

ヘリックスペプチド会合体の安定化因子と  
イオンチャネル形成能に関する研究

2022年3月

佐賀大学大学院工学系研究科  
システム創成科学専攻

重富 敬太

# 目次

要旨	1
第1章 序論	2
1-1. イオンチャネルタンパク質	2
1-1-1. 生体のイオンチャネルタンパク質の機能と構造	2
1-1-2. ウイルスがもつイオンチャネルタンパク質	4
1-2. イオンチャネルペプチド	6
1-2-1. イオンチャネルペプチドの構造	6
1-2-2. $\alpha$ -ヘリックス性のイオンチャネルペプチド	7
1-3. イオンチャネルにおける芳香族アミノ酸	9
1-3-1. $\pi$ - $\pi$ 相互作用とカチオン- $\pi$ 相互作用の性質	9
1-3-2. イオンチャネルの構造及び機能に対する芳香族残基の影響	11
1-4. 研究の目的	13
1-5. 参考文献	15
第2章 トリプトファン含有 Aib 基盤モデルペプチドと疎水性 Aib 基盤モデルペプチドのデザイン	21
2-1. Introduction	21
2-1-1. 天然物由来のイオンチャネルペプチドのデザイン	21
2-1-2. De novo 設計によるイオンチャネルペプチド	24
2-1-3. ヘリックス-ヘリックス相互作用における芳香族残基	26
2-2. Trp 含有 Aib 基盤モデルペプチドのデザイン	28
2-3. Ile 含有疎水性 Aib 基盤モデルペプチドのデザイン	30
2-4. 参考文献	32
第3章 モデルペプチドの二次構造とペプチド-脂質間相互作用	36
3-1. Introduction	36
3-2. Results	39
3-2-1. モデルペプチドの構造とヘリックス-ヘリックス相互作用	39

3-2-2.	ヘリックス間の Trp-Trp 相互作用	46
3-2-3.	脂質二分子膜存在下でのモデルペプチドの構造とペプチド-脂質膜間相互作用	50
3-2-4.	モデルペプチドの溶血活性	53
3-3.	Discussion	55
3-3-1.	モデルペプチドの構造とヘリックス-ヘリックス相互作用	55
3-3-2.	脂質二分子膜存在下でのモデルペプチドの構造とペプチド-脂質膜間相互作用	59
3-3-3.	モデルペプチドの膜摂動活性	61
3-4.	参考文献	62
<b>第 4 章</b>	<b>モデルペプチドのイオンチャネル特性</b>	<b>64</b>
4-1.	Introduction	64
4-2.	Results	66
4-2-1.	Trp 含有モデルペプチドのイオンチャネル特性	66
4-2-2.	Ile 含有疎水性モデルペプチドのイオンチャネル特性	71
4-2-3.	イオンチャネル活性のペプチド濃度依存性	73
4-3.	Discussion	76
4-3-1.	チャネル形成におけるヘリックス-ヘリックス相互作用とペプチド-脂質膜間相互作用	76
4-3-2.	モデルペプチドのチャネル構造とカチオン- $\pi$ 相互作用によるチャネル構造の安定化	78
4-3-3.	Viroporin 及び peptaibol のイオンチャネル構造に関する考察	81
4-4.	参考文献	83
<b>第 5 章</b>	<b>実験</b>	<b>86</b>
5-1.	試薬	86
5-2.	ペプチド合成	86
5-3.	アミノ酸分析	90
5-4.	Large Unilamellar Vesicles (LUVs) の調製	91
5-5.	円二色性 (CD) 測定	91
5-6.	溶血活性測定	92

5-7.	単一チャネル電流測定	93
5-8.	参考文献	96
<b>第6章</b>	<b>結論</b>	97
	略号	100
	謝辞	102

## 要旨

イオンチャネルタンパク質は細胞のイオン恒常性の維持や電気信号の形成などの生体内の様々な生理学的プロセスに加え、ウイルスのライフサイクルにも関与する膜タンパクである。また機能性を付与した人工イオンチャネルペプチドは抗菌剤、ドラッグデリバリーシステム、抗がん剤のような幅広い用途に応用できる。従って、チャネル形成を促進するような因子の探索は、天然のイオンチャネルタンパク質のイオン透過機構の理解や機能性人工イオンチャネルペプチドの設計において重要である。

多くのイオンチャネルは膜貫通領域のヘリックス構造が互いに相互作用することによりチャネル構造を形成する。本研究では、ペプチドによるチャネル形成の根幹となるヘリックス間相互作用の安定化因子として、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用やカチオン- $\pi$ 相互作用のような芳香族相互作用を想定した一連の Trp 含有ヘリックスモデルペプチドと疎水性相互作用を想定した Ile 含有ヘリックスモデルペプチドをデザインした。CD 測定とイオンチャネル測定から、ペプチド両末端に Trp を導入したペプチドは水溶液中で分子間 Trp-Trp 相互作用を形成し、ヘリックス間会合に寄与することが示唆された。またリポソーム存在下における CD 測定より、ヘリックス親水面への Trp の導入はペプチド-脂質間相互作用を増強することが示された。Ile を導入したペプチドは疎水性相互作用によって水溶液中でのヘリックス間相互作用の増強を示したが、チャネル形成能は観測されなかった。これらの結果から、ペプチドの膜挿入とチャネル形成には疎水面でのヘリックス間会合と解離が動的に起こる必要があり、それらのバランスが重要であることが示唆された。さらに特定部位への Trp の導入により、カチオン- $\pi$  相互作用によるチャネル構造の安定化やポアサイズの変化が示された。本研究で得られた知見は天然のイオンチャネルタンパク質における芳香族残基の重要性を示すだけでなく、機能性イオンチャネルペプチドの設計において Trp 残基の位置選択的な導入が有効な方法であることを示唆した。

# 第1章 序論

## 1-1. イオンチャネルタンパク質

### 1-1-1. 生体のイオンチャネルタンパク質の機能と構造

生体膜は脂質二分子膜から構成されており、二分子膜内部は疎水性であるためイオンや極性物質は透過できない。イオンチャネルタンパク質は生体膜にイオンの通り道となる孔(ポア)をつくることで、細胞内外のイオン輸送を行う。哺乳類動物のゲノムには100種類以上のイオンチャネルがコードされており、細胞内及び細胞間でのシグナルの伝達や細胞のイオン恒常性維持において必須のタンパク質である。細胞内外の各種イオン濃度はそれぞれ異なっており、膜の内外にはそれに応じた電位差(膜電位)が生じている。通常の細胞では細胞外を基準(0 mV)としたとき、細胞内は-90 mV~-60 mVの膜電位を保持しており、細胞膜は分極している。イオンチャネルタンパク質の主な機能は、膜電位変化、化学刺激、機械刺激などの様々な刺激に応答して、細胞内外のイオン濃度差および膜電位の勾配に従ってイオンを受動輸送し、細胞内外の各種イオン分布を時空間的に制御することである。このようなイオン輸送は細胞内カルシウム信号、細胞の電気信号、活動電位の発生に必須であるため、特に筋細胞や神経細胞のような興奮性細胞においてイオンチャネルは中心的な役割を果たすタンパク質である。

イオンチャネルタンパク質は数本の膜貫通ヘリックスから構成されるサブユニットが細胞膜内で相互作用し、多量体を形成することでイオン透過孔をつくる(Figure 1-1)。各サブユニットはイオン透過に関与するポアと刺激に応答してポアの開閉を制御するゲートといった2つの構造単位から構成されている。さらにポアにはイオン選択性フィルターと呼ばれる構造が存在しており、ポアとイオン選択性フィルターは天然のイオンチャネルタンパク質

のイオン透過機構を緻密に制御している。実際に、MacKinnon らは細菌由来のカリウムチャンネルである KcsA の結晶構造を基に、カリウムチャンネルの高いイオン選択性と速いイオン透過機構がポアとイオン選択性フィルターの精巧な構造によって実現していることを示している [1]。ゲートに関しては刺激を感知するセンサと呼ばれる機能単位が存在しているが、刺激を感知する機構については未知な部分が多い。KcsA の結晶構造が決定されて以来、多くのカリウムチャンネルの結晶構造解析がなされ、電位依存性のカリウムチャンネルの結晶構造も明らかになっているが [2]、膜電位の変化によってどのような構造変化が起きてチャンネルのゲーティングが制御されているのか、どのような残基が構造変化において重要な役割を担っているのかといった問題については現在も議論が続いている [3-5]。電位依存性なゲーティング機構に関しては、Shaw らが MD シミュレーションによって得られた結果を基にモデルを提案している [6]。このモデルによると、電位依存性カリウムチャンネルの正電荷をもつ膜貫通ヘリックス S4 が膜電位の変化に依存して膜中を上下に動き、S4 の動きと共役して S4-S5 リンカー及び S6 末端が動くことでゲートの開閉が制御されている。

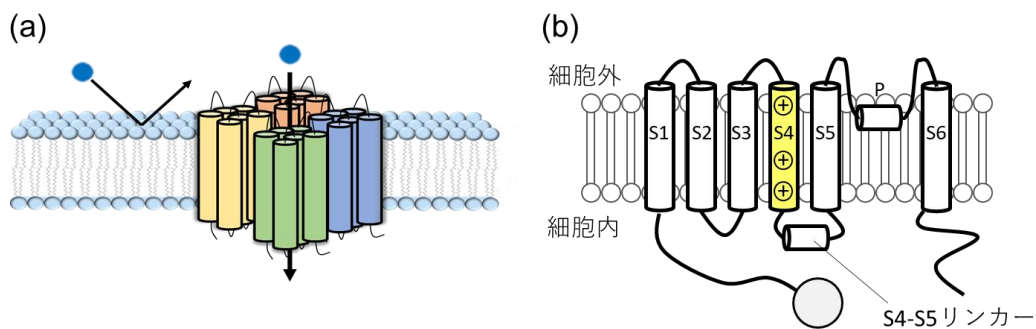


Figure 1-1. (a) イオンチャンネルタンパク質によるチャンネル形成. (b) 電位依存性カリウムチャンネルの膜貫通セグメント. S5-S6 がポア構造を構成し、S4 が電位センサの役割を果たす. P はポアヘリックスでイオン選択性フィルターになる。

## 1-1-2. ウイルスがもつイオンチャネルタンパク質

ウイルスの遺伝子には viroporin と呼ばれるタンパク質ファミリーがコードされている。様々なウイルス由来の viroporin の遺伝子を宿主細胞に発現した場合、宿主の細胞膜透過性が増加することが報告されている [7]。さらに単離された viroporin がリポソームや平面脂質二分子膜存在下でイオンチャネルを形成することも示されている [8]。このことから viroporin はイオンチャネルタンパク質として機能していると考えられている。Viroporin はウイルス遺伝子の複製、ウイルスタンパクの会合、宿主細胞に対するウイルス粒子の侵入及び放出の際の膜融合といったウイルスのライフサイクルにおいて、中心的な役割を果たすイオンチャネルタンパク質である [9]。また、いくつかのウイルスでは宿主細胞への感染において viroporin が必須であることが報告されている [10]。現在までに数多くのウイルス由来の viroporin が発見されており、詳細な構造研究が行われている代表的な viroporin として、A 型インフルエンザウイルスの M2 タンパク (IVA M2) がある。IVA M2 は単一の膜貫通ヘリックス構造をもつ 97 残基のタンパク質で、ウイルスエンベロープ中で 4 量体に会合することでチャネルを形成する [11]。IVA M2 はプロトンチャネルとして機能するだけでなく、プロトン輸送と同時にカリウムイオンをプロトンとは逆の方向へ輸送する  $H^+/K^+$  アンチポーターとしても作用する [9]。これまで IVA M2 はウイルス RNA を宿主細胞内に放出する際に、ウイルス内部の pH を低下させるプロトンチャネルとして機能すると考えられてきた [12]。しかしながら、近年、IVA M2 は宿主細胞からウイルスが出芽する際にも重要な役割を果たすことが報告されている [9]。IVA のようなエンベロープウイルスは宿主細胞から出芽するとき、膜融合を介して原形質膜から切り離される。Figure 1-2 に示すように、この過程は膜のネックの形成によって始まり、ネックの内側の単層が接触し、膜融合が起こる。原形質膜には膜電位が存在するため、ネック内側の単層の接触は電気的な反発を伴う。このとき原形質膜に挿入された IVA M2 は  $H^+/K^+$  アンチポーターとして作用し、原形質膜の脱分極を引き起



こし、膜表面の電荷密度を減少させることで、単層間の反発を減少させ膜融合を促進する。Viroporin は、単一の膜貫通ドメインをもつ class I とヘリックス-ターン-ヘリックス構造から成る 2 本の膜貫通ドメインをもつ class II に分類される [9]。さらにそれぞれの class は膜トポロジーに基づいて 2 つの subgroup に分けられる。生体のチャネルタンパク質と同様に viroporin は膜貫通ヘリックスが会合体を形成することでチャネルを構築するが、原核生物や真核生物のイオンチャネルと比較すると配列相同性は低く [8]、他の生物とは異なる機能や性質をもつことが示唆される。一般的に、viroporin は 60-120 アミノ酸残基で構成され、配列中には高度に疎水性のドメインが含まれており、この部分が両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成する。この両親媒性  $\alpha$ -ヘリックスが親水性面をポア側に、疎水性面を二分子膜の脂質アシル鎖側に向くように多量体を形成することでイオン透過孔が作られる [11, 13, 14]。

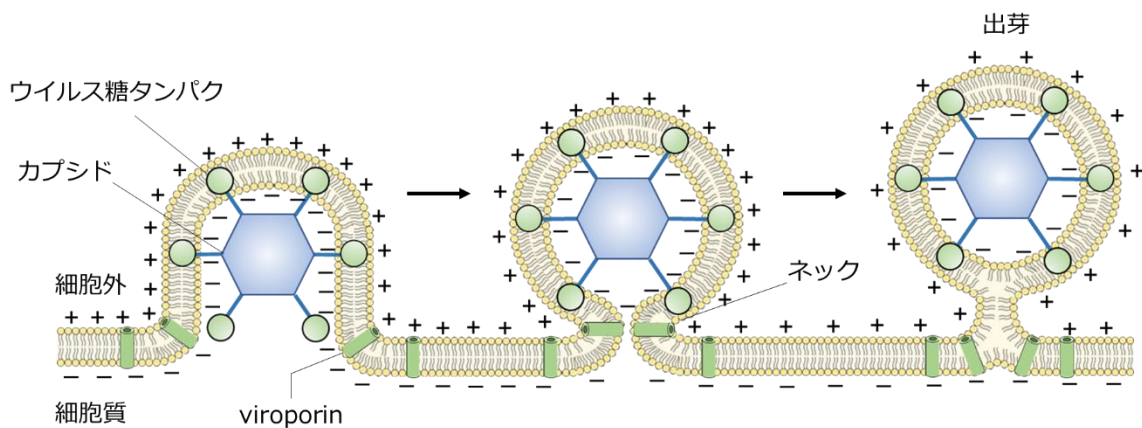


Figure 1-2. Viroporin によって促進されるウイルスの出芽の模式図 [9]。Viroporin は細胞膜の脱分極を引き起こし、膜表面の電荷密度を減少させる。これにより、ネックが形成される際の電氣的な反発が弱められ、膜融合が起こりやすくなる。

## 1-2. イオンチャネルペプチド

### 1-2-1. イオンチャネルペプチドの構造

イオンチャネルはタンパク質よりも小さな分子であるペプチドによっても形成される。イオンチャネルタンパク質と同様に、ペプチドによるチャネル構造は会合体の形成により構築されるが、単一の二次構造が会合してポア部分のみを形成するという点でタンパク質よりも単純な構造である。チャネルを構成するペプチドモノマーの二次構造は実に多様であるが、最も一般的な構造は、ヘリックス構造であり、多くのヘリックス構造をとる天然のイオンチャネルペプチドや人工イオンチャネルペプチドが報告されている [15-19]。Gramicidin A はグラム陽性菌である *Brevibacillus brevis* が産生する 15 残基の抗菌ペプチドであり、 $\beta$ -ヘリックス構造をとるモノマーが脂質膜中で N 末端同士 (head-to-head) で会合することによりイオン透過孔を形成する [20]。また合成ペプチドを用いた研究において、両親媒性の  $3_{10}$ -ヘリックス構造によるイオンチャネル形成も報告されている [21]。一方、Ghadiri らは、L- $\alpha$ アミノ酸と D- $\alpha$ アミノ酸を交互に配列した環状ペプチドが分子間水素結合で積み重なることによって、膜中でナノチューブ構造を形成し、イオンチャネルとして機能することを報告した [22]。このようにイオンチャネルペプチドの構造には多様性があるが、脂質膜中で会合体を形成するという点は共通しており、膜中での分子間相互作用がチャネル形成において重要な因子であると考えられる。

## 1-2-2. $\alpha$ -ヘリックス性のイオンチャネルペプチド

$\alpha$ -ヘリックス構造をとるイオンチャネルペプチドは脂質膜中でヘリックス-ヘリックス相互作用を介して会合体を形成することにより、ヘリックスバンドル状のポア構造を形成する。真菌、カエル、哺乳類動物のような多くの生物は $\alpha$ -ヘリックス性のイオンチャネルペプチドを産生する。これらのペプチドはイオンチャネル作用を介して生体膜の構造や機能に影響を与えるため、生体防御のための抗菌剤として作用する [23]。特に真菌から単離される膜活性ペプチドである peptaibol ファミリーでは、その多くが $\alpha$ -ヘリックス性イオンチャネルペプチドとして作用する。Peptaibol は異常アミノ酸である 2-アミノイソ酪酸 (Aib, B) を配列中に多く含み、C 末端がアミノアルコール化されているという特徴をもつ [24]。土壌真菌類 *Trichoderma viride* から単離された alamethicin は詳細な研究がされている peptaibol である。Alamethicin は膜貫通 $\alpha$ -ヘリックス構造をとる 20 残基のペプチドで、3-12 のペプチドモノマーが会合することでヘリックスバンドル状のチャネル構造を形成する [15, 16]。このような alamethicin によるチャネル形成は barrel-stave モデルとして知られている。天然のイオンチャネルペプチドの他にも、イオンチャネルタンパク質の膜貫通ドメイン由来の合成ペプチドや de novo 設計された両親媒性ペプチドが $\alpha$ -ヘリックス構造を形成し、天然のイオンチャネルタンパク質の構造と機能を模倣することが報告されている [17-19]。これらのイオンチャネルペプチドは天然のチャネルタンパク質と同様のポア構造を有するため、イオンチャネルタンパク質の単純化されたモデルとして利用できる。天然の膜タンパクは多量体からなる複雑な構造に加え、脂質二分子膜という特異な環境下で構造を保持していることから X 線結晶構造解析や NMR 構造解析などが困難である。従って、構造解析が難しく、複雑な構造をもつ天然のチャネルタンパク質の構造と機能を理解するためのモデルペプチドとして、 $\alpha$ -ヘリックス性イオンチャネルペプチドは有用である。

Table 1-1. 天然起源または人工の $\alpha$ -ヘリックス性イオンチャネルペプチド. Jはイソバリン, Oはヒドロキシプロリンを表す.

peptide	sequence	ref.
<b>天然起源のイオンチャネルペプチド</b>		
Alamethicin F-50	Ac-BPBABAQVBGLBPVBBQQF-ol	15, 16
Chrysospermin A	Ac-FBSBBLQGBBAABPBBBQW-ol	25
Hypelcin A	Ac-BPBABBQLBGBBBPVBBQQL-ol	26
Saturnisporin SA IV	Ac-BABABBQBLBGBBPVBJQQP-ol	27
Trichorzin PA IX	Ac-BSAJJQVBGLBPLBBQP-ol	28
Trichotoxin A-50E	Ac-BGBLBQBBBAABPLBBQV-ol	29
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	30
Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIIKAGPAVAVVGQATQIAK-NH <sub>2</sub>	31
$\delta$ -toxin	MAQDIISTIGDLVWIIDTVNKFTKK	32
<b>人工イオンチャネルペプチド</b>		
(LSSLLSL) <sub>3</sub>	LSSLLSLLSSLLSLLSSLLSL-NH <sub>2</sub>	17
S3	DPWNWLDFTVITFAYVTEFVDL	18
M2 $\delta$	EKMSTAISVLLAQAVFLLLTSQR	19
M2GlyR	PARVGLGITTVLTMTTQSSGSRA	33
BXBA20	Ac-(BXBA) <sub>5</sub> -NH <sub>2</sub> (X = K, E, G, S)	34, 35

## 1-3. イオンチャネルにおける芳香族アミノ酸

### 1-3-1. $\pi$ - $\pi$ 相互作用とカチオン- $\pi$ 相互作用の性質

トリプトファン (Trp), フェニルアラニン (Phe), チロシン (Tyr) のような芳香族側鎖をもつアミノ酸同士は芳香族-芳香族相互作用という特異的な相互作用を形成する. Figure 1-3 に示すように, 芳香族-芳香族相互作用は主に edge-to-face と offset stacked の2種類のジオメトリで配向し [36], これらの相互作用は $\pi$ - $\pi$ 相互作用とも呼ばれている. 芳香環は平面構造であり,  $\pi$ 電子が非局在化しているため, 環の上下は部分的に負に荷電しており, 対照的に芳香環に結合している水素原子は部分的に正に荷電し, 全体として四重極モーメントをもつ. Edge-to-face ではこの水素原子と芳香環の $\pi$ 電子が相互作用し, 2つの芳香環は垂直の配向をとる. 一方で, offset stacked では2つの芳香環は平行に重なった配向をとるが,  $\pi$ 電子同士の反発により少しずれた形をとる. Edge-to-face はアルキル基の水素原子と芳香環の $\pi$ 電子の間でも起こり, CH- $\pi$ 相互作用とも呼ばれる. 芳香族-芳香族相互作用はファンデルワールス力と静電力の2つの成分から成ると提唱されており, offset stacked のような配向ではファンデルワールス力の寄与が増加すると考えられている [37]. さらに,  $\pi$ 電子をもつ芳香族アミノ酸はカチオン性アミノ酸であるリジン (Lys) やアルギニン (Arg) の側鎖とも相互作用する. この種の相互作用はカチオン- $\pi$ 相互作用として知られている. カチオン- $\pi$ 相互作用も芳香環の電子豊富な面に対して, 荷電部分が平行に配向するコンホメーション (parallel) と垂直に配向するコンホメーション (perpendicular) の2種類の配向があり, 一般的に平行な配向が有利なコンホメーションであることが示唆されている [38].  $\pi$ - $\pi$ 相互作用やカチオン- $\pi$ 相互作用は, 様々なタンパク質の立体構造形成や受容体とリガンドの相互作用部位において観察されており, タンパク質の分子認識において重要である [39]. さらにカチオン- $\pi$ 相互作用はカリウムチャネルにおけるカリウムイオン選択性に関与していると考えられている [39].

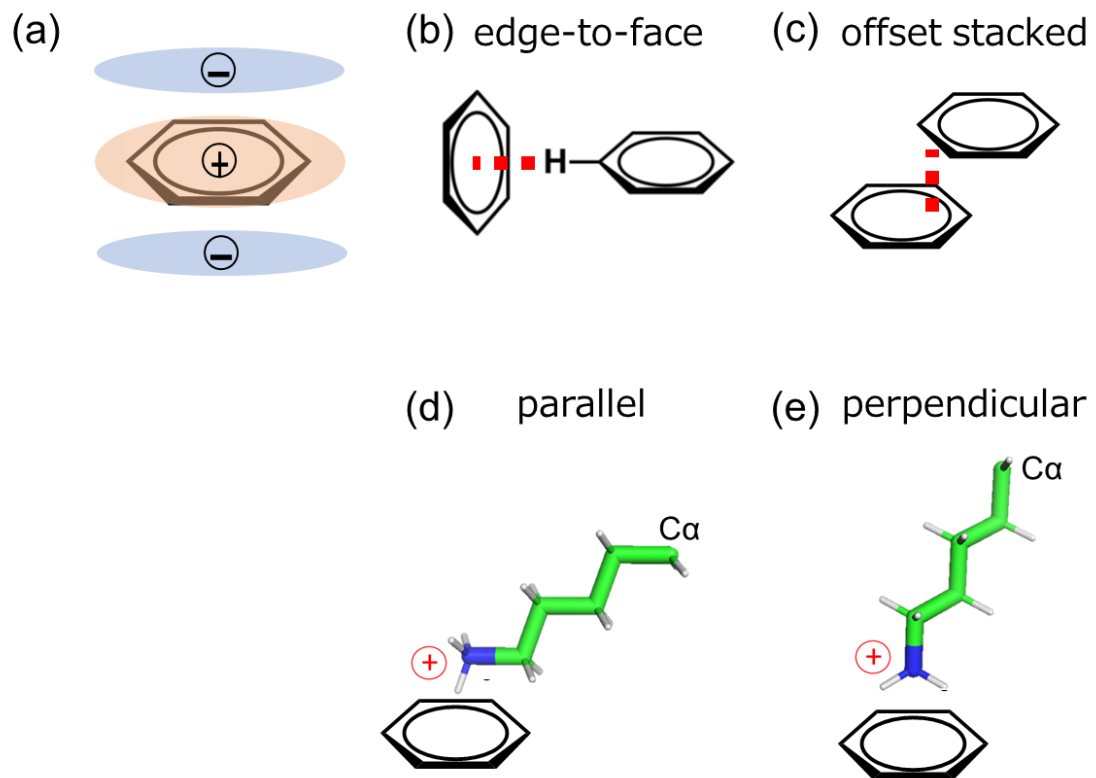


Figure 1-3. 芳香族-芳香族相互作用及びカチオン- $\pi$ 相互作用の模式図. (a) 芳香環の性質. (b) Edge-to-face. (c) Offset stacked. Lys 側鎖のアミノ基は芳香環に対して parallel (d) または perpendicular (e) に配向している.

### 1-3-2. イオンチャネルの構造及び機能に対する芳香族残基の影響

天然のイオンチャネルタンパク質においても、膜貫通セグメントに存在する芳香族残基がチャネル構造形成や機能発現に重要であることが示唆されている。カリウムチャネルのポア形成に関与する膜貫通セグメントには保存されている芳香族残基が存在しており、これらの点変異研究により芳香族残基がチャネルの開状態や閉状態の安定性に寄与していることが報告されている [40-43]。またグリシン受容体や GABA<sub>A</sub>受容体のようなイオンチャネル型受容体では、膜貫通ヘリックスセグメントに多数の芳香族残基が存在しており、これらが $\pi$ - $\pi$ 相互作用やカチオン- $\pi$ 相互作用から成る芳香族ネットワークを形成することで、チャネル会合体を安定化していることが示唆された [44, 45]。

Table 1-2 に示すように、近年、様々な viroporin の一次構造において疎水性のドメインとは別に、芳香族アミノ酸である Trp, Phe, Tyr に富んだドメインが発見されている [46]。芳香族アミノ酸は細胞のイオンチャネルにはあまり含まれていないため、この領域がウイルス特有の膜融合や膜摂動、膜透過性に関与することが示唆される。また、Trp に対応するコドン (UGG) では 3 番目のコドンであるグアニンがアデニンに変異すると終止コドン (UGA) となる。グアニンからアラニンへの変異は RNA ウイルスにおいて一般的であるため、Trp の存在は不完全なタンパク質を産生してしまうというリスクを伴うにもかかわらず、viroporin の芳香族アミノ酸に富んだ領域には複数の Trp 残基が存在する。従って、Trp の存在は比較的小さなタンパク質である viroporin がヘリックス会合体を形成するために必要な要素であることが推察される。

Table 1-2. Viroporin の一次構造. 芳香族残基は赤字で示される.

viroporin	sequence
Human Poliovirus 1 protein 2B	GITN <b>Y</b> IESLGAA <b>F</b> GSG <b>F</b> TQQIGDKVTELTNMVTSTITEKLLKNLVKIISSLVITR <b>Y</b> ED TTTVLATLALLGCDVSP <b>W</b> Q <b>W</b> LKKKACDILEIPYAIKQ
Human coxsackievirus B3 protein 2B	GVKD <b>Y</b> VEQLGNA <b>F</b> GSG <b>F</b> TNQICEQVNULLKESLVGQDSILEKSLKALVKIISALVIVV RNHDDLITVTATLALIGCTSSP <b>W</b> R <b>W</b> LKQKVSQ <b>Y</b> YGIPMAERQ
Human Poliovirus 1 protein 3A	GPLQ <b>Y</b> KDLKIDIKTSPPPECINDLLQAVDSQEV <b>R</b> D <b>Y</b> CEKKG <b>W</b> IVNITSQVQTERNIN RAMTILQAVTT <b>F</b> AAVAGVVY <b>V</b> M <b>Y</b> KL <b>F</b> AGHQ
Semliki Forest Virus protein 6K	ASVAETMA <b>Y</b> LWDQNQAL <b>F</b> W <b>L</b> E <b>F</b> AAPVACILI <b>T</b> YCLRNVLCCCKSL <b>S</b> FLVLLSLGAT ARA
Sindbis virus protein 6K	ET <b>F</b> TETMS <b>Y</b> LWSNSQP <b>F</b> FW <b>V</b> QLCIPLAA <b>F</b> IVLMRCCSCCL <b>P</b> FLVVAG <b>Y</b> LAKVA
Ross River virus protein 6K	GSAS <b>F</b> AETMA <b>Y</b> LWDENKTL <b>F</b> W <b>M</b> E <b>F</b> AAPAAALALLACCICKSLICCK <b>P</b> <b>F</b> S <b>F</b> LVLLSL GAS
Human immunodeficiency virus type1 protein Vpu	MQPIQIAIVALVVAIIIAIV <b>V</b> W <b>S</b> IVIE <b>Y</b> RKILRQRKIDRLIDRLIERAEDSGNESEGEISA LVEMGVEMGHAP <b>W</b> DVDDL
Human respiratory syncytial virus protein SH	MENTSITIE <b>F</b> SSK <b>F</b> W <b>P</b> Y <b>F</b> TLIHMITTIISLLIIISIMTAILNK <b>L</b> CE <b>Y</b> N <b>V</b> FHNKT <b>F</b> ELPRAR VNT
Influenza A virus protein M2	MSLLTEVETPIRNE <b>W</b> GCRCNDSSDPLVVAASIIIGILHL <b>L</b> WILDRL <b>F</b> FKC <b>I</b> Y <b>R</b> FFEHG LKRGPSTEGVPESMREE <b>Y</b> RKEQQSAVDADD <b>S</b> H <b>F</b> VSIELE
Avian orthoreovirus protein p10	MLRMPPGSCNGATA <b>V</b> FGNVHCQAAQNTAGGDLQATSSII <b>Y</b> W <b>P</b> YLAAGGG <b>F</b> LLIV IFALL <b>Y</b> CCKAKVKADAARS <b>V</b> FHRELVALSSGKHNAMAPP <b>Y</b> DV
Bovine ephemeral fever virus protein alpha 1	MEKGLLSN <b>F</b> W <b>N</b> D <b>F</b> K <b>R</b> W <b>S</b> EDRKVEI <b>V</b> W <b>W</b> SNLESKVRL <b>G</b> W <b>I</b> ILILLGILAIRIAIK <b>V</b> QCVK <b>F</b> TNQGVKKIKRIIKRKR <b>S</b> IK <b>K</b> Y <b>R</b> KT
Hepatitis C virus protein p7	ALENLVILNAASLAGTHGLV <b>S</b> FL <b>V</b> FF <b>C</b> FAW <b>Y</b> LKGR <b>W</b> VP <b>G</b> AV <b>Y</b> AL <b>Y</b> GM <b>W</b> PLLLLLLA LPQRAYA
Paramecium bursaria chlorella virus protein Kcv	MLV <b>F</b> SK <b>F</b> L <b>T</b> RTE <b>P</b> F <b>M</b> IHL <b>F</b> ILAM <b>F</b> V <b>M</b> I <b>Y</b> K <b>F</b> FP <b>G</b> GFEN <b>F</b> SVANPD <b>K</b> KAS <b>W</b> IDC <b>I</b> Y <b>F</b> G VTTHSTVG <b>F</b> GDILPKTTGAKLCTIAHIVTV <b>F</b> FIV <b>L</b> Y <b>L</b>



## 1-4. 研究の目的

有用なイオンチャネル特性を付与した $\alpha$ -ヘリックス性イオンチャネルペプチドは、抗菌剤 [47, 48], ドラッグデリバリーシステム [49], 抗がん治療のための細胞溶解性ペプチド [50] のような機能性分子の候補化合物となる。 $\alpha$ -ヘリックス性イオンチャネルペプチドによるヘリックスバンドル構造の形成には、ペプチド-脂質間相互作用、脂質膜中でのヘリックス間会合が関与している。従って、ペプチド-脂質間相互作用やヘリックス-ヘリックス相互作用の調節によるチャネル形成の促進、チャネル構造の安定化、イオン流量やポアサイズの制御は機能性分子を創製する上で重要である。

低いペプチド濃度で安定なイオンチャネル構造を形成するようなペプチド配列は、機能性人工イオンチャネルペプチドを設計する際の基本骨格として利用できる。従って、ポア構造の安定化因子やチャネル形成を促進するような因子の探索は重要である。ヘリックスバンドルによるチャネル構造の形成は、ヘリックス-ヘリックス相互作用により駆動されるため、ヘリックス間会合による二量体形成はチャネル形成能に影響を与えることが推測される。実際に、平らは静電相互作用によって駆動される二本鎖コイルドコイル構造の形成が安定なチャネル構造の形成を促進することを報告した [51]。本研究では、水溶液中で高いヘリックス会合能を有する Ile 含有疎水性ヘリックスモデルペプチドを設計して、円二色性 (CD) 測定とイオンチャネル活性測定により、水溶液中でのヘリックス会合能とイオンチャネル形成能の相関を調べた。その結果、水性環境下において強固な疎水性相互作用による安定な二本鎖コイルドコイル構造の存在が示唆されたが、イオンチャネル活性は観測されなかった。従って、両親媒性ヘリックスペプチドの膜挿入とチャネル形成には、水溶液中における疎水面でのヘリックス間会合と解離が動的に起こる必要があり、それらのバランスが重要であることが示唆された。

さらに本研究では、チャネル構造の安定化因子として芳香族残基である Trp に焦点を当て

た. 近年報告されている生体のイオンチャネルタンパク質や viroporin における Trp 残基の存在や芳香族相互作用に着目すると, Trp 残基がヘリックス会合やヘリックスバンドル構造に与える影響は興味深く, これらを調べるためのモデルペプチドは複雑な構造をもつイオンチャネルタンパク質における芳香族残基の役割を理解する上で有用である. またこれまでに報告されている天然のイオンチャネルタンパク質のチャネル機能に対する芳香族残基の重要性や, 膜タンパクのヘリックス間会合の安定化に対する芳香族相互作用の重要性に着目すると, 人工イオンチャネルペプチドの設計において Trp 残基が安定なチャネル構造形成のためのビルディングブロックになることが期待される. 一方でこれまでに, 両親媒性の  $\alpha$ -ヘリックス構造を形成するイオンチャネルペプチドの異なる部位に Trp を導入し, 導入部位とチャネル活性に対する Trp の影響を系統的に調べた例はなく, チャネル形成に対する Trp の効果は詳細に明らかにされていない. そこで本研究では, de novo 設計した両親媒性ヘリックスモデルペプチドを母骨格として Trp をペプチド鎖中の異なる位置に導入した Trp 含有ヘリックスモデルペプチドを設計して, 構造-活性相関研究を行った. 結果として, ヘリックスの特定の位置における Trp 残基の導入はチャネルのコンダクタンス値, 寿命, チャネル形成濃度に影響を与えることが示され, Trp 側鎖によるペプチド間のカチオン- $\pi$ 相互作用と  $\pi$ - $\pi$ 相互作用の形成がチャネル構造の安定化に寄与することが示された.

## 1-5. 参考文献

- [1] Doyle, D. A.; Cabral, J. M.; Pfuetzner, R. A.; Kuo, A.; Gulbis, J. M.; Cohen, S. L.; Chait, B. T.; MacKinnon, R., The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* **1998**, *280*, 69-77.
- [2] Jiang, Y.; Lee, A.; Chen J.; Ruta, V.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R., X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Nature* **2003**, *423*, 33-41.
- [3] Horn, R., Coupled Movements in Voltage-gated Ion Channels. *J. Gen. Physiol.* **2002**, *120*, 449-453.
- [4] Yellen, G., The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q. Rev. Biophys.* **1998**, *31*, 239-295.
- [5] Yifrach, O.; MacKinnon, R., Energetics of Pore Opening in a Voltage-Gated K<sup>+</sup> Channel. *Cell* **2002**, *1111*, 231-239.
- [6] Jensen, M. Ø.; Jogini, V.; Borhani, D. W.; Leffler, A. E.; Dror, R. O.; Shaw, D. E., Mechanism of voltage gating in potassium channels. *Science* **2012**, *336*, 229-233.
- [7] Gonzalez, M. E.; Carrasco, L., Viroporins. *FEBS Lett.* **2003**, *552*, 28-34.
- [8] Fischer, W. B.; Hsu, Hao-Jen, Viral channel forming proteins — Modeling the target. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2011**, *1808*, 561-571.
- [9] Nieva, J. L.; Madan, V.; Carrasco, L., Viroporins: structure and biological functions. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 563-574.
- [10] Sakai, A.; Claire, M. St.; Faulk, K.; Govindarajan, S.; Emerson, S. U.; Purcell, R. H.; Bukh, J., The p7 polypeptide of hepatitis C virus is critical for infectivity and contains functionally important genotype-specific sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 11646-11651.
- [11] Pinto, L. H.; Dieckmann, G. R.; Gandhi, C. S.; Papworth, C. G.; Braman, J.; Shaughnessy, M. A.; Lear, J. D.; Lamb, R. A.; DeGrado, W. F., A functionally defined model for the M2 proton

channel of influenza A virus suggests a mechanism for its ion selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1997**, *94*, 11301-11306.

[12] Pielak, R. M.; Chou, J. J., Influenza M2 proton channels. *Biochim. Biophys. Acta* **2011**, *1808*, 522-529.

[13] Agirre, A.; Barco, A.; Carrasco, L.; Nieva, J. L., Viroporin-mediated membrane permeabilization. Pore formation by nonstructural poliovirus 2B protein. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 40434-40441.

[14] Melton, J. V.; Ewart, G. D.; Weir, R. C.; Board, P. G.; Lee, E.; Gage, P. W., Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 46923-46931.

[15] Sansom, M. S. P. Alamethicin and related peptaibols—model ion channels. *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*, 105–124.

[16] Payne, J. W.; Jakes, R.; Hartley, B. S. The primary structure of alamethicin. *Biochem. J.* **1970**, *117*, 757–766.

[17] Lear, J. D.; Wasserman, Z. R.; DeGrado, W. F. Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels. *Science* **1988**, *240*, 1177–1181.

[18] Oiki, S.; Danho, W.; Montal, M. Channel protein engineering: synthetic 22–mer peptide from the primary structure of the voltage– sensitive sodium channel forms ionic channels in lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 2393–2397.

[19] Oiki, S.; Danho, W.; Madison, V.; Montal, M. M2  $\delta$ , a candidate for the structure lining the ionic channel of the nicotinic cholinergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1988**, *85*, 8703–8707.

[20] Kelkar, D. A.; Chattopadhyay, A. The gramicidin ion channel: a model membrane protein. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2007**, *1768*, 2011–2025.

- [21] Iwata, T.; Lee, S.; Oishi, O.; Aoyagi, H.; Ohno, M.; Anzai, K.; Kirino, Y.; Sugihara, G. Design and synthesis of amphipathic 3<sub>10</sub>-helical peptides and their interactions with phospholipid bilayers and ion channel formation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4928–4933.
- [22] Montenegro, J.; Ghadiri, M. R.; Granja, J. R. Ion channel models based on self-assembling cyclic peptide nanotubes. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2955–2965.
- [23] Matsuzaki, K. Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defence? Magainins and tachyplesins as archetypes, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1373*, 137–146.
- [24] Sansom, M. S. P. The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **1991**, *55*, 139–235.
- [25] Grigoriev, P.; Schlegel, R.; Dornberger, K.; Gräfe, U. Formation of membrane channels by chrysospermins, new peptaibol antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1237*, 1–5.
- [26] Matsuzaki, K.; Nakai, S.; Handa, T.; Takaishi, Y.; Fujita, T.; Miyajima, K. Hypelcin A, an alpha-aminoisobutyric acid containing antibiotic peptide, induced permeability change of phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* **1989**, *28*, 9392–9398.
- [27] Rebuffat, S.; Duclohier, H.; Auvin-Guette, C.; Molle, G.; Spach, G.; Bodo, B. Membrane-modifying properties of the pore-forming peptaibols saturnisporin SA IV and harzianin HA V. *FEMS. Microbiol. Immunol.* **1992**, *5*, 151–160.
- [28] Duval, D.; Cosette, P.; Rebuffat, S.; Duclohier, H.; Bodo, B.; Molle, G. Alamethicin-like behaviour of new 18-residue peptaibols, trichorzins PA. Role of the C-terminal amino-alcohol in the ion channel forming activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1369*, 309–319.
- [29] Duclohier, H.; Alder, G. M.; Bashford, C. L.; Brückner, H.; Chugh, J. K.; Wallace, B. A. Conductance studies on trichotoxin\_A50E and implications for channel structure. *Biophys. J.* **2004**, *87*, 1705–1710.

- [30] Cruciani, R. A.; Barker, J. L.; Durell, S. R.; Raghunathan, G.; Guy, H. R.; Zasloff, M.; Stanley, E. F. Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes. *Eur. J. Pharmacol.* **1992**, *226*, 287–296.
- [31] Christensen, B.; Fink, J.; Merrifield, R. B.; Mauzerall, D. Channel-forming properties of cecropins and related model compounds incorporated into planar lipid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 5072–5076.
- [32] Mellor, I. R.; Thomas, D. H.; Sansom, M. S. Properties of ion channels formed by *Staphylococcus aureus* delta-toxin. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *942*, 280–294.
- [33] Reddy, G. L.; Iwamoto, T.; Tomich, J. M.; Montal, M. Synthetic peptides and four-helix bundle proteins as model systems for the pore-forming structure of channel proteins. II. Transmembrane segment M2 of the brain glycine receptor is a plausible candidate for the pore-lining structure. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 14608–14615.
- [34] Higashimoto, Y.; Kodama, H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Kato, F.; Kondo, M. Structure-function relationship of model Aib-containing peptides as ion transfer intermembrane templates. *J. Biochem.* **1999**, *125*, 705–712.
- [35] Hara, T.; Kodama, H.; Higashimoto, Y.; Yamaguchi, H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Ehara, T.; Kondo, M. Side chain effect on ion channel characters of Aib rich peptides. *J. Biochem.* **2001**, *130*, 749–755.
- [36] Hunter, C. A.; Sanders, J. K. M. The nature of  $\pi$ - $\pi$  interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 5525–5534.
- [37] Waters, M. L. Aromatic interactions in model systems. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 736–741.
- [38] Ma, J. C.; Dougherty, D. A. The cation- $\pi$  interaction. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1303–1324.

- [39] Dougherty, D. A. Cation- $\pi$  interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **1996**, *271*, 163-168.
- [40] Batulan, Z.; Haddad, G. A.; Blunck, R. An intersubunit interaction between S4-S5 linker and S6 is responsible for the slow off-gating component in Shaker K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 14005–14019.
- [41] Kanevsky, M.; Aldrich, R. W. Determinants of voltage-dependent gating and open-state stability in the S5 segment of Shaker potassium channels. *J. Gen. Physiol.* **1999**, *114*, 215–242.
- [42] Pless, S. A.; Niciforovic, A. P.; Galpin, J. D.; Nunez, J. J.; Kurata, H. T.; Ahern, C. A., A novel mechanism for fine-tuning open-state stability in a voltage-gated potassium channel. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1–11.
- [43] Garneau, L.; Klein, H.; Lavoie, M. F.; Brochiero, E.; Parent, L.; Sauvé, R. Aromatic-aromatic interactions between residues in KCa3.1 pore helix and S5 transmembrane segment control the channel gating process. *J. Gen. Physiol.* **2014**, *143*, 289–307.
- [44] Cory-Wright, J.; Alqazzaz, M.; Wroe, F.; Jeffreys, J.; Zhou, L.; Lummis, S. C. R. Aromatic Residues in the Fourth Transmembrane-Spanning Helix M4 Are Important for GABA<sub>A</sub> Receptor Function. *ACS. Chem. Neurosci.* **2018**, *9*, 284–290.
- [45] Haeger, S.; Kuzmin, D.; Detro-Dassen, S.; Lang, N.; Kilb, M.; Tsetlin, V.; Betz, H.; Laube, B.; Schmalzing, G. An intramembrane aromatic network determines pentameric assembly of Cys-loop receptors. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 90–98.
- [46] Sanz, M. A.; Madan, V.; Carrasco, L.; Nieva, J. L., Interfacial domains in Sindbis virus 6K protein. Detection and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **2002**, *278*, 2051-2057.
- [47] Agawa, Y.; Lee, S.; Ono, S.; Aoyagi, H.; Ohno, M.; Taniguchi, T.; Anzai, K.; Kirino, Y. Interaction with phospholipid bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic

amphipathic  $\alpha$ -helical model peptides of various chain lengths. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20218–20222.

[48] Juvvadi, P.; Vunnam, S.; Merrifield, E. L.; Boman, H. G.; Merrifield, R. B. Hydrophobic effects on antibacterial and channel-forming properties of cecropin A-melittin hybrids. *J. Pept. Sci.* **1996**, *2*, 223–232.

[49] Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. C., Jr GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 967–985.

[50] Ellerby, H. M.; Lee, S.; Ellerby, L. M.; Chen, S.; Kiyota, T.; del Rio, G.; Sugihara, G.; Sun, Y.; Bredeesen, D. E.; Arap, W.; Pasqualini, R. An artificially designed pore-forming protein with anti-tumor effects. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 35311–35316.

[51] Taira, J.; Jelokhani-Niaraki, M.; Osada, S.; Kato, F.; Kodama, H. Ion-channel formation assisted by electrostatic interhelical interactions in covalently dimerized amphiphilic helical peptides. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3705–3714.

[52] Jelokhani-Niaraki, M.; Nakashima, K.; Kodama, H.; Kondo, M. Interaction and orientation of an  $\alpha$ -aminoisobutyric acid- and tryptophan-containing short helical peptide pore-former in phospholipid vesicles, as revealed by fluorescence spectroscopy. *J. Biochem.* **1998**, *123*, 790–797.



## 第2章 トリプトファン含有 Aib 基盤モデルペプチドと疎水性 Aib 基盤モデルペプチドのデザイン

### 2-1. Introduction

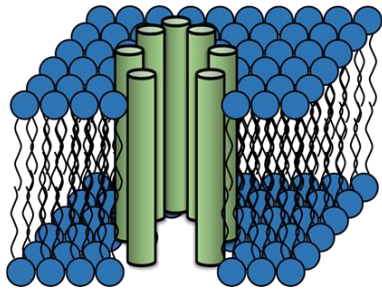
#### 2-1-1. 天然物由来のイオンチャネルペプチドのデザイン

Table 1-1 に示すように、これまでに多くの天然物由来のイオンチャネルペプチドが見出されている。Figure 2-1 に示すように、これらのイオンチャネルペプチドによるポア形成機構には barrel-stave モデルと toroidal モデルの 2 つのモデルが知られている [1]。Barrel-stave モデルでは、複数の膜貫通ヘリックスが膜中でバンドル状に会合することで barrel (樽) 様のポアを形成する。一方、toroidal モデルでは脂質分子がヘリックスペプチドの間に入り込み、脂質頭部とヘリックスの親水面がポア内壁を構成している。イオンチャネルペプチドを機能性分子として利用するためには、一定サイズの安定なポア構造が要求される。Melittin [1] や magainin [2] のような toroidal モデルによってポアを形成するペプチドは、ヘリックスモノマー間の脂質分子が流動的に動くことでポアサイズが動的に変化するため、ポアサイズの制御が難しく、これまでにこれらのペプチドが機能性イオンチャネルペプチドのデザインの基本骨格として利用された例はない。一方で barrel-stave モデルによって形成されるポアについても、バンドルを構成する膜貫通ヘリックスの本数が動的に変化するためポアサイズが一定ではないが、会合に関与するヘリックスの本数を制御して単一の会合状態を安定化するようにペプチドをデザインすることでポアサイズを制御することが可能である。土壌真菌由来の peptaibol である alamethicin は代表的な barrel-stave モデルのイオンチャネルペプチドであり [3, 4], alamethicin を基本骨格として単一の会合状態を安定化するようなペプチドデザインがこれまでにいくらか報告されている。Woolley らは、共有結合によってペ

プチドC末端を架橋した二量化 alamethicin をデザインした [5]. この二量化 alamethicin では 6 量体ヘリックスバンドル構造が優先的に安定化され、一定サイズのポアを形成することが報告されている. また, 6 量体ヘリックスバンドルによるチャネルの平均寿命は, 単量体 alamethicin と比較して大きく上昇しており, より安定なチャネルを形成することが示された. 非共有結合により alamethicin の会合状態を制御するようなペプチドデザインも報告されている. Sugiura らは alamethicin の細胞外ドメインに水溶液中でのヘリックス会合モチーフであるロイシンジッパー配列を導入することによって, 4 量体ヘリックスバンドル構造を選択的に安定化できることを示した [6]. このペプチドではロイシンジッパー配列による疎水性相互作用がヘリックスの二量化の強い駆動力になると考えられている. さらに Figure 2-2 に示すように, Sugiura らはペプチドテンプレートに単量体モチーフを共有結合させ, 会合体をテンプレート上で形成する template assembled synthetic protein (TASP) strategy により, 共有結合でつながった 4 量体ペプチドをデザインした [6]. この 4 量体ハイブリットペプチドは膜中で 4 量体ヘリックスバンドル構造を形成し, 一定サイズのポアを形成することが示されている.

天然のイオンチャネルペプチドをベースとしたデザインとは別に, 天然のイオンチャネルタンパク質の膜貫通ドメインをベースとしたペプチドデザインも盛んに行われている. Na チャネル, アセチルコリン受容体の $\delta$ -サブユニット, グリシン受容体といった様々な生体のイオンチャネルタンパク質のポア部分に相当する膜貫通ヘリックスペプチドが合成され, 平面脂質膜においてチャネルを形成することが報告されている [7-9]. また Na チャネルの電圧センサの役割を担う膜貫通ドメイン由来の合成ペプチドもイオンチャネルを形成することが報告されている [10]. 一方で, alamethicin と同様にこれらのチャネルタンパク質由来の合成ペプチドも膜中で多数の会合状態が存在し, ポアサイズが一定でないため, TASP を利用して特定の会合状態を安定化させる試みが行われている [11, 12].

(a) barrel-stave poreモデル



(b) toroidal poreモデル

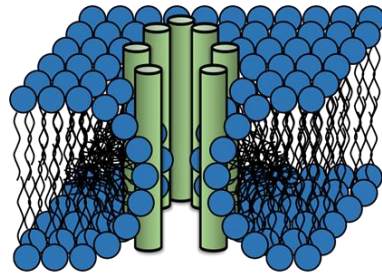


Figure 2-1. Barrel-stave モデルによるポア形成 (a) と toroidal モデルによるポア形成 (b).

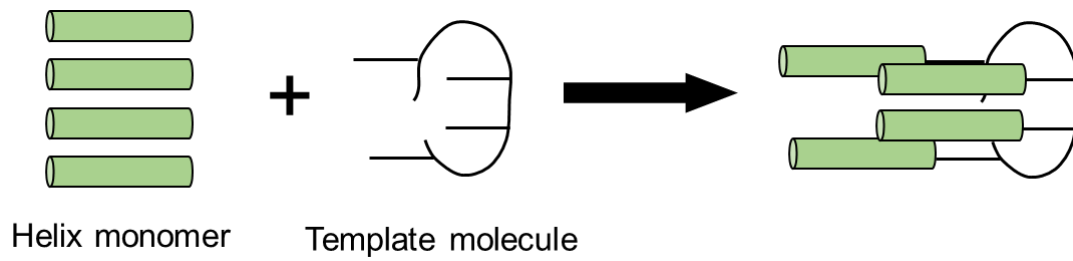


Figure 2-2. Template assembled synthetic protein (TASP) の模式図.

## 2-1-2. De novo 設計によるイオンチャネルペプチド

アミノ酸配列を一からデザインする de novo 設計は、チャネル構造の安定化因子やイオン選択性因子の探索、機能性を付与したイオンチャネルペプチドの創出において有用な方法である。Table 2-1 に報告されている de novo 設計されたイオンチャネルペプチドを示した。イオンチャネルの形成には膜に挿入されるための十分な疎水性とイオン透過孔を形成するための親水性を併せ持つ両親媒性ヘリックス構造が重要である。従って、両親媒性ヘリックス構造を形成するようなアミノ酸配列を de novo 設計する必要がある。Imanishi らは、ヘリックス構造を誘導する Aib 残基と Ala 残基を交互に含む 16 残基のペプチド Boc-(Ala-Aib)<sub>8</sub>-OMe をデザインし、ヘリックスバンドルによるイオンチャネルの形成を報告した [13]。Kirino らは鎖長が異なる両親媒性ヘリックスペプチドをデザインし、鎖長の増加に伴いイオン透過能が増加することを示しており、膜を貫通する 20 残基程度の鎖長がチャネル形成に必要であることを示唆した [14]。Degrado らはペプチドによるチャネル形成において、(1)  $\alpha$ -ヘリックス構造、(2) 膜を貫通するために必要な 20 残基程度の鎖長、(3) 膜に挿入されるための十分な疎水性、(4) ヘリックス間の相互作用が重要であると考え、コイルドコイル構造モチーフを取り入れたイオンチャネルペプチド (LSSLLSL)<sub>3</sub> 及び (LSLLLSL)<sub>3</sub> を de novo 設計した [15]。コイルドコイルは様々なタンパク質で見られるヘリックス間相互作用の構造モチーフで、7 残基の繰り返し配列から成り、knobs-into-holes 様式によってヘリックス間が密接にパッキングされるという特徴をもつ。(LSSLLSL)<sub>3</sub> は平面脂質膜において 6 量体ヘリックスバンドル構造から成る単一コンダクタンスのカチオン選択性チャネルを形成し、極性アミノ酸であるセリン残基のヒドロキシ基がカチオン選択性に重要であることが示された [15]。また近年では計算化学を利用して、ヘリックス間の相互作用を制御したコイルドコイルモチーフを構築し、亜鉛結合部位として EXXH モチーフを導入することによって Zn<sup>2+</sup> と H<sup>+</sup> を対向輸送するような 25 残基のペプチドが報告されている [16, 17]。

Table 2-1. De novo 設計によるイオンチャネルペプチド.

peptide	sequence	ref.
AB16	Boc-(Ala-Aib) <sub>8</sub> -OMe	13
4 <sub>3</sub>	Ac-(LARL) <sub>3</sub> -NHMe	14
4 <sub>4</sub>	Ac-(LARL) <sub>4</sub> -NHMe	14
4 <sub>5</sub>	(LARL) <sub>3</sub> -(LRAL) <sub>2</sub>	14
4 <sub>6</sub>	(LARL) <sub>3</sub> -(LRAL) <sub>3</sub>	14
(LSSLLSL) <sub>3</sub>	LSSLLSLLSSLLSLLSSLLSL-NH <sub>2</sub>	15
(LSLLLSL) <sub>3</sub>	LSLLLSLLSLLLSLLSLLLSL-NH <sub>2</sub>	15
(LSLBLSL) <sub>3</sub>	LSLBLSLLSLBLSLLSLBLSL-NH <sub>2</sub>	15
Rocker	YYKEIAHALFSALFALSELYIAVRY	16, 17
Pep-P	LLLALLQLLFGLLALLLE	31
ARL <sub>8</sub>	(Ala-Arg-Leu) <sub>8</sub>	32
VRL <sub>8</sub>	(Val-Arg-Leu) <sub>8</sub>	32
LRL <sub>8</sub>	(Leu-Arg-Leu) <sub>8</sub>	32
BXBA20	Ac-(BXBA) <sub>5</sub> -NH <sub>2</sub> (X = K, E, G, S)	30, 33

### 2-1-3. ヘリックス-ヘリックス相互作用における芳香族残基

膜貫通ドメインのヘリックス-ヘリックス相互作用に関しては現在までに多くの研究が行われている。一般的に膜タンパクの脂質膜中でのヘリックス-ヘリックス会合はファンデルワールス相互作用によって駆動される。典型的な膜タンパク二量体形成の会合モチーフとして GxxxG や AxxxA が発見されており [18, 19], これらのモチーフではヘリックス間の接触面を増加させるためにグリシンやアラニンといった小さな残基が利用されている。また, 極性残基や荷電残基による側鎖間または側鎖-主鎖間の静電相互作用や水素結合も膜貫通ドメインのヘリックス-ヘリックス会合に寄与していることが報告されている [20-22]. 近年これらの相互作用に加え, 芳香族残基による芳香族-芳香族相互作用やカチオン- $\pi$ 相互作用が膜タンパクのヘリックス-ヘリックス会合に関与していることが報告されている (Table 2-2). Dever らはモデルペプチドを利用した系統的な研究によって, 芳香族-芳香族相互作用やカチオン- $\pi$ 相互作用が脂質膜中でのヘリックス-ヘリックス相互作用を促進することを示した [23, 24]. Shai らは細菌の膜タンパクの配列の統計的解析を基に, 膜貫通ドメインの二量体形成に芳香族モチーフである WxxW が関与することを示した [25].

芳香族残基は高い疎水性をもつにもかかわらず, ファンデルワールス力や静電力から成る芳香族相互作用を形成することから, Trp, Tyr, Phe 残基により形成される相互作用部位は極性と疎水性の両方の性質を併せ持つ。このような性質は脂質二分子膜中のような疎水性環境下における分子間または分子内相互作用に非常に適していると考えられる。

Table 2-2. ヘリックス間の会合に芳香族残基が関与している膜タンパク. 下線は相互作用している残基, 太字はヘリックス会合に寄与している芳香族残基を表す.

protein	sequence of transmembrane domain	ref.
ErbB-2	<sup>651</sup> <u>L</u> <u>T</u> SIVS <u>A</u> V <u>V</u> GILLV <u>V</u> V <u>L</u> G <u>V</u> V <u>F</u> GILI <sup>675</sup>	20
BNIP3	<sup>164</sup> <u>V</u> <u>F</u> LP <u>S</u> <u>L</u> <u>L</u> L <u>S</u> H <u>L</u> L <u>A</u> I <u>G</u> L <u>G</u> I <u>Y</u> I <u>G</u> R <sup>185</sup>	26
TCR ζ-chain	<sup>28</sup> DSK <u>L</u> <u>C</u> Y <u>L</u> LD <u>G</u> I <u>L</u> FI <u>Y</u> G <u>V</u> I <u>L</u> T <u>A</u> L <u>F</u> LR <u>V</u> K <u>F</u> SRR <sup>57</sup>	21
EpsM	<sup>26</sup> MGALTVLAIAY <u>W</u> GI <u>W</u> Q <sup>41</sup>	25
Integrin αIIbβ3	αIIb : <sup>966</sup> I <u>W</u> W <u>V</u> L <u>V</u> G <u>V</u> L <u>G</u> LL <u>L</u> L <u>T</u> I <u>L</u> V <u>L</u> AMW <u>K</u> V <u>G</u> <b>FF</b> <sup>993</sup>	27
	β3 : <sup>693</sup> I <u>L</u> V <u>V</u> LL <u>S</u> <u>V</u> M <u>G</u> A <u>I</u> LL <u>I</u> G <u>L</u> A <u>A</u> LL <u>I</u> <u>W</u> KLL <u>I</u> T <u>I</u> I <sup>721</sup>	
ErbB-3	<sup>645</sup> ALT <u>V</u> I <u>A</u> GL <u>V</u> V <u>I</u> F <u>M</u> M <u>L</u> GGT <u>F</u> LY <u>W</u> R <u>R</u> G <sup>670</sup>	28
EphA2	<sup>535</sup> <u>L</u> A <u>V</u> I <u>G</u> GV <u>A</u> V <u>G</u> V <u>V</u> LL <u>L</u> V <u>L</u> AG <u>V</u> G <b>FF</b> I <u>H</u> <sup>559</sup>	29

## 2-2. Trp 含有 Aib 基盤モデルペプチドのデザイン

ヘリックス-ヘリックス相互作用やイオンチャネル形成能に対する Trp 残基の効果を見積もるためには、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成する単純なアミノ酸配列の人工イオンチャネルペプチドを母体として、この母体ペプチドに Trp 残基を導入し、構造およびイオンチャネル活性の変化を調べる方法が最も効果的であると考えられる。このとき、Trp の導入により母体ペプチドのヘリックス構造が不安定化されてしまうと、ヘリックス-ヘリックス相互作用やイオンチャネル形成能に対する Trp 残基の効果を正確に見積もることができなくなるため、安定な $\alpha$ -ヘリックス構造を形成するようなペプチド配列を母体とする必要がある。Higashimoto らは異常アミノ酸である Aib を含む 20 残基の人工 $\alpha$ -ヘリックスペプチド Ac-(Aib-Lys-Aib-Ala)<sub>5</sub>-NH<sub>2</sub> (BKBA20) を合成し、BKBA20 がヘリックスバンドル様のイオンチャネル活性を示すことを報告した [30]。Aib 残基はヘリックス構造を強く誘導する性質をもつため、BKBA20 は水溶液中及びリポソーム存在下で安定な $\alpha$ -ヘリックス構造を形成することが示されており、濃度依存的なヘリックス会合挙動が報告されている [30]。さらに Figure 2-3 のヘリカルホイール投影図に示すように、BKBA20 はヘリックスの片方の側面に疎水性残基が、もう片方の側面に親水性残基が並ぶことで両親媒性の $\alpha$ -ヘリックス構造を形成する。Aib 残基の存在により安定な両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成し、会合能およびイオンチャネル形成能を示す BKBA20 は、Trp の効果を見積もるための母体ペプチドとして適していると考えられる。しかしながら、水溶液中及び脂質膜環境下における BKBA20 のヘリックス-ヘリックス相互作用の界面は明確に同定されていない。そこで本研究では、BKBA20 を母体として Trp 残基をヘリックスの異なる部分に系統的に導入したペプチドを設計した。Table 2-3 に示すように、単一の Trp 残基をヘリックス中央部の疎水面 (8 位, 12 位), 親水面 (10 位), 親水面と疎水面の境界部 (9 位, 11 位) にそれぞれ導入したペプチドをデザインした。また、ペプチド末端における Trp 残基の影響を調べるために、単一の Trp 残基を



ヘリックスの N-末端部 (4 位), C-末端部 (16 位) にそれぞれ導入したペプチドをデザインした. さらに複数の Trp 残基による効果を調べるために, 2 つの Trp 残基を両末端部 (4 位及び 16 位) に導入したペプチドをデザインした.

### 2-3. Ile 含有疎水性 Aib 基盤モデルペプチドのデザイン

ヘリックスバンドル構造によるチャンネル形成はヘリックス会合が重要なプロセスであるため、水溶液中での2本鎖コイルドコイル構造の形成はチャンネル形成能に影響を与えると考えられる。そこで本研究では、水溶液中で高い二本鎖コイルドコイル形成能をもつようなヘリックスモデルペプチドのデザインを行った。水溶液中での2本鎖コイルドコイル構造の形成は疎水性相互作用が主な駆動力となるため、BKBA20のAla残基をIle残基に置換して、疎水面の疎水性度を増加させたペプチド(BKBI20)をデザインした。さらにBKBI20の会合能とチャンネル形成能に対するTrp残基の影響を調べるために、BKBI20の両末端(4位及び16位)にTrp残基を導入したペプチドをデザインした。

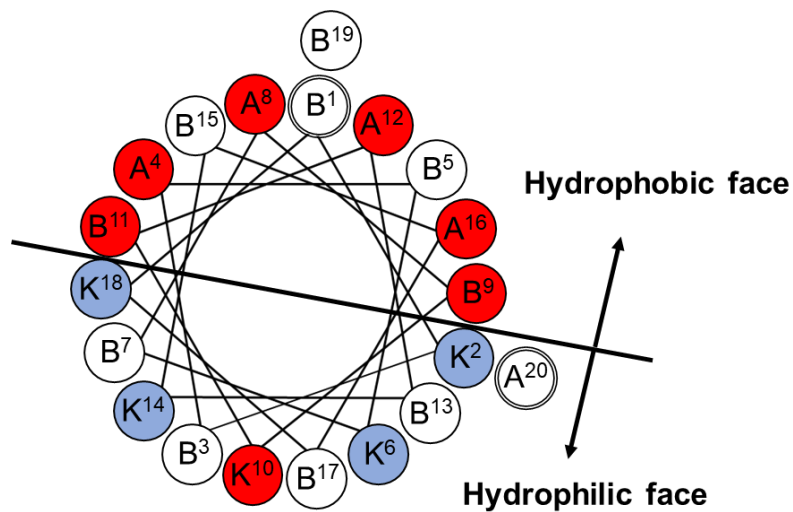


Figure 2-3. BKBA20のヘリカルホイール投影図。親水性アミノ酸残基を青、Trp残基の導入部位を赤で示した。

Table 2-3. デザインしたモデルペプチドの構造. 導入した Trp 残基は太字で示される.

peptide	sequence	MW (Da)
BKBA20	Ac-BKBA-BKBA-BKBA-BKBA-BKBA-NH <sub>2</sub>	1906
[W8] BKBA20	Ac-BKBA-BK <b>W</b> -BKBA-BKBA-BKBA-NH <sub>2</sub>	2021
[W9] BKBA20	Ac-BKBA-BKBA- <b>W</b> KBA-BKBA-BKBA-NH <sub>2</sub>	2007
[W10] BKBA20	Ac-BKBA-BKBA-B <b>W</b> BA-BKBA-BKBA-NH <sub>2</sub>	1964
[W11] BKBA20	Ac-BKBA-BKBA-BK <b>W</b> A-BKBA-BKBA-NH <sub>2</sub>	2007
[W12] BKBA20	Ac-BKBA-BKBA-BKB <b>W</b> -BKBA-BKBA-NH <sub>2</sub>	2021
[W4] BKBA20	Ac-BKB <b>W</b> -BKBA-BKBA-BKBA-BKBA-NH <sub>2</sub>	2021
[W16] BKBA20	Ac-BKBA-BKBA-BKBA-BKB <b>W</b> -BKBA-NH <sub>2</sub>	2021
[W4W16] BKBA20	Ac-BKB <b>W</b> -BKBA-BKBA-BKB <b>W</b> -BKBA-NH <sub>2</sub>	2137
BKBI20	Ac-BKBI-BKBI-BKBI-BKBI-BKBI-NH <sub>2</sub>	2118
[W4W16] BKBI20	Ac-BKB <b>W</b> -BKBI-BKBI-BKB <b>W</b> -BKBI-NH <sub>2</sub>	2263

## 2-4. 参考文献

- [1] Yang, L.; Harroun, T. A.; Weiss, T. M.; Ding, L.; Huang, H. W. Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* **2001**, *81*, 1475–1485.
- [2] Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13723–13728.
- [3] Baumann, G.; Mueller, P. A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.* **1974**, *2*, 538–557.
- [4] Boheim, G. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J. Membr. Biol.* **1974**, *19*, 277–303.
- [5] You, S.; Peng, S.; Lien, L.; Breed, J.; Sansom, M. S. P.; Woolley, G. A., Engineering Stabilized Ion Channels: Covalent Dimers of Alamethicin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 6225–6232.
- [6] Futaki, S.; Fukuda, M.; Omote, M.; Yamauchi, K.; Yagami, T.; Niwa, M.; Sugiura, Y., Alamethicin-leucine zipper hybrid peptide: a prototype for the design of artificial receptors and ion channels. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12127–12134.
- [7] Oiki, S.; Danho, W.; Montal, M., Channel protein engineering: synthetic 22-mer peptide from the primary structure of the voltage-sensitive sodium channel forms ionic channels in lipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 2393–2397.
- [8] Oiki, S.; Danho, W.; Madison, V.; Montal, M., M2 delta, a candidate for the structure lining the ionic channel of the nicotinic cholinergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 8703–8707.
- [9] Langosch, D.; Hartung, K.; Grell, E.; Bamberg, E.; Betz, H. Ion channel formation by synthetic transmembrane segments of the inhibitory glycine receptor--a model study. *Biochim. Biophys. Acta*

**1991**, *1063*, 36–44.

[10] Tosteson, M. T.; Auld, D. S.; Tosteson, D. C. Voltage-gated channels formed in lipid bilayers by a positively charged segment of the Na-channel polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1989**, *86*, 707–710.

[11] Montal, M.; Montal, M. S.; Tomich, J. M. Synporins--synthetic proteins that emulate the pore structure of biological ionic channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 6929–6933.

[12] Grove, A.; Tomich, J. M.; Montal, M. A molecular blueprint for the pore-forming structure of voltage-gated calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1991**, *88*, 6418–6422.

[13] Otoda, K.; Kimura, S.; Imanishi, Y. Orientation and aggregation of hydrophobic helical peptides in phospholipid bilayer membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, *1150*, 1–8.

[14] Agawa, Y.; Lee, S.; Ono, S.; Aoyagi, H.; Ohno, M.; Taniguchi, T.; Anzai, K.; Kirino, Y., Interaction with phospholipid bilayers, ion channel formation, and antimicrobial activity of basic amphipathic alpha-helical model peptides of various chain lengths. *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 20218–20222.

[15] Lear, J. D.; Wasserman, Z. R.; DeGrado, W. F. Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels. *Science* **1988**, *240*, 1177–1181.

[16] Joh, N. H.; Wang, T.; Bhate, M. P.; Acharya, R.; Wu, Y.; Grabe, M.; Hong, M.; Grigoryan, G.; DeGrado, W. F., De novo design of a transmembrane Zn<sup>2+</sup>-transporting four-helix bundle. *Science* **2014**, *346*, 1520–1524.

[17] Joh, N. H.; Grigoryan, G.; Wu, Y.; DeGrado, W. F. Design of self-assembling transmembrane helical bundles to elucidate principles required for membrane protein folding and ion transport. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **2017**, *372*, 20160214.

[18] Senes, A.; Gerstein, M.; Engelman, D. M., Statistical analysis of amino acid patterns in

transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J. Mol. Biol.* **2000**, *296*, 921-936.

[19] Kleiger, G.; Grothe, R.; Mallick, P.; Eisenberg, D., GXXXG and AXXXA: common alpha-helical interaction motifs in proteins, particularly in extremophiles. *Biochemistry* **2002**, *41*, 5990-5997.

[20] Bocharov, E. V.; Mineev, K. S.; Volynsky, P. E.; Ermolyuk, Y. S.; Tkach, E. N.; Sobol, A. G.; Chupin, V. V.; Kirpichnikov, M. P.; Efremov, R. G.; Arseniev, A. S., Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 6950-6956.

[21] Call, M. E.; Schnell, J. R.; Xu, C.; Lutz, R. A.; Chou, J. J.; Wucherpfennig, K. W., The structure of the  $\zeta$   $\zeta$  transmembrane dimer reveals features essential for its assembly with the T cell receptor. *Cell* **2006**, *127*, 355-368.

[22] Call, M. E.; Wucherpfennig, K. W.; Chou, J. J., The structural basis for intramembrane assembly of an activating immunoreceptor complex. *Nat. Immunol.* **2010**, *11*, 1023-1029.

[23] Johnson, R. M.; Hecht, K.; Deber, C. M. Aromatic and cation- $\pi$  interactions enhance helix-helix association in a membrane environment. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9208-9214.

[24] Johnson, R. M.; Heslop, C. L.; Deber, C. M. Hydrophobic helical hairpins: Design and packing interactions in membrane environments. *Biochemistry* **2004**, *43*, 14361-14369.

[25] Sal-Man, N.; Gerber, D.; Bloch, I.; Shai, Y. Specificity in transmembrane helix-helix interactions mediated by aromatic residues. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19753-19761.

[26] Bocharov E. V.; Pustovalova, Y. E.; Pavlov, K. V.; Volynsky, P. E.; Goncharuk, M. V.; Ermolyuk, Y. S.; Karpunin, D. V.; Schulga, A. A.; Kirpichnikov, M. P.; Efremov, R. G.; Maslennikov, I. V.; Arseniev, A. S., Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain

- suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 16256–16266.
- [27] Lau, T. L.; Kim, C.; Ginsberg, M. H.; Ulmer, T. S., The structure of the integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO. J.* **2009**, *28*, 1351–1361.
- [28] Mineev, K. S.; Khabibullina, N. F.; Lyukmanova, E. N.; Dolgikh, D. A.; Kirpichnikov, M. P.; Arseniev, A. S.; Spatial structure and dimer–monomer equilibrium of the ErbB3 transmembrane domain in DPC micelles. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **2011**, *1808*, 2081–2088.
- [29] Bocharov, E. V.; Mayzel, M. L.; Volynsky, P. E.; Mineev, K. S.; Tkach, E. N.; Ermolyuk, Y. S.; Schulga, A. A.; Efremov, R. G.; Arseniev, A. S., Left-Handed Dimer of EphA2 Transmembrane Domain: Helix Packing Diversity among Receptor Tyrosine Kinases. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 881–889.
- [30] Higashimoto, Y.; Kodama, H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Kato, F.; Kondo, M. Structure–function relationship of model Aib–containing peptides as ion transfer intermembrane templates. *J. Biochem.* **1999**, *125*, 705–712.
- [31] Spach, G.; Merle, Y.; Molle, G., Peptide amphiphiles et canaux transmembranes. *J. Chimie Physique* **1985**, *82*, 719–721.
- [32] Iwata, T.; Lee, S.; Oishi, O.; Aoyagi, H.; Ohno, M.; Anzai, K.; Kirino, Y.; Sugihara, G., Design and synthesis of amphipathic 310-helical peptides and their interactions with phospholipid bilayers and ion channel formation. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 4928–4933.
- [33] Hara, T.; Kodama, H.; Higashimoto, Y.; Yamaguchi, H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Ehara, T.; Kondo, M., Side chain effect on ion channel characters of Aib rich peptides. *J. Biochem.* **2001**, *130*, 749–755.

## 第3章 モデルペプチドの二次構造とペプチド-脂質間相互作用

### 3-1. Introduction

円二色性 (CD) 測定は必要な試料が少量でよく、多様な環境下で測定することができ、データ解析も比較的簡便であることからペプチドの構造研究において一般的に利用されている。平面偏光は強度が等しい左円偏光と右円偏光で構成されている。円二色性はこれら2つの円偏光に対する吸収の差に起因する。円二色性を示すような物質は左円偏光と右円偏光に対する吸収に差があるため、平面偏光が物質を透過すると楕円偏光になる。左右円偏光に対する吸収の程度は波長依存的に変化するため、CD スペクトルでは縦軸を楕円率、横軸を波長として表す。タンパク質やペプチドの場合、縦軸を1残基あたりの楕円率である平均残基楕円率  $[\theta]$  に変換することで、濃度や残基数が異なる試料間でも CD スペクトルを比較することができる。CD スペクトルによるペプチド二次構造解析では遠紫外領域 (260-190 nm) の吸収を利用する。この吸収はペプチド結合の $\pi$ - $\pi^*$ 遷移と  $n$ - $\pi^*$ 遷移に基づくものである。この2種類の電子遷移に基づく吸収の強度や吸収帯はペプチド主鎖の構造によって異なるため、CD スペクトルを測定することでペプチドの二次構造を推定できる。 $\alpha$ -ヘリックスの場合には 190 nm 付近にヘリックス軸に垂直な $\pi$ - $\pi^*$ 遷移 ( $\pi$ - $\pi^*$  $\perp$ ) による正の極大、208 nm 付近にヘリックス軸に平行な $\pi$ - $\pi^*$ 遷移 ( $\pi$ - $\pi^*$  $\parallel$ ) による負の極大、222 nm 付近に  $n$ - $\pi^*$ による負の極大を示す。さらに 222 nm の平均残基楕円率 (MRE) の値を用いて、ペプチド鎖がどの程度の割合で $\alpha$ -ヘリックス構造を形成しているのかを表す helical contents (%) を見積もることも可能である [1, 2]。また CD スペクトルは二次構造の推定だけでなく、ヘリックス間の会合も評価できる。Lau らはヘリックスが会合し、二本鎖コイルドコイル構造を形成した場合、2つの負の極大の MRE の比である  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  が 1 よりも大きくなることを示唆した [3]。



さらに Zhou らはヘリックスが会合することで 208 nm 付近の負の極大波長がレッドシフトすることを報告した [4]. 従って, これらはヘリックスの会合を CD 測定で評価する際の指標となりうる.

Trp のインドール側鎖のような発色団は, 励起されて互いに接近すると, 励起状態のエネルギー準位が分裂する. この現象は exciton coupling と呼ばれ, CD スペクトルにおいて符号の異なる CD バンド (exciton couplet) が観測される (Figure 3-1). いくつかの抗菌ペプチドの構造解析において, Trp 残基に起因する特徴的な exciton couplet が検出され, 抗菌ペプチドの立体構造維持に Trp-Trp 相互相が重要であることが報告されている [5, 6]. Trp 残基由来の exciton coupling が顕著に現れるためには Trp 側鎖が~1.0 nm まで近接する必要があるため [7], exciton coupling の存在は Trp-Trp 相互作用の指標となりうる. また Trp は近紫外領域 (320–250 nm) に  $L_a$  及び  $L_b$  バンド由来の吸収帯をもち, この吸収帯由来の CD は Trp 周りの環境に依存して変化する. そのため, 近紫外 CD スペクトルもまた Trp-Trp 相互作用を検出する上で有用である.

本研究では, 水性環境下として 50 mM リン酸緩衝液 (PB), 疎水性環境下として 2,2,2-Trifluoroethanol (TFE) を用いて, それぞれの環境下でのモデルペプチドの二次構造を評価した. また, モデルペプチドの会合能を調べるために, ペプチド濃度依存的な CD 測定を行った. 脂質二分子膜との相互作用によるペプチドの構造変化は脂質小胞存在下で CD 測定により調べた. さらにペプチド-脂質膜間相互作用によってペプチドが脂質二分子膜の構造に与える影響を調べるために, ヒト赤血球の溶血活性を測定した.

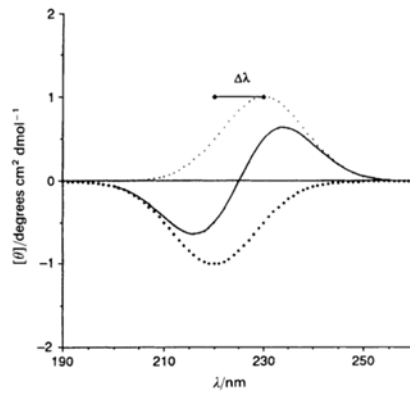
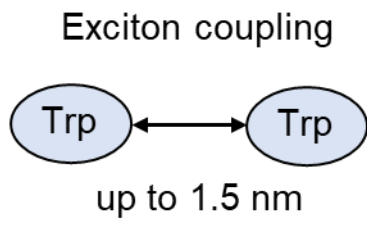


Figure 3-1. Trp-Trp 相互作用で生じる exciton coupling に由来する CD スペクトル [7].

## 3-2. Results

### 3-2-1. モデルペプチドの構造とヘリックス-ヘリックス相互作用

Figure 3-2 に中性 pH (pH 7.4) 条件下における Trp 含有モデルペプチドの CD スペクトルを示す。測定は生体内の水性環境を模倣した 50 mM リン酸緩衝液 (PB) と脂質膜の疎水性環境を模倣した 100% TFE 中で、ペプチド濃度 200  $\mu$ M で行った。緩衝液及び TFE 中において、[W4W16]BKBA20 以外の全ての Trp 含有モデルペプチドが 208 nm 付近と 222 nm 付近に負の極大を示し、典型的な $\alpha$ -ヘリックスのスペクトルを示した。CD スペクトルから算出した異なる環境下における各ペプチドの helical contents と  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  の値は Table 3-1 に要約した。TFE 中における Trp 含有モデルペプチドの helical contents は 30-47% であり、BKBA20 (38%) とほぼ同程度の値であった。また、TFE 中における  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  の値はすべてペプチドで 1 以下であり、疎水性環境下では単量体として存在していることが示唆された。一方で、TFE 中と比較してリン酸緩衝液中では  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  の値が増加しており、[W11]BKBA20 以外のすべてのペプチドが 1 以上の値を示していることから、水性環境下では [W11]BKBA20 以外のすべてのペプチドが会合能を有していることが示唆された。リン酸緩衝液中では、[W10]BKBA20 が高い helical contents (50%) を示したが、その他のペプチドの helical contents はほぼ同程度であり (35-42%)、[W11]BKBA20 のみ低い helical contents (25%) を示した。リン酸緩衝液中における  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  の値は、W11 < W8  $\approx$  W9  $\approx$  W12 < W4  $\approx$  W16 < BKBA20 < W10 < W4W16 の順で増加した。特に [W4W16]BKBA20 の  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値 (1.20) は大きく、BKBA20 (1.10) よりも 0.1 増加した。

Figure 3-3 は同様の条件下における Ile 含有疎水性モデルペプチドの CD スペクトルを示す。これら疎水性ペプチドはリン酸緩衝液に対する溶解性が低かったため、10  $\mu$ M のペプチド濃度で測定を行った。BKBA20 と比較して、BKBI20 は TFE 及びリン酸緩衝液の両方にお

いて高い helical contents を示した (Table 3-1). BKBI20 の  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値は TFE 中で 1 以下であったが, リン酸緩衝液中では著しい増加が観測され (2.59), BKBI20 の緩衝液中での高い会合能が示唆された. 両末端に Trp 残基を導入した [W4W16]BKBI20 においても BKBI20 と同様の傾向が観測されたが, helical contents 及び  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値は減少した.

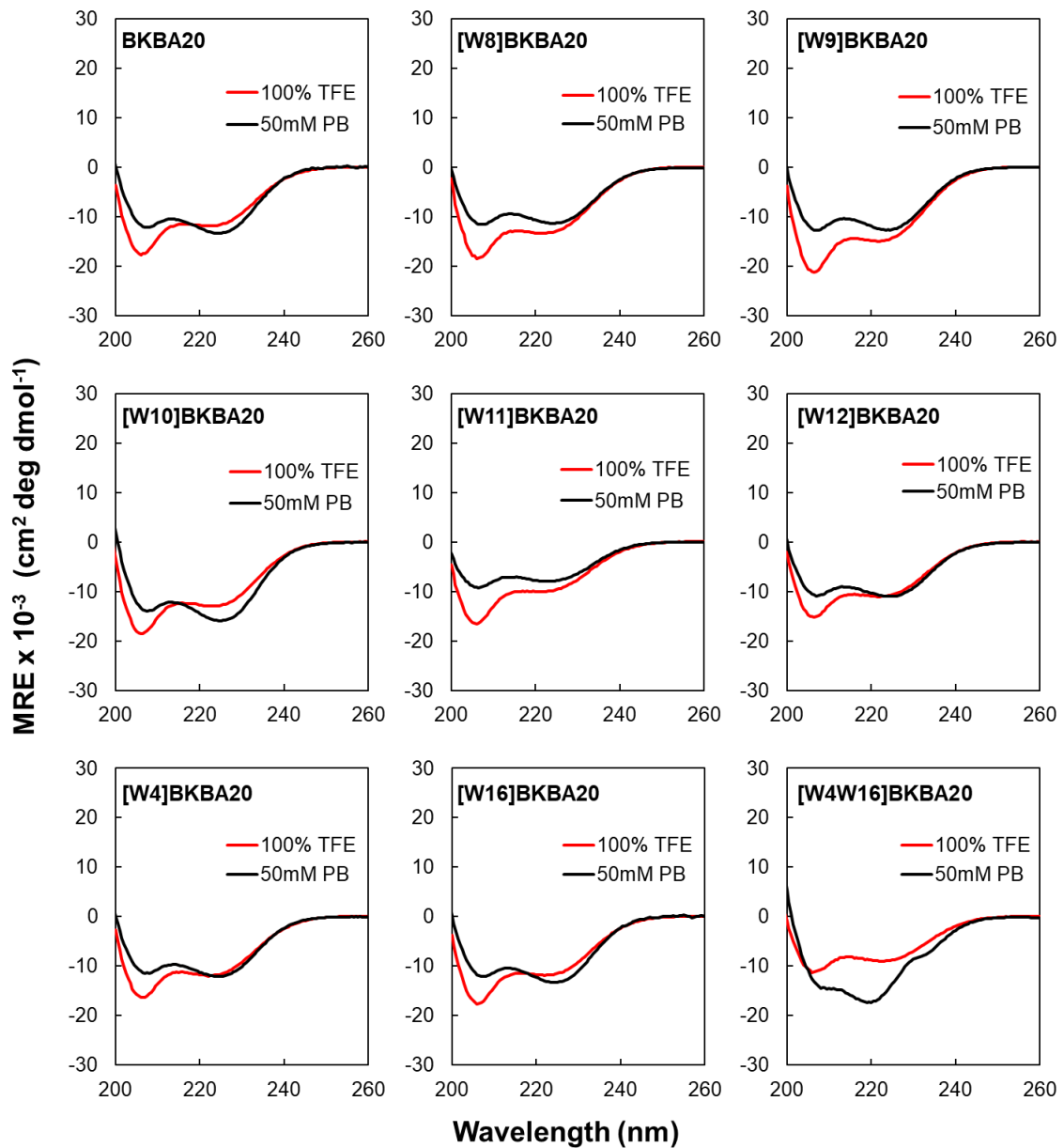


Figure 3-2. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (黒線) 及び TFE (赤線) 中の BKBA20 及び Trp 含有モデルペプチドの CD スペクトル. ペプチド濃度は 200  $\mu$ M.

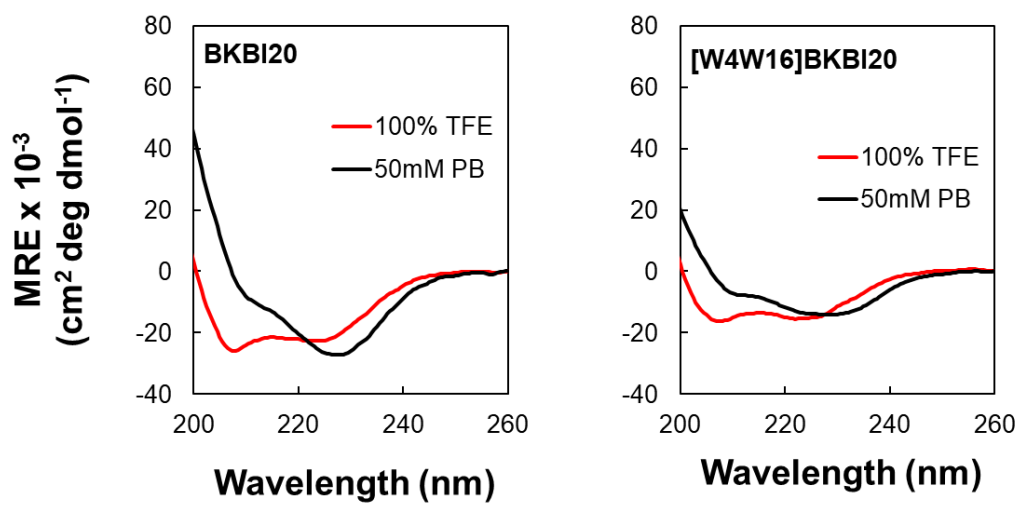


Figure 3-3. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (黒線) 及び TFE (赤線) 中の Ile 含有疎水性モデルペプチドの CD スペクトル. ペプチド濃度は 10  $\mu$ M.

Table 3-1. 異なる環境下におけるモデルペプチドの CD スペクトルから算出された helical contents (%) と  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^* \parallel}$  の値. [W4W16]BKBA20 の helical contents は Trp 由来の exciton coupling の影響で算出されなかった.

peptide	helical contents (%)			$[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^* \parallel}$		
	phosphate buffer	TFE	DPPC LUVs	phosphate buffer	TFE	DPPC LUVs
BKBA20	42	38	47	1.10	0.67	1.09
[W8] BKBA20	36	42	50	0.98	0.72	1.06
[W9] BKBA20	40	47	56	1.00	0.70	1.00
[W10] BKBA20	50	41	65	1.14	0.70	1.03
[W11] BKBA20	25	32	40	0.86	0.61	1.05
[W12] BKBA20	35	35	43	1.01	0.73	1.02
[W4] BKBA20	38	38	47	1.05	0.73	1.09
[W16] BKBA20	37	31	45	1.06	0.72	0.99
[W4W16] BKBA20	-	30	48	1.20	0.82	1.21
BKBI20	86	72	61	2.59	0.88	2.60
[W4W16] BKBI20	36	49	40	1.64	0.95	1.62

ペプチド濃度依存的な CD 測定は、リン酸緩衝液中で 5–200  $\mu\text{M}$  の濃度範囲で行った。Figure 3-4 に示すように、BKBA20 の MRE 値は濃度依存的に変化し、ペプチド濃度の増加に伴い helical contents が増加した。このペプチド濃度の増加に伴うヘリックス構造の安定化は、ペプチド間のヘリックス–ヘリックス相互作用に起因すると考えられる。同様の濃度依存的挙動が、[W4]BKBA20, [W9]BKBA20, [W10]BKBA20, [W16]BKBA20 においても観測された。[W4W16]BKBA20 については、BKBA20 よりも顕著な濃度依存性変化が示された。[W4W16]BKBA20 は濃度の増加に伴い 208 nm 付近の極小のレッドシフト、225 nm 付近の極小のブルーシフトが観測され、200  $\mu\text{M}$  では 230 nm 付近に小さなショルダーが出現し、他のペプチドとは異なる濃度依存的な挙動を示した。一方で、[W8]BKBA20, [W11]BKBA20, [W12]BKBA20 においては濃度依存的な挙動が 5–200  $\mu\text{M}$  の濃度範囲でも観測されなかったことから、これらのペプチドでは Trp 残基の導入によるペプチドの会合能の低下が示唆された。Ile 含有疎水性モデルペプチドに関しては、低い水溶性の問題により CD スペクトルの濃度依存性を調べるができなかった。



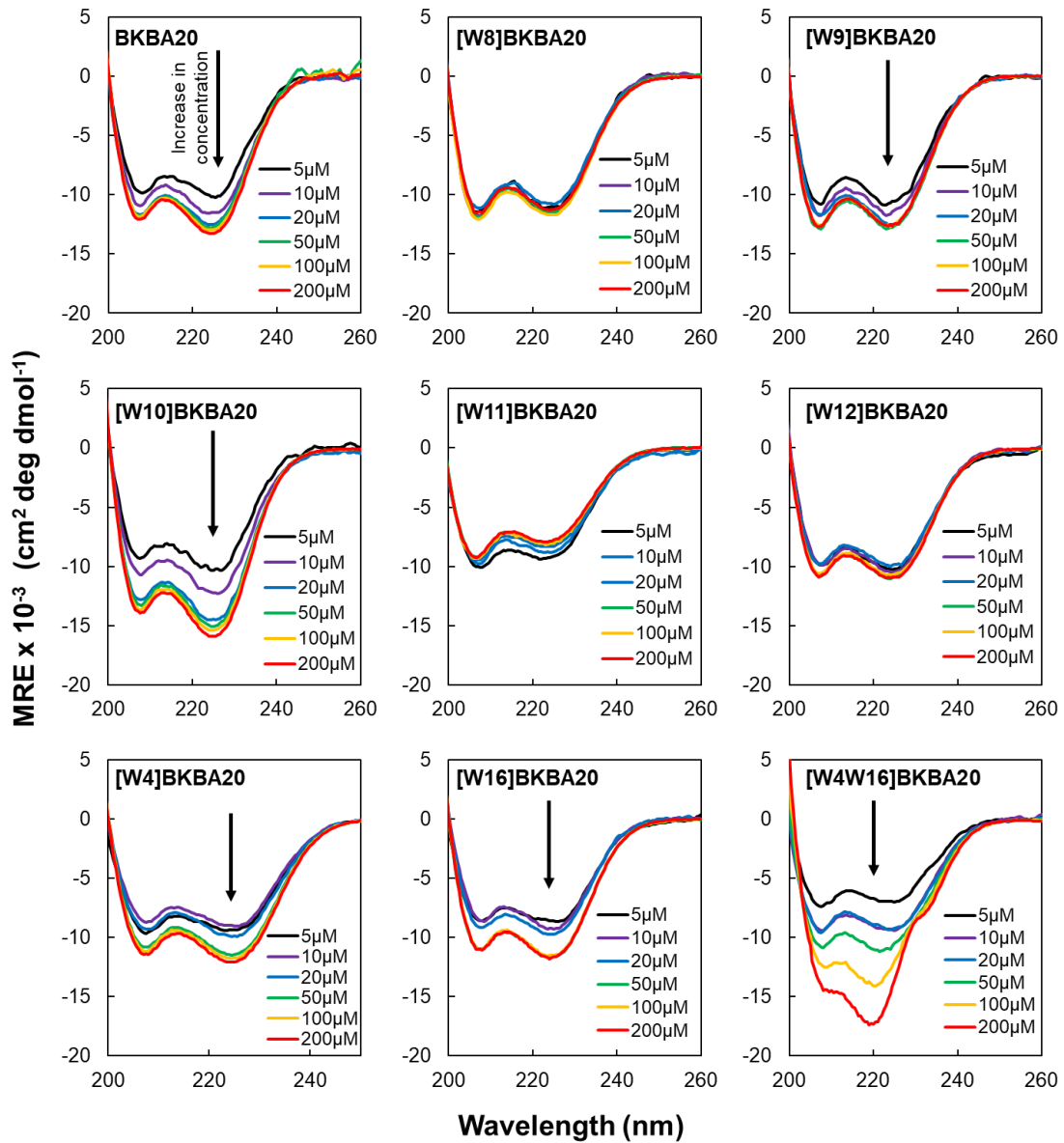


Figure 3-4. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) における BKBA20 及び Trp 含有モデルペプチドの CD スペクトルのペプチド濃度依存性. 測定は 5–200  $\mu\text{M}$  のペプチド濃度範囲で行われた. 矢印はペプチド濃度の増加に伴う平均残基橢円率  $[\theta]$  の増加を示す.

### 3-2-2. ヘリックス間の Trp-Trp 相互作用

Trp 含有モデルペプチドのヘリックス間会合における Trp-Trp 相互作用の寄与を調べるために、200  $\mu\text{M}$  における各 Trp 含有モデルペプチドと BKBA20 の差スペクトルを算出した (Figure 3-5)。Figure 3-5 に示すように、[W4W16]BKBA20 の差スペクトルにおいて、229 nm の極大と 217.5 nm の極小が観測され、近接した Trp-Trp ペアによる exciton coupling の典型的な CD パターンが示された。一方で、このような CD パターンは他の Trp 含有モデルペプチドでは観測されなかった。Figure 3-6 に [W4W16]BKBA20 と BKBA20 の差スペクトルのペプチド濃度依存性を示す。[W4W16]BKBA20 の差スペクトルは 5-20  $\mu\text{M}$  の低い濃度範囲では他の Trp 含有モデルペプチドと同様のパターンであるが、50  $\mu\text{M}$  でわずかに couplet が観測され、100  $\mu\text{M}$  及び 200  $\mu\text{M}$  ではより顕著な couplet が観測された。

Figure 3-7 に BKBA20 と各 Trp 含有モデルペプチドの近紫外領域 (320-250 nm) の CD スペクトルを示す。近接した Trp-Trp ペアによる couplet に加えて、Trp の  $L_a$  及び  $L_b$  吸収帯由来の特徴的な近紫外 CD バンドが [W4W16]BKBA20 においてのみ観測された。この結果は [W4W16]BKBA20 の Trp 残基周辺の局所環境が他のペプチドと異なることを示しており、exciton couplet と特徴的な近紫外 CD バンドの存在は水溶液中における Trp-Trp 相互作用の存在を示唆した。

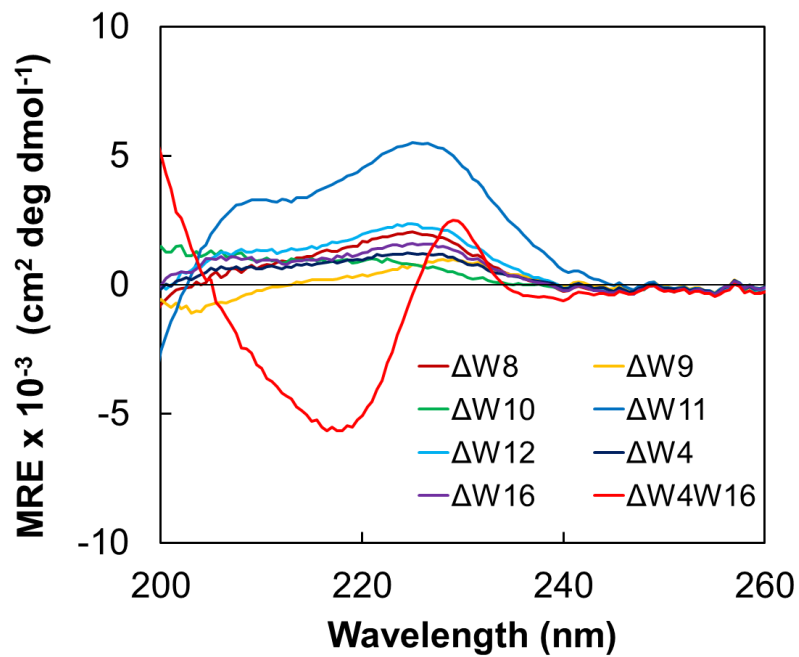


Figure 3-5. 200  $\mu\text{M}$  ペプチド濃度における BKBA20 と Trp 含有モデルペプチドの CD の差スペクトルの比較. 差スペクトルは 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) における Trp 含有モデルペプチドのスペクトルから BKBA20 のスペクトルを差し引くことにより得られた. [W4W16]BKBA20 の差スペクトル (赤) は Trp-Trp exciton coupling の典型的なパターンを示した.

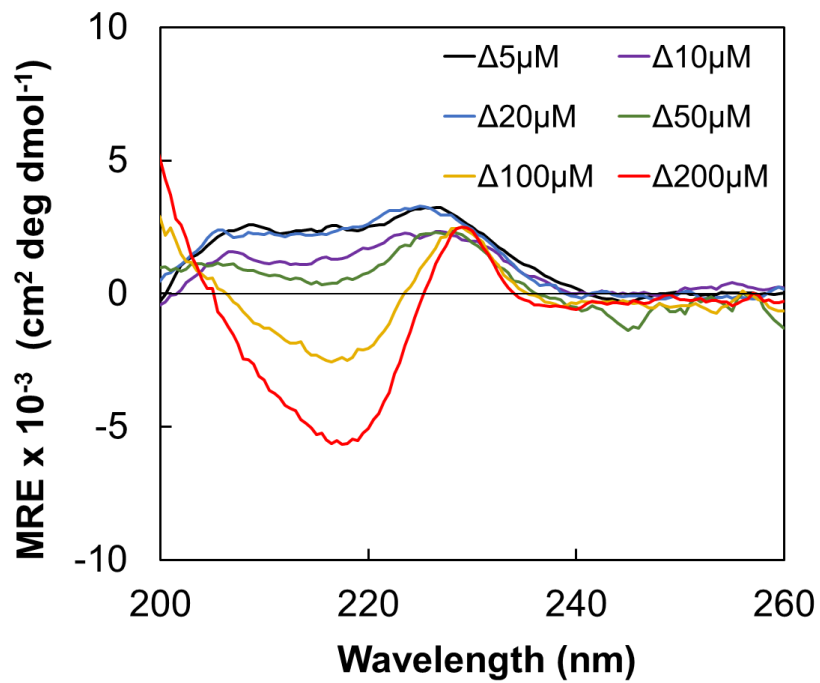


Figure 3-6. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) における[W4W16]BKBA20 と BKBA20 の CD の差スペクトルのペプチド濃度依存性. 100  $\mu\text{M}$  及び 200  $\mu\text{M}$  において Trp-Trp exciton coupling の典型的なパターンを示した.

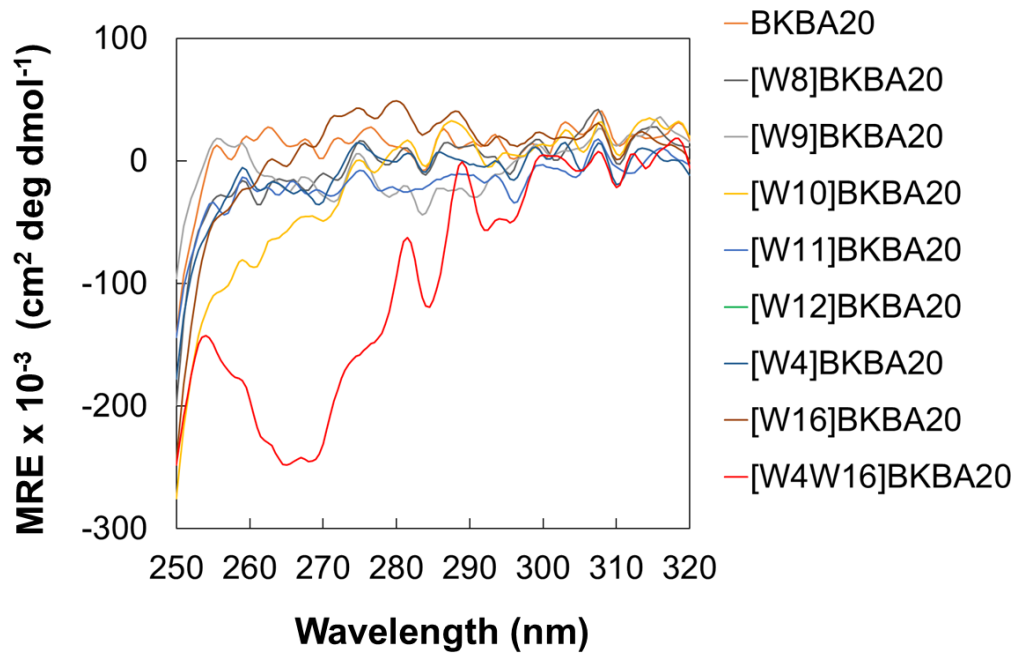


Figure 3-7. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) における BKBA20 及び Trp 含有モデルペプチドの近紫外 CD スペクトル. ペプチド濃度は 200  $\mu\text{M}$ . [W4W16]BKBA20 は 225–290 nm に Trp の  $L_a$  及び  $L_b$  バンド由来の特徴的な CD バンドを示した.

### 3-2-3. 脂質二分子膜存在下でのモデルペプチドの構造とペプチド-脂質膜間相互作用

モデルペプチドの脂質二分子膜存在下での構造とペプチド-脂質膜間相互作用は DPPC リポソーム存在下の CD 測定により評価した。Figure 3-8 及び Figure 3-10 に Trp 含有モデルペプチドと Ile 含有疎水性モデルペプチドの DPPC リポソーム存在下とリン酸緩衝液中の CD スペクトルの比較を示す。Figure 3-7 に示すように、脂質二分子膜存在下における BKBA20 及びすべての Trp 含有モデルペプチドの MRE  $[\theta]$  強度がリン酸緩衝液中よりも増加しており、helical contents の増加も示された (Table 3-1)。特に[W10]BKBA20 は DPPC リポソーム存在下で最も高い helicity を示した。BKBA20 の  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値はリポソーム存在下で 1.09 であり、リン酸緩衝液中での値 (20  $\mu\text{M}$  のペプチド濃度のとき 1.07) と同等であった。[W4W16]BKBA20 を除いた他のペプチドについても同様の傾向があり、リポソーム存在下とリン酸緩衝液中で  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値の変化は観測されなかった。[W4W16]BKBA20 は Trp-Trp 由来の exciton coupling を示さなかったが、リポソーム存在下での  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値 (1.21) はリン酸緩衝液中の値 (20  $\mu\text{M}$  のペプチド濃度のとき 0.98) よりも大きく増加した。またリポソーム存在下で、[W4W16]BKBA20 は  $\pi-\pi^*$  遷移の極小の 207.5 nm から 209.5 nm へのレッドシフトを示した。Figure 3-9 に[W4W16]BKBA20 と天然のイオンチャネルペプチドである alamethicin の DPPC リポソーム存在下の CD スペクトルの比較を示す。[W4W16]BKBA20 の  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値 (1.21) は alamethicin (1.23) と同等であることから、DPPC リポソーム存在下において[W4W16]BKBA20 は alamethicin に近い構造を形成していることが示唆された。

Ile 含有疎水性モデルペプチドである BKBI20 はリポソーム存在下で helical contents の増加と明確な構造変化を示さなかった。一方で、[W4W16]BKBI20 はリポソーム存在下において、helical contents の増加と  $n-\pi^*$  遷移の極小の 229.5 nm から 223.5 nm へのブルーシフトが観測された。

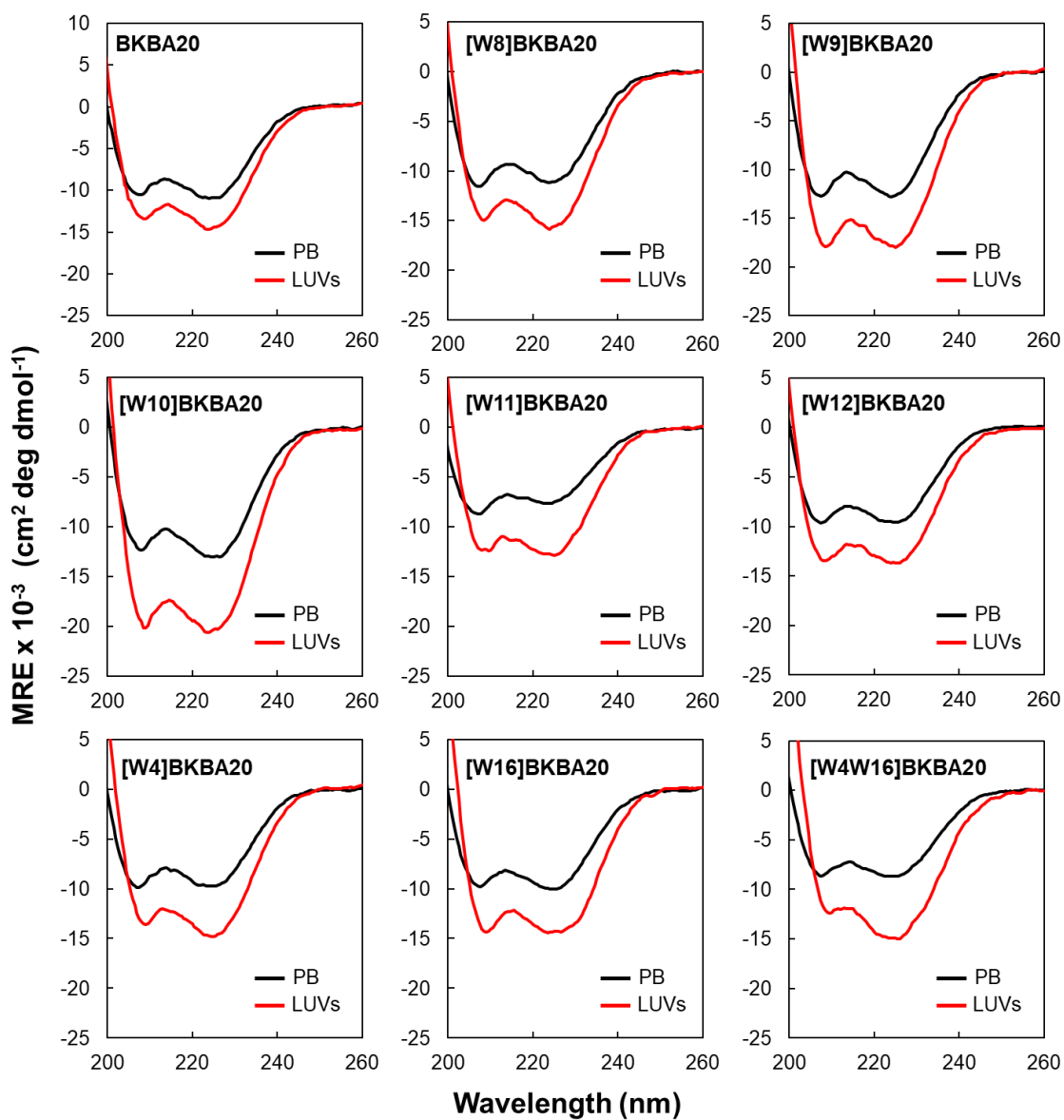


Figure 3-8. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (黒) 及び DPPC LUVs 存在下 (赤) における BKBA20 及び Trp 含有モデルペプチドの CD スペクトル. ペプチド濃度は 20  $\mu$ M, DPPC 濃度は 4 mM であり, 1/200 の P/L 比で測定が行われた.

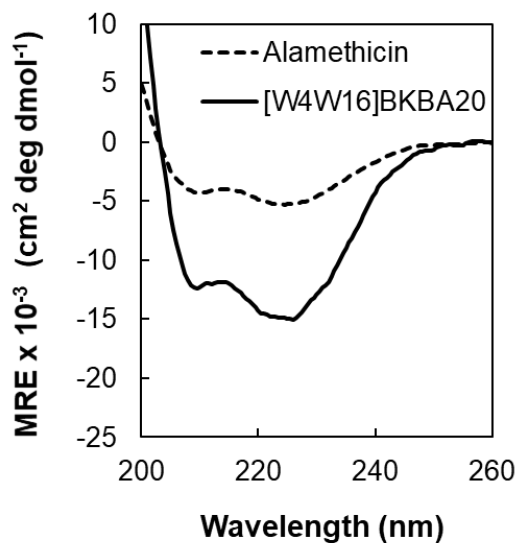


Figure 3-9. DPPC LUVs 存在下における[W4W16]BKBA20 (実線) 及び alamethicin (破線) の CD スペクトル. [W4W16]BKBA20 についてはペプチド濃度 20  $\mu\text{M}$ , DPPC 濃度 4 mM で, alamethicin についてはペプチド濃度 10  $\mu\text{M}$ , DPPC 濃度 2 mM で測定が行われた.

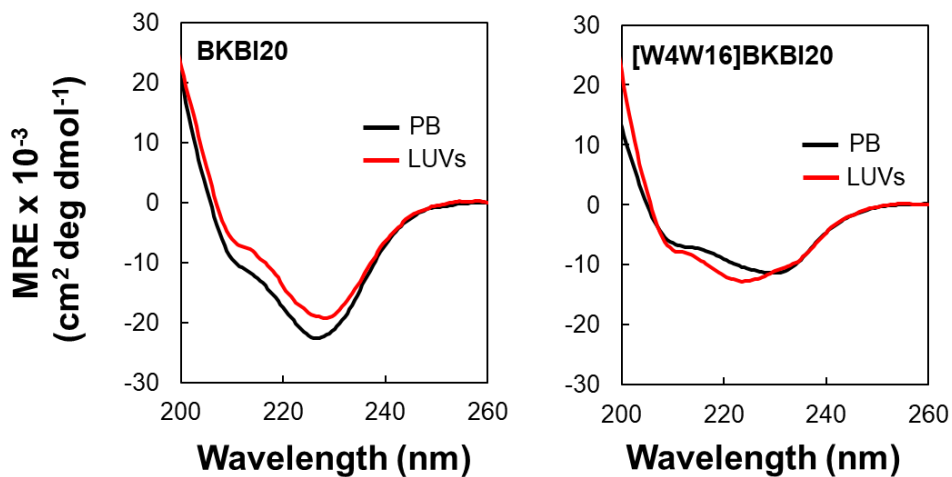


Figure 3-10. 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) (黒) 及び DPPC LUVs 存在下 (赤) における Ile 含有疎水性モデルペプチドの CD スペクトル. ペプチド濃度は 20  $\mu\text{M}$ , DPPC 濃度は 4 mM であり, 1/200 の P/L 比で測定が行われた.



#### 3-2-4. モデルペプチドの溶血活性

ヒト赤血球に対する各モデルペプチドの溶血活性を Figure 3-11 に示す. BKBA20 は測定した濃度範囲で溶血活性を示さなかったが, Trp 残基の導入により 50  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で全体的に溶血能が増加した. 単一の Trp 残基を導入したペプチドの内, [W10]BKBA20 及び [W4]BKBA20 はより強い溶血能を示した. 両末端に Trp 残基を導入した [W4W16]BKBA20 は 50  $\mu\text{g/ml}$  で完全な溶血 (100%) を示し, 1/5 の濃度 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) でも 16% の溶血を示した.

Ile 含有疎水性モデルペプチドは全体的に高い溶血の傾向が見られた. BKBI20 は非常に低い濃度 (1  $\mu\text{g/ml}$ ) でも高い溶血活性 (50%) を示したが, 両末端への Trp 残基の導入により溶血活性が減少した.

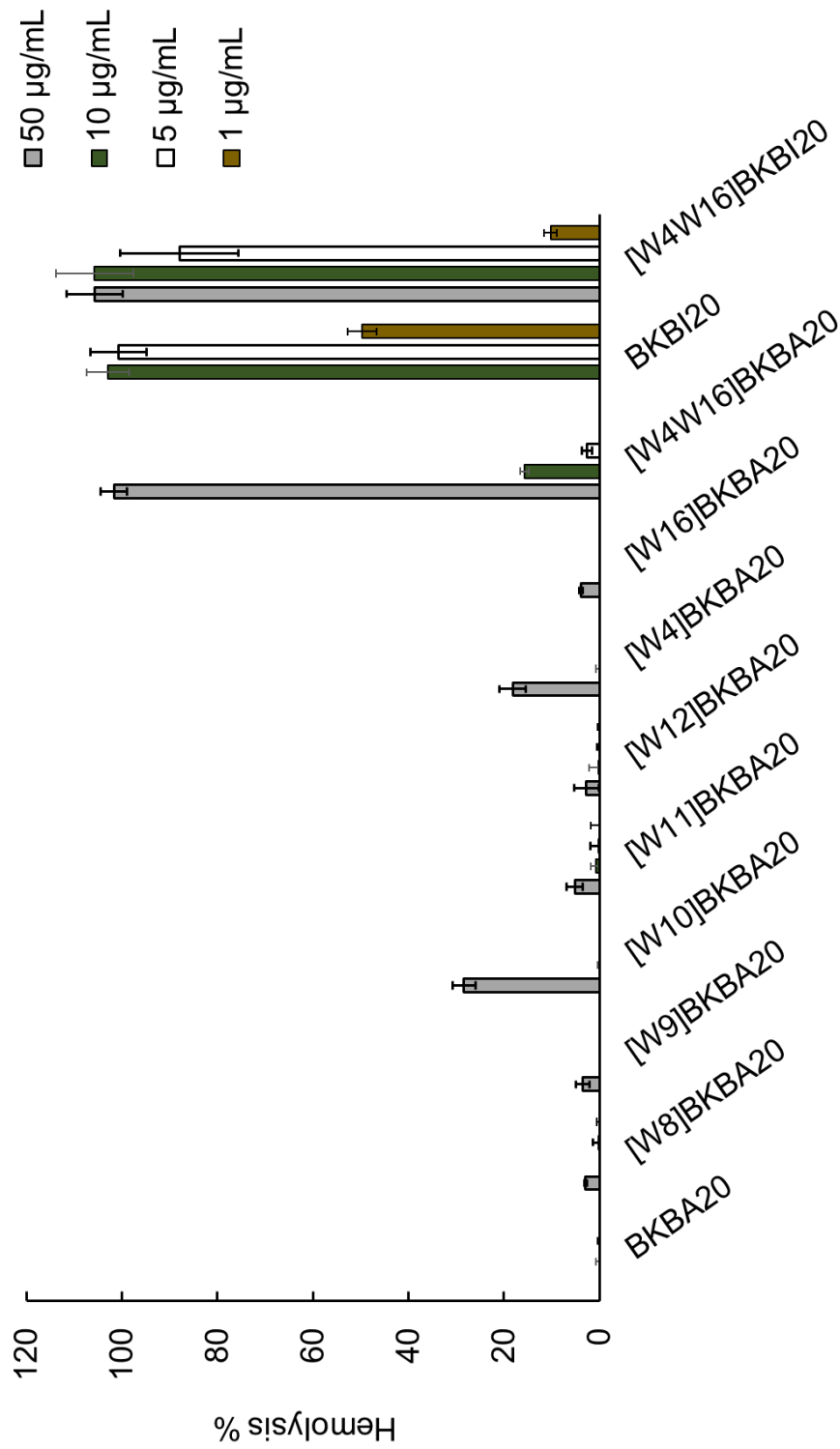


Figure 3-11. 各モデルペプチドのヒト赤血球に対する溶血活性. 1-50 µg/mlのペプチド濃度範囲で測定を行った. 50 µg/mlのBKBI20については, ペプチドの低い水溶性のため測定されなかった.

### 3-3. Discussion

#### 3-3-1. モデルペプチドの構造とヘリックス-ヘリックス相互作用

一般的に、ヘリックスペプチドの末端は分子内水素結合を形成できないため、規則的な二次構造を形成せず、柔軟性が高い構造をとる [8]. BKBA20 のリン酸緩衝液中での helical contents は 42%であったことから、中央部の 8-9 残基程度は $\alpha$ -ヘリックス構造を形成しており、両末端の 11-12 残基程度はフレキシブルな構造であると考えられる. [W11]BKBA20 を除いて、すべての Trp 含有モデルペプチドが helical contents を維持したことから、Trp の導入は BKBA20 のヘリックス構造にほとんど影響を与えないことが示された. 従って、ヘリックス-ヘリックス相互作用やイオンチャネル形成能に対する Trp 残基の効果を見積もるための母体ペプチドとして BKBA20 は適していると考えられる. 親水面 (10 位), 親水面と疎水面の境界 (9 位), 末端 (4 位または 16 位) に Trp を導入したペプチドは水溶液中で濃度依存性変化を示したが、疎水面である 8 位または 12 位への Trp の導入は BKBA20 の濃度的な挙動を消失させた. またリン酸緩衝液中における  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*||}$  の値を比較すると、 $W11 < W8 \approx W9 \approx W12 < W4 \approx W16 < BKBA20 < W10 < W4W16$  の順で増加しており、濃度依存性を示したほとんどのペプチドがより高い  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*||}$  値を示した. 従って、観測された濃度依存的な挙動はヘリックス間会合によって $\alpha$ -ヘリックス構造が安定化された結果であり、親水面、境界面、末端に Trp を導入したペプチドは水溶液中で BKBA20 と同等またはそれ以上の会合能を持つが、疎水面 (8 位または 12 位) への導入は BKBA20 の会合能を低下させることが示唆された. これらの結果から推測される BKBA20 の水溶液中における会合モデルを Figure 3-12 (a) に示す. BKBA20 の水性環境下でのヘリックス-ヘリックス相互作用界面は疎水面であり、Ala や Aib のような比較的小さな側鎖間の密接なパッキングによる疎水性相互作用によって BKBA20 のヘリックス会合は安定化されていると考えられる. Trp 残基は立体

的に嵩高いインドール環をもつため、ヘリックス中央部の疎水面である 8 位や 12 位における Trp 残基の存在は BKBA20 のヘリックス主鎖間の密接なパッキングを妨げ、会合能を低下させたと考えられる (Figure 3-12 (b)). 興味深いことに, [W9]BKBA20 は BKBA20 と同程度の helical contents と会合能を示したが, 同じ境界面でも 11 位への Trp 残基の導入は helical contents を減少させ, 会合能も低下させた. この違いが何に起因するのかを明確に示すことはできないが, 11 位への Trp の導入は BKBA20 のヘリックス構造を破壊し, ペプチドのヘリックス安定性を低下させると考えられる.

[W4W16]BKBA20 で観測された近接した Trp 側鎖間の exciton coupling と遠紫外領域の特徴的な CD バンドは, Trp-Trp 相互作用の存在を示唆している. また[W4W16]BKBA20 の exciton coupling は 50  $\mu$ M 以上で濃度依存的に増加していることから, Trp-Trp 相互作用は分子間で働いていると考えられる. BKBA20 の末端部がフレキシブルな構造であることを考慮すると, 末端部の Trp 残基はヘリックス中央部の密接なパッキングを妨げることなく互いに近づくことができるため, 分子間 Trp-Trp 相互作用は水溶液中での[W4W16]BKBA20 モノマーのヘリックス間会合に寄与していると考えられる (Figure 3-12 (c)). 一方で, Trp による exciton coupling はペプチドの片側の末端に Trp を導入した[W4]BKBA20 と[W16]BKBA20 では観測されなかった. ヘリックスの会合には C 末端同士が同じ側にある平行型と N 末端と C 末端が同じ側にある逆平行型の 2 つのパターンが考えられる. 末端部に Trp を置換したペプチドが平行型で会合した場合 2 つの Trp 残基は近い位置に存在するが, 逆平行型で会合した場合 Trp 残基は離れる. CD の結果から, [W4]BKBA20 と[W16]BKBA20 は会合性を示したが, Trp による exciton coupling は観測されなかったため, BKBA20 は逆平行型で会合していると考えられる (Figure 3-12 (a)).

疎水性ペプチドである BKBI20 はリン酸緩衝液中で BKBA20 よりも非常に高い helical contents 及び会合能を示した. BKBI20 は TFE 中においても高い helical contents を示したこ

とから, BKBA20 の Ala を Ile に置換することでヘリックス安定性が向上することが示された. また BKBI20 は疎水環境である TFE 中では会合能を示さなかった. Suzuki らは疎水面上に Ile 残基をもつヘリックスペプチドをデザインし, このペプチドが Ile 側鎖による効果的な疎水性パッキングによって安定な 3 本鎖コイルドコイル構造を形成することを報告した [9]. 従って, BKBI20 のリン酸緩衝液中における高い会合能は Ile 側鎖による効果的な疎水性パッキングに起因すると考えられる. 一方で両末端への Trp 残基の導入は BKBI20 の helical contents と会合能を低下させた. これは Ile を Trp に置換したことで疎水性パッキングが妨げられたことが原因であると考えられる.

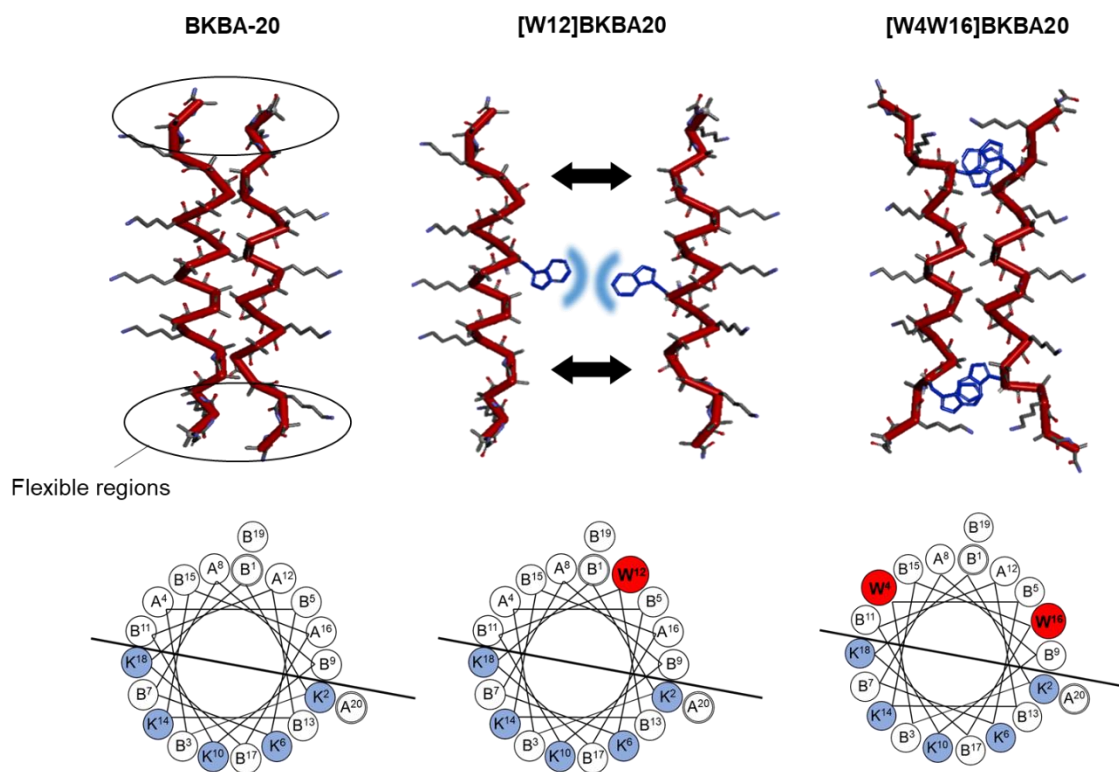


Figure 3-12. BKBA20 及び Trp 含有モデルペプチドの水性環境下におけるヘリックス会合の分子モデル. (a) BKBA20 の会合モデル. ペプチドは逆平行型で会合しており, 両親媒性ヘリックスの疎水面をヘリックス-ヘリックス相互作用の界面と仮定した. (b) [W12]BKBA20 の会合モデル. ヘリックスの疎水面 (12 位) に嵩高い Trp を導入することによって, ヘリックス間のパッキングが妨げられ BKBA20 の会合能が低下した. (c) [W4W16]BKBA20 の会合モデル. ヘリックスの両末端において Trp 同士が相互作用する. ペプチドの分子モデルの構築には Discovery Studio Visualizer を使用した.

### 3-3-2. 脂質二分子膜存在下でのモデルペプチドの構造とペプチド-脂質膜間相互作用

DPPC リポソーム存在下において、BKBA20 及びすべての Trp 含有モデルペプチドの helical contents は増加した。この結果はペプチド-脂質膜間相互作用によって誘導されたヘリックス構造の安定化に起因すると考えられる。Lys 残基による正電荷はリン脂質頭部のリン酸基の負電荷と相互作用し、これがペプチド-脂質膜間相互作用の駆動力になることから、BKBA20 ヘリックスの親水面は脂質との相互作用界面なると考えられる。Trp 含有モデルペプチドの helical contents の増加の程度 (8-16%) は BKBA20 (5%) よりも大きく、Trp の導入がペプチド-脂質膜間相互作用を増強していることが示唆された。Trp のインドール側鎖は疎水性でありながら、双極子モーメントや $\pi$ 電子系による極性も併せもつ。脂質のカルボニル基付近のような極性-非極性界面において、このような両親媒性をもつ Trp 側鎖の性質は適しており、Trp 側鎖の N 原子は脂質頭部と水素結合することが示唆されている [10]。実際に、膜タンパクの統計的解析により Trp 残基は膜中央部よりも脂質頭部-水界面付近に優位に存在することが示された [11]。Trp 含有モデルペプチドの中でも、[W10]BKBA20 は最も高い helicity を示した。脂質との相互作用界面と考えられる親水面に Trp を導入した[W10]BKBA20 ではより効率的に Trp と脂質頭部が相互作用し、結果としてペプチド-脂質膜間相互作用が促進され、ヘリックス構造が強く誘導されたと考えられる (Figure 3-13)。

興味深いことに、[W4W16]BKBA20 に関しては DPPC リポソーム存在下において  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値の増加と、 $[\theta]_{\pi-\pi^*}$  の極小のレッドシフトが観測された。この結果は [W4W16]BKBA20 の二本鎖またはより高次の $\alpha$ -ヘリックス会合体が水性環境よりも脂質二分子膜環境下でより形成されやすいことを示唆している。またリポソーム存在下で観測された[W4W16]BKBA20 の  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値は alamethicin と同等の値を示した。リポソーム存在下において alamethicin は膜電位が存在しないにもかかわらず、膜貫通状態として存在し

ており、さらに膜中で二量体またはより高次の会合体を形成することが、CD 測定における  $[\theta]_{n-\pi^*}/[\theta]_{\pi-\pi^*}$  値の解析によって示唆された [12]. 従って、[W4W16]BKBA20 は膜電位が存在しない状態でも、膜貫通配向をとっており、膜中で会合体を形成している可能性が示唆された. Sparks らはモデルペプチドを用いて、ペプチド末端の Trp 残基が脂質膜界面へのアンカーとして作用し、膜貫通ペプチドにおいて有利な配向やダイナミクスを決定することを報告した [13]. [W4W16]BKBA20 では両末端の Trp 残基が二分子膜両側の脂質頭部に対するアンカーとして作用し、ペプチドの膜挿入の促進と膜貫通配向の安定化を誘導すると考えられる. その結果としてペプチドは優先的に膜貫通型として存在し、膜中での会合体形成が生じたと考えられる.

BKBI20 は明確な helical contents の増加を示さなかったが、溶血活性の結果から膜と相互作用していると考えられる. これらのペプチドはリン酸緩衝液中でも高い helical contents を示したことから、水溶液中で既にほぼ完全な $\alpha$ -ヘリックス構造を形成しており、脂質膜と相互作用してもそれ以上のヘリックス構造が誘導されなかったと考えられる.

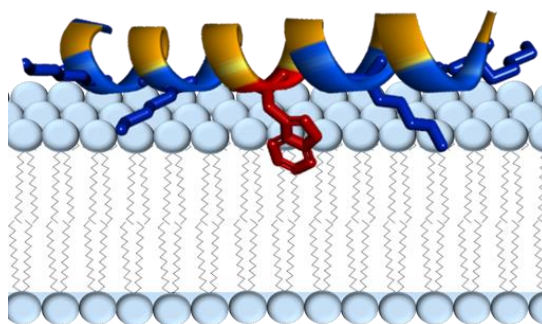


Figure 3-12. CD の結果から推定される[W10]BKBA20 と脂質二分子膜の相互作用のモデル. BKBA20 の親水面は青, 疎水面は黄, 10 位の Trp 残基は赤で示す. ペプチドの分子モデルの構築には Discovery Studio Visualizer を使用した.



### 3-3-3. モデルペプチドの膜摂動活性

BKBA20 への Trp 残基の導入は全体的に溶血活性を増加させたことから, Trp-脂質間の相互作用による膜摂動が示唆された. コレステロールは真核生物の生体膜に 30 mol%程含まれており [14], 膜の流動性やミクロな構造に影響を与えている. コレステロールは疎水性の sterane 骨格及び iso-octyl 基と親水性のヒドロキシ基 (-OH) をもつ両親媒性分子であるため, Trp と強く相互作用すると考えられる. Gasset らは, Trp を豊富に含むペプチドである gramicidin A が疎水性相互作用によって駆動される Trp-コレステロール相互作用を介して複合体形成を促進することを報告した [15]. また Santiago らはニコチン性アセチルコリン受容体 (AChR) において, 膜貫通セグメントに存在する Cys を Trp にした変異体が, コレステロール依存的に受容体のチャネル機能を変化させることを報告した [16]. 従って, Trp 含有モデルペプチドで観測された膜摂動の増加は, Trp-脂質頭部間の相互作用 (Trp アンカリング) に加えて, Trp-コレステロール間の相互作用も寄与していると考えられる. 親水面へ Trp を導入した[W10]BKBA20 は比較的高い溶血活性を示した. CD 測定の結果から, W10 はペプチド-脂質相互作用の界面に存在しているため, この位置への Trp の導入は Trp-脂質間の相互作用において効果的であり, より強く膜摂動が誘導されたと考えられる. 興味深いことに, [W4]BKBA20 や[W16]BKBA20 のような単一の Trp を末端に導入した場合と比較して, [W4W16]BKBA20 の溶血活性は 2 倍以上増加した. 従って, 両末端への Trp 導入は相乗的に膜構造の破壊を誘導すると考えられる.

疎水性の高い BKBI20 は溶血活性を著しく増加させた. Blondelle らは細胞溶解性ペプチドである melittin の Leu 残基を Trp に置換した場合, 溶血能が低下したことから, 脂溶性の側鎖が溶血において重要な役割を果たすことを報告した [17]. 同様の結果が, [W4W16]BKBI20 でも観測されたことから, 両親媒性 $\alpha$ -ヘリックスペプチドにおける脂溶性側鎖の存在はペプチドの膜摂動能と強い相関があると考えられる.

### 3-4. 参考文献

- [1] Chen, Y.-H.; Yang, J. T.; Chau, K. H. Determination of the helix and  $\beta$  form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **1974**, *13*, 3350–3359.
- [2] Gans, P. J.; Lyu, P. C.; Manning, M. C.; Woody, R. W.; Kallenbach, N. R. The helix–coil transition in heterogeneous peptides with specific side–chain interactions: Theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1605–1614.
- [3] Lau, S. Y. M.; Taneja, A. K.; Hodges, R. S. Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two–stranded  $\alpha$ -helical coiled–coils. *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 13253–13261.
- [4] Zhou, N. E.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two–stranded  $\alpha$ -helical coiled–coils. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2664–2670.
- [5] Nichols, M.; Kuljanin, M.; Nategholeslam M.; Hoang, T.; Vafaei, S.; Tomberli, B.; Gray, C. G.; DeBruin, L.; Jelokhani-Niaraki, M. Dynamic turn conformation of a short tryptophan-rich cationic antimicrobial peptide and its interaction with phospholipid membranes. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117*, 14697–14708.
- [6] Ladokhin, A. S.; Selsted, M. E.; White, S. H. CD spectra of indolicidin antimicrobial peptides suggest turns, not polyproline helix. *Biochemistry* **1999**, *38*, 12313–12319.
- [7] Grishina, I. B.; Woody, R. W. Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss.* **1994**, *99*, 245–262.
- [8] Creamer, T. P.; Rose, G. D.  $\alpha$ -Helix-forming propensities in peptides and proteins. *Proteins* **1994**, *19*, 85–97.
- [9] Suzuki, K.; Hiroaki, H.; Kohda, D.; Tanaka, T. An isoleucine zipper peptide forms a native-like

triple stranded coiled coil in solution. *Protein Eng.* 1998, 11, 1051–1055.

[10] Lee, A. G. Lipid–protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, 1612, 1–40.

[11] Arkin, I. T.; Brunger, A. T., Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1429, 113–128.

[12] Woolley, G. A.; Wallace, B. A. Temperature dependence of the interaction of alamethicin helices in membranes. *Biochemistry* 1993, 32, 9819–9825.

[13] Sparks, K. A.; Gleason, N. J.; Gist, R.; Langston, R.; Greathouse, D. V.; Koeppe 2nd, R. E., Comparisons of interfacial Phe, Tyr, and Trp residues as determinants of orientation and dynamics for GWALP transmembrane peptides. *Biochemistry* **2014**, 53, 3637–3645.

[14] Mouritsen, O. G.; Zuckermann, M. J. What's so special about cholesterol? *Lipids* **2004**, 39, 1101–1113.

[15] Gasset, M.; Killian, J. A.; Tournois, H.; de Kruijff, B. Influence of cholesterol on gramicidin–induced HII phase formation in phosphatidylcholine model membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, 939, 79–88.

[16] Santiago, J.; Guzmàn, G. R.; Rojas, L. V.; Marti, R.; Asmar-Rovira, G. A.; Santana, L. F.; McNamee, M.; Lasalde-Dominicci, J. A. Probing the effects of membrane cholesterol in the Torpedo californica acetylcholine receptor and the novel lipid-exposed mutation alpha C418W in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 46523–46532.

[17] Blondelle, S. E.; Simpkins, L. R.; Pérez-Payá, E.; Houghten, R. A. Influence of tryptophan residues on melittin's hemolytic activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1202, 331–336.

## 第4章 モデルペプチドのイオンチャネル特性

### 4-1. Introduction

単一チャネル測定はチャネル1分子の挙動を測定できるため、イオン透過の分子機構を調べる上で強力なツールである。一般的にイオンチャネルの性質は細胞に発現しているチャネルタンパクや遺伝子導入によって発現させたイオンチャネルタンパク質によるチャネル電流をパッチクランプ法によって記録し、評価する。パッチクランプ法は生体膜に近い環境で測定できるという利点があるが、イオンチャネルペプチドの構造活性相関を研究するためには、ペプチドを単純な組成の二分子膜上に再構成できるようなコントロールされた系でチャネル電流を測定する必要がある。脂質平面膜法は人工的に細胞膜を形成する方法で、脂質組成や溶液のイオン濃度を自由に変えることができるため、イオンチャネルペプチドの構造活性相関研究において有用である。平面脂質膜法にはペインティング法 [1], 張り合わせ法 [2], tip-dip 法 [3] がある。この中でも tip-dip 法は直径が 10  $\mu\text{m}$  程度のガラスピペット先端を単分子層に通過させて膜を形成する方法である。ペインティング法や張り合わせ法と比べて、膜面積が小さく膜容量によるノイズが抑えられるため高分解能のデータを得られる点、専用のチェンバーを必要としない点、膜形成時の操作が比較的簡便である点が利点として挙げられる。

Chui と Fyles は様々な合成イオンチャネル分子のチャネル活性の形状を解析し、開時間、コンダクタンスとの相関を研究した [4]。この研究によると、チャネル活性の形状は square-top, multi-level, flicker, spike, erratic の5つに分類される (Figure 4-1)。Figure 2-1 で示したように、今日までに、 $\alpha$ -ヘリックスペプチドによるチャネル形成機構には barrel-stave モデル [5, 6] と toroidal pore モデル [7] の2つの機構が提唱されている。Sekiya らは観測されるチャネル活性の形状に着目して、barrel-stave モデルでは膜貫通ペプチド間のタイトな会合によ

って堅牢な円筒形のポアが形成されるため square-top なチャンネル活性を示し, toroidal モデルではヘリックスモノマー間の脂質分子が流動的に動くことでポアサイズがダイナミックに変化し multi-level な活性を示すことを示唆した [8]. 従って, 観測されるチャンネル活性の形状から, ポア形成のモデルを推定することができる.

本研究では tip-dip 法を用いてチャンネル形成における Trp 残基及び Ile 残基の影響を調べた. また得られた結果から, ペプチドのチャンネル形成機構と天然のイオンチャンネルタンパク質における Trp 残基の重要性を考察した.

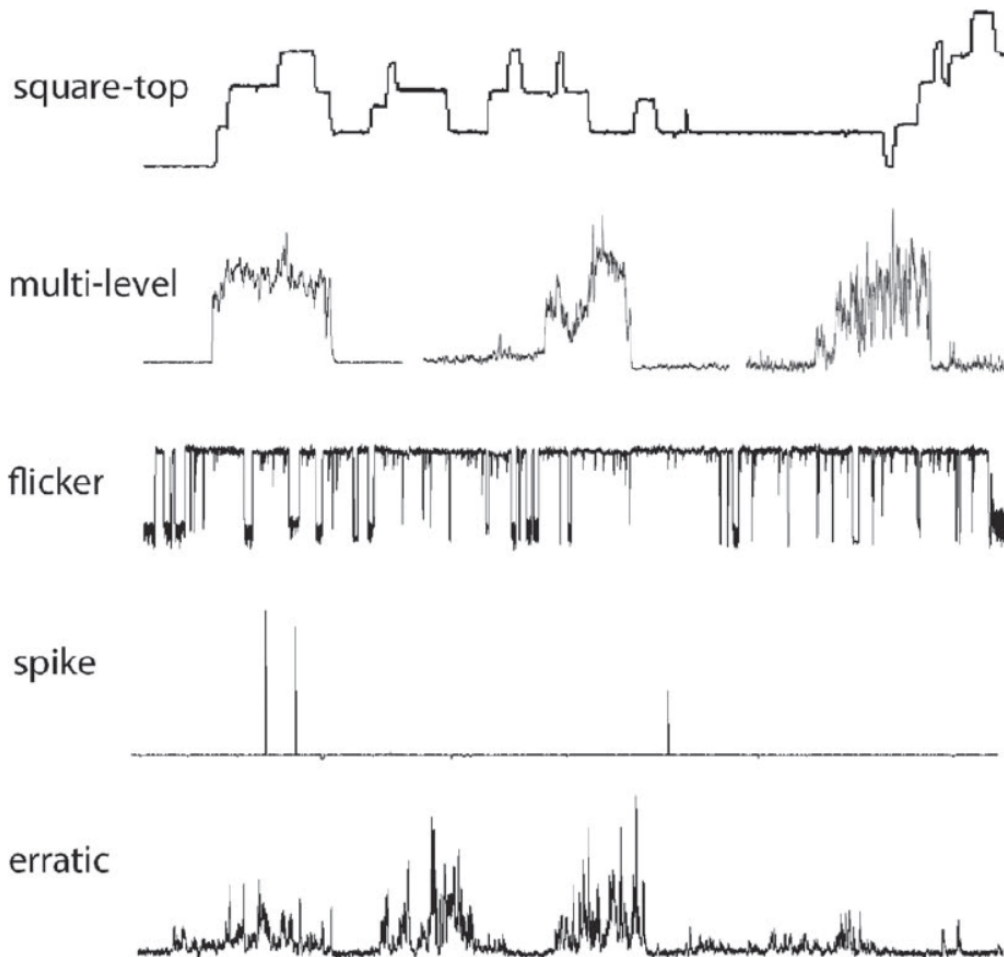


Figure 4-1. Chui と Fyles によって報告されたイオンチャンネル活性の形状の分類 [4].

## 4-2. Results

### 4-2-1. Trp 含有モデルペプチドのイオンチャネル特性

二分子膜を構成する脂質には分岐した飽和アシル基をもち、安定な膜形成ができることが報告されている diphytanoyl phosphatidyl choline (DPhPC) を用いた [9]. チャネル測定においてペプチドは膜の *cis*-side に添加された. さらに実際の生体において細胞外にペプチドが存在する状態を模倣するために, *cis*-side に+80 mV の膜貫通電位を印加した. Figure 4-2 および Figure 4-3 に Trp 含有モデルペプチドの単一チャネル電流記録と観察されたチャネル電流の頻度のヒストグラムを示す. BKBA20 は単一レベルのコンダクタンス値をもつチャネルの形成が観測され, コンダクタンス値は 260 pS であった. またチャネル活性の形状は square-top 型であり, ヘリックスバンドル様の構造が示唆された. Table 4-1 にヘリカルバンドルモデルを用いて観測されたコンダクタンス値から算出したチャネルのポアサイズとヘリックスバンドルを構成するヘリックスモノマーの数をまとめた. 見積もられた BKBA20 のポア直径は 0.38 nm であり, 4 量体ヘリックスバンドルによってチャネルを形成していることが示唆された. [W4W16]BKBA20 を除いたすべての Trp 含有モデルペプチドにおいて, イオンチャネルの square-top 型の明確な開閉が観測された. [W8]BKBA20, [W9]BKBA20, [W10]BKBA20, [W12]BKBA20 の 4 つのペプチドで主に観察されたチャネル活性のコンダクタンス値はそれぞれ 284 pS, 396 pS, 421 pS, 255 pS であった. またこれらのペプチドで見積もられたポア直径は 0.38 nm - 0.49 nm であり, BKBA20 とほぼ同じサイズで 4 量体ヘリックスバンドルによるポア構造を形成することが示された. 従って, これらの部位への Trp 残基の導入は, 膜中での BKBA20 ヘリックス間の相互作用様式にほとんど影響を与えず, チャネル会合体を構成するヘリックスの本数 (4 量体構造) を変化させないことが示唆された. 観測された頻度は少ないが, [W8]BKBA20, [W10]BKBA20, [W12]BKBA20, [W16]BKBA20 はより

高いコンダクタンスレベル (Level 2) のチャンネル活性を示した. このより高いコンダクタンスレベルは低いコンダクタンスレベル (Level 1) の約 2 倍高いため, チャンネル 2 分子が同時に開口した結果であると考えられる. 一方で, [W4]BKBA20, [W11]BKBA20, [W16]BKBA20 の Level 1 のコンダクタンス値はそれぞれ 748 pS, 731 pS, 705 pS と高く, ポア直径は約 0.65 nm であり BKBA20 よりも大きなサイズのポアを形成することが示唆された. チャンネルの開口頻度については, [W9]BKBA20, [W11]BKBA20, [W12]BKBA20, [W4]BKBA20 は BKBA20 と同程度で, [W8]BKBA20 は増加した. 一方で, [W11]BKBA20 はチャンネルの開口頻度が減少した. [W10]BKBA20 及び[W16]BKBA20 は開口頻度が著しく増加し, チャンネル開状態の寿命は他のペプチドと比較して増加した. 興味深いことに, [W4W16]BKBA20 は明確な開閉を示さず, むしろ膜摂動のような挙動を示した.

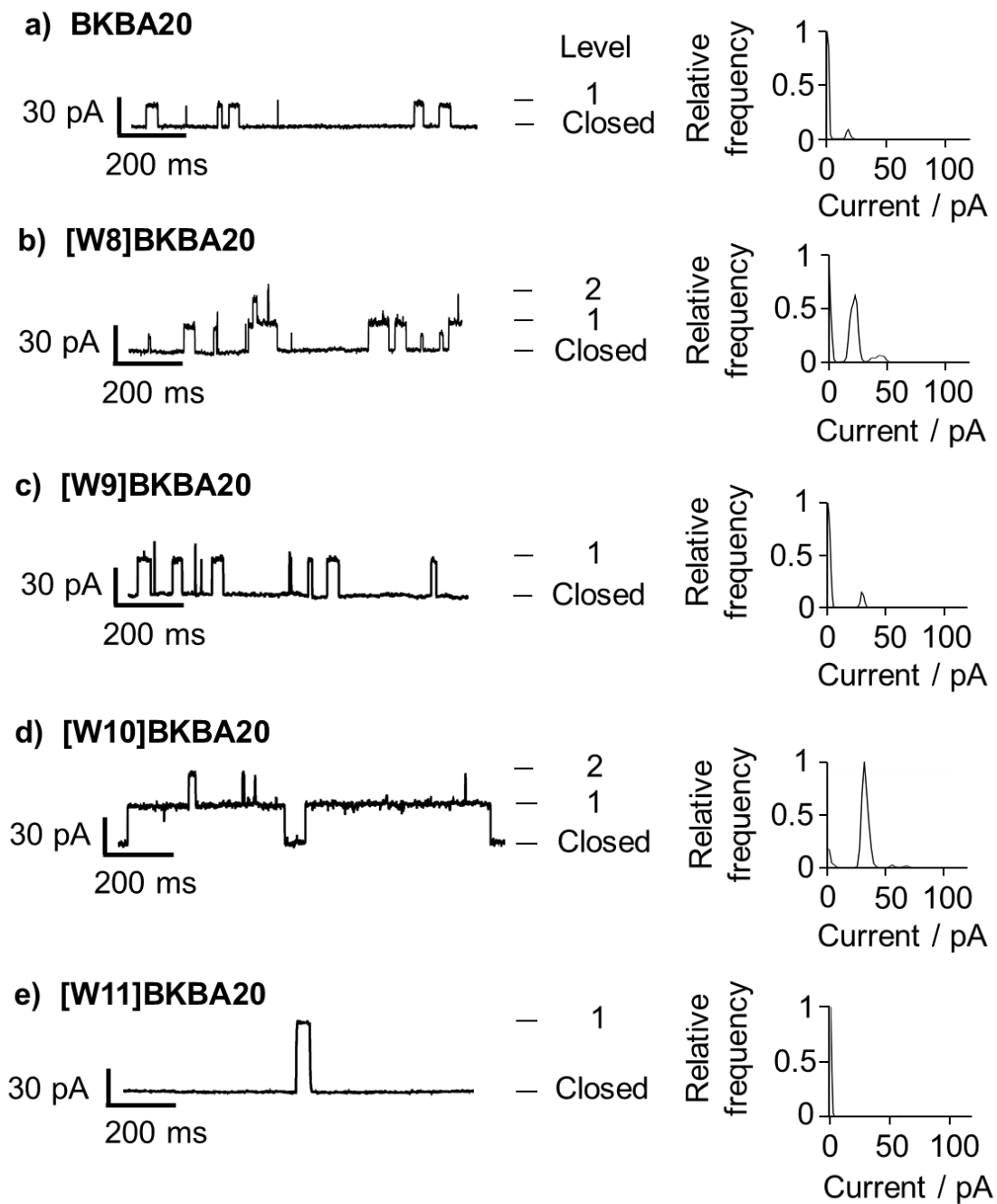


Figure 4-2. BKBA20 (a), [W8]BKBA20(b), [W9]BKBA20 (c), [W10]BKBA20 (d), [W11]BKBA20 (e) の単一チャネル電流記録及び電流値のヒストグラム. ペプチド濃度は 100 nM. 電解質溶液は 500 mM KCl と 5 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]ethanesulfonic acid (HEPES) を含む. 膜の *cis*-side に +80 mV 電圧を印加した.



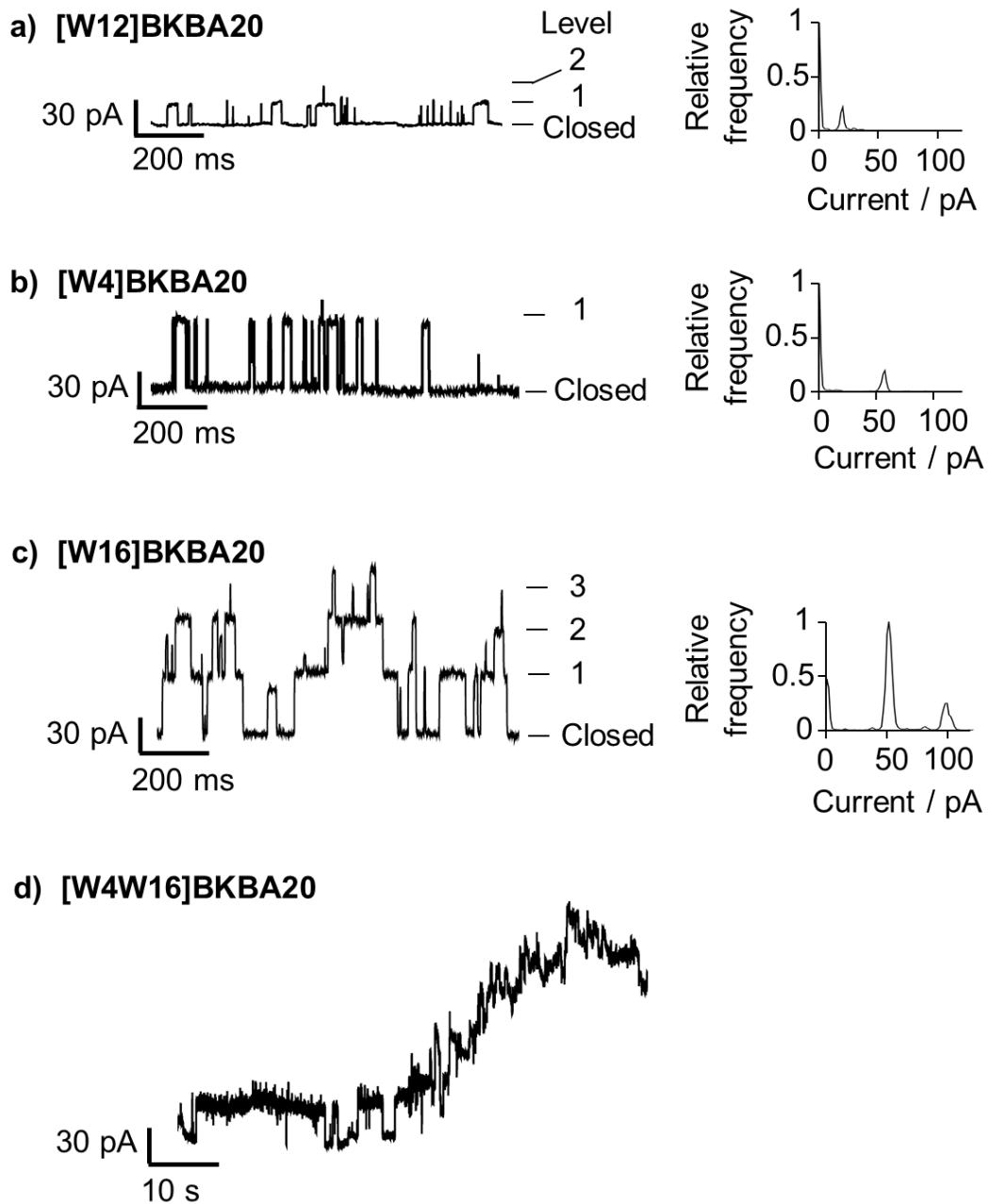


Figure 4-3. [W12]BKBA20 (a), [W4]BKBA20 (b), [W16]BKBA20 (c), [W4W16]BKBA20 (d) の単一チャンネル電流記録及び電流値のヒストグラム. ペプチド濃度は 100 nM. 電解質溶液は 500 mM KCl と 5 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) を含む. 膜の *cis*-side に +80 mV 電圧を印加した.

Table 4-1. *Cis*-side に+80 mV の電圧を印加した際に観測された 100 nM の各モデルペプチドのチャンネル活性のコンダクタンス値, 見積もられたポアの直径, ヘリックスバンドルを構成するヘリックスモノマーの数. [W4W16]BKBA20 及び BKBI20 は 100 nM で明確な開閉が観測されなかったため載せていない.

peptide	conductance [pS]	pore diameter [nm]	number of helices
BKBA20	258	0.38	4
[W4]BKBA20	748	0.66	4–5
[W8]BKBA20	284	0.40	4
[W9]BKBA20	396	0.46	4
[W10]BKBA20	421	0.44	4
[W11]BKBA20	731	0.66	4–5
[W12]BKBA20	255	0.38	4
[W16]BKBA20	705	0.64	4–5
[W4W16]BKBI20	1188	0.84	5–6

#### 4-2-2. Ile 含有疎水性モデルペプチドのイオンチャネル特性

Figure 4-4 に Ile 含有疎水性モデルペプチドの単一チャネル電流記録と観察されたチャネル電流の頻度のヒストグラムを示す。100 nM のペプチド濃度で BKBI20 は明確なチャネルの開閉を示さず, erratic な活性が観測された。一方で, [W4W16]BKBI20 は明確な開閉を示したが, 全体的に multi-level な活性が観測された。観測された level 1 のコンダクタンス値に対して見積もられたポア直径は 0.85 nm であり, BKBA20 の約 2 倍の大きさのポアが観測された。

a) BKBI20



b) [W4W16]BKBI20

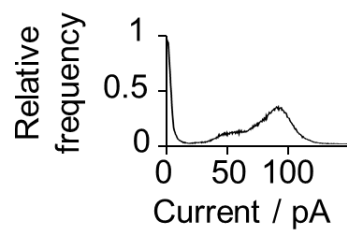
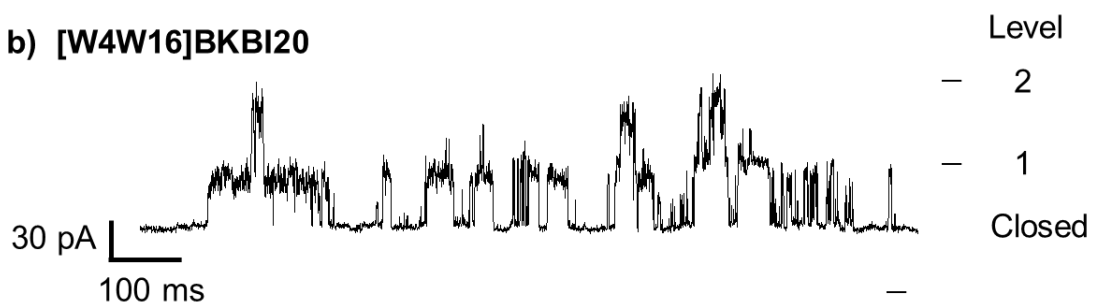
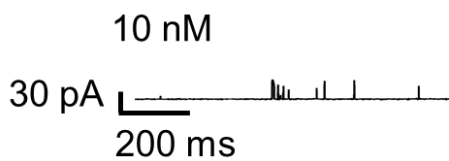
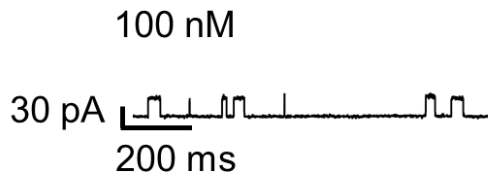


Figure 4-4. BKBI20 (a) 及び[W4W16]BKBI20 (b) の単一チャネル電流記録及び電流値のヒストグラム. ペプチド濃度は 100 nM. 電解質溶液は 500 mM KCl と 5 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethanesulfonic acid (HEPES) を含む. 膜の *cis*-side に+80 mV 電圧を印加した.

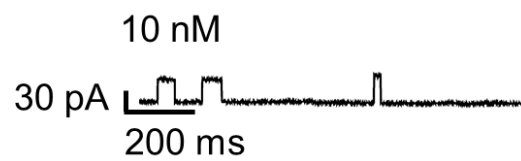
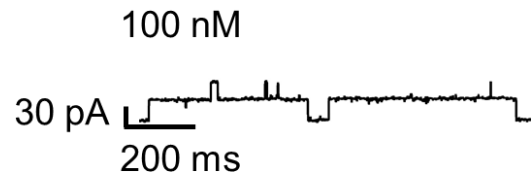
#### 4-2-3. イオンチャネル活性のペプチド濃度依存性

CD 測定で観測された結果から[W4W16]BKBA20 は 100 nM で非常に安定なチャネルを形成している可能性が考えられた。また 100 nM で[W10]BKBA20 と[W16]BKBA20 のチャネルの開時間が増加したことから、これらのペプチドもより安定なチャネルの形成が考えられた。そこで、この3つのペプチドと BKBA20 のチャネル活性の濃度依存性を評価した。Figure 4-5 及び Figure 4-6 に BKBA20, [W10]BKBA20, [W16]BKBA20, [W4W16]BKBA20 の低濃度におけるチャネル活性を示す。10 nM のペプチド濃度において、BKBA20 はほとんどチャネル活性を示さなかったが、[W10]BKBA20 及び[W16]BKBA20 は単一レベルの square-top 型の明確なイオンチャネル活性を示した。さらに、[W4W16]BKBA20 では 10 nM で多段階の square-top 型の開閉が観測された。興味深いことに、[W4W16]BKBA20 の濃度を 1 nM まで下げると、100 nM の BKBA20 と同等の単一チャネル活性が観測された。他の Trp 含有モデルペプチドでは 1 nM の濃度でチャネル活性は観測されなかった。(Data not shown)

**a) BKBA20**



**b) [W10]BKBA20**



**c) [W16]BKBA20**

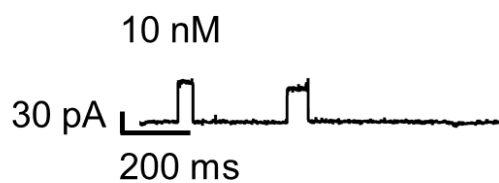
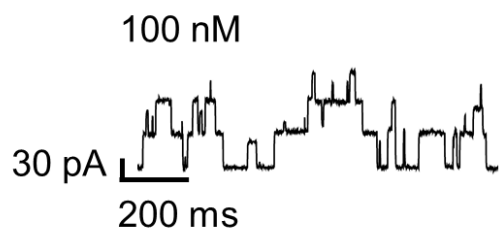


Figure 4-5. BKBA20 (a) , [W10]BKBA20 (b), [W16]BKBA20 (c) の濃度依存的なコンダクタンスパターン. 電解質溶液は 500 mM KCl と 5 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) を含む. 膜の *cis*-side に+80 mV 電圧を印加した.

### [W4W16]BKBA20

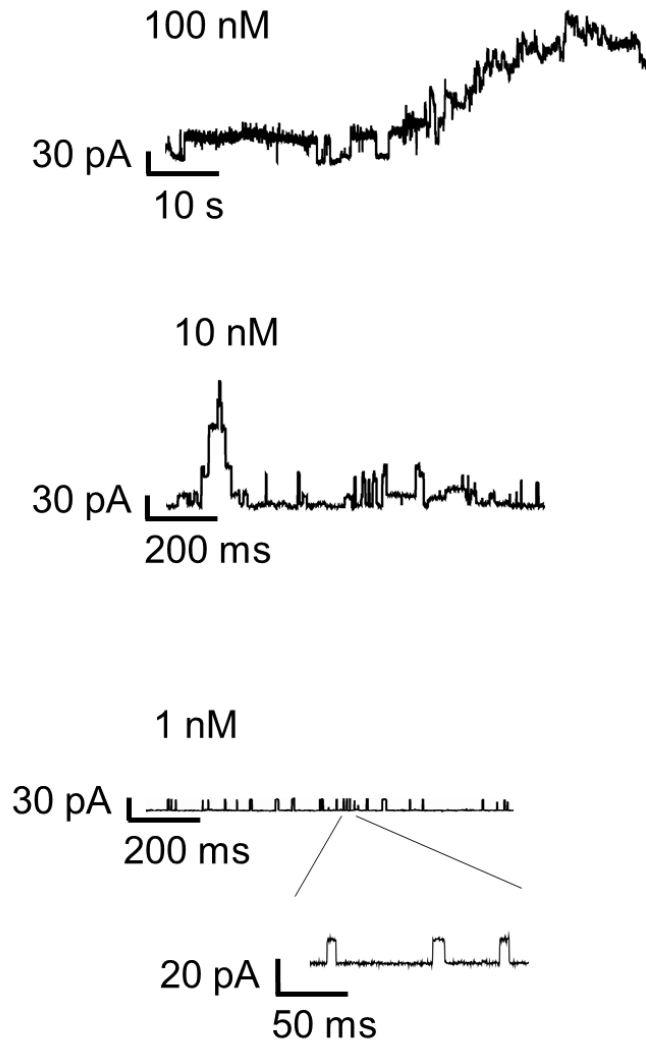


Figure 4-6. [W4W16]BKBA20 の濃度依存的なコンダクタンスパターン. 電解質溶液は 500 mM KCl と 5 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES) を含む. 膜の *cis*-side に +80 mV 電圧を印加した.

## 4-3. Discussion

### 4-3-1. チャンネル形成におけるヘリックス-ヘリックス相互作用とペプチド-脂質膜間相互作用

二本鎖コイルコイル構造はチャンネル構造の形成過程において中間体となることがこれまでの研究で示唆されている [10-14]. [W4W16]BKBA20 は BKBA20 よりも 100 倍低い濃度でも安定なイオンチャンネルを形成した. 従って, [W4W16]BKBA20 の両末端の 2 つの Trp 残基は水性環境において Trp-Trp 相互作用を介して 2 本鎖ヘリックス構造の安定化に寄与しており, この安定な 2 本鎖ヘリックス構造は脂質膜中におけるチャンネル会合体の中間体構造として作用することでチャンネル形成を促進すると考えられる. 一方で, [W8]BKBA20 や [W12]BKBA20 は水溶液中で会合能の減少が観測されたが, BKBA20 と同程度または高い頻度でイオンチャンネル活性を示した. チャンネルの形成には膜中での会合体の形成だけでなく, ペプチド-脂質相互作用と膜電位によって駆動されるペプチドの膜への挿入過程も重要である. 従って, [W8]BKBA20 と [W12]BKBA20 で観測された上記の矛盾の考えられる原因としては, Trp-脂質相互作用によりペプチドの膜挿入が促進され, これが会合能減少による不利な効果を補ったためだと考えられる. 実際にペプチド-脂質相互作用の界面と考えられる親水面に Trp 残基が存在する [W10]BKBA20 は長い開口時間と低濃度 (10 nM) でも安定なチャンネルを形成した. これは親水面の Trp 残基が Trp-脂質相互作用において効果的な部位であり, ペプチドの膜挿入が促進され, チャンネル形成を促進したことに起因すると考えられる. しかしながら, イオンチャンネル測定に使用されるペプチド濃度はかなり低く, CD 測定によってチャンネル形成濃度におけるペプチドの構造と脂質との相互作用様式を解析することは不可能であるため, これらの結果を説明するためには今後さらなる研究が必要である. 興味深いことに, [W11]BKBA20 はチャンネルの開口頻度が BKBA20 よりも減少した. CD 測定の結



果から, 11 位への Trp の導入は BKBA20 の helical content を減少させることが示された. 従って, [W11]BKBA20 におけるチャンネル開口頻度の減少は, 11 位への Trp 導入によるヘリックス形成能の低下に起因すると考えられる.

[W4W16]BKBA20 における安定な 2 本鎖ヘリックス構造はイオンチャンネル形成過程の間体となりチャンネル形成を促進したが, 高い疎水性をもつ BKBI20 のように水溶液中での会合能が高すぎるとイオンチャンネルが形成されなかった. 水溶液中において BKBA20 は疎水面で会合するため, 2 本鎖ヘリックス構造の外側は親水面のみになる. 親水面が外側を向いたままでは疎水環境である膜内へ入るのはエネルギー的に不利であるため, 膜に挿入される際はヘリックスの会合面が疎水面から親水面に動的に変化すると考えられる. 強固な 2 本鎖ヘリックス構造の形成はこのような会合面の動的な変化を妨げるため, BKBI20 は膜への挿入が起こりにくくチャンネル活性を示さなかったと考えられる. 一方で[W4W16]BKBI20 においては, 両親媒性と嵩高い側鎖をもつ Trp を Ile の代わりに 2 か所導入しているため, Ile 側鎖の疎水性パッキングによる会合能が減少し, チャンネル活性を形成したと考えられる. 従って, 水溶液中での会合と解離のバランスがチャンネル形成において重要であることが示唆された.

#### 4-3-2. モデルペプチドのチャネル構造とカチオン- $\pi$ 相互作用によるチャネル構造の安定化

[W10]BKBA20, [W16]BKBA20, [W4W16]BKBA20 は他のペプチドよりも低い濃度でチャネル活性を示したことから, Trp 残基の導入によるチャネル構造の安定化が示唆された. インフルエンザウイルスの M2 タンパクや chloride intracellular channel protein のような天然のイオンチャネルタンパク質において, 膜貫通領域のカチオン- $\pi$ 相互作用はチャネル構造の安定化やチャネル機能の制御に関与することが報告されている [15, 16]. [W10]BKBA20, [W16]BKBA20, [W4W16]BKBA20 は 4 量体ヘリックスバンドルを形成したとき Trp 側鎖と相互作用できるような位置に Lys 側鎖が存在するため, チャネルを形成したときに隣接ヘリックス間でカチオン- $\pi$ 相互作用による付加的な安定化が働くと考えられる. Figure 4-7 は分子間カチオン- $\pi$ 相互作用によって安定化されたチャネル構造の推定のモデルを示す. 観測されたコンダクタンス値から見積もられたように, BKBA20 のポアは 4 量体ヘリックスで構成される. このとき膜の疎水性コアへの荷電側鎖の露出はエネルギー的に不利であるため, BKBA20 がもつ 5 つの正に荷電した Lys 残基の側鎖はポアの内側を向いており, イオンが通過するための水性環境を提供している. さらに, 膜の *cis*-side に正の膜貫通電圧を印加するような条件下において, ヘリックスは膜中で互いに平行に配向し, ヘリックス双極子によって負に分極した C 末端は *cis*-side に向いている. Figure 4-7 に示すように, Trp 残基が親水面である 10 位に存在する場合, Trp 側鎖は隣接ヘリックスの 6 位または 14 位の Lys 側鎖と空間的に近い領域に位置しているため, これらの残基間でのカチオン- $\pi$ 相互作用はポアの内側で形成され, チャネルの安定化に寄与すると推測される. 同様に, C 末端の W16 は K18 と N 末端の W4 は K2 と隣接ヘリックス間のポアの縁の部分でカチオン- $\pi$ 相互作用を形成し, チャネルを安定化する. [W4]BKBA20 及び[W16]BKBA20 で観測されたポアサイズの増加から, これらのペプチドではヘリックスバンドルを構成するモノマーの数が増えた可能性が

考えられる。しかしながら、見積もられたモノマーの数は 4-5 本であり大きな増加がみられないことや Trp の導入によって BKBA20 のヘリックス構造がほとんど変化していないことを考慮すると構成モノマーの数が増加したわけではなく、立体的に嵩高い側鎖をもつ Trp 残基が 4 量体ヘリックスバンドルのヘリックス-ヘリックス相互作用界面に存在したことでポアサイズの増加が観測されたと推測される。[W4]BKBA20 と [W16]BKBA20 は両方とも相互作用可能な Lys 残基が近くに存在するためチャンネルの安定化が推測されるが、実際は [W16]BKBA20 のみ低濃度でのチャンネル活性と開口寿命の増加が観測された。Futaki らは alamethicin の N 末端に極性残基を導入した場合、チャンネルの活性化により高い膜電位が必要であることを報告した [17]。膜の *cis*-side に正電圧を印加した場合、部分的に正に荷電しているヘリックス N 末端は *trans*-side に向くと考えられるため、N 末端は膜を横切る必要がある。極性をもち立体的に嵩高い Trp 側鎖が膜の疎水性コアを通過するのはエネルギー的にも立体的にも不利であるため、[W4]BKBA20 はチャンネルを形成しにくくなると考えられる。それにもかかわらず、両末端に Trp 残基をもつ [W4W16]BKBA20 は著しく低いペプチド濃度 (1 nM) で明確なチャンネルの開閉を示した。[W4W16]BKBA20 は水溶液中でイオンチャンネルの中間体として Trp-Trp 相互作用によって安定化される二量体を形成する。さらに [W4W16]BKBA20 の場合、両末端に Trp 残基をもつためヘリックス毎に 2 つの相互作用部位があり単純に 2 倍の安定化が考えられる。チャンネル構造の安定化に対するそれらの累積的な寄与は N 末端の Trp 残基が膜の疎水性コアを通過するために必要なエネルギー損失を十分に補うことが可能であると推測される。

[W4W16]BKBI20 で観測された multi-level な活性は toroidal モデルによるチャンネル形成を示唆した。これは脂溶性の Ile 側鎖-脂質アシル鎖間の相互作用とペプチド主鎖-脂質頭部間の相互作用が働き、[W4W16]BKBI20 が脂質分子を巻き込みながら膜に挿入されることで toroidal モデルのポアを形成したためであると考えられる。

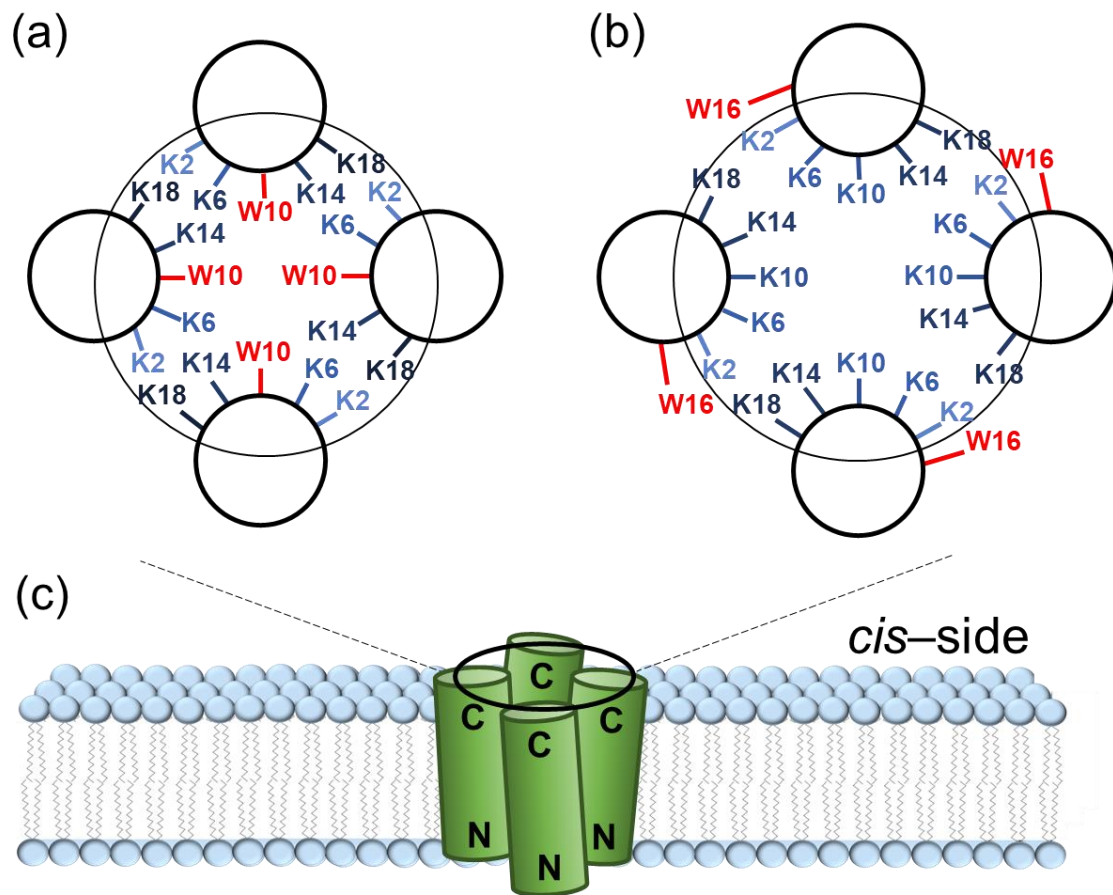
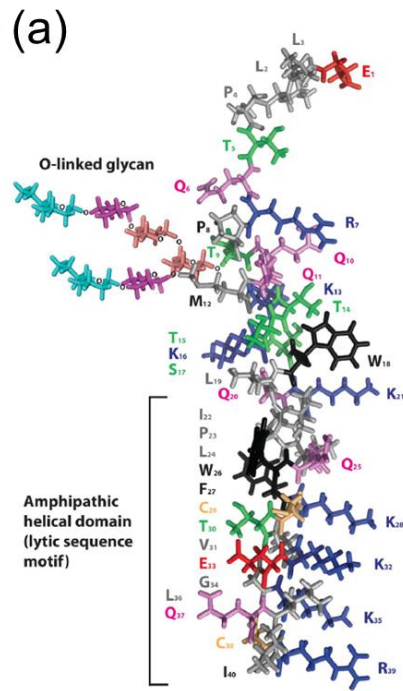


Figure 4-7. カチオン- $\pi$ 相互作用によって安定化される Trp 含有モデルペプチドの脂質二分子膜中における会合状態の推定されるモデル. (a) [W10]BKBA20 によって形成されるチャンネル構造の断面図. 推定上の分子間カチオン- $\pi$ 相互作用は K6/K14 と W10 の間で形成される. (b) [W16]BKBA20 によって形成されるチャンネル構造の断面図. 推定上の分子間カチオン- $\pi$ 相互作用は K18 と W16 の間で形成される. (c) BKBA20 の 4 量体ヘリックスバンドルによるチャンネル構造の側面図. ペプチドの C 末端は膜の *cis*-side を向いており, ヘリックスは互いに平行に配向している.

### 4-3-3. Viroporin 及び peptaibol のイオンチャネル構造に関する考察

いくらかの viroporin は塩基性残基と芳香族残基に富むドメインをもっており、それらのウイルスのライフサイクルにおいて重要な役割を担う [18]. エボラウイルス (EBOV) の delta peptide はウイルスがもつ GP 遺伝子にコードされており、RNA 編集によって産生される 40 残基の viroporin である [19-21]. Delta peptide は高い膜透過性とポア形成能をもっており、腸や肝臓の細胞に蓄積し、細胞溶解素または細胞毒素として作用する可能性があり、EBOV の発病に関与していることが示唆されている [21, 22]. Gallaher と Garry は EBOV delta peptide のポア構造が $\alpha$ -ヘリックス 4 量体から成り、正に荷電した残基がポアの内側を向きカチオン性のポアを形成することを示唆した (Figure 4-8) [22]. EBOV delta peptide のポアの構造は、本研究において BKBA20 モデルペプチドで示唆されたポアと類似している。さらに EBOV delta peptide の C 末端の Trp 残基はチャネル活性に必須であることが報告されている [21]. 従って、Trp のような芳香族残基による相互作用は viroporin のイオンチャネル構造の安定化に寄与しており、これによりウイルスのライフサイクルに必要とされる膜摂動と膜融合を促進すると推察される。

一方で真菌から単離された天然のイオンチャネルペプチドである peptaibol ファミリーには Trp 残基がほとんど含まれていない [23]. Peptaibol は配列中にヘリックス構造を強く誘導する Aib を豊富に含むため、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成しやすく、viroporin で見られるような芳香族残基による付加的な安定化を必要とせずにヘリックスバンドル構造を形成することができると考えられる。また本研究では、特定の位置に Trp 残基を導入したペプチドが高い溶血能を示した。Peptaibol は外来の微生物に対する抗菌ペプチドとして真菌が産生する二次代謝産物である。従って、Aib 残基によって誘導された堅牢な $\alpha$ -ヘリックス構造への過剰な Trp 残基の導入は膜破壊を引き起こし、peptaibol を産生する真菌自身にも毒性を示すことになる。これらは peptaibol が Trp 残基を含まない理由の一つであると考えられる。



WLQKIPLQWFKCTVKEGKLQCRI

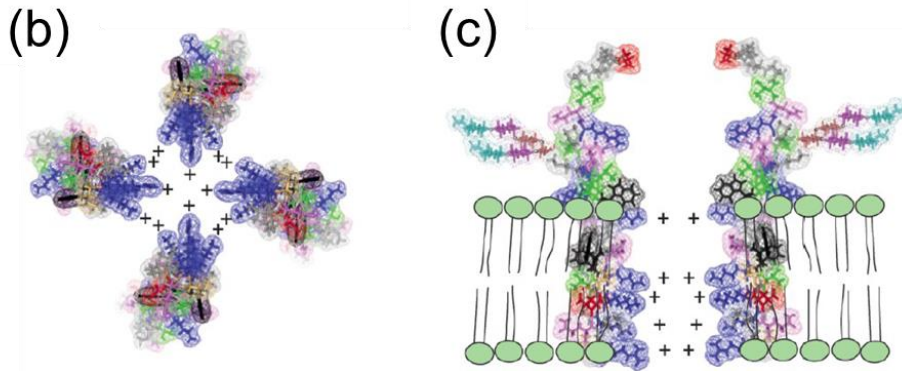


Figure 4-8. (a) Gallaher と Garry によって報告された EBOV delta peptide の膜貫通領域のアミノ酸配列と二次構造のモデル [22]. 正電荷アミノ酸である Lys 残基はヘリックスの片側を向いており両親媒性ヘリックス構造を形成する. (b) EBOV delta peptide によって形成されるヘリックス 4 量体ポアを上から見た図. Lys 残基はポアの内側を向いている. (c) ヘリックス 4 量体ポアを横から見た図.

#### 4-4. 参考文献

- [1] Mueller, P.; Rudin, D. O.; Tien, H. T.; Wescott, W. C. Methods for the formation of single bimolecular lipid membrane in aqueous solution. *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 534–535.
- [2] Montal, M.; Mueller, P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 3561–3566.
- [3] Coronado, R.; Latorre, R. Phospholipid bilayers made from monolayers on patch-clamp pipettes. *Biophys. J.* **1983**, *43*, 231–236.
- [4] Chui, J. K. W.; Fyles, T. M. Ionic conductance of synthetic channels: analysis, lessons, and recommendations. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 148–175.
- [5] Baumann, G.; Mueller, P. A molecular model of membrane excitability. *J. Supramol. Struct.* **1974**, *2*, 538–557.
- [6] Boheim, G. Statistical analysis of alamethicin channels in black lipid membranes. *J. Membr. Biol.* **1974**, *19*, 277–303.
- [7] Ludtke, S. J.; He, K.; Heller, W. T.; Harroun, T. A.; Yang, L.; Huang, H. W. Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry* **1996**, *35*, 13723–13728.
- [8] Sekiya, Y.; Sakashita, S.; Shimizu, K.; Usui, K.; Kawano, R. Channel current analysis estimates the pore-formation and the penetration of transmembrane peptides. *Analyst* **2018**, *143*, 3540–3543.
- [9] Redwood, W. R.; Pfeiffer, F. R.; Weisbach, J. A.; Thompson, T. E. Physical properties of bilayer membranes formed from a synthetic saturated phospholipid in n-decane. *Biochim. Biophys. Acta* **1971**, *233*, 1–6.
- [10] Lear, J. D.; Wasserman, Z. R.; DeGrado, W. F. Synthetic amphiphilic peptide models for protein ion channels. *Science* **1988**, *240*, 1177–1181.
- [11] Chung, L. A.; Lear, J. D.; DeGrado, W. F. Fluorescence studies of the secondary structure and

- orientation of a model ion channel peptide in phospholipid vesicles. *Biochemistry* **1992**, *31*, 6608–6616.
- [12] DeGrado, W.; Wasserman, Z.; Lear, J. Protein design, a minimalist approach. *Science* **1989**, *243*, 622–628.
- [13] Woolley, G. A.; Wallace, B. A. Temperature dependence of the interaction of alamethicin helices in membranes. *Biochemistry* **1993**, *32*, 9819–9825.
- [14] Taira, J.; Jelokhani-Niaraki, M.; Osada, S.; Kato, F.; Kodama, H. Ion-channel formation assisted by electrostatic interhelical interactions in covalently dimerized amphiphilic helical peptides. *Biochemistry* **2008**, *47*, 3705–3714.
- [15] Williams, J. K.; Zhang, Y.; Schmidt-Rohr, K.; Hong, M. pH-dependent conformation, dynamics, and aromatic interaction of the gating tryptophan residue of the influenza M2 proton channel from solid-state NMR. *Biophys. J.* **2013**, *104*, 1698–1708.
- [16] Peter, B.; Polyansky, A. A.; Fanucchi, S.; Dirr, H. W. A Lys-Trp cation- $\pi$  interaction mediates the dimerization and function of the chloride intracellular channel protein 1 transmembrane domain. *Biochemistry* **2014**, *53*, 57–67.
- [17] Noshiro, D.; Asami, K.; Futaki, S. Metal-assisted channel stabilization: Disposition of a single histidine on the N-terminus of alamethicin yields channels with extraordinarily long lifetimes. *Biophys. J.* **2010**, *98*, 1801–1808.
- [18] Gonzalez, M. E.; Carrasco, L. Viroporins. *FEBS Lett.* **2003**, *552*, 28–34.
- [19] Sanchez, A.; Trappier, S. G.; Mahy, B. W.; Peters, C. J.; Nichol, S. T. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1996**, *93*, 3602–3607.
- [20] Volchkova, V. A.; Dolnik, O.; Martinez, M. J.; Reynard, O.; Volchkov, V. E. RNA editing of



the GP gene of Ebola virus is an important pathogenicity factor. *J. Infect. Dis.* **2015**, *212*, S226–S233.

[21] He, J.; Melnik, L. I.; Komin, A.; Wiedman, G.; Fuselier, T.; Morris, C. F.; Starr, C. G.; Searson, P. C.; Gallaher, W. R.; Hristova, K.; Garry, R. F.; Wimley, W. C. Ebola virus delta peptide is a viroporin. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00438–00417.

[22] Gallaher, W.; Garry, R. Modeling of the Ebola virus delta peptide reveals a potential lytic sequence motif. *Viruses* **2015**, *7*, 285–305.

[23] Whitmore, L.; Wallace, B. A. Analysis of peptaibol sequence composition: implications for in vivo synthesis and channel formation. *Eur. Biophys. J.* **2004**, *33*, 233–237.

## 第5章 実験

### 5-1. 試薬

Fmoc-Aib-OH は渡辺化学工業株式会社から購入した。Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, NovaPEG Rink Amide resin LL は Novabiochem から購入した。HBTU は Merck, HOBt はペプチド研究所から購入した。アミノ酸標準溶液 H 型, Ac<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>CN, CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O, EtOH, DMF, DIEA, diethyl ether, HCl, MeOH, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NMP, piperidine, PITC, TEA, TFA は和光純薬工業株式会社から購入した。DPPC, CHCA は Sigma-Aldrich から購入した。TIS は東京化成工業株式会社から購入した。DPhPC は Avanti Polar Lipids から 50 mg/mL クロロホルム溶液として購入した。Triton X-100 は Thermo Fisher Scientific から購入した。

### 5-2. ペプチド合成

ペプチドの合成は Fmoc 固相合成法で行った。ペプチド合成用のカラムに NovaPEG Rink Amide LL (0.19 mmol/g, 25 μmol スケール) を量りとり, DMF で膨潤させた。25 μmol スケールに対して 10 当量分の N-α-Fmoc アミノ酸 (250 μmol) に 2 M DIEA/NMP (250 μl, 500 μmol) 及び 0.45 M HBTU/HOBt (560 μl, 250 μmol) を加え, 10 分間静置してアミノ酸を活性化した。合成用カラムから DMF を取り除き, 活性化させたアミノ酸を加え, 40 分間攪拌することで縮合させた後, 合成用カラムから反応溶液を取り除き, DMF で樹脂を洗浄した (2 ml x 5)。Fmoc 基の脱保護は 20% piperidine / DMF (2 ml) を合成カラムに加え, 10 分間攪拌することで行った。その後, 合成カラムから反応溶液を取り除き, DMF で樹脂を洗浄した (2 ml x 10)。この縮合ステップを繰り返すことでペプチド鎖を伸長させた。なお, 立体障害による合成上の問題から, Aib に関しては活性化時間を 20 分間, カップリングの反応時間を 60 分間に延長

した。目的鎖長までペプチドを伸長させ、N末端の脱保護を行った後、DMF (800  $\mu$ l), TEA (70  $\mu$ l, 500  $\mu$ mol), Ac<sub>2</sub>O (24  $\mu$ l, 250  $\mu$ mol) を加え、90 分間攪拌することで N 末端をアセチル化した。DMF (2 ml x 10) と MeOH (2 ml x 5) で樹脂を洗浄した後、減圧した中性デシケータ内で一晩放置し乾燥させた。その後、6 ml の脱樹脂カクテル (95% TFA, 2.5% TIS, 2.5% H<sub>2</sub>O) を合成用カラムに加え、2 時間攪拌することでペプチドの脱樹脂を行った。脱樹脂の溶液は遠沈管に回収し、N<sub>2</sub> ガス気流により TFA を除去した。得られた粗生成物にジエチルエーテルを加え、遠心分離によりペプチドを沈殿させた後、上清を除去してペレット状のペプチドを得た。ジエチルエーテルによるデカントをさらに 4 回繰り返した後、減圧した酸性デシケータ内で一晩放置して、粉末状のペプチドを得た。

合成したペプチドの純度は分析用 RP-HPLC によって確認した。RP-HPLC 分析ではポンプに JASCO PU-2089 (日本分光株式会社), 検出器に JASCO UV-2075 (日本分光株式会社) を使用した。固定相のカラムには Wakosil-II 5C18 HG 4.0 mm x 150 mm (和光純薬工業株式会社), 移動相の溶液には 0.05% TFA/H<sub>2</sub>O (溶離液 A) と 0.04% TFA/CH<sub>3</sub>CN (溶離液 B) を用いた。BKBI20 及び[W4W16]BKBI20 に分析には Wakosil-II 5C4 HG 4.0 mm x 150 mm (和光純薬工業株式会社) をカラムに用いた。検出波長は 220 nm, 流速は 0.5 ml / min, グラジエントは溶離液 A が 95-5% (0-30 min) となるように設定した。ペプチドの HPLC プロファイルを Figure 6-1 に示す。ペプチドの構造は MALDI-TOF MS 解析により確認した。装置は 4800 Plus MALDI/TOF Analyzer (Applied biosystems 社製) または Autoflex III (BRUKER 社製) 使用した。ペプチド溶液とマトリックス溶液をプレート上の同じスポットに 1  $\mu$ l ずつ滴下して乾固させた後、測定を行った。マトリックスには  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) を用いた。アミノ酸組成と実験で使用したストック溶液のペプチド濃度は定量的なアミノ酸分析で決定した。

**BKBA20.** MALDI-TOF MS: 1928.86 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 1928.21]. HPLC: R.T. 16.0 min.

**[W8]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 2044.01 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2043.26]. HPLC: R.T. 17.1 min.

**[W9]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 2030.08 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2029.24]. HPLC: R.T. 16.6 min.

**[W10]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 1986.32 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 1986.20]. HPLC: R.T. 17.1 min.

**[W11]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 2030.04 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2029.24]. HPLC: R.T. 17.0 min.

**[W12]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 2043.87 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2043.26]. HPLC: R.T. 16.3 min.

**[W4]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 2043.99 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2043.26]. HPLC: R.T. 17.3 min.

**[W16]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 2044.07 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2043.26]. HPLC: R.T. 17.2 min.

**[W4W16]BKBA20.** MALDI-TOF MS: 2158.93 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2158.30]. HPLC: R.T. 18.5 min.

**BKBI20.** MALDI-TOF MS: 2138.45 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2138.31]. HPLC: R.T. 27.1 min.

**[W4W16]BKBI20.** MALDI-TOF MS: 2284.44 [expected for (M+Na)<sup>+</sup> 2284.12]. HPLC: R.T. 22.5 min.

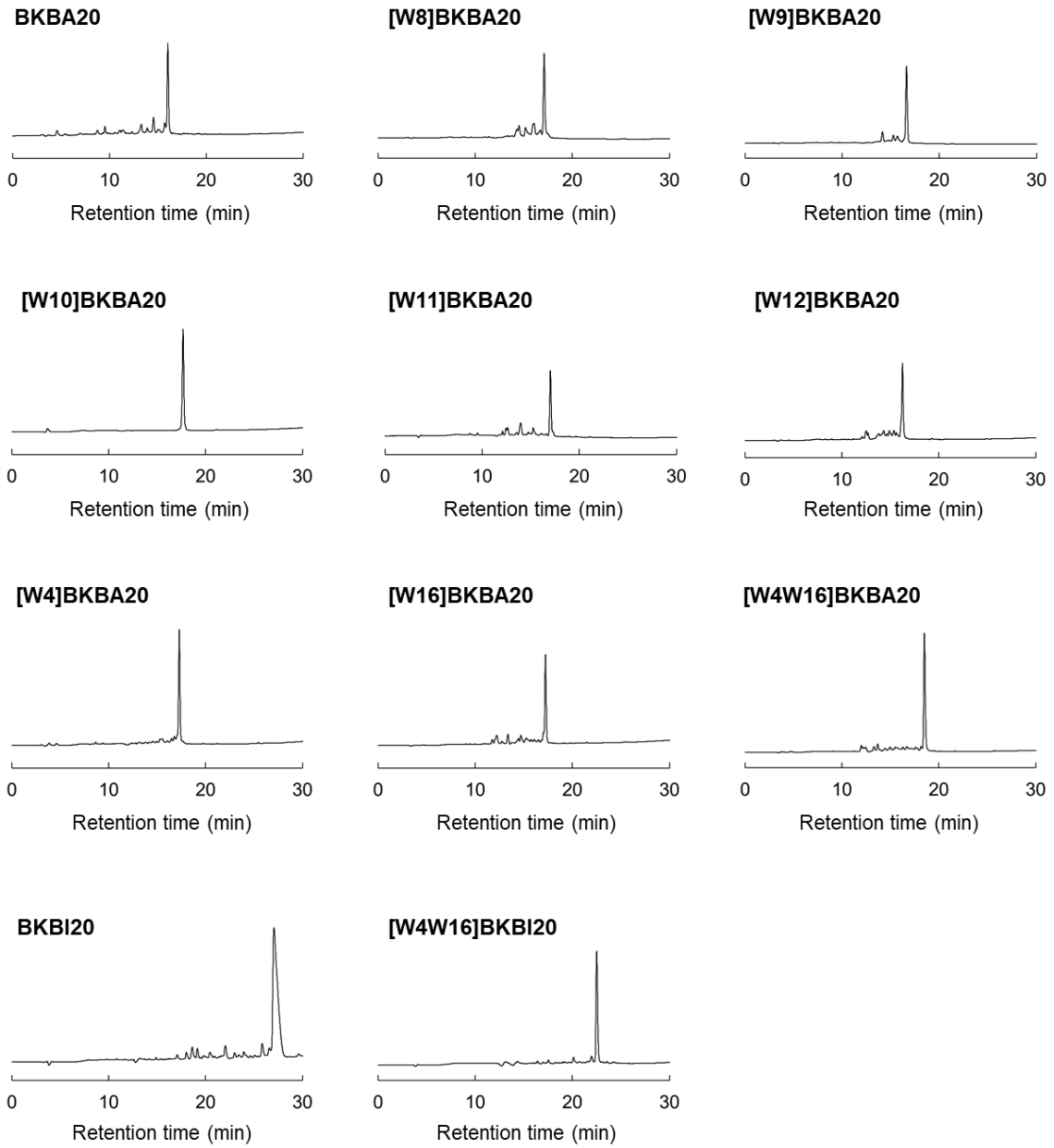


Figure 6-1. 合成したペプチドの HPLC プロファイル.

### 5-3. アミノ酸分析

アミノ酸組成と実験で使用したストック溶液のペプチド濃度は定量的なアミノ酸分析で決定した。ペプチドストック溶液 (200  $\mu$ l) をアンプル管に分注して、凍結乾燥により粉末状の固体にして封管した。封管したアンプル管を開け、超純水を 250  $\mu$ l 加えた。この溶液から 80  $\mu$ l 量りとり、試験管 (12 x 105 直口) に移した。エバポレーターにより濃縮した後、6 M HCl を 200  $\mu$ l 加え、封管して 110°C で 24 時間加熱し、ペプチド結合を加水分解した。エバポレーターで濃縮した後、超純水を 100  $\mu$ l 加え溶解させた。この溶液から 25  $\mu$ l 量りとり小型試験管に移した。また標準溶液として 2.5 mM アミノ酸標準溶液 H 型を 10  $\mu$ l (25 nmol) 量りとり小型試験管に移した。エバポレーターにより濃縮した後、各試験官に EtOH / H<sub>2</sub>O / TEA (2 / 2 / 1) 溶液を 20  $\mu$ l 加え溶解させた。エバポレーターにより濃縮した後、各試験官に EtOH / H<sub>2</sub>O / TEA / PITC (7 / 1 / 1 / 1) 溶液を 20  $\mu$ l 加え溶解させ、室温にてアミノ酸の PTC 化を行った。エバポレーターで濃縮した後、溶離液 C [6% CH<sub>3</sub>CN / 60mM CH<sub>3</sub>COONa (pH 6.0) ] 1 ml に溶解させ、10  $\mu$ l を量りとり RP-HPLC で分析した。サンプルと標準液のリジンの HPLC ピーク面積値を比較することで、ペプチド溶液の濃度を算出した。測定は 3 回行い、ピーク面積値は 3 回の測定の平均値を用いた。RP-HPLC 分析ではポンプに JASCO PU-2089 (日本分光株式会社)、検出器に JASCO UV-2075 (日本分光株式会社) を使用した。固定相のカラムには Lichrospher® 100 RP-18 endcapped 5  $\mu$ m (和光純薬工業株式会社)、移動相の溶液には 6% CH<sub>3</sub>CN / 60 mM CH<sub>3</sub>COONa (pH 6.0) (溶離液 C) と 60% CH<sub>3</sub>CN / 60 mM CH<sub>3</sub>COONa (pH 6.0) (溶離液 D) を用いた。検出波長は 254 nm、流速は 1.0 ml / min、グラジエントは溶離液 C が 100% (0-1 min), 100-30% (1-21 min), 30-0% (21-35 min) となるように設定した。カラムオーブンをういてカラムの温度を 50°C に保って測定を行った。

#### 5-4. Large Unilamellar Vesicles (LUVs) の調製

DPPC (4.44  $\mu\text{mol}$ ) をクロロホルム (100  $\mu\text{l}$ ) に溶解させた.  $\text{N}_2$  ガス気流による濃縮によってサンプル管の壁面に薄い脂質フィルムを形成させ, 減圧下で一晩放置した. 50 mM PB (pH 7.4, 1 ml) を加え, 60°C で脂質フィルムを懸濁させ multi lamellar vesicle (MLV) を調製した. 凍結-融解サイクルを 5 回繰り返した後, LiposoFast extruder (Avestin, Canada) を使用して LUV を調製した [1]. MLV 懸濁液を 60°C で 100 nm の polycarbonate membrane filter (Avanti Polar Lipids) に 21 回通して LUV を得た.

#### 5-5. 円二色性 (CD) 測定

CD スペクトルは JASCO J-820 spectropolarimeter (日本分光株式会社) を用いて, 320-190 nm の波長領域で測定した. 測定セルにはセル長 1.0 mm の円筒石英セルを用いた. 感度 Standard (100 mdeg), 積算回数 4-12 回, バンド幅 1.0 nm, 走査速度 50 nm/min, 走査モード Continuous, レスポンス 1 sec, データ間隔 0.1 nm, 窒素ガス気流下, 室温で測定を行った. ペプチドを含まない溶媒のスペクトルをブランクとして測定し, ペプチド溶液のスペクトルから差し引くことにより, ペプチド由来の CD スペクトルを得た. ペプチド溶液は測定の前 30 分前に調製した. 得られた楕円率は式 (1) を用いて平均残基楕円率 (MRE)  $[\theta]$  に変換し, 波長の関数としてプロットした.

$$[\theta] = \frac{[\theta]_{\text{obs}}}{l c n} \quad (1)$$

この式において,  $[\theta]_{\text{obs}}$  (mdeg) は実測の楕円率,  $[\theta]$  ( $\text{cm}^2 \text{deg dmol}^{-1}$ ) は MRE,  $l$  (cm) は光路長,  $c$  (mM) はペプチド濃度,  $n$  はペプチドのアミノ酸残基数である.

また各ペプチドの helix contents (helicity) は式 (2), (3) を用いて算出した [2, 3].

$$[\theta]_{222,\infty} = \frac{(-4100)(n - 4.6)}{n} \quad (2)$$

$$\text{Helix contents \%} = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta]_{222,\infty}} \times 100 \quad (3)$$

この式において,  $[\theta]_{222}$  は 222 nm での MRE,  $[\theta]_{222,\infty}$  はペプチドが完全な (100%) ヘリックス構造をとったときの MRE,  $n$  はペプチドのアミノ酸残基数である. 本研究で用いた 20 残基のペプチドの場合,  $[\theta]_{222}$  の値は  $-30,800 \text{ deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$  である.

## 5-6. 溶血活性測定

健康なヒトから 10 ml の血液を採取し, 遠沈管に移した. この血液を 500 x g で 5 分間遠心し, 赤血球のペレットを形成した. 血漿層を吸引し, 150 mM NaCl を加えて静かに攪拌し, 500 x g で 5 分間遠心した. この操作を 5 回繰り返すことで血球を洗浄した. 最終的に上清を吸引し, PBS (pH 7.4) を加えて赤血球濃度を 1/50 に希釈した.

ペプチドの溶血活性は 96 ウェルプレート溶血アッセイにより評価した [4]. ペプチドストック溶液, ポジティブコントロールとして 20% Triton X-100, ネガティブコントロールとして PBS (pH 7.4) をそれぞれ 10  $\mu\text{l}$  ずつ V 底の 96 ウェルプレートに加えた. 単離した赤血球溶液 190  $\mu\text{l}$  を各ウェルにピペッティングし, プレートを 37°C でインキュベートした. プレートを 500 x g で 5 分間遠心し, 無傷の赤血球をペレット化する. 各ウェルの上清 100  $\mu\text{l}$  を透明な平底 96 ウェルプレートに移した. 吸光プレートリーダー (アズワン社製) で上清の吸光度を 450 nm で測定した.



## 5-7. 単一チャネル電流測定

Figure 6-2 に示すように, 単一チャネル電流測定は tip-dip 法により作製した平面脂質膜を用いて測定した [5, 6]. ガラスピペット (内径 $\sim 1 \mu\text{m}$ ) は microelectrode puller (Narishige, Tokyo, Japan) を用いた two-pulls 法によってガラスキャピラリー (Narishige) から作製した. 測定には 500 mM KCl 5 mM HEPES バッファー (pH 7.4) を用いた. ペプチド溶液で満たしたガラスピペットの先端をバッファーで満たしたシャーレに浸した. この状態で 10 mg/ml DPhPC ヘキサン溶液 (2  $\mu\text{l}$ ) をシャーレ上に滴下し, 10 分間静置してヘキサンを蒸発させることで DPhPC 単分子膜をディッシュ表面に形成させた. その後, マイクロマニピレーターを使ってピペット先端を再浸漬させ, 脂質二分子膜をピペット先端に作製した. 脂質二分子膜は 2–20 G $\Omega$  のシールの形成により確認した. 単一チャネル電流は Axopatch 1D patch-clamp amplifier (Axon Instruments Inc., Union City, CA) を用いて増幅させ, pClamp 6 software (Axon Instruments, Inc.) によって制御した. データ取得装置は Digidata 1440A (Molecular Devices 社製), オシロスコープは 40 MHz OSCILLOSCOPE CS-4035 (KENWOOD 社製), ヘッドステージは CV-4 HEAD STAGE (Molecular Devices 社製), フィルターアンプには FLA-01 Filter/Amplifier (Cygnus Technology 社製) を用いて測定をおこなった. データは 1 kHz または 2 kHz のフィルターによりノイズを取り除き, AxoGraph 3.5 (Axon Instruments Inc.) によって解析した.

ヘリックスバンドルモデルでは [7], 膜貫通ヘリックスによるバンドルがイオン透過孔になると考えられる. 剛直な構造であるヘリックスバンドルはオームの法則に従う円筒形のポア構造としてみなすことができるため, ポアの抵抗は式 (4) で算出される.

$$R_{\text{pore}} = \frac{\rho l}{\pi r^2} \quad (4)$$

式 (4) において,  $\rho$  はバルク溶液の抵抗率,  $l$  はポアの長さ,  $r$  はポアの半径を表す. さらにこのようなポア自体の抵抗とは別に, イオンがポアの入り口に近づくときに発生する抵抗 (access resistance,  $R_{\text{access}}$ ) は式 (5) より算出され, ポア全体の抵抗 ( $R_{\text{total}}$ ) は式 (6) で表される.

$$R_{\text{access}} = \frac{\rho}{2r} \quad (5)$$

$$R_{\text{total}} = R_{\text{pore}} + R_{\text{access}} \quad (6)$$

これらの式から, ポア (チャンネル) のコンダクタンス値は式 (7) から算出される.

$$G = \frac{1}{R_{\text{total}}} = \frac{\pi r^2}{\rho \left(1 + \frac{\pi r}{2}\right)} \quad (7)$$

ヘリックスモノマーの半径が  $R$  である場合, ポアの半径 ( $r$ ) は式 (8) によって幾何学的に算出される (Figure 6-3).

$$r = R \left[ \frac{1}{\sin\left(\frac{\pi}{N}\right)} - 1 \right] \quad (8)$$

式 (8) において,  $N$  はバンドル構造におけるヘリックスモノマーの数を表す.

式 (8) に基づいて, モデルペプチドのポアサイズ ( $r$ ) とバンドルを構成するヘリックスモノ

マーの数 ( $N$ ) は算出された. このモデルでは, 以下のパラメーターとバルク溶液抵抗率が一般的に使用される.

ヘリックスの半径 ( $R$ ) は  $0.5 \text{ nm}$ , 20 残基のペプチドのヘリックス長は  $3.0 \text{ nm}$ ,  $500 \text{ mM KCl}$  溶液の抵抗率 ( $\rho$ ) は  $25^\circ\text{C}$  のとき  $0.13 \Omega\text{m}$  と見積もられた [8].

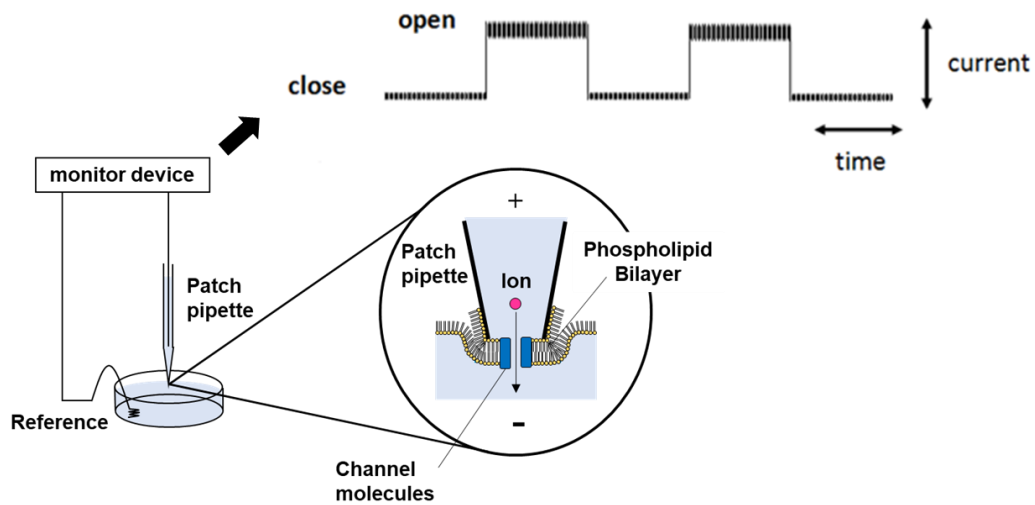


Figure 6-2. 単一チャンネル電流測定装置の模式図.

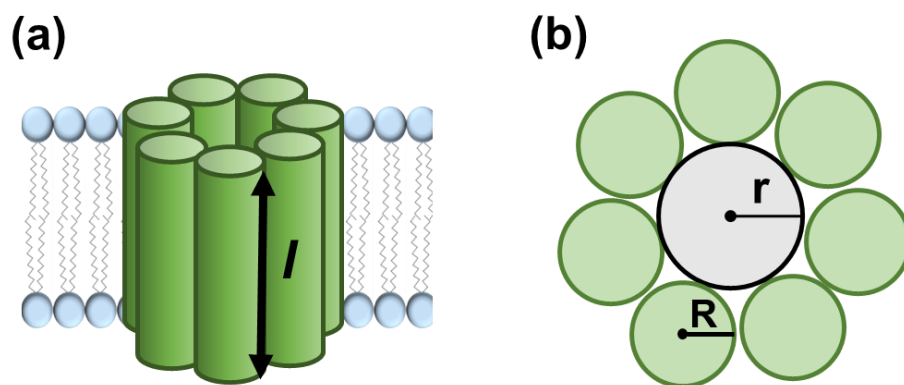


Figure 6-3. (a)ヘリックスバンドルモデルの模式図. (b) バンドル構造の断面図.  $l$ はヘリックス長,  $r$ はポア半径,  $R$ はヘリックスモノマーの半径.

## 5-8. 参考文献

- [1] MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I.; Menco, B. P. M.; Takeshita, K.; Subbarao, N. K.; Hu, L.-r. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim.Biophys. Acta* **1991**, *1061*, 297–303.
- [2] Chen, Y.-H.; Yang, J. T.; Chau, K. H. Determination of the helix and  $\beta$  form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. *Biochemistry* **1974**, *13*, 3350–3359.
- [3] Gans, P. J.; Lyu, P. C.; Manning, M. C.; Woody, R. W.; Kallenbach, N. R. The helix–coil transition in heterogeneous peptides with specific side–chain interactions: Theory and comparison with CD spectral data. *Biopolymers* **1991**, *31*, 1605–1614.
- [4] Evans, B.C.; Nelson, C. E.; Yu, S. S.; Beavers, K. R.; Kim, A. J.; Li, H.; Nelson, H. M.; Giorgio, T. D.; Duvall, C. L. Ex vivo red blood cell hemolysis assay for the evaluation of pH-responsive endosomolytic agents for cytosolic delivery of biomacromolecular drugs. *J. Vis. Exp.* **2013**, *73*, e50166.
- [5] Higashimoto, Y.; Kodama, H.; Jelokhani-Niaraki, M.; Kato, F.; Kondo, M. Structure–function relationship of model Aib–containing peptides as ion transfer intermembrane templates. *J. Biochem.* **1999**, *125*, 705–712.
- [6] Coronado, R.; Latorre, R. Phospholipid bilayers made from monolayers on patch–clamp pipettes. *Biophys. J.* **1983**, *43*, 231–236.
- [7] Sansom, M. S. P. Alamethicin and related peptaibols–model ion channels. *Eur. Biophys. J.* **1993**, *22*, 105–124.
- [8] Robinson, R. A.; Stokes, R. H. *Electrolyte solutions*, 2nd ed.; Butterworths: Lo

## 第6章 結論

人工イオンチャネル分子は様々な用途に応用できるため、近年注目されている。安定なイオンチャネル構造を形成するようなペプチド骨格は、イオン選択性やポアサイズの制御などの機能性をもたせた人工イオンチャネル分子を創製する上で基盤となる。そのため、イオンチャネルペプチドのチャネル構造を安定化するような因子やチャネル形成を促進するような因子の探索は、機能性人工イオンチャネルペプチドを開発するにあたって最も根本的で重要な部分であるといえる。ヘリックスバンドルによるチャネル形成の観点から、水溶液中または脂質二分子膜中でのヘリックス-ヘリックス相互作用は安定なチャネル構造の形成に強く関与していることが推測される。また、膜へのペプチドの挿入はチャネル構造の形成において重要な過程であるため、ペプチド-脂質相互作用もチャネル形成を促進する要素であると考えられる。本研究では、水溶液中でのヘリックス間の疎水性相互作用による二本鎖コイルドコイル構造の安定化がチャネル形成能に与える影響を研究した。また、ある種の生体のイオンチャネルタンパク質やウイルス由来の viroporin のチャネル機能において Trp 残基が必須であることに着目して、両親媒性 $\alpha$ -ヘリックスペプチドのチャネル形成に対する Trp 残基の寄与を調べた。

本研究では、水溶液中での疎水性相互作用による二本鎖コイルドコイル構造の安定化とチャネル形成能の相関を調べるために、Aib 含有チャネル形成ペプチドである BKBA20 の Ala を Ile に置換した疎水性モデルペプチド BKBI20 をデザイン、合成した。また、ヘリックス-ヘリックス相互作用、ペプチド-脂質相互作用、チャネル構造の安定化における Trp 残基の寄与を調べるために、BKBA20 を母骨格として Trp 残基をヘリックスの異なる位置に導入したペプチドと BKBI20 の両末端に Trp を導入したペプチドをデザイン、合成した。CD 測定から、BKBA20 の水性環境下でのヘリックス-ヘリックス会合の界面はヘリックスの疎水面で

あることが示された。ヘリックス会合面である疎水面への Trp の導入は BKBA20 の Ala と Aib によるヘリックス間の密接なパッキングを妨げることが示されたが、Trp-脂質相互作用を介したペプチドの膜挿入の促進によりチャンネル形成能が向上した。両末端に Trp を導入したペプチド[W4W16]BKBA20 では、水溶液中におけるヘリックス-ヘリックス会合に両末端の Trp 残基による $\pi$ - $\pi$ 相互作用が寄与していることが示唆された。このペプチドは BKBA20 よりも 100 倍低い濃度で同程度のチャンネル活性を示したことから、Trp-脂質相互作用に加え、水溶液中での Trp-Trp 相互作用を介したヘリックス-ヘリックス相互作用の増強がチャンネル形成に重要であることが示唆された。一方で、BKBI20 は水溶液中で Ile 側鎖の疎水性パッキングによる高い会合能を示したが、チャンネルは形成しなかった。従って、水溶液中で形成されるヘリックス会合体はチャンネル形成過程における中間体として作用するが、疎水面での強固なヘリックス-ヘリックス相互作用は膜挿入及び親水面が内側を向くようなポア構造の形成に不利であり、疎水面での会合と解離のバランスがチャンネル形成において重要であることが示唆された。

リポソーム存在下での CD 測定と溶血活性測定から、[W10]BKBA20 は脂質膜と強く相互作用することが示された。BKBA20 は脂質表面と親水面を介して相互作用し、親水面は Trp-脂質相互作用においてより効果的な部位であると考えられる。[W4W16]BKBA20 において、両末端の Trp 残基による膜へのアンカリングは膜挿入と膜貫通型の配向に有利に働くことが示唆された。[W10]BKBA20 と[W4W16]BKBA20 は低いペプチド濃度で推定されるチャンネルを形成したことから、Trp-脂質相互作用もまたチャンネル形成において重要な因子であることが示された。

BKBA20 によって形成されるヘリックスバンドル構造は、特定部位への Trp の導入によるカチオン- $\pi$ 相互作用を介して安定化された。Trp を導入した BKBA20 のチャンネル構造は塩基性残基と芳香族残基に富む viroporin と類似しているため、viroporin のモデルペプチドとし

て適しており, viroporin のチャンネル形成機構の研究に利用することができる. 本研究で得られたカチオン- $\pi$ 相互作用によるチャンネル構造の安定化モデルは viroporin における Trp 残基の重要性を支持する結果である. また, viroporin は様々なウイルスのライフサイクルにおいて必須のタンパク質であることから, 抗ウイルス薬の有望なターゲットである. 今回デザインしたペプチドは viroporin モデルペプチドとして将来的に抗ウイルス薬の開発やスクリーニングアッセイに応用できる可能性がある.

さらに, ヘリックスバンドル構造におけるヘリックス-ヘリックス相互作用界面である 4 位, 9 位, 11 位, 16 位への Trp の導入は, コンダクタンス値 (ポアの径) を増加させた. Trp の導入によるチャンネル構造の安定化効果とコンダクタンス値の変化に関するこれらの知見は, イオンチャンネルペプチドの特定部位への Trp 残基の導入によってポアサイズ, 寿命, チャンネル形成の有効濃度を調節できることを示唆している. 従って, 抗菌剤, ドラッグデリバリーシステム, 抗癌剤への応用に向けた機能性イオンチャンネルペプチドの設計において, Trp 残基が機能調節のためのビルディングブロックになることが期待される.

## 略号

Aib (B): 2-aminoisobutyric acid

Boc: tert-butoxy carbonyl

BNIP: Bcl-2/19 kDa interacting protein

CD: circular dichroism

CHCA:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy cinnamic acid

DIEA: N,N-diisopropyl-ethylamine

DMF: N,N-dimethylformamide

DPhPC: diphytanoylphosphatidylcholine

DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine

EphA2: erythropoietin-producing hepatocellular receptor A1

EpsM: cholera toxin secretion protein

ErbB: epidermal growth factor receptor tyrosine kinase

EtOH: ethanol

Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl

HBTU: 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate

HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid

HOBt: 1-hydroxybenzotriazole

LUVs: large unilamellar vesicles

MALDI-TOF MS: matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry

MeOH: methanol

NMP: 1-Methyl-2-pyrrolidinone

PB: phosphate buffer



PITC: phenyl isocyanate

Rink amide resin: 4-(2',4'-dimethoxyphenyl-Fmoc-aminomethyl) phenoxy resin

RP-HPLC: reversed phase high-performance liquid chromatography

SUVs: small unilamellar vesicles

TCR: T-cell surface glycoprotein

TEA: Triethanolamine

TFA: 2,2,2-trifluoro acetic acid

TIS: triisopropylsilane

TM: transmembrane

$\alpha$ IIb $\beta$ III: integrin  $\alpha$ IIb  $\beta$ III

## 謝辞

本研究を行うにあたり、多くの方にご協力いただきました。兒玉浩明先生には大学入学時からチューターとしてお世話になり、研究室に配属されてからも実験指導、発表練習等の研究に関する多くのことで大変お世話になりました。博士課程では学長の業務でお忙しい中、研究に対する貴重なアドバイスを頂き、ありがとうございました。また学生生活や進路に関しても温かいお言葉やお心遣いをいただき、誠にありがとうございました。長田聰史先生には博士課程から、指導教員になっていただき、実験指導から発表練習、論文の添削など研究課程全般において丁寧なご指導を賜りました。この場をかりて深くお礼申し上げます。研究生活で様々なご指導、ご助言を頂きました Wilfrid Laurier 大学の Masoud Jelokhani-Niaraki 先生に深く感謝の意を表します。実験を行うにあたり、様々な分析機器の使用法をご教授いただいた総合分析実験センターの方々に深く感謝致します。研究活動を共にし、多くの知識や示唆を頂戴いたしました研究室の先輩方や同期、後輩たちにも感謝の気持ちを申し上げます。学部、修士課程、博士後期課程において、多くのご助言をくださった佐賀大学の諸先生方には、深く感謝を申し上げます。