)]は、約 30~40 Å の炭化水素からなる疎水層があり、直径は約 250 Å となる。

1977 年に Weinstein らは、リポソームと細胞との相互作用を調べるために蛍光色素内包リポソームを調製し、漏出した色素の蛍光強度測定を行っている (24)。原理は、高濃度の蛍光色素を内包したリポソームから漏出する色素の蛍光強度を測定する。リポソームを構成する脂質成分として、ジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC) や卵黄フォスファチジルコリン (EYPC) などを使用した報告例が多くみられる。また、内包の蛍光色素はカルセインや 5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) が用いられている (19)。蛍光色素である CF は励起波長 470 nm で 510 nm に極大を持つ蛍光スペクトルを示す。

CF-leakage 活性測定の概略図を Fig. 2. 4 に示す。

リポソームの内水相は CF の濃厚溶液が存在しているため、濃度消光が生じている。そのため、leakage が起こる前の蛍光強度は当然小さい。しかし、ペプチド添加によりペプチドと脂質二分子膜が相互作用し、膜構造が乱されると、内包された CF はリポソームから漏出し、蛍光強度が増大する。漏出度は、ペプチドの性質や濃度に大きく影響される。

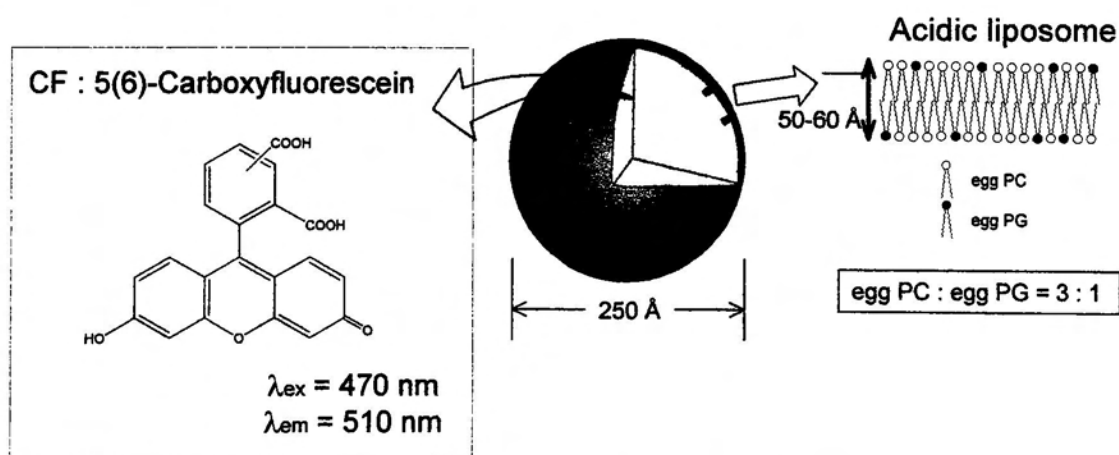


Fig. 2. 4 A schematic diagram of CF-leakage assay system.

### CF-leakage 活性測定

光路長 1 cm の角型石英セルに、2・2・3 の操作で得られた CF 内包リポソーム溶液を 10  $\mu$ L 採り、20 mM TES/150 mM NaCl 緩衝溶液 (pH 7.4) を 2 mL 加えて希釈した。これに、ペプチドストック溶液 (2 mM) を目的濃度になるように適量加えた。ペプチド添加から 2 分後の漏出した CF を調べるために、励起波長 470 nm における 510 nm での蛍光強度を測定した ( $F$ )。さらに、内包 CF がリポソームから総て漏出したときの値を得るために、Triton<sup>®</sup> X-100 (10  $\mu$ L, 20 % in TES buffer) を加え、このときの蛍光強度を測定した ( $F_t$ )。leakage 活性 (%) は  $100 (F - F_0) / (F_t - F_0)$  の式から算出した。ここで、 $F_0$  はペプチドが加えられていないときの蛍光強度値である。

### 2・2・7 透過型電子顕微鏡観察

顕微鏡観察試料は以下の手順で作製した。まず、ペプチド/C14SA 溶液を 2 mM / 17 mM になるように調製し、室温で 10 日間インキュベートした。さらに 10 倍希釈したサンプル溶液 5  $\mu$ L を電子顕微鏡用銅製グリッド (200 mesh, 応研商事株式会社製) に滴下した。30 秒後、グリッド上の液を濾紙片で吸い取り、さらに蒸留水を 1 滴滴下した。10 秒後、余分な蒸留水を濾紙片で吸い取り、2 % りんタングステン酸水溶液を滴下し、30 秒後に濾紙片で吸い取った。2 日間、真空乾燥した後、TEM 観察を行った。観察は H-9000NAR (日立製作所株式会社製) を使用し、100 kV の加速電圧で行った。

## 2・3 結果および考察

### 2・3・1 デカペプチドの CD スペクトル変化

一般的に、ペプチドの二次構造は $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、およびランダムに分類され、Fig. 2.5 に示されるような CD スペクトルパターンを示す(25)。アミドの  $n-\pi^*$  遷移に相当する 200-250 nm 付近のスペクトルパターンが各コンホメーションで異なる。例えば、L-アミノ酸から成るペプチドの場合、 $\alpha$ -ヘリックスでは 220 nm および 208 nm 付近に 2 つの負の極大、 $\beta$ -シートでは 218 nm およびに負の極大の特徴的なスペクトルを示す。

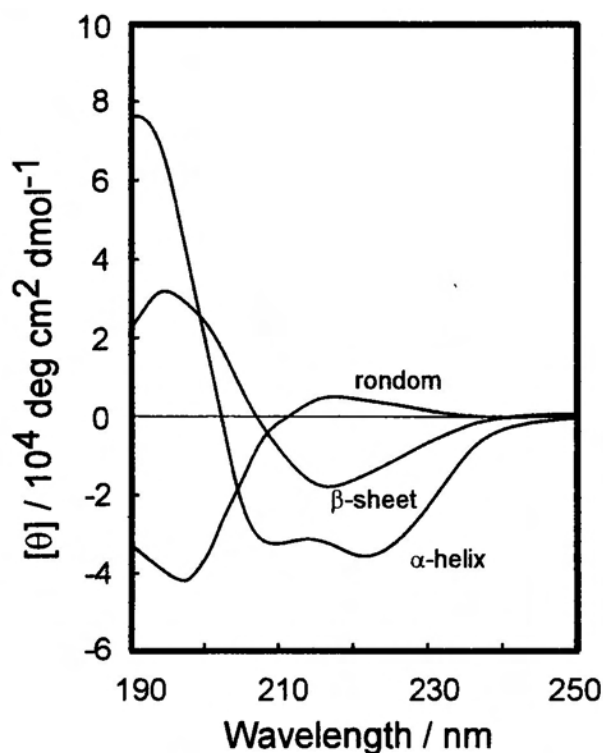
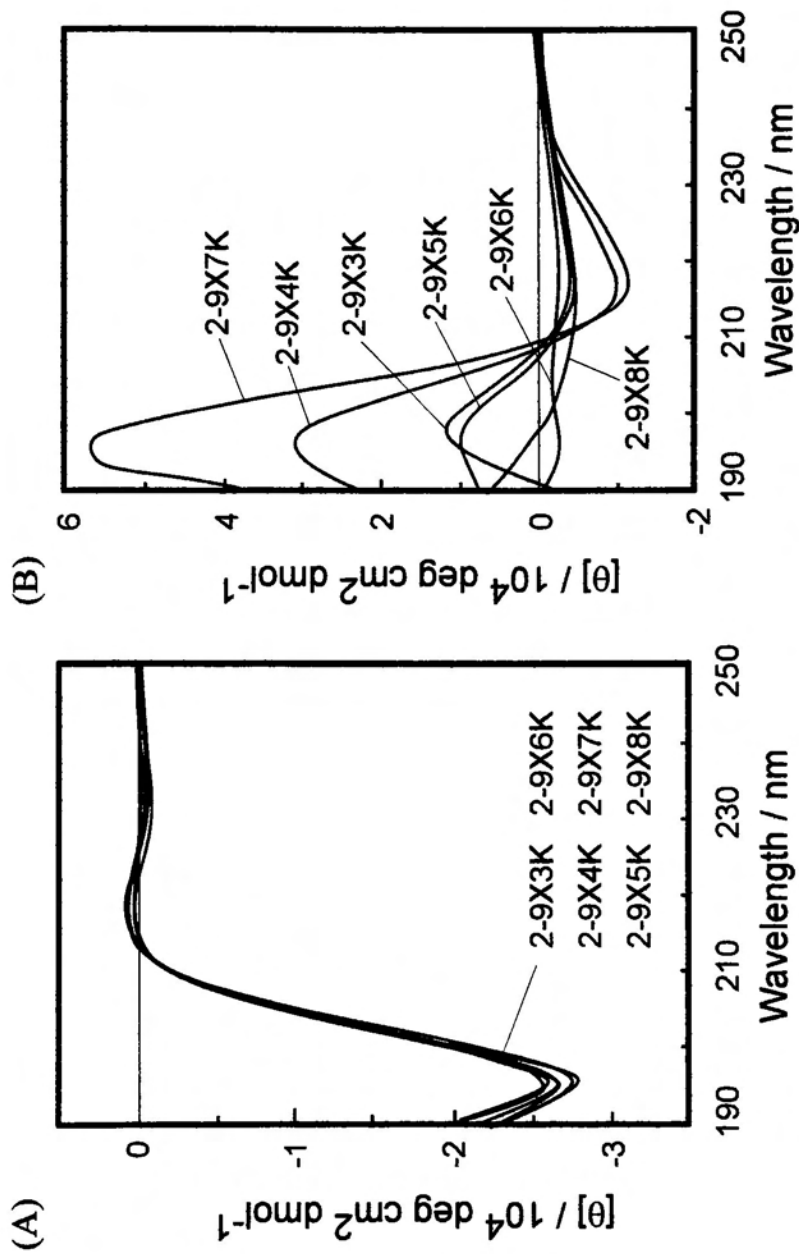


Fig. 2.5 Circular dichroism spectra of poly-L-lysine in the  $\alpha$ -helical,  $\beta$  and random conformation.

塩酸 4 mM を含むペプチド 1 mM の水溶液 (pH = 2-3) では, Fig. 2. 6-A に示されるように, いずれのデカペプチドにおいてもランダム構造のスペクトルパターンを示した。ペプチド内の 2 つのアミノ基 (N-末端の-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>, Lys の ε-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) は pH = 2-3 環境下で完全にプロトン化され, 水和されているが, 疎水性のノルロイシンを 2 残基含むデカペプチド分子は会合することができなかった。

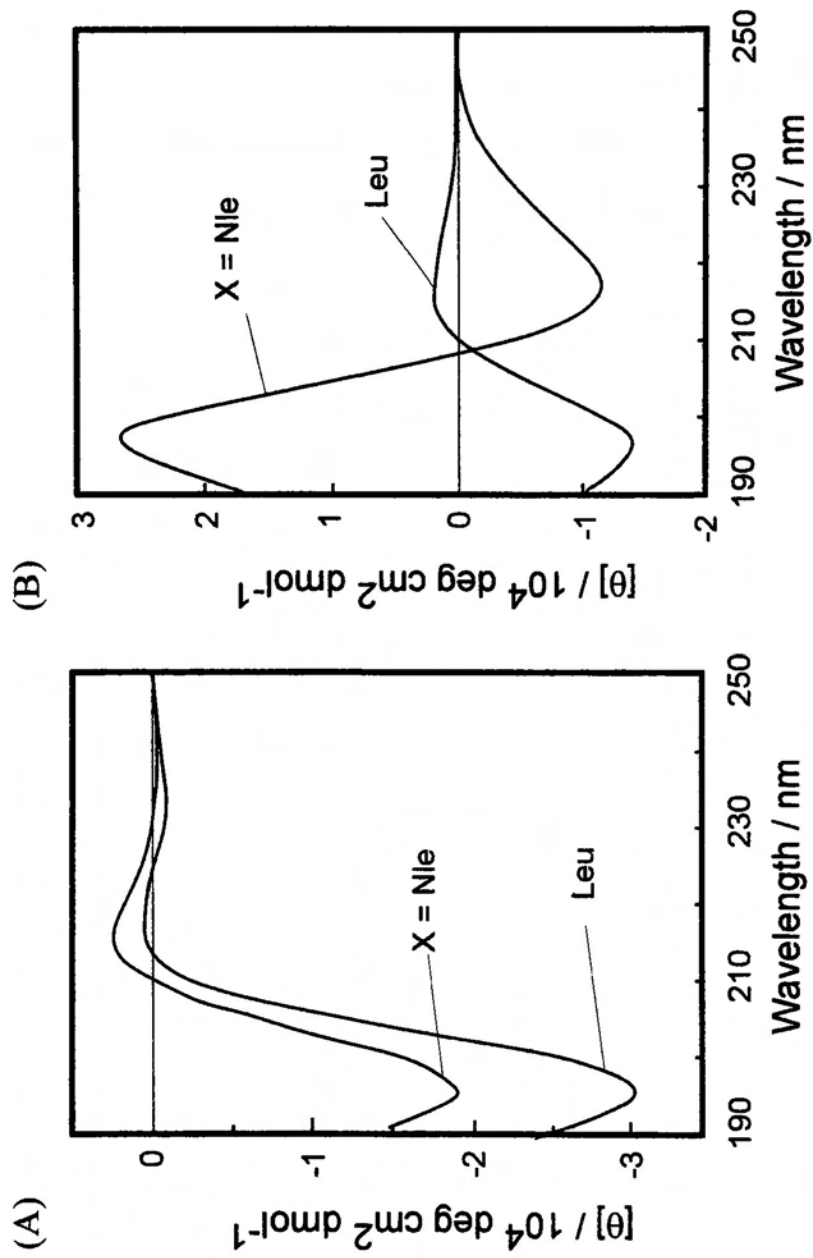
一方, メタノール中では Fig. 2. 6-B に示されるように 2-9X7K, 2-9X4K が特に強いβ-シート構造を示した。2-9X4K を N-末端から, 2-9X7K を C-末端から数えると, ノルロイシン 2 残基とリシン 1 残基 (Nle, Lys, Nle) は, (*i*, *i*+2, *i*+7) の順序で並ぶため, これらのペプチドは互いに対称配列である。したがって, この位置はβ-構造を形成しやすい関係であることが示唆された。また, 他の配列をもつペプチドはβ-シート構造とランダム構造の混合スペクトルを示した。

さらに, 著者は 2-9X4K の 2 および 9 残基目のノルロイシンをロイシンへ置換したペプチド 2-9L4K を合成し, 水中およびメタノールでの CD スペクトルを測定した。2-9L4K は, 水中およびメタノール中でランダム構造を示した (Fig. 2. 7-B)。疎水性アミノ酸置換の実験結果より, β-構造の形成には, 疎水性アミノ酸側鎖が分岐した構造 (*i*-butyl 基) より直鎖構造 (*n*-butyl 基) が必要であることが明らかになった。



**Fig. 2. 6** CD spectra of lys-scanning decapeptides in H<sub>2</sub>O (A) and methanol (B). [peptide] = 1 mM, H<sub>2</sub>O is containing 4 mM HCl, at 30°C.





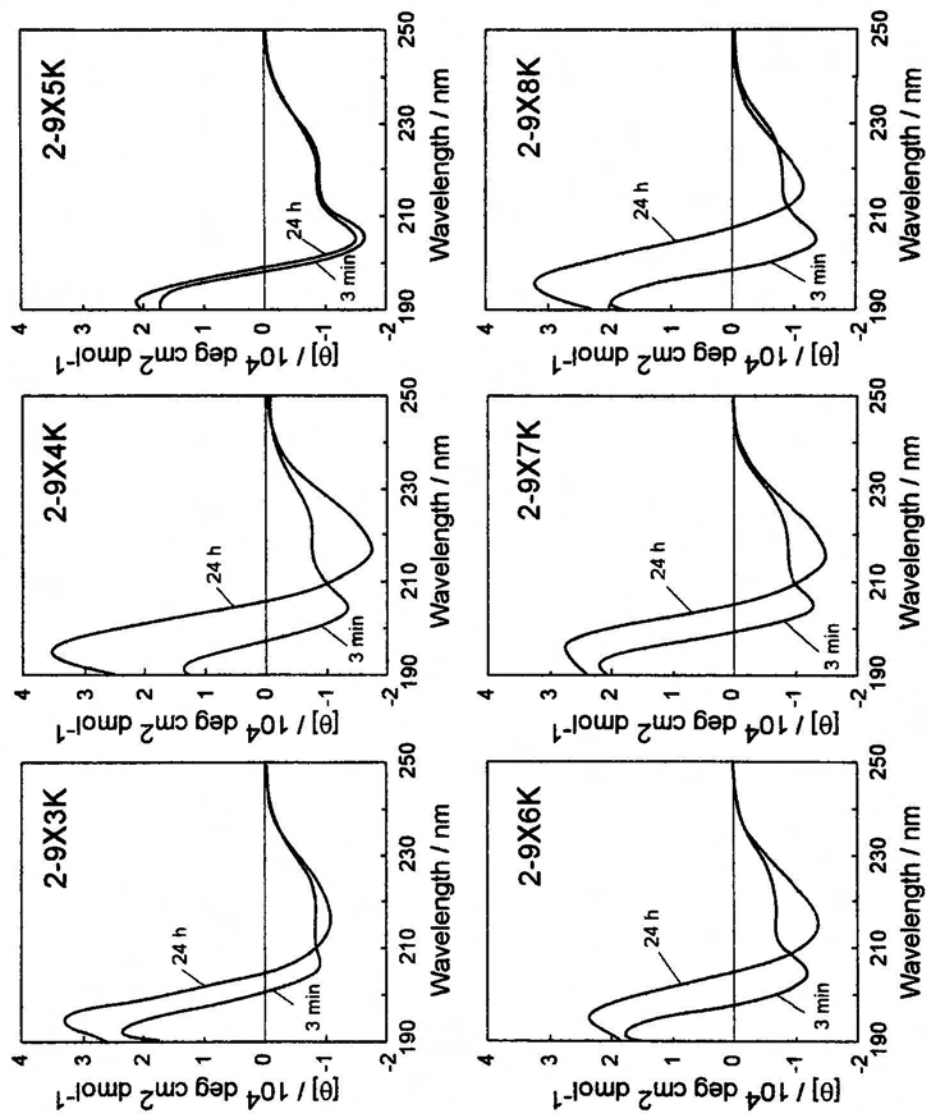
**Fig. 2. 7** CD spectra of 2-9X4K and 2-9L4K in H<sub>2</sub>O (A) and methanol (B). [peptide] = 1 mM, H<sub>2</sub>O is containing 4 mM HCl, at 30°C.

次に、C14SA 溶液中では、Fig. 2. 8 で示されるように、 $\alpha$ -ヘリックスから $\beta$ -構造への時間に伴う転移が確認された。しかしながら、(Nle, Lys, Nle) の位置が N-末端側から ( $i, i+3, i+7$ ) の関係である 2-9X5K だけは構造転移せず、 $\alpha$ -ヘリックス構造のまま安定であった。2-9X5K が構造転移しなかった理由として、(1) マイナス荷電したミセル表面とプラス荷電したペプチドの官能基 (N-末端の  $-\text{NH}_3^+$ ,  $^5\text{Lys}$  の  $\epsilon\text{-NH}_3^+$ ) 間の静電相互作用、(2)  $^2\text{Nle}$  と  $^9\text{Nle}$  の *n*-butyl 基とミセル内疎水領域との疎水性相互作用、の二種類の相互作用が考えられる。Figure 2. 1-A で示されるように、2-9X5K は、 $\alpha$ -ヘリックス構造形成時に、N-末端、 $^2\text{Nle}$ 、 $^5\text{Lys}$ 、 $^9\text{Nle}$  の側鎖が同一面に並ぶので、負荷電のミセル表面との静電相互作用、およびミセル内部との疎水性相互作用が生じ、結果的にヘリックス構造が安定化されたのではないかと考えられる。例えば、pH 7 の緩衝溶液中、アラニンベースペプチドの 2 つのロイシンが ( $i, i+4$ ) または ( $i, i+3$ ) の関係で位置するとき、ヘリックス構造が安定化されやすい (26)。2-9X5K のノルロイシンペアは ( $i, i+7$ ) の関係で位置するが、ノルロイシンとロイシンの関係はそれぞれ ( $i, i+3$ ) および ( $i, i+4$ ) になる。Lys 側鎖は *n*-butyl 基の部分をもっているため、Nle と同じ働きをしたのではないかと考えられる。

一方、他のペプチドも 2-9X5K 同様、ノルロイシンペアが ( $i, i+7$ ) の関係で位置するが、Lys と Nle の位置が互いに離れているため、一旦は  $\alpha$ -ヘリックスを形成したのち、エネルギー的により安定な  $\beta$ -構造へシフトしたものと考えられる。

CD スペクトルから得られた各溶液条件下での二次構造を Table 2. 2 にまとめる。

以上の結果より、溶媒変化によるリシンスキャンペプチドの立体構造変化は、アミノ酸配列に依存することが明らかになった。



**Fig. 2. 8** CD spectral change of lys-scanning peptides in anionic micellar solution at 3 minutes and 24 hours. [peptide] = 1 mM, [C14SA] = 17 mM, and [HCl] = 4 mM, at 30 °C.

**Table 2.2** Conformation of the peptides in various solvent conditions.

peptide	sequence	solvent condition	
		H <sub>2</sub> O <sup>a)</sup>	methanol <sup>b)</sup>
2-9X3K	AXKAAAAAXA	random	β/ random <sup>d)</sup>
2-9X4K	AXAKAAAAAXA	random	β
2-9X5K	AXAAKAAAXA	random	β/ random
2-9X6K	AXAAAKAAAXA	random	β/ random
2-9X7K	AXAAAAKAXA	random	β
2-9X8K	AXAAAAAKXA	random	β/ random
2-9L4K	ALAKAAAAALA	random	random
			α-helix → β
			α-helix → β
			α-helix
			α-helix → β
			α-helix → β
			α-helix → β

<sup>a</sup> [peptide] = 1 mM and [HCl] = 4 mM.

<sup>b</sup> [peptide] = 1 mM.

<sup>c</sup> [peptide] = 1 mM, [HCl] = 4 mM and [C14SA] = 17 mM.

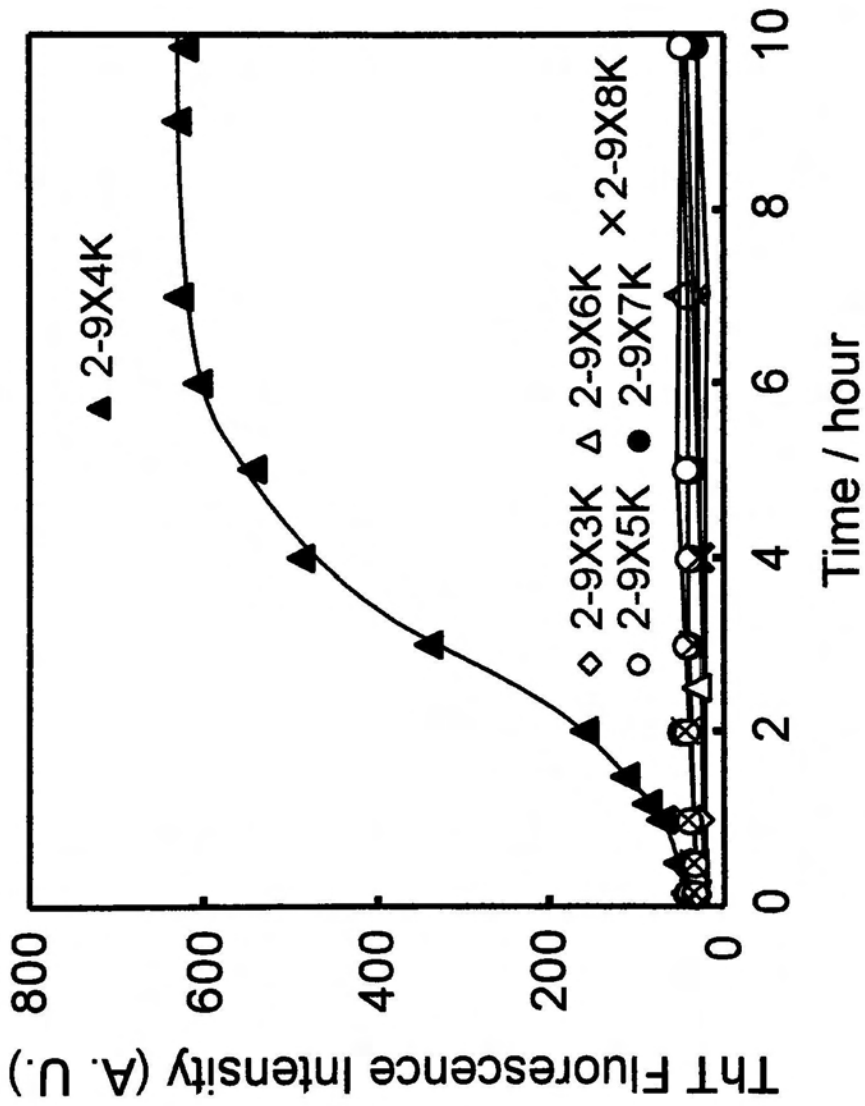
<sup>d</sup> Mixed spectrum of random and β-structure.

## 2・3・2 アミロイド形成能評価

### デカペプチド同種間の相互作用

ミセル共存下、 $\beta$ -構造を形成したデカペプチドのサンプル溶液に白濁が生じたので、リシンスキャンペプチドのアミロイド形成能について調べた。アミロイド形成能の評価法としては、2・2・5で説明したチオフラビンT評価法が多く用いられている。時間に対するチオフラビンTの蛍光強度変化を **Fig. 2.9** に示す。CD スペクトルでは $\beta$ -シート構造を示した 2-9X4K は、測定開始から 10 時間で蛍光強度が S 字曲線的に増大した。このような増加傾向は、アミロイド線維が形成されていることをあらわし、かつ、S 字曲線的増加は核形成反応が起こっていることを示唆する (27, 28)。

一方、他のペプチドは、3 日間 30°C でインキュベートを続けたが、蛍光強度の増大は確認されなかった。従って、2-9X4K は $\beta$ -シート構造になりやすく、また、 $\beta$ -シート構造が会合したアミロイド様線維を形成しやすいことがわかった。2-9X4K のノルロイシンおよびリシンの関係 (Nle, Lys, Nle) は、N-末端側から ( $i, i+2, i+7$ ) となり、ヘリックス形成時、ノルロイシンに対してリシンは反対に位置することになる。陰イオン性ミセルと相互作用する官能基が分散した為に、 $\alpha$ -ヘリックス構造が安定化されなかったと考えられる。従って、2-9X4K は、アミロイド線維の核、つまり $\beta$ -シート構造のオリゴマーを急速に形成したものと予想される。

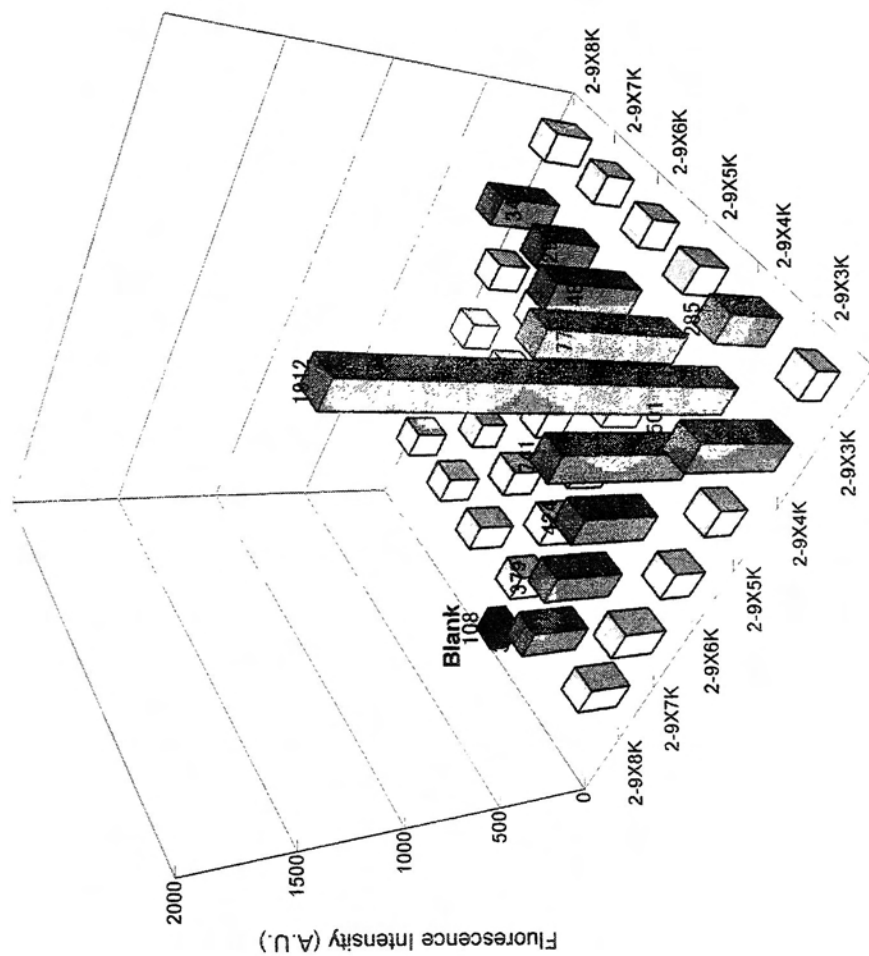


**Fig. 2. 9** Time course of ThT fluorescence intensity at 480 nm. [peptide] = 1 mM, [C14SA] = 17 mM and [HCl] = 4 mM, at 30 °C.

## デカペプチド異種間の相互作用

次に、著者は、異種ペプチド間でのアミロイド線維形成を確認するため、2種類のペプチドを等モル比で混合したサンプルに対するチオフラビンT結合実験を行った。測定開始から24時間後のチオフラビンTの蛍光強度を **Fig. 2.10** に示す。2-9X4K を含む系は、他の系列より高い蛍光強度を示した。特に、2-9X4K 純系が最も高く、次に 2-9X4K / 2-9X5K 混合系が高かった。**Figure 2.8** で示されるように、2-9X5K 純系は $\beta$ -シート構造を形成できない。しかし、2-9X4K / 2-9X5K 混合系は、2-9X4K 純系の約半分程度の蛍光強度を示した。これは2-9X4K に由来する蛍光であると考えられる。一方、他の2-9X4K を含む混合系は、2-9X4K / 2-9X5K 混合系より低く、純系の2分の1以下の蛍光強度を示した。再現性を確かめる実験でも、同様な結果を示したことから、2-9X3K、2-9X6K、2-9X7K および2-9X8K は、2-9X4K のアミロイド形成を抑制することが可能なアミノ酸配列であるといえる。従って、蛍光強度の増大が抑制されたと考えられる。

これまでにA $\beta$ ペプチドや huntingtin タンパク質などの線維形成を抑制する物質は多数報告されているが、全ての物質に対して抑制効果を示す物質は未だ明らかにはなっていない。上記4種の2-9X系ペプチドは、これらのアミロイド線維形成タンパク質の線維形成を抑制する可能性もあると考えられるので、今後さらに実験を進める予定である。



**Fig. 2. 10** Relative ThT fluorescence intensities of two-peptide mixtures after 24 h incubation in C14SA solution at 30°C. [peptide] = 1 mM, [HCl] = 4 mM, [C14SA] = 17 mM.



### 2・3・3 透過型電子顕微鏡観察

チオフラビンT結合実験で高いアミロイド形成能を示した 2-9X4K の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。C14SA 中で 10 日間インキュベートした 2-9X4K の TEM 観察画像を Fig. 2. 11 に示す。得られた観察画像から、幅が 3~10 nm 程度の線維状会合体を確認した。また、この線維幅は、2-9X4K が $\beta$ -シートを形成したときの長さ約 3.5 nm に近いことがわかった。

以上の結果より、ミセルがペプチドのアミロイド様線維形成を促していることが示唆された。

他のアミロイド様線維形成ペプチドの TEM 画像と比較すると、やや線維幅が細いようではあるが、枝分かれの無い直線構造の線維であり、他のアミロイド様線維の形態と良く一致する。しかし、今回は線維の形態確認が主たる目的であったため、単なる最終生成物を観察したに過ぎない。しかしながら、例えば、 $A\beta$ ペプチドがインキュベート開始直後、球状のアミロスフェロイドと呼ばれる会合体を形成していることが知られており (29)、今後、時間変化に伴う TEM 観察を行う必要があると考える。また、アミロイド様線維形成は pH 環境に応じて変化する (30, 31) ことから、溶液環境の変化に伴う観察、また、2・3・2 で行った異種ペプチド間のサンプルについても、調べる必要がある。

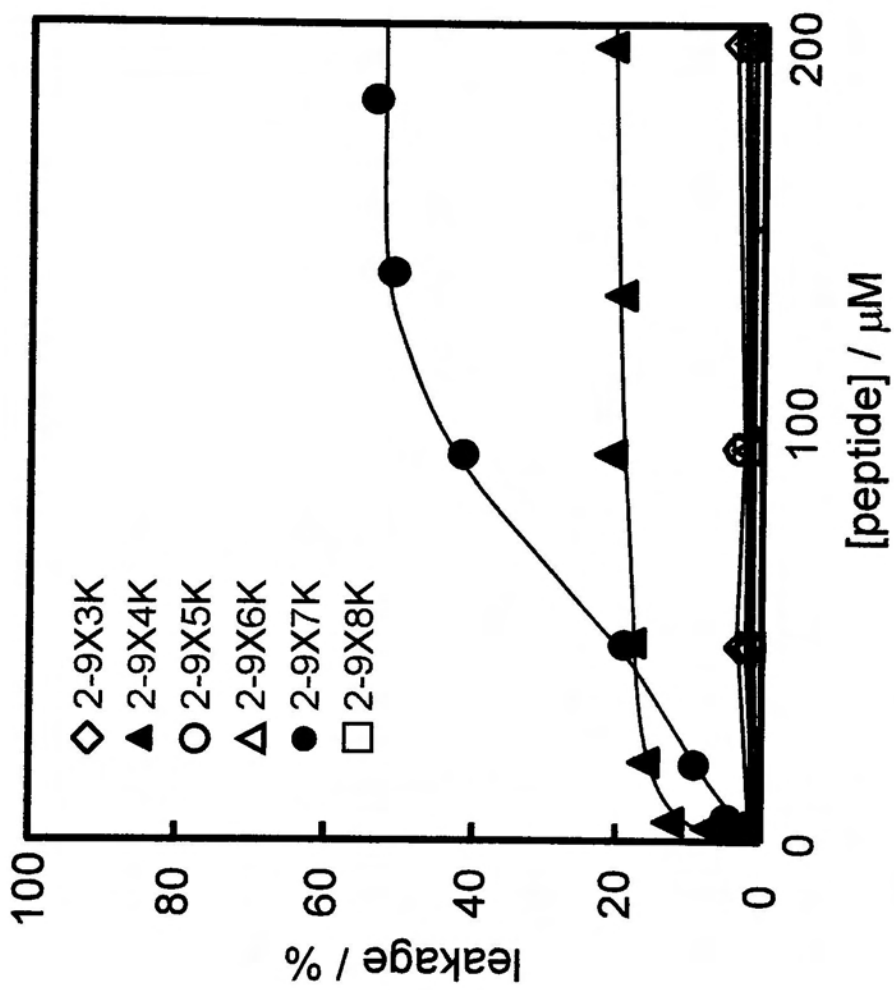


**Fig. 2. 11** Electron micrograph of 2-9X4K in  $\beta$ -sheet form, which was incubated for 10 days and then negatively stained. [peptide] = 200  $\mu$ M, [CI4SA] = 1.7 mM. Magnification 53000 x; scale bar, 100 nm.

#### 2・3・4 リポソームに対する CF-leakage 能評価

著者は、リシンスキャンペプチドとリポソームとの相互作用について調べるため、CF-leakage 活性テストを行った。この手法は、両親媒性ペプチドと細胞膜モデルとの相互作用を評価する方法としてしばしば用いられる (32, 33)。

ミセル系で、リシンスキャンペプチドは陰イオン性ミセルとよく相互作用したので、同様に表面荷電がマイナスである酸性リン脂質含有リポソームを調製、使用した。ペプチド濃度に対する leakage 活性 (%) を Fig. 2. 12 に示す。6 種類のペプチドのなかで、2-9X4K および 2-9X7K は高い leakage 活性を確認した。特に、ペプチド濃度 150  $\mu$ M 以上では、2-9X4K は 20%、2-9X7K は 50% 程度の leakage 活性を示した。しかしながら、50  $\mu$ M 以下の濃度域では 2-9X4K の方が 2-9X7K より leakage 能が優れていた。また、他の 2-9X3K、2-9X5K、2-9X6K および 2-9X8K の leakage 活性は確認されなかった。このように、デカペプチドの構成アミノ酸は同じでありながら、アミノ酸配列の違いで leakage 能に差が生じるのは、デカペプチドの立体構造が影響しているのではないかと推察される。一般に、leakage 活性が高いペプチドは、 $\alpha$ -ヘリックス形成時におけるアミノ酸の疎水-親水性バランスが優れている(19, 34)。2-9X4K および 2-9X7K は  $\alpha$ -ヘリックスのとき、リシン (K) がノルロイシン(X) の反対側に位置する故に(Fig. 2. 1-A)、疎水性-親水性バランスが保たれている。従って、他のデカペプチドより leakage 能が高いと考えられた。また、ミセル系でのアミロイド形成能とリポソームに対する leakage 能との間に相関性はみられなかった。

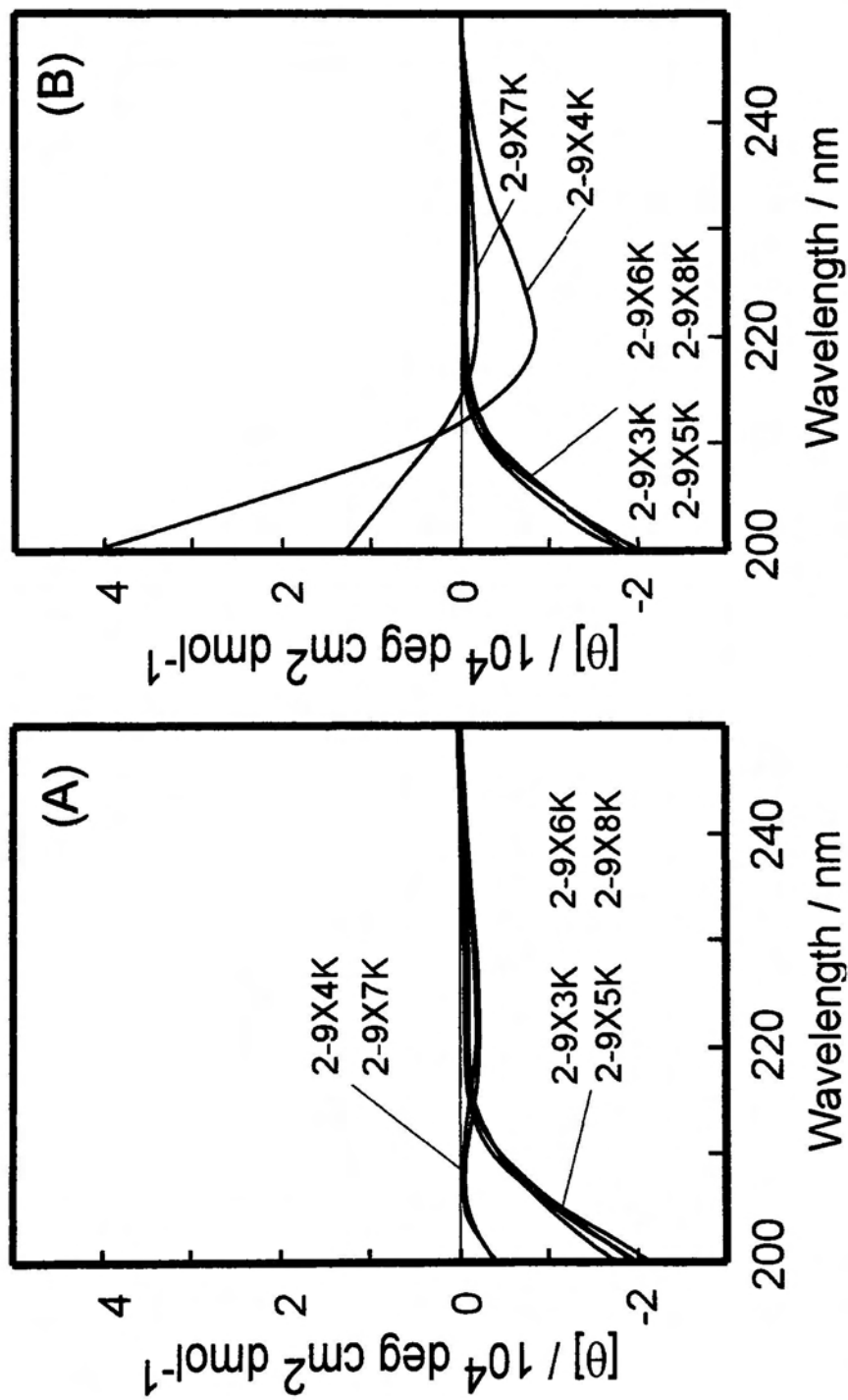


**Fig. 2. 12** Profiles of CF leakage as a function of the peptide concentration in 20mM TES/150 mM NaCl buffer (pH 7.4) containing 100  $\mu\text{M}$  EYPC/EYPG (3/1) liposomes. The fluorescence intensity was recorded at 515 nm with excitation at 470 nm at 30  $^{\circ}\text{C}$ .

次に、著者は、リポソーム存在下におけるデカペプチドの二次構造について調べた。得られた CD スペクトルを **Fig. 2. 13** に示す。リポソームが存在しない緩衝溶液中では、**Fig. 2. 13-A** に示されるように 2-9X4K と 2-9X7K の両ペプチドは弱い  $\beta$ -構造を示した。しかし、リポソームが存在すると、**Fig. 2. 13-B** に示されるように両ペプチドの  $\beta$ -構造を示すスペクトル強度が大きくなり、特に、2-9X4K の方が 2-9X7K より強いことがわかった。これは、ミセル系で 2-9X4K が最もアミロイド形成能が高かった結果と一致する。つまり、2-9X4K はミセルやリポソームが存在する場合と同じように挙動していることが明らかとなった。一般的なミセルの粒子半径は 5~10 nm、また、small unilamellar vesicle (SUV) は 25~100 nm なので、SUV の方がミセルよりやや大きい。2-9X4K はミセルやリポソームのような負荷電粒子の存在によって  $\alpha$ -ヘリックスを形成したと予想される。さらに、より安定な構造である  $\beta$ -シート構造への転移が起こり、ミセル系では  $\alpha/\beta$  構造転移を示す CD スペクトル変化が得られたのだらうと思われる。しかし、リポソーム系では  $\alpha$ -ヘリックス構造を確認することは出来なかった。これは、ミセル系と比べて速やかに構造転移が生じたためであると予想される。さらに、ペプチドの会合が進むと、ペプチド-脂質複合体から離れるようにアミロイドが形成され始める。長時間放置した 2-9X4K のサンプル溶液が白濁するのはこのような理由からであろう。

リポソーム系では、2-9X4K より 2-9X7K の方が leakage 活性は高いが、2-9X4K の方が  $\beta$ -シート構造を形成しやすいことがわかった。通常、CF-leakage 活性はペプチドの立体構造に大きく影響される。つまり、2-9X7K の方が  $\beta$ -シート構造を形成しにくい分だけ、高い leakage 活性を示したものと考えられる。一方、2-9X4K は、ペプチド濃度増加に伴い、 $\beta$ -シートの占める割合が多くなり、結果的に leakage 活性が低下したと予想される。

以上の結果より、ミセル系とリポソーム系においてデカペプチドが異なる挙動を示すのは、リポソームよりミセルの方がはるかに動的な状態で存在しているためと言える。



**Fig. 2. 13** CD spectral changes of Lys scanning peptides in the absence (A) and presence (B) of EYPC/EYPG (3/1).  
 [peptide] = 150  $\mu\text{M}$ , [lipid] = 1 mM, 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.4.

## 2・4 結言

本章で、著者は、ノルロイシンを導入したアラニンベースペプチドのリシンスキャンを行い、ミセルおよびリポソームとペプチドとの粒子間に生じる静電相互作用や疎水性相互作用について評価した。その結果、ミセルやリポソームのような荷電粒子が存在すると、ペプチドは $\alpha/\beta$ 構造転移を生じ、ペプチド側鎖とミセルが強く相互作用していることが示された。また、著者は、長時間経過したサンプルにおいて、僅か10残基のアラニンベースペプチドが、ミセル共存下、アミロイド様線維を形成したことを確認した。

著者は、デカペプチドのリシンスキャンを行ったことにより、上記の特性を示すアミノ酸配列を特定することができた。

## 参考文献

1. G.J. Cooper, A.C. Willis, A. Clark, R.C. Turner, R.B. Sim and K.B. Reid, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol. **84**, 8628-8632 (1987).
2. K.M. Pan, M. Baldwin, J.P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schlossmacher, J. Whaley and C. Swindlehurst, *Nature*, Vol. **359**, 325-327 (1992).
3. Nguyen, M. Gasset, A. Serban, D. Groth, I. Mehlhorn, Z.W. Huang, R.J. Fletterick, F.E. Cohen and S.B. Prusiner, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol. **90**, 10962-10966 (1993).
4. P.Y. Chou and G.D. Fasman, *Biochemistry*, Vol. **13**, 211-222 (1974).
5. J.A. Vila, D.R. Ripoll and H.A. Scheraga, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol. **97**, 13075-13079 (2000).
6. C.A. Rohl, W. Fiori and R.L. Baldwin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol. **96**, 3682-3687 (1999).
7. B. Ma and R. Nussinov, *Protein Sci.*, Vol. **11**, 2335-2350 (2002).
8. H. Inouye and D.A. Kirschner, *J. Struct. Biol.*, Vol. **122**, 247-255 (1998).
9. J. Torrent, M.T. Alvarez-Martinez, M.C. Harricane, F. Heitz, J.P. Liautard, C. Balny and R. Lange, *Biochemistry*, Vol. **43**, 7162-7170 (2004).
10. I.V. Baskakov, G. Legname, M.A. Baldwin, S.B. Prusiner and F.E. Cohen, *J. Biol. Chem.*, Vol. **277**, 21140-21148 (2002).
11. H. Inouye, J. Bond, M.A. Baldwin, H.L. Ball, S.B. Prusiner and D.A. Kirschner, *J. Mol. Biol.*, Vol. **300**, 1283-1296 (2000).
12. H. Akisada, S. Kinoshita and H. Wakita, *Colloids and Surfaces*, Vol. **66**, 121-127 (1992).
13. H. Akisada, M. Ishihara, M. Nishi, M. Higake, S. Ishimaru and J. Nishida, *Colloid. Polym. Sci.*, Vol. **281**, 993-997 (2003).
14. W.F. DeGrado, Z.R. Wasserman and J.D. Lear, *Science*, Vol. **243**, 622-628



- (1989).
15. A.J. Doig, *Biophys. Chem.*, Vol. **101**, 281-293 (2002).
  16. W.C. Chan and P.D. White, *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach*, Oxford University Press, New York, pp. 41 (2000).
  17. H. Akisada, H. Shimo, K. Fukuoka, S. Abe, S. Akano and J. Nishida, *Nippon Kagaku Kaishi*, Vol. **7**, 393-399 (2001).
  18. K.W. Herrmann, J.G. Brushmiller and W.L. Courchene, *J. Phys. Chem.*, Vol. **70**, 2909-2918 (1966).
  19. T. Kiyota, S. Lee and G. Sugihara, *Biochemistry*, Vol. **35**, 13196-13204 (1996).
  20. T. Niidome, M. Kimura, T. Chiba, N. Ohmori, H. Mihara and H. Aoyagi, *J. Peptide Res.*, Vol. **49**, 563-569 (1997).
  21. H. Levine, *Protein Sci.*, Vol. **2**, 404-410 (1993).
  22. H. Levine, *Methods Enzymol.*, Vol. **309**, 274-284 (1999).
  23. H. Levine, *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. **306**, 306-316 (1997).
  24. J.N. Weinstein, S. Yoshikami, P. Henkart, R. Blumenthal and W.A. Hagins, *Science*, Vol. **195**, 489-492 (1977).
  25. N. Greenfield and G.D. Fasman, *Biochemistry*, Vol. **8**, 4108-4116 (1969).
  26. P. Luo and R.L. Baldwin, *Biophys. Chem.*, Vol. **96**, 103-108 (2002).
  27. F.L. Heppner, M. Prinz and A. Aguzzi, *Prog. Brain Res.*, Vol. **132**, 737-750 (2001).
  28. T. Ban, D. Hamada, K. Hasegawa, H. Naiki and Y. Goto, *J. Biol. Chem.*, Vol. **278**, 16462-16465 (2003).
  29. M. Hoshi, M. Sato, S. Matsumoto, A. Noguchi, K. Yasutake, N. Yoshida and K. Sato, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, Vol. **100**, 6370-6375 (2003).
  30. K. Ma, E.L. Clancy, Y. Zhang, D.G. Ray, K. Wollenberg and M.G. Zagorski, *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. **121**, 8698-8706 (1999).
  31. S.P. Martsev, A.P. Dubnovitsky, A.P. Vlasov, M. Hoshino, K. Hasegawa, H. Naiki and Y. Goto, *Biochemistry*, Vol. **41**, 3389-3395 (2002).

32. K. Otoda, S. Kimura and Y. Imanishi, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. **1150**, 1-8 (1993).
33. K.A. Stieglitz, B.A. Seaton and M.F. Roberts, *Biochemistry*, Vol. **40**, 13954-13963 (2001).
34. A.S. Luk, E.W. Kaler and S.P. Lee, *Biochemistry*, Vol. **36**, 5633-5644 (1997).



## 第3章 多様な疎水性アミノ酸をもつデカペプチドと界面活性剤との相互作用

### 3・1 はじめに

タンパク質・ペプチドは、イオン性、中性および疎水性のアミノ酸から成り、溶液中で $\alpha$ -ヘリックスや $\beta$ -シート構造など、特定のコンホメーションを形成する。このとき、主鎖アミド基は分子内あるいは分子間で水素結合する。ポリペプチド主鎖のN-H基とC=O基の間の水素結合エネルギーは約3 kcal mol<sup>-1</sup>である(1)。タンパク質内に架かる水素結合は、タンパク質とそれを覆う水分子との間で形成される水素結合と同程度の安定性を持つと考えられる。従って、疎水性アミノ酸はタンパク質の立体構造安定化に寄与する。一般的に、水溶性タンパク質の場合、疎水性アミノ酸は25~30%を占めるが、疎水性アミノ酸残基の多くは分子内部に埋もれるように存在する。このとき、一度安定化されたコンホメーションであっても、溶媒変化や配位子の存在によって突如として他のコンホメーションへ転移する場合もある。

以前、Tanfordらは、疎水性アミノ酸に着目し、各種アミノ酸の溶解度測定を行い、水から有機溶媒への移行自由エネルギー変化を求めた(2)。主なアミノ酸の疎水性スケールをTable 3.1に示す。表中で、エネルギー変化の値が小さいほどアミノ酸側鎖の疎水性が高いことを示す。例えば、側鎖にbutyl基を持つロイシンとノルロイシンを比較すると、*n*-butyl基を持つノルロイシンの水相から有機相への移行自由エネルギー変化は、*i*-butyl基を持つロイシンよりも小さい。これは、分岐した*i*-butyl基より直鎖である*n*-butyl基の方が、周辺に秩序化された水構造(iceberg)を形成しやすいからである。したがって、icebergの形成は、エントロピーの減少、および自由エネルギー増大を招く。

著者は、第2章で、ペプチドが $\beta$ -シート構造を形成するためには、側鎖が高い疎水性であること、および側鎖構造が直線的であることの重要性を指摘

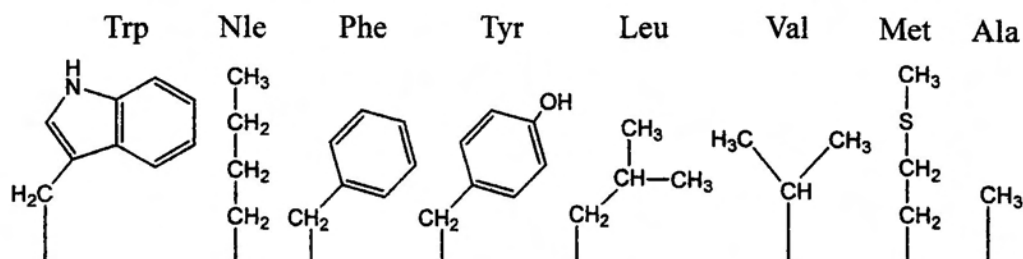
した。

そこで、著者は、アミロイド様線維を形成した 2-9X4K (AXAKAAAAXA) の配列をもとに、ノルロイシンとは異なる疎水性アミノ酸に置換したデカペプチドを合成する。そして、側鎖疎水性とペプチドの立体構造変化の関係について調べる。また、媒質として存在するミセルの親水基荷電の影響、およびミセル濃度変化より得られる立体構造の変化について調べる。

**Table 3.1** Hydrophobic scale of amino acids.

		$\mu_{\text{org}}^{\circ} - \mu_{\text{w}}^{\circ}$ (cal / mol)
Tryptophan	Trp	-3400
Norleucine	Nle	-2600
Phenylalanine	Phe	-2500
Tyrosine	Tyr	-2300
Leucine	Leu	-1800
Valine	Val	-1500
Methionine	Met	-1300
Alanine	Ala	-500

Structural formulae of side chains

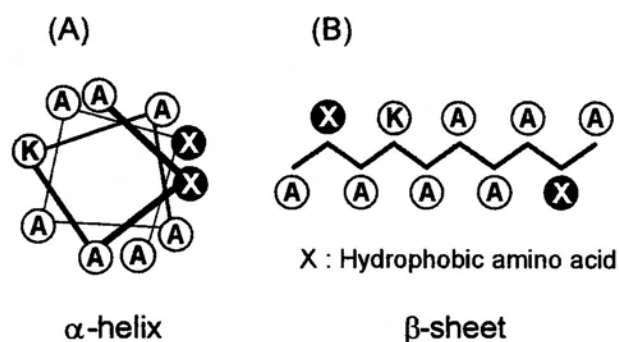


## 3・2 実験

### 3・2・1 デカペプチドの設計

デカペプチドのアミノ酸配列は、 $\alpha/\beta$ 構造転移を生じた後、アミロイド様線維を形成した2-9X4K (AXAKAAAAXA, X: Nle)の配列をもとに設計された。著者は、このアミノ酸配列のうちXで示す疎水性アミノ酸の位置に、メチオニン(Met), ロイシン(Leu), フェニルアラニン(Phe), ノルロイシン(Nle), 2-アミノオクタン酸(Aoc), 2-アミノデカン酸(Ade)の6種類をそれぞれ導入した。Met, Leu および Phe の側鎖の長さは、Nle とほぼ同じである。また、Aoc および Ade は、側鎖に *n*-hexyl 基と *n*-octyl 基を有し、直鎖型である。

上記のデカペプチドが形成可能な  $\alpha$ -ヘリックスおよび  $\beta$ -シート構造の模式図を Fig. 3. 1 に示す。



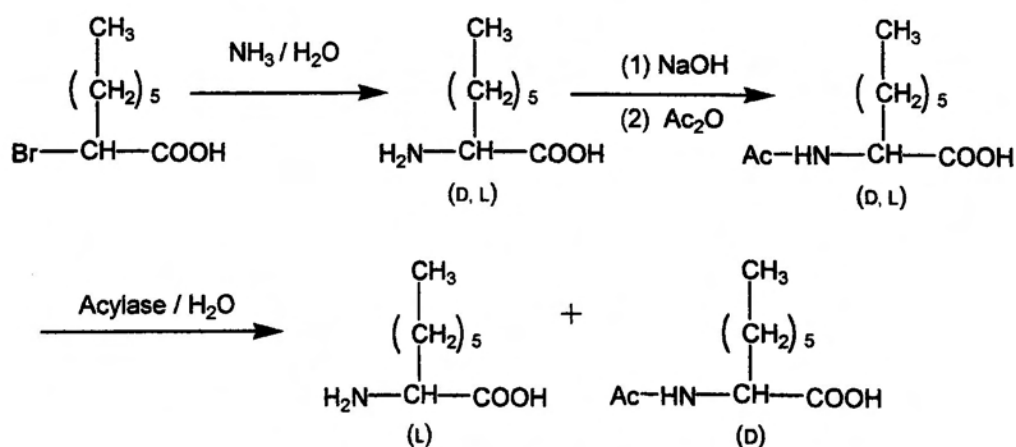
**Fig. 3. 1** Schematic representation of decapeptides containing hydrophobic amino acids (X: Met, Leu, Nle, Phe, Aoc, or Ade). (a)  $\alpha$ -Helix structure, (b)  $\beta$ -sheet structure.

### 3・2・2 アミノ酸合成

#### L-2-アミノオクタン酸(L-Aoc)の合成

25%アンモニア水 550 mL に 2-ブロモオクタン酸 (25 g, 112 mmol) を氷冷下、攪拌しながら滴下した。滴下終了後、室温で 72 時間攪拌した。TLC で原料消失を確認後 (C:M:A = 9:3:1,  $R_f = 0.83$ ), 反応溶液を濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣にメタノール 250 mL を加えて冷蔵庫で一晩放置した。析出した結晶を濾取した。濾取した結晶の量が少なかった為、濾液を濃縮した。析出した結晶 28g に、4N NaOH 水溶液 250 mL, 無水酢酸 100 mL を加え、アセチル化を行った。HCl で pH を 3 から 4 に調節後、酢酸エチルで抽出した。硫酸マグネシウムで酢酸エチル層を脱水処理後、減圧濃縮した。ジエチルエーテルで固化し、D, L-N-アセチル-2-アミノオクタン酸を得た (収量: 17.7 g, 82.5 mmol / 収率 100%)。結晶に水 85 mL を加え、4N NaOH 6 mL を加え、溶解させた。溶液を pH 6~7 に調節した後、アシラーゼ 2 g を加え、37°C で 24 時間静置した。沈殿した L-体を濾取し、水で洗浄した。微量に含まれる N-アセチルアミノ酸除去のため、メタノールで結晶を洗浄した (収量: 5.4 g, 34 mmol / 収率: 82.2%)。

Scheme 3. 1



### L-2-アミノオクタン酸(L-Aoc)の Fmoc-基保護

100 mL ナス型フラスコに L-Aoc (5.41 g, 34.0 mmol) , および水 25 mL を加えたのち, DIEA (5.916 mL, 34.0 mmol) を加えた。別容器に 40°C アセトニトリル 25 mL に Fmoc-OSu (11.5g, 34.0 mmol) を溶かした溶液を, 先に用意した L-Aoc-OH/DIEA 溶液に加えた。さらに, アセトンを少量加え, 室温で約 2 時間攪拌した。TLC で原料の消失を確認し, 反応を終了した(C:M:A = 9:3:1,  $R_f$  = 0.67)。その後, 反応溶液を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル層を硫酸マグネシウムで脱水処理後, 減圧濃縮し, ジエチルエーテルで固化した。白色結晶 7.7g の粗生成物を収率 60% で得た。さらに, 粗生成物をメタノールに溶かし, 再び減圧濃縮し, ジエチルエーテルと石油エーテルで固化した。収量 6.9g で Fmoc-Aoc-OH を得た。



### 3・2・3 ペプチド合成および精製

#### **H-Ala-Met-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Met-Ala-OH (2-9X4K, X=Met) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 660 mg に Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (454 mg, 1.38 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は, 0.59 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (559 mg, 0.59 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Met-OH (371 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い, 各アミノ酸の脱保護, および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に, プロトコル⑤に従い, 得られた Fmoc-Ala-Met-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Met-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後, エーテル/ジエチルエーテルで固化し, 白色粉末の粗生成物

H-Ala-Met-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Met-Aoc-OH (377 mg, 0.332 mmol, 収率 100%) を得た。次に, プロトコル⑥に従い, RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 30% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し, 凍結乾燥により収量 18 mg, 収率 9% で白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>S : 905.4, Found : 906 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 13.1 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### **H-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala-OH (2-9X4K, X=Leu) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ

酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.65 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (461 mg, 0.65 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH·H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Leu-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Leu-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Leu-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Leu-Ala-OH (320 mg, 0.368 mmol, 収率 100%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 13% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により収量 62 mg, 収率 39%で白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>39</sub>H<sub>71</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 14.4 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### **H-Ala-Phe-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Phe-Ala-OH (2-9X4K, X=Phe) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.64 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (515 mg, 0.64 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH·H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Phe-OH (387 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得ら

れた Fmoc-Ala-Phe-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Phe-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Phe-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Phe-Ala-OH (560 mg, 0.597 mmol, 収率 100%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 13% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により収量 19.3 mg, 収率 9.7% で白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>45</sub>H<sub>67</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 937.5, Found : 938 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 11.8 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### **H-Ala-Nle-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (2-9X4K, X=Nle) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.68 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (485 mg, 0.68 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Nle-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (325 mg, 0.338 mmol, 収率 100%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 11% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結

乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for  $C_{39}H_{71}O_{11}N_{11}$ : 869.5, Found : 870 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 13.7 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient  $CH_3CN$  / 0.1% TFA over 30 min)

### **H-Ala-Aoc-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Aoc-Ala-OH (2-9X4K, X=Aoc) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 567 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (394 mg, 1.19 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は, 0.61 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (492 mg, 0.61 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Aoc-OH (382 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い, 各アミノ酸の脱保護, および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に, プロトコル⑤に従い, 得られた Fmoc-Ala-Aoc-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Aoc-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後, エーテル/ジエチルエーテルで固化し, 白色粉末の粗生成物

H-Ala-Aoc-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Leu-Aoc-OH (304 mg, 0.329 mmol, 収率 100%) を得た。次に, プロトコル⑥に従い, RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 38% isocratic  $CH_3CN$  / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し, 凍結乾燥により収量 40 mg, 収率 16% で白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for  $C_{43}H_{79}O_{11}N_{11}$ : 925.6, Found : 926 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 15.9 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient  $CH_3CN$  / 0.1% TFA over 30 min)

## H-Ala-Ade-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ade-Ala-OH (2-9X4K, X=Ade) の合成・精製

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 430 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (296 mg, 0.90 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は, 0.60 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (300 mg, 0.60 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (178 mg, 0.54 mmol), Fmoc-Ade-OH (221 mg, 0.54 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (253 mg, 0.54 mmol) を導入した。プロトコル④に従い, 各アミノ酸の脱保護, および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に, プロトコル⑤に従い, 得られた Fmoc-Ala-Ade-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Ade-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後, エーテル/ジエチルエーテルで固化し, 白色粉末の粗生成物

H-Ala-Ade-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ade-Ala-OH (161 mg, 0.164 mmol, 収率 91%) を得た。次に, プロトコル⑥に従い, RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 38% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し, 凍結乾燥により収量 7.5 mg, 収率 6% で白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>47</sub>H<sub>87</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 981.6, Found : 982 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 15.8 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### 3・2・4 界面活性剤溶液の調製

#### 界面活性剤溶液の調製

陰イオン性界面活性剤 Ammonium tetradecanesulfonate (C14SA) は、2・2・3で合成したものを使用した。

CD スペクトル測定、および蛍光測定用の C14SA ストック溶液 20 mM を調製した。サンプル溶液調製には二次蒸留水を使用した。

#### リポソーム溶液の調製

リポソームの脂質として、市販品の卵黄フォスファチジルコリン (EYPC, シグマ社製), および卵黄フォスファチジルグリセロール (EYPG, シグマ社製) を使用した。2・2・3のプロトコル(a), (b) および (c) に従い, leakage 測定用の酸性リポソームの調製, 定量を行った。その結果, 脂質濃度は, 149 mg / dL であった。

### 3・2・5 CD スペクトル測定

CD スペクトル測定は, 円二色性分散計 (J-720, 日本分光株式会社製) を使用し, 30℃下で行なわれた。1 または 0.1 mm 円筒型石英セルを使用した。

ミセル系およびリポソーム系でのペプチド濃度をそれぞれ 1 mM と 150  $\mu$ M とした。得られたデータを平均残基モル楕円率  $[\theta]$  に換算した。

### 3・2・6 チオフラビン T 蛍光測定

チオフラビン T 蛍光強度測定は、以下の手順で行われた。まず、CD スペクトル測定時と同様に、ペプチドおよび界面活性剤各々のストック溶液を準備し、測定開始直前に目的濃度になるように混合した。混合溶液を光路長 1 cm の角型石英セルに移し、30℃下にて蛍光強度を測定した。測定は、分光蛍光光度計 (F-2500 ; 日立製作所株式会社製) を使用し、励起波長 435 nm における 480 nm の蛍光強度を測定した。光源および検出器の波長フィルターはそれぞれ 405 nm と 460 nm の付属品を使用した。

### 3・2・7 CF-leakage 活性測定

CF-leakage 活性測定は、以下の手順で行われた。まず、光路長 1 cm の角型石英セルに、3・2・4 で得られた CF 内包リポソーム溶液を 10  $\mu$ L 採り、20 mM TES/150 mM NaCl 緩衝溶液 (pH 7.4) を 2 mL 加え、希釈した。これに、ペプチドストック溶液 (2 mM) を目的濃度になるように適量加えた。ペプチド添加から 2 分後の漏出した CF を調べるため、励起波長 470 nm における 510 nm での蛍光強度を測定した ( $F$ )。さらに、内包された CF がリポソームから総て漏出したときの値を得るために、Triton<sup>®</sup> X-100 (10  $\mu$ L, 20 % in TES buffer) を加え、このときの蛍光強度を測定した ( $F_t$ )。leakage 活性 (%) は  $100 (F - F_0) / (F_t - F_0)$  の式から算出した。ここで、 $F_0$  はペプチドが加えられていないときの蛍光強度の値である。

### 3・3 結果および考察

#### 3・3・1 水およびメタノール系でのデカペプチドの CD スペクトル

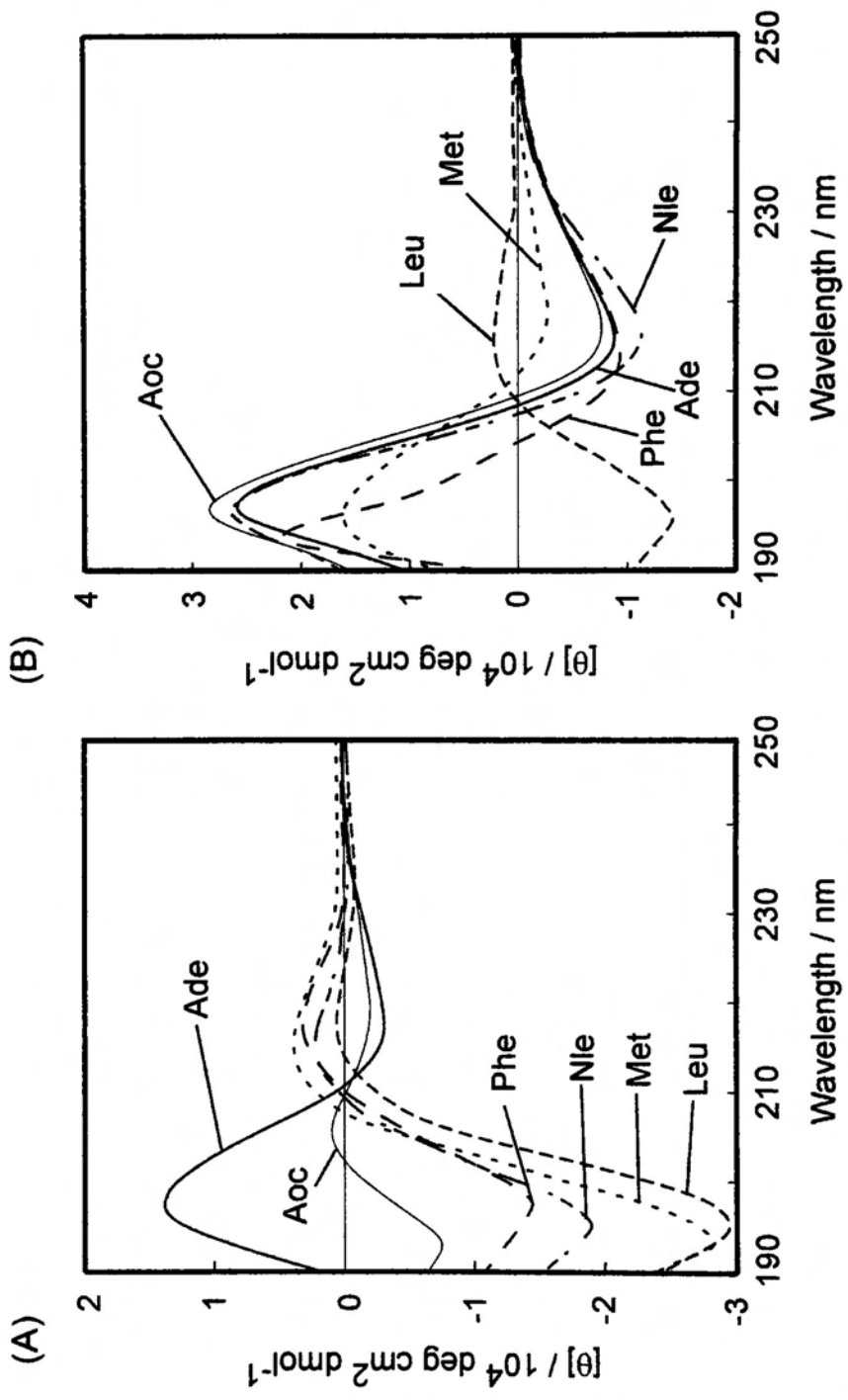
水、メタノール系でのデカペプチドの二次構造を調べる為、CD スペクトル測定を行った。水に対する溶解度が良くなかった為、ペプチド 1 mM に対して 4 mM 塩酸を加えた。また、メタノールに対する溶解度は良好であった。各溶媒系で測定されたスペクトルパターンを Fig. 3. 2 に示す。水系では、Met, Leu, Phe および Nle 導入ペプチドはランダム構造特有のスペクトルを示した。また、Aoc 導入ペプチドは、 $\beta$ -構造とランダムが共存したスペクトルを示し、より鎖長の長い Ade を導入したペプチドは強い $\beta$ -構造を示した。従って、酸性水溶液中では、アミノ酸 X 側鎖の炭素数が 6~8 程度のとき、側鎖間の疎水性相互作用によって $\beta$ -構造を形成できることが示された。

次に、メタノール中では、Leu 導入ペプチドはランダム構造を示したが、他のアミノ酸を導入したペプチドは全て $\beta$ -構造を形成した。特に、側鎖が直鎖である Nle, Aoc, および Ade を導入したペプチドは、ねじれた $\beta$ -構造のスペクトルパターンを示した(4)。これは、195 nm 付近の正の極大ピークが長波長側へレッドシフトした結果に由来する。また、そのピーク強度が約 30000 degree cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup> に近いことから、逆平行 $\beta$ -構造を形成していると思われる

(4)。一方、Phe および Met の場合、195 nm 付近の極大ピーク値は Nle, Aoc, Ade を導入したときと比べて減少した。Phe 導入ペプチドの最大吸収波長は 194 nm であり、他のペプチドと比較するとより短波長側に現れた。これは、Phe 導入ペプチドはねじれた $\beta$ -構造でなく、より平坦な $\beta$ -構造を形成しているといえる。

以上をまとめると、水、メタノール中では側鎖の構造によって $\beta$ -構造形成パターンに差が見られた。特に、ねじれた $\beta$ -構造形成には、側鎖の疎水性も必要であるが、さらに直鎖構造であることが必要であることがわかった。





**Fig. 3. 2** CD spectra of 2-9X4K (X = Leu, Nle, Met, Phe, Aoc and Ade) in H<sub>2</sub>O (A) and methanol (B). [peptide] = 1 mM. H<sub>2</sub>O is containing 4 mM HCl, at 30°C.

**Table 3.2** Conformation of 2-9X4K in H<sub>2</sub>O and methanol.  
 2-9X4K : Ala-Xaa-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Xaa-Ala

amino acid Xaa	side chain -R	H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	methanol <sup>c</sup>		$\mu^{\circ}_{\text{org}} - \mu^{\circ}_{\text{w}}$ (cal mol <sup>-1</sup> )	
			$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$[\theta]_{\text{max}}$ (deg cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup> )		
methionine	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub>	random	β	197	16000	-1300 <sup>d</sup>
leucine	-CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	random	random	-	-	-1800 <sup>d</sup>
phenylalanine	-CH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	random	β	194	22000	-2500 <sup>d</sup>
norleucine	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	random	β	197	26000	-2600 <sup>d</sup>
2-aminooctanoic acid	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	random / β <sup>b</sup>	β	197	26000	-
2-aminodecanoic acid	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	β	β	197	26000	-

<sup>a</sup> [peptide] = 1 mM and [HCl] = 4 mM.

<sup>b</sup> Mixed spectrum of random and β-sheet.

<sup>c</sup> [peptide] = 1 mM.

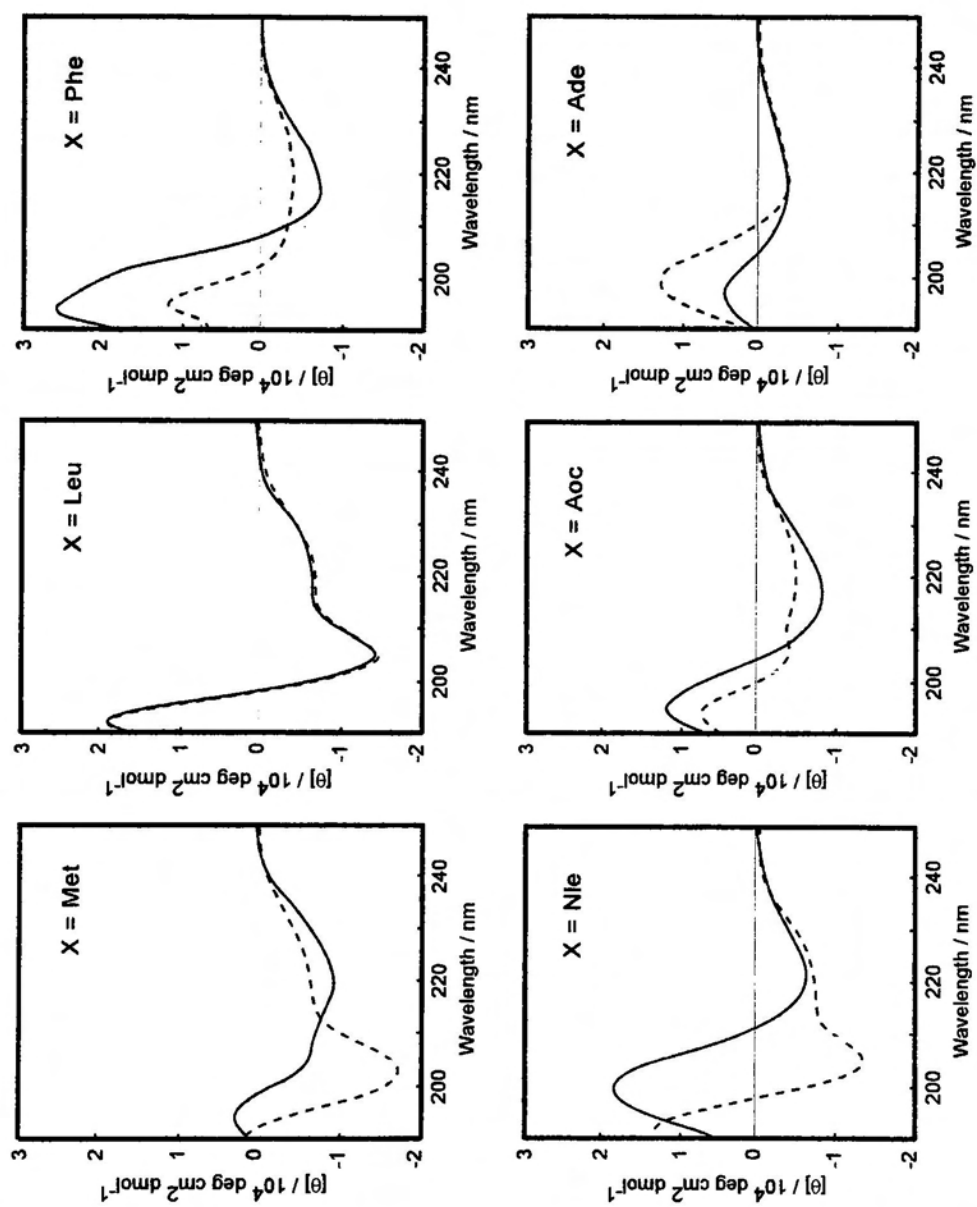
<sup>d</sup> Free energy of the shift to an organic solvent from water, taken from Nozaki and Tanford. [Ref. 2]

### 3・3・2 ミセル系でのデカペプチドの CD スペクトル

陰イオン性界面活性剤 C14SA 系での 2-9X4K の CD スペクトル変化を Fig. 3. 3 に示す。ミセルとペプチドを混合した直後と 24 時間後では、導入した疎水性アミノ酸 X の種類によって時間に伴うスペクトル変化に差が確認された。まず、水またはメタノール中で特定のコンホメーションを示さなかった Met, Leu および Nle 導入ペプチドは、ミセル存在下では $\alpha$ -ヘリックス構造を示した。 $\alpha$ -ヘリックス構造の CD スペクトルは、二つの負の極大 (222 nm および 205 nm 付近) を持つ (5)。また、より長鎖である Aoc 導入ペプチドも $\alpha$ -ヘリックス構造を形成したが、ヘリックス-ヘリックス間で相互作用をしていた。これは、スペクトル中の二つの負の極大値のうち、222 nm のモル残基楕円率の方が 208 nm より大きい値を示したからである(6, 7)。さらに Aoc より長鎖である Ade を導入したペプチドは、 $\beta$ -構造を形成した。Ade 導入ペプチドは、水中でさえも $\beta$ -構造を形成したことから、ミセルの有無に関係なく $\beta$ -構造が形成されやすいと考えられる。また、Phe 導入ペプチドは不明瞭なスペクトルを示した。

24 時間後には、Nle, Aoc および Phe 導入ペプチドは $\alpha$ -ヘリックスから $\beta$ -構造へ転移した。Nle 導入ペプチドは 218 nm の負の極大が長波長側へシフトしたことより、強くねじれた $\beta$ -構造(4)を形成していると考えられる。また、Met 導入ペプチドは、ヘリックスが会合したスペクトル(6, 7)を示した。Met および Nle の側鎖は、*n*-butyl 基と methylthioethyl 基であり、互いに直線構造である。しかし、ミセル存在下では、異なる二次構造を形成した。また、Leu 導入ペプチドは $\alpha$ -ヘリックス構造のまま、数日間安定であった。

以上の結果より、ミセル系での $\beta$ -構造は、2-9X4K に導入される疎水性アミノ酸 X の側鎖が直線型であることが必要とされた。



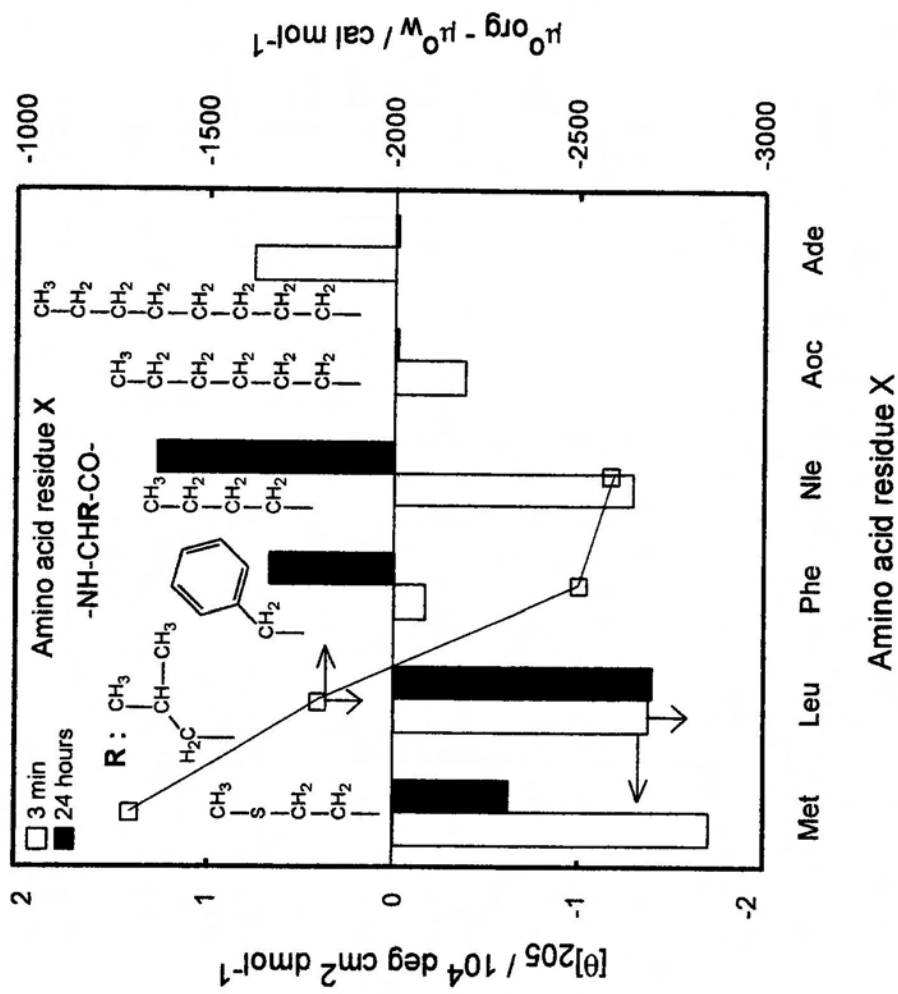
**Fig. 3. 3** CD spectra of 2-9X4K in C14SA solution after 3 min (dashed lines) incubation and after 24 h incubation (solid lines).  $[C14SA] = 17 \text{ mM}$ ,  $[peptide] = 1 \text{ mM}$  and  $[HCl] = 4 \text{ mM}$ , at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3・3・3 デカペプチドのコンホメーション変化と Hydrophobic scale との関係

ミセル系において、導入されたアミノ酸の疎水性を比較するために、Fig. 3. 3 で得られた 205 nm のモル残基楕円率の値( $[\theta]_{205}$ )を各アミノ酸に対してプロットした(Fig. 3. 4)。グラフ中のバーは、負のとき、 $\alpha$ -ヘリックス含量が多いことを表し、正のとき、 $\beta$ -シート含量が多いことを表す。また、第二軸は、Tanford らが算出した疎水性度 [Hydrophobicity scale]の値 (2) をプロットした。

アミノ酸 X の疎水性度が大きくなるにつれ、 $[\theta]_{205}$  の変化は大きくなり、 $\alpha/\beta$ 構造転移はアミノ酸 X の影響を受けているといえると考えられる。さらに興味深いことに、インキュベート開始 3 分後から 24 時間後の $[\theta]_{205}$  値の変動傾向は、アミノ酸 X の疎水性度の傾向とほぼ一致していた。C14SA ミセル存在下では、ノルロイシン導入ペプチドが、最も $\alpha/\beta$ 構造転移しやすいことが明らかになった。

また、ミセルが存在すると、Aoc および Ade 導入ペプチドは、 $\beta$ -構造形成が困難になることがわかった。これは、Aoc 側鎖の *n*-hexyl 基、あるいは Ade 側鎖の *n*-octyl 基とミセルの疎水領域との親油的相互作用が強くなり、一旦形成された $\beta$ -構造が時間と共に緩和されていったのではないかと考えられる。



**Fig. 3.4** Changes in molar ellipticity at 205 nm for amino acid residues X, taken from data in Fig. 3.3. Open columns: after 3 min incubation, and shaded columns: after 24 h incubation. The free energy shift from water to an organic solvent ( $\mu^{\text{org}} - \mu^{\text{o}_w}$ ) is shown by squares.  $[\text{C14SA}] = 17 \text{ mM}$ ,  $[\text{peptide}] = 1 \text{ mM}$  and  $[\text{HCl}] = 4 \text{ mM}$ , at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

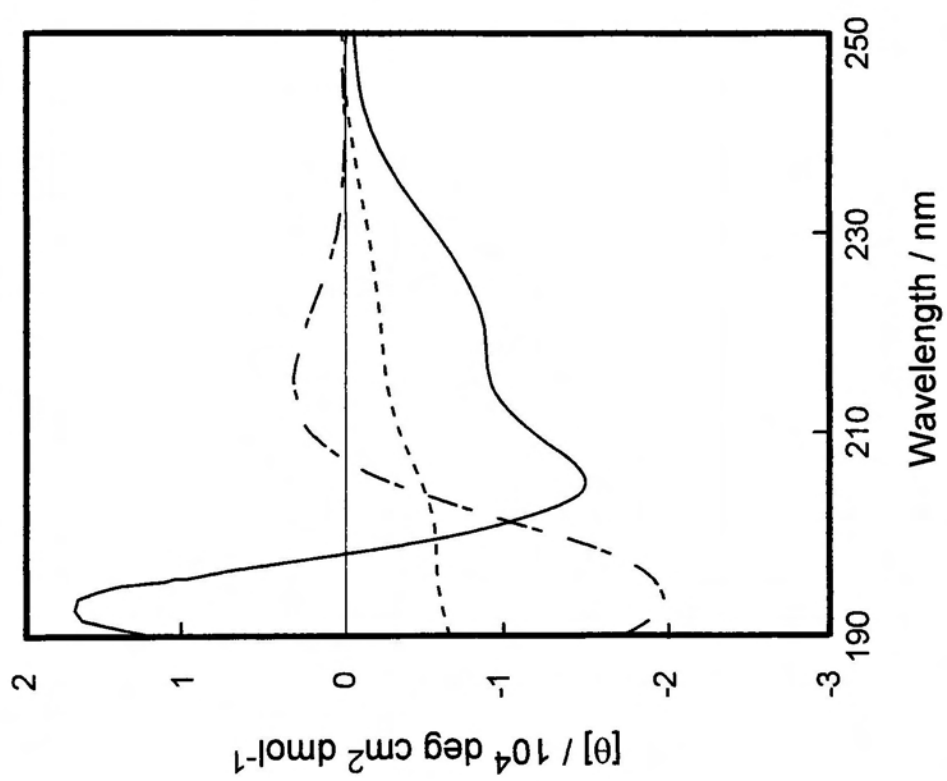
### 3・3・4 デカペプチドのコンホメーションに与えるミセル表面電荷の影響

陰イオン性，陽イオン性，非イオン性界面活性剤のミセル系における 2-9X4K (X=Nle) の CD スペクトルを Fig. 3. 5 に示す。

陽イオン性界面活性剤は臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (C16TAB)，非イオン性界面活性剤はドデシルジメチルフォスフィンオキシド (C12DPO) を使用した。CD 測定時のサンプル濃度は，ペプチド 1 mM および 活性剤濃度 17 mM とした。

まず，測定開始後，C14SA ミセル系では $\alpha$ -ヘリックス構造を，C16TAB 系では不明瞭なスペクトルを，C12DPO 系ではランダム構造を示した。C14SA 系で $\alpha$ -ヘリックス構造を形成した理由として，C14SA の親水基である $-\text{SO}_3^-$  基とペプチドの Lys 側鎖，N-末端の $-\text{NH}_3^+$  基との静電相互作用による影響が大きいと考えられる。また，24 時間後では，C14SA 系でのみスペクトル変化が確認された。

以上の結果より，2-9X4K の $\alpha$ -ヘリックス形成にはミセル-ペプチド間の静電相互作用が必要であることが示された。



**Fig. 3.5** CD spectra of 2-9X4K (X = Nle) in various surfactant solutions; C14SA (solid line), C16TAB (short dashed line) and C12DPO (dotted and dashed line). [surfactant] = 17 mM, [peptide] = 1 mM and [HCl] = 4 mM, at 30 °C.



### 3・3・5 デカペプチドのコンホメーションに与えるミセル濃度の影響

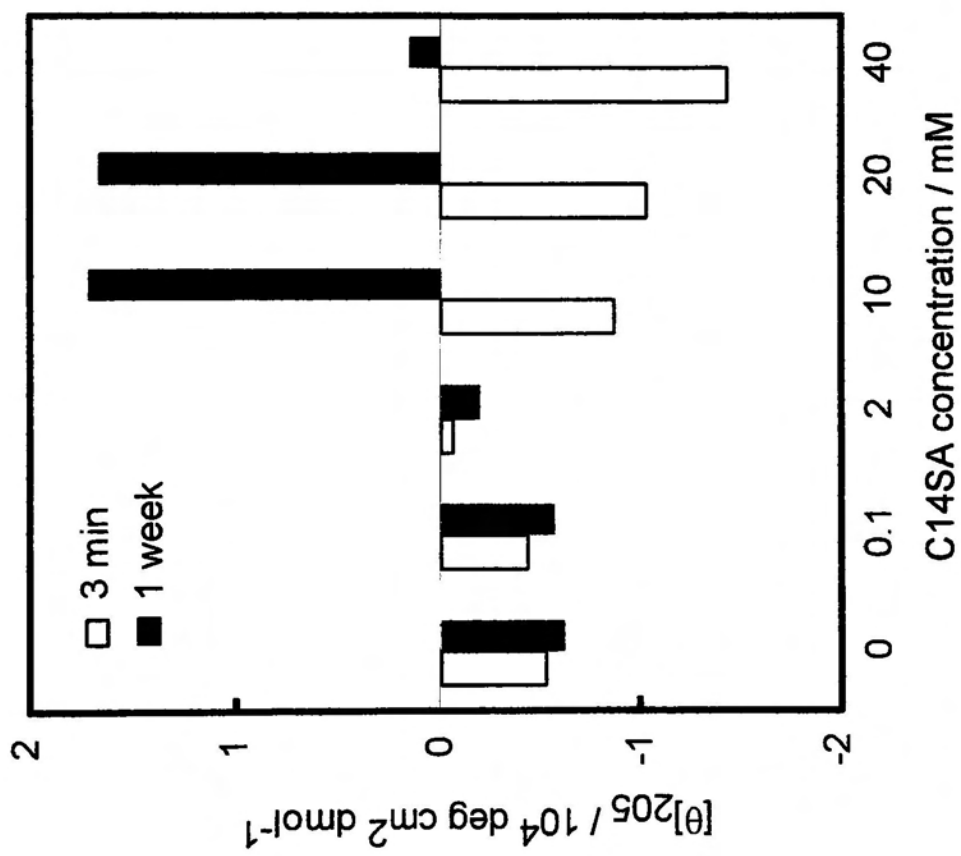
#### (1) ノルロイシン導入型ペプチド

ミセル濃度変化による 2-9X4K の構造を調べるために、C14SA 濃度 0.1~40 mM の範囲内での CD スペクトル測定を行った。Figure 3.4 と同様に、 $[\theta]_{205}$  の値を Y 軸に、また、X 軸に濃度をプロットしたものを Fig. 3.6 に示す。

C14SA 濃度が 10 mM および 20 mM のとき、 $\alpha$ -ヘリックスから $\beta$ -構造への構造転移が確認された。しかし、40 mM という高濃度条件では、 $\beta$ -構造へ転移しなかった。この結果より、 $\beta$ -構造への転移は活性剤濃度に強く依存することが示された。C14SA ミセルの会合数は約 80 であり(8)、C14SA 濃度 40 mM のとき、ペプチド 1 mM なら、ミセル粒子 1 個あたりに存在するペプチドは約 2 分子になる。従って、ペプチド濃度一定の条件下では、活性剤濃度が高くなるにつれ、ミセル上のペプチド濃度が減少、つまり、 $\alpha$ -ヘリックスから $\beta$ -構造への転移は妨げられると考えられる。

一方、C14SA 濃度が低いとき (<2 mM) は、ペプチドを加えた途端に白濁が生じた。これは、C14SA 分子とペプチドが共沈を起こしているためによるものと思われる。

以上の結果より、ミセル系で 2-9X4K (X=Nle) が $\alpha$ -ヘリックスから $\beta$ -構造へ転移するためには、ミセル粒子 1 個あたりのペプチド分子が 2 分子以上必要であることがわかった。



**Fig. 3. 6** Changes in molar ellipticity at 205 nm after 3 minute (open columns) and 1 week (shaded columns) in the C14SA concentration range of 0 - 40 mM. [peptide] = 1 mM, [HCl] = 4 mM at 30 °C.

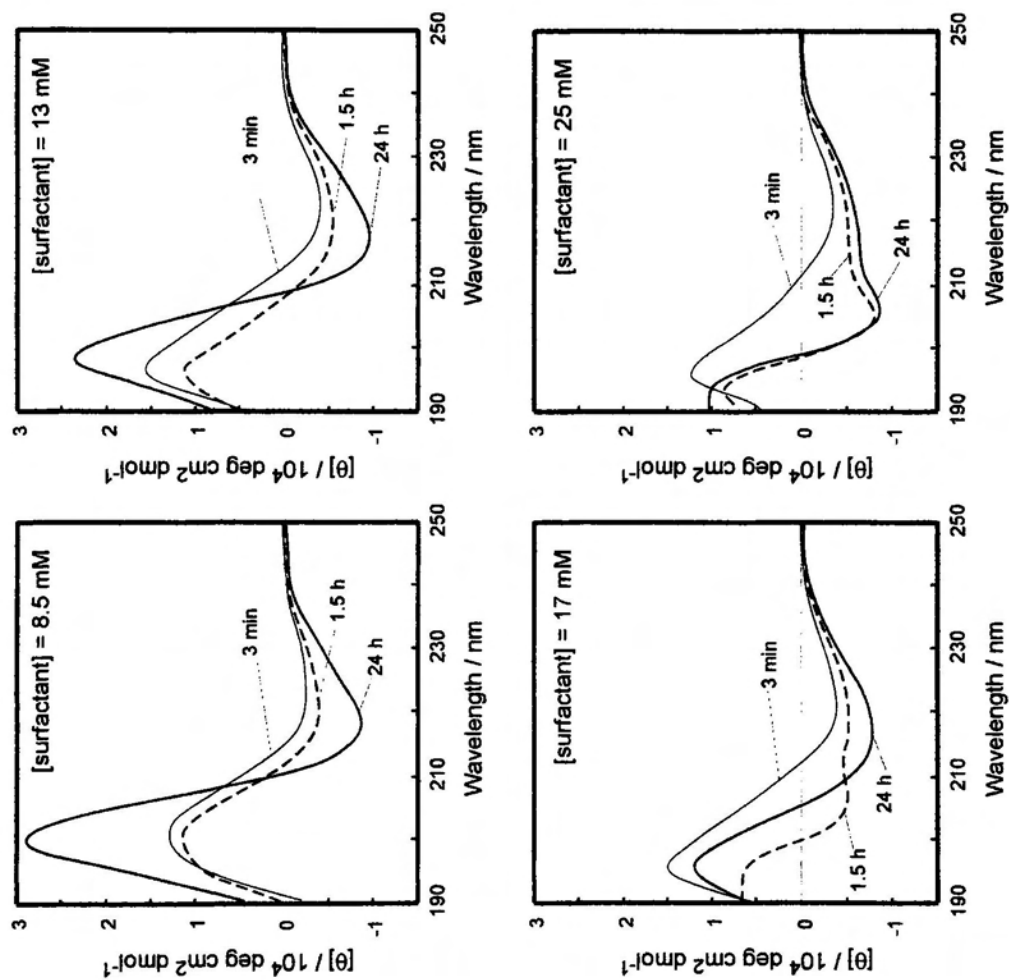
## (2) 2-アミノオクタン酸導入型ペプチド

2-アミノオクタン酸導入ペプチド 1 mM 一定条件下、活性剤濃度変化に伴うコンホメーション変化を調べた。2-アミノオクタン酸導入型ペプチドは試料が少なかつたため、活性剤濃度 8.5 mM, 13 mM, 17 mM, 25 mM の4点についてのみ調べた。得られた CD スペクトルを Fig. 3.7 に示す。

ペプチド濃度一定条件下、C14SA 濃度 8.5 mM および 13 mM のとき、サンプル混合直後、 $\beta$ -シート構造の形成が確認された。この濃度では、 $\alpha$ -ヘリックス構造を経ずに、 $\beta$ -シートが形成された。C14SA 濃度 17 mM では、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成したのち、徐々に $\beta$ -シート構造へと転移する過程が観察された。さらに、C14SA 濃度 25 mM では $\alpha$ -ヘリックス構造で安定化し、 $\beta$ -シート構造は形成されなかつた。

C14SA 低濃度のとき、ノルロイシン導入型ペプチドは $\alpha/\beta$ 構造転移したが、2-アミノオクタン酸導入型は $\alpha$ -ヘリックス構造を形成できずに $\beta$ -シート構造を形成した。これは、Aoc 側鎖 (*n*-hexyl 基) 同士の疎水性相互作用が強い為に、分子間で $\beta$ -シート構造を形成したものと考えられる。

また、C14SA 濃度が高いとき、2-アミノオクタン酸導入型ペプチドの $\alpha$ -ヘリックス構造は、ノルロイシンの場合と比べて安定だった。その理由として、2-アミノオクタン酸側鎖の *n*-hexyl 基とミセル内部の炭化水素鎖領域との強い相互作用によって、ヘリックス構造が安定化されたことが予想される。



**Fig. 3. 7** CD spectra of 2-9X4K (X: Aoc) in C14SA solution after 3 min incubation (thin lines), after 1.5 h incubation (dashed lines) and after 24 h incubation (bold lines). [peptide] = 1 mM and [C14SA] = 4 mM, at 30 °C.

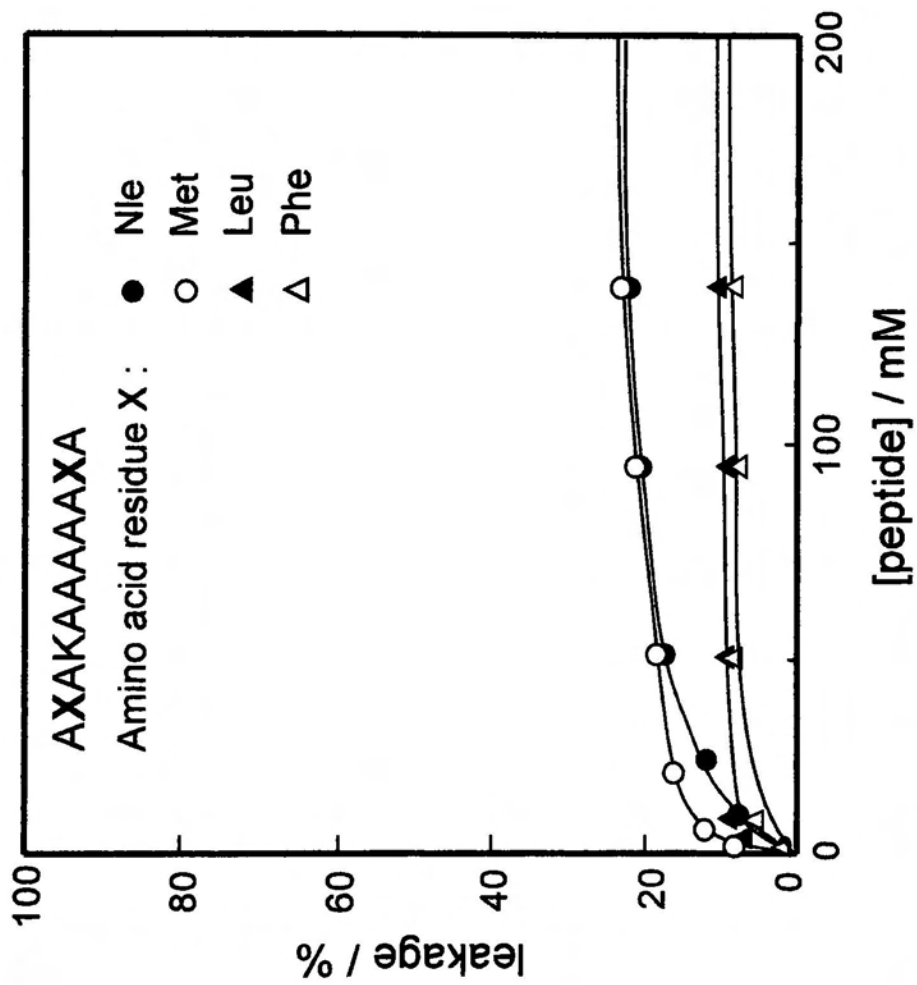
### 3・3・6 様々な疎水性アミノ酸を含むデカペプチドの CF-leakage 活性

リポソームに対する相互作用を調べるために、CF-leakage 活性測定を行った。各ペプチドの濃度に対する leakage 活性(%)を Fig. 3.8 に示す。

疎水性アミノ酸は、すべてのペプチドにおいて2および9番目に導入されている。つまり、leakage 活性の値は導入された疎水性アミノ酸の特性をほぼ反映すると思われる。著者は、この実験で、側鎖の長さがほぼ等しい Nle, Met, Leu および Phe を導入したペプチドにおける leakage 活性を調べた。

活性測定の結果、特に強い leakage を示すアミノ酸は確認されなかった。しかし、低活性ながらも側鎖の長さや構造の違いによって、2つの傾向がみられた。まず、Nle と Met 導入ペプチドは、100  $\mu$ M 近傍で約 20 %の leakage 活性を示した。この2つのアミノ酸は、側鎖に *n*-butyl 基と methylthioethyl 基をもつ。両者とも長さはほぼ等しく、直線型構造である。また、Leu と Phe 導入ペプチドは、100  $\mu$ M 近傍で約 10 %の leakage 活性を示した。この2つのアミノ酸は、側鎖に *iso*-butyl 基と benzyl 基をもち、ノルロイシンやメチオニンと比べるとかさ高い側鎖構造である。Fig. 3.8 で示されるように、側鎖構造が直線的であるほうが、弱いながらも leakage 活性を示したのは、興味深い現象である。

ペプチドがリポソーム内部へ侵入するメカニズムは、今のところ明らかになってはいない。しかし、最近、Ohta らは、CF 内包リポソームを用いて、アミノ酸型界面活性剤の侵入作用に関する実験結果を報告した(9)。その結果、アミノ酸型界面活性剤は協同的に会合してリポソームに侵入することが明らかになった。アミノ酸型界面活性剤には分子内にアミドがあるため、分子間で水素結合を形成しやすい。同様にノルロイシン導入ペプチドも、協同的作用によって会合体を形成し、リポソームへ侵入したと推察される。

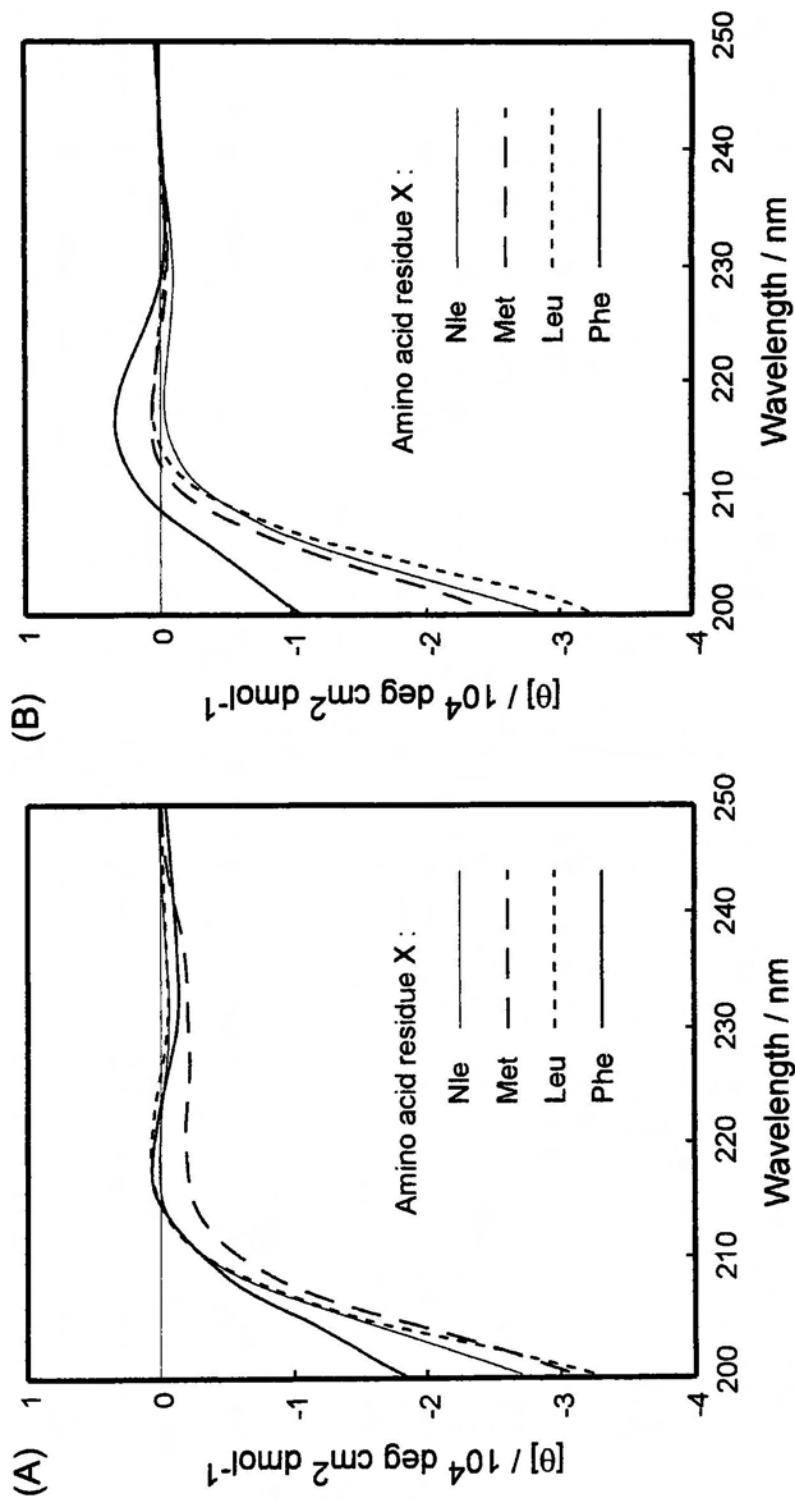


**Fig. 3. 8** Profiles of CF leakage as a function of the peptide concentration in 20mM TES/150 mM NaCl buffer (pH 7.4) containing 100  $\mu$ M EYPC/EYPG (3/1) liposomes. The fluorescence intensity was recorded at 515 nm with excitation at 470 nm at 30  $^{\circ}$  C.

次に、脂質存在下での、各ペプチドのコンホメーションを調べた。得られた CD スペクトルを **Fig. 3.9** に示す。

リポソームの有無に関わらず、全てのペプチドはほぼランダム構造であった。しかし、フェニルアラニン導入型ペプチドは、リポソームが存在するとカルボニル基由来の波長域 220-210 nm が微増した。これは、フェニルアラニンの側鎖フェニル基間の $\pi$ - $\pi$ 相互作用、または側鎖フェニル基/炭化水素間の CH- $\pi$ 相互作用によって、主鎖カルボニル基の弱い誘起スペクトルが出現したものである。

以上をまとめると、リポソーム存在下ではペプチドの疎水性が変化しても特定の構造をとることはなく、leakage 活性の向上は見られなかった。



**Fig. 3. 9** CD spectral changes of 2-9X4K in the absence (A) and presence (B) of EYPC/EYPG (3/1). [peptide] = 100  $\mu\text{M}$ , [lipid] = 100  $\mu\text{M}$ , 5 mM TES buffer, pH 7.4.

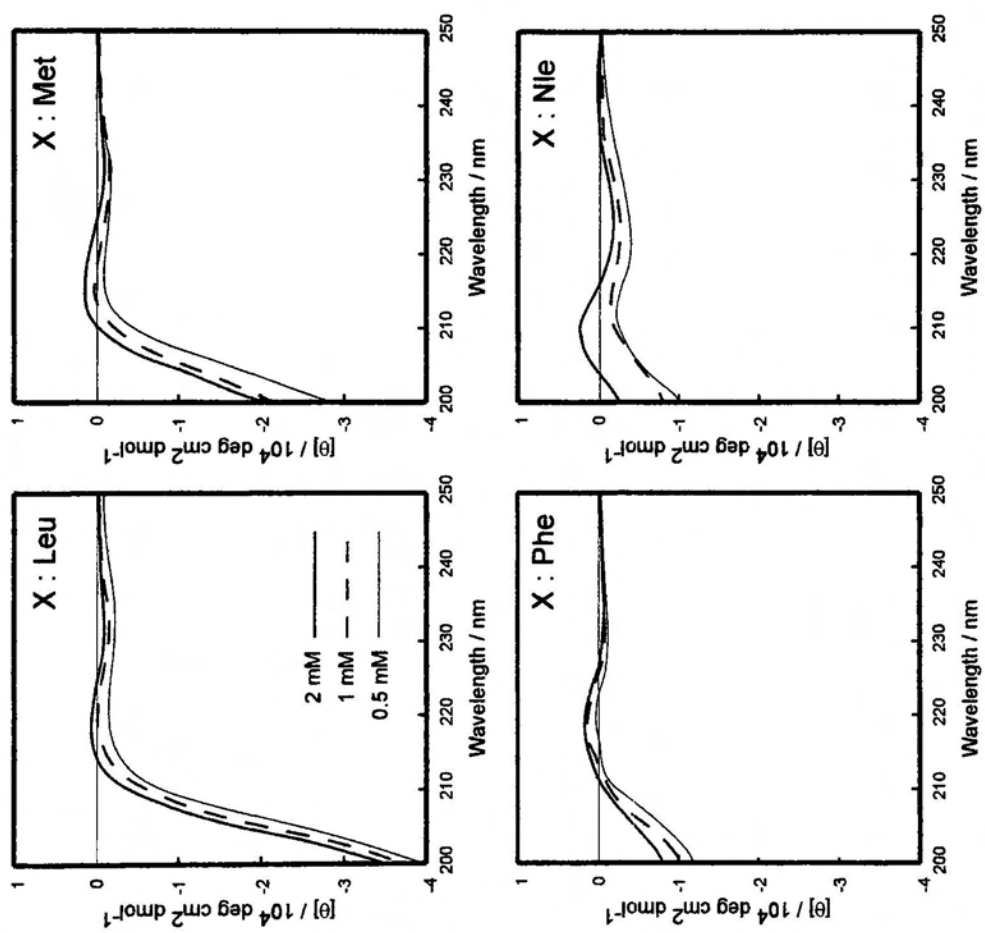


### 3・3・7 様々な疎水性アミノ酸を含むデカペプチドの会合特性

疎水性アミノ酸を含むペプチドは、Fig. 3.9 で示されているように、pH 7.4 の緩衝溶液中ではほぼランダム構造であった。測定時のペプチド濃度は 100  $\mu$ M であり、これらのペプチドはモノマーとして存在していた可能性が高い。従って、より高濃度条件下で、疎水性アミノ酸導入ペプチドの CD スペクトル測定を行った。緩衝溶液中、ペプチド濃度 0.5 mM, 1 mM および 2 mM の環境下で測定した。得られたスペクトルを Fig. 3.10 に示す。

Leu および Met 導入ペプチドは、濃度に関係なくランダム構造であった。また、Phe と Nle 導入ペプチドは、ランダム構造特有のスペクトルパターンを示さなかった。Phe と Nle は、Tanford らが定義した疎水性度の高いアミノ酸に分類される。特に、Nle 導入ペプチドは 220 nm 付近に弱い負の極大が確認された。このような 220 nm 付近の弱いスペクトル変化は、主鎖カルボニル基の配向の違いによるものと考えられ、ペプチドの分子間会合が起こっていることが示唆される。つまり、Nle 側鎖の *n*-butyl 基間の疎水性相互作用によって、ペプチド分子間の会合が促進されたと考えられる。

以前、El-Agnaf らは、アミロイド $\beta$ ペプチド(A $\beta$ )の凝集に関する研究のなかで、酸化された Met の代わりに Nle を用いて実験を行った(10)。その結果、Nle を導入した A $\beta$ は、導入していない A $\beta$ に比べて、アミロイド線維形成が加速されたことが明らかとなった。このように、ノルロイシンは、ペプチド分子間の会合性を向上させる疎水性アミノ酸の一つであるといえるだろう。



**Fig. 3. 10** CD spectra of 2-9X4K (X: Leu, Met, Phe and Nle) in the peptide concentration range of 0.05 mM to 2 mM with 5 mM TES buffer containing 100 mM NaCl at pH 7.4.

### 3・4 結言

本章で、著者は、多様な疎水性アミノ酸を導入したアラニンベースペプチドを合成し、ミセルおよびリポソームとペプチドとの粒子間に生じる疎水性および静電相互作用を評価した。その結果、 $\beta$ -シート形成には、導入される疎水性アミノ酸側鎖の構造が直線的であることが必要であることがわかった。また、疎水性アミノ酸導入ペプチドの $\alpha/\beta$ 構造転移は、Tanford らが定義した疎水性スケールの傾向と一致し、ミセル荷電および濃度に強く影響を受けた。一方、リポソーム存在下では、4種の疎水性アミノ酸の種類に関係なく、強い leakage 活性を示すペプチドは確認されなかった。また、緩衝溶液中では、ノルロイシン導入ペプチドの自己会合が確認された。

## 参考文献

1. C.Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Krieger Pub. Co., pp. 138-140 (1991).
2. Y. Nozaki and C. Tanford, *J. Biol. Chem.*, Vol. **246**, 2211-2217 (1971).
3. T. Niidome, M. Kimura, T. Chiba, N. Ohmori, H. Mihara and H. Aoyagi, *J. Peptide Res.*, Vol. **49**, 563-569 (1997).
4. M.C. Manning, M. Illangasekare and R.W. Woody, *Biophys. Chem.*, Vol. **31**, 77-86 (1988).
5. N. Greenfield and G.D. Fasman, *Biochemistry*, Vol. **8**, 4108-4116 (1969).
6. W. Kohn, C.M. Kay and R.S. Hodges, *Protein Sci.*, Vol. **4**, 237-250 (1995).
7. T.J. Graddis, D.G. Myszka and I.M. Chaiken, *Biochemistry*, Vol. **32**, 12664-12671 (1993).
8. H.V. Tartar and A.L. M. Lelong, *J. Phys. Chem.*, Vol. **59**, 1185 – 1190 (1955).
9. 太田明雄・安原主馬・大橋麻衣子・小玉泰史・浅川毅・宮岸重好, 第 43 回日本油化学会年会講演予稿集, pp. 80, (2004).
10. J. El-Agnaf, *Eur. J. Biochem.*, Vol. **256**, 560-569 (1998).



## 第4章 ノルロイシンを位置変化したデカペプチドと界面活性剤との相互作用

### 4.1 はじめに

著者は、リシンスキャンによって陰イオン性ミセル存在下で $\alpha/\beta$ 構造転移するアラニンリッチペプチドの配列を特定し(第2章)、構造転移に適したミセル濃度を明らかにした(第3章)。このように、ミセルのような荷電粒子が存在するとき、10残基程度の短いペプチドの立体構造は側鎖の性質に強く影響される。螺旋状の $\alpha$ -ヘリックス構造の場合、ペプチド鎖の両端(N-, C-末端)の主鎖の水素結合はほどけた状態である。従って、より短いペプチドにとって最安定構造は分子内水素結合から成る $\alpha$ -ヘリックス構造より、分子間水素結合から成る $\beta$ -シート構造であるといえるだろう。

一般的なタンパク質の場合、二次構造を予測する方法として、Chou-Fasman法(1)が知られている。この方法では、アラニン(Ala; A)は $\alpha$ -ヘリックス構造を形成しやすいアミノ酸として位置づけられる。しかし、ヘリックス性の高いアラニンを多く含む場合でも、その立体構造は一義的ではない。例えば、先に述べた2-9X4Kは、水溶液中でランダムであるが、ミセルのような荷電粒子が存在すると、2-9X4Kはミセルと相互作用し、 $\alpha$ -ヘリックス構造へと変化した。さらに、共存するミセルの運動性にともない(2)、 $\alpha$ -ヘリックス構造からより安定な $\beta$ -シート構造へ移行した。これは、ペプチド分子間でNle側鎖の*n*-butyl基同士が相互作用し、会合が強化された結果である。

また、ミセル濃度によってペプチドの立体構造が変化したのは、ミセルおよびNle側鎖の炭化水素鎖間に生じる疎水性相互作用が原因であると思われる。ミセルとペプチドのような異種分子間で起こる疎水性相互作用の微妙なバランスによって、ペプチドの立体構造は変化すると考えられる。また、リシンスキャンのように、アミノ酸の位置によってペプチドの立体構造は変化することから、ノルロイシンスキャンの試みは、様々な立体構造を示すペプ

チドの配列特定に有用な手法である。

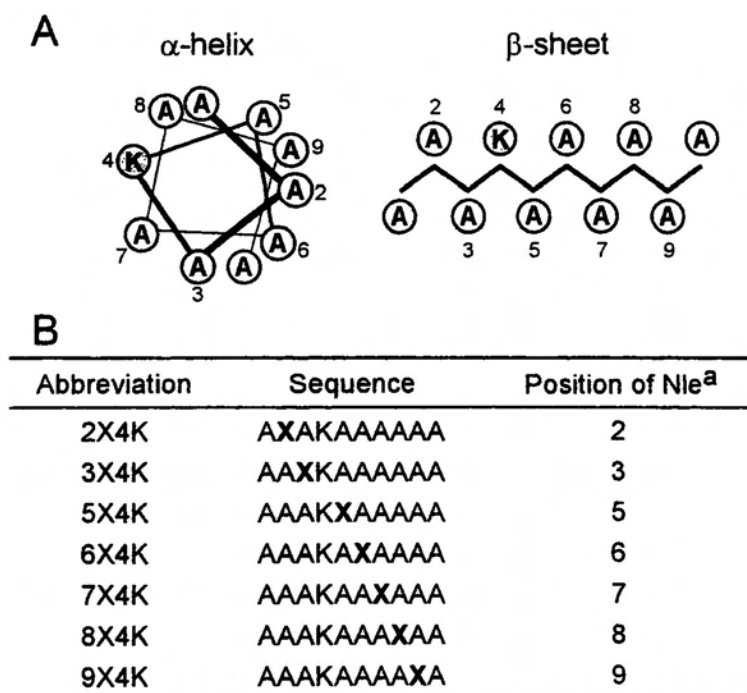
著者は、本章で、アラニンリッチペプチドの疎水性アミノ酸位置と立体構造との関係の評価するため、導入する Nle 残基数を 2 残基から 1 残基へ減らし、ノルロイシンスキャンを行う。そして、ノルロイシンスキャンペプチドとミセル、またはリポソームとの相互作用について調べることを目的とする。

10 残基という短いペプチドへ導入された疎水性アミノ酸 (Nle; X) および塩基性アミノ酸 (Lys; K) の位置が、全体のコンホメーションにどのような影響を与えるのか、という点に着目し、主に分光学的手法から得られたデータをもとに考察する。

## 4・2 実験

### 4・2・1 デカペプチドの設計

ミセル存在下で $\alpha/\beta$ 構造転移を生じた 2-9X4K [AXAKAAAAXA (X = Nle)] の配列をもとに、ノルロイシンをスキャンしたペプチドを設計した。実際は、Lys (K) を4残基目に固定し、Nle を2から9残基目までシフトしたデカペプチド計7種を合成した。 $\alpha$ -ヘリックスおよび $\beta$ -シート構造の模式図およびそのアミノ酸配列を Fig. 4. 1 に示す。1残基および10残基目にノルロイシンが位置するペプチドについては、末端基効果があると予想されたので合成を行わなかった。



<sup>a</sup> Position of substitution of Ala by Nle in Figure 1A.

**Fig. 4. 1** Schematic representation of decapeptides in  $\alpha$ -helix and  $\beta$ -sheet structures (A), amino acid sequences of norleucine-scanning decapeptides: an amino acid X represents a norleucine residue (B).



#### 4・2・2 デカペプチドの合成

##### **H-Ala-Nle-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-OH (2X4K)の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 645 mg に Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (645 mg, 0.3 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は, 0.44 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (766 mg, 0.44 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い, 各アミノ酸の脱保護, および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に, プロトコル⑤に従い, 得られた Fmoc-Ala-Nle-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後, エーテル/ジエチルエーテルで固化し, 白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-OH (327 mg, 0.395 mmol, 収率 100%) を得た。次に, プロトコル⑥に従い, RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し, 凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 827.5, Found : 828 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 14.8 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

##### **H-Ala-Ala-Nle-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-OH (3X4K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い, Wang resin 476 mg に Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (331 mg, 1.00 mmol) を導入した。プロトコル②に従い, 樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang Resin への導入率は, 0.62 mmol / g resin であった。次に, プロトコル③に従い, ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (484 mg, 0.62 mmol / g resin) に対して, Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (329

mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Ala-Nle-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Ala-Nle-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-OH (235 mg, 0.284 mmol, 収率 95%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 3%-15% gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA (20 min.) とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 827.5, Found : 828 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 5.5 min. (column : Chromolith, 4.6 x 100 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min.)

#### **H-Ala-Ala-Ala-Lys-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-OH (5X4K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 476 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (331 mg, 1.00 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang Resin への導入率は、0.62 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。

Fmoc-Ala-resin (600 mg, 0.55 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Ala-Ala-Lys-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-OH (205 mg, 0.241 mmol, 収率 98%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液

の条件を 3%-10% gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA (20 min.) とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 827.5, Found : 850 (M + Na)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 5.2 min. (column : Chromolith, 4.6 x 100 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### **H-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-OH (6X4K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 476 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (331 mg, 1.00 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.62 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。

Fmoc-Ala-resin (403 mg, 0.62 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-OH (210 mg, 0.254 mmol, 収率 100%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 5% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 827.5, Found : 850 (M + Na)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 5.6 min. (column : Chromolith, 4.6 x 100 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### **H-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Nle-Ala-Ala-OH (7X4K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 476 mg に Fmoc-Ala-OH ·

H<sub>2</sub>O (331 mg, 1.00 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.62 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (403 mg, 0.62 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-OH (217 mg, 0.262 mmol, 収率 100%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 5% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 827.5, Found : 828 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 5.9 min. (column : Chromolith, 4.6 x 100 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

### **H-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-Ala-OH (8X4K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 645 mg に Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (444 mg, 0.9 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.57 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (582 mg, 0.57 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH・H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-Ala-resin の脱保護と樹脂

からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (239 mg, 0.289 mmol, 収率 87%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 827.5, Found : 850 (M + Na)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 14.8 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### **H-Ala-Ala-Ala-Lys-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-OH (9X4K) の合成・精製**

ペプチド合成のプロトコル①に従い、Wang resin 645 mg に Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (444 mg, 0.9 mmol) を導入した。プロトコル②に従い、樹脂へのアミノ酸導入率を求めた。Fmoc-Ala-OH の Wang resin への導入率は、0.61 mmol / g resin であった。次に、プロトコル③に従い、ペプチド鎖の伸長を行った。Fmoc-Ala-resin (582 mg, 0.57 mmol / g resin) に対して、Fmoc-Ala-OH · H<sub>2</sub>O (329 mg, 1 mmol), Fmoc-Nle-OH (353 mg, 1 mmol), または Fmoc-Lys(Boc)-OH (469 mg, 1 mmol) を導入した。プロトコル④に従い、各アミノ酸の脱保護、および縮合反応終了時に Kaiser test を行った。次に、プロトコル⑤に従い、得られた Fmoc-Ala-Ala-Ala-Lys(Boc)-Ala-Ala-Ala-Ala-Nle-Ala-resin の脱保護と樹脂からの切断を同時に行った。反応溶液を減圧濃縮後、エーテル/ジエチルエーテルで固化し、白色粉末の粗生成物

H-Ala-Nle-Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Nle-Ala-OH (271 mg, 0.327 mmol, 収率 98%) を得た。次に、プロトコル⑥に従い、RP-HPLC 精製を行った。溶離液の条件を 19% isocratic CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA とした。分取液を減圧濃縮し、凍結乾燥により白色粉末の目的物を得た。

FAB MS ; Calcd. for C<sub>36</sub>H<sub>65</sub>O<sub>11</sub>N<sub>11</sub>: 827.5, Found : 828 (M + H)<sup>+</sup>

HPLC ; Rt = 14.8 min. (column : TSKgel ODS-120, 4.6 x 150 mm, 0-100% linear

gradient CH<sub>3</sub>CN / 0.1% TFA over 30 min)

#### 4・2・3 界面活性剤溶液の調製

##### ミセル溶液の調製

陰イオン性界面活性剤 Ammonium tetradecanesulfonate (C14SA) は、2・2・3 で合成したものを使用した。

CD スペクトル測定、および蛍光測定用の C14SA ストック溶液 20 mM を調製した。サンプル溶液には、二次蒸留水を使用した。

##### リポソーム溶液の調製

リポソームの脂質として、市販品の卵黄フォスファチジルコリン (EYPC, シグマ社製), および卵黄フォスファチジルグリセロール (EYPG, シグマ社製) を使用した。2・2・3 のプロトコル(a), (b) および (c) に従い, leakage 測定用の酸性リポソームの調製, 定量を行った。その結果, 脂質濃度は, 149 mg / dL であった。

#### 4・2・4 CD スペクトル測定

CD スペクトル測定は円二色性分散計 (J-720, 日本分光株式会社製) を使用して 30°C 下で行った。1 または 0.1 mm 円筒型石英セルを使用した。ペプチド濃度は, ミセル系では 1 mM, リポソーム系では 150 μM とした。得られたデータは平均モル残基楕円率  $[\theta]$  に換算した。

#### 4・2・5 チオフラビンTによるアミロイド形成能評価

##### チオフラビンT 蛍光測定

チオフラビンT 蛍光強度測定は、以下の手順で行われた。まず、CD スペクトル測定時と同様に、ペプチドおよび界面活性剤各々のストック溶液を準備し、測定開始直前に目的濃度になるように混合した。混合溶液を光路長 1 cm の角型石英セルに移し、30℃下にて蛍光強度を測定した。測定は、分光蛍光光度計 (F-2500 ; 日立製作所株式会社製) を使用し、励起波長 435 nm における 480 nm の蛍光強度を測定した。光源および検出器の波長フィルターはそれぞれ 405 nm と 460 nm の付属品を使用した。

#### 4・2・6 CF-leakage 活性測定

##### CF-leakage 活性測定

CF-leakage 活性測定は、以下の手順で行われた。まず、光路長 1 cm の角型石英セルに、4・2・3 の操作で得られた CF 内包リポソーム溶液を 10  $\mu$ L 採り、20 mM TES/150 mM NaCl 緩衝溶液 (pH 7.4) を 2 mL 加えて希釈した。これに、ペプチドストック溶液 (2 mM) を目的濃度になるように適量加えた。ペプチド添加から 2 分後の漏出した CF を調べるために、励起波長 470 nm における 510 nm での蛍光強度を測定した ( $F$ )。さらに、内包された CF がリポソームから総て漏出したときの値を得るために、Triton<sup>®</sup> X-100 (10  $\mu$ L, 20 % in TES buffer) を加え、このときの蛍光強度を測定した ( $F_t$ )。leakage 活性 (%) は  $100 (F - F_0) / (F_t - F_0)$  の式から算出した。ここで、 $F_0$  はペプチドが加えられていないときの蛍光強度の値である。

#### 4・2・7 透過型電子顕微鏡観察

顕微鏡観察試料は以下の手順で作成した。まず、ペプチド/C14SA 溶液は、それぞれ 1 mM / 17 mM になるように調製し、室温で 2 週間インキュベートした。測定時にその溶液を 10 倍希釈して、TEM 観察に使用した。次に、ペプチド希釈溶液 5  $\mu$ L をカーボン膜を貼った電子顕微鏡用銅製グリッド(応研商事株式会社製) (200 mesh) にのせた。30 秒後、濾紙片でグリッド上の液を吸い取り、蒸留水をさらに 1 滴のせた。10 秒後に、余分な蒸留水を濾紙片で吸い取り、2% リンタングステン酸水溶液をのせて、30 秒後に濾紙片で吸い取った。2 日間、真空乾燥した後、TEM 観察を行った。観察は H-9000NAR (日立製作所株式会社製) を使用し、100 kV の加速電圧で行った。



### 4・3 結果および考察

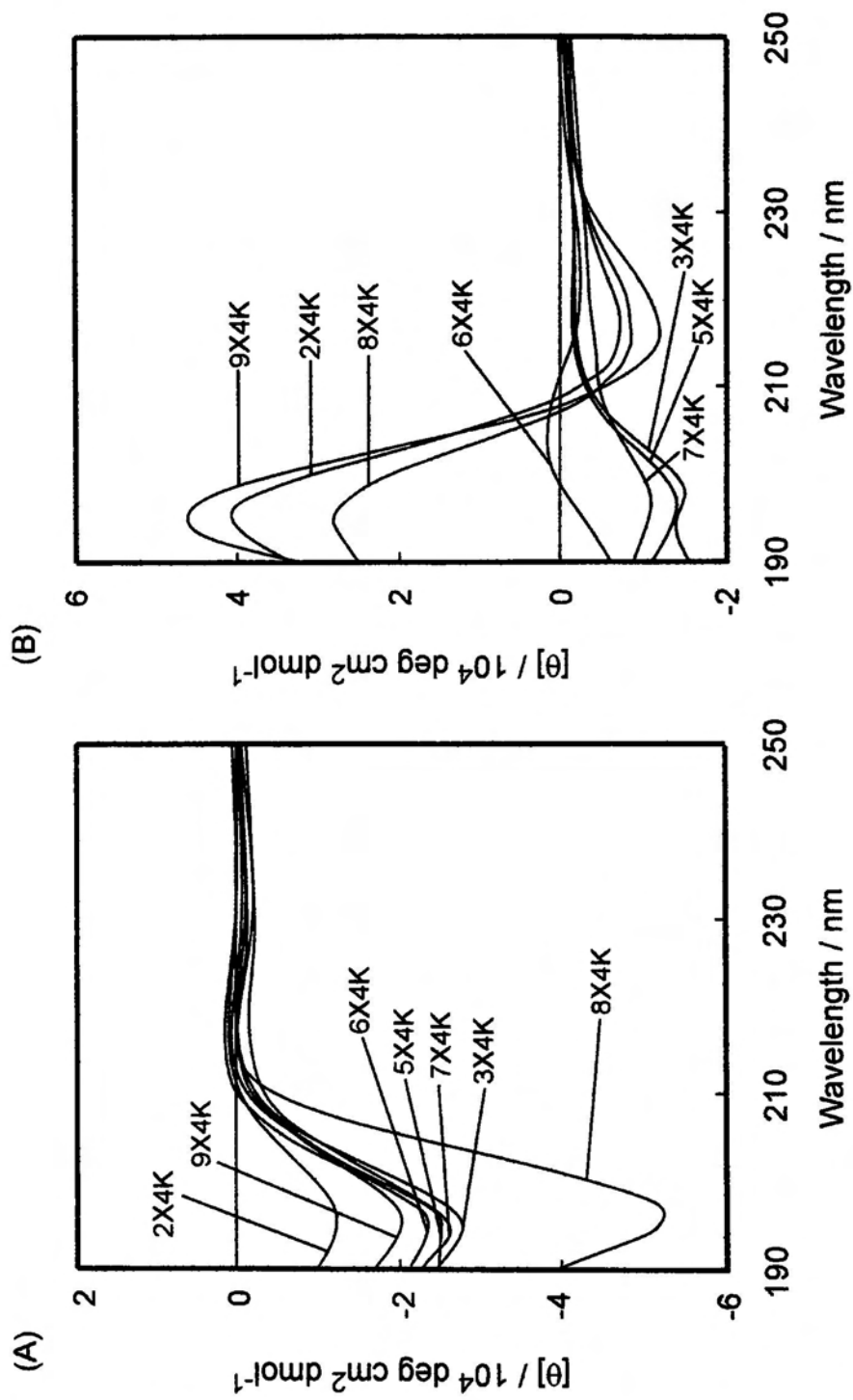
#### 4・3・1 デカペプチドの CD スペクトル変化

水、メタノール系での CD スペクトルを Fig. 4.2 に示す。

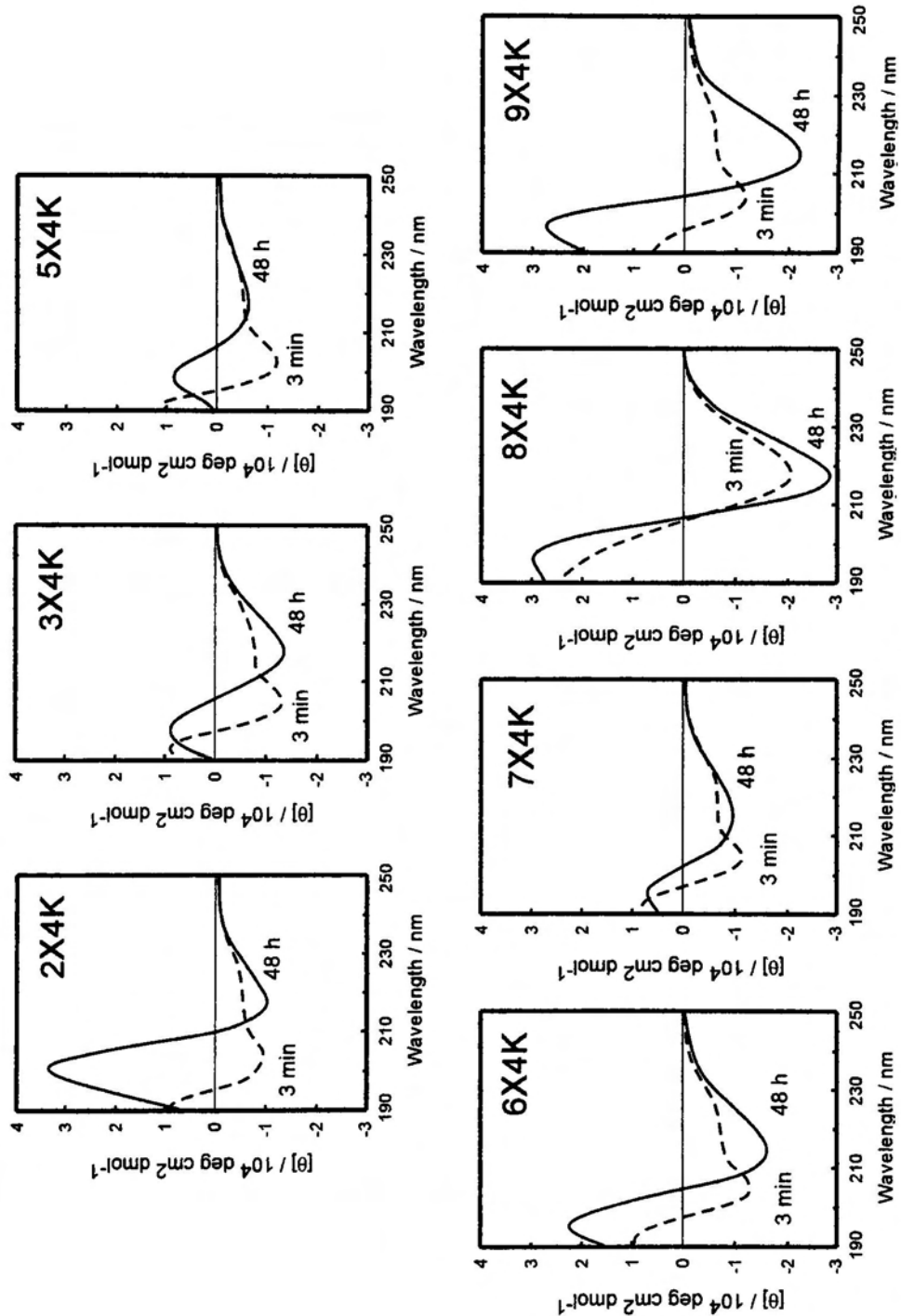
まず、水中では、すべてのペプチドがランダム構造のスペクトルパターンを示した。ノルロイシンスキャンペプチドは、ノルロイシンの位置によるスペクトル変化が確認された。

また、メタノール中では 2X4K, 6X4K, 8X4K および 9X4K が  $\beta$ -構造を形成した。このうち、2X4K, 6X4K, 8X4K は、 $\beta$ -シート構造形成時、Lys (K) と Nle (X) の側鎖がシート面に対して同一方向に揃う。しかし、9X4K は、Lys (K) と Nle (X) が互いに反対に位置したにも関わらず、 $\beta$ -構造を形成した。また、Nle を 1 残基有するノルロイシンスキャンペプチドでさえも  $\beta$ -構造を形成したことから、メタノール中での立体構造はノルロイシンの残基数に影響されないことが明らかになった。次に、陰イオン性界面活性剤 C14SA ミセル中での CD スペクトル測定を行った。3 分後と 48 時間後に得られたスペクトルを Fig. 4.3 に示す。ほとんどのペプチドは、 $\alpha$ -ヘリックスから  $\beta$ -シートへの構造転移を生じた。しかし、8X4K は、サンプル溶液混合直後から  $\alpha$ -ヘリックス構造を形成せず、 $\beta$ -構造を形成した。混合サンプル溶液の白濁は確認されなかった。 $\alpha$ -ヘリックスから  $\beta$ -シート構造への転移を比較するために、3 分後と 48 時間後の 205 nm でのモル残基楕円率の差  $\Delta[\theta]_{205}$  をプロットした。X 軸に  $\Delta[\theta]_{205}$  の値を、Y 軸にペプチドの種類をあらわしたグラフを Fig. 4.4 に示す。 $\Delta[\theta]_{205}$  の値が大きいほど  $\alpha$ -ヘリックスから  $\beta$ -シート構造への転移が起こりやすいことを意味する (3)。ノルロイシンを 2 残基有する 2-9X 系の方が 1 残基有する系より  $\Delta[\theta]_{205}$  の値が大きいことから、ミセル存在下では配列中に疎水性アミノ酸が多い方が明確な構造転移が起こっているといえる。また、N-端からノルロイシン残基が遠ざかるにつれて  $\Delta[\theta]_{205}$  の値が減少することから、ノルロイシン側鎖 *n*-butyl 基がミセルと強く相互作用することでペ

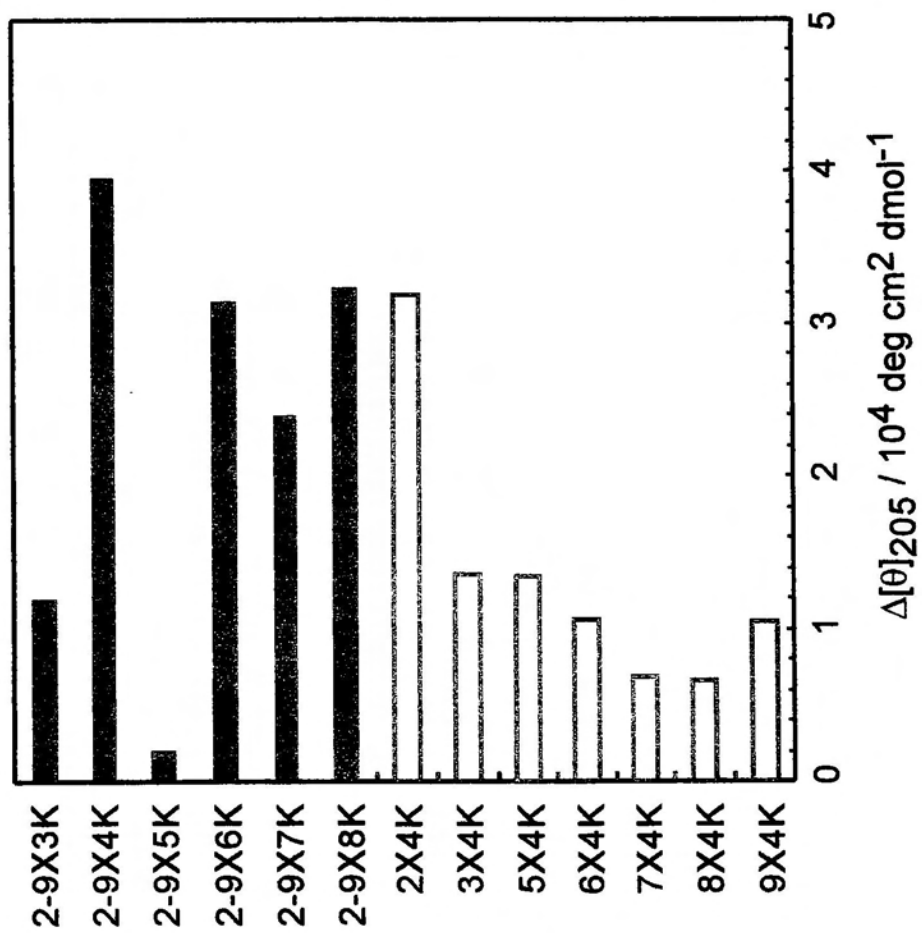
プチド分子の動きが制限されたと考えられる。従って、 $\alpha/\beta$ 構造転移は、N-端、<sup>4</sup>Lys および N1e の位置に大きく影響されることが示された。



**Fig. 4.2** CD spectra of norleucine-scanning decapeptides in H<sub>2</sub>O (A) and methanol (B). [peptide] = 1 mM, H<sub>2</sub>O is containing 4 mM HCl, at 30°C.



**Fig. 4.3** CD spectral change of Nle-scanning peptides in anionic micellar solution at 3 minutes and 48 hours. [peptide] = 1 mM, [C14SA] = 17 mM, and [HCl] = 4 mM, at 30 °C.



**Fig. 4.4** Differences in mean residue ellipticities at 205 nm from 3 minutes to 48 hours.

**Table 4. 1** Conformation of the peptides in various solvent conditions.

peptide	sequence	solvent condition		
		H <sub>2</sub> O <sup>a)</sup>	methanol <sup>b)</sup>	C14SA <sup>c)</sup>
2X4K	AXAKAAAAAA	random	β	α-helix → β
3X4K	AAXKAAAAAA	random	random	α-helix → β
5X4K	AAAKXAAAAA	random	random	α-helix → β
6X4K	AAAKAXAAAA	random	β/ random <sup>d)</sup>	α-helix → β
7X4K	AAAKAAXAAA	random	random	α-helix → β
8X4K	AAAKAAAXAA	random	β	β
9X4K	AAAKAAAAAXA	random	β	α-helix → β
2-9X4K	AXAKAAAAAXA	random	β	α-helix → β

<sup>a</sup> [peptide] = 1 mM and [HCl] = 4 mM.

<sup>b</sup> [peptide] = 1 mM.

<sup>c</sup> [peptide] = 1 mM, [HCl] = 4 mM and [C14SA] = 17 mM.

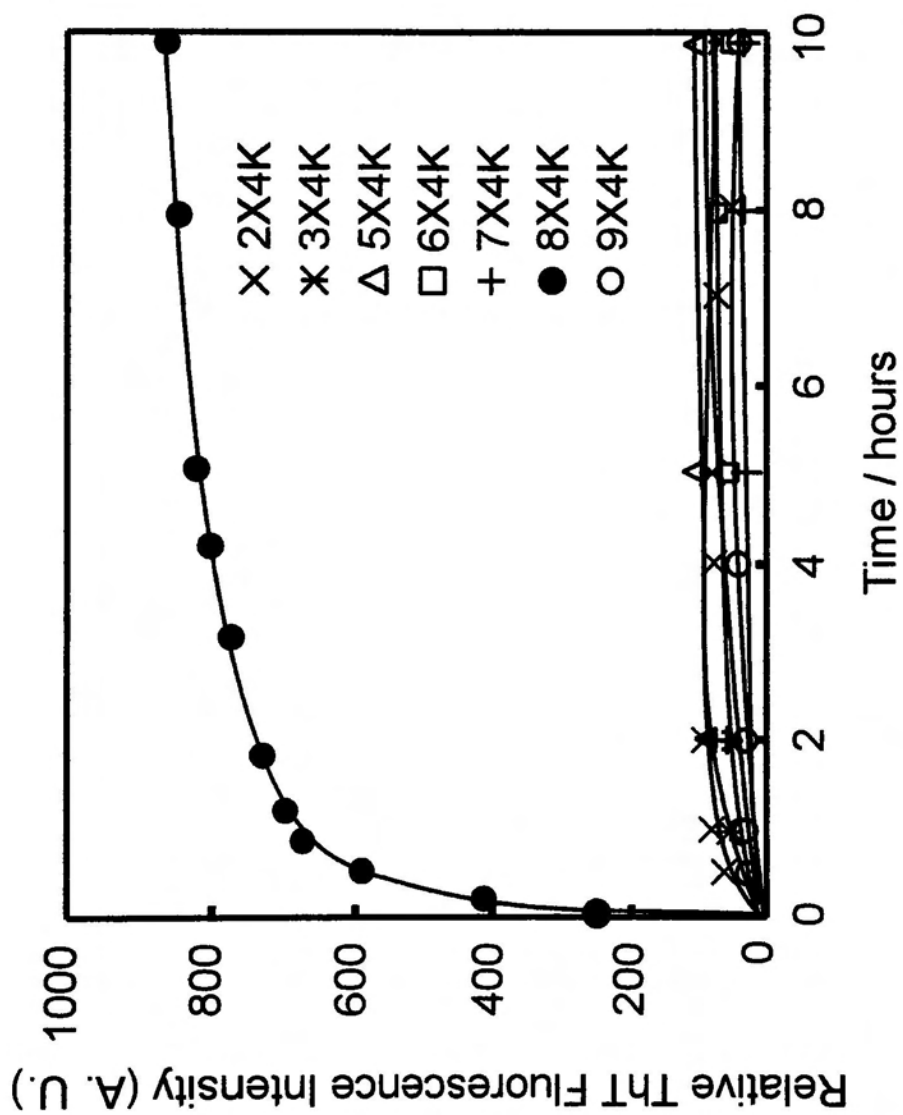
<sup>d</sup> Mixed spectrum of random and β-structure.

#### 4・3・2 チオフラビンTによるアミロイド形成能評価

リシンスキャンペプチドと同様に陰イオン性ミセル共存下でのノルロイシンスキャンペプチドのアミロイド形成能について調べた。時間に対する蛍光強度変化を Fig. 4.5 に示す。蛍光強度は、435 nm の励起波長における 480 nm の蛍光強度をプロットした。

ミセルと混合した直後から 8X4K の蛍光強度は急激に増大した。このような急激な変化は、8X4K の CD スペクトル変化とほぼ一致する。従って、8X4K はミセル添加後、直ちに $\beta$ -シート構造を形成し、さらに会合したアミロイド様線維を形成していると考えられる。一方、8X4K 以外のペプチドの蛍光強度の増大はみられなかった。従って、CD スペクトルでは $\beta$ -シート構造を示したが、蛍光強度の増大がみられなかったデカペプチドは、分子間で $\beta$ -シート構造までは形成できるものの、さらに伸長したアミロイド線維までは形成することができないといえる。

また、蛍光強度の増加傾向について第2章の 2-9X4K の場合と比較すると、2-9X4K はシグモイド曲線的な増加であったのに対して、8X4K の場合はそうではなかった。従って、ミセル存在下で 8X4K は 2-9X4K とは異なる会合様式でアミロイド様線維を形成していると考えられる。



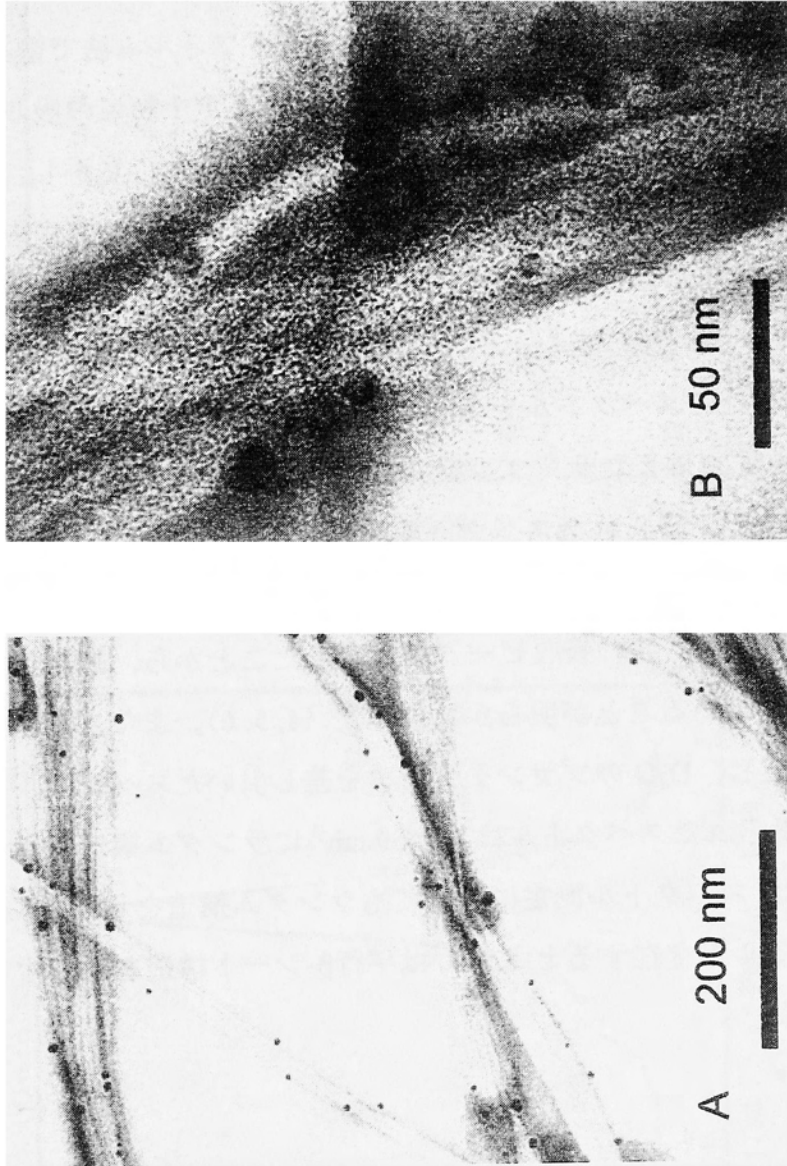
**Fig. 4.5** Time course of ThT fluorescence intensity at 480 nm. [peptide] = 1 mM, [C14SA] = 17 mM, [HCl] = 4 mM and [ThT] = 6 μM, at 30 °C.



### 4・3・3 アミロイド様線維の TEM 観察

チオフラビンT法でアミロイド様線維形成能が最も高かった 8X4K の透過型電子顕微鏡観察 (TEM) を行った。C14SA ミセル共存下、室温で2週間インキュベートしたサンプルを観察した。得られた画像を **Fig. 4. 6** に示す。

**Figure 4. 6-A** では、幅が約 50 nm 程度の線維がみられた。さらに高倍率の画像 **Fig. 4. 6-B** では、幅が約 10 nm 程度の線維が集積した形態であった。 $\beta$ -シート構造形成時における 8X4K の幅は約 3.5 nm であるが、**Fig. 4. 6-B** の画像では、線維幅は約 10 nm 程度であり、やや大きい。しかし、混合した界面活性剤テトラデシルスルホン酸アンモニウムとペプチドの複合体によるチューブとは考えにくい。もし、テトラデシルスルホン酸アンモニウムのベシクル状会合であるとするれば、内水相を考慮に入れると、チューブの直径は 10 nm 以上になると予想されるからである。

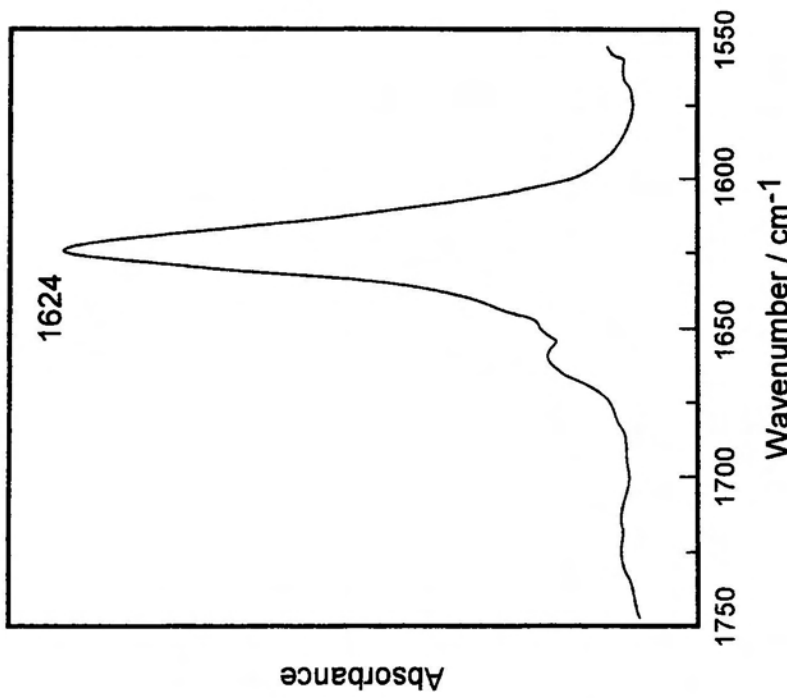


**Fig. 4. 6** Electron micrographs of 8X4K with C14SA. The fibrils were formed by incubating 1 mM 8X4K in 17 mM C14SA solution containing 4 mM HCl at r.t. for 2 weeks and then applying these samples to the grid. Magnification, 53000 $\times$  (A), 25000 $\times$  (B).

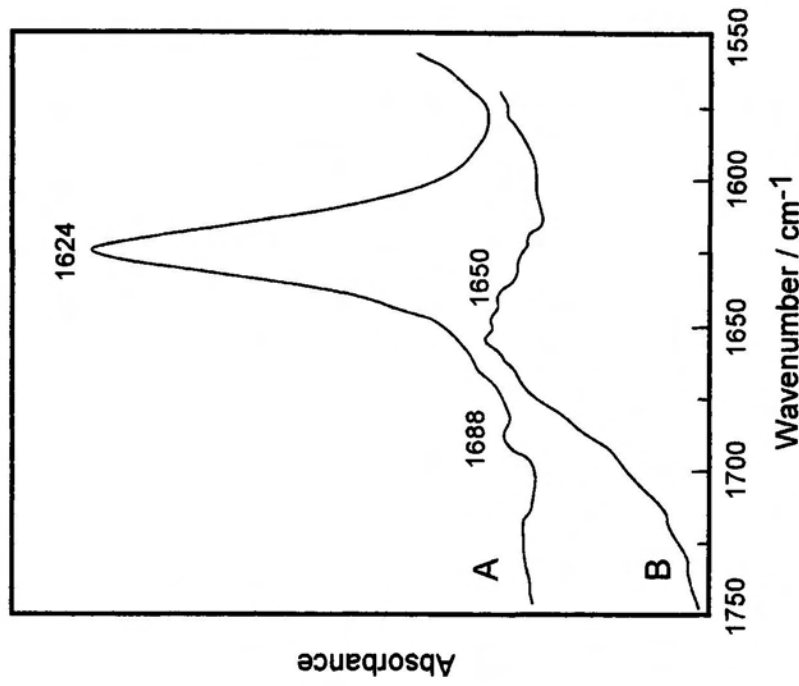
#### 4・3・4 ミセル系における $\beta$ -シート構造のFTIRスペクトル解析

ノルロイシンスキャンペプチドのうち 8X4K は、陰イオン性ミセル存在下で $\beta$ -シート構造で会合し、アミロイド様線維を形成した。さらに、 $\beta$ -シート構造が平行か逆平行かを調べるために、FTIR 測定を行った。アミロイド様線維が確認されたサンプル溶液を  $\text{CaF}_2$  上にキャストフィルム法で塗布、乾燥させた。得られたスペクトルを **Fig. 4. 7** に示す。アミド I 領域の吸収帯である  $1624 \text{ cm}^{-1}$  付近に $\beta$ -シート特有の鋭いピークが見られた。しかし、逆平行 $\beta$ -シートの場合に出現する  $1690 \text{ cm}^{-1}$  付近の弱いピーク(4, 5, 6)が見られなかったため、8X4K は平行 $\beta$ -シート構造であることが示唆された。

また、対照サンプルとして 4 mM DCl を含む  $\text{D}_2\text{O}$  中での 8X4K の FTIR 測定を行った。得られたスペクトルを **Fig. 4. 8** に示す。まず、ペプチド 1 mM に対して DCl 4 mM を加えたサンプル溶液を  $\text{CaF}_2$  上にキャストフィルム法で塗布し、乾燥させた。得られたスペクトルを **Fig. 4. 8-A** に示す。アミド I 領域である  $1624 \text{ cm}^{-1}$  付近に、 $\beta$ -シート構造特有の鋭いピークが観察された。また、 $1688 \text{ cm}^{-1}$  付近に弱い吸収ピークが出現したことから、逆平行 $\beta$ -シート構造が形成されていることが明らかになった (4, 5, 6)。また、同サンプルを乾燥せずに測定し、 $\text{D}_2\text{O}$  のブランクデータを差し引いたスペクトルを **Fig. 4. 8-B** に示す。得られたスペクトルは、 $1650 \text{ cm}^{-1}$  にランダム構造を示す吸収ピークを示し、CD スペクトル測定においてもランダム構造を示した。従って、陰イオン性ミセルが存在すると 8X4K は平行 $\beta$ -シート構造を形成することが明らかになった。



**Fig. 4. 7** Infrared spectrum of the amide I region of 8X4K with micelles after 2 weeks. The spectrum of the micelles was subtracted from that of the 8X4K mixture with micelles.

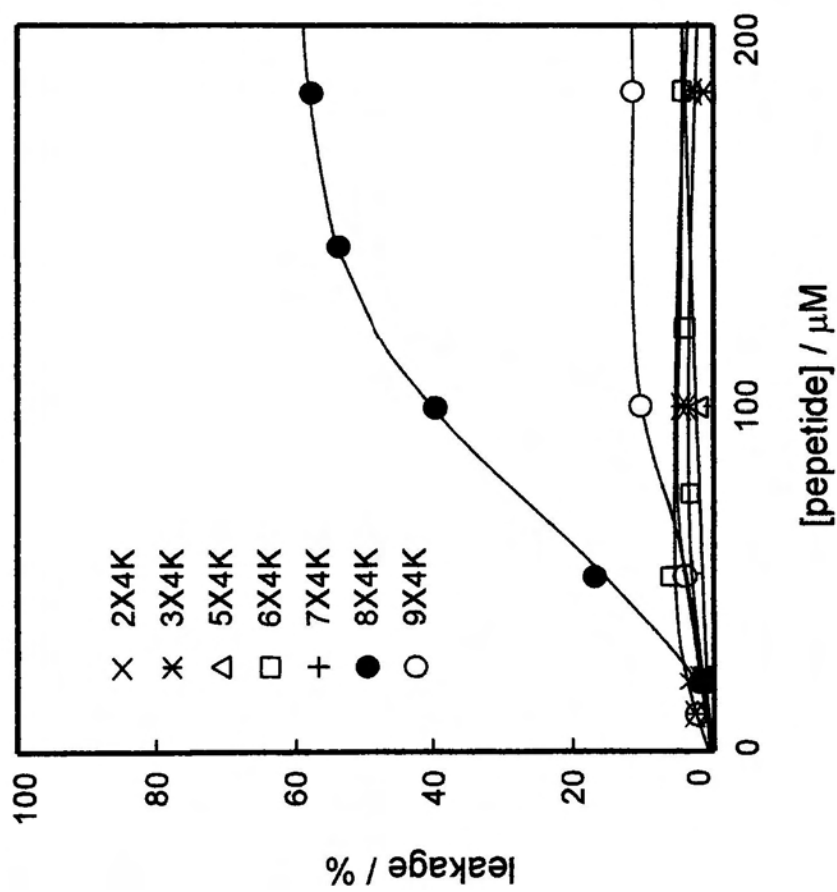


**Fig. 4. 8** Infrared spectrum of the amide I region of 8X4K in D<sub>2</sub>O containing 4 mM HCl at dried (A) and nondried (B).

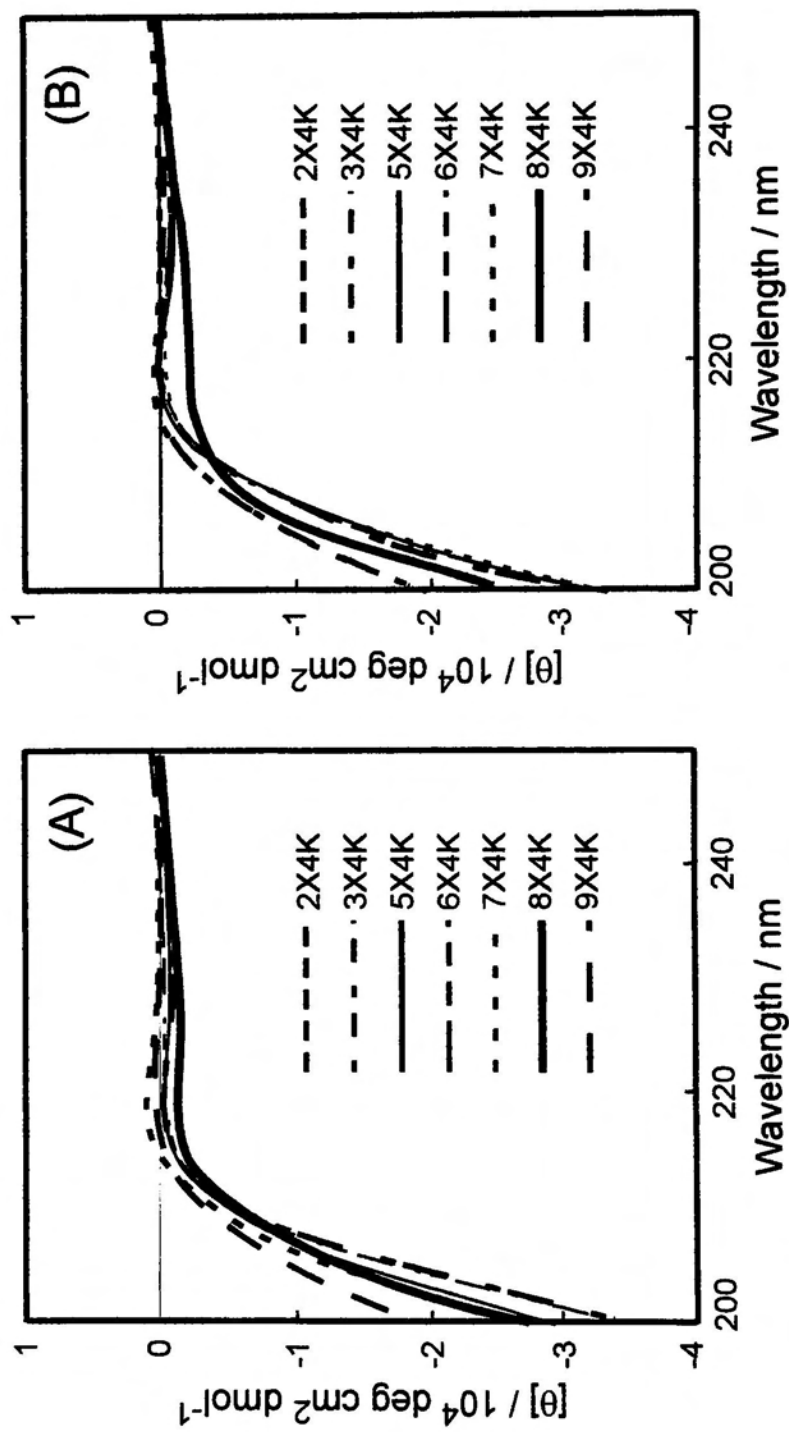
#### 4・3・5 リポソームに対する CF-leakage 能評価

7種のノルロイシンスキャンペプチドの濃度に対して leakage 活性 (%) をプロットしたグラフを Fig. 4. 9 に示す。7種のペプチドのうち、8X4K は約 60% の leakage 活性を示した。また、9X4K は、約 10% 程度の leakage 活性をもつことが確認された。しかし、それ以外のペプチドは leakage 活性がないことがわかった。ミセル系で $\beta$ -シート構造を形成した 8X4K は、リポソームに対して高い leakage 活性を示したことから、 $\beta$ -シート形成能と leakage 活性の相関性があることが示唆された。アミノ酸配列については、8X4K における(Lys, Nle) の位置関係は、( $i, i+4$ ) であり、リシンスキャンペプチド 2-9X4K における(Nle, Lys, Nle) の位置は( $i, i+2, i+7$ ) となり、相同性は認められなかった。

2X4K から 9X4K までの 7種について、リポソームが存在する場合と存在しない場合での CD スペクトルを測定した。得られたスペクトルを Fig. 4. 10-A および Fig. 4. 10-B に示す。リポソームなし、つまり、pH 7.4 の TES 緩衝溶液中では、いずれのペプチドもほぼランダム構造であった。また、リポソーム存在下では、8X4K の構造は若干変化したが、ほぼランダム構造であった。従って、leakage 活性があった濃度 150  $\mu$ M 付近では、ペプチドのコンホメーション変化に特別な差異は確認されなかった。



**Fig. 4.9** Profiles of CF leakage as a function of Nle scanning decapeptides concentration in 20mM TES / 150 mM NaCl buffer (pH 7.4) containing 100 μM EYPC/EYPG (3/1) liposomes. The fluorescence intensity was recorded at 515 nm with excitation at 470 nm at 30 °C.



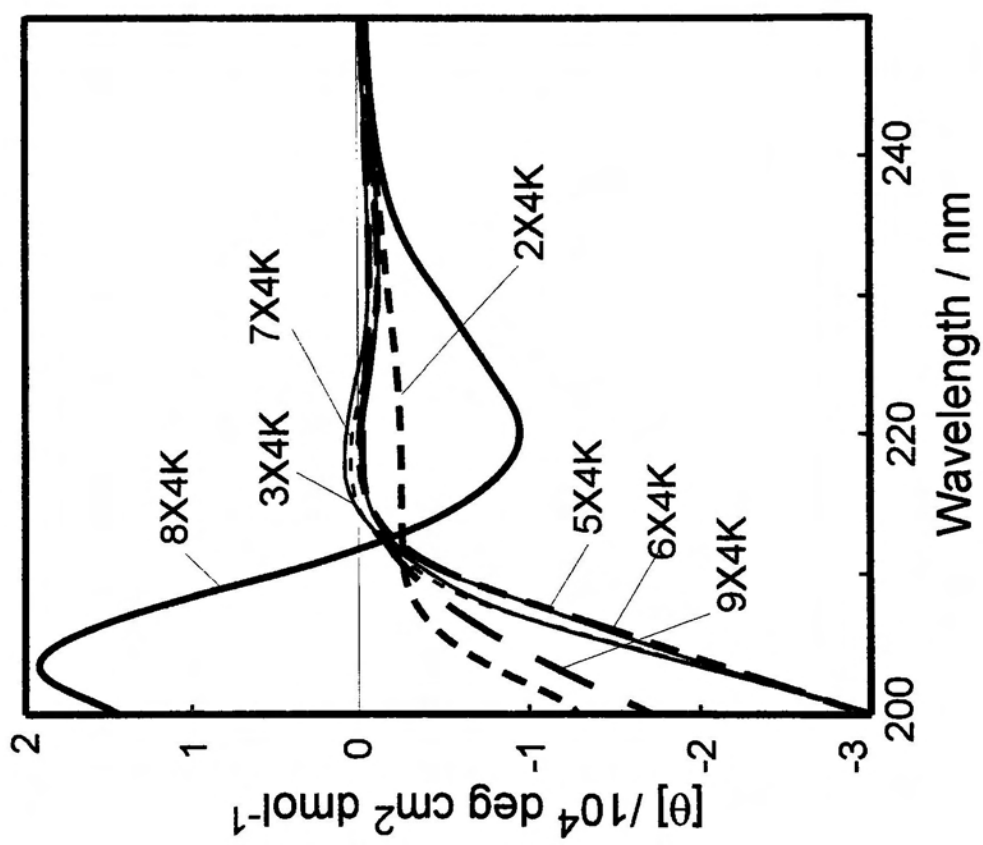
**Fig. 4.10** CD spectra of the peptides in buffer solution (A), in the presence of EYPC/EYPG (3/1) liposome (B). [peptide] = 150  $\mu\text{M}$ , [lipid] = 1 mM, 5 mM TES/100 mM NaCl buffer, pH 7.4, at 30°C.

8X4K が leakage 高活性を示した理由を考察したところ、測定時に加えるペプチドストック溶液が 2 mM であり、局所的に高濃度であるため、leakage 活性が向上したのではないかと予想された。そこで、ペプチド濃度 2 mM の CD スペクトル測定を行った。Figure 4. 11 に各ペプチドの CD スペクトルを示す。

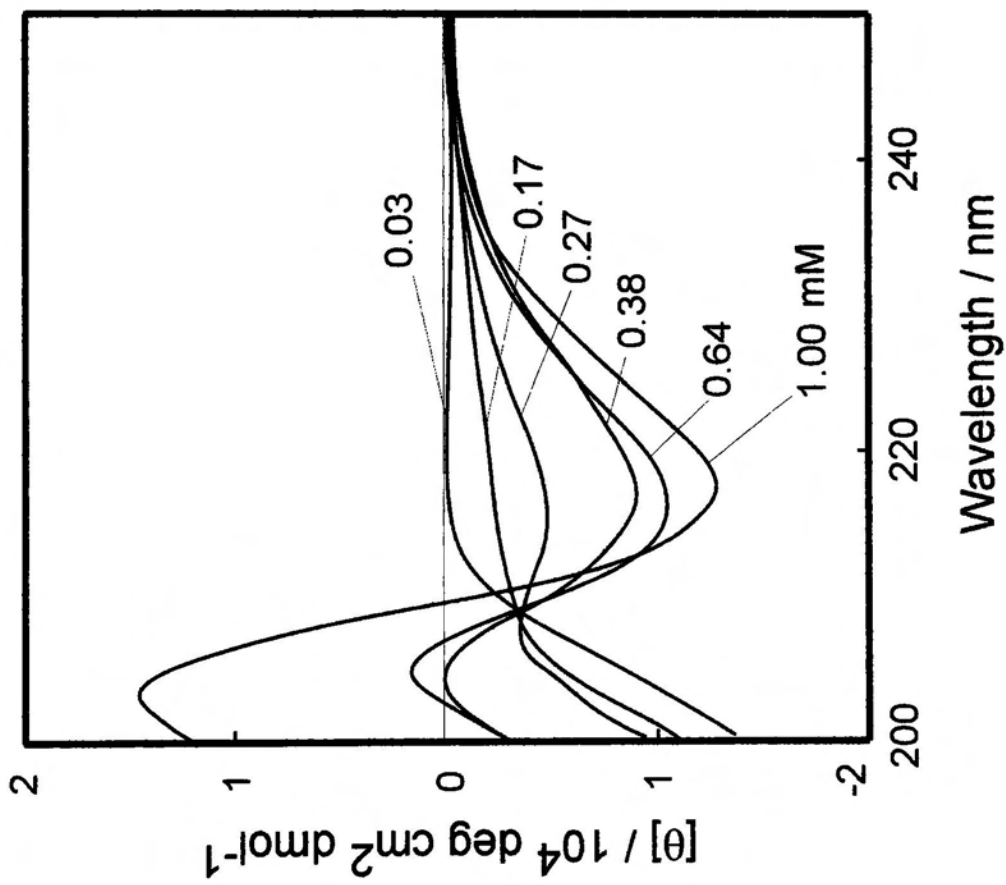
ペプチド濃度 2 mM では、8X4K のみが $\beta$ -シート構造を形成した。一方、他のペプチドはすべてランダム構造であった。従って、緩衝溶液中で 8X4K は分子間水素結合で会合し、 $\beta$ -シート構造を形成していると予想される。しかも、ペプチド濃度が 150  $\mu$ M の時 (Fig. 4. 10-A)はランダムで、2 mM の時(Fig. 4. 11)は $\beta$ -シート構造であったことより、コンホメーションの濃度依存性が示唆された。そこで、8X4K について 0.03 mM~1 mM の濃度範囲で CD スペクトル測定を行った。その結果を Fig. 4. 12 に示す。

ペプチド濃度 1.00 mM では、 $\beta$ -シート構造を示した。そのサンプルを徐々に希釈していったところ、0.38~0.27mM 付近で、218 nm のピーク値が減少した。これは、ペプチド濃度の低下に伴い、 $\beta$ -シート構造が崩壊し、ランダム構造へと徐々に移行した為と考えられる。さらに、希釈したところ、ペプチド濃度 0.03 mM で完全にランダム構造となった。





**Fig. 4.11** CD spectra of Nle scanning peptides in 5 mM TES buffer containing 100 mM NaCl at pH 7.4, [peptide] = 2 mM, at 30°C.

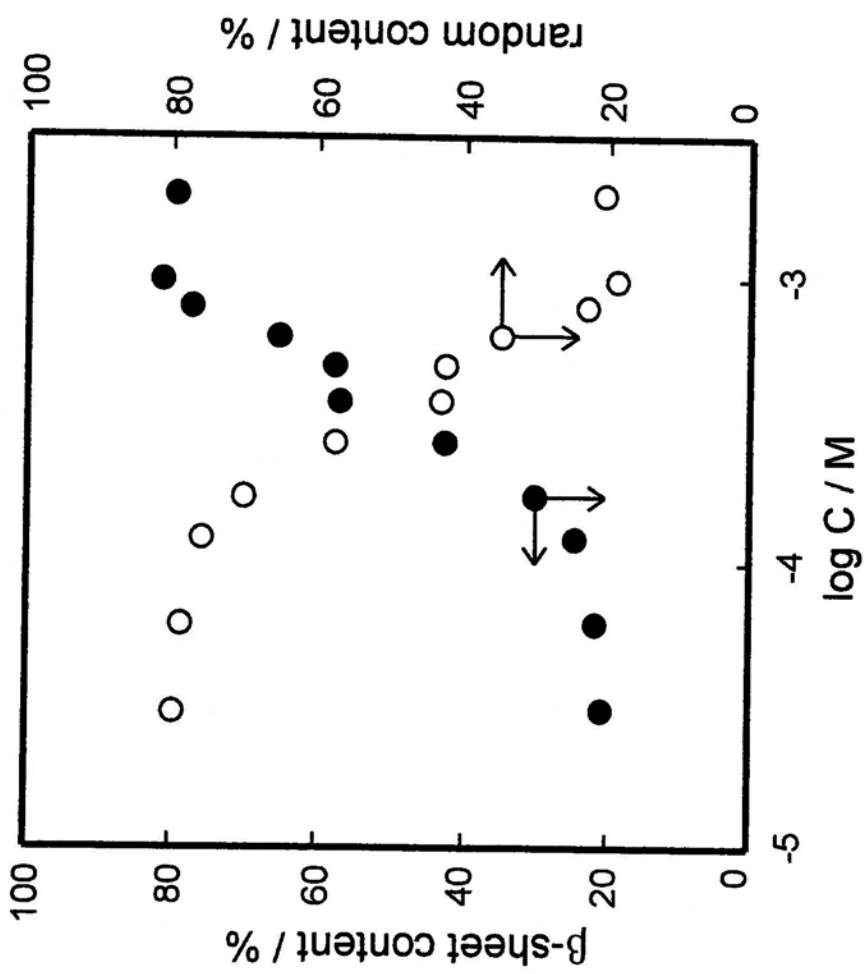


**Fig. 4. 12** CD spectra of 8X4K in the peptide concentration range of 0.03 mM to 1 mM with 5 mM TES buffer containing 100 mM NaCl at pH 7.4.

#### 4・3・6 デカペプチド 8X4K の会合挙動

Figure 4.12 で得られたスペクトルについて、 $\alpha$ -ヘリックス、 $\beta$ -シート、ランダム構造の3成分の含率(%)を求めるため、フィッティング処理を行った。Greenfield & Fasman らによるポリリシンのデータ(7)を基に最小自乗法により算出した。得られた各組成を Fig. 4.13 に示す。X-軸にペプチド濃度の対数を、第1 Y-軸に $\beta$ -シート含率、第2 Y-軸にランダム構造含率をプロットした。

計算の結果、 $\alpha$ -ヘリックス構造は系に含まれておらず、8X4K の会合体はランダムと $\beta$ -シート構造の平衡関係で存在していることが明らかになった。つまり、8X4K は、 $10^{-4} \text{ molL}^{-1}$  のオーダーあたりから会合し始め、最終的に分子間水素結合の作用により $\beta$ -シート構造を形成していると考えられる。一方、ランダム構造は $\beta$ -シートの減少とともに増大した。従って、8X4K は pH7.4 の緩衝溶液中で協同的結合(28)により $\beta$ -シートを形成していることが明らかになった。



**Fig. 4. 13** Peptide concentration dependence of  $\beta$ -sheet or random content of 8X4K. Each content were determined from the CD spectra of reference data, using a least-squares method.

#### 4・3・7 デカペプチド 8X4K の温度変化による会合挙動

緩衝溶液中で、8X4K は自己会合することがわかった。しかも、会合はペプチド濃度に大きく依存した。著者は、温度変化による会合挙動について調べるため、ペプチド濃度および測定温度変化による CD スペクトル変化を調べた。

得られた CD スペクトルの 218 nm でのモル残基楕円率 $[\theta]_{218}$ をペプチド濃度に対してプロットしたグラフを Fig. 4. 14 に示す。

測定温度に関係なく、ペプチド濃度 0.3 mM 付近を境に傾きの差が生じた。すなわち、高濃度 (0.3 ~ 1 mM) では、 $[\theta]_{218}$  値はほとんど変化せず、 $\beta$ -シート構造が優先的であった。しかし、低濃度 (< 0.03 mM) では、濃度が低くなるにつれて $[\theta]_{218}$  は徐々に増大し、ランダム構造が優先的になった。このことは、臨界ミセル濃度 (critical micelle concentration; cmc) の様な臨界会合濃度 (critical aggregation concentration; cac) が存在することが示唆される。

また、温度変化によるモル残基楕円率 $[\theta]_{218}$  に注目すると、温度が上がるにつれて $[\theta]_{218}$  値の低下、すなわち $\beta$ -シート構造の増大がみられた。これを式 (1) および式(2)から導出した式(3)を用いて考察する。

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K \quad \dots \dots (1)$$

$$\left[ \frac{\partial \left( \frac{\Delta G^\circ}{T} \right)}{\partial T} \right]_p = -\frac{\Delta H^\circ}{T^2} \quad \dots \dots (2)$$

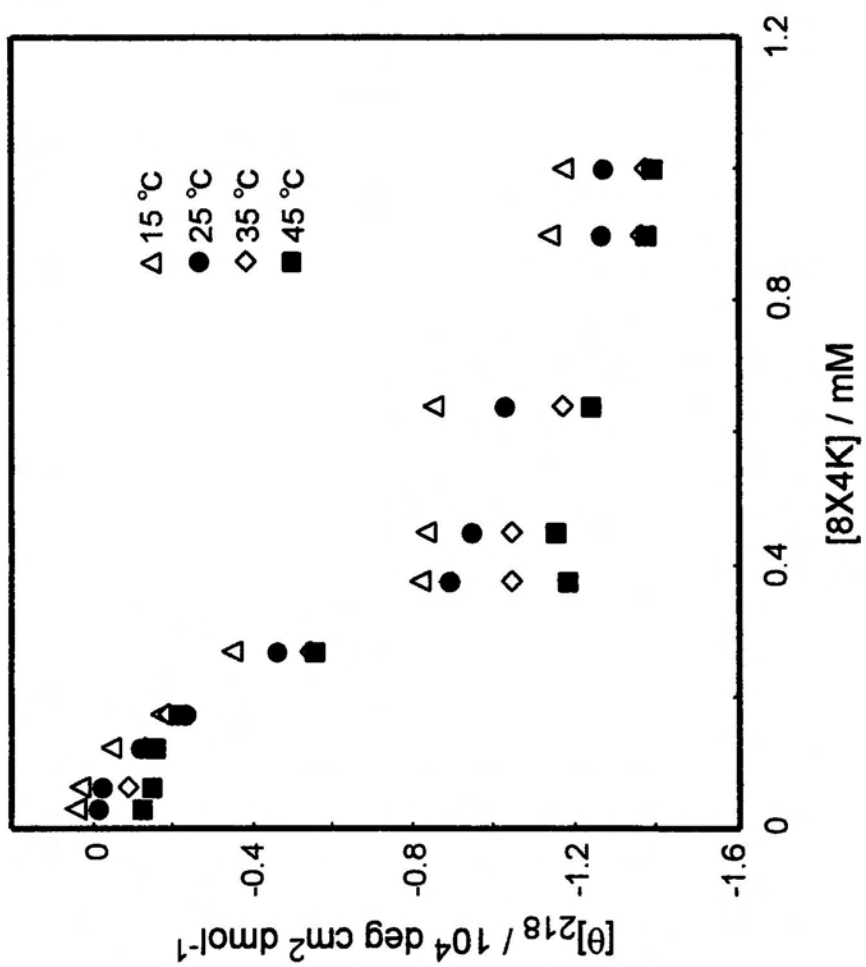
$$\left( \frac{\partial \ln K}{\partial T} \right)_p = \frac{\Delta H^\circ}{RT^2} \quad \dots \dots (3)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad \dots \dots (4)$$

この系では温度上昇によりペプチド間の会合 (水素結合の形成) が促進したので $\Delta H^\circ > 0$  である。また、自発的变化であれば $\Delta G < 0$  となる。従って、式(4)を満たすには $\Delta S^\circ > 0$  となる必要があり(2)、この会合は疎水性相互作用による

ものとみられる。

従って、高濃度域 (0.3~1 mM) における $[\theta]_{218}$  値は、温度変化の影響を受けたのに対し、低濃度域 (<0.03 mM) では、温度変化の影響をあまり受けなかった。これは、低濃度域 (<0.03 mM) でペプチドはランダム構造で、かつ、単分散しているため、ペプチド分子間の会合性が低下したためと予想される。



**Fig. 4.14** Mean residue ellipticity at 218 nm of 8X4K versus peptide concentration at various temperature in 5 mM TES buffer containing 100 mM NaCl at pH 7.4.

#### 4・4 結言

著者は、陰イオン性ミセル共存下で、8X4K (AAAKAAAXAA, X = Nle) が高いアミロイド形成能を示し、線維状会合体を形成することを確認した。また、FTIR スペクトルより、陰イオン性ミセル共存下で 8X4K が平行 $\beta$ -シート構造で会合していることを明らかにした。また、8X4K が酸性リポソームに対して高い leakage 活性を示すことと、緩衝溶液中では自己会合によって $\beta$ -シート構造を形成することを見出した。さらに、8X4K の会合がペプチド濃度および温度に依存することを明らかにした。



## 参考文献

1. P.Y. Chou and G.D. Fasman, *Biochemistry*, Vol. 13, 211-222 (1974).
2. C.Tanford, *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, Krieger Pub. Co., pp. 138-140 (1991).
3. Y. Takahashi, A. Ueno and H. Mihara, *Bioorg. Med. Chem.*, Vol. 7, 177-185 (1999).
4. J. Bandekar, *Biochim. Biophys. Acta*, Vol. 1120, 123-143 (1992).
5. C. Toniolo and M. Palumbo, *Biopolymers*, Vol. 16, 219-224 (1977).
6. N. Yamada and K. Ariga, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, Vol. 49, 435-446 (2000).
7. N. Greenfield and G.D. Fasman, *Biochemistry*, Vol. 8, 4108-4116 (1969).

## 第5章 円偏光二色性による *n*-decanoyl-*N*-methylglucamide と添加物と の相互作用に関する研究

### 5・1 はじめに

生命体の基本単位である細胞は、リン脂質から成る脂質二分子膜によって隔てられ、内外を区別されている。細胞膜は、物質の輸送、エネルギー変換、情報伝達などの重要な生命活動を担っており、膜タンパク質、コレステロール、糖脂質などが存在することが知られている。なかでも、糖脂質は、細胞認識、抗原、ウイルスや毒素に対する受容体、あるいは細胞の分化や増殖などあらゆる生命現象に関与している。さらに、分布パターンは、生物の種属、臓器、細胞の種類に対して特徴的であり、発育・分化・がん化などに伴って変化することも知られている(1)。また、糖脂質は細胞表面においてラフト(筏)と呼ばれるドメインを形成することも知られており、ドメイン形成と糖脂質認識のメカニズムに関する研究も多数報告されている(2,3,4)。

このように、糖脂質をはじめ膜を構成する成分は、細胞や蛋白質間で相互作用することによって、様々な機能を発現する。さらに、糖鎖-ペプチド間相互作用の分子レベルでの解析が進めば、糖認識部位に結合するペプチド阻害剤開発の一助になるとと思われる。糖鎖認識部位との相同性や、何らかの規則性が見いだされれば、生体内糖鎖-タンパク質相互作用を理解する手助けにもなるだろう。

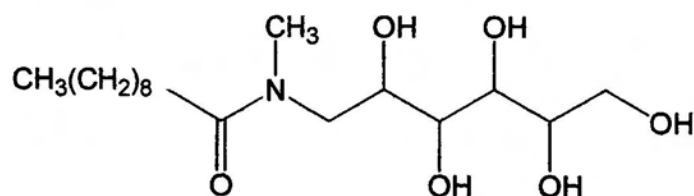
糖脂質を含む細胞で起こる多様な相互作用メカニズムを解明するには、分子構造がより単純化された系で解析するのが望ましい。著者は、糖脂質のモデルとして、分子構造がシンプルである糖結合型界面活性剤を選択した。

1982年 Hildreth らは、非イオン性の糖結合型界面活性剤 *n*-decanoyl-*N*-methylglucamide (MEGA-10)を開発した(5)。MEGA-10は、膜を可溶化し、膜中に保持されている酵素や抗体などを検出するための界面活性

剤として使用されている。ここで、MEGA-10の構造式を Fig. 5.1 に示す。

MEGA-10 は、親水基部に *N*-メチルグルカミド基を持つため電気的中性を示す。また、CMC は約 7 mM であり、非イオン性界面活性剤ではそう低いほうではない。また、不斉炭素があり、紫外部の光学的透過性が良好であることから円二色性(CD)スペクトルによる測定が可能である。実際に、CD を用いた研究は多数行われている(6, 7, 8, 9, 10, 11)。MEGA-10 は、水溶液中で容易に混合ミセルを形成できるため、イオン性界面活性剤と混合すれば、混合ミセル表面で近接する糖鎖とイオン基との相互作用を評価できるだろう。

本章では、CD スペクトルを使用し、MEGA-10 と界面活性剤のイオン基との相互作用について詳細に調べることを目的とする。



**Fig. 5.1** Structural formula of *n*-decanoyl-*N*-methylglucamide (MEGA-10).

## 5・2 実験

### 5・2・1 MEGA-10 および界面活性剤の合成・精製

#### MEGA-10 の精製

MEGA-10 は、同仁化学(株)より市販品を購入した。精製法を以下に示す。まず、MEGA-10 50 g にアセトン 1 L を加え、約 1 時間還流した。還流終了後、上澄みを加熱しながらセパレート型フィルターで濾過した。濾液を減圧濃縮後、白色の粗結晶が析出した。約 7-10 mL エタノールを加熱しながら結晶に加え、完全に溶解させたのち、ジエチルエーテルを加えて冷却、結晶化させた。エタノール-ジエチルエーテル系での再結晶を 3 回行った。その後、約 500 mL のエタノールで結晶を溶解し、セパレート型フィルターでゴミ等の除去を行った。濾液を減圧濃縮後、再びエタノール-ジエチルエーテル系で再結晶を行い、濾紙を引いたガラスフィルターで結晶を濾取し、白色結晶を得た。結晶をガラスチューブオーブンで 50℃ 下、約 5 時間乾燥した。

#### デシルスルホン酸デシルトリメチルアンモニウム (C10TAC10S)

デシルスルホン酸銀 (75.9 g, 0.231 mol) に 1.1 等量の臭化デシルトリメチルアンモニウム (71.2 g, 0.254 mol) を加えて、エタノール 760 mL を加えて約 6 時間加熱還流した。反応終了後、副生成物である臭化銀をセパレート型フィルターで除去した。濾液を減圧濃縮後、析出した粗結晶をエタノール-アセトン系で再結晶を行った。ガラスフィルターで冷却下、結晶を濾取した。再結晶の操作を 3 回繰り返した後、約 500 mL のエタノールで結晶を溶解し、セパレート型フィルターでゴミ等の除去を行った。濾液を減圧濃縮後、再びエタノール-アセトン系で再結晶を行い、濾紙を引いたガラスフィルターで結晶を濾取し、ガラスチューブオーブンで 50℃ 下、約 6 時間乾燥後、白色結晶を得た。

### **塩化ドデシルアンモニウム (C12TAC)**

ドデシルアミン (62 mL, 0.270 mol) にエタノールを 40 mL 加えて温浴中で溶かした。完全に溶解した後、濃塩酸 (41 mL, 0.405 mol) 加え、アセトンを約 700 mL 加えた。

エタノール-アセトン系で再結晶を 3 回繰り返した後、約 500 mL のエタノールで結晶を溶解し、セパレート型フィルターでゴミ等の除去を行った。濾液を減圧濃縮後、再びエタノール-アセトン系で再結晶を行い、濾紙を引いたガラスフィルターで結晶を濾取し、ガラスチューブオーブンで 50°C 下、約 6 時間乾燥後、白色結晶を得た。

### **臭化ドデシルトリメチルアンモニウム (C12TABr)**

市販品を精製した。臭化ドデシルトリメチルアンモニウムを 100 g 量り取り、エタノール-アセトン系で再結晶を 3 回繰り返した後、約 500 mL のエタノールで結晶を溶解し、セパレート型フィルターでゴミ等の除去を行った。濾液を減圧濃縮後、再びエタノール-アセトン系で再結晶を行い、濾紙を引いたガラスフィルターで結晶を濾取し、ガラスチューブオーブンで 50°C 下、2 日間乾燥後、白色結晶を得た。

### **ドデシルスルホン酸ナトリウム (SC12S)**

市販品を精製した。ドデシルスルホン酸ナトリウム 100 g に活性炭 1 g、水 100 mL を加えた。活性炭は、あらかじめ少量のメタノールで湿らせ、水を加えておいた。セパレート型フィルターで加熱しながら活性炭を除去した。濾液を冷蔵庫で一日放置後、析出した結晶を冷却濾過で濾取した。得られた粗結晶をガラスチューブオーブンで減圧乾燥した。さらに、ブタノールによる再結晶を行った。粗結晶 50 g に約 2 L のブタノールを加えて約 1 時間加熱還流した。室温に戻し、析出した結晶をガラスフィルターで濾取した。さらに、ブタノールで加熱還流と濾過による再結晶を 5 回繰り返した。最後に 1 次蒸留水に結晶を溶解し、セパレート型ガラスフィルターでゴミを除去した。

濾液を冷蔵庫で一晩冷却後、析出した結晶をガラスフィルターで濾過した。得られた結晶を減圧乾燥，白色結晶を得た。

#### **ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (SC12BS)**

市販品のドデシルベンゼンスルホン酸 (soft type, (株)東京化成) を水酸化ナトリウムで滴定してサンプル溶液とした。実際には，ドデシルスルホン酸 0.5 mol/L の溶液を 500 mL 作成した。水酸化ナトリウム溶液で中和滴定法により 0.5 mol/L のドデシルスルホン酸ナトリウム溶液を用意した。水酸化ナトリウム溶液濃度は，シュウ酸滴定により求めた。得られた水溶液は，サンプル調製にそのまま使用した。

#### **オクチルスルホン酸オクチルアンモニウム (C8AC8S)**

オクチルアミン (30 g, 0.232 mol) に塩酸 (25 mL, 0.232 mol) 水溶液をゆっくりと加えた。別容器にオクタンスルホン酸ナトリウム (50.2 g, 0.232 mol) と蒸留水を加え，完全に溶解させた。これに，オクチルアミン塩酸塩水溶液とを混ぜ合わせ，冷蔵庫内で一晩放冷した。析出した結晶をガラスフィルターで濾取し，一次蒸留水で 4 回再結晶を行った。得られた粗結晶を一旦ガラスチューブオーブンで 80°C 下，乾燥した。次に，エタノール-アセトン系で再結晶を 4 回行った。5 回目の再結晶は約 500 mL のエタノールで結晶を溶解し，セパレート型フィルターでゴミ等の除去を行った。濾液を減圧濃縮後，再びエタノール-アセトン系で再結晶を行い，濾紙を引いたガラスフィルターで結晶を濾取し，ガラスチューブオーブンで 80°C 下，約 3 時間乾燥後，白色結晶を得た。

#### **ドデシルスルホン酸ヘプチルアンモニウム (C7AC12S)**

ドデシルスルホン酸ナトリウム (60 g, 0.220 mol) を秤量し，蒸留水を加えて完全に溶かした。次に，ヘプチルアミン (25 g, 0.220 mol) を塩酸で中和した溶液を，ドデシルスルホン酸ナトリウム水溶液に温浴下加えた。室温で一晩放

置後、析出した結晶をガラスフィルターで濾過した。得られた粗結晶を、蒸留水で再結晶を5回繰り返し、塩を除去した。再び水溶液にした後、凍結乾燥を行い粗結晶を得た。

次に、エタノール-アセトン系で4回再結晶を行った。5回目の再結晶は約500 mLのエタノールで結晶を溶解し、セパレート型フィルターでゴミ等を除去した。濾液を減圧濃縮後、再びエタノール-アセトン系で再結晶を行い、濾紙を引いたガラスフィルターで結晶を濾取し、ガラスチューブオーブンで80°C下、約6時間乾燥後、白色結晶を得た。

塩化ヘキサデシルピリジニウム(C16PCl)およびオクタノール(C8OH)は、市販品を精製せずに実験に使用した。また、ドデシルジメチルフォスフィンオキシド(C12PO)およびテトラデシルスルホン酸ブチルアンモニウムは九州共立大学工学部秋貞教授より提供された。

### 5・2・2 サンプル溶液の調製

サンプル溶液は、全て重量法で調製し、二次蒸留水を使用した。ただし、C7AC12S の高濃度溶液はゲル化したため、エタノール溶解後、目的濃度になるよう分注したのち、バキュームオーブンでメスフラスコごと乾燥し、エタノールを留去した。

### 5・2・3 CD スペクトル測定

CD スペクトル測定は 30°C 下、JASCO J-720（日本分光（株）社製）を使用した。また、光路長 0.1 mm 円筒型石英セルを使用した。MEGA-10 の 225 nm 付近におけるピーク強度が小さいため、積算回数 30 回とした。得られた楕円率はモル楕円率  $[\theta]$  に換算した。



## 5・3 結果および考察

### 5・3・1 MEGA-10 の CD スペクトル

MEGA-10 の各濃度における 215-240 nm 付近の CD スペクトルを **Fig. 5.2** に示す。MEGA-10 の CD スペクトルは、220 nm 付近にメチルアミド由来のピークが出現する(5)。MEGA-10 の CMC は約 0.005 mol/kg であるので(7)、グラフの 0.00510 mol/kg までは極大ピークの増大はみられなかった。しかし、CMC を超えると、濃度増加と共に極大ピークが増加した。しかし、さらに高濃度側の  $50.7 \times 10^{-3}$  mol/kg と  $105 \times 10^{-3}$  mol/kg を比較すると、スペクトルの形、極大はほとんど変化しなかったので MEGA-10 濃度  $100 \times 10^{-3}$  mol/kg 付近で、添加物効果によるスペクトル変化を調べることにした。

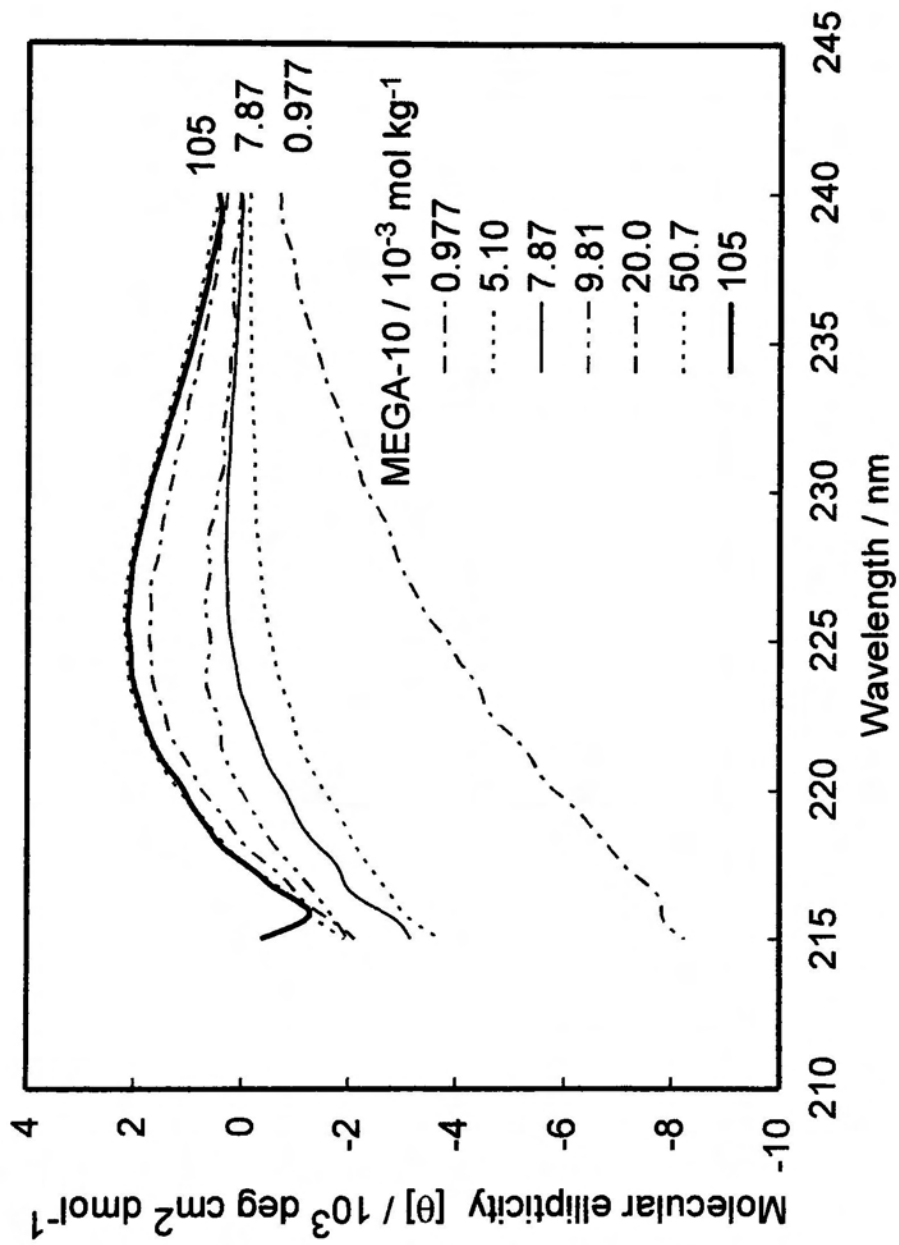


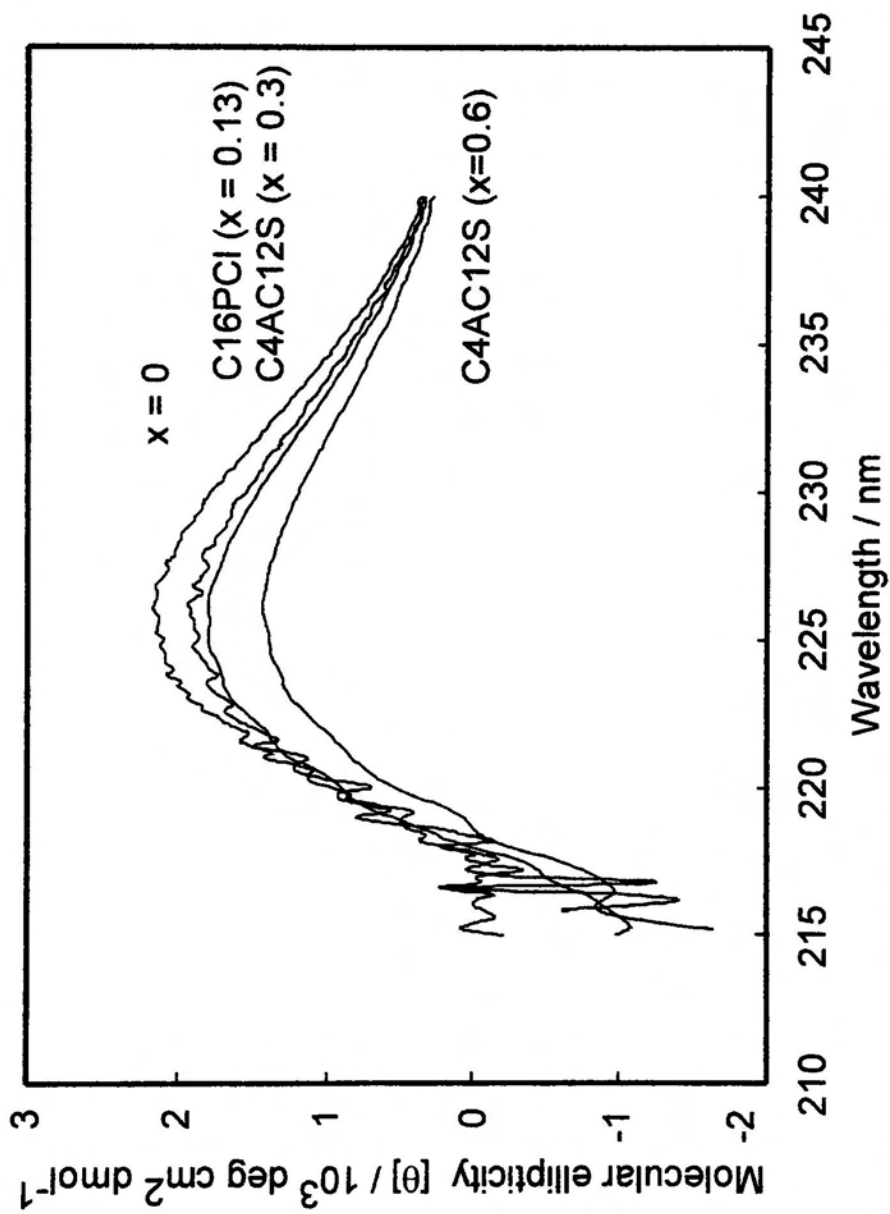
Fig. 5. 2 CD spectra of different molalities of pure MEGA-10.

### 5・3・2 CD スペクトルの添加物による影響

MEGA-10 に対する添加物の影響を調べるために、添加物の種類を変えた時の CD スペクトルを測定した。いくつかの代表的なスペクトル例を **Fig. 5. 3** に示す。

MEGA-10 純系 ( $X=0$  のとき) と比べて、親水基がピリジニウム基の C16PCI と両イオン性の C4AC12S を加えた場合では、極大ピークのシフトは見られず、最大ピーク波長は 225.6 nm のままであった。また、ピーク値は添加物のモル分率に依存して減少した。

従って、添加物質は 225 nm に吸収を持つ化合物以外は使用可能であり、添加物質のモル分率に対してのみ 225.6 nm のピーク強度が変化した。

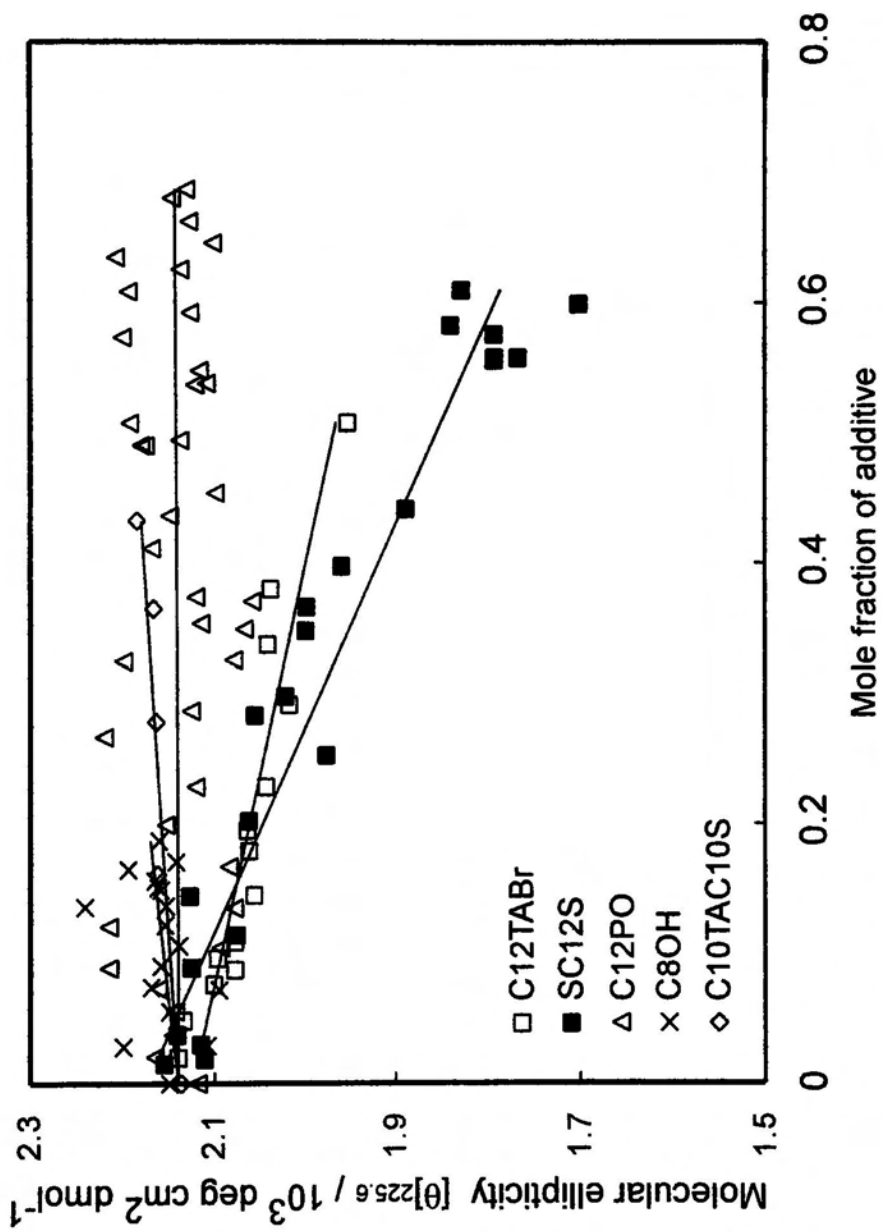


**Fig. 5.3** Samples of CD spectra of MEGA-10 with some additives; the concentration of MEGA-10 is 0.1 mol/kg and the symbol  $x$  is the mole fraction of the additive.

### 5・3・3 添加物の親水基電荷の影響

添加する界面活性剤親水基の電荷の影響をみるために、MEGA-10 に対して陽イオン性の C12TABr, 陰イオン性の SC12S, 両イオン性(catanionic)の C10TAC10S, 非イオン性の C12PO および C8OH を加えて, モル分率変化に対する MEGA-10 の 225.6 nm での分子楕円率変化を調べた。得られた結果を Fig. 5.4 に示す。

陰イオン性活性剤ドデシルスルホン酸ナトリウム (SC12S) と陽イオン性活性剤の臭化ドデシルトリメチルアンモニウム (C12TABr) の分子楕円率  $[\theta]$  は, モル分率の増加と共に減少した。一方, 両イオン性活性剤のデシルスルホン酸デシルトリメチルアンモニウム (C10TAC10S), 非イオン性活性剤のドデシルホスフィンオキシド (C12PO), および *n*-オクタノール (C8OH) の  $[\theta]$  はモル分率に関係なく一定であった。以上の結果より, MEGA-10 のカルボニル基と添加物の親水基間の相互作用は, ミセルの表面電荷密度に影響されることが示唆された。

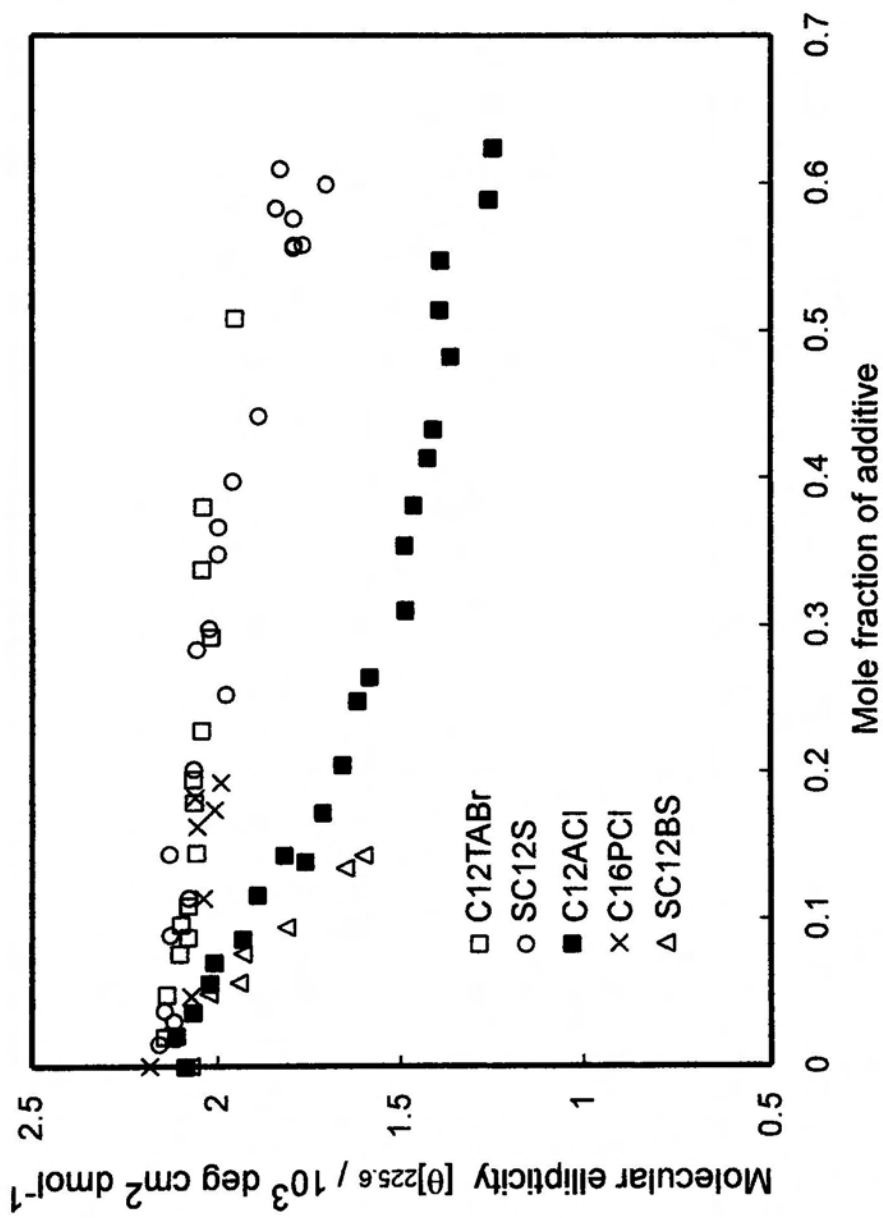


**Fig. 5.4** Effect of additive charge on the molecular ellipticity of MEGA-10; nonionic, ionic, and cationic surfactants. The concentration of MEGA-10 is 0.1 mol/kg.

#### 5・3・4 添加物の親水基イオン種の影響

MEGA-10は、Fig. 5.5で示されるように親水基のイオン種にも影響される。アンモニウム基を持つ C12ACl や、ベンゼンスルホン酸を持つ SC12BS は、トリメチルアンモニウム基を持つ C12TABr やスルホン酸基を持つ SC12S と比べて分子楕円率[ $\theta$ ]が著しく低下した。これは、ベンゼンスルホン酸のベンゼン環  $\pi$ 電子と MEGA-10 のカルボニル基の相互作用によるものと思われる。また、トリメチルアンモニウム基よりアンモニウム基の方がより効果的なのはアンモニウム基の水素原子とカルボニル基が強く相互作用しているからであると予想される。

また、非イオン性の C12PO や C8OH はほとんど影響しなかったことから、水和した双極子と MEGA-10 のカルボニル基は相互作用しないといえるだろう。



**Fig. 5. 5** Effect of additive charge on the molecular ellipticity of MEGA-10; nonionic, ionic, and catanionic surfactants. The concentration of MEGA-10 is 0.1 mol/kg.



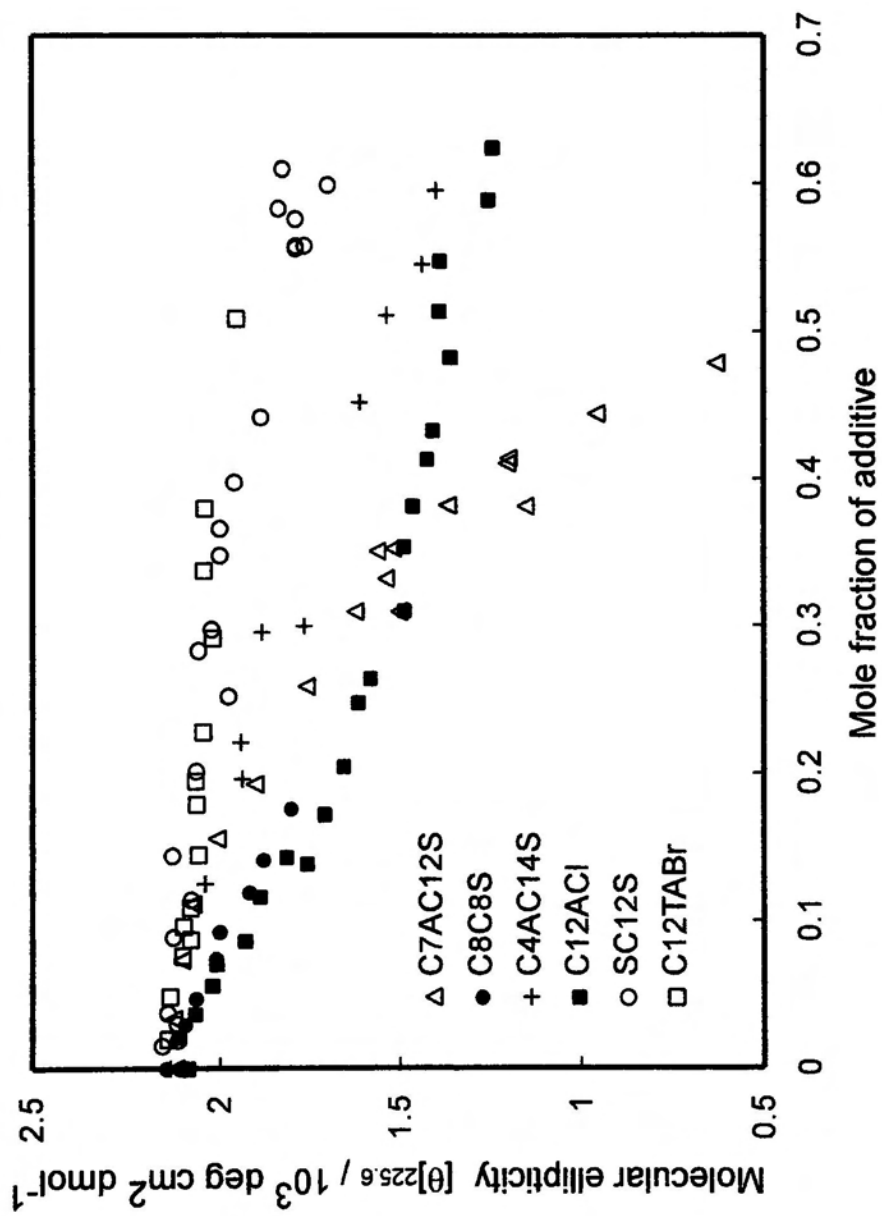
### 5・3・5 アンモニウム基の影響

Figure 5.5 で示される直線の傾きから、MEGA-10 のカルボニル基に対するトリメチルアンモニウム基とアンモニウム基の相互作用は異なるタイプであると考えられる。Fig. 5.6 で示されるように、オクチルアンモニウム基を持つ C8C8S とドデシルアンモニウム基を持つ C12ACI は異なる対イオンを持つが、モル分率 0.2 あたりまでの傾きはほぼ一致していた。また、両イオン性型の活性剤においては、ブチルアンモニウム基を持つ C4AC14S とヘプチルアンモニウム基を持つ C7C12S は、モル分率 0.15 あたりまでは同じ傾きを示した。SC12S も似たような傾きであったことから、モル分率 0.15 まではアルカンサルホン酸が占めるミセルの影響が大きいと考えられる。

一方、モル分率が 0.2 以上のとき、C4AC14S より C12ACI の方がより効果的であった。しかし、徐々に両化合物の傾きの差は小さくなり、モル分率 0.6 付近ではほとんど等しくなった。これは、対イオンのブチルアンモニウム基とテトラデシルサルホン酸とが混合ミセルを形成しているからであると思われる。実際に、ブチルアンモニウム基は疎水的であり、混合ミセルを形成する(12, 13)。また、C7AC12S はモル分率 0.3 付近で傾きが変化した。これは、C4AC14S と比べて C7AC12S の方が低いモル分率のところで混合ミセルを形成しているのではないかと考えられる。さらに C7AC12S のモル分率が 0.5 以上では、混合溶液はゲル化した。したがって、C7AC12S のモル分率 0.3 以上ではミセルの構造が変化していることが予想される。

以上の結果より、MEGA-10 のカルボニル基とミセル表面のアンモニウム基は強く相互作用することが示された。

以上の結果について理解しやすくするために、添加物質の低モル分率 (<0.2) の傾きを Table 5.1 にまとめた。MEGA-10 に対して効果的に相互作用する物質から順に記した。



**Fig. 5.6** Effect of additives on the molecular ellipticity of MEGA-10; types of hydrophilic groups. The concentration of MEGA-10 is 0.1 mol/kg.

**Table 5.1** Effect of additives on the molecular ellipticity of MEGA-10 when the upper limit of the mole fraction is 0.2.

Additives	Slope /10 <sup>3</sup> degree cm <sup>2</sup> dmol <sup>-1</sup>
SC12BS	-3.50
C12ACI	-2.37
C8AC8S	-1.82
C4AC14S	-0.92
C7AC12S	-0.71
C16PCI	-0.66
C12TABr	-0.47
SC12S	-0.32
C12PO	0.01
C10TAC10S	0.10
C8OH	0.17

#### 5・4 結言

MEGA-10 と相互作用しやすい物質は、非イオン性よりイオン性の親水基をもつ化合物であった。また、イオン性でありながらアルカンサルホン酸アルカントリメチルアンモニウムのような中性イオン型の界面活性剤は、MEGA-10 に対してほとんど影響しなかった。つまり、MEGA-10 を含む混合ミセルでは、MEGA-10 分子内のカルボニル基は、隣接分子の荷電に大きく影響されることがわかった。

特に、強い相互作用が見られたのはベンゼンサルホン酸の場合で、モル分率—分子楕円率のプロットから得られた傾きは  $-3.50 \times 10^3 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  であった。また、正の荷電をもつ活性剤と MEGA-10 との相互作用については、アンモニウム基をもつ物質が特に強い相互作用を示した。トリメチルアンモニウム基はアンモニウム基ほど強い相互作用を示さなかったことから、MEGA-10 のカルボニル基とアンモニウム基の水素結合が相互作用の大きな要因であると考えられる。

以上の実験結果より、混合ミセルの表面にある MEGA-10 由来のカルボニル基と隣接分子由来のアンモニウム基とは非イオン性の官能基よりも強く相互作用することが明らかになった。

著者は、水溶液中での近接分子間相互作用に関する詳細が明らかになることによって、ミセル表面に限らず、細胞表面等で起こる様々な分子の相互作用を理解するための一助となることを期待する。

## 参考文献

1. T. Harder and K. Simons, *Curr. Opin. Cell Biol.*, Vol. **9**, 534-542 (1997).
2. S. Munro, *Cell*, Vol. **115**, 377-388 (2003).
3. A. Viola, S. Schroeder, Y. Sakakibara and A. Lanzavecchia, *Science*, Vol. **283**, 680-682 (1999).
4. T.K. Khan, B. Yang, N.L. Thompson, S. Maekawa, R.M. Epand and K. Jacobson, *Biochemistry*, Vol. **42**, 4780-4786 (2003).
5. J.E. Hildreth, *Biochem. J.*, Vol. **207**, 363-366 (1982).
6. Y. Yunomiya, T. Kunitake, T. Tanaka, G. Sugihara and T. Nakashima, *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. **208**, 1-5 (1998).
7. G. Sugihara, M. Hagio, M. Tanaka and Y. Ikawa, *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. **123**, 544-545 (1988).
8. M. Okawauchi, M. Hagio, Y. Ikawa, G. Sugihara, Y. Murata and M. Tanaka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, Vol. **60**, 2718-2723 (1987).
9. S. Harada and H. Sahara, *Langmuir*, Vol. **10**, 4073-4076 (1994).
10. S. Miyagishi, K. Okada and T. Asakawa, *J. Colloid Interface Sci.*, Vol. **238**, 91-95 (2001).
11. H. Lippold, M. Findeisen, K. Quitzsch and M. Helmstedt, *Colloids and Surfaces A*, Vol. **135**, 235-244 (1998).
12. H. Akisada, S. Kinoshita and H. Wakita, *Colloids and Surfaces*, Vol. **66**, 121-127 (1992).
13. H. Akisada, M. Ishihara, M. Nishi, M. Higake, S. Ishimaru and J. Nishida, *Colloid. Polym. Sci.*, Vol. **281**, 993-997 (2003).

## 第6章 結論

本研究は、分子間に生じる静電相互作用や疎水性相互作用によって引き起こされる現象とその機構について調べたものである。水溶液中の動的ミセルを疑似固定相として、疎水性アミノ酸や親水性アミノ酸を導入したアラニンリッチペプチドとの相互作用について評価した。

水という媒体を介する分子間の様々な相互作用は、動植物の体内における物質の移動や生命活動には不可欠な要素である。細胞モデルとしてのミセル利用は、細胞表面のタンパク質が担う伝達、物質輸送、接着や自己組織化など極めて重要な機能を理解する一助になることを願い、本研究を進めた。

### 6・1 本研究のまとめ

本研究により、以下の2点について成果を得ることができた。

第1に、ミセル共存下において、疎水性アミノ酸を導入したペプチドの立体構造を調べることで、水溶液中での疎水性相互作用と立体構造との関係を明確化することができた。第2に、糖結合型界面活性剤に対して強く相互作用する官能基を明らかにすることができた。

様々な分子間相互作用の傾向や、比較検討するための詳細なデータを提示できた点において、本研究の有用性がある。

以下、各章毎に研究の要点をまとめる。

まず、第1章序論では、分子間相互作用の種類や重要性について簡単に述べた。また、疎水性相互作用や静電相互作用の原理および現象を述べ、具体例を示した。さらに、多様な相互作用とタンパク質のコンホメーション変化や自己組織化とを関連付け、本研究の目的および方針を示した。

第2章では、アラニンリッチペプチドに導入した疎水性および親水性アミノ酸の位置と立体構造との関係について述べた。親水性アミノ酸が1残基ずつシフトしたペプチドを網羅的に合成し、ミセルやリポソームとの相互作用について分光手法を用いて評価した。ペプチド分子間相互作用が特に強く、

アミロイド様線維形成までに至るペプチドを見出し、僅か10残基のアミノ酸配列を特定した。

第3章では、疎水性アミノ酸側鎖の性質や構造とペプチドの立体構造との関係について述べた。また、疎水性度に従う疎水性アミノ酸導入ペプチドの会合挙動について示した。

第4章では、疎水性アミノ酸導入位置に伴う立体構造の変化について述べた。また、特定のアミノ酸配列を持つペプチドが、ミセルやリポソームのような荷電粒子と強く相互作用することを示した。また、荷電粒子が無い環境下では、導入された疎水性アミノ酸の効果によってペプチド分子同士がミセルのように会合できることを示した。

第5章では、糖結合型界面活性剤に対して、最も効果的な添加物質についてCDスペクトル変化から明らかにすることができた。水中で混合された分子は混合ミセルを形成するので、ミセル表面で近接したカルボニル基とアンモニウム基は特に強く相互作用することを見出した。

## 6・2 今後の課題

本研究において、著者が取り組んだテーマは、生体分子モデルの分子間相互作用によるペプチドおよび糖型脂質モデルの構造変化であり、興味深い現象や傾向を垣間見たに過ぎない。今後、より定量性を高めた実験系の構築をめざし、様々な相互作用の熱力学的物性を明らかにしたい。最終的には、水溶液系において、ペプチドやタンパク質に含まれるアミノ酸側鎖間の相互作用パラメータを算出したい。

以上の課題に取り組むことにより、生命体にとって重要な役割を果たすタンパク質の構造と機能に関する新たな知見が得られるとともに、その分野の研究に多大なる貢献をなすものと期待する。

## 論文目録

以下に、本研究の成果に関して誌上公表された内容を示す。尚、第2章の研究内容は論文(1)および(2)に、第3章の内容は論文(4)に、第4章の内容は論文(5)に、第5章の内容は論文(3)にそれぞれ公表した。

- (1) “Chain length effect of the counterion on the partial molal volume of alkanesulfonates” H. Akisada, M. Ishihara, M. Nishi, M. Higake, Seiki Ishimaru and J. Nishida, *Colloid and Polymer Science*, 2003, **281**, 993-997.
- (2) “Effects of Hydrophobic and Electrostatic Interactions on change in Decapeptide conformation in Micelle and Liposome Solution” J. Kuwahara, H. Akisada, T. Kato and N. Nishino, *Journal of Oleo Science*, 2004, **53**, 619-626.
- (3) “A circular dichroism study of the interaction between *n*-decanoyl-*N*-methylglucamide and surface active agents in mixed micelles” H. Akisada, J. Kuwahara, M. Kunisaki, K. Nishikawa, S. Akagi and M. Wada, *Colloid and Polymer Science*, 2004, **283**, 169-173.
- (4) “Effect of hydrophobic amino acids on the conformational change of decapeptides in micellar environments” J. Kuwahara, H. Akisada, T. Kato and N. Nishino, *Colloid and Polymer Science*, 2005, **283**, 747-752.
- (5) “Amyloid fibril formation of a simple decapeptide in a micellar environment” J. Kuwahara, H. Akisada, N. Wakayama, T. Kato and N. Nishino, *Journal of Oleo Science*, 2005, **54**, 225-231.





## 略号

### アミノ保護基

Fmoc- N- $\alpha$ -9-fluorenylmethoxycarbonyl

### 側鎖保護基

Boc- *tert*-buthyloxycarbonyl

### 試薬・溶媒

Fmoc-Osu N-(9-fluorenylmethoxycarbonyl)succinimide  
 Alko Resin *p*-alkoxybenzyl alcohol resin  
 DMAP 4-dimethylaminopyridine  
 DCC *N, N'*-dicyclohexylcarbodiimide  
 HBTU *O*-benzotriazol-1-yl-*N, N, N', N'*-tetramethyluronium  
 hexafluorophosphate  
 HOBT 1-hydroxybenzotriazole  
 DIEA diisopropylethylamine  
 DMF dimethylformamide  
 CH<sub>3</sub>CN acetonitrile  
 TFA trifluoroacetic acid  
 Ac<sub>2</sub>O acetic anhydride  
 PPD piperidine

### アミノ酸

Ala L-alanine  
 Nle L-norleucine  
 Lys L-lysine  
 Met L-methionine  
 Leu L-leucine  
 Phe L-phenylalanine  
 Aoc 2-aminooctanoic acid  
 Ade 2-aminodecanoic acid

### 界面活性剤

C14SA ammonium tetradecylsulfonic acid  
 C16TAB hexadecanetricethylammonium bromide

脂質

egg-PC	egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylcholine
egg-PG	egg yolk L- $\alpha$ -phosphatidylglycerol

機器類

HPLC	high performance liquid chromatography
vis-UV	ultraviolet
CD	circular dichroism
FAB	fast atom bombardment
FTIR	fourier transform infrared spectroscopy
TEM	transmission electron microscopy

## 謝 辞

本研究を遂行する上で、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻教授 西野 憲和 先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究に際して、貴重なご意見、ご指導を賜りました工学研究科物質工学専攻教授 吉永 耕二 先生、同じく工学研究科物質工学専攻教授 柘植 顕彦 先生、工学研究科電気工学専攻教授 並木 章 先生に心より御礼申し上げます。

九州共立大学大学院工学研究科教授 秋貞 英雄 先生には、社会人課程博士の就学にご理解を頂き、また、界面活性剤を用いた研究に際し、機器の御提供、および実験に関する御協力、御助言を賜りました。深く感謝申し上げます。さらに、九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻助教授 加藤 珠樹 先生には、実験を行うにあたり有益な御助言を多く賜りました。深く感謝申し上げます。

FTIR 測定の試料作成および測定法に関して有益な御助言を賜りました岐阜大学工学部生命工学科助手 石黒 亮 先生に厚く御礼申し上げます。また、機器使用に際し、ご協力を戴きました九州共立大学大学院工学研究科教授 山栄 允 先生に深く御礼申し上げます。TEM 観察では、初めての有機性試料にも関わらず快く測定に応じて頂きました九州工業大学機器分析センター技官 若山 登 様に厚く御礼申し上げます。また、FAB-MS 測定を行っていただきました九州工業大学機器分析センター技官 山口 恵子 様に感謝の意を表します。

最後に、本研究の遂行にあたり、筆者を支え、励まし、最後まで温かく見守って下さった西野/加藤 研究室卒業生の皆様、秋貞研究室卒業生の皆様、勇気と希望を与えてくれた沢山の友人、遠く離れた故郷でいつも応援して下さいだった栞原、西田両家の御父様、そして御母様に深く感謝申し上げます。そして、何よりも多忙な研究生活を理解し、最後まで心強く筆者を支えてくれた主人に心より感謝いたします。

2005 年 3 月

栞原 順子