

平成 28 年度 博士論文

新規界面活性剤 PG-surfactant の合成と機能評価

Synthesis and characterization of novel Peptide
Gemini Surfactant

指導教員 出羽 毅久 教授

工学研究科 博士後期課程 共同ナノメディシン科学専攻

平成 26 年 4 月 入学

小枝 周平

博士論文目次

第1章 序論 1

第2章 二分子膜形成分子としての PG-surfactant の設計 9

2-1 緒言 9

2-2 実験項 12

2-3 結果と考察 27

2-3-1 二分子膜形成能をもつ PG-surfactant の機能評価 27

2-3-1-1 表面張力法による cac 値の測定 27

2-3-1-2 DLS による水溶液中での会合体挙動の評価 29

2-3-1-3 AFM による PG-surfactant の固定基板上での会合挙動観察 32

2-3-1-4 TEM による会合体の観察 35

2-3-1-5 エマルジョン法による選択的なベシクル調製の検討 38

2-3-2 PG-surfactant による二分子膜形成 40

2-3-2-1 光褪色後蛍光回復法 (FRAP) による膜流動性の評価 40

2-3-2-2 PG-surfactant 二分子膜と LH2 の複合化評価 43

2-3-2-3 ショ糖密度勾配法による複合化溶液の評価 44

2-3-2-4 DLS による複合体の粒径分布測定 45

2-3-2-5 AFM による基板上での複合体の観察 46

2-3-3 クロスリンク PG-surfactant による二分子膜形成 47

2-3-3-1 Ellman 試薬による SH 基の定量 48

2-3-3-2 蛍光プローブ法による cac 値の測定 49

2-3-3-3 DLS による水溶液中での会合体挙動の評価 52

2-3-3-4 TEM による会合体の観察 53

2-3-3-5 AFM による基板上での会合挙動観察 54

2-3-3-6 DTT による還元雰囲気下の影響 56

2-3-3-7 光褪色後蛍光回復法 (FRAP)による膜流動性の評価 57

2-3-4 cr-PG-surfactant 二分子膜中への膜蛋白質の固定化 60

2-3-4-1 cr-PG-surfactant 二分子膜と LH2 の複合化評価 60

2-3-4-2 ショ糖密度勾配法による複合化溶液の評価 61

2-3-4-3 DLS による複合体の粒径分布測定 62

2-3-4-4 TEM による複合体の形態観察 63

- 2-3-4-5 AFM による基板上での複合体の観察 64
- 2-4 まとめ 66

第3章 新規膜蛋白質可溶化試薬としての PG-surfactant の設計 72

- 3-1 緒言 72
- 3-2 実験項 76
- 3-3 結果と考察 85
 - 3-3-1 新規膜蛋白質可溶化試薬の開発 85
 - 3-3-1-1 緩衝溶液中での PG-surfactant の会合挙動に関する考察 85
 - 3-3-1-2 表面張力法による PG-surfactant の cac 値測定 87
 - 3-3-1-3 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定 88
 - 3-3-1-4 DLS 測定による水溶液中での会合挙動の評価 90
 - 3-3-2 PG-surfactant を用いた PSI,PSII の可溶化 93
 - 3-3-2-1 シアノバクテリア由来の光合成膜蛋白質 PSI, PSII 93
 - 3-3-2-2 吸収スペクトルによる PSI, PSII への構造的影響 94
 - 3-3-2-3 77K における蛍光スペクトルによる PSI への構造的影響 95
 - 3-3-2-4 PG-surfactant で可溶化された PSI, PSII の DLS 測定による可溶化状態の評価 97
 - 3-3-2-6 過渡吸収測定による PSI の P700⁺の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI への構造的影響の評価 99
 - 3-3-2-7 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI, PSII の光誘起電子移動活性評価 104
 - 3-3-2-7-1 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価 104
 - 3-3-2-7-2 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSII の光誘起電子移動活性の評価 106
 - 3-3-3 機能性分子を修飾した PG-surfactant の合成 108
 - 3-3-3-1 PSI からの電子をトラップ可能な PG-surfactant の設計 108
 - 3-3-3-2 蛍光プローブ法による MV-DKDKC₁₂K の cac 測定 111
 - 3-3-3-3 DLS 測定による水溶液中での会合体挙動の評価 112
 - 3-3-4 MV-DKDKC₁₂K を用いた PSI の可溶化及び機能評価 113
 - 3-3-4-1 吸収スペクトルによる PSI, PSII への構造的影響 113

- 3-3-4-2 MV-DKDKC₁₂K で可溶化された PSI, PSII の DLS 測定による可溶化状態の評価 114
- 3-3-4-3 酸素電極による MV-DKDKC₁₂K で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の比較 116
- 3-3-4-5 ITO 基板の上に吸着させた MV-PGs で可溶化された PSI の光電流測定の評価 118
- 3-3-4-6 ITO 基板上へ吸着された PSI の光電流測定 118
- 3-4 まとめ 122

第4章 膜蛋白質抽出試薬としての PG-surfactant の設計 126

- 4-1 緒言 126
- 4-2 実験項 130
- 4-3 結果と考察 135
 - 4-3-1 β -ターンペプチド配列を導入した PG-surfactant 135
 - 4-3-1-1 緩衝溶液中での PG-surfactant の会合挙動に関する考察 135
 - 4-3-1-2 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定 136
 - 4-3-1-3 DLS 測定による水溶液中での会合体挙動の評価 137
 - 4-3-2 β ターン PG-surfactant を用いた PSI, PSII の可溶化 138
 - 4-3-2-1 吸収スペクトルによる PSI, PSII への構造的影響 138
 - 4-3-2-2 77K における蛍光スペクトルによる PSI への構造的影響 140
 - 4-3-2-3 過渡吸収測定による PSI の P700⁺ の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI の構造的影響の評価 143
 - 4-3-2-4 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI, PSII の光誘起電子移動活性評価 143
 - 4-3-2-4-1 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性評価 143
 - 4-3-2-4-2 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSII の光誘起電子移動活性評価 144
 - 4-3-3 チラコイド膜からの PSI, PSII の抽出 144
 - 4-3-3-1 チラコイド膜 144
 - 4-3-3-2 吸収スペクトル測定によるチラコイド膜から PG-surfactant で抽出された成分の評価 145

4-3-3-3 Native PAGE によるチラコイド膜から PG-surfactant で抽出された成分の評価 147

4-4 まとめ 149

第5章 分子量の大きな膜蛋白質可溶化試薬の開発 154

5-1 緒言 154

5-2 実験項 156

5-3 結果と考察 159

5-3-1 多量化 PG-surfactant の設計と機能評価 159

5-3-1-1 蛍光プローブ法による cac 値測定 159

5-3-1-2 DLS による会合水溶液中での会合挙動の評価 161

5-3-2 多量化 PG-surfactant を用いた PSI, PSII の可溶化 162

5-3-2-1 界面活性剤置換法による PSI, PSII の可溶化 162

5-3-2-2 吸収スペクトルによる PSI, PSII への構造的影響 163

5-3-2-3 77K における蛍光スペクトルによる PSI への構造的影響 164

5-3-2-4 過渡吸収測定による PSI の P700⁺ の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI の構造的影響の評価 165

5-3-2-5 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI, PSII の光誘起電子移動活性評価 166

5-3-3 多量化 PG-surfactant の低濃度領域での膜蛋白質可溶化能力の評価 168

5-3-3-1 低濃度の多量化 PG-surfactant で可溶化した際の PSI, PSII の水和直径の DLS 測定による評価 169

5-3-3-2 低濃度で可溶化を行った際の TEM による形態観察 172

5-4 まとめ 175

第6章 高分子ゲル中での膜蛋白質安定性を向上させる界面活性剤の開発 179

6-1 緒言 179

6-2 実験項 182

6-3 結果と考察 187

6-3-1 ポリエチレングリコールを修飾した PG-surfactant の合成 187

6-3-1-1 蛍光プローブ法による cac 値測定 189

6-3-1-2 DLS による水溶液中での会合挙動の評価 192

- 6-3-2 PEG-PG-surfactant を用いた PSI 可溶化 193
 - 6-3-2-1 吸収スペクトルを用いた、PEG 修飾 PG-surfactant に可溶化された PSI の変性度合いの評価 193
 - 6-3-2-2 77K における蛍光スペクトル測定を利用した、PEG 修飾 PG-surfactant に可溶化された PSI の変性度合いの評価 194
 - 6-3-2-3 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700* の寿命評価を利用した PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化された PSI の変性度合いの評価 196
 - 6-3-2-4 酸素電極を用いた、PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性評価 197
- 6-3-3 ポリアクリルアミドゲル内部に固定化した PSI の機能評価 199
 - 6-3-3-1 PSI を内部に固定化したポリアクリルアミドゲルの作製 199
 - 6-3-3-2 ゲル内部に固定化した各種蛍光色素の漏えい挙動の評価 200
 - 6-3-3-3 ポリアクリルアミドゲルへの PSI の導入 203
 - 6-3-3-4 吸収スペクトル測定を用いた、ゲルへ封入することの PSI への構造的影響 204
 - 6-3-3-5 77K における蛍光スペクトル測定を用いた、ゲル内部に固定化した PSI の変性度合いの評価 205
 - 6-3-3-6 ゲルへ内包された PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化された PSI の、酸素電極による光誘起電子移動活性の比較 207
- 6-4 まとめ 209

第 7 章 反応性官能基を修飾した PG-surfactant を用いた新規膜蛋白質ゲル化手法の開発 214

- 7-1 緒言 214
- 7-2 実験項 216
- 7-3 結果と考察 220
 - 7-3-1 反応性官能基としてアルキニル基を修飾した PG-surfactant 220
 - 7-3-1-1 蛍光プローブ法による cac 値の算出 220
 - 7-3-1-2 DLS による水溶液中での会合挙動 222
 - 7-3-2 **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を用いた PSI の可溶化 222
 - 7-3-2-1 吸収スペクトルを用いた、**Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K**

で可溶化することによる PSI への構造的影響の評価	223
7-3-2-2 77K における蛍光スペクトルによる Alk-DKDKC₁₂K 、 Bis-Alk-DKDKC₁₂K で可溶化された PSI の変性度合いの評価	224
7-3-2-3 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700 ⁺ の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI への構造的影響の評価	225
7-3-2-4 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI, PSII の光誘起電子移動活性評価	226
7-3-3 Azide-PEG との Huisgen 環化付加反応によるゲル化	227
7-3-3-1 Huisgen 環化付加反応	227
7-3-3-2 IR 測定を用いた、ゲル作製に対する各試薬濃度の最適化	228
7-3-3-3 Huisgen 環化付加反応の PSI への影響	230
7-3-3-3-1 吸収スペクトル測定を用いた、ゲル中での PSI の変性割合の評価	231
7-3-3-3-2 77 K における蛍光スペクトル測定を用いた PSI の変性度合いの評価	232
7-3-3-3-3 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700 ⁺ の寿命評価を利用した、PSI への Huisgen 環化反応の構造的影響の評価	233
7-3-4 3D プリンターを用いた立体的なゲルの作成	234
7-3-4-1 3D プリンターを用いた立体的なゲルの作成条件の最適化	234
7-3-4-2 3D プリンターを用いた立体格子ゲルの作成	235
7-3-4-3 立体格子ゲル中に内包された PSI の光誘起電子移動活性の評価	236
7-4 まとめ	238

第 8 章 結言 243

論文リスト

謝辞

第1章 序論

界面活性剤研究の歴史は長く、食品・生活・工業など多岐に渡る分野でその検討がなされている。また近代では、ナノテクノロジー分野や生体模倣工学の分野においても、人工的に設計された界面活性剤 (両親媒性分子) を用いたボトムアップ的手法の研究が進んでいる。そもそも生体内には様々な両親媒性分子が存在しており、様々な界面で物質や情報などの交換に関与し生命活動を担っている。例えば細胞膜の主要な構成物であるリン脂質は代表的な両親媒性分子であり、このリン脂質は細胞膜中で図1のように親水基を外側に向け、疎水鎖同士で寄り添うことで二分子膜構造を形成していることが知られているが、1977年、國武先生らはリン脂質分子を単純化して模倣した人工両親媒性分子(図2)がリン脂質のように二分子膜を形成することを明らかにした¹⁾。以降様々な分子骨格の合成両親媒性化合物が検討され、それらの会合形態も多種存在することが明らかとなった。例えば山田先生らは図3の分子がナノチューブ状の会合となることを示している²⁾。

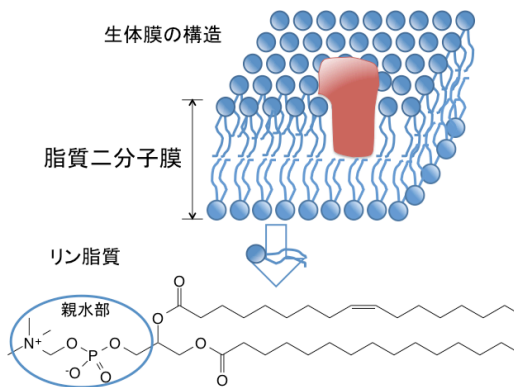


図1 生体膜モデル図とリン脂質の構造

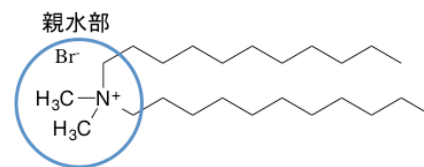


図2 リン脂質分子を単純化した人工両親媒性分子

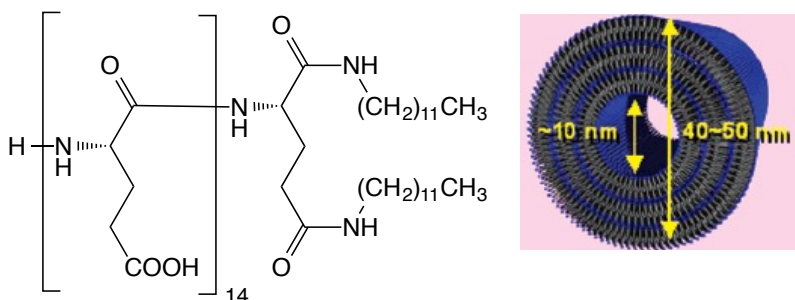


図3 リン脂質を模した二本鎖型人工両親媒性分子 (左) とこの分子が形成するナノチューブ構造のモデル図 (右)

また植物の葉緑体のチラコイド膜や光合成細菌の細胞膜を形成する主成分である糖脂質もまた代表的な両親媒性分子である。これらを模倣した、最も簡単な糖系界面活性剤としてはオクチルグルコシド (図 4) が挙げられる³⁾。オクチルグルコシドやその類縁体は膜蛋白質の可溶化や結晶化に用いられている。また、膜蛋白質を糖脂質の二分子膜中へ再構成する検討もなされており、フィタニル基をもつ合成糖脂質 $\text{Mal}_3(\text{Phyt})_2$ (図 5) はリン脂質に比べ二分子膜の安定性が高く、バリアー能が高いことが明らかとなったが⁴⁾、この膜中に光化学系 II 蛋白質を再構成するとリン脂質膜に比べ 6 倍高い酸素発生活性を示すことが分かった⁵⁾。

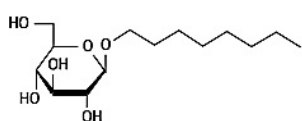


図 4 オクチルグルコシドの構造

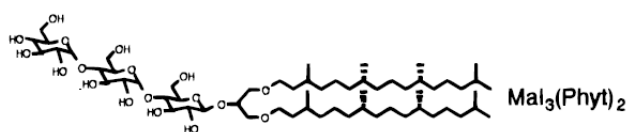


図 5 $\text{Mal}_3(\text{Phyt})_2$ の構造

一方、生体由来分子のペプチドを用いた両親媒性分子の開発も検討されている。ペプチドはアミノ酸が縮合し繋がった分子であり、特にポリペプチドにおいてはアミド結合同士の水素結合により α -ヘリックスや β -シートなどの二次構造を形成することが知られている。S. I. Stupp らは、このような二次構造を形成しやすいアミノ酸残基であるグルタミン酸やフェニルアラニンを含んだペプチド含有界面活性剤を設計し、それらがヘリカルリボン状の会合を形成することを明らかにした (図 6)⁶⁾。

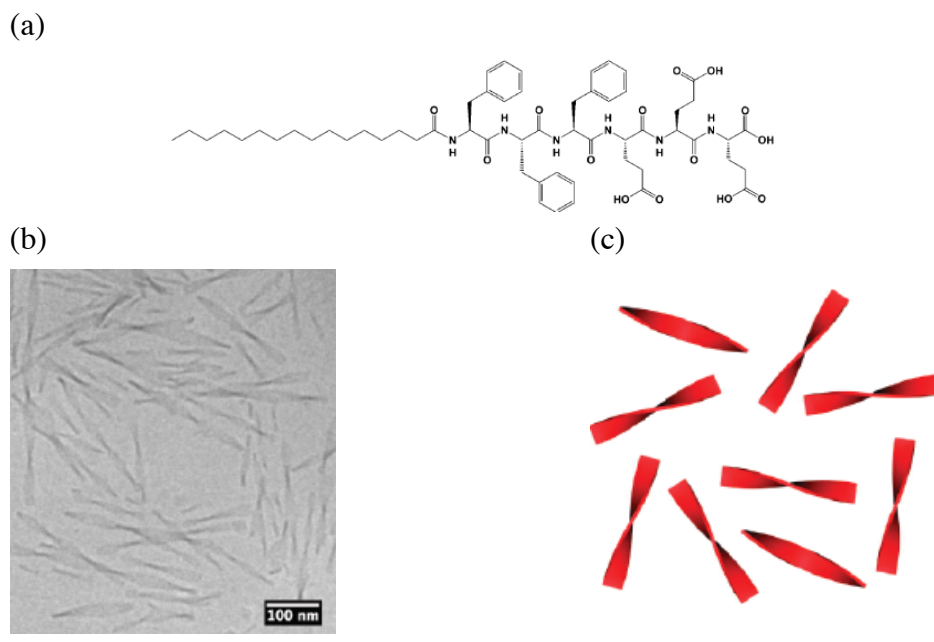


図 6 (a) 設計されたペプチド含有界面活性剤の構造 (b) (a)の分子の溶液中での会合状態を観察した Cryo-TEM 画像 (c) (b)で見られた会合体のモデル図

また S. Santoso、S. Zhang らは、図 7 のようなペプチド骨格のみからなる両親媒性分子が自己組織的にナノチューブや棒状の二分子膜を形成することを示した⁷⁾。

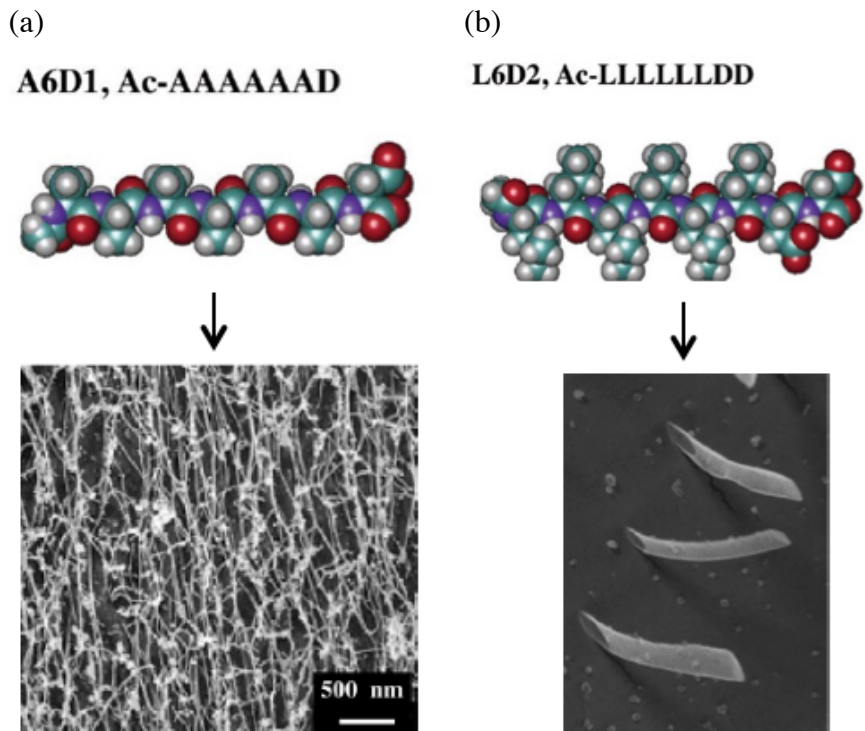


図 7 (a) 設計された両親媒性ペプチドの分子モデル (b) (a)のそれぞれの分子の溶液中での会合状態を観察した Cryo-TEM 画像

ところで、ペプチドをこのような自己組織化材料に用いる利点は、単にそれらが特異な組織化能を持つためだけではなく、水素結合や構造的な相補性を駆使して、細胞表面や蛋白質、無機材料などと相互作用する能力を利用できる点がある。S. Zhang らはこの点に着目し、この両親媒性ペプチドを用いて膜蛋白質(グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、光化学系 I など) を可溶化し評価を行った。その結果、これらの熱安定性を上昇させることに成功した⁸⁻¹³⁾。

現在再構成系に広く用いられているリン脂質については、膜蛋白質の機能制御や集合形態の制御までは至っておらず、また官能基修飾をするにも単離精製が難点となっており、精製の簡便さと機能性を両立した二分子膜形成分子が求められている。S. Zhang.らの研究は「ペプチド」が膜蛋白質の機能制御を可能にするカギとなりうることを示した意味から、興味深いものであった。

一方で、膜蛋白質は天然に存在する蛋白質の約 30%を占め、細胞膜を介した情報伝達・物質輸送・エネルギー変換など様々な生体膜機能を担っている。近年、これらの膜蛋白質機能を利用した半人工分子素子開発に興味もたれており、研究が行われている。そのために必要な要件として、①膜蛋白質機能を維持したまま生体膜から単離精製すること、②膜蛋白質機能を維持したまま某かの担持担体に固定化すること、③固定化担体上での膜蛋白質の長期安定性を上げること、などが挙げられる。しかしながら、依然としてこれらを満たす報告例は限られており、特に後半2点に関しては様々な方法論の検討が模索されている段階にある。仮に様々な膜蛋白質に適応可能な技術が確立できれば、現在創薬ターゲットとして大きな注目を集めている G 蛋白質共役受容体(G-Protein Coupled Receptor, GPCR)に対して、安定にドラッグスクリーニングが可能な新たなシステム構築に繋がることも期待される。

膜蛋白質機能を利用した半人工分子素子開発において、植物などの光合成の明反応(光照射により起こる反応)において中心的な役割を果たしているのは、光化学系 I (PSI)、光化学系 II (PSII) といわれる超分子膜蛋白質複合体である。これはいずれも光エネルギー利用の量子収率がほぼ 100%¹⁴⁾と優れていることにより、人工光合成システム構築への応用が検討されている。金ナノ粒子¹⁵⁾やメソポーラスシリカ¹⁶⁾などの無機材料に固定化することで太陽エネルギーを用いて水から酸素ガスを生産するシステムも行われている。このような固体担体中での人工光合成システムを構築するためには、膜蛋白質を安定に固定担体に導

入する技術が必要となる。

これまでに、いくつかのペプチドベースの界面活性剤が、膜蛋白質の可溶化のための界面活性剤として使用するために検討されている¹⁷⁾。McGregorらは二本の長いアルキル鎖をもつ24-merの両親媒性ペプチドからなる界面活性剤が、膜蛋白質の膜貫通ドメイン、および両親媒性ペプチドの疎水性表面間の疎水性相互作用を介して熱的安定性を増加させることを報告している¹⁸⁾。S. Zhangらは両親媒性ペプチドの界面活性剤A6Dを用いた熱安定性の同様の増加を報告している(図7)¹⁹⁾。しかしながら、依然として膜蛋白質可溶化のための報告例は限られている。ペプチドを含む界面活性剤の多くは、ペプチド部位のアミド結合間の水素結合、導入した疎水鎖間での強い疎水性相互作用により、様々な会合種(ファイバー、シート、ラメラ、さらにこれらが凝集することでのゲル形成など)を取りやすいことも、これまでにペプチド配列の機能を活かした界面活性剤の開発が進んで来なかった原因の1つと考えられる。

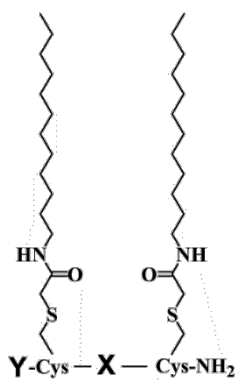


図8 PG-surfactantの構造

表1 評価を行ったペプチドジェミニ界面活性剤(PG-surfactant)の一覧

	PG-surfactant	X部のペプチド配列	Y部のペプチド配列
二分子膜形成	DnC₁₂	-[Asp] _n -	Ac-
	Cr-DnC₁₂	-[Cys-(Asp) _n -Cys]-	Ac-
膜蛋白質可溶化	DKDKC₁₂K	-[Asp-Lys-Asp-Lys]-	Ac-Lys
	DKDKC₁₂D	-[Asp-Lys-Asp-Lys]-	Ac-Asp
膜蛋白質抽出	NPDGC₁₂KK	-[Asn-Pro-Asp-Gly]-	Ac-Lys-Lys-
	DPDGC₁₂KK	-[Asp-Pro-Asp-Gly]-	Ac-Lys-Lys-

そこで私は、親水性コアペプチドから構成される新規ペプチドジェミニ界面

活性剤 (PG-surfactant) の設計に取り組んだ。親水性コアペプチドは dodecylamidomethyl 鎖のコネクタとしても、極性頭部基としても作用するので、これらの界面活性剤は、コアペプチド配列に由来するユニークな両親媒性を有すると期待された。また、これまでのリポペプチド系両親媒性分子 (ペプチド + アルキル鎖の構造を持つ分子) と異なり、様々なペプチド配列を用いた場合においても、比較的ミセル以外の高次会合体を形成しにくい性質が見られた。これは、従来のペプチド配列を含む界面活性剤の開発を抑制してきた問題解決につながるため、ペプチド配列の性質を活かした、様々なペプチド配列を含む新規界面活性剤の創出も可能であった。

そこで本研究では第 2 章で膜蛋白質を内包固定化出来る新規二分子膜形成分子として、親水性のオリゴ-Asp のペプチドコアからなる PG-surfactant を合成し評価を行った。続いて第 3 章では膜蛋白質可溶化試薬として、Lys と Asp の交互配列のペプチドコアからなる PG-surfactant の開発と、これを用いた機能性分子修飾膜蛋白質可溶化試薬の開発と、機能評価を行った。

また、第 4 章では、生体膜からの膜蛋白質の効率のよい抽出が可能な、膜蛋白質抽出試薬の開発を、 β -ターン構造をとることが知られている -[Asn-Pro-Asp-Gly]-配列を PG-surfactant のコア配列に組み込むことにより行った。第 5 章では、次の第 6 章にて検討を行う、PEG 鎖を導入しても膜蛋白質可溶化試薬としての機能を維持できる、高分子量化膜蛋白質可溶化試薬を、-[Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)]-のコア配列を多量化することで設計した。第 6 章では、実際に PEG 鎖を導入した高分子量化膜蛋白質可溶化試薬を設計し、水和ゲル担体中での膜蛋白質の長期安定性への効果を検討した。また、第 7 章では反応性官能基を修飾した PG-surfactant の設計合成を行い、膜蛋白質の機能を保持したまま、膜蛋白質とは直接反応しない(生体直交性)反応を利用することで、膜蛋白質の集合化 (ゲル化) が可能か検討を行った。

参考文献

- 1) T. Kunitake, Y. Okahara, *J. Am. Chem. Soc.*, **99**, 3860-3861 (1977).
- 2) K. Yamada, H. Ihara, T. Ide, T. Fukumoto, C. Hirayama, *Chem. Lett.*, 1713-1716 (1984).
- 3) M. Clarke, *Nature*, **335**, 752-753 (1988).
- 4) H. Minamikawa, M. Hato, *Langmuir*, **13(9)**, 2564-2571 (1997).
- 5) T. Baba, H. Minamikawa, M. Hato, A. Motoki, M. Hirano, D. Zhou, K. Kawasaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265(3)**, 734-738 (1999).
- 6) E. T. Pashuck, S. I. Stupp, *J. Am. Chem. Soc.*, **132(26)**, 8819-8821 (2010).
- 7) S. Vauthey, S. Santoso, H. Gong, N. Watson, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99(8)**, 5355-5360 (2002).
- 8) J. I. Yeh, S. Du, A. Tordajada, J. Paulo, S. Zhang, *Biochemistry*, **44(51)**, 16912-16919 (2005).
- 9) P. Kiley, X. Zhao, M. Vaughn, M. Baldo, B. D. Bruce, S. Zhang, *PLoS Biol.*, **3**, 1181-1186 (2005).
- 10) K. Matsumoto, M. Vaughn, B. D. Bruce, S. Koutsopoulos, S. Zhang, *J. Phys. Chem. B*, **113(1)**, 75-83 (2009).
- 11) X. Zhao, Y. Nagai, P. Revees, P. Kiley, H. G. Khorana, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103(47)**, 17707-17712 (2006).
- 12) X. Wang, K. Corin, C. J. Wienken, M. J-Willemsen, S. Duhr, D. Braun, S. Zhang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **118**, 9049-9054 (2011).
- 13) K. Corin, P. Baaske, D. B. Ravel, J. Song, E. Brown, X. Wang, C. J. Wienken, M. J-Willemsen, S. Duhr, D. Braun, S. Zhang, *PLoS ONE*, **6(11)**, e25067 (2011).
- 14) C. E. Lubner, R. Grimme, D. A. Bryant, J. H. Golbeck, *Biochemistry*, **49**, 404-414 (2010).
- 15) T. Noji, H. Suzuki, T. Gotoh, M. Iwai, M. Ikeuchi, T. Tomo, T. Noguchi *J. Phys. Chem. Lett.*, **2**, 2448-2452 (2011).
- 16) T. Noji, C. Kamidaki, K. Kawakami, J. R. Shen, T. Kajino, Y. Fukushima, T. Sekitoh, S. Itoh, *Langmuir*, **27**, 705-713 (2011).
- 17) X. Zhao, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, **14 (5)**, 340-348 (2009).
- 18) C. L. McGregor, L. Chen, N. C. Pomroy, P. Hwang, S. Go, A. Chakrabarty, G. G. Prive, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 171-176 (2003).

19) S. Koutsopoulos, L. Kaiser, H. M. Eriksson, S. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 1721–1728 (2012).

第2章 二分子膜形成分子としての PG-surfactant の設計

2-1 緒言

膜蛋白質は天然蛋白質の約 1/3 を占め、生体膜上においてシグナルの受容と変換、物質輸送、情報伝達、エネルギー生産といった数多の重要な生命機能を担っている¹⁾⁴⁾。それら膜蛋白質は以前より着目されており機能解明が進んでいるが、さらなる構造解析や、生体膜模倣デバイス等への応用を達成するためには、膜蛋白質の構造変性を起こさずに機能活性を維持したまま人工二分子膜中に固定化する（再構成する）ことが有効である。これまで膜蛋白質の再構成膜作製には、生体内の細胞膜を構成するリン脂質が主に用いられてきた⁵⁾⁸⁾。一方で、膜蛋白質の集合形態の制御のために両親媒性ブロック共重合体や非天然の低分子両親媒性物質などを用いる試みも近年報告されている⁹⁾¹⁰⁾。これら分子の利点としては、リン脂質に比べ官能基修飾などの合成プロセスが容易であることが挙げられる。また、合成ポリマーや無機材料などとの適合性が上がる可能性も考えられる。

これまで二分子膜形成能の獲得を狙った両親媒性分子の設計は多くなされてきた。しかしながら、それら分子の形成する二分子膜中に膜蛋白質を固定化できた事例は限られている。その中で、近年ペプチド配列を分子骨格に含む界面活性剤が注目されつつある¹¹⁾¹⁹⁾。これはペプチド配列を含むことで生分解性を獲得する、あるいはペプチドの持つ自己組織化能に起因してユニークな会合挙動を示しうるからである。またこれまで検討されてきた多くのペプチド含有界面活性剤は、ペプチド配列部同士の相互作用、あるいは主鎖アミド基間の水素結合により、特に非極性溶媒中でゲルを形成するという報告が数多くなされてきた¹⁹⁾。一方でリン脂質のように二分子膜構造（溶液中における球状二分子膜、あるいは基板上における平面二分子膜など）を形成するペプチド含有界面活性剤の報告例は非常に限られている²⁰⁾²²⁾。もし膜構造形成能を獲得することができれば、生体膜を模倣する新たなツールとしての応用に大きく期待できると考えられる。ペプチド配列を多種多様に選択できることで、これまで用いられてきたリン脂質の二分子膜ではできなかった会合形態の制御や生理活性の調節、膜蛋白質との相互作用などが可能となるかもしれない。この膜構造形成能の獲得のため、我々はジェミニ型界面活性剤に着目した。

ジェミニ型界面活性剤とは親水頭部に対して、2つあるいはそれ以上の疎水部を持つ界面活性剤の総称であり、一本鎖型界面活性剤に比べて一般的に会合能が高いという特徴を持つ²³⁾⁻²⁶⁾。さらには、その分子骨格の形状から二分子膜構造を形成しやすいという報告もなされている。このことから、図2-1に示すようなペプチド骨格を含むジェミニ型界面活性剤(以下 PG-surfactant と略す) は高い自己組織化能と膜形成能を有するのではないかと考えた。

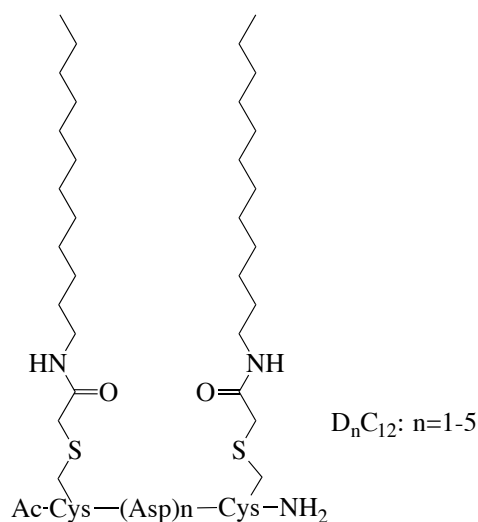


図 2-1 設計した PG-surfactant の分子構造

この新規界面活性剤の基本的な分子骨格としては、親水性アミノ酸であるアスパラギン酸(Asp)を連続させたオリゴ Asp ペプチドをスペーサーとすることで、このスペーサー部位が界面活性剤における親水頭部としての働きをすることを期待した。またこのスペーサーの両末端にシステイン(Cys)を配置、この SH 基に疎水鎖となるアルキルアミン誘導体を接続することで 2 本の疎水鎖を導入する。導入する疎水鎖には、この PG-surfactant がミセルやベシクル等の会合体を形成した際、隣り合った分子同士で水素結合を形成し安定化されることを期待し、アミド結合を有する長鎖アルキル鎖を採用した。

膜形成に対するペプチドスペーサーの Asp 残基数の最適化を検討するため、Asp 数が 1~5 個(n=1~5)で疎水鎖の炭素数 12 の PG-surfactant (**D₁C₁₂**、**D₂C₁₂**、**D₃C₁₂**、**D₄C₁₂**、**D₅C₁₂**) を、また疎水鎖長による影響を調べるため Asp 数が 3 個で炭素鎖数 14, 16 の PG-surfactant (**D₃C₁₄**、**D₃C₁₆**) も設計合成した。また、より安定的な二分子膜が形成可能な分子としてオリゴ Asp ベースであったペプチドスペーサーの配列に 2 つのシステインを導入し [-Cys-(Asp)_n-Cys-] (n=2, 3, 4) とすることで、分子内でジスルフィド架橋を形成すると考えられる構造とした。なお名称は Asp

数が 2, 3, 4 のものを順に **cr-D₂C₁₂**、**cr-D₃C₁₂**、**cr-D₄C₁₂** とし、総称を **cr-PG-surfactant** とする。

まず本章ではこれらの新規化合物であるこれら **PG-Surfactant** の基礎的な物性や会合能を明らかにするため、表面張力法による **PG-Surfactant** の臨界会合濃度 (cac) 値測定、原子間力顕微鏡 (AFM) ・動的光散乱 (DLS) ・透過型電子顕微鏡 (TEM) による固定基板上や溶液中での会合挙動の評価を行った。

その後、これらの **PG-surfactant** を用いてこの二分子膜中への膜蛋白質の固定化を試みた。膜蛋白質には *Rps. Acidophila* 由来の光収穫アンテナ複合体 2 (LH2) を用いた^{27), 28)}。

LH2 はこれまでにリン脂質を用いた再構成膜構築のプロセスや平面二分子膜中での観察例が報告されており、**PG-surfactant** を用いて同様の評価が可能であると考えられたため用いることとした。また実験として、膜の流動性を調べる光褪色後蛍光回復法 (FRAP 測定)、共ミセル法による **PG-surfactant** と LH2 の複合化、ショ糖密度勾配法・DLS による **PG-surfactant/LH2** 複合化溶液の評価、AFM による基板上での **PG-surfactant/LH2** 複合形態の観察を行ったため、以下に述べる。

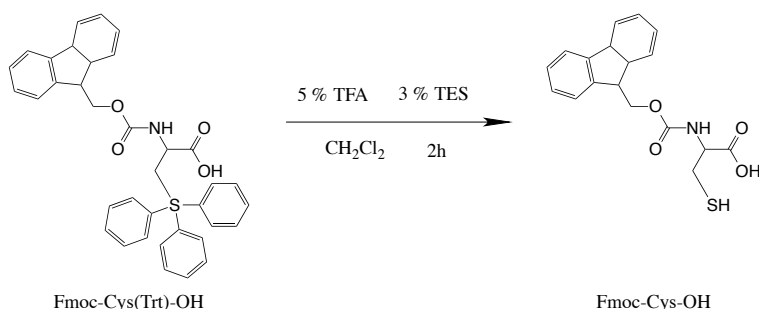
2-2 実験項

2-2-1 PG-surfactant の合成

PG-surfactant の合成方法として、長鎖アルキルアミド基をあらかじめ Fmoc-Cys-OH 側鎖に導入した Fmoc-Cys(C₁₂)-OH 誘導体を合成し、PG-surfactant をすべて固相上で合成する方法をとった。

2-2-1-1 アルキル鎖を修飾したシステイン誘導体を用いた固体担体上での PG-surfactant の合成

2-2-1-1-1 トリチル基で保護されたシステイン(Fmoc-Cys(Trt)-OH)からのトリチル基の脱保護²⁹⁾

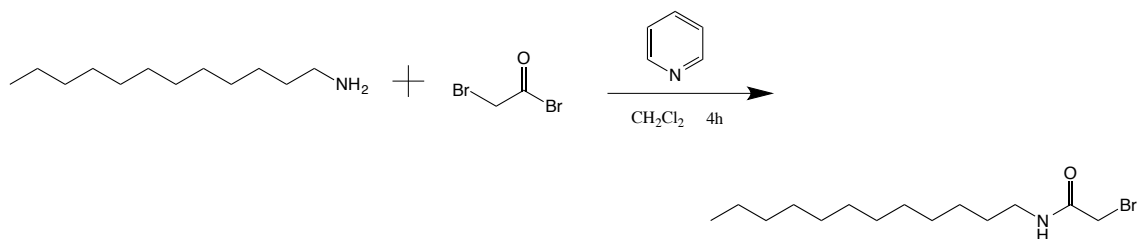


窒素気流下、丸底フラスコにジクロロメタン(250 ml)、Fmoc-Cys(Trt)-OH (10.0g, 17.12mmol)、TFA (12.5ml, 溶媒に対し 5%) を加え、次いでトリエチルシラン (TES)(7.5ml, 溶媒に対し 3%) を加え 2 時間攪拌した。反応後エバポレーターで溶媒留去し、得られた白色固体にヘキサンを加え洗浄することでトリチル基由来の副生成物を除き、吸引濾過をすることで目的物 Fmoc-Cys-OH を得た (5.5 g, 94%)。化合物の同定は、¹H-NMR にて行った。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, r.t.) 3.04 (*t*, 2H, -CH₂-SH), 4.24 (*t*, 1H, Cys-H_a), 4.55 (*d*, 2H, Fluorenyl-CH₂-O-), 4.71 (*brs* 1H, Fluorenyl-H-9), 5.58 (*brs*, 1H, amide-NH), 7.33 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-2, 7), 7.41 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-3, 6), 7.61 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-1, 8), 7.77 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-4, 5).

2-2-1-1-2 ハロゲン化アルキルアミド誘導体

2-2-1-1-2-1 C₁₂-br の合成



窒素気流下、二口フラスコにジクロロメタン (200 mL)、ドデシルアミン (10.0 mg, 46.8 mmol)、ピリジン (5 mL, 61 mmol) を加え、1 時間氷浴で冷却攪拌し、その後ジクロロメタン (50 mL) で希釈したブromoアセチルブロミド (4.5 mL, 51.5 mmol) をゆっくりと滴下した。これを 2 時間氷浴下攪拌した。その後反応液を分液漏斗へ移し、3 M 塩酸で洗浄を行った。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、エバポレーターで溶媒留去することにより組成生物として白色粉末を得た。その後少量のジクロロメタンで溶かしジエチルエーテル：ヘキサン = 1:1 の混合溶媒で再沈殿を行う。その後吸引ろ過により沈殿をろ別し、ろ液をエバポレーターで溶媒留去することにより目的物として白色粉末を得た。これらは薄層クロマトグラフィー (SiO₂、CH₂Cl₂/MeOH = 4/1) により単一成分であることを確認した(10.2 g, 71%)。¹H-NMR と ESI-HRMS にて同定を行った。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, r.t.) 0.88 (*t*, 3H, -CH₃), 1.26 (*brs*, 18H, -CH₂-), 1.56 (*qv*, 2H, -CH₂-CH₂-NH), 3.30 (*pseudo-q*, 2H, -CH₂-NH), 3.90 (*s*, 2H, CH₂-Br), 6.56 (*brs*, 1H, -NH-). HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd. for C₁₄H₂₈BrNO, 305.1354; found, 305.1381.

2-2-1-1-2-2 C₁₄-br の合成

二口フラスコにジクロロメタン (30 ml)、テトラデシルアミン (1 g, 4.69 mmol)、ピリジン (0.75 ml, 9.37 mmol) を加え 1 時間氷浴で冷却し、その後ジクロロメタン (10 ml) で希釈したブromoアセチルブロミド (0.45 ml, 5.15 mmol) をゆっくりと滴下した。これを 2 時間氷浴で冷却しつつ攪拌した。これらは窒素気流下で行った。その後反応液を分液漏斗に移し、1 N 塩酸で洗浄を行った。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、エバポレーターで溶媒留去することにより目的物を白色粉末として得た。(1.2 g、78%)

これらはシリカゲルクロマトグラフィー (SiO₂、CH₂Cl₂/MeOH = 20/1–10/1) によって単一成分であることを確認した。¹H-NMR と ESI-HRMS にて同定を行っ

た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , r.t.) 0.880 (*t*, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.256 (*brs*, 22H, $-\text{CH}_2-$), 1.520 (*qv*, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.275 (*pseudo-q*, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.889 (*s*, 2H, CH_2-Br), 6.489 (*brs*, 1H, $-\text{NH}-$). HRMS (ESI-TOF, $[\text{M}+\text{H}]^+$): calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{BrNO}$, 333.1667; found, 333.1657.

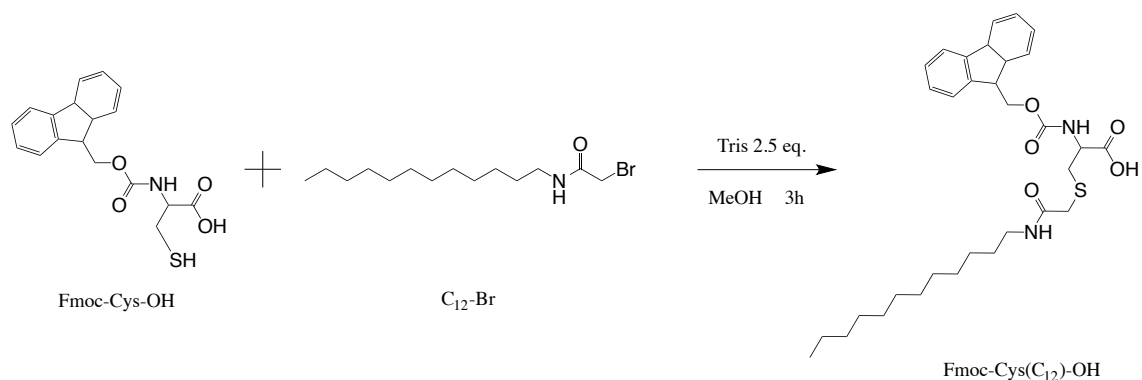
2-2-1-1-2-3 $\text{C}_{16}\text{-br}$ の合成

二口フラスコにジクロロメタン (30 mL)、ヘキサデシルアミン (1.5 g、6.22 mmol)、ピリジン (1.0 ml、12.5 mmol) を加え 1 時間氷浴で冷却し、その後ジクロロメタン (10 ml) で希釈したブロモアセチルブロミド (0.59 ml、6.85 mmol) をゆっくりと滴下した。これを 2 時間氷浴で冷却しつつ攪拌した。これらは窒素気流下で行った。その後反応液を分液漏斗に移し、1 N 塩酸で洗浄を行った。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、エバポレーターで溶媒留去することにより目的物を白色粉末として得た (1.5 g、67%)。これらはシリカゲルクロマトグラフィー (SiO_2 、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 20/1-10/1$) によって単一成分であることを確認した。 $^1\text{H-NMR}$ と HRMS にて同定を行った。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , r.t.) 0.880 (*t*, 3H, $-\text{CH}_3$), 1.255 (*brs*, 26H, $-\text{CH}_2-$), 1.538 (*qv*, 2H, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.275 (*pseudo-q*, 2H, $-\text{CH}_2-\text{NH}$), 3.889 (*s*, 2H, CH_2-Br), 6.494 (*brs*, 1H, $-\text{NH}-$). HRMS (ESI-TOF, $[\text{M}+\text{H}]^+$): calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{BrNO}$, 361.1980; found, 361.1995.

2-2-1-1-3 Fmoc-Cys-OH への $\text{C}_n\text{-br}$ 付加による Fmoc-Cys(C_n)-OH の合成³⁰⁾

2-2-1-1-3-1 Fmoc-Cys(C_{12})-OH の合成



窒素気流下、丸底フラスコにメタノール (250 ml)、Fmoc-Cys-OH (5.0 g、14.6 mmol)、C₁₂-br (7.32 g、21.9 mmol) を加え、Tris (4.42 g、36.5 mmol) を添加後 2 時間室温で攪拌した。反応後エバポレーターで一旦溶媒留去し、得られた黄色固形物をジクロロメタン (100 ml) に溶解して分液漏斗に移し、3M 塩酸と少量のメタノールを加え洗浄した (目的物が、ジクロロメタン+メタノールの混合溶媒によく溶解するため少量のメタノールを添加した)。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、エバポレーターで溶媒留去し、得られた黄色残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (SiO₂、CH₂Cl₂/MeOH = 10/1-8/3) にかけることにより、目的物 Fmoc-Cys(C₁₂)-OH を単一成分で分取した (7.28 g、83%)。化合物の同定は、¹H-NMR、ESI-HRMS にて行った。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, r.t.) 0.88 (*t*, 3H, CH₃-CH₂-), 1.22-1.33 (*s*, 18H, -CH₂-), 1.48-1.59 (*brs*, 2H, -CONH-CH₂-CH₂-), 3.07 (*d*, 2H, -CH₂-S-), 3.29 (*s*, 2H, -S-CH₂-CONH-), 3.37 (*pseudo-q*, 2H, -CONH-CH₂-), 4.39 (*d*, 2H, Fluorenyl-CH₂-O-), 4.59 (*t*, 1H, Fluorenyl-H-9), 6.00 (*brs*, 1H, Cys-NHCO), 6.76 (*brs*, 1H, C₁₂-NHCO), 7.32 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-2, 7), 7.40 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-3, 6), 7.60 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-1, 8), 7.77 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-4, 5): HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd. for C₃₂H₄₄N₂O₅S+Na, 591.2869; found, 591.2872.

2-2-1-1-3-2 Fmoc-Cys(C₁₄)-OH の合成

窒素気流下、丸底フラスコにメタノール (150 ml)、Fmoc-Cys-OH (2.4 g、7.0 mmol)、C₁₄-br (3.5 g、10 mmol) を加え、Tris (2.1 g、17.5 mmol) を添加後 3 時

間室温で攪拌した。反応後エバポレーターで一旦溶媒留去し、得られた黄色固形物をジクロロメタン(100 mL)に溶解して分液漏斗に移し、1N 塩酸と少量のメタノールを加え洗浄した (目的物が、ジクロロメタン+メタノールの混合溶媒によく溶解するため少量のメタノールを添加した)。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、エバポレーターで溶媒留去し、得られた黄色残さをシリカゲルクロマトグラフィー (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 10/1-8/3) にかけることにより、目的物 Fmoc-Cys(C₁₄)-OH を単一成分で分取した (3.83 g, 91.8 %)。化合物の同定は、¹H-NMR にて行った。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, r.t.) 0.88 (*t*, 3H, CH₃-CH₂-), 1.25-1.30 (*s*, 22H, -CH₂-), 1.52-1.54 (*brs*, 2H, -CONH-CH₂-CH₂-), 3.07 (*d*, 2H, -CH₂-S-), 3.31 (*s*, 2H, -S-CH₂-CONH-), 3.37 (*pseudo-q*, 2H, -CONH-CH₂-), 4.38 (*d*, 2H, Fluorenyl-CH₂-O-), 4.58 (*s*, 1H, Fluorenyl-H-9), 6.01(*brs*, 1H, Cys-NHCO), 6.51 (*brs*, 1H, C₁₂-NHCO), 7.32 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-2, 7), 7.41 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-3, 6), 7.60 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-1, 8), 7.76 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-4, 5): HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd. for C₃₄H₄₈N₂O₅S+Na, 619.3182; found, 619.3196

2-2-1-1-3-3 Fmoc-Cys(C₁₆)-OH の合成

窒素気流下、丸底フラスコにメタノール(150 ml)、Fmoc-Cys-OH (1.65 g, 4.80 mmol)、C₁₆-br (2.6 g, 7.2 mmol) を加え、Tris (1.45 g, 12.0 mmol) を添加後 3 時間室温で攪拌した。反応後エバポレーターで一旦溶媒留去し、得られた黄色固形物をジクロロメタン(100 mL)に溶解して分液漏斗に移し、1N 塩酸と少量のメタノールを加え洗浄した (目的物が、ジクロロメタン+メタノールの混合溶媒によく溶解するため少量のメタノールを添加した)。有機相を無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、エバポレーターで溶媒留去し、得られた黄色残さをシリカゲルクロマトグラフィー (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 10/1-8/3) にかけることにより、目的物 Fmoc-Cys(C₁₆)-OH を単一成分で分取した(2.99 g, 99.4 %)。化合物の同定は、¹H-NMR にて行った。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, r.t.) 0.88 (*t*, 3H, CH₃-CH₂-), 1.25-1.30 (*s*, 26H, -CH₂-), 1.51-1.54 (*brs*, 2H, -CONH-CH₂-CH₂-), 3.06 (*d*, 2H, -CH₂-S-), 3.30 (*brs*, 2H, -S-CH₂-CONH-), 3.34 (*pseudo-q*, 2H, -CONH-CH₂-), 4.38 (*d*, 2H, Fluorenyl-CH₂-O-),

4.57 (*s*, 1H, Fluorenyl-H-9), 6.00 (*brs*, 1H, Cys-NHCO), 6.53 (*brs*, 1H, C₁₂-NHCO), 7.32 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-2, 7), 7.41 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-3, 6), 7.60 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-1, 8), 7.76 (*d*, 2H, Fluorenyl-H-4, 5): HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd. for C₃₆H₅₂N₂O₅S+Na, 647.3495; found, 647.3502.

2-2-1-1-4 Fmoc-Cys(C₁₂)-OH を用いた固相担体上での PG-surfactant の合成³¹⁾

樹脂担体として Rink-amide AM resin (200–400 mesh、樹枝上のアミノ基濃度 ~ 0.9 mmol/g、Novabiochem 社)を用い、一般的な Fmoc 固相合成法によりを合成した。*N*-(9-フルオレニルオキシカルボニル) (Fmoc)基により主鎖アミノ基を保護し、側鎖を *t*-ブトキシ基で保護した L-アスパラギン酸 (Fmoc-Asp(OtBu)-OH、Novabiochem 社)、側鎖をトリチル基で保護した L-システイン (Fmoc-Cys(Trt)-OH、Novabiochem 社)、1-2-1-1-2 で合成を行ったアルキル鎖を修飾したシステイン (Fmoc-Cys(C₁₂)-OH) を固相合成用のアミノ酸誘導体として用いた。縮合剤として 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT、渡辺化学)、2-(1*H*-ベンゾトリアゾール-1-ニル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェイト (HBTU、渡辺化学) を用い、縮合の際の塩基として *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (DIEPA、渡辺化学)、反応溶媒として NMP (渡辺化学)、固相合成の途中での Fmoc 基の脱保護を行うのに 30 % ピペリジン (渡辺化学) /NMP 溶液を用いた。また、樹脂の洗浄にはジクロロメタン (関東化学) と DMF (関東化学) を用い、乾燥にはジエチルエーテル (関東化学) を用いた。*N*-末端アミノ基のアセチル化には、10 % 無水酢酸 (和光純薬) /NMP 溶液を用いた。樹脂担体からのペプチドの切り出しは、トリフルオロ酢酸 (TFA、和光純薬) /1,2-エタンジチオール (EDT、和光純薬) /H₂O (95/2.5/2.5) の混合溶液中 (樹脂 100 mg あたり 1 mL) に、樹脂を室温で 2 時間懸濁することにより行った。樹脂から切り出したペプチドを含む反応液は、綿を利用した濾過により樹脂と濾別し、その後ペプチドに対する貧溶媒である冷ジエチルエーテルを入れた遠沈管中に滴下することで目的物を析出させた (樹脂 300 mg あたり再沈殿に用いるジエチルエーテルは 100 mL 以上)。遠心分離機にかけることで白色沈殿として目的物を得た。

2-2-1-1-5 種々の PG-surfactant の固相担体上での合成

それぞれ合成した PG-surfactant は次のような配列をもつ。**D₃C₁₄**、**D₃C₁₆** の合成に際しては、予めアルキル鎖を導入したシステイン誘導体として、Fmoc-Cys(C₁₄)-OH、Fmoc-Cys(C₁₆)-OH をそれぞれ利用して合成を行った。

D₁C₁₂については溶媒に対し不溶であったため同定を含め評価はできなかった。以下に合成した **D₂C₁₂**、**D₃C₁₂**、**D₄C₁₂**、**D₅C₁₂**、**D₃C₁₄**、**D₃C₁₆**、**cr-D₂C₁₂**、**cr-D₃C₁₂**、**cr-D₄C₁₂** の収量と ESI-HRMS による同定結果をまとめる。

D₂C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Asp-Asp-Cys(C₁₂)-NH₂) (85.2 mg, 44.8 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₄₄H₇₈N₇O₁₁S₂, 944.5201; found, 944.5186.

D₃C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Asp-Asp-Asp-Cys(C₁₂)-NH₂) (167 mg, 74.1 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₄₈H₈₃N₈O₁₄S₂, 1059.5470; found, 1059.5474.

D₄C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Asp-Asp-Asp-Asp-Cys(C₁₂)-NH₂) (171 mg, 68.2 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₂H₈₈N₉O₁₇S₂, 1174.5740; found, 1174.5743.

D₅C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Asp-Asp-Asp-Asp-Asp-Cys(C₁₂)-NH₂) (99.2 mg, 36.1 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₆H₉₄N₁₀O₂₀S₂Na, 1313.5985; found, 1313.5980.

D₃C₁₄ (Ac-Cys(C₁₄)-Asp-Asp-Asp-Cys(C₁₄)-NH₂) (123 mg, 51.6 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₆H₉₉N₈O₁₄S₂Na, 1137.5916; found, 1137.5920

D₃C₁₆ (Ac-Cys(C₁₆)-Asp-Asp-Asp-Cys(C₁₆)-NH₂) (174 mg, 69.7 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₆₀H₁₀₇N₈O₁₄S₂Na, 1193.6542; found, 1193.6523

cr-D₂C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Cys-Asp-Asp-Cys-Cys(C₁₂)-NH₂) (82.3 mg, 33.6 %)

HRMS (MALDI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₀H₈₇N₉O₁₃S₄Na, 1172.5198; found, 1172.5211.

cr-D₃C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Cys-Asp-Asp-Asp-Cys-Cys(C₁₂)-NH₂) (116 mg, 43.1 %)

HRMS (MALDI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₄H₉₂N₁₀O₁₆S₄Na, 1287.5468; found, 1287.5165.

cr-D₄C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Cys-Asp-Asp-Asp-Asp-Cys-Cys(C₁₂)-NH₂) (115 mg, 39.3 %)

HRMS (MALDI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₈H₉₇N₁₁O₁₉S₄Na, 1402.5737; found, 1402.5438.

2-2-2 PG-Surfactant の cac 値測定

2-2-2-1 表面張力法による PG-Surfactant の cac 値測定

各 PG-surfactant の cac は、全て 50 mM carbonate buffer (pH 10) を測定溶媒として測定を行った。界面活性剤溶液を満たすシャーレの中に、あらかじめ 10 mL の 5 mM PG-surfactant 溶液 (50 mM carbonate buffer (pH 10)) を満たし、ここへ Wilhelmy プレートをつけた。50 mM carbonate buffer (pH 10) を順次加えることにより、それぞれの PG-surfactant 溶液の測定濃度に薄めながら、表面張力をそれぞれ測定していった。測定装置には Dynamic contact angle tensiometer (DCAT 21, Dataphysics 社) を用い、測定温度は 30 ± 1 °C で行った。測定に用いるガラス器具は表面の汚れを除くため、洗剤で洗浄後、超純水により洗浄した。また Wilhelmy プレートは超純水で洗浄後、アルコールランプで強熱することの有機物を除去後、室温に戻るまでおいて利用した。PG-surfactant の各濃度における表面張力を測定し、対数濃度 対 表面張力をプロットし、変曲点前後の 2 本の線形近似直線の交点から臨界面合濃度 (cac) の値を算出した。

2-2-2-2 蛍光プローブ法による PG-Surfactant の cac 値測定³²⁾

各 PG-surfactant の cac は、蛍光プローブとして 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid (ANS) を用い測定を行った。PG-surfactant ストック溶液として、1 mM の 50 mM carbonate buffer (pH 10) 溶液を調製した。また ANS ストック溶液として、2 mM の 50 mM carbonate buffer (pH 10) 1 ml を調製した。これらを用いて、各 PG-surfactant の所定の濃度に ANS 濃度 10 μ M となるように加え、最終溶液量は 2 mL に統一した。蛍光スペクトル測定には FP-6200 (日本分光製) を使用した。

2-2-3 AFM による PG-Surfactant の固定基板上での会合挙動観察

セロテープを利用し表面から数層を剥離することできれいな表面を露出したマイカ基板上に、ポリ-L-リジン臭素酸塩水溶液 0.1 ml (Mw. 30000–70000, 100mg/ml, SIGMA) をマウントし、室温で 1 時間半置いた後この溶液を取り除き、その後 Milli-Q 水で複数回洗浄することで、マイカ基板上にのっている過剰のポリ-L-リジン塩を除いた。ポリ-L-リジンコートしたマイカ基板を液中 AFM

観察用のホルダーに固定し、300 μL の Milli-Q 水を満たした。ここへ、球状二分子膜化した PG-surfactant 溶液 10 μL (1 mM) またはエマルジョン法により調製した cr-PG-surfactant 溶液 10 μL (1 mM) または PG-surfactant/LH2 複合化溶液 10 μL (PG-surfactant の濃度が約 1 mM、LH2 の OD_{860} は約 1.0) を添加し 30 分間置くことで、マイカ基板上への平面二分子膜化を行った。基板上に残った過剰の PG-surfactant 分子を取り除くために、再度マイカ基板を Milli-Q 水で複数回洗浄した(ただし、作製された平面二分子膜を崩壊させないために、完全に Milli-Q 水は取り除ききらない(表面を乾燥させない))。最後に 300 μL の Milli-Q 水で満たし、カンチレバーにバイオレバー-BL-AC40TS-C2 (resonant frequency of 110 kHz in air、tip radius < 10 nm、spring constant of 0.1 N/m、オリンパス社)、装置に PicoPlus™ (molecular imaging) を用い、Acoustic AC mode (AAC mode) で、室温において測定を行った。

2-2-4 エマルジョン法による二分子膜形成サンプルの調製³³⁾

PG-Surfactant (1 mg) を流動パラフィン (0.5 mL) に超音波 (バス型) 分散後、内水相溶液 (175 mM グルコース、75 mM スクロース、50 mM NaOH) 30 μL を加えた。その後超音波ホモジナイザー (プローブ型) によりこの溶液を乳化させた (DUTY 4、Interval 60、30 秒 \times 3)。1.5 mL 遠心チューブに入れた外水相溶液 (250mM グルコース、50 mM 炭酸バッファー) 0.5 mL の上に先に乳化した溶液を乗せ、遠心分離機にかけることにより球状二分子膜の作製を行った (13000 rpm \times 20 min.、作製された球状二分子膜は二層分離した下層 (水層) に作製される)。その後注射針で遠心チューブの底に穴を開けるなどして、下層 (水相) のみをとりだし、球状二分子膜溶液として評価を行った。

2-2-5 DLS 測定による溶液中での会合体挙動の評価

S-S 結合を分子内に形成しない PG-surfactant (1 mM) は全て 50 mM carbonate buffer (pH 10) に溶解し、1 週間室温でエイジングさせた後に測定を行った。一方、各 cr-PG-surfactant (1 mM) は全てエマルジョン法により調製し測定を行った。粒径測定には、Zetasizer Nano ZS (MALVERN 社製) を用い、光源は He-Ne レーザー ($\lambda=632.8$ nm)、非接触後方散乱光学系 (NIBS)、動的散乱法(DLS)

にて行った。

2-2-6 透過型電子顕微鏡 (TEM) による会合体の形態観察

S-S 結合を分子内に形成しない PG-surfactant (1 mM) は全て 50 mM carbonate buffer (pH 10) に溶解し、1 週間室温でエイジングさせた後に測定を行った。一方、各 cr-PG-surfactant (1 mM) は全てエマルジョン法により調製し測定を行った。また cr-D₂C₁₂/LH2 複合化溶液は 2-1-12 項に記載した方法で調製を行った。このサンプル溶液を、濾紙上においたプラスチック支持膜 (フォルムパール PVF-C15 STEM Cu150P 仕様、応研商事) に 15 μ L \times 2 回 (液滴が潰れるように) のせ、デシケーターで 2 時間減圧乾燥を行った。その後染色のため、この銅グリッドにリンタングステン酸水溶液 (1.7 wt%) を 15 μ L 滴下し、さらに洗浄のため Milli-Q 水を 15 μ L 滴下し、過剰の染色剤を濾紙に吸わせることで除いた後に、さらにデシケーターで 2 時間減圧乾燥を行った。測定は JEM-2500 SE microscope (日本電子製) を用い、加速電圧は 100 keV に設定した。

2-2-7 Ellman 試薬による SH 基の定量³⁴⁾

1 mM cr-PG-surfactant の carbonate buffer 溶液 (50 mM、pH 10) 1 mL に対し 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) を 10 mM となるように加え、1 時間置いた後の溶液の吸収スペクトルを測定することで、cr-PG-surfactant が塩基性溶液中で持つフリーの SH 基の定量を行った。

2-2-8 ジチオトレイトール (DTT) による還元雰囲気下の影響

AFM 測定においては、10 mM DTT の MilliQ 水溶液を予め作製し、マイカ基板上に作製した cr-PG-surfactant の平面二分子膜サンプル上に 200 μ L ほど満たし、そのまま 30 分ほど置くことに S-S 結合の還元を試みた。この際に、cr-PG-surfactant の形成する平面二分子膜構造への影響を AFM 測定により確認した。AFM 測定前には、過剰の DTT 溶液を MilliQ 水でよく洗浄し、最後に MilliQ 水で覆った後 AFM 測定を行った。DLS 測定においては、10 mM DTT の carbonate buffer 溶液 (50 mM、pH 10) を調製し、cr-PG-surfactant 溶液 (1 mM) に、1:1

で混合したサンプルを調製し、この DLS 測定を行うことにより DTT 還元の効果
を評価した。

2-2-9 Rh-DOPE を混合した PG-surfactant の二分子膜サンプル調製

各 PG-surfactant は、エマルジョン法 (2-2-4 項) を用いることで、二分子膜サ
ンプルを調製したが、流動パラフィン中にクロロホルムで溶解させたローダミ
ンをラベルしたジオレオイルホルファチジルエタノールアミン (Rh-DOPE、
Avanti Polar Lipids, Inc.) を PG-surfactant に対し 1 mol% の濃度となるように予め
加えることで、各 PG-surfactant (1mg) の形成する二分子膜への Rh-DOPE の導
入を行った。

2-2-10 ジオレオイルホスファチジルグリセロール(DOPG)の二分子膜溶液調製

DOPG の二分子膜溶液調製は、薄膜水和法を用いた。ガラス試験管 (13 X 100 mm、
Fischer Brand 社) 内で DOPG 1 mg をクロロホルム少量 (~1 mL) に溶かした後、
窒素フローにより溶媒留去して試験管内壁で薄膜とした。これを 6 時間以上真
空乾燥することで完全にクロロホルムを留去し、MilliQ 水 1 ml を加え水和させ、
室温 (DOPG の相転移温度以上) で 30 分おくことで内壁から脂質薄膜を剥が
した。その後ボルテックスによる振とうと液体窒素で凍結させる操作を交互に
4 回程度に繰り返した (凍結融解法)。この溶液をポリカーボネートフィルター
(ポアサイズ、100nm) を固定化したミニエクストルーダー (Avanti Polar Lipids,
Inc.) を、11 回通す (最後に、はじめにフィルターを通す前の溶液を充填した
マイクロシリンジと反対側のマイクロシリンジに溶液をあつめて終わる) こと
によりサイズの 100 nm への調整とユニラメラ化を行った。



図 2-2 Avanti Polar Lipids 社のミニエクストルーダー

2-2-11 蛍光顕微鏡による光褪色後蛍光回復の観察

10 N KOH 水溶液に 3 時間以上浸漬したカバーガラスを MilliQ 水で洗浄した後、窒素フローで乾燥し、片面にポリジメチルシロキサン (PDMS) ゲルで作った枠を吸着させた。このガラス基板にポリ-L-リジン臭素酸塩水溶液 0.1 ml (Mw. 30000–70000, 100 mg/mL, SIGMA) をのせて 1 時間半置いた後、この溶液を除き、過剰の試薬を Milli-Q 水で複数回洗浄することにより取り除いた。その後 PDMS 枠の中に Milli-Q 水を 300 μ L 満たし、調製した各ベシクル溶液 10 μ l (約 1 mg/ml) を添加し、30 分置くことで、ベシクルの基板表面への吸着及び平面二分子膜化を行った。その後過剰の試薬を、Milli-Q 水で複数回洗浄することで除いた（この際に、ガラス基板上面は完全に乾燥しないようにしながら洗浄は行う）。最後に PDMS 枠内を Milli-Q 水で満たし、微分干渉倒立顕微鏡 ECLIPSE TE 2000-U、超高圧水銀ランプ電源装置 C-SHG1 (以上、Nikon)、デジタル CCD カメラ C4742-95-12ER (浜松ホトニクス(株))を用いて、ガラス基板表面の蛍光観察を行った。観察・データ解析には、画像解析ソフトウェア AQUACOSMOS (浜松ホトニクス(株))を使用した。画像データはレーザー照射直後から 5 分後までの 1 分毎と、その後 5 分毎に撮り、最大 30 分後まで測定した。50% 蛍光回復時間 (t_{half}) の算出は、測定データに対して、以下の式で非線形カーブフィッティングを行い求めた。

$$F = A(1 - \exp(-t/t_{\text{half}}))$$

F :消光後 t 秒後の蛍光強度

A :消光前の蛍光強度

t :消光後の時間

t_{half} :消光後 50%の蛍光が回復までの時間

測定データとして、(F, t)を利用し、 A と t_{half} を非線形カーブフィッティングにより算出

2-2-12 PG-surfactant 二分子膜と LH2 の複合化評価

2-2-12-1 ダンシル化 D_3C_{12} の合成

樹脂担体 Rink-amide resin (300 mg)を用い、Fmoc 固相合成法により N 末端をアセチル化していない D_3C_{12} (H-Cys(C_{12})(Asp)₃Cys(C_{12})-NH₂) を樹脂担体上で合成した。ここにダンシルクロリド (291 mg、1.08 mmol) を他のアミノ酸と同様に縮合させてダンシル基を修飾した。樹脂からの目的物の切り出しは、合成後の樹脂を TFA/H₂O (95/5)の混合溶液中に室温で 2 時間懸濁することにより行った。脱樹脂した反応液から綿を用いた濾過により樹脂を濾別後、貧溶媒である冷ジエチルエーテル (45 mL) を入れた遠沈管 2 本の中に滴下することで目的物を析出させ、遠心分離機にかけることで黄色沈殿の目的物、ダンシル化 D_3C_{12} (200mg, 72.7%) を得た。ESI-HRMS にて同定を行った。

ESI-HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₈H₉₃N₉O₁₅S₃Na, 1274.5845; found, 1274.5749.

2-2-12-2 PG-surfactant の形成する二分子膜への LH2 の導入実験

D_3C_{12} (1 mg) または **cr-D₂D₁₂** (1 mg) をダンシル化 D_3C_{12} の 50 mM NaOH 水溶液 (0.5 mg/mL) 100 μ L でよく溶かした後、50 mM Tris HCl buffer (pH 8) 400 μ L を加えて中和し、ここへ 0.5 mL の 1.56 wt% *n*-オクチル- β -D-グルコシド(OG) の Tris HCl buffer 溶液 (20 mM、pH 8) を加えた (最終 PG-surfactant 濃度 1 mg/mL, OG 濃度 0.78wt%)。上記方法により調製した PG-surfactant 溶液を、膜蛋白質(LH2)

溶液 ($O.D_{878} = \text{約 } 200$) を PG-surfactant/LH2 = 500/1 (mol/mol) となるように添加し、 4°C で 1 時間静置した。その後この溶液を 500 mL の 20 mM Tris HCl buffer (pH 8) で最低 24 時間 (途中 3 回溶液を交換) 透析を行ことで、OG を除いた。UV スペクトル測定を行う事により、 D_3C_{12} または $cr-D_2D_{12}$ の形成する二分子膜に導入された LH2 の変成度合いの評価を行った。

2-2-12-3 ショ糖密度勾配法による PG-surfactant 二分子膜/LH2 複合体の評価

前項の透析により OG を除去し調製した PG-surfactant/LH2 複合化溶液 1 mL に 60 wt%スクロース水溶液 1 mL (20 mM Tris-HCl (pH 8)) を静かに加えた (最終スクロース濃度 30 wt%)。遠心チューブに、40 wt%スクロース水溶液 1 ml を入れ、その上にスクロース濃度 30wt%の D_3C_{12} /LH2 複合化溶液あるいは、 $cr-D_2D_{12}$ /LH2 複合化溶液 2 mL をのせた。さらに 26 wt%スクロース水溶液 2 ml、23 wt%スクロース水溶液 2 ml、20 wt%スクロース水溶液 2 ml、10 wt%スクロース水溶液 1 ml と順番にのせていった (図 2-3)。これを超遠心分離装置 (HITACHI himac CP 70MX, P70AT2 ローター) で 46500 rpm、3 時間以上遠心分離を行った。その後上面より 1 ml ずつ分取し、それぞれ吸収スペクトルを測定した。

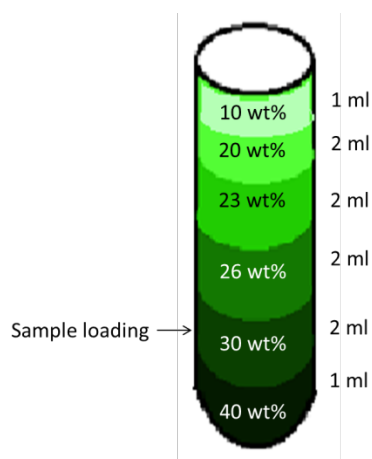


図 2-3 遠心チューブに調製したサンプルモデル図 (記載濃度はスクロース濃度)

また比較として、LH2 が複合化されていない D_3C_{12} あるいは、 $cr-D_2D_{12}$ の二分子膜サンプル、OG に可溶化された LH2 のバッファー溶液も同様に、ショ糖密度勾配法により移動度の分析を行った。具体的には、5 mol% ダンシル化 D_3C_{12}

を加えた D_3C_{12} (1 mg) あるいは、 $cr-D_2D_{12}$ (1 mg) をエマルジョン法 (2-2-4 項) により二分子膜溶液としたサンプル 1 mL と、0.78 wt% OG により溶解した LH2 のサンプル (O.D. ~ 1.0) 1 mL を用意し、それぞれに、60 wt% スクロース水溶液を 1 mL (20 mM Tris-HCl (pH 8)) ずつ静かに加えた (最終スクロース濃度 30 wt%)。これを 40 wt% から 10 wt% までスクロースの濃度勾配を作製した遠心チューブに入れて、同様に超遠心による分析を行った。

2-3 結果と考察

2-3-1 二分子膜形成能をもつ PG-surfactant の機能評価

2-3-1-1 表面張力法による cac 値の測定

臨界凝集濃度 cac（あるいは臨界ミセル濃度 cmc）は、界面活性剤のキャラクタリゼーションにおいて重要である。臨界ミセル濃度の算出法には、表面張力法、伝導度法、ANS を用いた蛍光測定などの方法が知られているが、ここでは表面張力法を用いて評価を行った。電気伝導度法では、バッファー成分のイオン濃度に大きく影響を受け満足な結果が得られなかった。表面張力法の概略は、図 2-4 に示した。

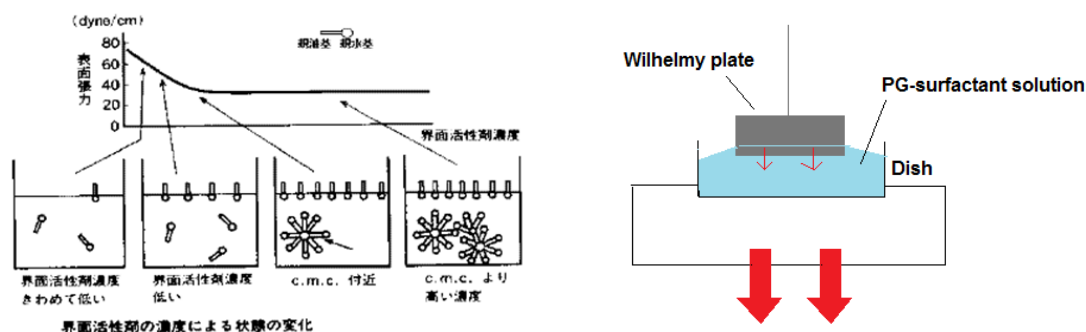


図 2-4 表面張力法の概略

以下に表面張力測定の測定結果を示す。

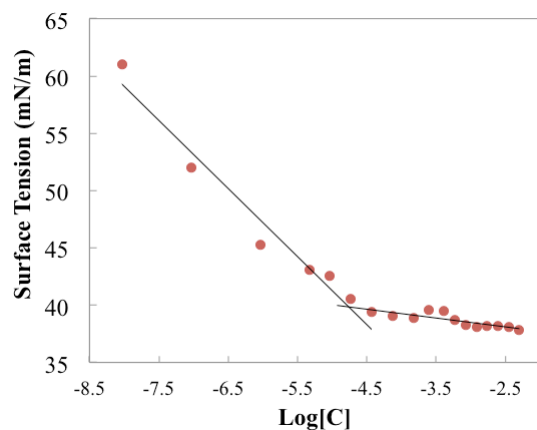


図 2-5 D_2C_{12} の対数濃度 対 表面張力のプロット

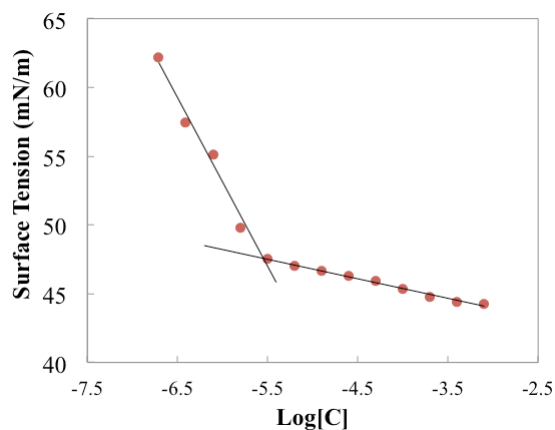


図 2-6 D_3C_{12} の対数濃度 対 表面張力のプロット

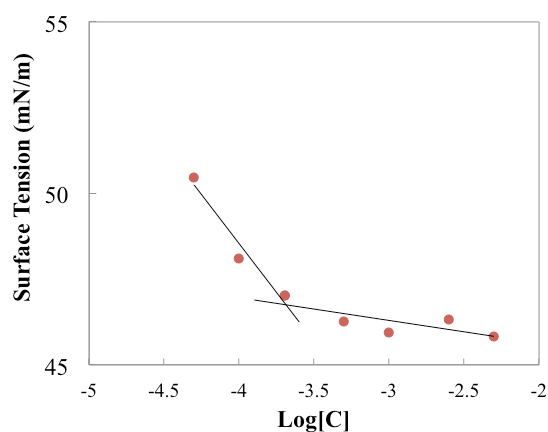


図 2-7 D_4C_{12} の対数濃度 対 表面張力のプロット

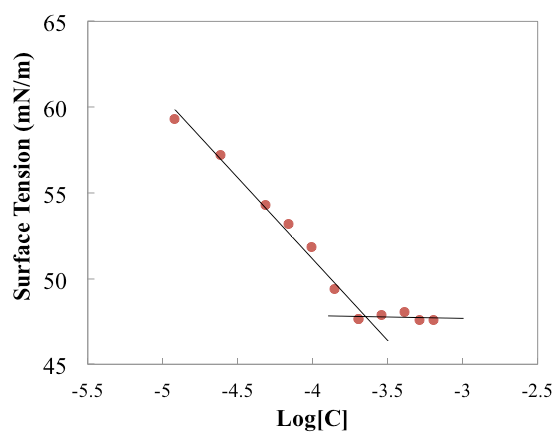


図 2-8 D_5C_{12} の対数濃度 対 表面張力のプロット

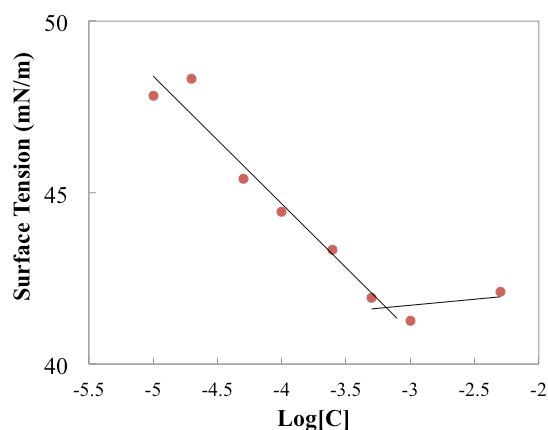


図 2-9 D_3C_{14} の対数濃度 対 表面張力のプロット

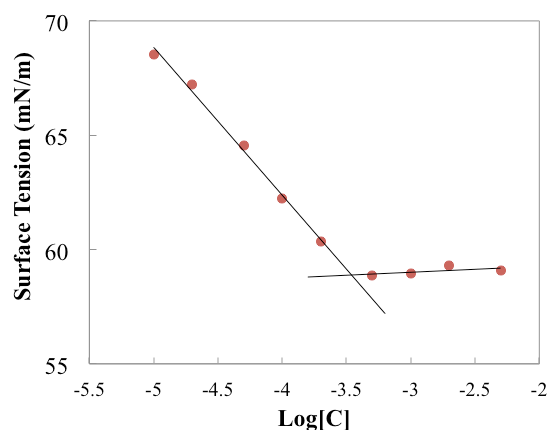


図 2-10 D_3C_{16} の対数濃度 対 表面張力のプロット

変曲点前後の 2 直線の交点より算出された各 PG-Surfactant の cac 値を以下の表にまとめた。

表 2-1 各 PG-Surfactant の cac 値

PG-surfactant	CAC/mM
D_2C_{12}	0.017
D_3C_{12}	0.0030
D_4C_{12}	0.21
D_5C_{12}	0.23
D_3C_{14}	0.65
D_3C_{16}	0.35

いずれのサンプルに関しても、1つの明確な変曲点がみられたことから、ある濃度を境に溶液中で、ミセルやリポソームなどの何らかの会合体が形成されることが明らかとなった。また、 D_2C_{12} 、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} に関しては、変曲点より

高濃度側で、さらに表面張力の減少が見られた。通常の 1 本鎖型の界面活性剤、あるいはアルキル鎖をスペーサーに持つジェミニ型界面活性剤ではこのような挙動は見られない（変曲点以降は表面張力に変化はない）ことから、これら PG-surfactant は単純なミセル様の会合体のみではなく、リポソームなどのより高次な会合体の形成が考えられた。

ペプチドスペーサーの長さの違いに関して比較を行うと、 D_3C_{12} が最も低い濃度から会合しはじめることが分かった。最もスペーサー長の短い D_2C_{12} に関して最も低い cac 値が観測されなかったことから、ペプチドスペーサーにより構成される親水頭部の大きさには、アルキル鎖のパッキングに対して至適なサイズが存在することが示唆された。しかし一方で、今回の分子設計では、ペプチドスペーサーそのものが親水頭部として働き、スペーサー長の違いはすなわちアニオン電荷数の違いにもなるため、親水頭部の電荷数も含めた解釈が必要に思われる。

また 3 つの Asp 残基で構成されるペプチドスペーサーを持つ PG-surfactant に関して、炭素鎖長の影響を比較したところ、意外なことに炭素数 12 が最も cac 値が小さくなり、14 と 16 ではそれほどの差が見られなかった。一般的な界面活性剤においては疎水鎖が長くなるほど cmc (cac) 値が小さくなる傾向が見られるため、このような性質は、PG-Surfactant 特有の性質と思われるが、現状では厳密なメカニズムの説明は難しい。ひとつこの原因として考えられることに、特に D_3C_{14} に関して測定中に表面張力の値が安定せず徐々に減少していく現象が見られた。従って、表面張力測定からはうまく cac 値の算出ができていない可能性も考えられた。このことは D_3C_{14} が、ある濃度を境に単純なミセル様の会合体を形成しているだけでなく、膜構造を作り Wilhelmy プレート上に吸着していることが示唆された。

2-3-1-2 DLS による水溶液中での会合体挙動の評価

いずれの PG-surfactant についても、表面張力法により算出された cac 以上の濃度において、何らかの会合体の形成が示唆された。そこで、溶液中での各 PG-surfactant の会合挙動を、DLS により具体的に評価を行った。

ここでは、1 mM の濃度で各 PG-surfactant をバッファー中に溶解し、その溶解直後と 1 週間エイジングした後のサンプルについて会合体の粒径評価を行った。

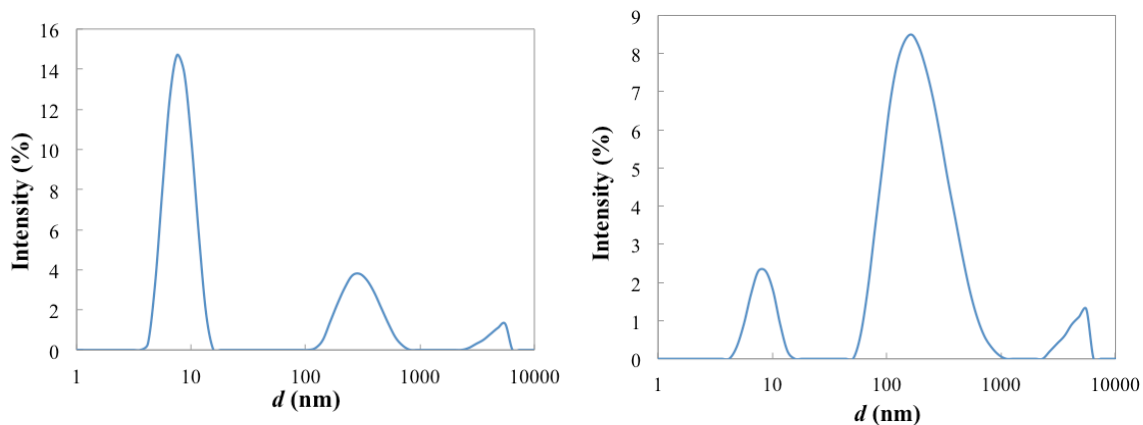


図 2-11 DLS による D_2C_{12} 会合体の粒径分布評価
 左：バッファーに溶解直後 右：バッファーに溶解後、室温で1週間エイジング

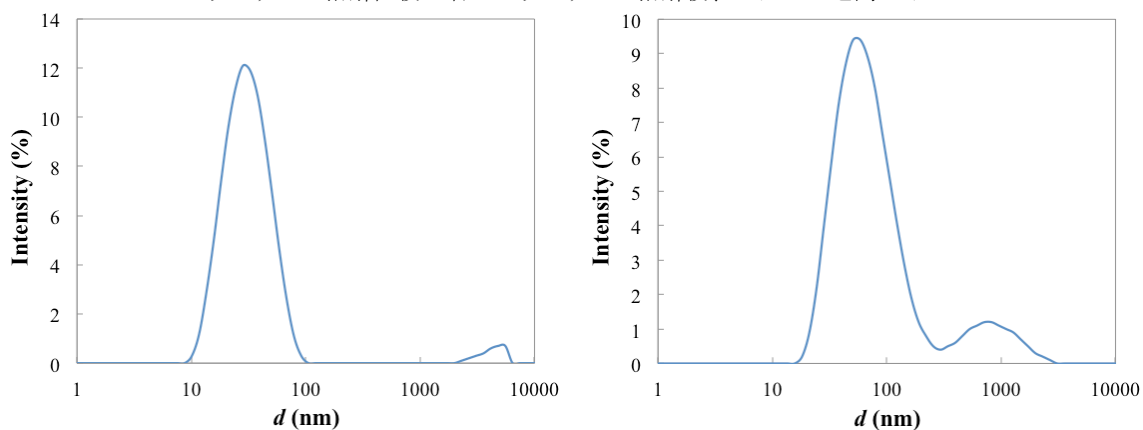


図 2-12 DLS による D_3C_{12} 会合体の粒径分布評価
 左：バッファーに溶解直後 右：バッファーに溶解後、室温で1週間エイジング

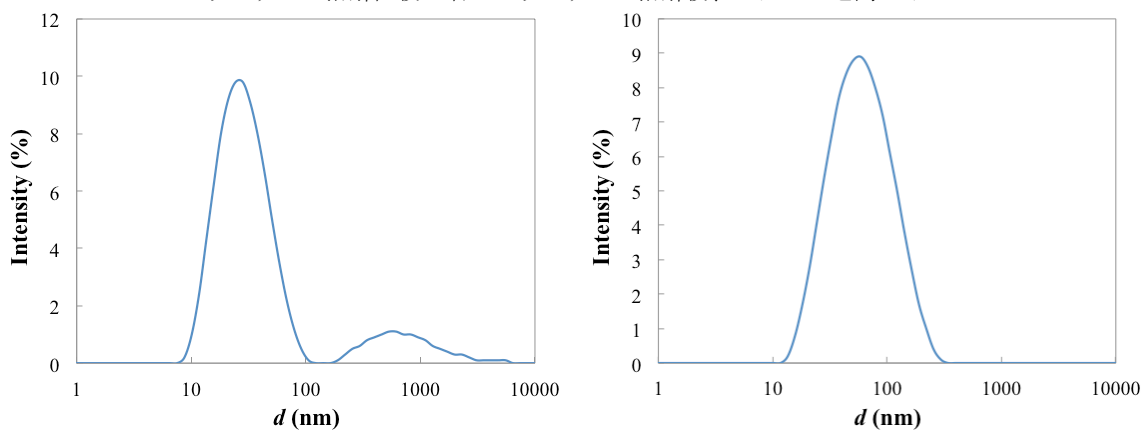


図 2-13 DLS による D_4C_{12} 会合体の粒径分布評価
 左：バッファーに溶解直後 右：バッファーに溶解後、室温で1週間エイジング

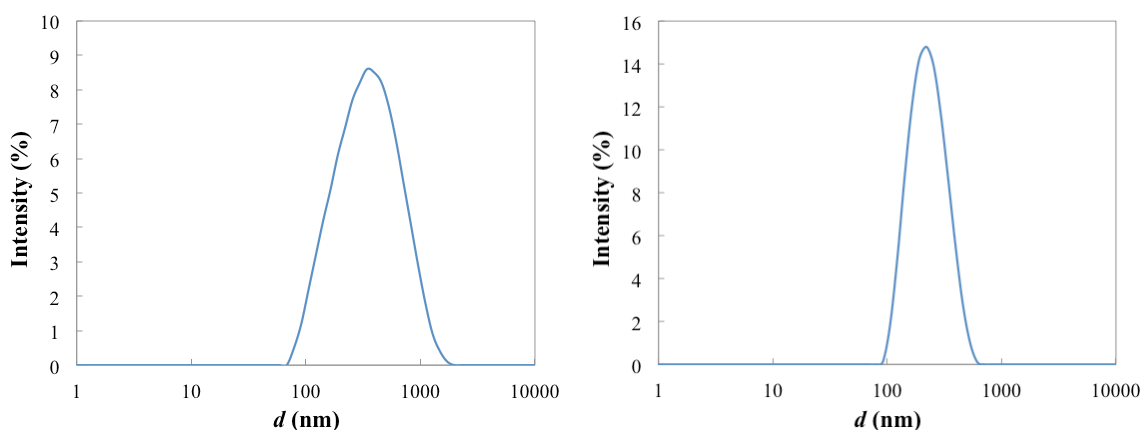


図 2-14 DLS による D_5C_{12} 会合体の粒径分布評価
 左：バッファーに溶解直後 右：バッファーに溶解後、室温で 1 週間エイジング

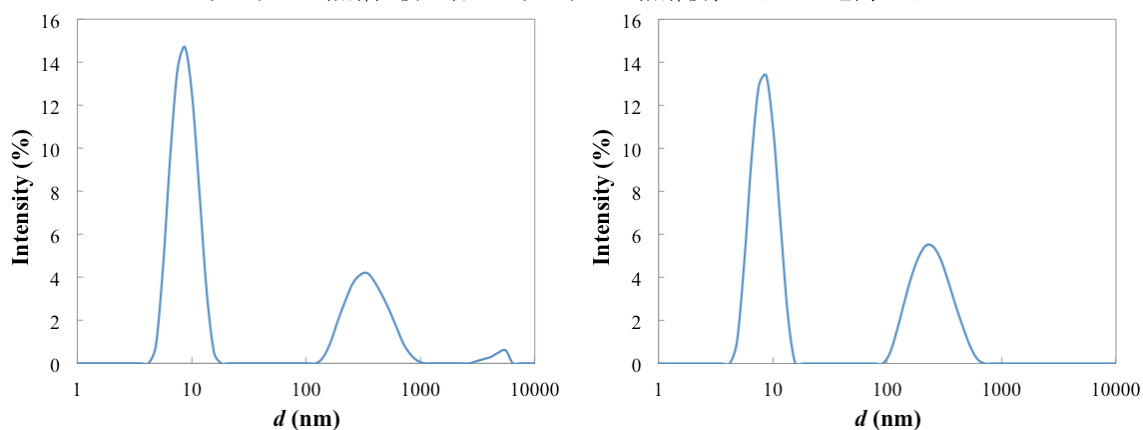


図 2-15 DLS による D_3C_{14} 会合体の粒径分布評価
 左：バッファーに溶解直後 右：バッファーに溶解後、室温で 1 週間エイジング

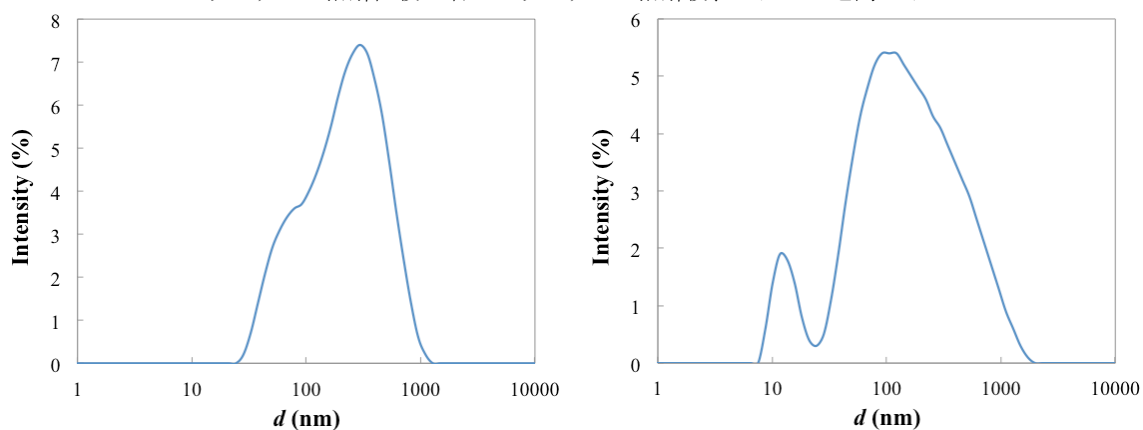


図 2-16 DLS による D_3C_{16} 会合体の粒径分布評価
 左：バッファーに溶解直後 右：バッファーに溶解後、室温で 1 週間エイジング

まず、いずれのサンプルに関しても、溶解直後に比べて 1 週間エイジングすることで、より大きなサイズを持った会合体に成長する傾向がみられた。溶解直後に関して比較を行うと、 D_2C_{12} に関してはミセル様会合体の形成に対応すると思われる 10 nm 以下の粒径の会合体が主成分としてみられたのに対し、 D_3C_{12} 、

D_3C_{12} 、 D_4C_{12} では40 nm程度、 D_5C_{12} では400 nm程度の会合体が選択的に形成された。一方で、 D_3C_{16} に関してはバッファー中への溶解度の低さからか、溶解直後から不均一な会合体の分布が見られた。

1週間エイジング後のサンプルで比較を行うと、 D_2C_{12} 、 D_5C_{12} は200-300 nm程度の会合体、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} に関しては70-80 nm程度の会合体への、選択的な収束がみられた。一方 D_3C_{14} 、 D_3C_{16} に関しては、バッファー中での溶解度の低さのためか、エイジングに伴うサイズの変化は観測されなかった。

2-3-1-3 AFM による PG-surfactant の固定基板上での会合挙動観察

一般的に界面活性剤は固定基板上と相互作用することで、単分子膜や二分子膜を形成することが知られている。また、リン脂質が形成する球状二分子膜（リポソーム）を固定基板上にラプチャーした場合には、その二分子膜構造を保ちながら球状の構造が割れ、平面状の二分子膜が基板表面に広がることが知られている。

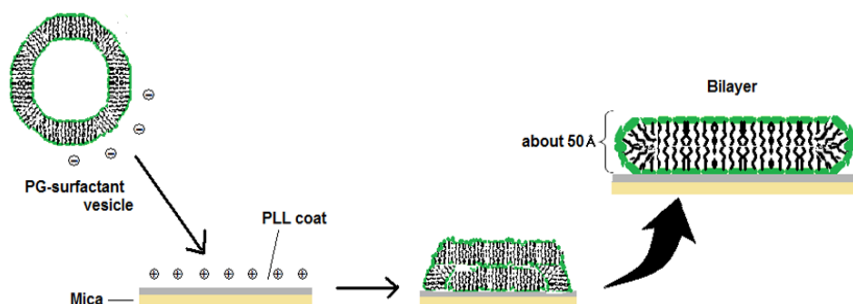


図 2-17 リン脂質二分子膜（リポソーム）からの、PLL（ポリリジン）被覆マイカ基板上での平面二分子膜形成

そこで、今回検討を行っている新規の界面活性剤分子である PG-Surfactant がどのような構造で基板表面に組織化されるか、検討を行った。なお、今回検討を行っている PG-surfactant は、いずれもオリゴ Asp 残基をスペーサー部位に持ったため、特に中性付近ではアニオン電荷を持つことが予測される。そこで基板との相互作用を高めるため、予めポリ-L-リジン（PLL）を基板表面に吸着させることで正電荷を基板表面に持たせた後で、PG-surfactant の組織化の評価を行った。

D_3C_{12} 、 D_4C_{12} について図 2-1 8 にマイカ基板上に PLL コートを行いその上に二分子膜の作成を行ったサンプルについての AFM 像を示す。

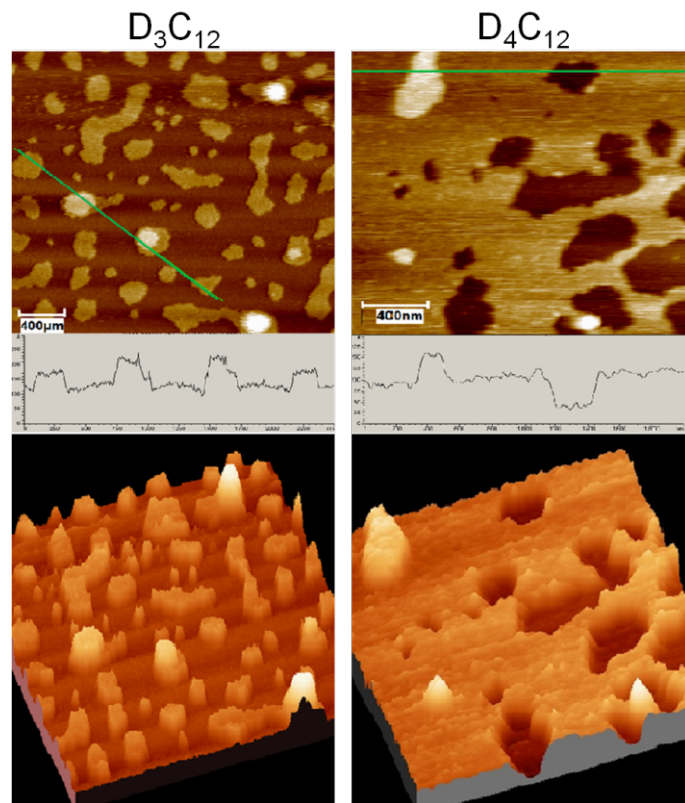


図 2-18 カチオン修飾したマイカ基板上で各 PG-Surfactant が形成する平面二分子膜の AFM 画像 (左: D_3C_{12} , 右: D_4C_{12})

その結果 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} について一様に高さの揃ったテラス構造が観察された。これらテラス構造のマイカ表面からの高さは、ちょうど PG-Surfactant 2 分子分の長さ一致したことから (1 分子=約 2.5 nm)、平面二分子膜であると考えられた。

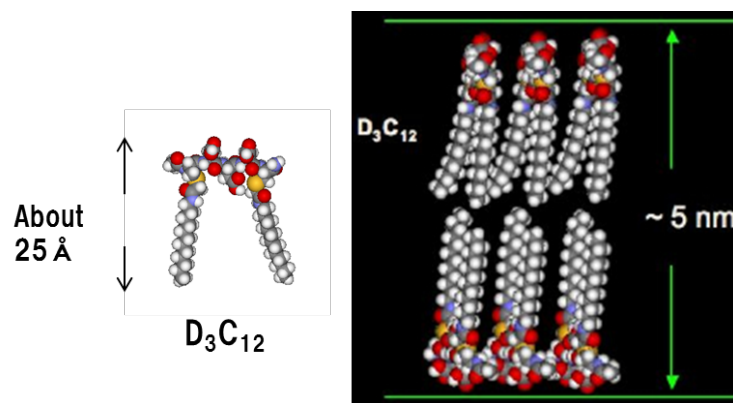


図 2-19 D_3C_{12} の推定される分子長と二分子膜形成モデル

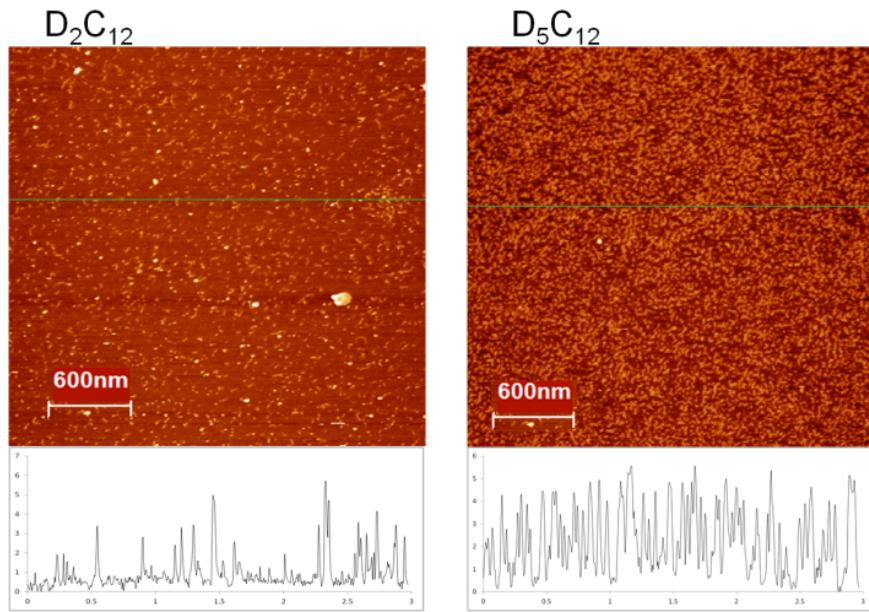


図 2-20 固定基板上で平面二分子膜を形成しない PG-Surfactant の AFM 画像
(左 : D_2C_{12} , 右 : D_5C_{12})

一方、 D_2C_{12} 、 D_5C_{12} については平面二分子膜構造の形成が確認されなかった。この理由として、ペプチドスペーサーの長さが短い、あるいは長い場合には、膜構造を取る際のアルキル鎖間のパッキング形成に対して、親水頭部の大きさが適切でなく、安定的な二分子膜形成を行えなかったことが考えられた。

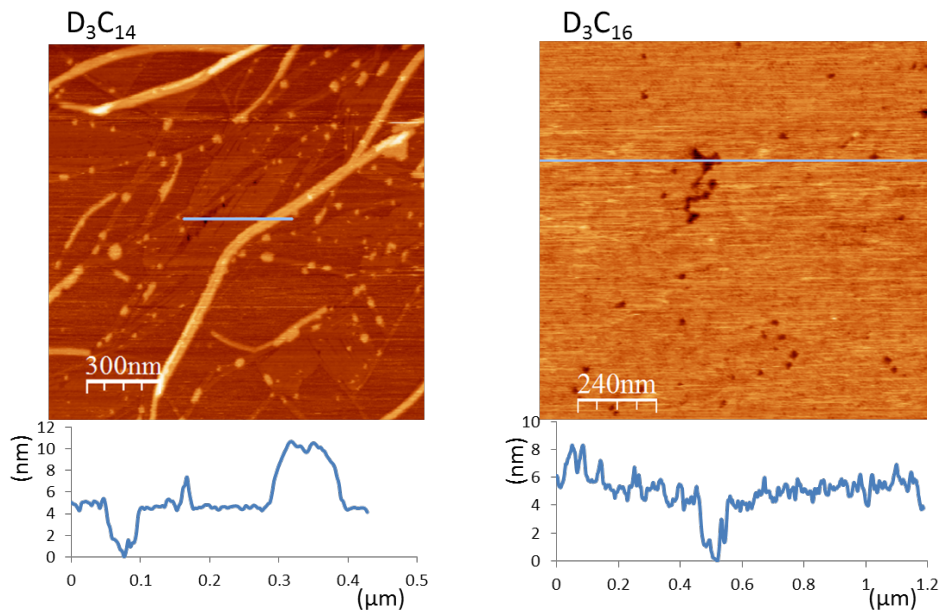


図 2-21 疎水鎖長が異なる PG-Surfactant が形成する平面二分子膜の AFM 画像
(左 : D_3C_{14} , 右 : D_3C_{16})

D_3C_{14} 、 D_3C_{16} に関しては基板表面に対する吸着量が多かったため、島状のドメイン形成は見られなかったものの、所々に残っていた（穴状の）マイカ表面からの高さ情報（約 5 nm）から、平面二分子膜の形成が示唆された。また D_3C_{14} に関しては、形成された平面二分子膜の上に、高さ（直径）5 nm 程度の繊維状の会合体の吸着も見られた。こちらは、 D_3C_{14} により形成される棒状ミセルのように思われた。

2-3-1-4 TEM による会合体の観察

バッファー溶液中で確認された、100 nm 前後の会合体の形態を直接的に評価観察するため透過型電子顕微鏡（TEM）測定を行った。

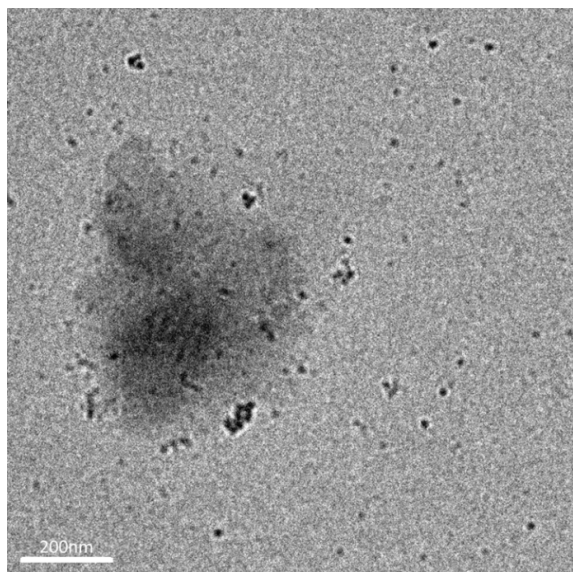


図 2-22 TEM による D_2C_{12} の会合体観察

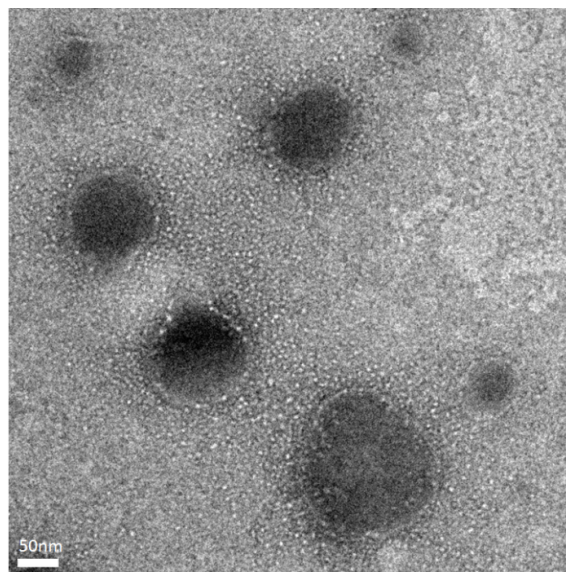


図 2-23 TEM による D_3C_{12} の会合体観察

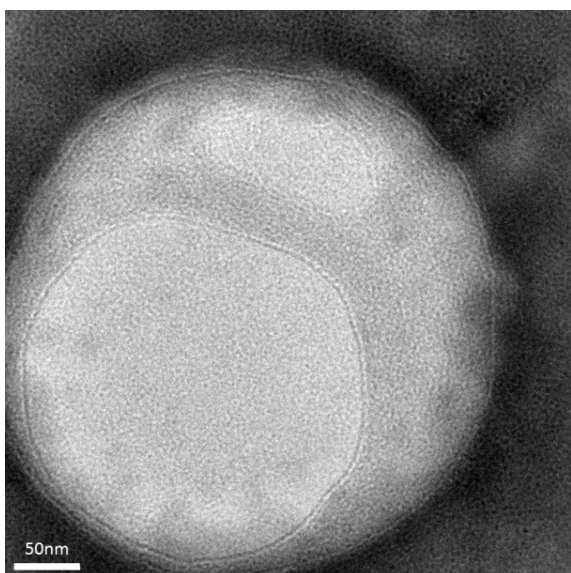


図 2-24 TEM による D_4C_{12} の会合体観察

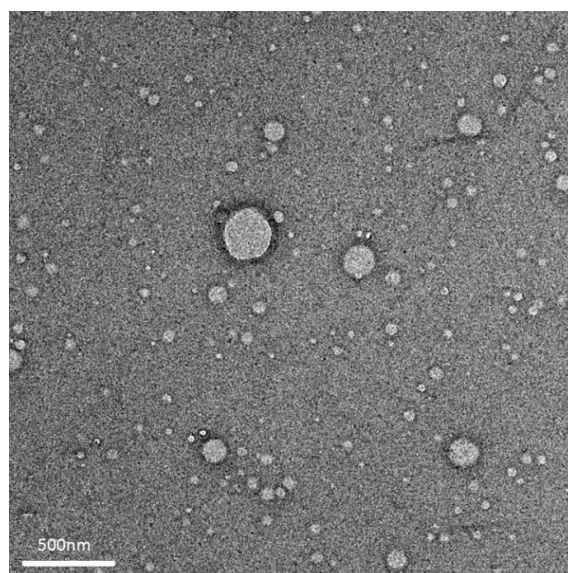


図 2-25 TEM による D_5C_{12} の会合体観察

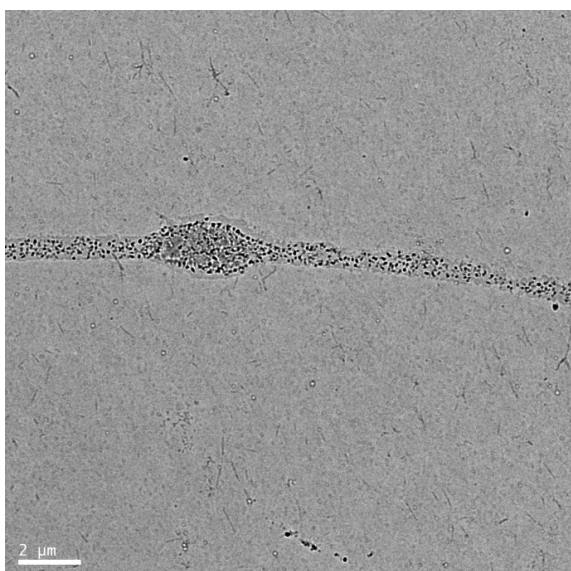


図 2-26 TEM による D_3C_{14} の会合体観察

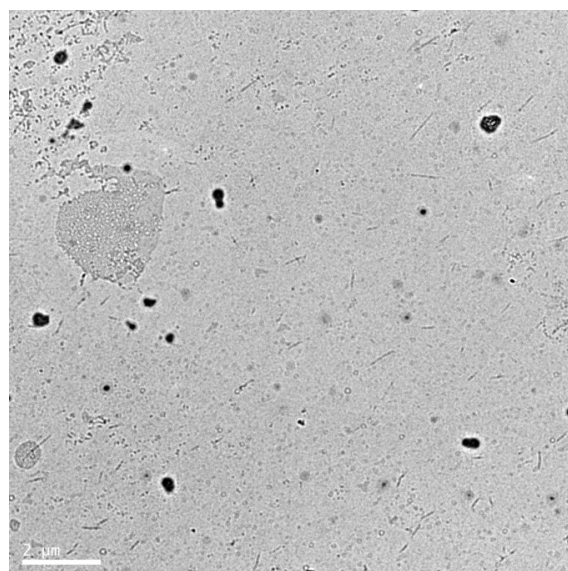


図 2-27 TEM による D_3C_{16} の会合体観察

カチオン修飾されたマイカ基板上で平面二分子膜を形成することが明らかになった D_3C_{12} 、 D_4C_{12} について、溶液中ではリポソーム様の球状二分子膜が形成されていることが示唆されていたが、TEM による直接観察から、確かにベシクル様の球状二分子膜が形成されていることが確認できた。従って、これらが平面二分子膜を形成する過程は、リン脂質二分子膜（リポソーム）から平面二分子膜が形成される過程と類似していることが予測された。

一方 D_2C_{12} に関しては、DLS から 200-300 nm 程度の会合体の形成が確認され

たが、TEM 測定からは、このサイズに対応する明確な会合体は観測されなかった (D_3C_{12} 、 D_4C_{12} のように、二分子膜構造を持ったものではない)。この解釈としては、溶解直後に生成が確認されたミセル様の構造物 (粒子径 < 10 nm) がぶどう状に寄り集まったぶどう状会合体が、エイジングと共に生成したことが考えられる。この場合、TEM 測定用の Cu グリッドにのせた後、サンプルの脱塩をするために MilliQ 水で洗浄する際に、分子同士の会合力が弱い故にすぐにはがれる、あるいは単分子に分散してしまい、TEM 測定時には目立った会合体として観測できなかったことが考えられた。この結果は、平面二分子膜の形成を試みて AFM 測定を行った際に、二分子膜の形成が見られなかったこととも一致する。

D_5C_{12} では、DLS で観測された 200-300 nm 程度のサイズを持つ球状の会合体の生成が TEM 測定からも確認できた。球状会合体の外側辺縁に二分子膜の形成を示唆する薄膜は観測することができなかったが、ぶどう状ミセル会合体のような複雑な凝集物とも異なっていたことから、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} と同様に、溶液中で球状二分子膜が形成されていると思われる。一方で D_5C_{12} に関しては、AFM 測定から平面二分子膜の形成は確認されていない。これに対する解釈としては、5 つの Asp 残基からなり大きな親水頭部を持つ D_5C_{12} に関しては、平面二分子膜を形成するために平らな表面と相互作用する場合には、このサイズや形が不利に働いたことが考えられた。

D_3C_{14} 、 D_3C_{16} では、いずれも明確な会合形態の観察には至らなかった。これはアルキル鎖長の増加に伴い溶液中でのマイクロなレベルでの溶解度の低下が見られたためと考えられる (TEM グリッド上に、凝集体の生成もみられた)。ただ D_3C_{14} に関しては、ファイバー状の会合体も若干ではあったが見られた。一方でこのような結果は、AFM 測定において、両者から平面二分子膜の生成が見られた結果と矛盾してみえる。これに対する解釈としては、TEM 測定では非常に頻度が小さくみだせなかったが、ごく少量生成している球状二分子膜が平面二分子膜化していた、あるいは濃度は低いが、溶液中に単分子で分散しているこれら分子が、球状二分子膜の生成を経ずに平面二分子膜化したことも考えられる。しかしながら、現状これ以上の解釈を与えることは難しい。

2-3-1-5 エマルジョン法による選択的なベシクル調製の検討³⁵⁾

これまでの、1 mM 程度の濃度でバッファ溶液中に溶かしてエイジングを行う方法の検討から、特に D_3C_{12} 、 D_4C_{12} には二分子膜形成能が高いことが分かってきた。しかしながら、リン脂質などでリポソームを調製する場合には、有機溶媒（クロロホルムなど）やエタノールに一旦溶解し薄膜の形成を経て水和させる薄膜水和法³⁷⁾や、エタノールに溶かした溶液をバッファ溶液中に注入するエタノールインジェクション法³⁸⁾を用いることで、選択的な球状二分膜の形成が可能である。今回検討を行っている PG-surfactant に関しても、選択的な二分子膜調製を目指し、同様な方法を検討してみたが、 D_3C_{12} をはじめとするいずれの PG-surfactant も、これらの溶媒に対して溶解性が悪いため実行は難しかった。一方で、S. Pautot らにより³⁵⁾、エマルジョン法と呼ばれる手法を用いたジャイアントリポソーム調製法報告されていたため、この方法を利用した球状二分膜の調製に関して検討を行った。

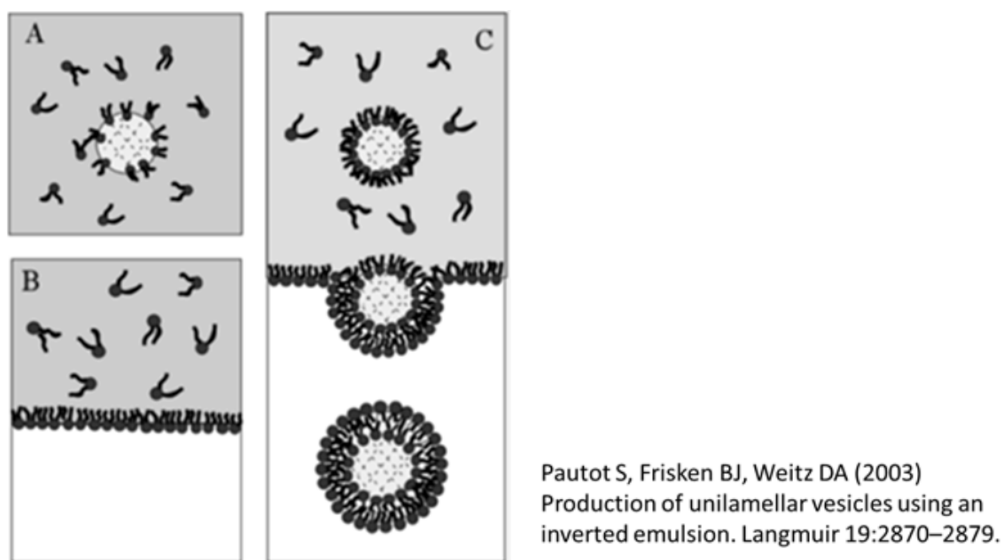


図 2-28 エマルジョン法によるベシクル調製のイメージ

図 2-28 に示したエマルジョン法について説明をする。まず、ステップ A で流動パラフィン中に両親媒性分子を分散させ、そこに極少量の水系溶媒を加え超音波ホモジナイザーにより乳化（逆エマルジョン）することで、両親媒性分子の親水部を内側（水滴側）に向け水滴表面に吸着させた状態を作製する。ステップ B で、外水相となる水系溶媒の上に乳化した流動パラフィン溶液を乗せる

ことで、エマルジョン表面に吸着しなかった両親媒性分子が水界面に並び、その上に両親媒性分子が吸着した水滴が載った状態となる。なお、このとき内水相溶液にはスクロース+グルコース、外水相溶液にはグルコースのみをそれぞれ同濃度になるよう混ぜ、内水相と外水相の浸透圧を同じにしておく。その後ステップ C で遠心分離機にかけることにより、比重の大きい内水相溶液を含んだ逆エマルジョンが両溶媒の界面に並んだ両親媒性分子を巻き込みつつ外水相溶媒に沈降する。このようにして、球状二分子膜を形成させる方法である。

S. Pautot ら³⁵⁾は脂質をクロロホルムに溶かし流動パラフィンと混合した後、クロロホルムを留去させているが、内水相溶液に PG-surfactant が可溶性塩基性水溶液を用いれば、これに溶けた PG-surfactant がパラフィンとの界面に並び逆エマルジョンを作ることができると考えた。

実際に、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} をエマルジョン法により球状二分子膜化したものに関して、DLS による評価を行った結果を図 2-29 に示した。その結果、前節までに検討を行ってきた、溶液中でエイジングする手法（エイジング法）で得られた会合体とは大きく異なり、100 nm 程度の粒径をもつ均一な会合体の生成が確認された。エイジング法と異なり、エマルジョン法では得られる球状二分子膜の粒径が若干大きくなったが、これはエマルジョン法ではじめに PG-surfactant のエマルジョン溶液を作る際に利用した溶液の量（PG-surfactant 1 mg に対して、内水相溶液を 30 μ L）や、超音波分散の度合いに依存すると思われる。この辺りの条件の影響に関しては、ここでは詳細な検討までは行っていない。しかしながら、得られる球状二分子膜の単分散性に劇的な改善が見られたことから、PG-surfactant で選択的に球状二分子膜を調製する手法として、エマルジョン法が有効であることが分かった。

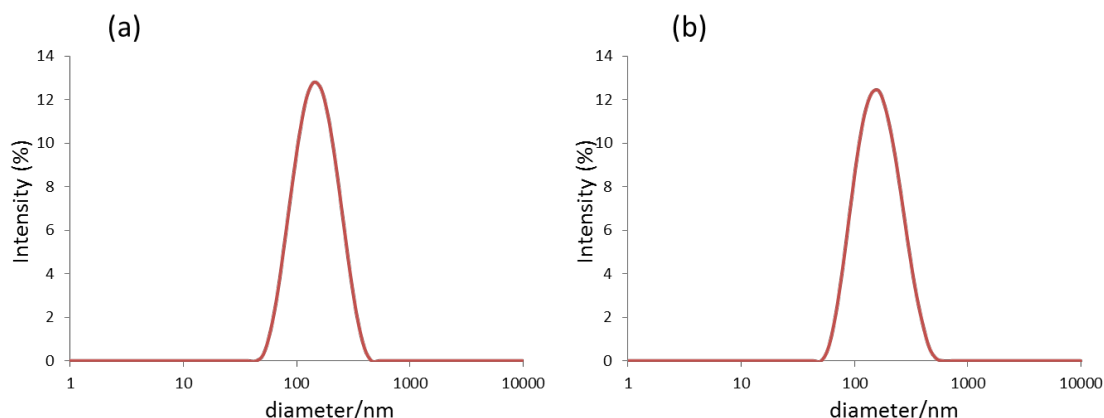


図 2-29 DLS による会合体の粒径分布評価 (エマルジョン法で調製した(a) D_3C_{12} , (b) D_4C_{12})

表 2-2 エマルジョン法とエイジング法による調製で得られる球状二分子膜の平均粒子径と多分散度 (PDI) の比較

	平均粒径 (nm)	PDI
エイジング法 D_3C_{12}	99.1	0.35
エマルジョン法 D_3C_{12}	159	0.20
エイジング法 D_4C_{12}	70.1	0.26
エマルジョン法 D_4C_{12}	175	0.20

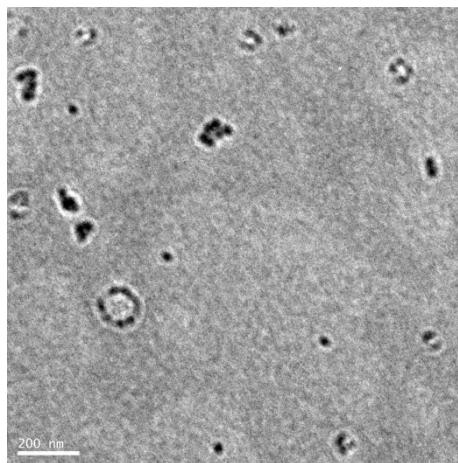


図 2-30 エマルジョン法により調製を行った D_3C_{12} の球状二分子膜の TEM 画像

2-3-2 PG-surfactant の形成する二分子膜形成のキャラクタリゼーションと膜蛋白質の内包挙動の観察

2-3-2-1 光褪色後蛍光回復法 (FRAP) による膜流動性の評価

D_3C_{12} 、 D_4C_{12} がカチオン修飾したガラス基板上に形成した平面二分子膜について、膜の流動性の有無を確認するため FRAP 測定を行った。図 2-3 1 に D_4C_{12} 二分子膜の、図 2-3 2 に DOPG 二分子膜のレーザー照射直後・1 分後・3 分後・5 分後・10 分後・15 分後の褪色箇所の画像の変化をそれぞれ示した。

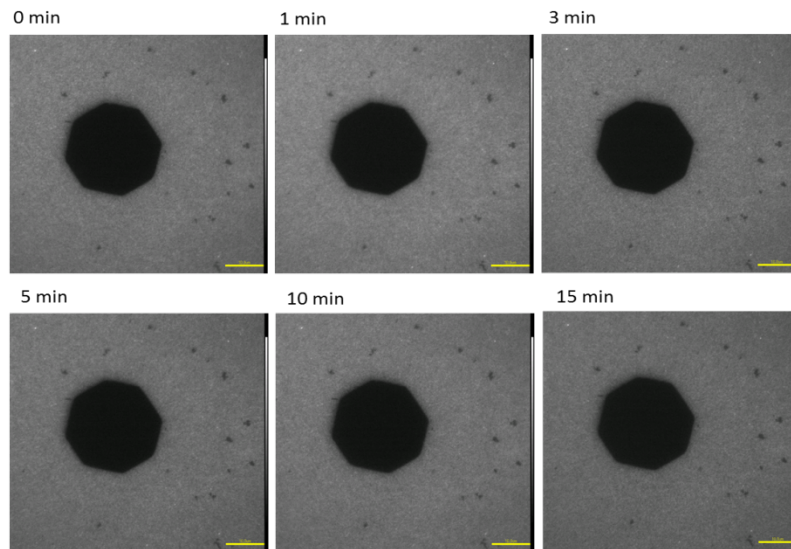


図 2-31 蛍光顕微鏡による光褪色後の D_4C_{12} 平面二分子膜観察
(上段左からレーザー照射直後・1 分後・3 分後 下段左から 5 分後・10 分後・15 分後)

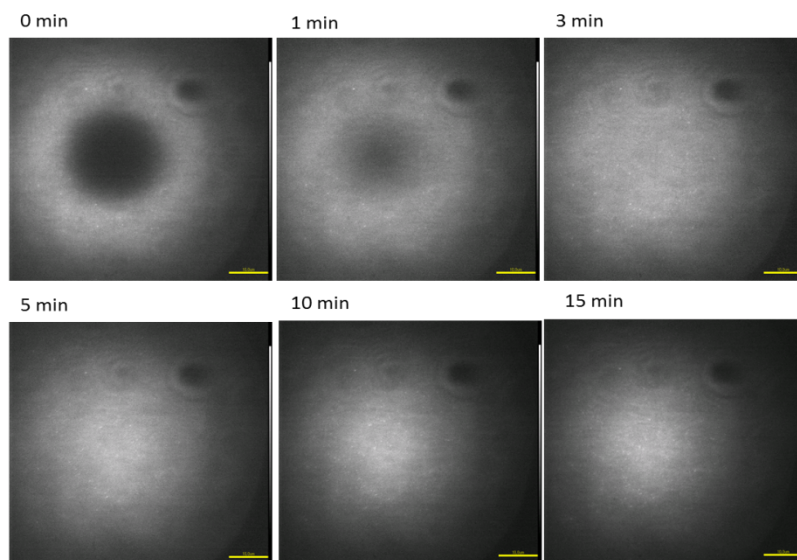


図 2-32 蛍光顕微鏡による光褪色後の DOPG 平面二分子膜観察
(上段左からレーザー照射直後・1 分後・3 分後 下段左から 5 分後・10 分後・15 分後)

またこの観察画像から求められる褪色部分の領域の蛍光強度を用いて、蛍光回復した面積比率を求め時間毎にプロットしたグラフを図 2-3 3 に示した。

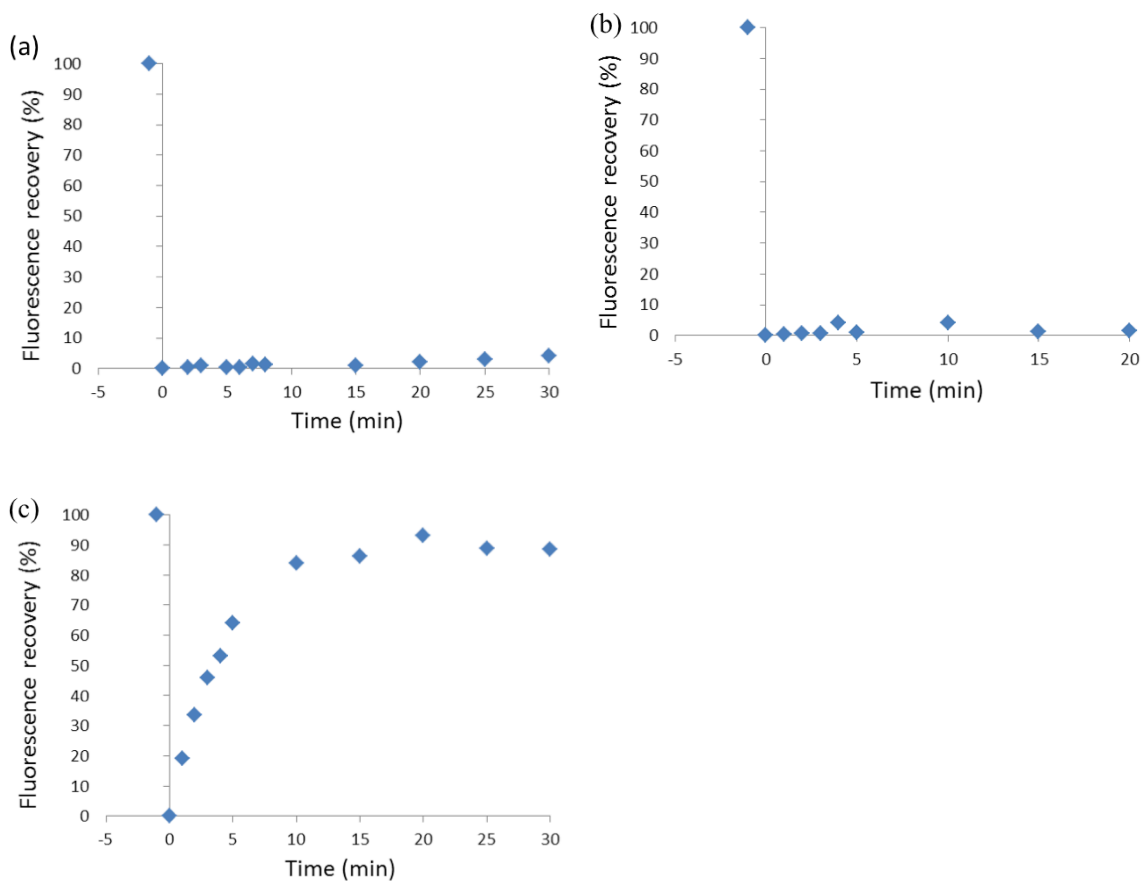


図 2-33 消光後の時間に対する光褪色部分の蛍光回復率 (%) (a) D_3C_{12} (b) D_4C_{12} (c) DOPG

図 2-3 3 のデータを元に、 t_{half} (min.)を算出した結果を表 2-3 に示した。

二分子膜形成分子	t_{half} (min.)
D_3C_{12}	>1000
D_4C_{12}	>1000
DOPG	4.3

こちらからも明らかなように、DOPG 二分子膜では照射後 15 分程度でほぼ完全に蛍光回復が見られたが、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} の形成する二分子膜では蛍光回復がほとんど見られなかった。これより、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} の形成する二分子膜では膜の流動性はほとんど無いことが分かった。この原因としては、オリゴ Asp からなる極性基を通じた隣接分子との相互作用、あるいは長鎖アルキル鎖の根元にあるアミド結合間の水素結合などが、リン脂質などに比べて強いことが考えられた。

2-3-2-2 PG-surfactant 二分子膜と LH2 の複合化評価

D_3C_{12} が形成する二分子膜中に膜蛋白質 LH2 を変性させることなく固定化することを目指し、透析を用いた複合化を試みた。図 2-3 4 には D_3C_{12} を用いて LH2 を溶解し、透析した後の複合化した溶液の吸収スペクトルを示した。

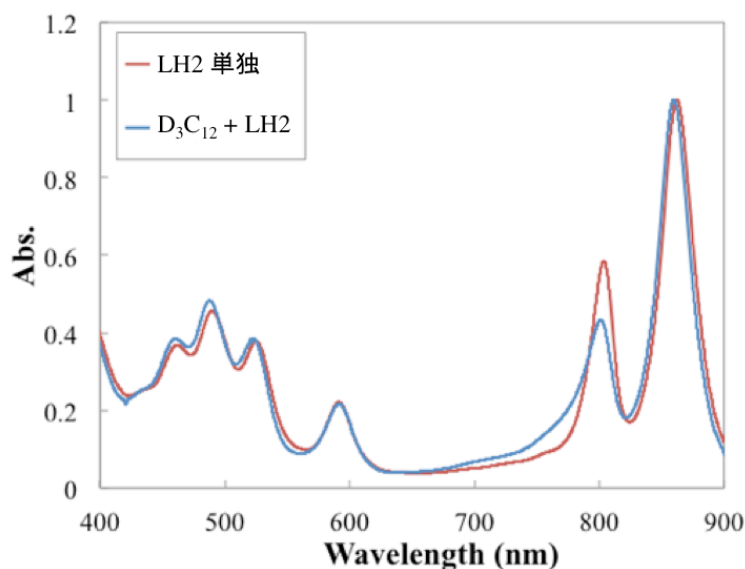


図 2-34 D_3C_{12} 二分子膜と LH2 を複合化した後の吸収スペクトル

LH2 の BChla に基づく 2 種類の特徴的なピークは B800 と B860 の 2 つのピークであり、この両者の比が変性度合の指標となることが知られている。図 2-3 4 から、 D_3C_{12} による LH2 複合化後のこの 2 つのピークを確認すると B800 のピークトップが約 20 %減少していることから、若干の変性 (B800 の色素の離脱) が起きていると考えられる。ただし、一般にリン脂質により形成されるリポソーム膜に再構成した場合であっても、B800 の吸光度は若干減少が起ることが知られている。またリン脂質のリポソームに再構成した場合には、B800 と B860 のそれぞれの吸収バンドが 2 nm ほどの長波長シフトが起こることが知られているが、 D_3C_{12} においてはむしろ僅かに短波長シフトしていることから、球状二分子膜の形態を保ったまま、複合化されていないことが示唆された。

2-3-2-3 ショ糖密度勾配法による複合化溶液の評価

続いて D_3C_{12} と LH2 が複合化し共存しているかどうかの確認するため、ショ糖密度勾配法により評価を行った。超遠心装置による遠心分離を行った後の各遠心チューブの画像を図 2-3 5 に示す。

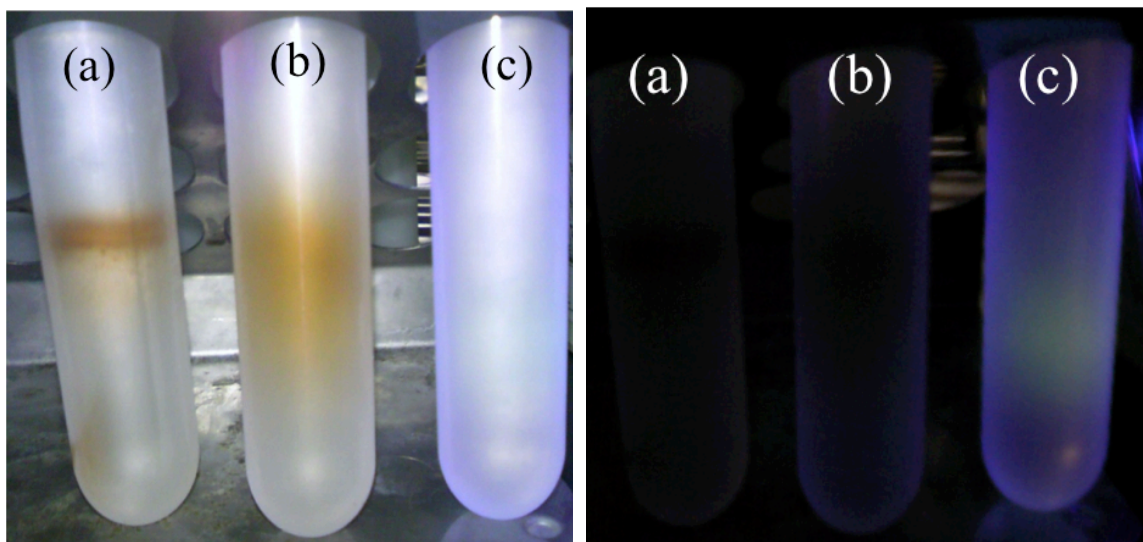


図 2-35 D_3C_{12} /LH2 複合化溶液のショ糖密度勾配法による分析
左：明所 右：暗所で UV ランプ照射下 (a) LH2 (b) D_3C_{12} /LH2 (c) D_3C_{12}

図 2-3 5 に見られるように、 D_3C_{12} /LH2 複合化溶液は LH2 単独に比べ下方方向にブロードしたバンドとなっていた。また D_3C_{12} 単独のバンド (ダンシル化 D_3C_{12} による蛍光バンド) は LH2 単独に比べ下の位置に見られ、 D_3C_{12} /LH2 複合化溶液のバンドと大部分は一致しているように見えた。

次にこれら遠心チューブの上面より 1ml ずつ分取して、上から順にフラクション 1, 2... とし、それぞれの吸収スペクトルと蛍光スペクトルを測定した。

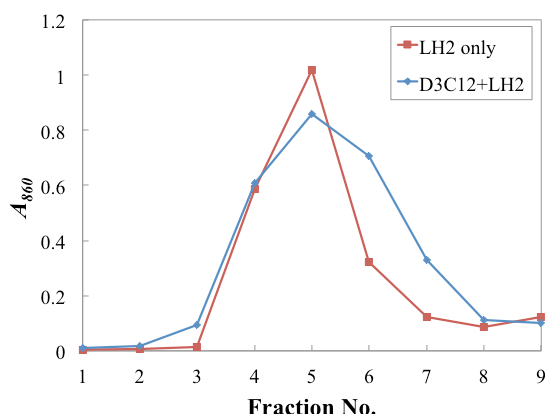


図 2-36 LH2 単独と D_3C_{12} /LH2 複合化溶液の各フラクションの A_{860} における吸収スペクトル (赤: LH2 単独 青: D_3C_{12} /LH2 複合化溶液)

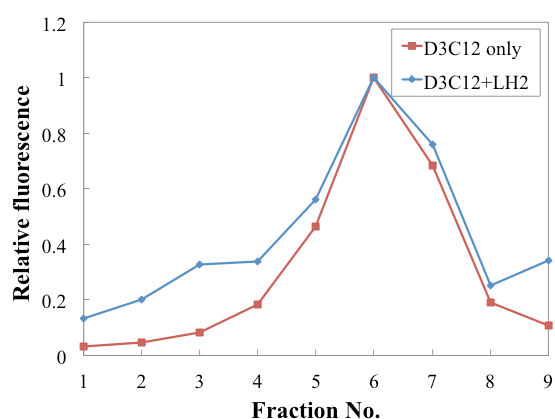


図 2-37 D_3C_{12} 単独と D_3C_{12} /LH2 複合化溶液の各フラクションの 506 nm における蛍光スペクトル (赤: D_3C_{12} 単独 青: D_3C_{12} /LH2 複合化溶液)

図 2-36 より、LH2 単独は主にフラクション 4, 5 に存在していることが分かる。それに対し D_3C_{12} /LH2 複合化溶液もフラクション 4, 5 に多くの LH2 が多く存在しているが、6 と 7 にも存在していることが分かった。また図 2-37 より、 D_3C_{12} 単独のフラクションと複合化溶液を比べるとほとんど同じ位置に存在していることが分かる。このことから、 D_3C_{12} /LH2 複合化溶液中で LH2 は D_3C_{12} によって可溶化され、 D_3C_{12} 単独の密度に依存して、若干下のフラクション (低い比重のフラクション) に移動したものと考えられる。

2-3-2-4 DLS による複合体の粒径分布測定

LH2 を複合化させることで、 D_3C_{12} の溶液中での会合状態に影響があるのか調べるため DLS による粒径分布測定を行った。結果を図 2-38 に示す。

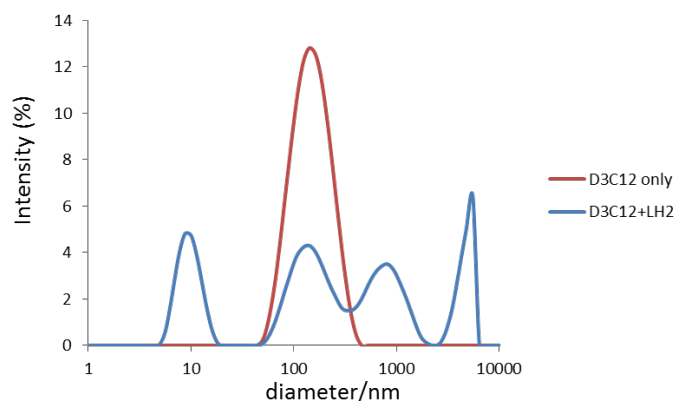


図 2-38 DLS による D_3C_{12} /LH2 複合化溶液の粒径分布測定

D_3C_{12} 単独の溶液と比較して、複合化溶液では大幅に多分散化していることが分かった。これは、LH2 が D_3C_{12} のミセルによって 1 分子、あるいは複数の凝集体の状態でも可溶化されているものや、可溶化しきれなかった LH2 が大きな粒径のピークとなったもの、あるいはわずかながらに、当初の目的であった、 D_3C_{12} の形成する二分子膜に LH2 が取り込まれたものなどが混在していると考えられる。

2-3-2-5 AFM による基板上での複合体の観察

二分子膜中への LH2 の固定化ができていた場合、最も直接的にその形態を評価できる方法として、基板上へ平面膜化させて AFM で観察する方法が挙げられる。図 2-3 9 には膜蛋白質を固定化した平面二分子膜の形成モデルを示した。理想的な状態であれば、高さの揃ったテラス状の膜ドメイン中に、膜外領域を突出した LH2 が確認されると考えられる。そこで D_3C_{12} /LH2 複合化溶液をカチオン修飾した基板上へラプチャーし AFM で観察を行った。結果を図 2-4 0 に示した。

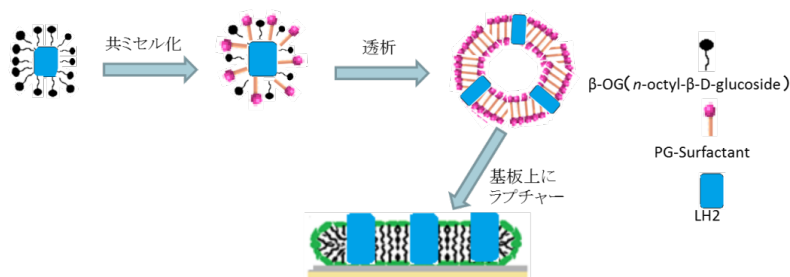


図 2-39 プロテオリポソームを経由した膜蛋白質固定化のモデル

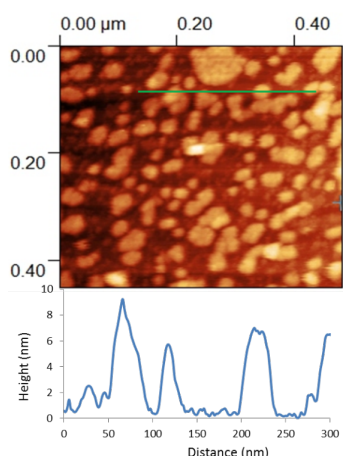


図 2-40 AFM による基板上での D_3C_{12} /LH2 複合形態の観察

観察の結果、まとまった平面二分子膜のテラス構造は確認できず、基板上に粒状に分散し吸着した会合体しか見られなかった。ショ糖密度勾配法による評価や DLS 測定の結果と合わせて考えると、 D_3C_{12} 二分子膜がその構造を保ったまま LH2 を固定化することは困難であると考えられた。

2-3-3 クロスリンク PG-surfactant による二分子膜形成

2-3-2 項の検討から、 D_3C_{12} の形成する二分子膜中への膜蛋白質 LH2 の固定化は困難であるという結論が得られた。よって 2-3-3 項ではより安定的に二分子膜が形成可能な分子設計を目指す。具体的には、オリゴ Asp ベースであったペプチドスペーサーの配列に 2 つのシステインを導入し $-Cys(Asp)_n Cys-$ ($n=2, 3, 4$) とすることで、分子内でジスルフィド架橋を形成すると考えられる構造とした。なお名称は Asp 数が 2, 3, 4 のものを順に $cr-D_2C_{12}$ 、 $cr-D_3C_{12}$ 、 $cr-D_4C_{12}$ とし、総称を $cr-PG-surfactant$ とする。

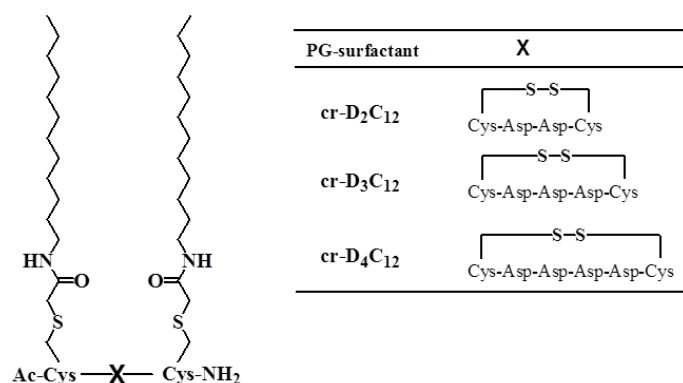


図 2-41 $cr-PG-surfactant$ の構造式

これまでの PG-Surfactant ではペプチド部分に構造規制を加えていないことから、ペプチドの構造により 2 本の疎水鎖が柔軟に向きを変えてしまい、膜構造の安定性を欠いている可能性が考えられた。分子内でジスルフィド架橋を形成することで、ペプチドの構造が環状に制限され 2 本の疎水鎖は同じ方向に向き、結果膜蛋白質の導入が可能な安定性のある二分子膜が形成できるのではないかと考えた。

非架橋PG-Surfactant
ペプチド骨格に影響を受け
疎水鎖が不揃いになる可能性

cr-PG-surfactant
ペプチド骨格を環状に固定し
疎水鎖を揃える

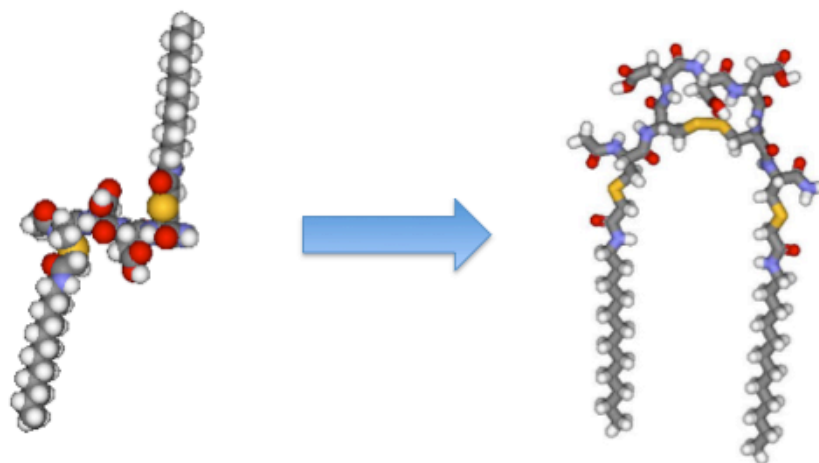


図 2-42 非架橋 PG-Surfactant と cr-PG-surfactant のとりうる分子骨格の違い

2-3-3 項ではこの分子内架橋を施した cr-PG-surfactant の合成と、これらの基礎的な物性や会合能を明らかにするため、ANS を用いた cac 値の算出、AFM、DLS、TEM 測定を用いた固定基板上や溶液中での会合挙動の評価を行った。また Ellman 試薬を用いることで、cr-PG-surfactant が塩基性溶液中でジスルフィド結合をどの程度生成しているのか、フリーの SH 基を定量することにより評価した。

2-3-3-1 Ellman 試薬による SH 基の定量

合成した各 cr-PG-surfactant に含まれる 2 つのシステイン側鎖の SH 基が、塩基性溶液中でジスルフィド結合をしているかどうか調べるため、SH 基定量試薬 DTNB を用いて SH 基の定量を行った。DTNB はフリーの SH 基が存在すると SH 基の量に相当する量の S-S 結合が切れて、安定な 5-メルカプト-2-ニトロ安息香酸を生成する。この生成した 5-メルカプト-2-ニトロ安息香酸の吸光度 ($\lambda_{\max} = 412$ nm、 $\epsilon = 1.55 \times 10^4$) から SH 基を定量する。

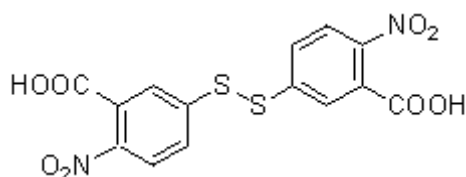


図 2-43 DTNB の構造式

$A_{\text{calcd.}} = \varepsilon \cdot C \cdot L$ (L : セル光路長)、 $(A_{\text{obs.}}/A_{\text{calcd.}}) \times 100$ より SH 基残存率を求めた。

$$\text{cr-D}_2\text{C}_{12} : (1.025/62) \times 100 = 1.7 \%$$

$$\text{cr-D}_3\text{C}_{12} : (1.006/62) \times 100 = 1.6 \%$$

$$\text{cr-D}_4\text{C}_{12} : (1.145/62) \times 100 = 1.8 \%$$

これより各 cr-PG-surfactant の SH 基残存率はそれぞれ 2%以下と算出された、ほぼ全ての分子がジスルフィド架橋を形成していることが分かった。

2-3-3-2 蛍光プローブ法による cac 値の測定

非架橋 PG-surfactant と同様に、各 cr-PG-surfactant について cac 値の測定は ANS を用いた蛍光強度変化により行った。環境応答性の蛍光色素である ANS は、分子周辺が疎水性環境となることで蛍光強度が大きく増加する特徴を持つ。界面活性剤と共存させた系では、ANS が界面活性剤ミセル中に取り込まれ疎水性環境に置かれることでこれに応答する。このことから、界面活性剤溶液の濃度に対する ANS の蛍光強度が大きく変化する変曲点から CMC 値の概算が可能となる。以下に ANS の構造式を載せる。また各 cr-PG-surfactant の濃度変化に対する ANS の蛍光スペクトル変化と、各 cr-PG-surfactant 対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロットを、次ページ以降に示した。なお後者の縦軸の相対蛍光強度について、界面活性剤が非存在下での ANS 溶液の蛍光強度を 1 とした。

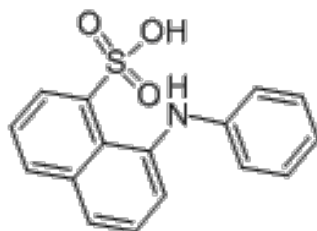


図 2-44 ANS の構造式

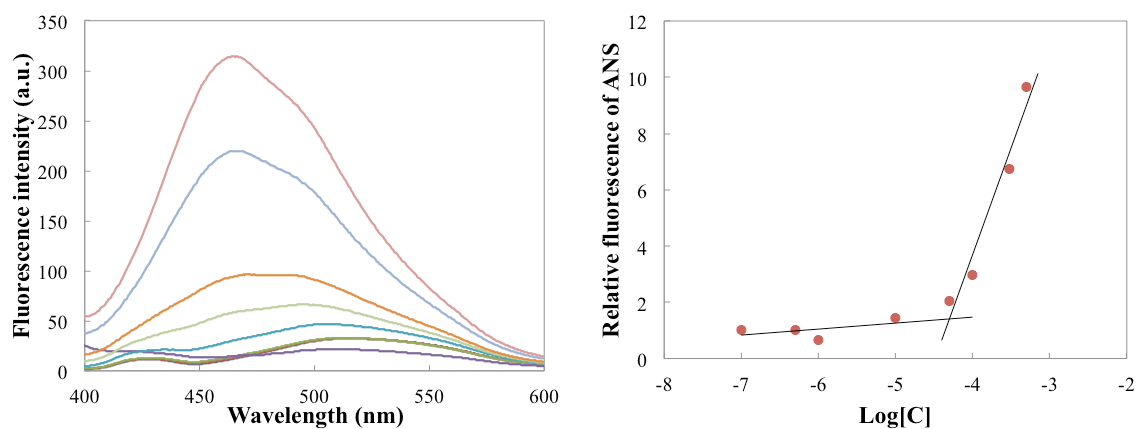


図 2-45 (左) $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ の各濃度における ANS の蛍光スペクトル,
 (右) $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ の対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロット

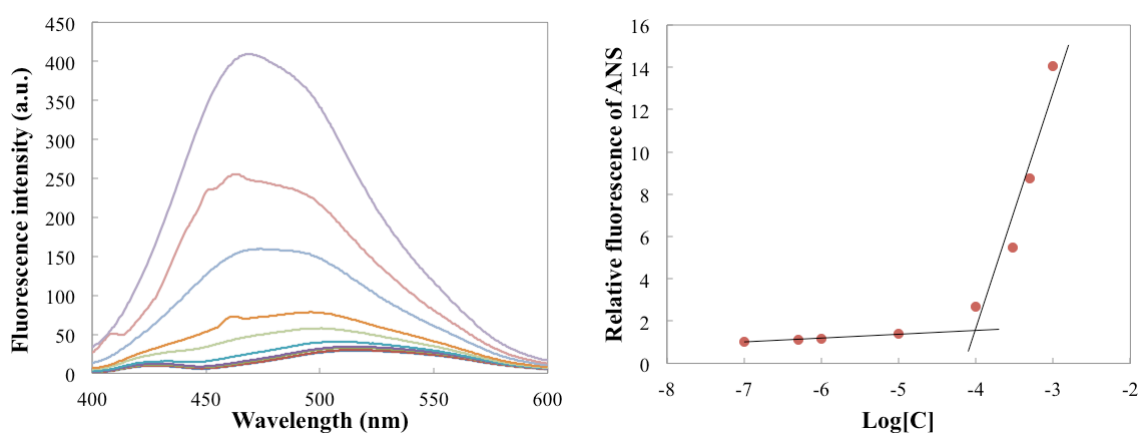


図 2-46 (左) $\text{cr-D}_3\text{C}_{12}$ の各濃度における ANS の蛍光スペクトル,
 (右) $\text{cr-D}_3\text{C}_{12}$ の対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロット

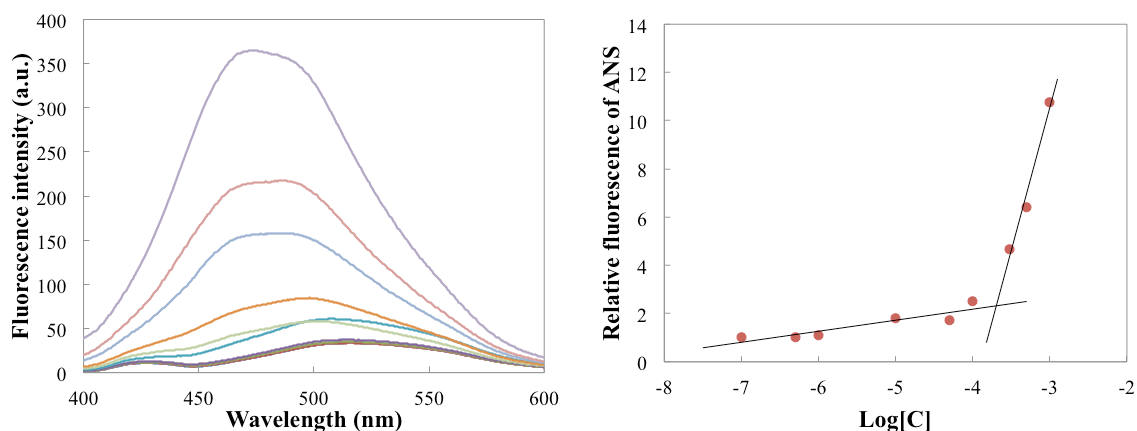


図 2-47 (左) $\text{cr-D}_4\text{C}_{12}$ の各濃度における ANS の蛍光スペクトル,
 (右) $\text{cr-D}_4\text{C}_{12}$ の対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロット

図 2-45、46、47 より、 cr-PG-surfactant の濃度上昇時に、ある濃度を境に蛍光スペクトルの最大強度が大きくなっていくことが確認できた。それに加

え、ピーク位置が徐々に短波長シフトしていくことも明らかとなった。これは ANS がより疎水的環境である cr-PG-surfactant の会合体内に取り込まれたことを示していると考えられる。変曲点前後の 2 直線の交点より算出された各 cr-PG-surfactant の cac 値を以下にまとめる。

表 2-4 各 cr-PG-surfactant の cac 値

PG-surfactant	cac/mM
cr-D₂C₁₂	0.050
cr-D₃C₁₂	0.097
cr-D₄C₁₂	0.20

ここに示すように、cr-PG-surfactant においても濃度の上昇に伴い、測定している物理量に一つの変曲点が見られ、ミセルあるいは何らかの会合体の形成が示唆された。親水頭部別の比較をすると、それほどの差は見られないものの **cr-D₂C₁₂** が最も会合能が高いという結果となった。また非架橋 PG-surfactant との比較をしても大きな差は見られないが、**cr-D₂C₁₂**、**cr-D₃C₁₂** についてペプチドスペーサーが同残基数の **D₄C₁₂**、**D₅C₁₂** と比べ若干 cac 値が小さくなっているのは、ジスルフィド架橋により長鎖アルキル鎖の会合を促進する効果が見られたと考えられた。

2-3-3-3 DLS による水溶液中での会合体挙動の評価

非架橋 PG-surfactant と同様にエマルジョン法により二分子膜化をしたサンプルに関して、バッファー溶液中で形成している会合体の粒径分布を DLS により評価した。溶媒には 50 mM carbonate buffer (pH 10)を用いた。

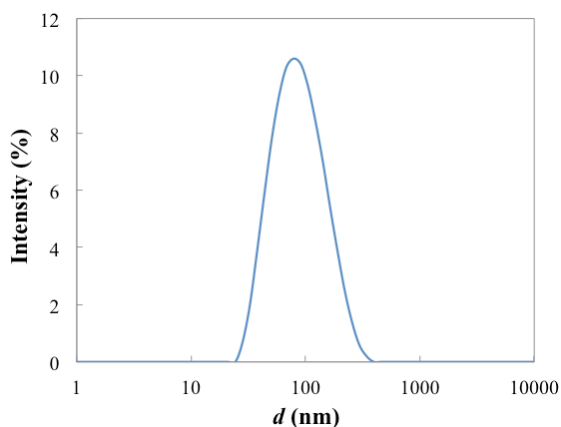


図 2-48 **cr-D₂C₁₂** 会合体の粒径分布評価 ;[**cr-D₂C₁₂**] = c.a. 1 mM, 50 mM carbonate buffer (pH 10)

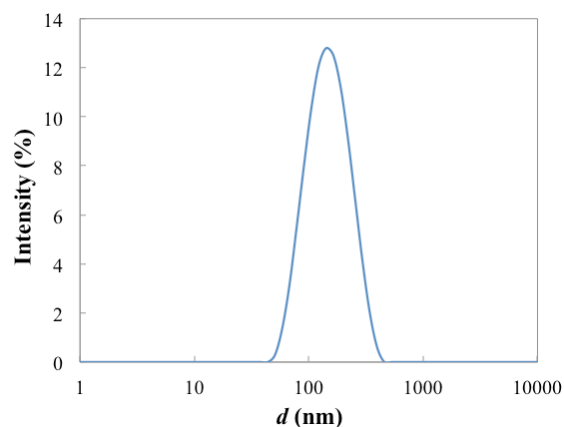


図 2-49 **cr-D₃C₁₂** 会合体の粒径分布評価 ;[**cr-D₃C₁₂**] = c.a. 1 mM, 50 mM carbonate buffer (pH 10)

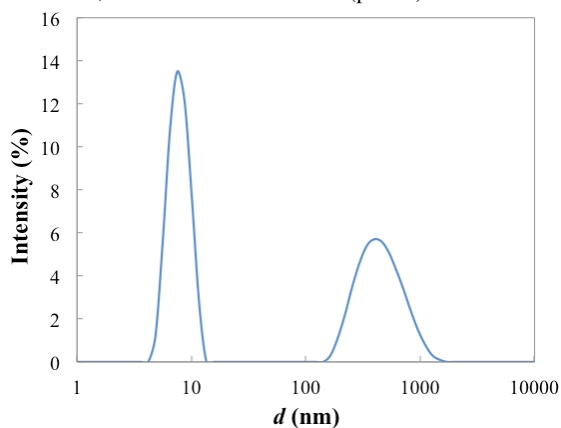


図 2-50 **cr-D₄C₁₂** 会合体の粒径分布評価[**cr-D₄C₁₂**] = c.a. 1 mM, 50 mM carbonate buffer (pH 10)

その結果 **cr-D₂C₁₂**、**cr-D₃C₁₂** については直径 100nm オーダーの会合体のピークが単独で得られたのに対して、**cr-D₄C₁₂** については直径~10nm のミセル様会合体と思われるピークと 400 nm 程度のサイズを持つ会合体の形成がそれぞれ観測された。これは、**cr-D₄C₁₂** については親水頭部が大きく分子形状が円錐型となったことで、二分子膜形成能が下がり、代わりに球状ミセル形成の選択性が上がったものと考えられる。

2-3-3-4 TEM による会合形態の観察

前述の DLS 測定から、架橋型の PG-surfactant (**cr-D₂C₁₂**、**cr-D₃C₁₂**) に関して、非架橋 PG-surfactant と同様に、100 nm 程度の会合体の形成が確認され、球状二分子膜の形成が示唆された。そこで、TEM 測定から、溶液中での形態の確認を行った。測定サンプルは、DLS 測定に用いたサンプルと同様に、エマルジョン法により 1 mg/ml の濃度でサンプル調製を行った。測定溶媒には 50 mM carbonate buffer (pH 10) を用いた。

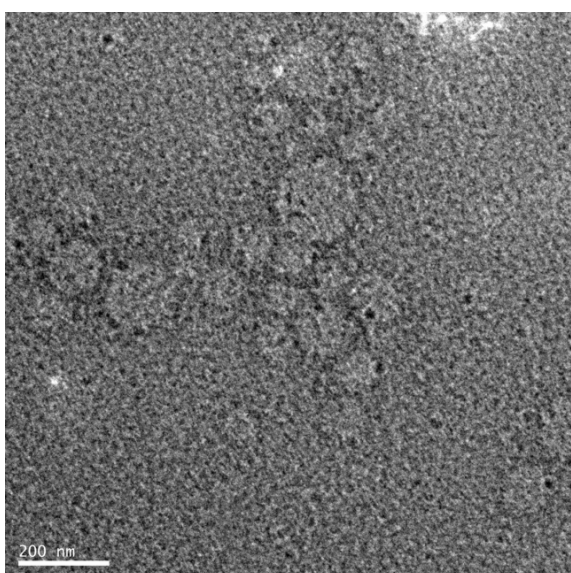


図 2-51 TEM による **cr-D₂C₁₂** の形成する会合体観察

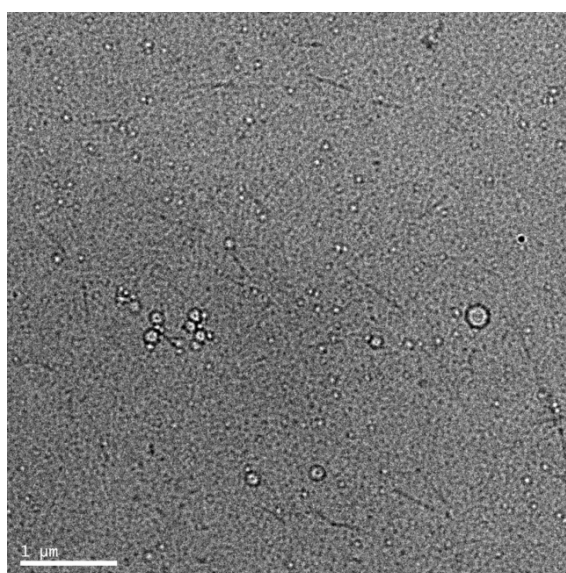


図 2-52 TEM による **cr-D₃C₁₂** の形成する会合体観察

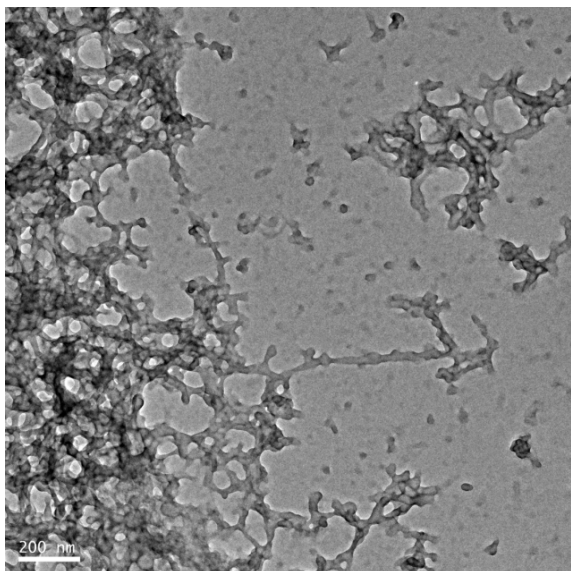


図 2-53 TEM による **cr-D₄C₁₂** の形成する会合体観察

TEM 測定の結果から、**cr-D₂C₁₂**、**cr-D₃C₁₂**については DLS で確認された直径 100 nm の会合体が、球状二分子膜であることが確認された。サイズのばらつきは見られたものの、大まかなサイズに一致も見られた。またこれらの形態は、**D₃C₁₂**、あるいは **D₄C₁₂** で観測されたものとも類似していた。

一方で、**cr-D₄C₁₂**については、全体的には何も写らない箇所が多く見られたが、図 2-5 3 に見られるように一部で巨大な網状の構造物が見られた。DLS からは、400 nm 程度の会合体の形成が示唆されたが、こちらとの一致は見られていない。これらを総合的に考察すると、DLS や TEM 測定で見られているものは、**cr-D₄C₁₂** の形成するミセル同士が集合しペプチド部分の水素結合により、不均一な凝集体が形成されているのではないかと考えられる。いずれにしても、**cr-D₄C₁₂** の大きな極性基部位の構造が、それらが会合しリポソーム様の球状二分子膜を形成するのには向いていないことが推測された。

2-3-3-5 AFM による基板上での会合挙動観察

合成した **cr-PG-surfactant** について非架橋 **PG-surfactant** と同様、平面二分子膜形成能を有しているかどうか評価を行った。PLL を予め固定化しカチオン修飾したマイカ基板上に、**cr-PG-surfactant** の形成する球状二分子膜溶液をラプチャーし、平面二分子膜化を行った後に、液中 AFM 観察を行った。エマルジョン法により調製した球状二分子膜の **cr-PG-surfactant** 濃度は 1 mg/mL で、50 mM carbonate buffer (pH 10) を溶媒とした。AFM 観察の際には、MilliQ 水で覆ったマイカ基板上に、**cr-PG-surfactant** 球状二分子膜溶液を少量加え、カチオン化したマイカ基板上に固定化し、測定サンプルとした。

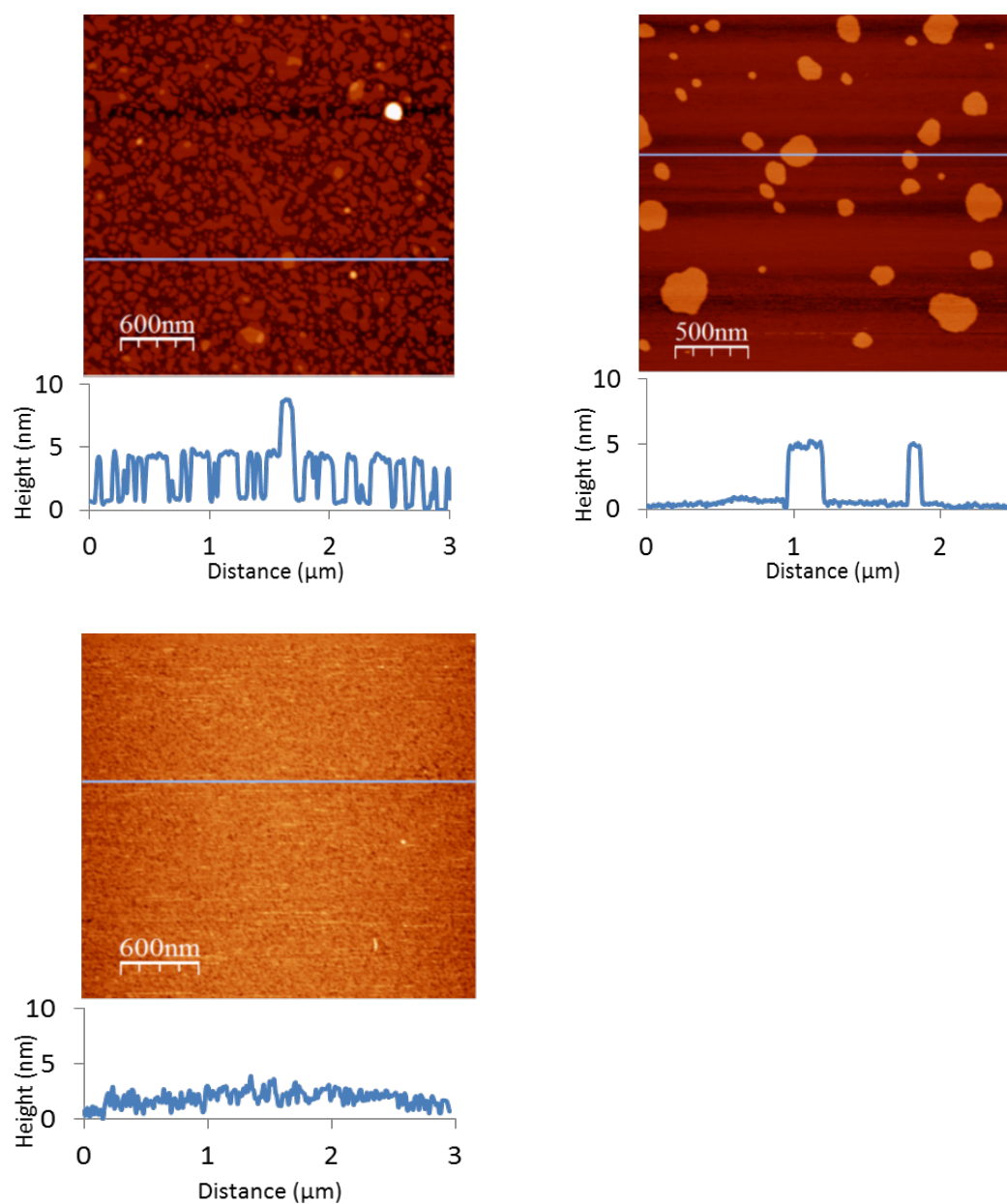


図 2-54 AFM による基板上での平面二分子膜形成能観察
 左上：cr-D₂C₁₂ 右上：cr-D₃C₁₂ 左下：cr-D₄C₁₂

その結果 cr-D₂C₁₂、cr-D₃C₁₂ については D₃C₁₂ などと同様、一様に高さの揃った分子膜のテラス構造が観察された。マイカ表面からの高さ（約 5 nm 程度）情報から、ちょうど cr-D₂C₁₂ あるいは cr-D₃C₁₂ の 2 分子長と一致したことから、平面二分子膜が形成されているものと思われる。ただし、D₃C₁₂、D₄C₁₂ などに比べると、若干ではあるが、平面二分子膜の高さが低くなる傾向も見られた。これは、架橋構造のあるなしによる、ペプチド鎖部分の立体構造の違いに起因する

のかもしれない。

一方 **cr-D₄C₁₂** では、2-3 nm 程度の細かい凝集体の吸着は見られたものの、平面二分子膜の形成は見られなかった。原因としては親水頭部が大きすぎるため、平面状にうまく集積化しにくいことや、親水性が高すぎることで基板表面に吸着されにくいなどの原因が考えられた。

2-3-3-6 DTT による還元雰囲気下の影響

cr-PG-surfactant が分子内に S-S 結合による架橋構造を持つことから、還元雰囲気下では分子内の S-S 結合解裂による架橋構造の消失が期待される。またその場合、**cr-PG-surfactant** の形成する会合体も酸化、還元に対して応答性が予測された。そこで、マイカ基板に **cr-PG-surfactant** を平面二分子膜化したサンプルに対して、過剰の還元剤 (DTT) を添加することによる AFM 画像への影響を次に調べた。ちなみに、会合した **cr-PG-surfactant** 分子のいくつかの分子内ジスルフィド架橋が隣り合った分子間の架橋に掛け変わってその構造を形成していた場合にも、同様の応答性をもつ可能性は考えられた。

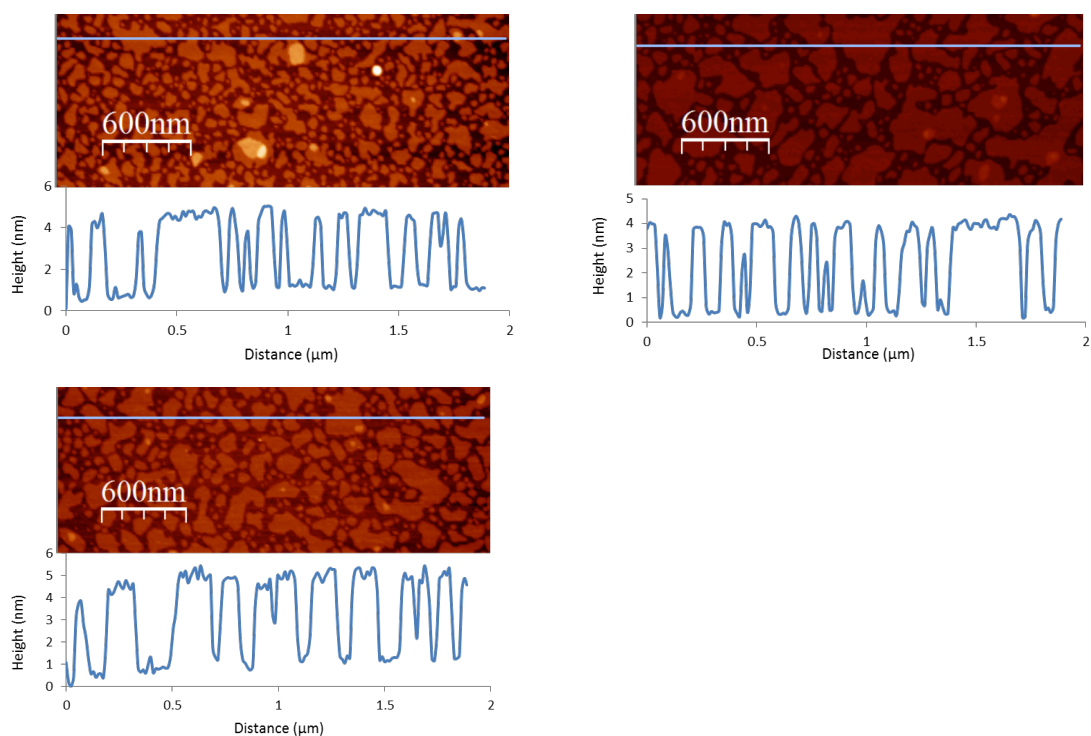


図 2-55 AFM による基板上的での **cr-D₂C₁₂** の会合挙動観察 (左上: DTT 添加前 右上: DTT 添加直後 左下: DTT 添加 60 分後)

これらの結果より、DTT 添加前にマイカ基板の上に形成されていた平面二分子膜は DTT を添加して時間が経過した後も特に大きな変化を見せることはなかった。

続いてバッファー溶液中における $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ の会合体に対する DTT 添加の影響を、DLS で粒径を測定することにより評価した。

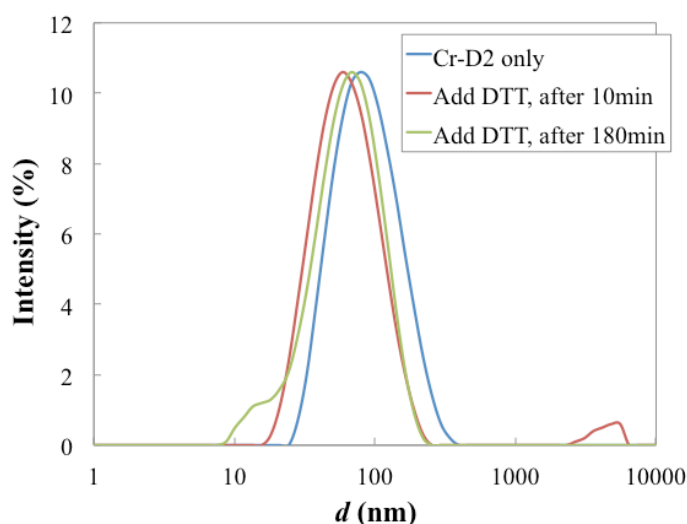


図 2-56 DLS による DTT 添加時の $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ 会合体の粒径分布評価
青：添加前 赤：添加 10 分後 緑：添加 180 分後

その結果、AFM の結果と同様に DTT を添加して時間経過した後も、若干の粒径の減少は見られたものの、粒径分布が大きく変わることはなかった。

これら AFM と DLS の結果から、 $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ が膜構造を形成した際、ジスルフィド架橋した部分はより疎水鎖側に存在しており、還元雰囲気条件下においても還元されずに構造の変化を起こさなかったのではないかと考えられた。

2-3-3-7 光退色後蛍光回復法 (FRAP)による膜流動性の評価

$\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ 、 $\text{cr-D}_3\text{C}_{12}$ がカチオン修飾した基板の上に形成した平面二分子膜について流動性の有無を確認するため、FRAP 測定を行った。図 2-5 7 に $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ 二分子膜、図 2-5 8 に DOPG 二分子膜へのレーザー照射直後、1 分後、3 分後、5 分後、10 分後、15 分後の褪色箇所の画像変化をそれぞれ示した。

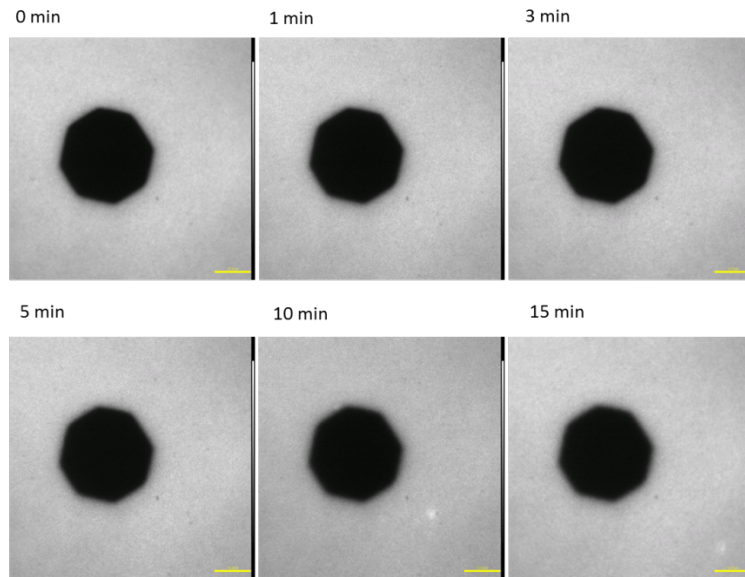


図 2-57 蛍光顕微鏡による光褪色後の平面二分子膜観察 (サンプル: $cr-D_2C_{12}$
 上段左からレーザー照射直後・1分後・3分後 下段左から5分後・10分後・15分後)

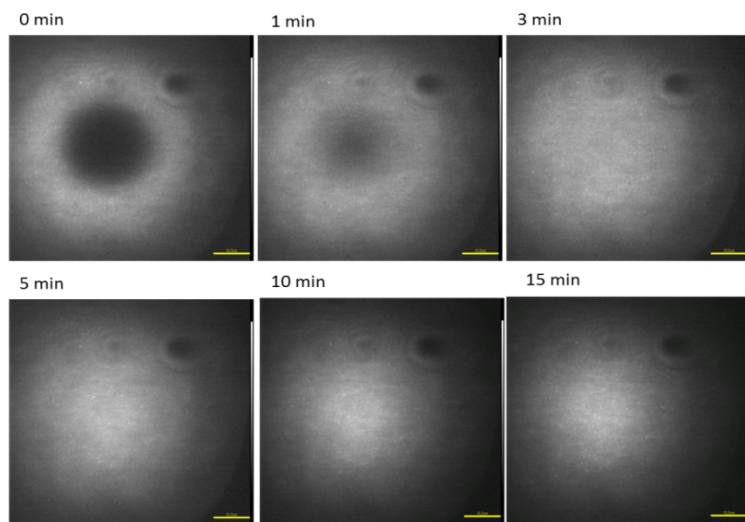


図 2-58 蛍光顕微鏡による光褪色後の平面二分子膜観察 (サンプル: DOPG
 上段左からレーザー照射直後・1分後・3分後 下段左から5分後・10分後・15分後)

またこの観察画像から求められる褪色部分の面積を用いて、蛍光回復した面積比率を求め時間毎にプロットしたグラフを図 2-59 に示した。

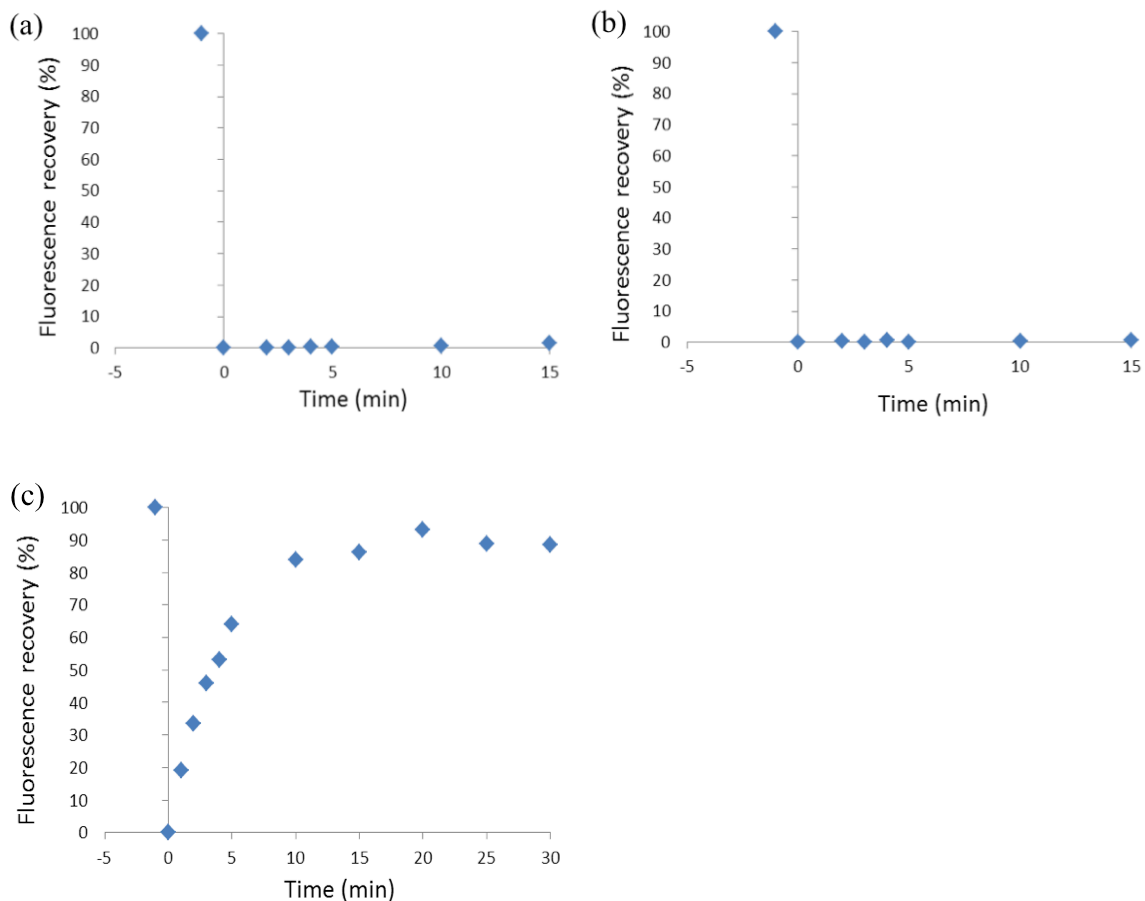


図 2-59 時間に対する光褪色部分の蛍光回復率
(a) cr-D₂C₁₂ (b) cr-D₃C₁₂ (c) DOPG

図 2-5 7 には **cr-D₂C₁₂** の結果を載せたが、図 2-5 8 に示した **DOPG** の結果とは大きく異なり、光褪色後蛍光強度の回復は見られなかった。なお、測定結果は載せていないが、**cr-D₃C₁₂** についても同様に蛍光回復は見られなかった。

表 2-5 FRAP 測定から算出された t_{half} (min.)

二分子膜形成分子	t_{half} (min.)
cr-D₂C₁₂	>1000
cr-D₃C₁₂	>1000
DOPG	4.3

表 2-5 に具体的に t_{half} (min.) の結果を纏めたが、非架橋 PG-surfactant と同様に **cr-D₂C₁₂**、**cr-D₃C₁₂** の形成する二分子膜についても、蛍光回復が見られないことから、膜の流動性はほとんど無いことが分かった。

2-3-4 cr-PG-surfactant 二分子膜中への膜蛋白質の固定化

2-3-4-1 cr-PG-surfactant 二分子膜と LH2 の複合化評価

cr-D₂C₁₂ が形成する二分子膜中に膜蛋白質 LH2 を変性させることなく固定化出来るか、透析を用いた複合化を試みた。図 2-60 には OG 共存下、**cr-D₂C₁₂**、LH2 を共に溶解した溶液から、OG を透析により除いて複合化したサンプルの吸収スペクトルを示した。

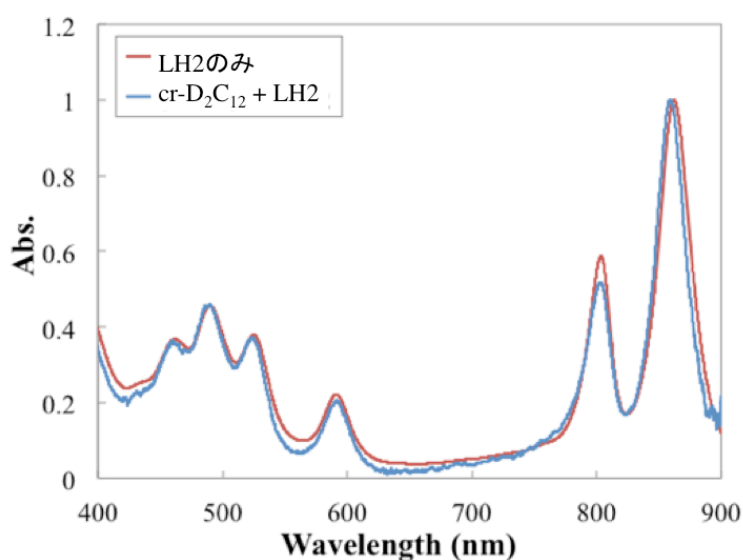


図 2-60 cr-D₂C₁₂ と LH2 の複合化後の吸収スペクトル

cr-D₂C₁₂ と LH2 を複合化後の B800 の吸光度を確認すると、やはり透析前の吸光度に比較して若干の吸収強度の低下は見られるものの、ほとんど強度変化が見られなかったことから、LH2 の構造変性は大分抑えられていることが確認された。**D₃C₁₂** での結果に比べるとその変性度合には明らかな差が見られ、LH2 の変性を抑えた複合化が可能となると示唆された。

2-3-4-2 ショ糖密度勾配法による複合化溶液の評価

続いて **cr-D₂C₁₂** と LH2 が複合化されて共存していることを確認するため、ショ糖密度勾配法により評価を行った。超遠心装置による遠心分離を行った後の各遠心チューブの画像を図 2-6 1 に示す。

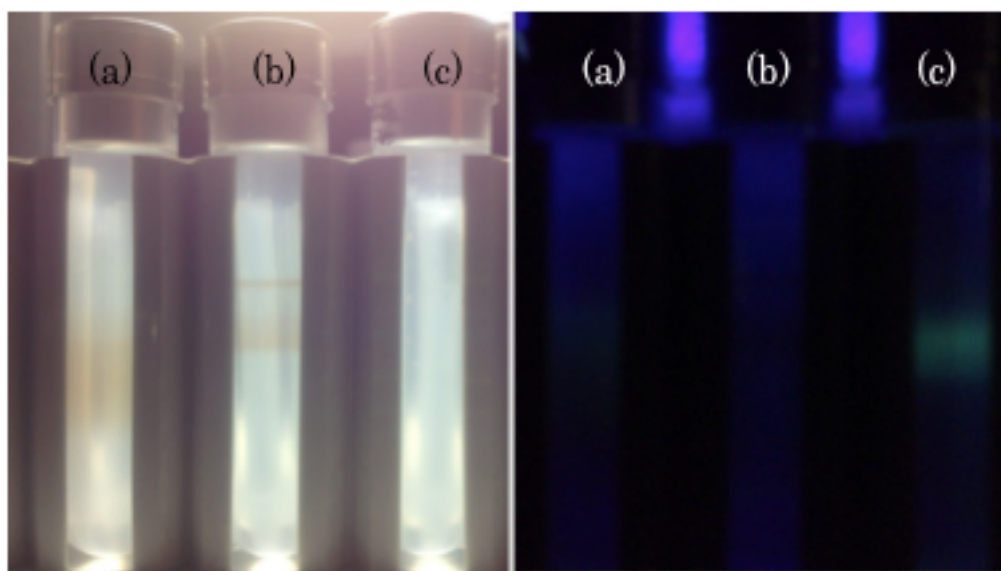


図 2-61 **cr-D₂C₁₂/LH2** 複合化溶液のショ糖密度勾配法による分析
左：明所 右：暗所で UV ランプ照射下 (a) LH2 (b) **cr-D₂C₁₂/LH2** (c) **cr-D₂C₁₂**

図 2-6 1 に見られるように、**cr-D₂C₁₂/LH2** 複合化溶液は比較サンプルである LH2 単独に比べ下の位置（比重がより重い）でバンドとなって現れた。また **cr-D₂C₁₂** 単独のバンド（内包させたダンシル化 **D₃C₁₂** による蛍光バンド）も LH2 単独に比べ下の位置に見られた。

次にこれら遠心チューブの液面より 1ml ずつ分取して上から順にフラクション 1, 2...とし、それぞれの吸収スペクトルを測定した。なお、265 nm に置ける吸収強度 A_{265} （ダンシル化 **D₃C₁₂** のダンシル基由来の吸光度）を、**cr-D₂C₁₂** の濃度評価に利用した。

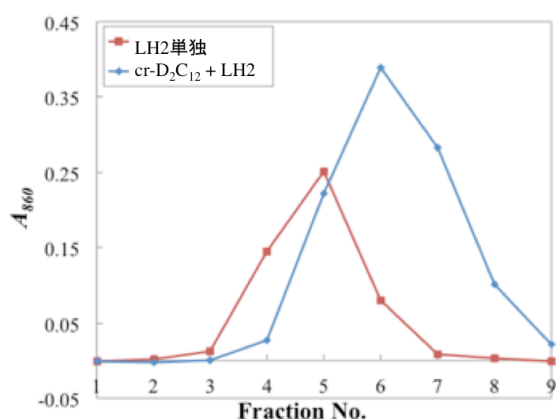


図2-62 LH2 単独と **cr-D₂C₁₂/LH2** 複合化溶液の各フラクションの B860 における吸収スペクトル
赤 : LH2 単独 青 : **cr-D₂C₁₂/LH2** 複合化溶液

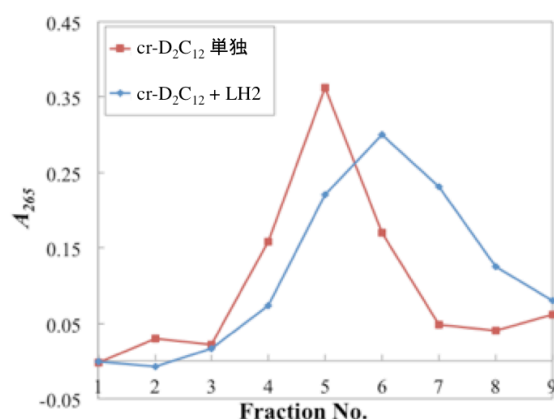


図2-63 **cr-D₂C₁₂** 単独と **cr-D₂C₁₂/LH2** 複合化溶液の各フラクションの A_{265} における吸収スペクトル
赤 : **cr-D₂C₁₂** 単独 青 : **cr-D₂C₁₂/LH2** 複合化溶液

図2-62より、LH2 単独は主にフラクション5に最も存在していることが分かる。それに対し **cr-D₂C₁₂/LH2** 複合体はフラクション6が極大となっていることが分かった。また図2-63より **cr-D₂C₁₂** 単独は主にフラクション5に最も存在しており、それに対し複合化溶液はフラクション6が極大となっていることが分かった。**cr-D₂C₁₂** と LH2 は単独ではフラクション5付近に分画されるが、複合化することでそれらが共にフラクション6付近に分画される、というこれらの結果から考えて、同程度の密度をもつ両者がプロテオリポソーム様に複合化することでその複合体1つ当たりの密度が大きくなり、より下のフラクション（比重の重い分画）で共存する結果となったのではないかと考えられる。これらの結果は、**cr-D₂C₁₂** の形成する二分子膜構造内に LH2 が複合化されていることを強く示唆するものであった。

2-3-4-3 DLS による複合体の粒径分布測定

LH2 を複合化させることで、**cr-D₂C₁₂** の溶液中での会合状態に影響があるのか調べるため DLS による粒径分布測定を行った。結果を図2-64に示す。

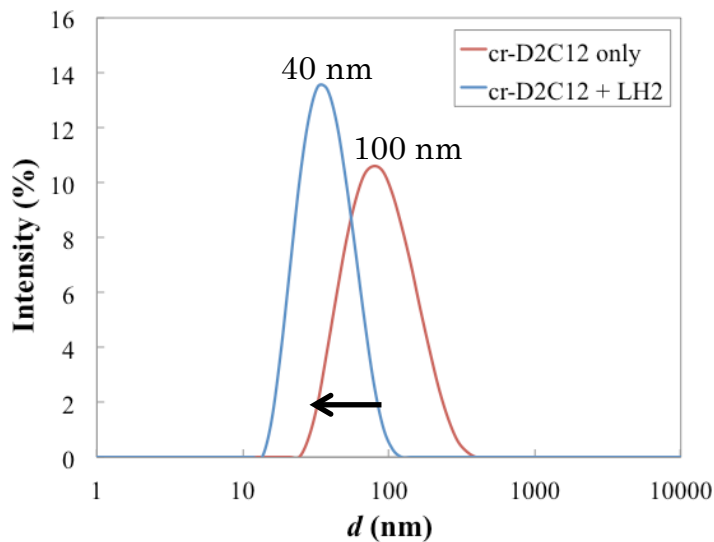


図 2-64 DLS による cr-D₂C₁₂/LH2 複合化溶液の粒径分布測定

cr-D₂C₁₂ 単独がエマルジョン法により形成する 100 nm 程度の会合体と比較して、透析により複合化された溶液では 40 nm 程度と若干粒子径の低下が見られたが、D₃C₁₂ の場合と大きく異なり、均一なサイズの会合体が形成されていることが分かった。この結果は、cr-D₂C₁₂ の形成する二分子膜構造を崩すことなく、膜蛋白質 LH2 を安定に固定化できていることを示唆するものであった。

2-3-4-4 TEM による複合体の形態観察

DLS による粒径分布測定の結果、二分子膜構造が崩れていないことが示唆された。これを裏付けるため、TEM により形態観察を行った。ポータル支持膜を持つ Cu グリッド上に cr-D₂C₁₂/LH2 複合体のサンプルをキャスト後、リンタングステン酸水溶液 (1.7wt%) により染色を行い測定を行った。

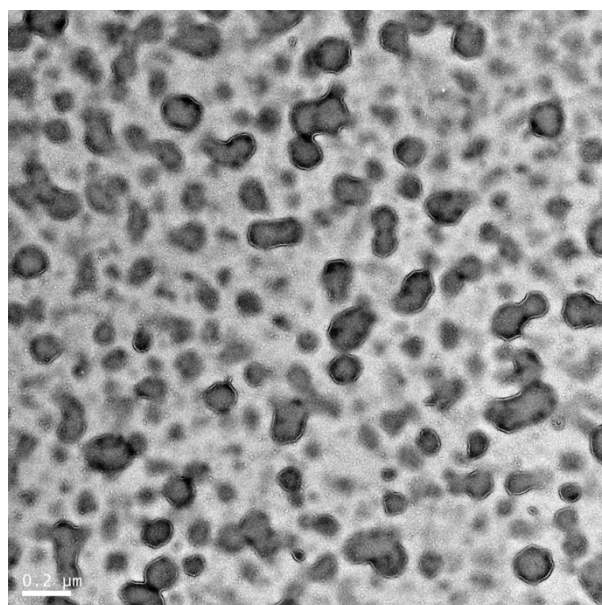


図 2-65 TEM による溶液中での $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ /LH2 複合形態の観察

図 2-6 5 より、プロテオリポソーム様の袋状の会合体と思われる、粒径の揃った球状会合体を多数観察することができた。むしろ $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ 単独での TEM 測定よりもはっきりとベシクル様の会合体が観察できたことから、LH2 が組み込まれたことで膜の安定が増強し、粒子径のサイズが小さく規定され、さらにベシクル構造も安定化された可能性が考えられた。

2-3-4-5 AFM による基板上での複合体の観察

D_3C_{12} /LH2 複合体と同様に、 $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ /LH2 複合化溶液を、PLL を予め吸着させたカチオン修飾したマイカ基板上へラプチャーし、AFM にて液中観察を行った。結果を図 2-6 6 に示す。

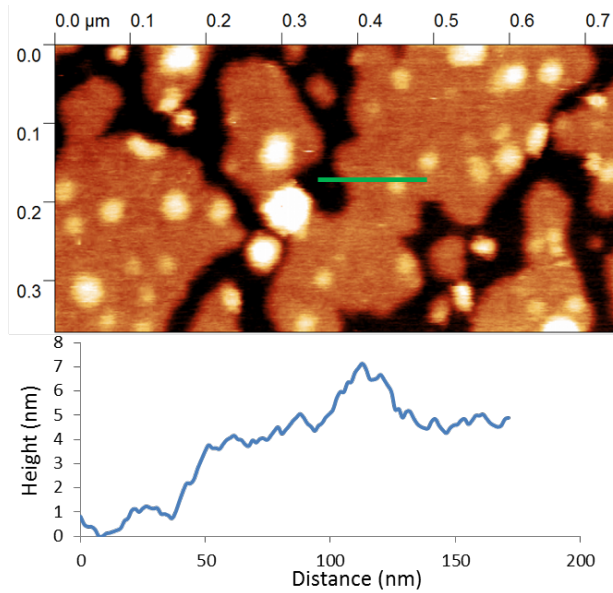


図 2-66 AFM による基板上での $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ /LH2 複合形態の観察

観察の結果、一様に高さの揃ったテラス構造の平面二分子膜と、その膜中に点在する 1~2 nm 程度の高さの突起が複数観察された。LH2 の高さが膜外領域を含め約 6~7 nm と推測され、 $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ の二分子膜高さが 5 nm 程度であることから、この突出が膜に固定化された LH2 であると考えられる (図 2-6 7)。 D_3C_{12} の結果と比べ明らかに膜構造が保たれており、DLS、TEM の結果と合わせて考えるに、LH2 を固定化できうる安定性をもった二分子膜の作製に成功したといえる。

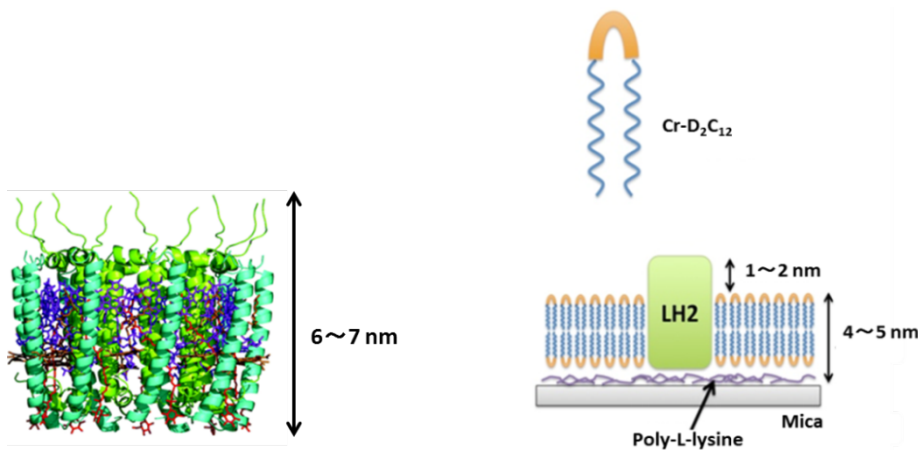


図 2-67 LH2 の推測される高さ (左) と LH2 が固定された $\text{cr-D}_2\text{C}_{12}$ 二分子膜モデル (右)

2-4 まとめ

本研究では新規のペプチド含有界面活性剤として、オリゴ Asp 残基をスペーサーとしたジェミニ型骨格の新規界面活性剤分子 PG-surfactant を設計し、またそれらの機能評価を行った。

2-3-1 項では直鎖状のオリゴ Asp 残基をスペーサー部位とした PG-surfactant、 D_2C_{12} 、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} 、 D_5C_{12} 、 D_3C_{14} 、 D_3C_{16} の合成と二分子膜系性能に関して評価を行い、これらの実験結果を示した。

合成法に関しては、長鎖アルキルアミド基を予め Fmoc-Cys-OH の側鎖に導入した Fmoc-Cys-OH 誘導体を合成し、PG-surfactant を全て固相上で合成する方法を適用したことで、一連のオリゴ Asp ペプチドをスペーサー部位に持つ PG-surfactant を全て十分な収率、純度で得ることができた。この合成法は今後様々なペプチド配列の PG-surfactant 合成に適応可能と期待させた。

物性評価として、表面張力法を用いた臨界凝集濃度 (cac) の算出を行った。今回検討を行った全ての PG-surfactant について、濃度上昇に伴う表面張力値の変化に、1つの変曲点が見られ、cac 値の算出が可能であった。一方で、いずれも変曲点以降も表面張力値の減少が観測されたことから、単純にミセル様の会合体が形成するだけではなく、それより高次の会合体（球状二分子膜や、ぶどう状ミセル会合体など）の形成が示唆された。また、最も低い cac 値を与えたのは D_3C_{12} であり、会合に対して最適なペプチドスペーサー部位の長さが存在することが分かった。さらに、3つの Asp 残基からなるペプチドスペーサーを持つ PG-surfactant (D_3C_{12} 、 D_3C_{14} 、 D_3C_{16}) に関して、長鎖アルキル基部位の長さの影響を検討したところ、意外なことにより炭素鎖長の短い、 C_{12} のもの (D_3C_{12}) について、最も低い cac 値を与えた。これはアルキル鎖長の長さの増加に従い水溶液中での溶解度が減少する効果が主たる原因と考えられた。すなわち D_3C_{14} 、 D_3C_{16} などが、溶液の見目ではなくマイクロなレベルで凝集が起これ、うまく表面張力測定ができていないことである。

次に、PG-surfactant の基板表面への二分子膜形成能に関して評価を行った。リン脂質の球状二分子膜を基板上に平面二分子膜化させる方法と同様に、ポリ-L-リジン臭素酸塩をマイカなどの基板表面に予め吸着させ、ここに PG-surfactant 溶液をラプチャーする方法を検討した。作製したサンプルを原子間力顕微鏡 (AFM) により観察したところ、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} 、 D_3C_{14} 、 D_3C_{16} に関してのみ平面二分子膜の形成が確認できた。ペプチドスペーサー間の距離が短い、 D_2C_{12} や、逆

に長い D_5C_{12} に関して平面二分子膜の形成が見られなかったことから、親水頭部の荷電数や長さが平面二分子膜形成能に大きく影響を及ぼしていることが分かった。

さらに、このような平面二分子膜形成能の違いを理解するため、溶液中での会合挙動に関して、動的光散乱 (DLS) 測定、透過型電子顕微鏡 (TEM) 測定を行った。その結果、平面二分子膜の形成に成功している D_3C_{12} 、 D_4C_{12} に関して、DLS、TEM 測定いずれからもリポソーム様の球状二分子膜の形成が確認された。一方で D_5C_{12} に関しては、溶液中で同様に球状二分子膜の形成が示唆されたが、一方で AFM 測定からは平面二分子膜の形成は見られなかった。このような挙動の不一致は、親水頭部の大きさの影響が考えられ、球状のモルフォロジーであれば構造的に許容であるが、平面上に集積される場合には不安定化されたものと思われる。

また、PG-surfactant による球状二分子膜の選択的な作製法として、エマルジョン法の検討を行った。有機溶媒への溶解度が低いために水和法、エタノールインジェクション法などのリン脂質における球状二分子膜作製法が適用できなかったことからこの方法を検討した。この方法により調製したサンプルの粒径分布を DLS で測定したところ、ベシクル様会合体のものと思われる直径約 100 nm のピークが 1 ピークで得られ、溶解後室温で一週間エイジングすることにより二分子膜の形成を行ったサンプルに比べて粒子径の分散度も小さくなった。このことから PG-surfactant を用いた二分子膜形成には、エマルジョン法が適していることが明らかとなった。

2-3-2 項では、PG-surfactant が形成する二分子膜を用いた各種評価を行った。FRAP 測定の結果、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} 二分子膜はどちらも流動性をほとんど持たないことが明らかとなった。隣接分子同士がアルキルアミン誘導体の接続部分のアミド結合により水素結合をしている可能性があり、これによって流動性が抑制されていることが考えられる。 D_3C_{12} 二分子膜と LH2 の複合化を透析により行った結果、その溶液状態から可溶化はできているものの、吸収スペクトルから LH2 が 20 %程度変性していることが示唆された。またこの溶液をショ糖密度勾配法により評価したところ、LH2 単独に比べ下のフラクションまでブロードしていたことから、 D_3C_{12} と LH2 が相互作用していることは示唆された。しかし、DLS による粒径分布測定の結果、直径 10 nm 程度のミセル状態と思われるピークと凝集しているようなピークが観測され、AFM による基板上での観察の結果から

も粒状に吸着した会合しか見られなかったことから、 D_3C_{12} の二分子膜性が失われ LH2 の固定化ができていないと考えられ、 D_3C_{12} 二分子膜中への LH2 の導入は困難という結果となった。

2-3-3, 2-3-4 項ではこの結果を踏まえ、膜蛋白質の固定化が可能な二分子膜形成分子の構築を目指した。そこで疎水鎖の向きを揃えるため分子内架橋を施した PG-surfactant、cr-PG-surfactant を設計合成し、物性評価を行った。

DTNB による SH 基の定量の結果、各 cr-PG-surfactant のバッファー溶液中でのフリーの SH 基残存率はそれぞれ 2%以下と算出されたことから、ほぼ全ての SH 基が分子内ジスルフィド架橋を形成していることが分かった。

次に cr-PG-surfactant の濃度変化に伴う ANS の蛍光強度変化から各 cr-PG-surfactant の cac 値の算出を行った。その結果、全ての cr-PG-surfactant で濃度に対する蛍光強度にひとつの変曲点が見られ、cac 値を定義することができた。その中でも cr- D_2C_{12} で最も低い cac 値が観測されたことから、cr-PG-surfactant の中で最も高い会合能を持つと考えられた。また蛍光色素を用いた cac 値測定は、今回の cr-PG-surfactant のような表面張力法や電気伝導度測定などが適用できないサンプルに対しても適応可能であり、今後も様々な PG-surfactant に有用であると考えられた。

DLS による溶液中での会合体の粒径分布評価の結果、cr- D_2C_{12} 、cr- D_3C_{12} については直径 100 nm オーダーの会合体のピークが単独で得られ、一方で cr- D_4C_{12} については直径~10 nm のミセル様会合体と思われるピークが主として観測された。また TEM による観察でも、cr- D_2C_{12} 、cr- D_3C_{12} については DLS の結果と対応のつくサイズの球状二分子膜の形成が観察された。

AFM による cr-PG-surfactant のマイカ基板上での会合挙動観察の結果、cr- D_2C_{12} 、cr- D_3C_{12} について一様に高さの揃った（ちょうど二分子長の高さ）の分子膜のテラス構造が観察されたことから、非架橋型 PG-surfactant D_3C_{12} 、 D_4C_{12} と同様に、平面二分子膜の形成が明らかとなった。ちなみに FRAP 測定の結果、 D_3C_{12} 、 D_4C_{12} 二分子膜と同様に cr- D_2C_{12} 、cr- D_3C_{12} の形成する平面二分子膜も膜流動性をほとんど持たないことが明らかとなった。

平面二分子膜形成能を確認できたため、 D_3C_{12} 二分子膜と同様、cr- D_2C_{12} の形成する二分子膜中へ LH2 の固定化を試みた cr- D_2C_{12} 二分子膜と LH2 の複合化を透析法により行った結果、その溶液状態から可溶化はできており、さらに吸収スペクトルから D_3C_{12} と複合化を試みた場合と異なり、LH2 の変成は大分抑えら

れていることが確認された。またこの溶液をショ糖密度勾配法により評価したところ、LH2 単独 **cr-D₂C₁₂** 単独と比べて異なる比重を持つ成分となっていることが確認され、プロテオリポソーム用の会合体の形成が強く示唆された。次いで DLS による粒径分布測定を行ったところ、40 nm 程度で均一に粒径の揃った会合体が形成されていることが分かり、これを TEM で観察したところ DLS の結果と対応のつくサイズのベシクル様会合体が多数観察された。これらの結果を踏まえると、**cr-D₂C₁₂** の二分子膜構造が崩れることなく LH2 が内包された、プロテオリポソーム様の複合体となっているために、LH2 変性度合の低減、ベシクル 1 つあたりの密度の増加、粒径の均一化が起きたと考えられる。このプロテオリポソームを、ポリ-L-リジン臭素酸塩を吸着させたマイカ基板にラプチャーすることにより形成される平面二分子膜の AFM による観察からも、一様に高さの揃った **cr-D₂C₁₂** のテラス構造の平面二分子膜と、その膜中に固定化された LH2 の膜外領域と思われる 1~2 nm の高さの突出が確認された。

参考文献

- 1) J.U. Bowie, *Nature*, **438**, 581-589 (2005).
- 2) S. Iwata, J. W. Lee, K. Okada, J. K. Lee, M. Iwata, B. Rasmussen, T. A. Link, S. Ramaswamy, B. K. Jap, *Science*, **281(5373)**, 64-71 (1998).
- 3) J. Abramson, I. Smirnova, V. Kasho, G. Verner, H. R. Kaback, S. Iwata, *Science*, **301(5633)**, 610-615 (2003).
- 4) K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, *Science*, **303(5665)**, 1831-1838 (2004).
- 5) N. Kahya, E.-I. Pe'cheur, W. P. de Boeij, D. A. Wiersma, D. Hoekstra, *Biophys. J.* **81**, 1464-1474 (2001).
- 6) A. Chanturia, L. V. Chernomoridik, J. Zimmerberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 14423-1428 (1997).
- 7) T. Dewa, K. Yoshida, M. Sugimoto, R. Sugiura, M. Nango, *e-J. Surf. Sci. Nanotech.*, **3**, 145-150 (2005).
- 8) T. Dewa, T. Yamada, M. Ogawa, M. Sugimoto, T. Mizuno, K. Yoshida, Y. Nakao, M. Kondo, K. Iida, K. Yamashita, T. Tanaka, M. Nango, *Biochemistry*, **44**, 5129-5139 (2005).
- 9) Mi. A-Ochsner, Z. Fu, S. May, L. Y. Xiu, M. Nallani, E.-K. Sinner, *Langmuir*, **28**, 2044-2048 (2012).
- 10) E. Rakhmatullina, W. Meier, *Langmuir*, **24**, 6254-6261 (2008).
- 11) S. F.-Lopez, H. S. Kim, E. C. Choi, M. Delgado, J. R. Granja, A. Khasanov, K. Kraehenbuehl, G. Long, D. A. Weinberger, K. M. Wilcoxon, M. R. Ghadiri, *Nature*, **412**, 452-455 (2001).
- 12) J. D. Hartgerink, E. Beniash, S. I. Stupp, *Science*, **294(5547)**, 1684-1688 (2001).
- 13) H. Matsui, B. J. Gologan, *Phys. Chem. B.*, **104**, 3383-3386 (2000).
- 14) S. Cavalli, J.-W. Handgraaf, E. E. Tellers, D. C. Popescu, M. Overhand, K. Kjaer, V. Vaiser, N. A. J. M. Sommerdijk, H. Papaport, A. Kros, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 13959-13966 (2003).
- 15) S. Zhang, *Nat. Biotech.*, **21**, 1171-1178 (2003).
- 16) M. Kogiso, Y. Okada, T. Hanada, K. Yase, T. Shimizu, *Biochem. Biophys. Acta.*, **1475**, 346-352 (2000).
- 17) M. G. Ryadnov, D. N. Woolfson, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 3021-3023 (2003).

- 18) E. F. Marques, R. O. Brito, S. G. Silva, J. E. Rodriguez-Borges, M. L. do Vale, P. Gomes, M. J. Araujo, O. Söderman, *Langmuir*, **24**, 11009-11017 (2008).
- 19) R. Kiagus-Armad, A. Brizard, C. Tang, R. Blatchly, B. Desbat, R. Oda, *Chem. Eur.*, **17**, 9999-10009 (2011).
- 20) T. Kunitake, Y. Okahata, S. Yasunami, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 5547-5549 (1982).
- 21) A. Yaghmur, P. Laggner, S. Zhang, M. Rappolt, *PLoS ONE*, **5**, e479 (2007).
- 22) R. Bordes, J. Tropsch, K. Holmberg, *Langmuir*, **26**, 10935-10942 (2010).
- 23) F. M. Menger, C. A. Littau, *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, **113**, 1451-1452 (1991).
- 24) R. Zana, M. Benraou, R. Rueff, *Langmuir*, **7**, 1072-1075 (1991).
- 25) Y. P. Zhu, A. Masuyama, Y. I. Kirito, M. Okahara, M. Rosen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 626-632 (1992).
- 26) F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1906-1920 (2000).
- 27) G. McDermott, S. M. Prince, A. A. Freer, A. M. H.-Lawless, M. Z. Papiz, R. J. Cogdell, N. W. Isaacs, *Nature*, **374**, 517-521 (1995).
- 28) M. Z. Papiz, S. M. Prince, T. Howard, R. J. Cogdell, N. W. Issacs, *J. Mol. Biol.*, **326**, 1523-1538 (2003).
- 29) M. Lumbierers, J. M. Palomo, G. Kragol, S. Roehrs, O. Müller, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.*, **11**, 7405-7415 (2005).
- 30) B. Yang, R. D. DiMarchi, *Understanding of biology using peptides*, Springer, 88-89 (2006).
- 31) E. T. Kaiser, D. S. Lawrence, *Science*, **226**, 505-511 (1984).
- 32) R. M. Metrione, *Anal. Biochem.*, **120**, 91-94 (1982).
- 33) W. C. Chan, P. D. White, *Fmoc solid phase peptide synthesis: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford (2000).
- 34) E. D. Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato, V. Bocchini, *Anal. Biochem.*, **115**, 278-286 (1981).
- 35) S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, *Langmuir*, **19**, 2870-2879 (2003).
- 36) J. Bouffard, Y. Kim, T. M. Swager, R. Weissleder, S. A. Hilderbrand, *Org. Lett.*, **10** (1), 37-40 (2008).
- 37) A. Darszon, C. A. Vandenberg, M. Schönfeld, M. H. Ellisman, N. C. Spitzer, M. Montal, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **77**(1), 239-243 (1980)
- 38) S. Batzri, E. D. Korn, *Biochem. Biophys. Acta*, **298**(4), 1015-1019 (1973)

第3章 新規膜蛋白質可溶化試薬としての PG-surfactant の設計

3-1 緒言

現在、膜蛋白質可溶化試薬として種々の界面活性剤が用いられている。膜蛋白質可溶化試薬とは、元々生体膜に埋め込まれている膜蛋白質の疎水表面に結合することで、膜蛋白質を水溶液中に可溶化できる界面活性剤であるが、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のような通常のイオン性界面活性剤と異なり、蛋白質に変性を及ぼすことはない。そのため、通常の界面活性剤とは明確に区別されている。現在、膜蛋白質可溶化試薬として主に用いられているものには、親水部に単糖あるいは二糖類を持つ非イオン性界面活性剤である *n*-Dodecyl- β -D-Maltoside (DDM) や *n*-Octyl- β -D-Glucoside (OG)、正と負の電荷を共に持ち、電荷が分子内で中和された両性イオンである Lauryldimethylamine-*N*-oxide (LDAO)、さらに飽和炭化水素鎖の代わりにコール酸部位を持つ 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio] propanesulfonate (CHAPS) などがある。これらの可溶化試薬は比較的古くから用いられており、膜蛋白質可溶化の成功例が多い可溶化試薬として広く知られている¹⁾。

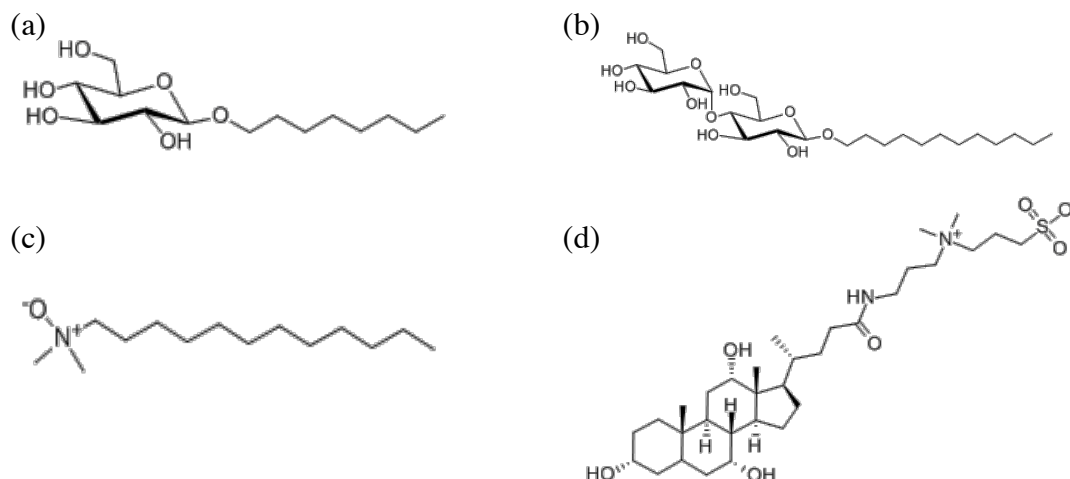


図 3-1 (a) *n*-Octyl- β -D-Glucoside (OG) の構造,
(b) *n*-Dodecyl- β -D-Maltoside (DDM) の構造
(c) *N,N*-dimethyldodecylamine-*N*-oxide (LDAO) の構造
(d) 3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS)

しかしながら、依然として膜蛋白質可溶化の成功例は限られており、例えば薬剤開発のターゲットとして注目されている G 蛋白質共役受容体(G-Protein

Coupled Receptor、GPCR)では、既存の膜蛋白質可溶化試薬では変性を抑えた可溶化は不可能であるとさえ報告されている。このような状況の改善のためには、可溶化試薬として利用可能な試薬の選択肢を増やすことが、合理的な解決法の一つと考えられる。しかしかといって、無作為に異なる分子構造をもった化合物をスクリーニングするのでは、実際に新規膜蛋白質可溶化試薬として利用可能な試薬にヒットする確立は、非常に低いという問題点もあった。

そこで、種類を膨大な数に増やすことが可能な新規界面活性剤の開発を目指す上で、我々はペプチド配列を含む界面活性剤に着目した。界面活性剤の分子構造内にペプチド配列を含むことで、ペプチド部分のアミノ酸配列の選択により、疎水-親水性のバランスから立体構造まで、性質の大きく異なる一連の試薬ライブラリーが容易に構築できると考えた。またさらに、高効率な可溶化能をもたせる上で、アルキル鎖を2つ持つ分岐型の分子骨格の利用にも着目した。アルキル鎖を2つ以上含む界面活性剤は一般的に「ジェミニ型界面活性剤」と呼ばれ、疎水鎖を複数持つことで、一本鎖型の界面活性剤に比べて一般的に会合能が高いという特徴をもつ²⁾⁵⁾。より低い濃度からミセル形成が可能であれば、可溶化に必要な界面活性剤の使用量が少なくなり、蛋白質に変性を招く因子が減らせるため、可溶化試薬開発のプラットフォームとしての優位性も期待された。

我々は以上の2点を考慮し、ペプチド骨格を含むジェミニ型界面活性剤(以下、PG-surfactant と呼ぶ)が、新規の膜蛋白質可溶化試薬の分子骨格として有用ではないかと考え、検討を行った。可溶化試薬として利用可能な PG-surfactant のコアペプチド部分の配列には、親水性アミノ酸であるアスパラギン酸(Asp)やリジン(Lys)を連続させたオリゴペプチドを選択することで、このコアペプチド部位が界面活性剤における親水頭部としての働きをすることを期待した。またこのコアペプチドの両端に疎水鎖として働くアルキルアミド鎖を修飾したシステイン(Cys(C₁₂))を配置することで2本の疎水鎖を導入した。導入する疎水鎖には、この PG-surfactant がミセル様の会合体を形成した際に、隣り合った分子同士で安定な水素結合も形成しうることを期待し、アミド結合を末端に有する長鎖アルキル鎖 C12 を採用した。

また、今回我々が新規に設計合成した PG-surfactant が膜蛋白質の可溶化試薬として利用可能か検討するための膜蛋白質には、好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* 由来の光化学系 I (PSI)⁶⁾と *T. vulcanus* 由来の光化学系 II (PSII)⁷⁾を用い

た。これらの膜蛋白質はチラコイド膜中に存在し光合成の明反応に参与している。

簡単にチラコイド膜内における光化学反応について説明する。チラコイド膜には4つの巨大なタンパク質複合体が存在し、光化学系 II 複合体のアンテナクロロフィル (Chl *a*) が光を吸収すると励起エネルギーが反応中心 (P680) に伝達される。P680 で励起された電子は反応中心を離れ、膜内に存在するプラストキノン (PQ) に伝達される。P680 が電子を失いホール (正孔) が生成すると、このホールは膜外ドメインに存在する酸素生成複合体の Mn-Ca クラスタ (Mn_4CaO_5) に運ばれ、酸素発生を伴う水分解が起こる (4 電子酸化反応)。PQ は光化学系 II から電子を受け取ると同時に、チラコイド膜外側の H^+ と結合し、膜内を移動する。PQ はチトクロム *b/f* 複合体に電子を渡し、 H^+ を膜外に放出する。さらに電子はチトクロム *b/f* 複合体からはプラストシアニン (PC) を経て光化学系 I 複合体の反応中心 (P700) に伝達される。光化学系 I では光化学系 II 同様に反応中心 (P700) での電荷分離を経て、電子が膜外に存在するフェレドキシン (Fd) に伝達される。Fd はフェレドキシン-NADP 酸化還元酵素 (FNR) を媒介することで、 NADP^+ に電子を渡し、NADPH が生産される⁸⁾。(図 3-2)

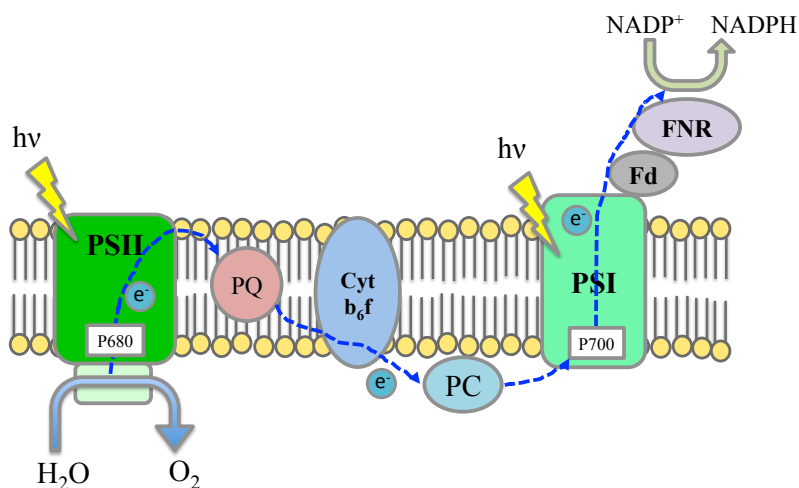


図 3-2 チラコイド膜での光化学反応の概略図

PSI、PSII は蛋白質の形成する超分子複体内に多数の色素成分、電子アクセプターとなる[4Fe-4S]クラスターなどを含み、分光学的な測定データから、それぞれの PG-surfactant ベースの可溶化試薬が膜蛋白質のどの位置に構造的ダメージが及ぼされているのか検討がし易いという利点を持つ。例えば、光誘起電

電子移動に伴う、酸素発生あるいは酸素減少などの反応速度を介して、電子移動効率の評価が酸素電極を用いて簡便に評価が可能である。そこで本章では、吸収スペクトルや蛍光スペクトル、過渡吸収スペクトル測定になどの分光法と、酸素電極を用いた電子移動活性の測定により、PG-surfactant ベースの新規界面活性剤の膜蛋白質かよいか試薬としての機能評価を行ったので以下に述べる。

3-2 実験項

3-2-1 PG-surfactant の合成

第 2 章 2-2-1 項で示したものと同様に長鎖アルキルアミドをあらかじめ Fmoc-Cys-OH 側鎖に導入した Fmoc-Cys(C₁₂)-OH を合成し、PG-surfactant をすべて固相上で合成する方法をとった。

3-2-1-1 種々の PG-surfactant の固相合成用担体上での合成

それぞれ合成した PG-surfactant は次のような配列をもつ。

以下に合成した **D₃C₁₂**、**D₄C₁₂**、**K₃C₁₂**、**K₄C₁₂**、**DKDKC₁₂**、**DKDKC₁₂D**、**DKDKC₁₂K** の HRMS による同定結果をまとめる。

D₃C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)Asp₃Cys(C₁₂)-NH₂) (62 mg、 29 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₄₈H₈₃N₈O₁₄S₂, 1059.5470; found, 1059.5474.

D₄C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)Asp₄Cys(C₁₂)-NH₂) (84 mg、 35 %)

HRMS (ESI-TOF, [M+Na]⁺): calcd. for C₅₂H₈₈N₉O₁₇S₂, 1174.5740; found, 1174.5743.

K₃C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)Lys₃Cys(C₁₂)-NH₂) (75 mg、 33 %)

HRMS (EI-TOF, [M+H]⁺): calcd. for C₅₄H₁₀₆N₁₄O₈S₂, 1100.7667; found, 1100.7656.

K₄C₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)Lys₄Cys(C₁₂)-NH₂) (73 mg、 29 %)

HRMS (EI-TOF, [M + Na]⁺): calcd. for C₆₀H₁₁₇N₁₃O₉S₂ + Na⁺, 1250.8436; found, 1250.8412.

DKDKC₁₂ (Ac-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂) (95 mg、 38 %)

HRMS (EI-TOF, [M + H]⁺): calcd. for C₅₆H₁₀₄N₁₁O₁₃S₂, 1202.7256; found, 1202.7253.

DKDKC₁₂D (Ac-Asp-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂) (113 mg、 41 %)

HRMS (EI-TOF, [M + Na]⁺): calcd. for C₆₀H₁₀₈N₁₂O₁₆S₂ + Na⁺, 1339.7345; found, 1339.7338.

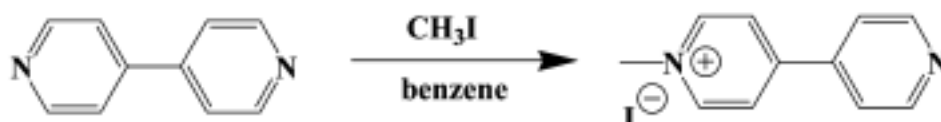
DKDKC₁₂K (Ac-Lys-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂) (110 mg、 40 %)

HRMS (EI-TOF, [M + H]⁺): calcd. for C₆₂H₁₁₆N₁₃O₁₄S₂, 1330.8206; found, 1330.8197.

3-2-1-2 MV-DKDKC₁₂K の合成

3-2-1-2-1 カルボキシ基修飾メチルピオロゲンの合成

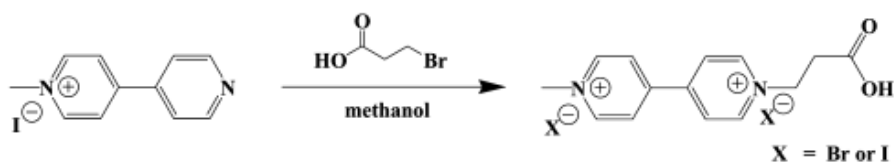
3-2-1-2-1-1 モノメチルピオロゲンの合成⁹⁾



窒素気流下、丸底フラスコにベンゼン(100 mL)、4,4'-bipyridyl (10 g、64 mmol) を加え、攪拌した。4,4'-bipyridyl が溶けた後、ヨードメタン(2.6 mL、42 mmol) を約 15 分かけ滴下した。すべて加え終わったら、48 時間窒素気流下室温で攪拌を行った。反応後エバポレーターにて溶媒留去し、残った黄色固形物をジクロロメタンで洗浄し(100 mL × 5 回)、目的物を得た。(7.32 mg、59%)
化合物の同定は ¹H-NMR にて行った。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, rt) 4.39 (*s*, 3H, CH₃-), 8.05 (*d*, 2H, pyridine-H-2'), 8.63 (*d*, 2H, pyridine-H-3'), 8.87 (*d*, 2H, pyridine-H-2), 9.15 (*d*, 2H, pyridine-H-3).

3-2-1-2-1-2 カルボキシ修飾メチルピオロゲンの合成⁹⁾



丸底フラスコにメタノール(100 mL)、3-2-1-1-1 項で合成したモノメチルピオロゲン (2.0 g、6.7 mmol)、3-ブロモプロピオン酸 (1.22 g、8.0 mmol) を加え、窒素気流下、還流条件で 36 時間反応を行った。反応後桐山漏斗にて黄色沈殿物をろ取りメタノールで洗浄を行い、目的物を得た。(665.2 mg、22%)
化合物の同定は ¹H-NMR にて行った。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, rt) 3.18 (*t*, 2H, CH₂-COOH), 4.45 (*s*, 3H, CH₃-), 4.91 (*t*, 2H, pyridine-CH₂-), 8.79 (*d*, 2H, pyridine-H-2'), 8.81 (*d*, 2H, pyridine-H-2), 9.31 (*d*, 2H, pyridine-H-3'), 9.42 (*d*, 2H, pyridine-H-3).

3-2-1-2-2 固相合成の担体上での **MV-DKDKC₁₂K** の合成

樹脂担体 Rink-amide resin (300 mg)を用い、Fmoc 固相合成により **MV-DKDKC₁₂K** (MV-Lys-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂)を合成した。メチルビオロゲンを修飾させるため、**DKDKC₁₂K** の最後のリジンを縮合した後、N-末端アミノ基のアセチル化は行わず、代わりに 3-2-1-1 項で合成を行ったカルボキシ基修飾メチルビオロゲンを縮合した。合成した **MV-DKDKC₁₂K** の収量と ESI-HRMS による同定結果を以下にまとめる

MV-DKDKC₁₂K (95 mg, 30.7 %)

HRMS (EI-TOF, [M + H]⁺): calcd. for C₇₄H₁₂₈N₁₅O₁₄S₂, 1514.9215; found, 1514.9294.

3-2-2 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定¹⁰⁾

第 2 章 2-2-2-2 項に記述したのと同様の方法で、蛍光プローブに ANS を用いて cac 値の算出を行った。今回は 20 mM phosphate buffer (pH 7) を用いて測定を行った。

3-2-3 DLS 測定による各 PG-surfactant の水溶液中での会合サイズの評価

各 PG-surfactant を 20 mM phosphate buffer (pH 7) に所定の濃度で溶解させ、測定を行った。粒径測定には、Zetasizer Nano ZS (MALVERN 社製) を用い、光源は He-Ne レーザー(λ= 632.8 nm)、非接触後方散乱光学系 (NIBS)、動的光散乱法 (DLS)により行った。

3-2-4 シアノバクテリア由来の光合成膜蛋白質、光化学系 I (PSI)、光化学系 II (PSII) の単離精製

3-2-4-1 シアノバクテリア由来の光化学系 I (PSI) の単離精製⁶⁾

膜蛋白質 PSI は、好熱性シアノバクテリア *T. elongatus* のものを用いた。*T. elongatus* のチラコイド膜 (クロロフィル濃度 1.0 mg-Chl/mL) を、1 wt% β-n-dodecyl-D-maltopyranoside (β-DDM) を含む緩衝液 [20 mM HEPES- NaOH (pH

7.2]、10 mM MgCl₂、25% (w/v) グリセロール] を用いて暗所で 30 分間 0 °C にてインキュベートをすることにより、PSI を含む膜蛋白質成分の可溶化を行った。可溶化処理を行ったチラコイド膜サンプルを超遠心分離 (107,000 x g、30 min) にかけることにより、チラコイド膜残渣と、膜蛋白質の可溶化された上清成分を分離した。PSI は天然型ではホモ 3 量体の構造をとっており、天然型の PSI 単離精製のためには、これが壊れることのできる PSI 単量体との分離も必要である。ここでは低圧陰イオン交換クロマトグラフィー (イオン交換樹脂 : Toyo Pearl DEAE650S, 東ソー製) により単離精製を行った。4 °C にて行い、溶離液には buffer C50 (30 mM MES-NaOH (pH 6.2)、0.03 wt% β-DDM、3 mM CaCl₂、0~500 mM の NaCl) を用いた。NaCl の塩濃度を 100 mM まで増加させることで PSI 単量体および PSII が先に溶出され、150 mM まで増加させることで最終的に天然型の 3 量体型 PSI が溶出された。純度確認は BN-PAGE によって行った。

3-2-4-2 シアノバクテリア由来の光化学系 II (PSII) の単離精製⁷⁾

膜蛋白質 PSII は、好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* のものを用いた。*T. vulcanus* チラコイド膜からの PSII の単離精製は、まずは 1 wt% β-DDM を含む緩衝液 [40 mM MES-NaOH (pH 6.5)、100 mM NaCl、15 mM CaCl₂、25% (w/v) グリセロール] を用いてチラコイド膜からの抽出可溶化を行い、その後 2 回低圧陰イオン交換クロマトグラフィー (イオン交換樹脂 : Toyo Pearl DEAE650S, 東ソー製) にかけることで精製を行った。PSII は天然型ではホモ 2 量体の構造をとっており、天然型の PSII の単離精製のためには、これが壊れることのできる PSII 単量体との分離も必要である。単離精製を行い得られた天然型 PSII は、20 mM MES-NaOH (pH 6.0) [20 mM NaCl、3 mM CaCl₂、25% (w/v) グリセロールを含む] に懸濁し、使用するまで液体窒素にて凍結保存した。

3-2-4-3 本実験で使用した buffer 一覧

可溶化用 buffer

PSI 可溶化 ; Buffer K2 (40 mM HEPES-NaOH (pH 7.8)、100 mM NaCl、
15 mM CaCl₂、15 mM MgCl₂)

PSII 可溶化 ; Buffer L2 (40 mM MES-NaOH (pH 6.5)、100 mM NaCl、
15 mM CaCl₂、15 mM MgCl₂)

酸素電極測定用 buffer

PSI ; Buffer K4 (40 mM HEPES-NaOH (pH 7.8)、100 mM NaCl、
15 mM CaCl₂、15 mM MgCl₂、0.4 M スクロース)

PSII ; Buffer L4 (40 mM MES-NaOH (pH 6.5)、100 mM NaCl、
15 mM CaCl₂、15 mM MgCl₂、0.4 M スクロース)

3-2-5 界面活性剤置換法を用いた各 PG-surfactant により可溶化された膜蛋白質 サンプルの調製

3-2-4 に記載した方法で単離精製された PSI、PSII のバッファー溶液 (0.1 wt% β-DDM を含む) に 50% (w/v) PEG 1450¹¹⁾ (Sigma-Aldrich) を終濃度 17% (w/v) となるように添加した。10 分間氷上で静置することで、PSI、PSII が沈殿化し溶液が濁ってくるので、遠心分離 (104,000 × g、30 min) にかけることで、沈殿化した PSI、PSII を得た。遠心後上清を捨て、さらに β-DDM を含まないバッファー (PSI の場合 Buffer K2、PSII の場合 Buffer L2) で 3 回程洗浄を行うことで、完全に β-DDM を除いた。その後、沈殿化した PSI、PSII に対して 0.1 % (w/v) の β-DDM、または 0.1 % (w/v) の各 PG-surfactant を含む緩衝液を加え、暗黒下氷上で 30min 静置することで、各 PG-surfactant により可溶化された PSI、PSII サンプルの調製を行った。

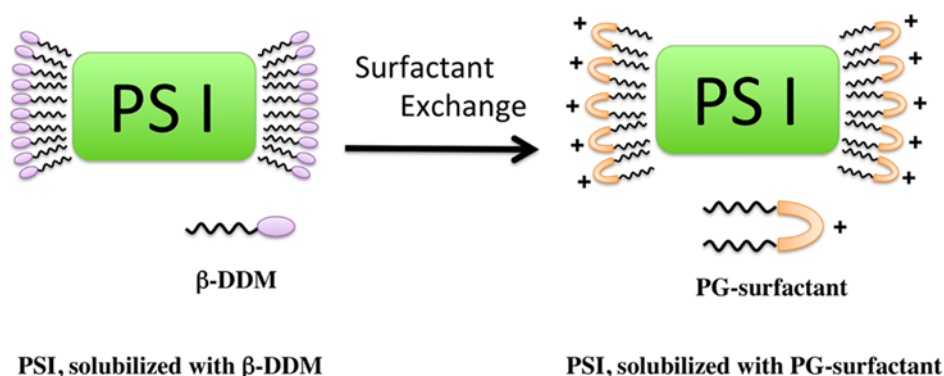


図 3-3 界面活性剤置換法による膜蛋白質可溶化試薬の置換

3-2-6 PG-surfactant で可溶化された PSI、PSII の吸収スペクトル測定による変性度合いの評価

3-2-5 に記載した方法で、PG-surfactant に界面活性剤が置換された PSI、PSII の溶液サンプルを調製し、吸収スペクトル測定を行った。PSI の測定溶液は、PSI 濃度 24 nM となるように Buffer K2 で希釈することにより調製した。PSII の測定溶液は、PSII 濃度 32 nM となるように Buffer L2 で希釈することにより調製した。いずれの場合においても、PG-surfactant の濃度は 0.1 wt% とした。

これらのサンプルで得られた吸収スペクトルを、0.1 wt% β -DDM を含む緩衝液で可溶化された PSI、PSII サンプルの吸収スペクトルと比較することで、それぞれの膜蛋白質の変性度合いを評価した。PSI、PSII は、0.1 wt% β -DDM を含む緩衝液で可溶化された場合において、Native 状態を保ち変性していないことが報告されており、全ての実験における Native 状態のコントロールとして用いた。

3-2-7 PG-surfactant で可溶化された PSI の 77K における蛍光スペクトル測定による、PSI への構造的影響の評価¹²⁾

3-2-5 に記載した方法で界面活性剤の置換された PSI サンプルについて、77 K における蛍光スペクトル測定を行った。専用のデュワー瓶中に液体窒素を注ぎ、セルを液体窒素温度で冷却しながら測定を行った。濃度消光をさけるため、薄い PSI 濃度 (0.005 mgChl/mL) となるように Buffer K2 にて希釈をした。測定には分光光度計 F-2500 (Hitachi 社製) を用いた。励起波長は 430 nm を用いた。

3-2-8 過渡吸収測定による PSI の P700⁺ の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化することの PSI への構造的影響の評価¹³⁾

3-2-5 に記載した方法で界面活性剤の置換された PSI サンプルについて、605 nm でのパルス励起後のスペシャルペア P700 由来の吸収帯 A_{698} の室温における経時変化測定を、split beam 分光光度計を用いて行った。フラッシュはキセノンフラッシュを用い、5 μ s パルスでほぼ飽和させる強度 (300 W) で用いた。Buffer K2 を用い、反応溶液として 10 μ M DCIP、1 μ M PMS、10 mM アスコルビン酸ナトリウム、[PSI] = 24 nM で測定は行った。 A_{698} の経時変化測定は、100 回の測定

を積算し平均したものを測定結果として用いた。

3-2-9 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価¹⁴⁾

25°Cにおける PSI の光誘起電子移動活性は、クラーク型の酸素電極（米国 Hansatech Instrument 社製、DWI、Oxygen Electrode Unit）を用い、溶存酸素濃度の減少速度から見積もった。光源は 550 W のハロゲンランプを用い、レッドフィルター（R-62、Hoya 社製）を通すことでクロロフィルやフィコビルンなどに吸収される長波長側の光を選択し利用した。また光源による熱の発生を緩和させるため、熱線カットフィルター（HA-50、Hoya 社製）や 12cm 程度の水槽を通すことで熱をカットした。サンプルは体積 1 mL 直径 1 cm の円柱状の測定セル（外部にウオータジャケットを備えている）に入れた。

まず Buffer K4 を測定セルに 1 mL 満たし、そこへ電子移動メディエーターとして dichloroindophenol (DCIP)、電子受容体として methyl viologen (MV^{2+}) をそれぞれ終濃度 0.5 mM になるように加え、装置が（溶存酸素濃度の測定値が）安定するまでしばらく待った。ついで、PSI の終濃度が 24 nM となるように PSI 溶液を加え、最後に還元的犠牲試薬であるアスコルビン酸ナトリウムを終濃度 2 mM となるように加えた。その後光源を点灯することで、溶存酸素濃度変化の測定は開始した。

3-2-10 PG-surfactant で可溶化された PSII の、酸素電極を用いた光誘起電子移動活性の評価¹⁴⁾

PSII の場合も 3-2-6 と同様にクラーク型の酸素電極（米国 Hansatech Instrument 社製、DWI、Oxygen Electrode Unit）を用いて測定を行った。PSII の場合は、光誘起電子移動に伴い酸素が生成するため、溶存酸素濃度の上昇速度から光誘起電子移動活性を見積もった。バッファ L4 を 1 mL 円柱状の測定セルに満たし、そこへ電子受容体として終濃度 0.5 mM となるように phenyl-*p*-benzoquinone を加え、溶存酸素濃度の測定値が安定するまでしばらく待った。PSII の終濃度が 24 nM となるように PSII 溶液を加えた。試薬をすべて入れ終わったら、光源を点灯することで、溶存酸素濃度の上昇速度を評価した。

3-2-11 酸素電極による **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化された PSI の活性評価

基本的に 3-2-9 項に述べた方法を用いて行った。測定には、クラーク型の酸素電極（米国 Hansatech Instrument 社製、DWI、Oxygen Electrode Unit）を用いた。ここでは **MV-DKDKC₁₂K** によって PSI 周囲に集積された MV^{2+} の影響について評価を行うため、 MV^{2+} 濃度に対する PSI の比を一定（167 等量）にして評価を行った。ちなみに PSI 1 ユニットを緩衝液中に可溶化するのに必要な、 β -DDM の最小分子数は 200 分子程度と報告されている¹⁵⁾。測定に用いた PSI 濃度は 12、24、36、48、72 nM で、それぞれに対して MV^{2+} あるいは **MV-DKDKC₁₂K** の濃度を 2、4、6、8、12 μ M とし評価を行った。まず、バッファー K4 [40 mM HEPES-NaOH (pH 7.8)、100 mM NaCl、15 mM CaCl₂、15 mM MgCl₂、0.4 M スクロース] を反応容器に 1 mL 満たし、そこへ電子移動メディエーターとして dichloroindophenol (DCIP) を終濃度 0.5 mM となるように加えた。 β -DDM を可溶化試薬として用いたサンプルの測定をする場合は MV^{2+} も所定の濃度（2、4、6、8、12 μ M）になるように加え装置が安定するまでしばらく待った。ここで各 MV^{2+} 濃度に対応する PSI 濃度（12、24、36、48、72 nM）となるように PSI の可溶化溶液（**MV-DKDKC₁₂K** で可溶化されたものか β -DDM で可溶化されたもの）を加えた。さらに、最後に還元的犠牲試薬であるアスコルビン酸ナトリウムを終濃度 2 mM となるように加えた。試薬をすべて入れ終えたら、光源を点灯することで、測定を開始した。

3-2-12 ITO 基板上に吸着させた **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化された PSI の光誘起電子移動挙動の評価¹⁶⁾

3-2-12-1 **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化された PSI の ITO 基板上への吸着固定化

ITO 基板は、UV オゾンクリーナー（NL-UV253、日本レーザー&エレクトロニクス研究室）を用いて洗浄を行い、さらにクロロホルムにより洗浄を行った。その後 100 μ M の 7-carboxy-1-heptanethiol（同仁化学研究所）クロロホルム溶液中に 16 時間浸漬を行う事で自己組織化単分子膜（SAM）による表面修飾を行った。その後、過剰の試薬をクロロホルム洗浄により取り除き、N₂ ガスで乾燥することで、COOH 末端 SAM 修飾 ITO 電極を得た。**MV-DKDKC₁₂K** で可溶化した PSI 溶液（40 mM HEPES-NaOH (pH7.8)、100 mM NaCl、15 mM MgCl₂、15

mM CaCl_2) に浸漬し、16 時間室温で静置する事で電極表面への吸着を行った。浸漬後、ITO 電極を慎重に緩衝液 (40 mM HEPES-NaOH (pH7.8)、100 mM NaCl、15 mM MgCl_2 、15 mM CaCl_2) で洗浄した後、 N_2 ガスで乾燥させた。

3-2-12-2 ITO 基板上へ吸着された PSI の吸収スペクトル測定

ITO 電極上に固定化された PSI の吸収スペクトルは、乾燥条件下で紫外可視分光光度計 (UV-1800、島津製作所製) を用いて測定した。

3-2-12-3 ITO 基板上へ吸着された PSI の光電流測定

3-2-12-1 で準備した、COOH 末端 SAM 修飾 ITO 基板上へ吸着された PSI からの光電流測定を行った。光電流は、3 つの電極が含まれているセルを用いて測定した：(1) 作用極として PSI 固定化電極 (2) 参照電極として銀/塩化銀 (飽和 KCl) (3) 対極として白金線。支持電解質に 0.1 M 過塩素酸ナトリウムを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いた。入射単色光は、SM-250 hyper-monolight system (分光計器社製) を用い 440 nm を選択した。

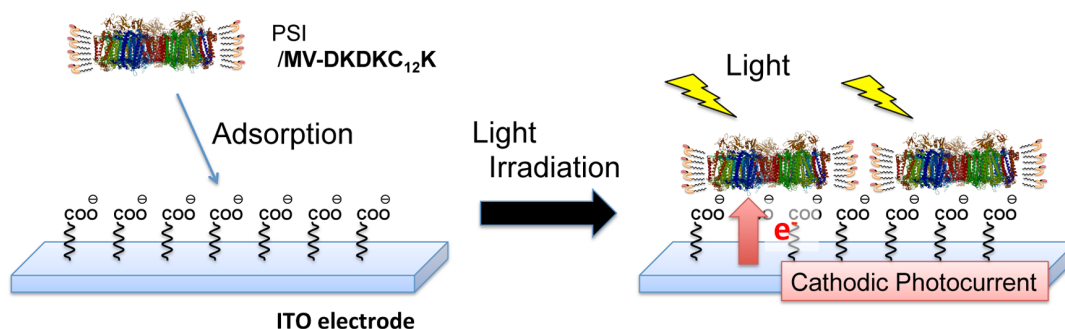


図 3-4 ITO 基板上への吸着および光電流測定の模式図

3-3 結果と考察

3-3-1 新規膜蛋白質可溶化試薬の開発

膜蛋白質の可溶化に対するペプチドスペーサーの最適化を検討するため、Asp 数が 3、4 つのもの(D_3C_{12} 、 D_4C_{12})、Lys 数が 3、4 つのもの(K_3C_{12} 、 K_4C_{12})のもの Asp と Lys を交互に並べたもの($DKDKC_{12}$)、これに電荷を偏らせるためさらに Lys、Asp を追加したもの($DKDKC_{12}K$ 、 $DKDKC_{12}D$)を Fmoc 固相合成により合成した。

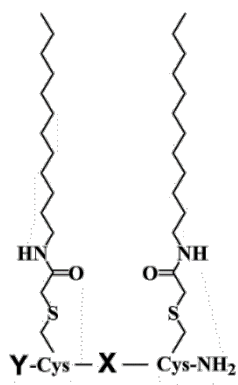


図 3-5 PG-surfactant の構造

表 3-1 評価を行ったペプチドジェミニ界面活性 (PG-surfactant) の一覧

PG-surfactant	X 部のペプチド配列	Y 部のペプチド配列
D_3C_{12}	-Asp-Asp-Asp-	Ac-
D_4C_{12}	-Asp-Asp-Asp-Asp -	Ac-
K_3C_{12}	-Lys-Lys-Lys -	Ac-
K_4C_{12}	-Lys-Lys-Lys -Lys-	Ac-
$DKDKC_{12}$	-Asp-Lys-Asp-Lys-	Ac-
$DKDKC_{12}K$	-Asp-Lys-Asp-Lys-	Ac-Lys-
$DKDKC_{12}D$	-Asp-Lys-Asp-Lys-	Ac-Asp-

3-3-1-1 緩衝溶液中での PG-surfactant の溶解挙動に関する考察

膜蛋白質可溶化試薬として PG-surfactant を用いるためには、中性で水に可溶、もしくはミセルをとることで水中に分散していることが望ましい。そこで、それぞれの PG-surfactant を各 pH の緩衝溶液 (pH 3、7、10) に溶かした。溶解度の判定は目視とした。以下表 3-2 に結果をまとめた。

表 3-2 各 PG-surfactant の溶解性

PG-surfactant	溶解性(緩衝溶液)		
	pH 3	pH 7	pH10
D₃C₁₂	×	×	○
D₄C₁₂	×	×	○
K₃C₁₂	○	×	×
K₄C₁₂	○	×	×
DKDKC₁₂	△	△	×
DKDKC₁₂K	○	○	×
DKDKC₁₂D	×	○	○

ペプチド配列の X の部分 (図 3-5) に酸性アミノ酸であるアスパラギン酸のオリゴマーを用いた、**D₃C₁₂**、**D₄C₁₂** は、pH 3、pH 7 の緩衝液には溶解せず、pH 10 の緩衝液には溶解した。対照的に、塩基性アミノ酸であるリジンのオリゴマーを用いた **K₃C₁₂**、**K₄C₁₂** では pH 7、pH 10 の緩衝液には溶解せずに pH 3 の緩衝液に溶解した。しかし、どちらの場合も目的とする中性 pH の緩衝液には溶解しなかった。そこで、酸性のアミノ酸と、塩基性のアミノ酸を互い違いに配列した zwitter ion 型の **DKDKC₁₂** を作製した。この PG-surfactant は pH 7 の緩衝液に溶解するようになったが、電荷を中和させてしまったために、溶解した数分後には凝集、沈殿化が見られた。これを解消するため、PG-surfactant のペプチド配列の N-末端側にリジンやアスパラギン酸を導入し (**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D**) 分子全体の電荷を偏らせることで、pH 7 の緩衝液中でも溶解できるのではないかと検討を行った。その結果、中性条件でも溶解可能となった。これは、新たに追加したアミノ酸の電荷が、ミセル形成後にミセル表面に配置されることで互いに反発し、ミセル同士の凝集が緩和されることで水中での分散性が向上されたためと思われる。

これらの結果から、膜蛋白質の可溶化試薬として応用が可能であると考えられるのは、中性の pH で溶解可能な **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** であると考えられ、膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価を行っていった。

3-3-1-2 表面張力法による PG-surfactant の cac 値測定

臨界ミセル濃度 cmc (あるいは臨界凝集濃度 cac) は、界面活性剤のキャラクタリゼーションにおいて重要である。臨界ミセル濃度の算出法には、表面張力法⁵⁾、伝導度法¹⁷⁾、蛍光プローブを用いた蛍光測定などの方法¹⁰⁾が知られているが、ここではまず表面張力法を用いて評価を行った。以下に表面張力測定の結果を示す。

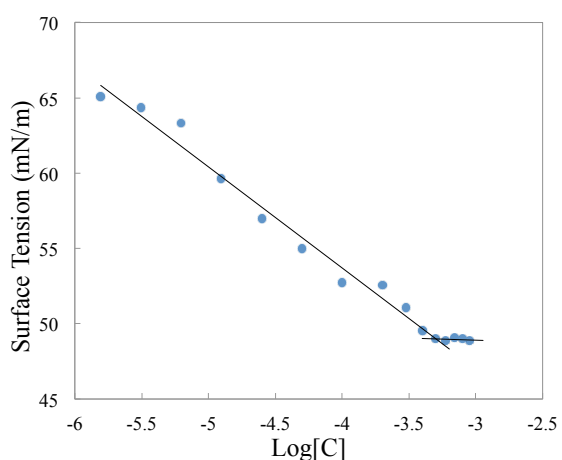


図 3-6 K_3C_{12} の対数濃度 対 表面張力のプロット

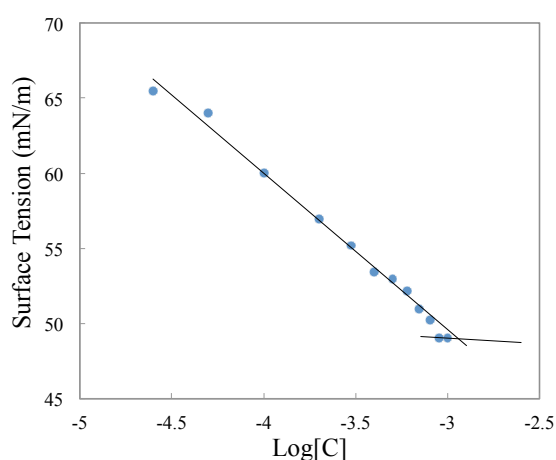


図 3-7 K_4C_{12} の対数濃度 対 表面張力のプロット

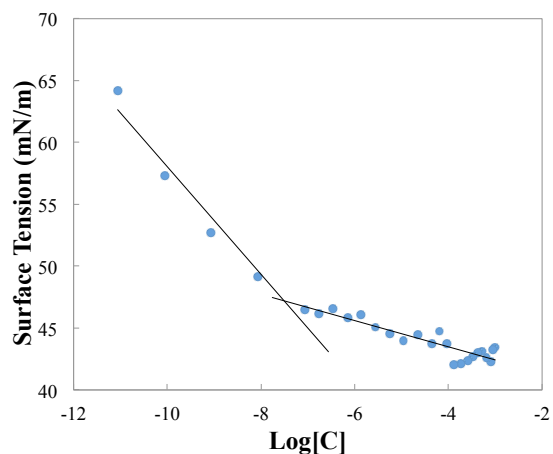


図 3-8 $DKDKC_{12}K$ の対数濃度 対 表面張力のプロット

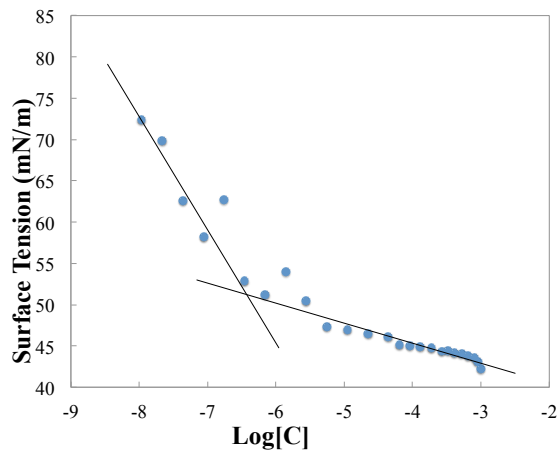


図 3-9 $DKDKC_{12}D$ の対数濃度 対 表面張力のプロット

変曲点前後の 2 直線の交点より算出された各 PG-Surfactant の cac 値を以下にまとめた。また D_3C_{12} 、 D_4C_{12} については第 2 章にて表面張力法にて評価を行ったので、値のみ以下に示す。

表 3-3 各 PG-surfactant の表面張力法による cac 値

Surfactant	cac/mM
D₃C₁₂	0.0030
D₄C₁₂	0.21
K₃C₁₂	5.040
K₄C₁₂	11.500
DKDKC₁₂K	0.00031
DKDKC₁₂D	0.00037

いずれのサンプルに関しても1つの明確な変曲点がみられたことから、ある濃度を境に、溶液中でミセルやリポソームなどの何らかの会合体が形成されていることが推測された。ただし、**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** に関しては、変曲点より高濃度側で、さらに表面張力の減少が見られた。通常の1本鎖型の界面活性剤、あるいはアルキル鎖をスペーサーに持つジェミニ型界面活性剤ではこのような挙動は見られない（変曲点以降は表面張力に変化はない）ことから、このような挙動の見られる PG-surfactant に関しては、単純なミセル様の会合体のみではなく、リポソームなどのより高次な会合体の形成、さらに Wilhelmy プレートのような基板表面に対して、特異的な吸着をしていることにより、うまく測定そのものが出来ていないことも考えられた。そこで、**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** については、蛍光プローブを用いる蛍光プローブ法による cac 値の算出を行うこととした。

3-3-1-3 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定

DKDKC₁₂K、**DKDKC₁₂D** について、ANS、ローダミン B などを蛍光プローブに用いた蛍光プローブ法にて cac 値の算出を試みた。環境応答性の蛍光色素である ANS は、分子周辺が疎水性環境となることで蛍光強度が大きく増加する特徴を持つ。界面活性剤と共存させた系では、蛍光プローブが界面活性剤ミセル中に取り込まれ疎水性環境に置かれることでこれに応答する。このような挙動は、ANS ほど劇的な蛍光強度変化はないものの、ローダミン B などの蛍光色素においても観測可能である。このことから、界面活性剤溶液の濃度に対して蛍光プローブの蛍光強度が大きく変化する変曲点から、cac 値の概算が可能となる。

各 PG-surfactant の濃度変化に対する蛍光プローブの蛍光スペクトルの変化と、各 PG-surfactant の対数濃度に対する蛍光プローブの相対蛍光強度変化のプロットを、図 3-10～図 3-13 に示した。なお後者の縦軸の相対蛍光強度は、界面活性剤が非存在時での蛍光プローブ溶液の蛍光強度を 1 とした。

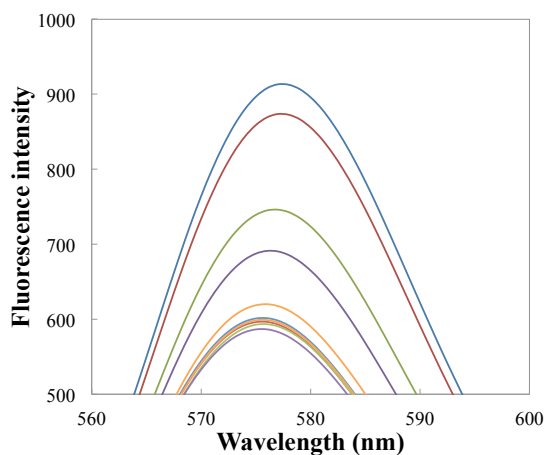


図 3-10 DKDKC₁₂K の各濃度におけるローダミン B の蛍光スペクトル(上図；全体像、下図；拡大図)

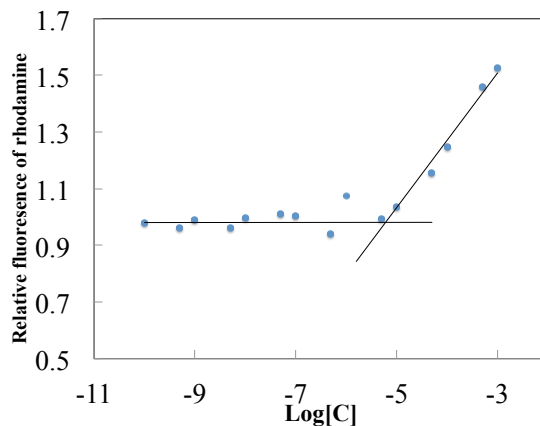


図 3-11 DKDKC₁₂K の対数濃度 対 ローダミン B の相対蛍光強度のプロット

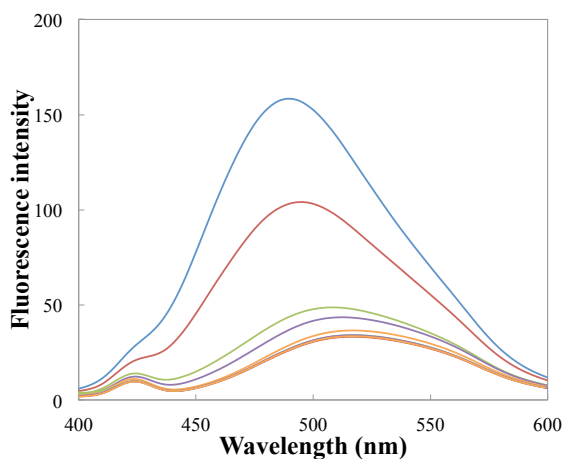


図 3-12 DKDKC₁₂D の各濃度における ANS の蛍光スペクトル

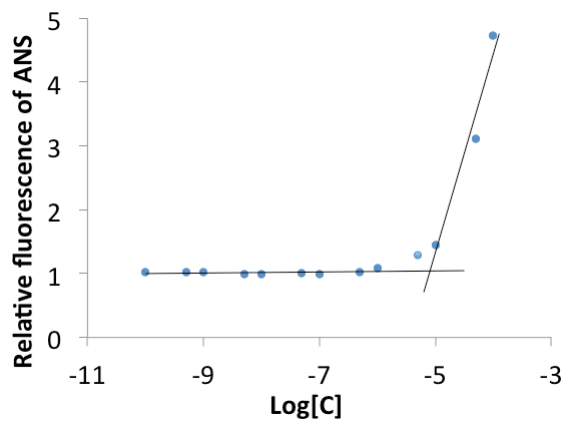


図 3-13 DKDKC₁₂D の対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロット

以上の図より、いずれの PG-surfactant についても、濃度が上昇した際に、ある濃度を境に蛍光スペクトルの最大強度が急激に大きくなることが確認された。ANS に関してはピーク位置の短波長シフトも見られたが、これは ANS が疎水環境となる PG-surfactant ミセル内に取り込まれたことを示していると考えられる。図の変曲点前後の 2 本の近似直線の交点から、各 PG-surfactant の cac 値を算出し、以下にまとめた。

表 3-4 各 PG-surfactant の cac 値

Surfactant	cac/mM
DKDKC₁₂K (蛍光法)	0.0083
(表面張力法)	0.00031
DKDKC₁₂D (蛍光法)	0.0079
(表面張力法)	0.00037

測定法により cac 値が異なっているが、表面張力法の挙動を考えると表面張力法で求められた cac 値は不適切であると考えられ、蛍光法で求めた値が正確な cac 値であると考えた。

3-3-1-4 DLS 測定による水溶液中での会合挙動の評価

いずれの PG-surfactant についても、cac 以上の濃度において何らかの会合体形成が示唆されたことから、溶液中での各 PG-surfactant の会合挙動を DLS 測定により評価した。ここでは中性条件下で可溶性 **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** のみについて評価を行い、20 mM phosphate buffer (pH 7) 中での各界面活性剤濃度 (1~0.0001% (w/v)) での評価をおこなった。結果を以下に示した。

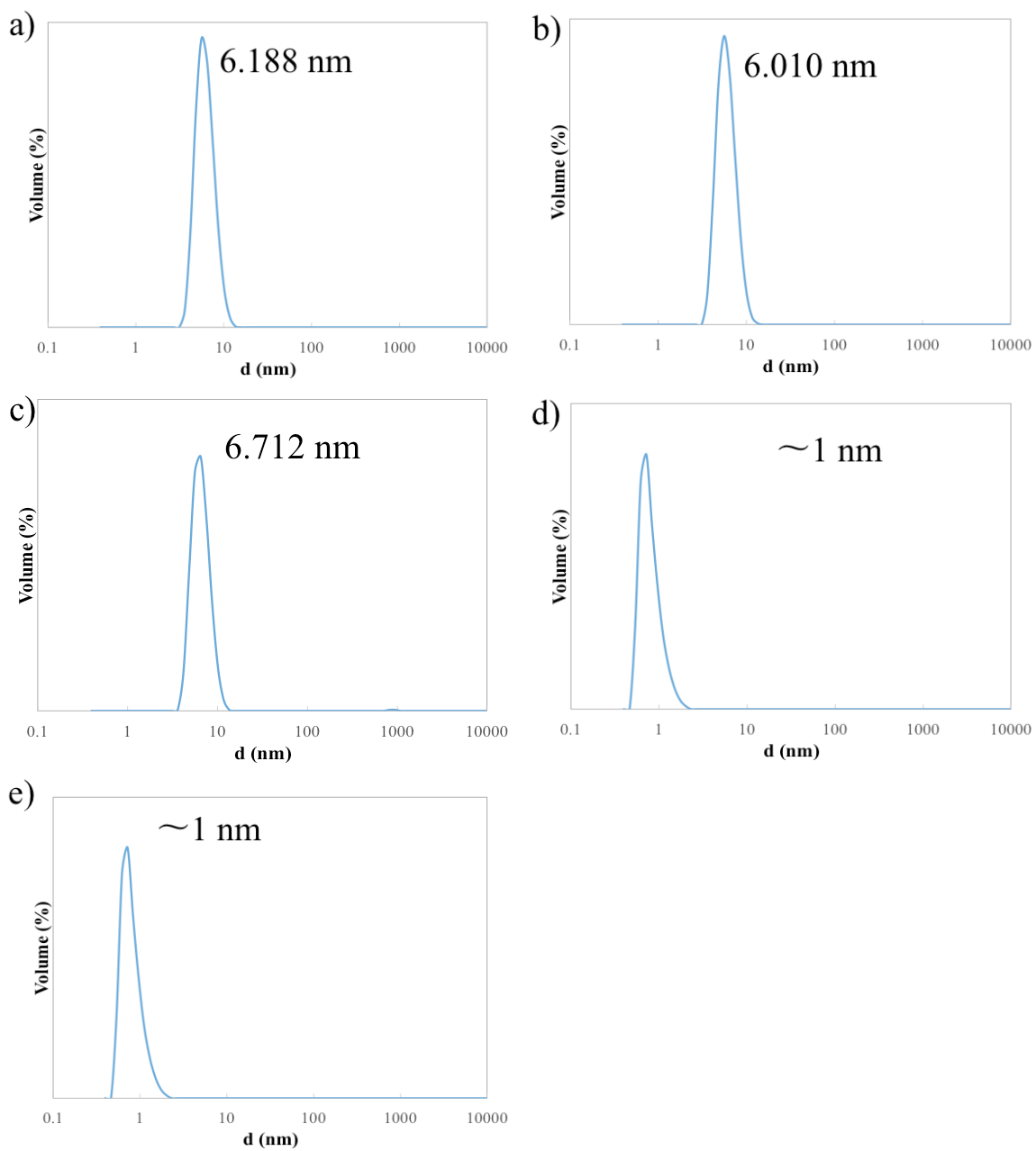


図 3-14 DLS による **DKDKC₁₂K** の会合体粒径分布評価: a) 0.1%(w/v) (0.75 mM), b) 0.01%(w/v) (0.075 mM), c) 0.001%(w/v) (0.0075 mM), d) 0.0001%(w/v) (0.00075mM), e) 0.00001%(w/v) (0.000075 mM)

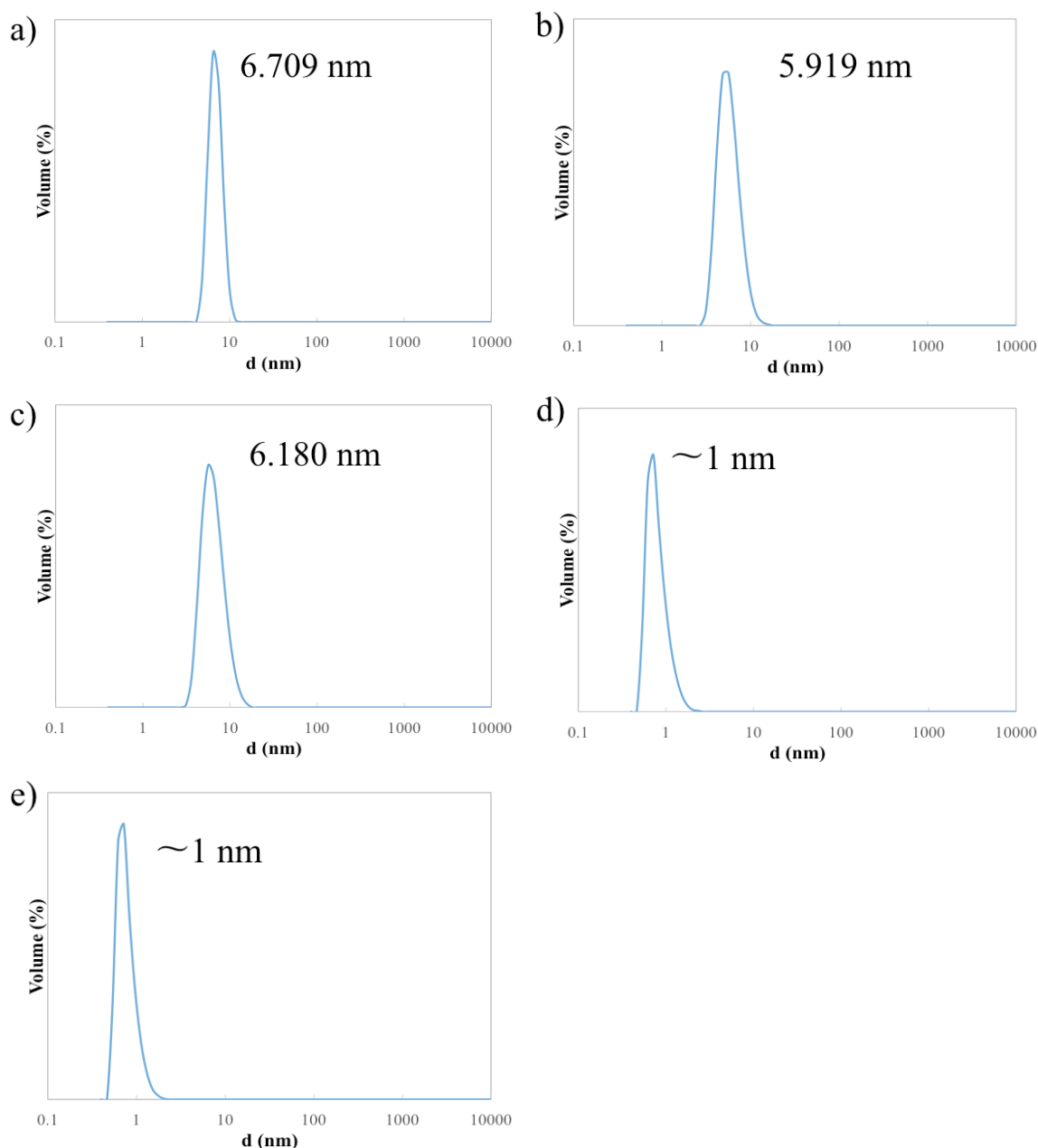


図 3-15 DLS による **DKDKC₁₂D** の会合体粒径分布評価: a) 0.1%(w/v) (0.75 mM), b) 0.01%(w/v) (0.075 mM), c) 0.001%(w/v) (0.0075 mM), d) 0.0001%(w/v) (0.00075mM), e) 0.00001%(w/v) (0.000075 mM))

DKDKC₁₂K、**DKDKC₁₂D** のどちらの PG-surfactant についても、cac 値以上の濃度では、約 6 nm オーダーの粒径を持つ会合種の生成がみられた。これは **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** が串状のコンホメーションをとったときの長軸方向の分子サイズのほぼ 2 倍に一致し、緩衝液中でミセル様の会合体を形成していることが示唆された。また cac 値以下の濃度では、単分子で溶解していることに対応するピークのみ (~1 nm) が観測され、蛍光法で求めた PG-surfactant の cac

値が、分子の会合挙動と関連性があること、また蛍光法で求めた cac 値が適当であることを裏付けていると考えられる。

3-3-2 PG-surfactant を用いた PSI、PSII の可溶化

3-3-2-1 シアノバクテリア由来の光合成膜蛋白質 PSI、PSII

T. elongatus 由来の PSI は、ホモ三量体型の超分子複合体である。各 PSI 単量体ユニットには、12 個のタンパク質サブユニット、96 個のクロロフィル a (Chl a)、及び 3 つの[4Fe-4S]クラスターが含まれている⁶⁾。

T. vulcanus 由来の PSII は、ホモ二量体型の超分子複合体である。各 PSII 単量体ユニットには、20 個のタンパク質サブユニット、35 個のクロロフィル a (Chl a)、及び 1 つの Mn_4CaO_5 クラスター (酸素発生錯体) が含まれている⁷⁾。

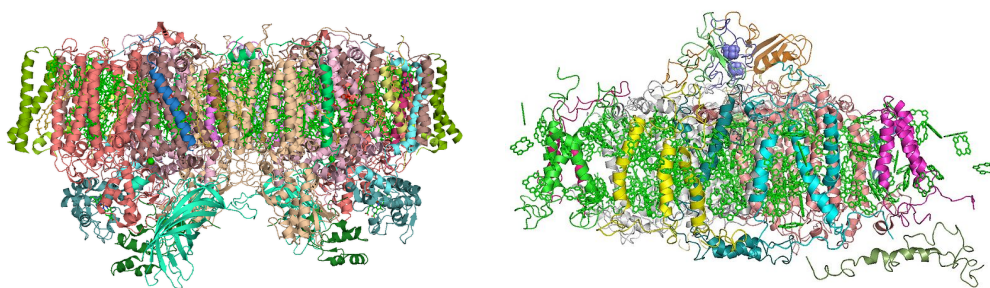


図 3-16 光化学系 I、II の立体構造 (左 : PSII、右 : PSI)

PG-surfactant を用い PSI、PSII を可溶化した際の影響評価のために、これらの膜蛋白質は各シアノバクテリアのチラコイド膜から β -DDM により抽出可溶化し、陰イオン交換クロマトグラフィーにより単離精製したものを用いた。これは、native 状態で単離精製された各膜蛋白質を、評価のしたい PG-surfactant で可溶化しなおすことで、具体的に native 状態の各膜蛋白質に対してどのように影響を与えているのか (分光学的性質などにどのような変化があるか)、評価し易いためである。各膜蛋白質サンプルは 0.1 wt% β -DDM により可溶化された状態で単離精製されるので、本実験では界面活性剤置換法により β -DDM からそれぞれの PG-surfactant に置き換え評価を行った。

3-3-2-2 吸収スペクトル測定からの PSI、PSII への構造的影響の評価

界面活性剤置換により 0.1 wt% の PG-surfactant (**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D**) を含む各緩衝液で可溶化された PSI、PSII サンプルを調製し、吸収スペクトル測定を行った。native 状態のコントロールとして、PSI、PSII を変性させずに可溶化出来る条件とされる 0.1 wt% の β -DDM を含む緩衝液で可溶化した PSI、PSII サンプルの吸収スペクトル測定も行い、これと比較した。吸収スペクトルの測定結果は、図 3-17、3-18 に示した。

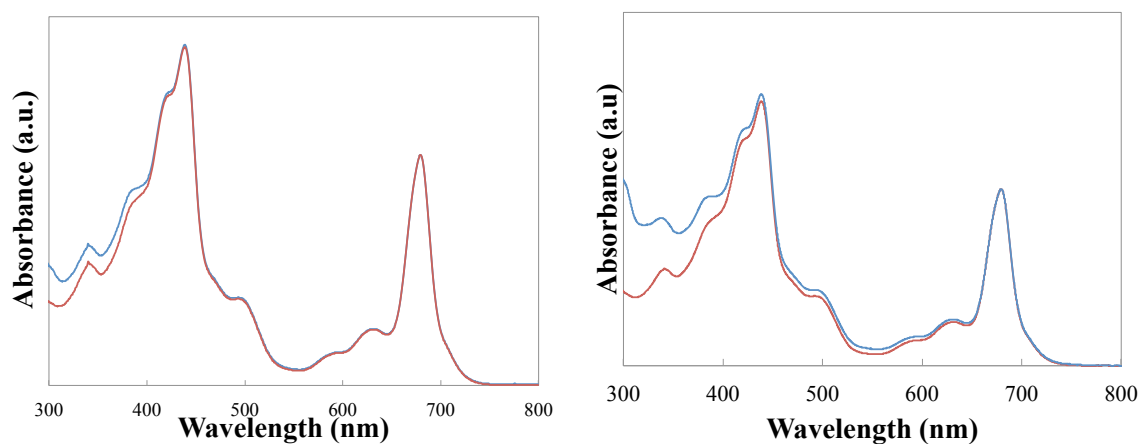


図 3-17 それぞれの PG-surfactant で可溶化した PSI の吸収スペクトル (左: 青-DKDKC₁₂K, 赤-, β -DDM 右: 青-DKDKC₁₂D, 赤-, β -DDM)

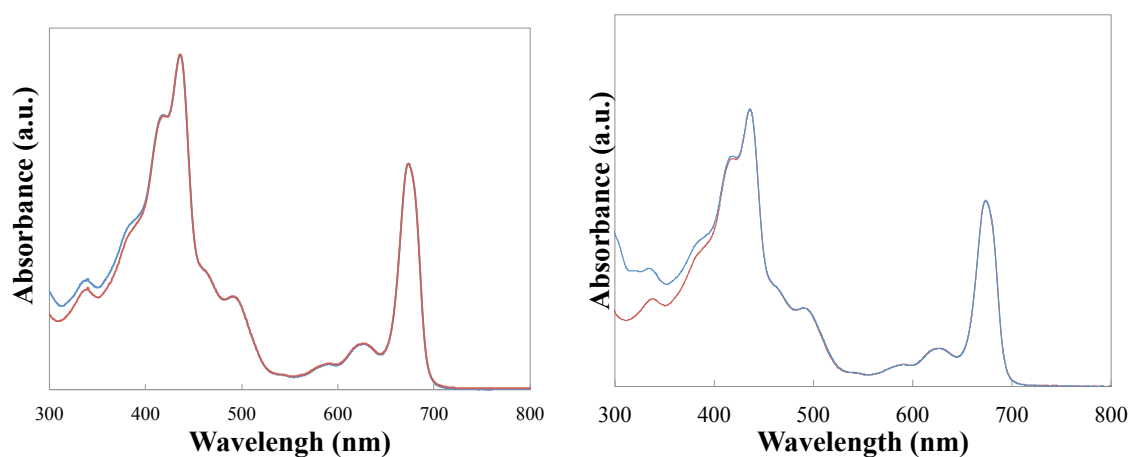


図 3-18 それぞれの PG-surfactant で可溶化した PSII の吸収スペクトル (左: 青-DKDKC₁₂K, 赤-, β -DDM 右: 青-DKDKC₁₂D, 赤-, β -DDM)

その結果、PSI、PSII ともに PG-surfactant (**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D**) で再可

溶化後の吸収スペクトルは、 β -DDM で再可溶化したときと λ_{\max} の位置やスペクトル概形などに一致がみられ、各膜蛋白質に対して変性が促されている挙動は見られなかった。なお吸収スペクトルでは、主に膜貫通領域に存在するアンテナクロロフィル色素に由来するスペクトルが観測されるため、ここで評価しているのはアンテナクロロフィル色素の脱離に伴う変性がない事を意味する。また各 PG-surfactant で PSI、PSII を可溶化した場合に、短波長側でのみベースラインの若干の上昇が確認されたが、これは PG-surfactant 由来の吸収によるため、各膜蛋白質の変性を示唆するものとは異なると考えられた。

3-3-2-3 77 K における蛍光スペクトルによる PSI への構造的影響

液体窒素温度での測定には、専用のデュワー瓶を使用した。普通のデュワー瓶は保温性を上げるために表面にメッキが施されているが、分光測定用ではメッキが施されていないものが用いられる (図 3-19 左)。サンプルホルダーは、図 3-19 中に示したようなものを用いた。図 3-19 右はサンプルホルダー全体を横から見た図である。これは、金属板に四角く窓を開けたものに、サンプル保持用の金属枠をアクリル板で挟んだ構造になっている。サンプルはこのアクリル板の間の隙間に注入して凍らせる。試料を凍らせるには、液体窒素を入れた別のデュワー瓶にサンプルホルダーを静かに入れる。最初は液体窒素が沸騰するが、全体が低温になるとおさまるので、測定用のデュワー瓶に移して測定を行う。

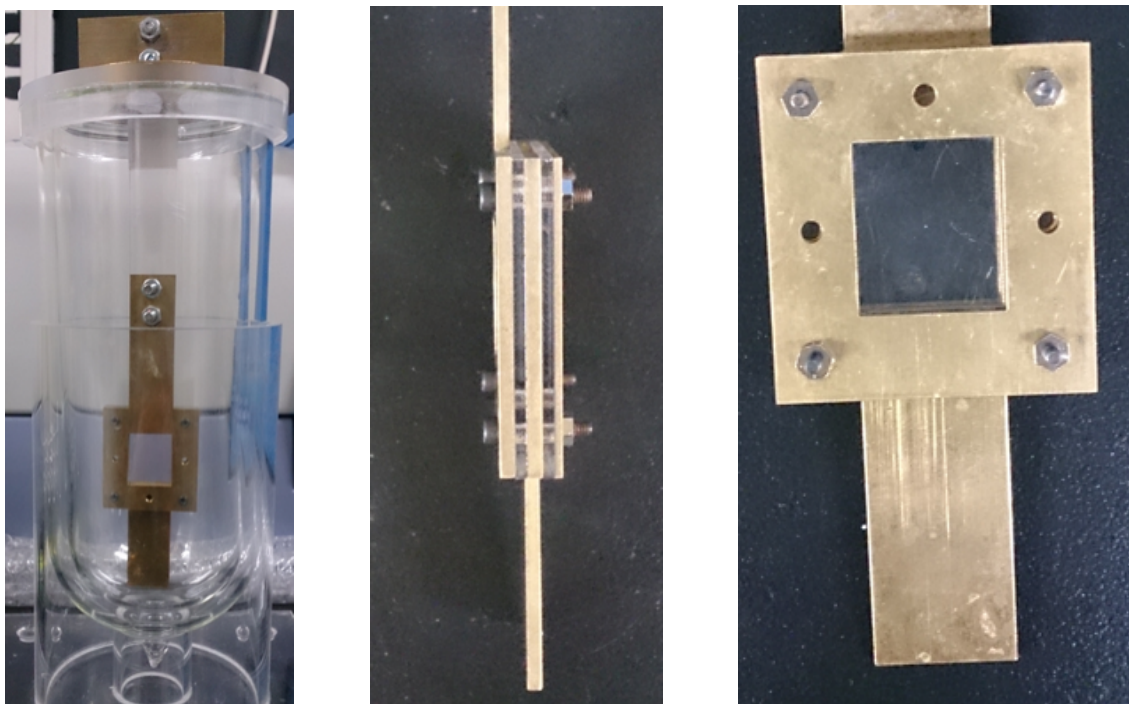
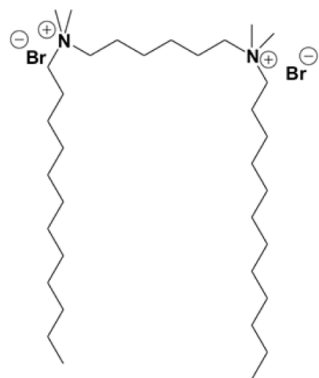


図 3-19 低温測定用サンプルホルダー(左;デュワー瓶にセットしたところ, 中;横から見た図, 右;正面から見た図)

光化学系 I においては、液体窒素温度 ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 77 K) まで冷却すると、レッドクロロフィル a 状態と呼ばれる P700 より長波長側 ($708\sim 714\text{ nm}$) の光を吸収できる「アンテナ Chl a 色素の状態」が生成し、この S0 状態から S1 状態への光遷移から S0 状態への緩和にともない、 $715\text{-}735\text{ nm}$ に蛍光発光が観測されるようになる。このレッドクロロフィル状態は、アンテナ Chl a 色素の集合状態が維持されていないと観測されず、また Chl a 色素の離脱が起こった場合には、 680 nm 付近に、フリーの Chl a 色素由来の蛍光発光ピークが観測されるため、PSI の変成状態の評価に有効である。

430 nm の光励起により測定は行った。対照実験として、PSI を変性させることなく可溶化できる $0.1\text{ wt}\%\beta\text{-DDM}$ を含む緩衝液に可溶化された PSI、アルキル鎖をスパーサーに持ちカチオン性のジェミニ型界面活性剤である 12-6-12 で可溶化された PSI を用いた。以下にこれらの結果を示す。



12-6-12

図 3-20 12-6-12 の構造式

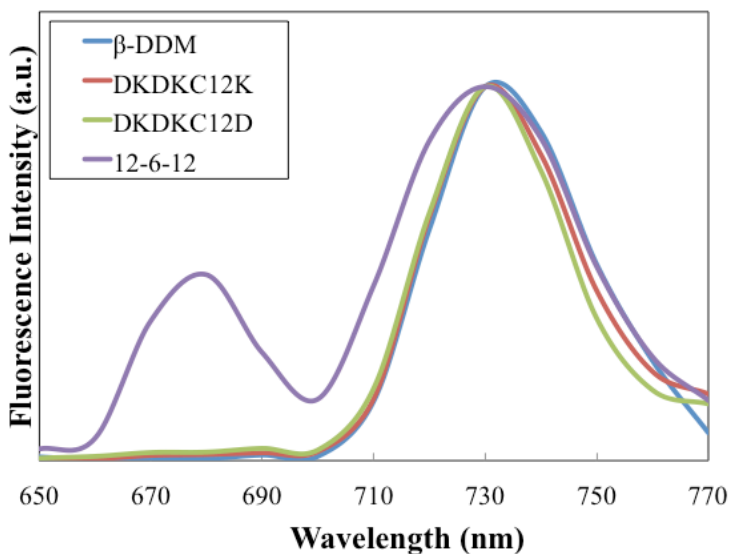


図 3-21 各 0.1 wt% surfactant で可溶化した PSI の 77K における蛍光スペクトル (青: β -DDM, 赤:DKDKC₁₂K, 緑:DKDKC₁₂D, 紫:12-6-12)

いずれの PG-surfactant (DKDKC₁₂K、DKDKC₁₂D) を用いた場合にも、735 nm にのみ蛍光スペクトルのピークトップが確認された。この蛍光最大波長は、PSI のレッドクロロフィル a 状態に特徴的な波長であり、PSI に変性がないことを意味している。実際に、PSI を変性させないと報告されている 0.1 wt% β -DDM を含む緩衝液で可溶化された PSI サンプルについても、同様に 735 nm にのみ蛍光スペクトルのピークトップが観測された。一方で、アルキル鎖をスペーサーに持つカチオン性ジェミニ界面活性剤である 12-6-12 では、680 nm 付近にもピークが確認され、PSI から離脱したフリーの Chl a 色素が生成していることから、膜貫通領域のアンテナ色素部位において変性が促されていることが示唆された。

3-3-2-4 PG-surfactant で可溶化された PSI、PSII の DLS 測定による可溶化状態の評価

種々の PG-surfactant の濃度において、PSI、PSII が凝集状態で可溶化されているのか、あるいは単分子（この場合は、超分子複合体 1 ユニット単位で）で可溶化されているのか評価するため、DLS による溶液中での粒径分布の評価を行った。

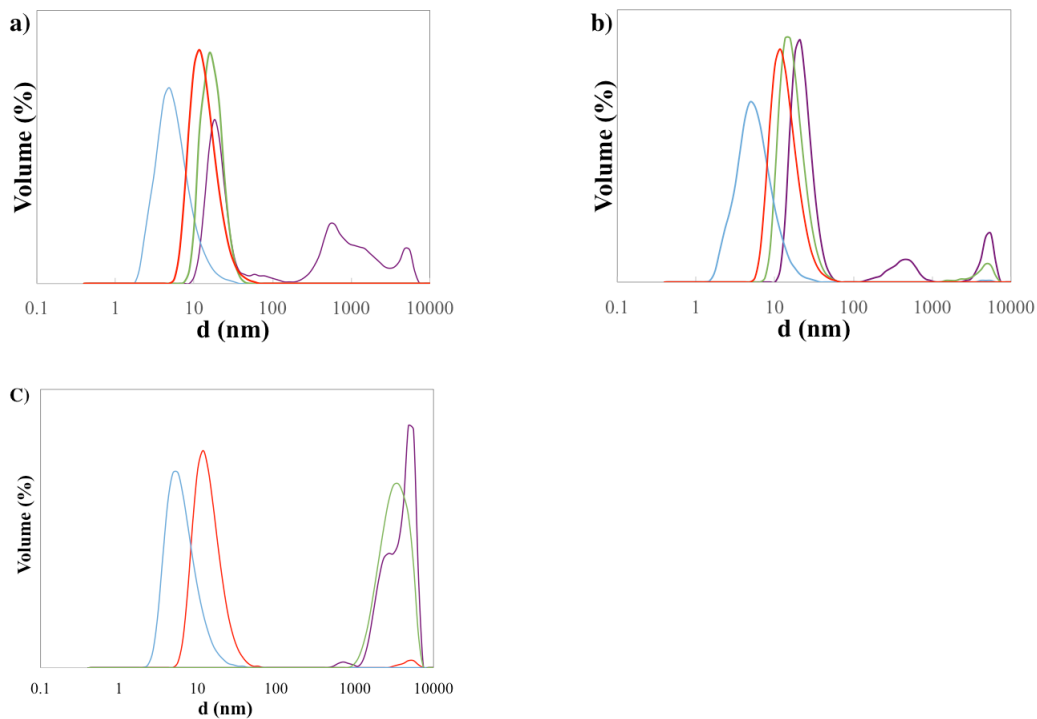


図 3-22 各界面活性剤で PSI を可溶化した溶液の DLS ピーク: **DKDKC₁₂K** (a), **DKDKC₁₂D** (b), and β -DDM (c) on 0.0001% (purple line) 0.001 wt % (green line), 0.01 wt % (red line), and 0.1 wt % (blue line) in buffer K2

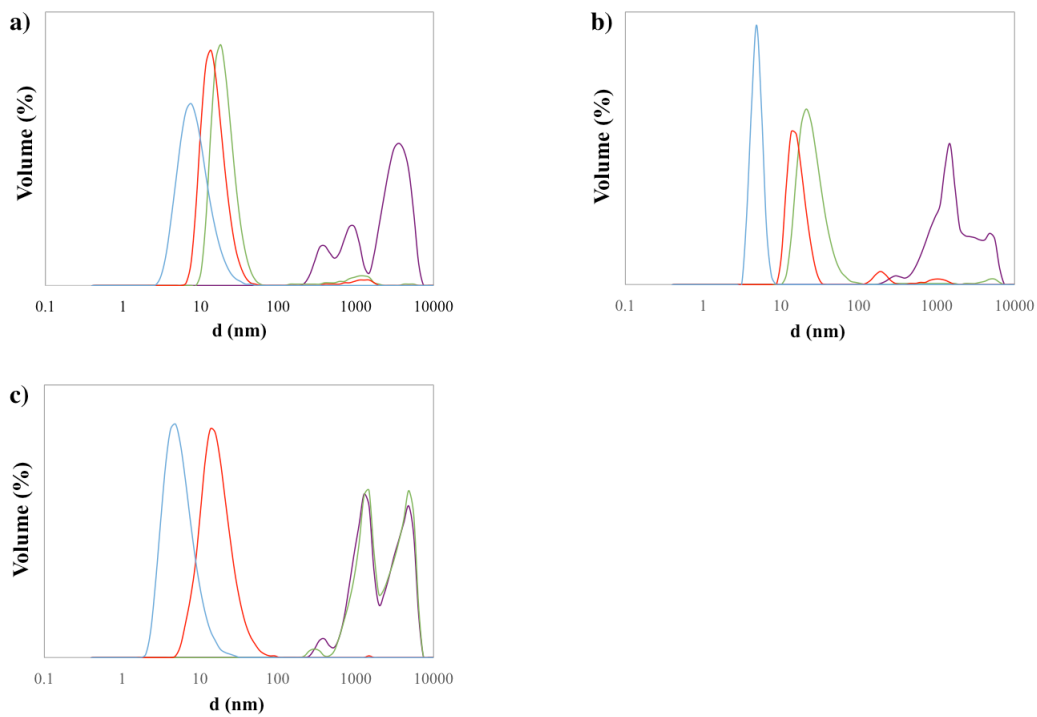


図 3-23 各界面活性剤で PSII を可溶化した溶液の DLS ピーク: **DKDKC₁₂K** (a), **DKDKC₁₂D** (b), and β -DDM (c) on 0.0001% (purple line) 0.001 wt % (green line), 0.01 wt % (red line), and 0.1 wt % (blue line) in buffer K2

それぞれの膜蛋白質可溶化試薬で検討を行った。可溶化試薬の濃度が濃い条件下 (0.01 wt%) では、いずれの膜蛋白質可溶化試薬を用いた場合についても、約 25 nm 程度のサイズが確認された。PSI 1 ユニットのサイズが 20 nm であるので、凝集などの非特異的な会合体形成はみられず、膜蛋白質可溶化試薬に可溶化されたサイズであることがわかる。より高濃度の条件下 (0.1 wt%) では、ピークの低粒径サイズ側へのシフトやブロード化が見られた。これは可溶化試薬のみからなるミセルのピークが優先的に観測されたためと考えられる。

また界面活性剤濃度がより薄い条件下 0.001% では、依然として cac 以上の濃度となる **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** では PSI、PSII には凝集がみられなかったが、cac 以下の濃度となる β -DDM (0.15 mM、0.08 %) では凝集がみられた。

3-3-2-6 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700⁺の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI への構造的影響の評価¹³⁾

PSI の膜外ドメインの 1 つである PsaC には 2 つの [4Fe-4S] クラスタースイト F_A と F_B が存在し、P700 の光励起により生成される電子を受け取る最終アクセプターとして機能している。PSI は、光励起により最終的に F_B サイトで電子を保持し、一方で P700 サイトにホールを持つことで長寿命の電荷分離状態 (τ が 30 ms) が達成され、その後のフェレドキシンを介した NADPH 還元酵素への効率の良い電子伝達がなされている。もし PSI の変性により PsaC が離脱した場合には、膜内ドメインに存在する [4Fe-4S] クラスタースイト F_X が、代わりに最終電子アクセプターとなるため、ここから P700⁺ への逆電子移動速度は、30 倍程度早くなる事が知られている (τ が 30 ms から 1 ms になる)。そこで、光励起により生成する P700⁺ が P700 へ戻る速度を評価する事は、PSI の主に膜外ドメインの変性情報を得る有効な手段となる (図 3-24 と 3-25)。

また、PSI に短い時間の熱変成を施した場合には、膜外ドメインにあるサブユニット蛋白質 PsaC、PsaD、PsaE が離脱する変性が優先的に起こる事が知られている¹³⁾。もし新たな膜蛋白質可溶化試薬によって、この熱変成を抑える効果が見られれば、PSI の新規膜蛋白質可溶化試薬としてより優れた試薬という事がいえる。そこで、今回検討を行う PG-surfactant (**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D**) と β -DDM で PSI を可溶化し、熱処理 (60°C、70°C、80°C、いずれかの温度に溶液を 5 分浸け、その後氷上に 15 分おく) 後の変成度合いを、各界面活性剤を用いた場

合で比較を行った。以下結果をまとめた。

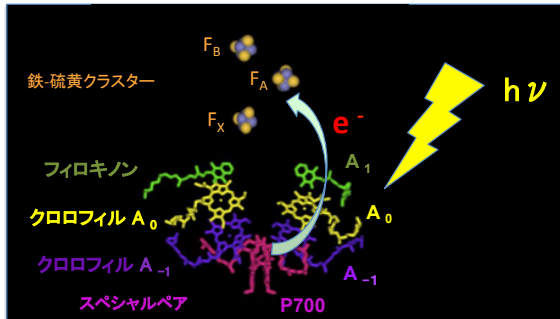


図 3-24 光化学系 I の反応中心模式図

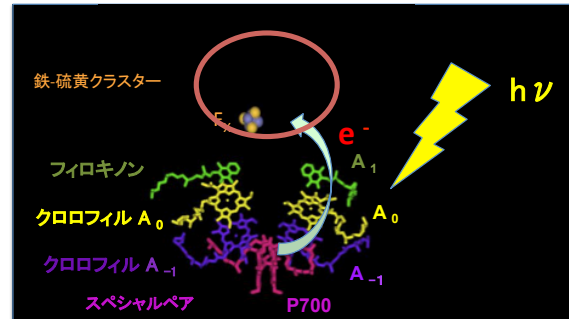


図 3-25 PsaC が脱離した場合の光化学系 I の反応中心模式図

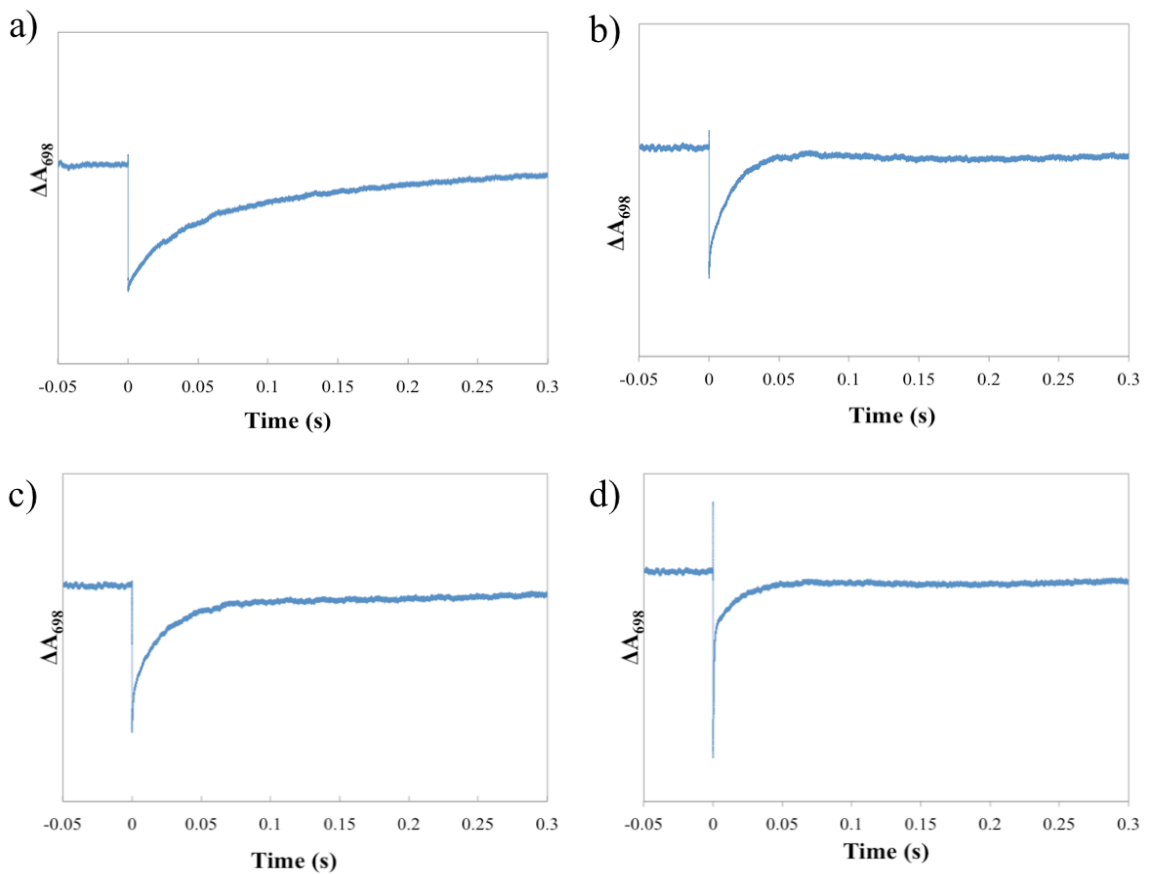


図 3-26 0.1 wt% β -DDM に可溶化された PSI の A_{698} の時間変化測定 a) 熱処理前 (25°C)、b) 60°C で熱処理後、c) 70°C で熱処理後、d) 80°C で熱処理後

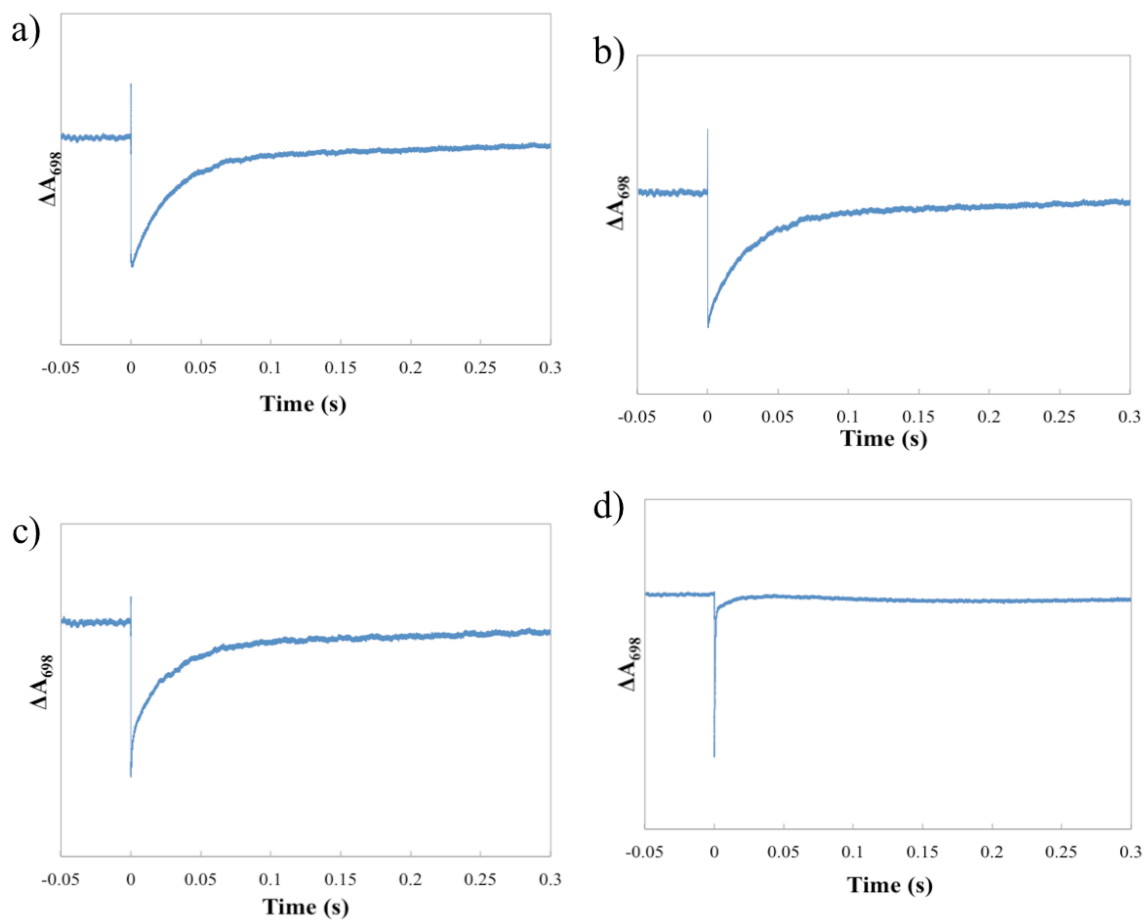


図 3-27 0.1 wt% DKDKC₁₂K に可溶化された PSI の A_{698} の時間変化測定 a) 熱処理前 (25°C)、b) 60°C で熱処理後、c) 70°C で熱処理後、d) 80°C で熱処理後

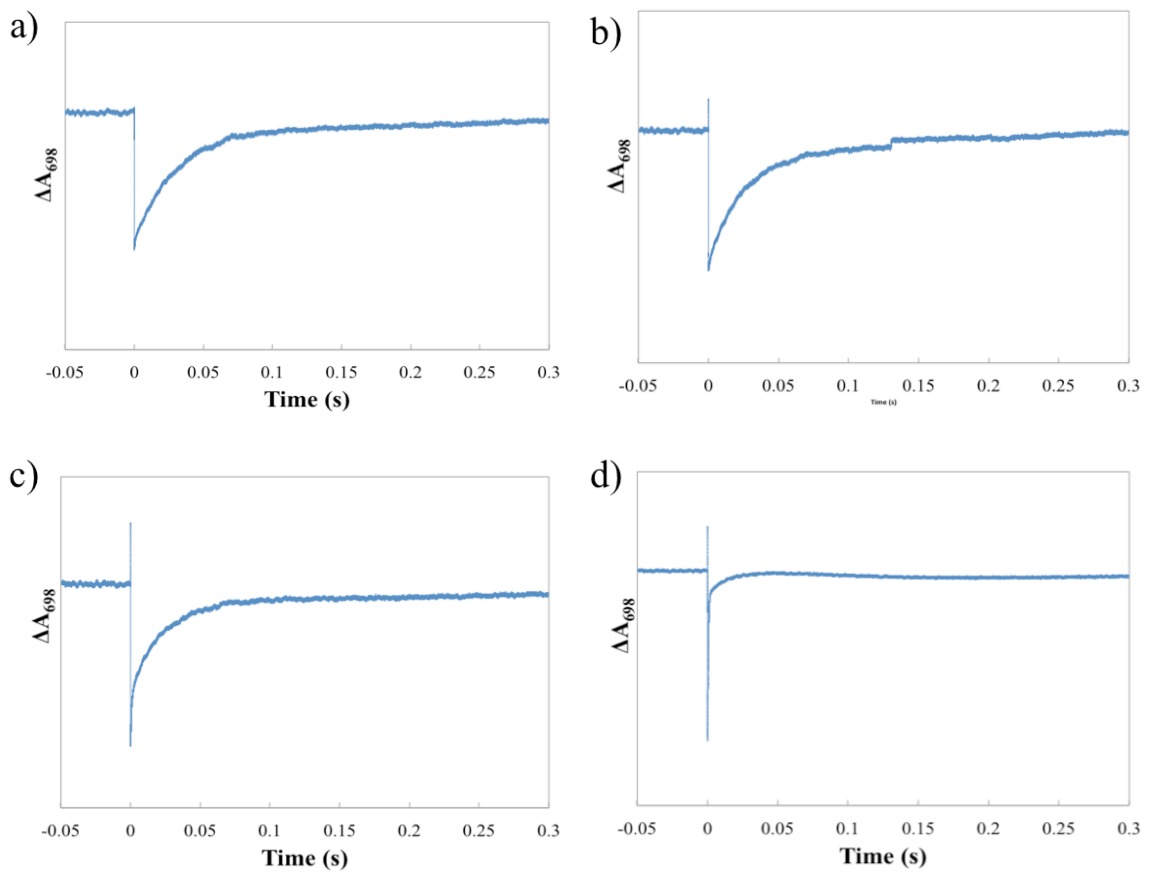


図 3-28 0.1 wt% **DKDKC₁₂D** に可溶化された **PSI** の A_{698} の時間変化測定 a) 熱処理前 (25°C)、b) 60°Cで熱処理後、c) 70°Cで熱処理後、d) 80°Cで熱処理後

上図の結果を、3成分の寿命を持つ理論式で非線形カーブフィッティング（解析ソフト Origin）を行った結果を表 3-5 に示す。

表 3-5 各 surfactant で可溶化された PSI の、熱処理前と熱処理後の P700⁺寿命の評価と、それを元にした PSI の変性割合の比較

	界面活性剤					
	β-DDM		DKDKC12K		DKDKC12D	
	P700 ⁺ の 寿命	変性割合 (%)	P700 ⁺ の 寿命	変性割合 (%)	P700 ⁺ の 寿命	変性割合 (%)
熱変性前	30 (60 %)	0	30 (37 %)	0	30 (49 %)	0
	150 (40 %)		36 (63 %)		50 (51 %)	
60℃にて 熱変性	30 (63 %)	30	30(23 %)	26	30 (57 %)	13
	1 (30 %)		1 (26 %)		1 (13 %)	
	150 (7 %)		48 (51 %)		33 (30 %)	
70℃にて 熱変性	30 (52 %)	42	30 (39 %)	40	30 (37 %)	44
	1 (42 %)		1 (40 %)		1 (44 %)	
	100 (6 %)		64 (21 %)		40 (19 %)	
80℃にて 熱変性	30 (55 %)	45	30 (33 %)	67	30 (40 %)	60
	1 (45 %)		1 (67 %)		1 (60 %)	

表 3-5 の結果より、熱処理前では、いずれの PG-surfactant (**DKDKC₁₂D**、**DKDKC₁₂K**) を用いた場合でも PsaC の離脱に伴う変性は見られなかった。同様の結果は、PSI を変性させない場合のコントロールとなる β-DDM を用いた場合でも観測された。一方 60℃にて熱処理を行った場合には、β-DDM で可溶化された場合に比べて、**DKDKC₁₂K** と **DKDKC₁₂D** を用いた場合に、変性される割合の低下が見られた。特に **DKDKC₁₂D** を用いた場合には、β-DDM を用いた場合に 30%の変性がみられたのに対して、13%だけの変性に抑えられた。しかしながらこの効果は、70℃での熱処理を行った場合には、どの PG-surfactant (**DKDKC₁₂D**、**DKDKC₁₂K**) でも β-DDM を用いた場合と変わらなくなり (いずれも 40%程度)、さらに熱処理温度を 80℃に上昇した場合には、むしろ β-DDM を用いた場合よりも、変性する割合の上昇が見られた (β-DDM で 45%、**DKDKC₁₂K** で 67%、**DKDKC₁₂D** では 60%)。残念ながら効果は限定的であったが、**DKDKC₁₂D** は PSI に対して、β-DDM よりもむしろ優れた膜蛋白質可溶化試薬である事が示唆された。

3-3-2-7 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI、PSII の光誘起電子移動活性評価¹⁴⁾

3-3-2-7-1 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価

酸素電極を用いて溶存酸素濃度の減少速度をモニタリングすることにより、PSI の光誘起電子移動活性の評価を行った。PSI のスペシャルペア P700 が光励起されると、励起電子は系内に存在するクロロフィルやフィロキノンを経由し、最終的に膜外ドメインに存在する[4Fe-4S]クラスター(F_a 、 F_b)まで渡る。この時に溶液中に電子受容体となるメチルビオロゲン MV^{2+} が存在した場合、直ちにこちらに電子が移動し、一電子還元体となる。この時に MV^{2+} の 1 電子還元体は非常に不安定であるため、溶液中に存在する酸素により直ちに酸化される。従って、P700 の光励起に伴う溶存酸素濃度の減少速度を酸素電極により追跡することで、PSI 内部での電子移動速度を擬似的に見積もることが可能である。そこで、この溶存酸素の減少速度による電子移動速度の評価から、PSI の変成度合いの評価を行った。

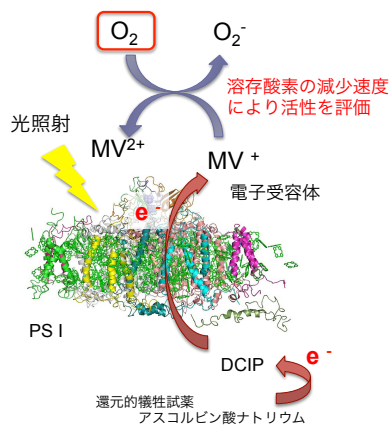


図 3-29 PSI の電子移動模式図

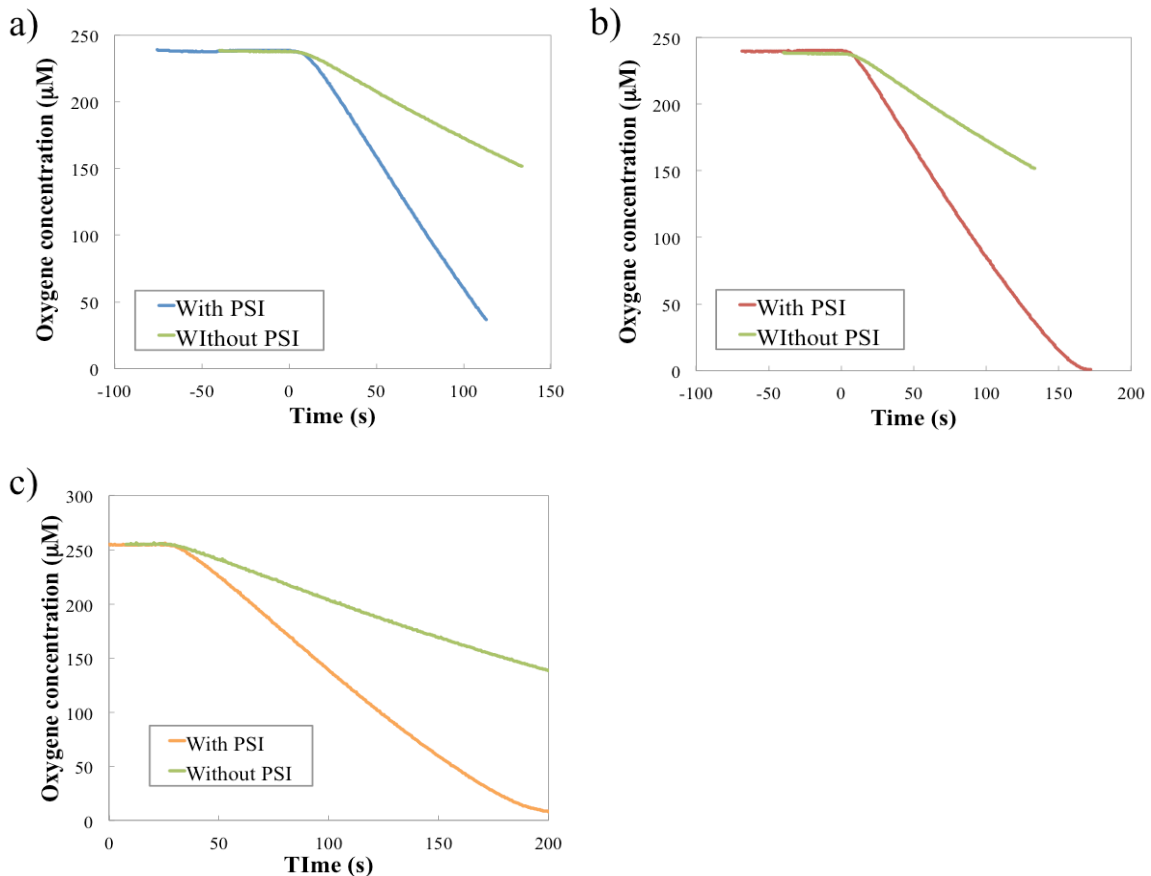


図 3-30 PSI への光照射に伴う溶液中の酸素濃度の減少挙動 a) 0001 wt% **DKDKC₁₂K** にて可溶化した場合、b) 0.001 wt%β-DDM にて可溶化した場合、c) 0.001 wt% **DKDKC₁₂D** にて可溶化した場合

酸素電極により観測された、PSI の光励起に伴う溶存酸素濃度の変化を、図 3-30 に示す。用いる膜蛋白質可溶化試薬の濃度は、一般的に酸素電極を用いて PSI の光電子移動活性の評価を行う場合に利用される 0.001 wt%(w/v)と、通常 PSI を β-DDM で可溶化する場合に用いる 0.1 wt%(w/v)の濃度で共に評価を行った。

図 3-30 より酸素減少の速度を求め($\text{mM} \cdot \text{O}_2 / \text{mgChl} \cdot \text{h}$)、PSI 1 ユニット当たりの電子伝達速度 ($\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}$) を求めた。

$$(\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}) = \frac{2}{3.886 \times 10^{-3} \times 3600} \times \frac{1}{3} (\mu\text{M} \mu\text{O}_2 / \text{mgChl} \times \text{h})$$

表 3-6 各膜蛋白質可溶化試薬に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度の比較

	界面活性剤濃度(%)	電子伝達速度 (PSI ⁻¹ s ⁻¹)
β -DDM	0.001	41 ± 2.1
	0.1	39 ± 1.2
DKDKC ₁₂ K	0.001	42 ± 0.7
	0.1	42 ± 1.0
DKDKC ₁₂ D	0.001	44 ± 1.5
	0.1	41 ± 2.3

上記の表 3-6 の結果から、いずれの PG-surfactant を用いた場合も、PSI が変性していない状態のコントロールとなる 0.1 wt% β -DDM を含む緩衝液で可溶化された場合と同程度の 40 PSI⁻¹s⁻¹ 程度の電子移動活性が保たれていることが確認された。すなわち、PSI の光誘起電子移動活性の面からも、今回検討を行っている PG-surfactant は優れた膜蛋白質可溶化試薬であることが分かった。また、図 3-2 2 の結果より 0.001 wt% の濃度で β -DDM を用いる場合は PSI が会合した状態で可溶化されている事が確認されているが、PSI の光誘起電子移動活性の面からは影響がないことも分かった。

3-3-2-7-2 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSII の光誘起電子移動活性の評価

PSI の場合と同じように、PSII についても光誘起電子移動活性を酸素電極にて評価を行った。PSII はスペシャルペア P680 の光励起に伴い、P680 にホールが生成され、このホールは膜外ドメインに有る酸素発生錯体のマンガカルシウムクラスターまで移動する。こちらで 4 つのホールが蓄積されたあと、水の 4 電子酸化が起こることで酸素が発生する。マンガカルシウムクラスターにおけるホールによる水の酸化反応効率がほぼ 100% であることから、P680 の光励起に伴う光誘起電子移動速度を、溶液中の酸素濃度の上昇速度から擬似的に見積もることが可能である。実際の測定の際には、図 3-3 1 のような系を組み、キノンの代わりに電子受容体であるフェニル-*p*-ベンゾキノンを経過的に添加し測定を行った。

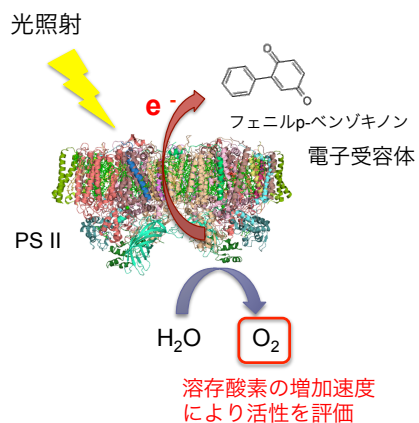


図 3-31 PSII の電子移動模式図

各種 PG-surfactant により可溶化された PSII に光照射した時の、酸素発生挙動の結果を以下に示す。

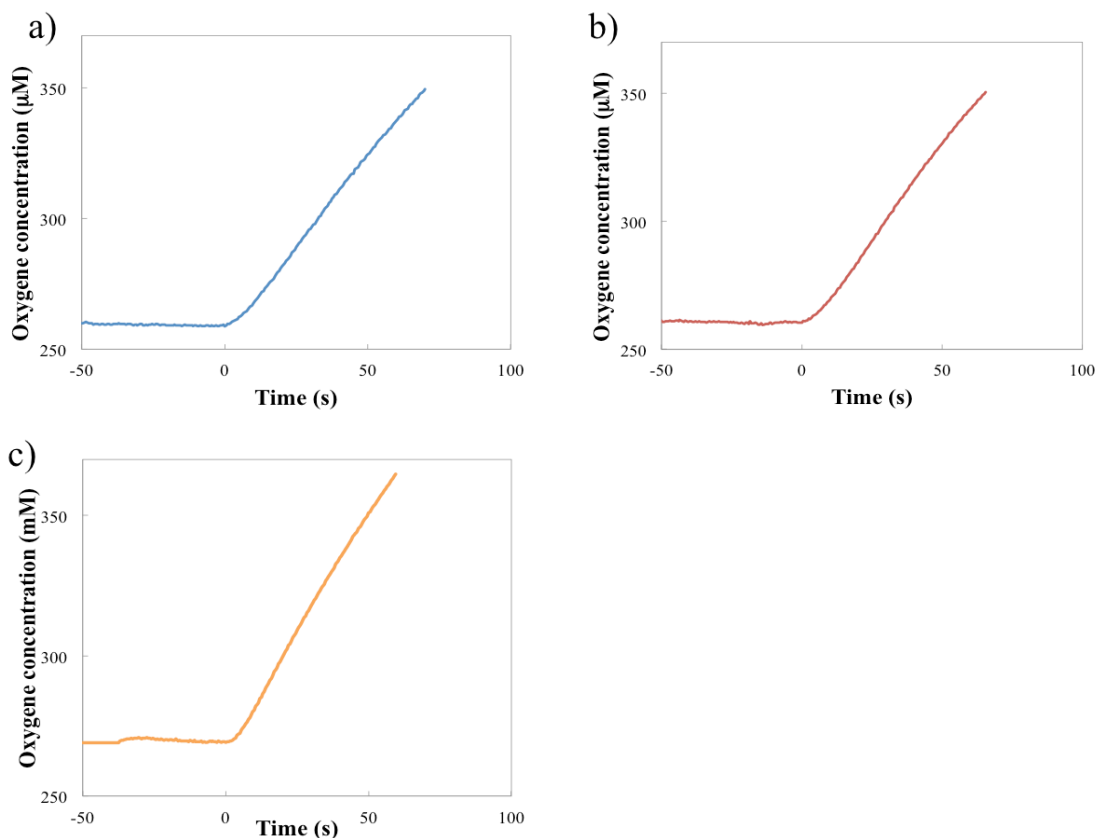


図 3-32 各膜蛋白質可溶化試薬に可溶化された PSII に光照射を行う事で乾燥される溶存酸素の濃度変化； a) 0.001 wt% DKDKC₁₂K にて可溶化、b) 0.001 wt%β-DDM にて可溶化、c) 0.001 wt% DKDKC₁₂D にて可溶化

以上の結果から、酸素増加の速度の傾き($\text{mM}\cdot\text{O}_2/\text{mgChl}\cdot\text{h}$)から PSII 1 ユニット当たりの電子伝達速度 ($\text{PSII}^{-1}\text{s}^{-1}$) を求めた。

$$(\text{PSII}^{-1}\text{s}^{-1}) = \frac{4}{15.99 \times 10^{-3} \times 3600} \times \frac{1}{2} (\mu\text{M}\mu\text{O}_2 / \text{mgChl} \times \text{h})$$

表 3-7 各種界面活性剤に可溶化された PSII の光誘起電子移動速度の比較

	界面活性剤濃度(wt%)	電子移動速度($\text{PSII}^{-1}\text{s}^{-1}$)
β -DDM	0.001	156 ± 0.9
DKDKC₁₂K	0.001	153 ± 3.6
DKDKC₁₂D	0.001	144 ± 4.9

上記の結果から、いずれの PG-surfactant を用いた場合も、PSII が native 状態を保っていると考えられるコントロールとである 0.001 wt% β -DDM で可溶化された場合と同程度の $150 \text{ PSII}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 程度の電子移動活性が保たれていたことが確認された。すなわち、PSII の光誘起電子移動活性の面からも、今回検討を行っている PG-surfactant は優れた膜蛋白質可溶化試薬であることが分かった。

3-3-3 機能性分子を修飾した PG-surfactant の設計

3-3-3-1 光照射時に PSI からの電子引き抜き効率を向上させる PG-surfactant の設計

前述の検討から、PG-surfactant **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** が新規の膜蛋白質可溶化試薬として利用可能であることが分かった。また一方で、このような試薬で膜蛋白質を可溶化した際には、「膜蛋白質可溶化試薬が膜蛋白質の疎水表面に選択的に集積している」と考えることができる。これは、見方を変えれば「膜蛋白質に対する選択的な結合分子」とみなすことも可能であり、膜蛋白質可溶化試薬を介して、種々の分子や官能基を膜蛋白質表面に集積するためのアンカー分子として利用可能ではないかと考えた。PG-surfactant はこれまでに報告されている一般的な膜蛋白質可溶化試薬 (β -DDM: $M_w = 510$ 、LDAO: $M_w = 229$ など) と異なり、分子量が比較的大きい事 ($M_w = \sim 1000$) やアルキル鎖を 1 つの分子内に 2 本保持しているため、直接膜蛋白質の可溶化に寄与しない新たな官能基を導入したとしても、元々の膜蛋白質の可溶化能が維持できると期待さ

れた。もし仮にこれが可能となれば、膜蛋白質表面に様々な官能基を簡便に集積させる新しい方法論となる。すなわち、合理的な膜蛋白質表面修飾試薬の開発法につながる。

そこで、これまでに一般に用いられている膜蛋白質と異なり、安定に可溶化する以外の機能を保持した、機能性膜蛋白質可溶化試薬の開発に取り組んだ。具体的には、光誘起電子移動活性を持つ PSI から蛋白質外への電子移動を促す膜蛋白質可溶化試薬の開発である。電子受容体である MV^{2+} を **DKDKC₁₂K** の N 末端側に修飾する事で、PSI の光励起により生成される還元力の高い電子を、蛋白質の外部に存在する MV^{2+} 部位に効率よく取り出す事を期待した。

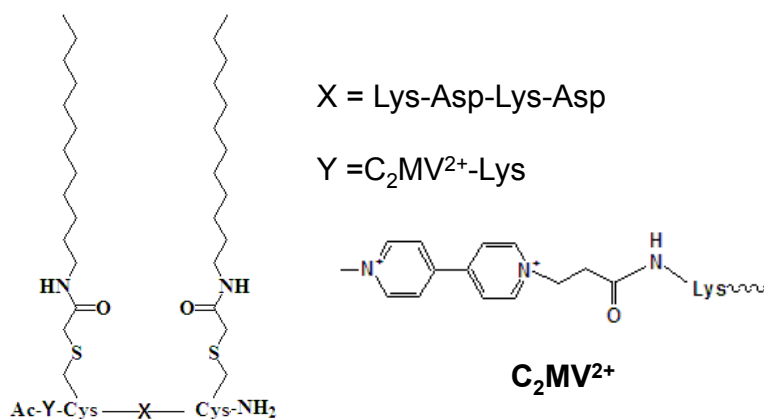


図 3-33 MV-DKDKC₁₂K の構造式

一方がエチルカルボキシル基で修飾された MV^{2+} 誘導体(C₂MV)を用いることで、**DKDKC₁₂K** の N 末端側に固相上で修飾することが可能である。なおこの誘導体の名称は、**MV-DKDKC₁₂K** とした。

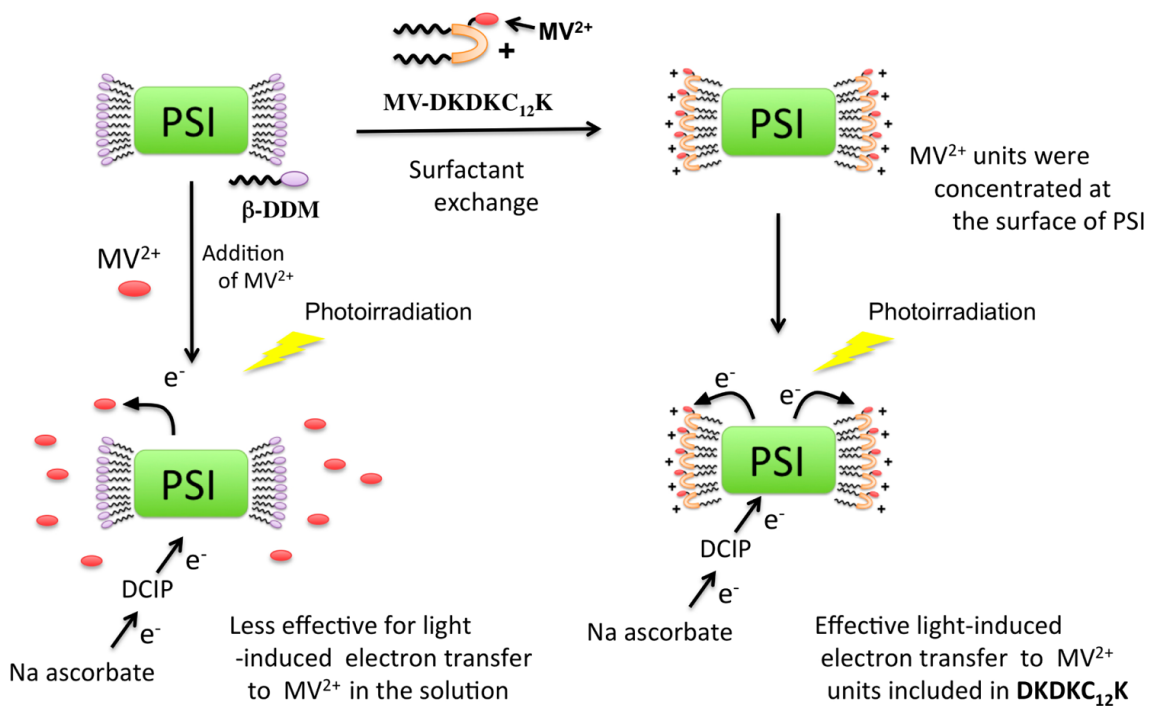


図 3-34 擬似分子内電子移動系（右）と分子間電子移動系（左）の比較

MV-DKDKC₁₂K で PSI を可溶化することにより、PSI の周囲に MV^{2+} を濃縮させることができるため、 β -DDM で PSI を可溶化している緩衝液中に MV^{2+} を添加した系（単に MV^{2+} を溶液中に分散させたもの）に比べて、 MV^{2+} への効果的な光誘起電子移動が起こると期待された。いうならば、前者が擬似分子内反応であり、後者は分子間反応でとなる。

はじめに、 MV^{2+} ユニットの可溶化試薬として機能する **DKDKC₁₂K** の N-末端側に導入した際の影響を評価するため、**MV-DKDKC₁₂K** の基本的なミセル形成挙動を蛍光法による cac 値の算出、DLS による溶液中での会合サイズの評価から行ったので以下に述べる。

3-3-3-2 蛍光プローブ法による MV-DKDKC₁₂K の cac 測定

3-3-1-3 項で述べた方法と同様の方法で MV-DKDKC₁₂K の cac 測定を行った。

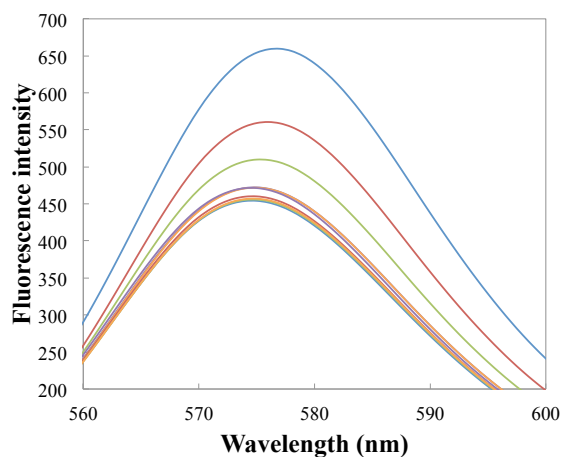


図 3-35 MV-DKDKC₁₂K の各濃度におけるローダミン B の蛍光スペクトル

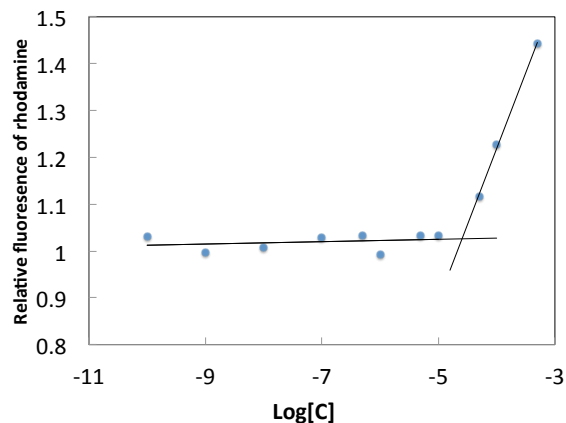


図 3-36 MV-DKDKC₁₂K の対数濃度 対 ローダミンの相対蛍光強度のプロット

図 3-3 6 の変曲点前後の 2 本の近似直線の交点より MV-DKDKC₁₂K の cac 値は次のように算出された。

表 3-8 MV-DKDKC₁₂K の cac 値

PG-surfactant	cac/mM
MV-DKDKC₁₂K	0.0068
DKDKC₁₂K	0.0083

図 3-3 6 に示すように、MV-DKDKC₁₂K においても濃度の上昇に伴い、蛍光強度上昇の際に 1 つの変曲点がみられ、この濃度を境にミセルあるいは何らかの会合体形成が示唆された。MV²⁺という大きな芳香族カチオン性基が修飾されているにもかかわらず、元の DKDKC₁₂K と比べて cac 値は若干小さい値であった。これは、DKDKC₁₂K よりも芳香族カチオン-アニオン間の付加的な相互作用が働いたことで、より会合しやすくなったためであると考えられる。

3-3-3-3 DLS 測定による水溶液中での会合体挙動の評価

MV-DKDKC₁₂K を 3-3-1-4 項で行った方法と同様に、異なる濃度のサンプルが、20 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 中で形成している会合体の粒径分布を DLS により評価した。

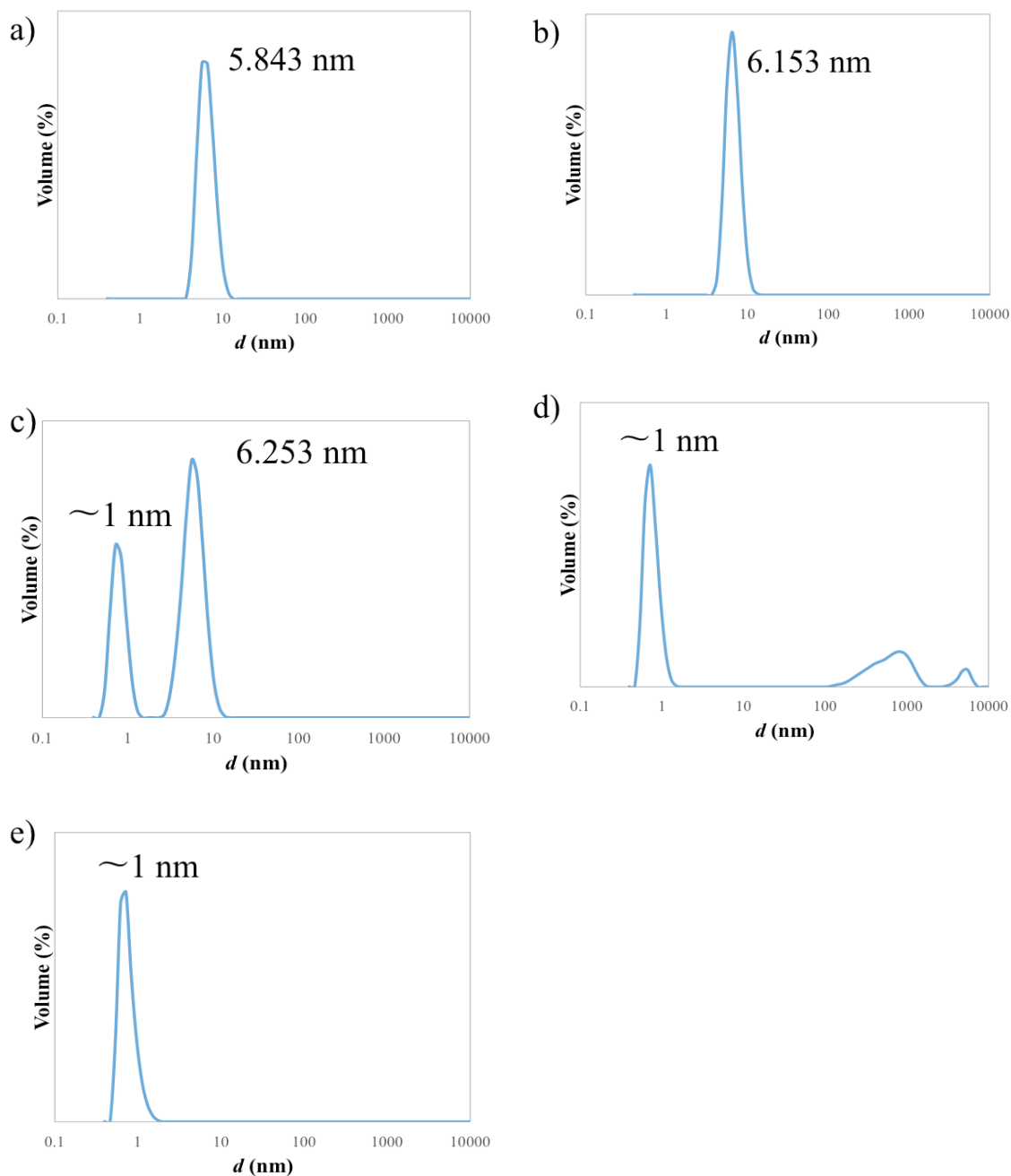


図 3-37 DLS による **MV-DKDKC₁₂K** の会合体粒径分布評価; a) 0.1%(w/v) (0.66 mM), b) 0.01%(w/v) (0.066 mM), c) 0.001%(w/v) (0.0066 mM), d) 0.0001%(w/v) (0.00066mM), e)0.0001%(w/v) (0.000066 mM))

図 3-3 7 の a)~c)に示すように、cac 値以上の濃度領域では直径約 6 nm の会合体のピークがみられ、**MV-DKDKC₁₂K** が串状のコンホメーションをとったときの長軸方向の分子サイズのほぼ 2 倍に一致し、ミセル形成が示唆された。一方で、cac 値以下の濃度領域では図 3-3 7 の c)~e)に示すように 1 nm 程度のサイズのみが観測され、単分子での溶解分散が示唆された。これらの濃度依存的な傾向は MV^{2+} の修飾を行っていない PG-surfactant と類似していたことから、メチルビオロゲンのような官能基を修飾したとしても、PG-Surfactant **DKDKC₁₂K** は、元々のミセル形成能を維持できる事が分かった。

3-3-4 **MV-DKDKC₁₂K** を用いた PSI の可溶化及び機能評価

3-3-3-1 項から電子移動メディエーターとなるメチルビオロゲンを複合化した新規の膜蛋白質可溶化試薬 (**MV-DKDKC₁₂K**) の合成を行い、界面活性剤としての基礎物性の評価を行った。その結果、興味深い事にメチルビオロゲンを未修飾の膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** と同様なミセル形成能の維持がみられた。そこで本章では、さらに **MV-DKDKC₁₂K** の膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価を行った。もし、新たに導入されたメチルビオロゲン部位に影響なく **MV-DKDKC₁₂K** が膜蛋白質を変性させることなく可溶化できれば、今回検討を行っている新規膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** が、膜蛋白質表面に様々な官能基や置換基を提示可能な新規分子骨格として有用である事の証明となる。

また、**MV-DKDKC₁₂K** で膜蛋白質である光化学系 I (PSI) を可溶化した場合、PSI の近傍にメチルビオロゲンが濃縮された状態になるため、PSI からメチルビオロゲン部位への効率の良い光誘起電子移動が起こると期待された。そこで、この電子移動効率に関して、溶液中での酸素電極を用いた検討と、ITO 電極基板上での光電流測定からの評価も行った。

3-3-4-1 吸収スペクトル測定による **MV-DKDKC₁₂K** により可溶化した際の PSI への構造的影響の評価

0.1 wt% **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化された PSI の吸収スペクトルを、PSI を変性させる事なく可溶化できる条件である 0.1 wt% β -DDM で可溶化された PSI の吸収スペクトルと比較することにより、膜内ドメインにあるクロロフィル色素

の脱離に伴う変性が起こっているか評価を行った。測定は、いずれも室温にて行った。

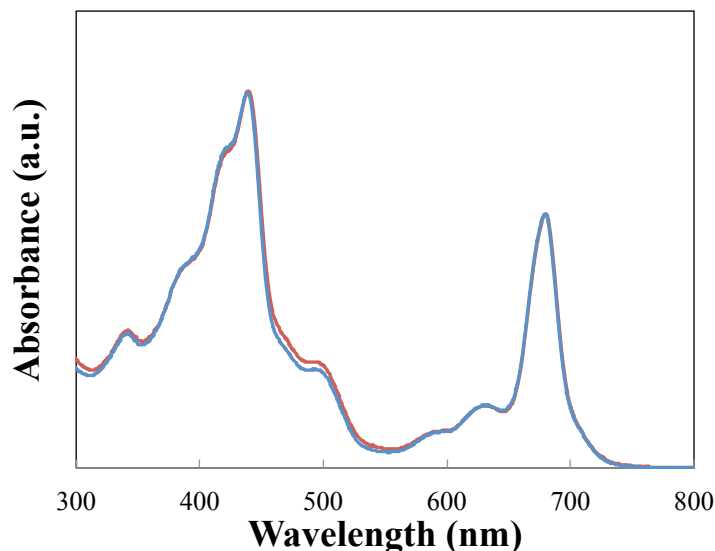


図 3-38 MV-DKDKC₁₂K と β-DDM で可溶化された PSI の吸収スペクトルの比較 (青: 0.1 wt% MV-DKDKC₁₂K, 赤:0.1 wt%β-DDM)

図 3-38 より、0.1 wt% MV-DKDKC₁₂K を含む緩衝液で可溶化された PSI の吸収スペクトルと、0.1 wt% β-DDM を含む緩衝液で可溶化した場合の吸収スペクトルに完全な一致が見られたことから、DKDKC₁₂K や DKDKC₁₂D と同様に、MV-DKDKC₁₂K も膜蛋白質可溶化試薬として利用可能である事が示唆された。

3-3-4-2 MV-DKDKC₁₂K で可溶化された PSI の DLS 測定による可溶化状態の評価

MV-DKDKC₁₂K で可溶化した際の PSI の溶液中での会合状態を評価するため、DLS による粒径分布測定を行った。

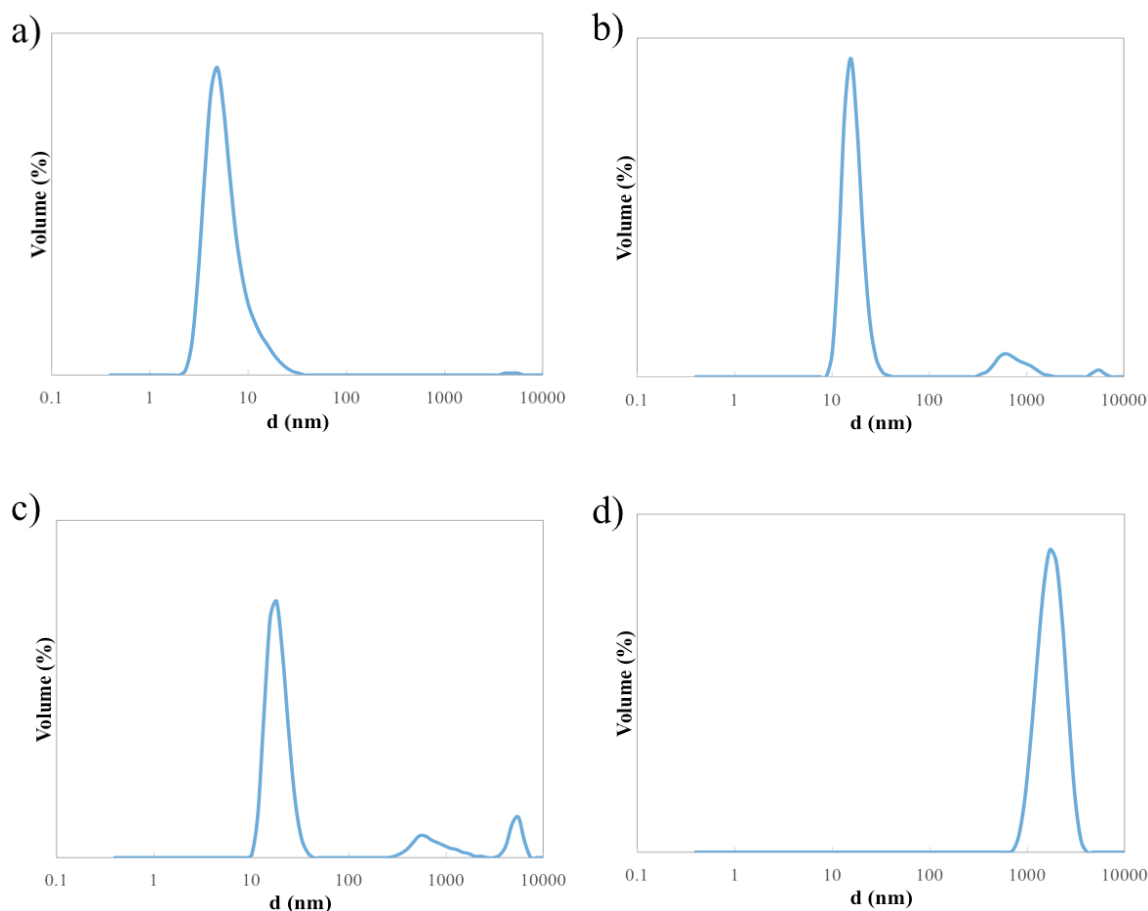


図 3-39 DLS による **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化した PSI の会合体粒径分布評価； a)0.1%(w/v) (0.66 mM)、(b) 0.01%(w/v) (0.066 mM)、(c) 0.001%(w/v) (0.0066 mM)、(d) 0.0001%(w/v) (0.00066 mM)

図 3-39 から、**MV-DKDKC₁₂K** 濃度 0.0001 wt%(w/v) (0.66 μ M)では、1000 nm より大きな直径を有する PSI 凝集体の形成が確認された。これは、**MV-DKDKC₁₂K** の cac 値以下の濃度であるために、PSI を可溶化できていないためと思われる。一方で、**MV-DKDKC₁₂K** の濃度を 0.001 wt%(w/v) (6.6 μ M) – 0.01 wt% (66 μ M)に増加させると、約 25nm の DLS ピークが生じ、このサイズが PSI 1 ユニットの長軸方向の直径と **MV-DKDKC₁₂K** 2 分子の分子サイズ一致した事から、PSI が 1 ユニットごとに分散され可溶化されている事が分かった。また 0.1 wt%(w/v) (660 μ M)では、相対的に PSI よりも **MV-DKDKC₁₂K** の濃度が過剰となるため、**MV-DKDKC₁₂K** ミセルの粒径のみが 6 nm 付近に観測された。以上の事から、PSI の可溶化挙動に関しては、**MV-DKDKC₁₂K** は **DKDKC₁₂K** と同様の性質が維持されている事が分かった。

3-3-4-3 酸素電極による **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価

図 3-3 4 で述べた、PSI と MV^{2+} の間の **MV-DKDKC₁₂K** を用いた擬似分子内相互作用の効果を確認するため、PSI からの光誘起電子移動効率を酸素電極により評価した。**MV-DKDKC₁₂K** は、可溶化試薬として使用される場合 MV^{2+} 基が PSI の周囲に集積すると考えられ、分子間で作用する分子間システムと比較して、この擬似分子内システムにおける PSI と MV^{2+} との間の電子移動が効率よく起こると考えた。**MV-DKDKC₁₂K** を用いた際の光誘起電子移動は、犠牲的還元剤としてアスコルビン酸ナトリウム (2 mM)、電子メディエーターとして DCIP (0.5 mM) の存在下で測定を行った。溶存酸素が MV^{2+} の一電子還元体を素早くクエンチするため、PSI からの MV^{2+} 基または MV^{2+} 分子へ電子移動した速度は、酸素電極を用いて溶存酸素の減少速度から見積もる事が可能である。

PSI に対する **MV-DKDKC₁₂K** の比は、可溶化に関与しない遊離 **MV-DKDKC₁₂K** の効果を低減するため、PSI 1 ユニットあたり 167 当量で一定とした。ちなみにこれまでの報告から、 β -DDM の場合 PSI 1 ユニットあたり約 200 分子が結合することが考えられるため、今回 PSI 1 ユニットあたりを 167 当量の **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化する事はそれなりに妥当性があると考えた。

12 nM PSI / 2 μ M **MV-DKDKC₁₂K** の濃度から、72 nM PSI / 12 μ M **MV-DKDKC₁₂K** の濃度まで、1 : 167 の分子数比を維持しつつ総分子数を増加させ、光誘起電子移動速度の比較を行った。3-3-4-2 項から、この実験で検討を行う **MV-DKDKC₁₂K** の濃度範囲は、一部 PSI の凝集を引き起こす濃度であると懸念されたが、3-3-2-7 項からみられるように酸素電極を用いた光誘起電子移動活性の評価においては、PSI に多少凝集が起こっていても正確な電子移動速度が見積もれることが確認されているため、十分に電子移動速度を評価可能と考えた。以上のことをふまえ、酸素減少速度の初速度から電子移動速度を概算し、濃度依存性を確認した結果を、図 3-4 0 に示した。

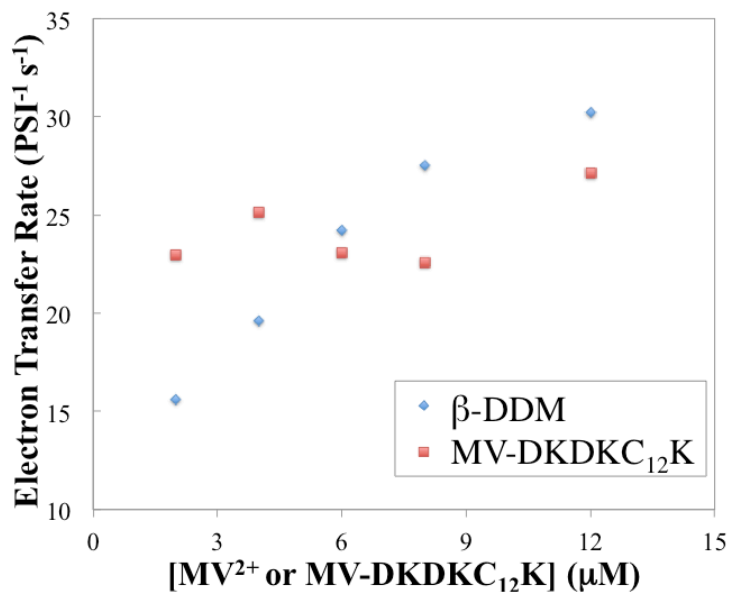


図 3-40 光誘起電子移動速度の濃度依存性

分子間電子移動の系 (MV^{2+} 分子の系) では MV^{2+} の濃度を減少させることで PSI から MV^{2+} への電子移動速度は単調な減少を示し、このような挙動は、二分子間反応に特徴的な性質であった。 MV^{2+} の濃度が $2 \mu M$ まで減少することで、電子移動速度は $15 \text{ PSI}^{-1}\text{s}^{-1}$ まで減少がみられた。一方擬似分子内電子移動の系 ($MV\text{-DKDKC}_{12}\text{K}$ の系) では、 $MV\text{-DKDKC}_{12}\text{K}$ の濃度が減少したとしても、電子移動速度の維持がみられ、 $8 \mu M$ 以下の濃度領域でも約 $23 \text{ PSI}^{-1}\text{s}^{-1}$ の電子移動速度が観測された。このことは、擬似分子内電子移動の系では、 MV^{2+} の濃度 (すなわち、 $MV\text{-DKDKC}_{12}\text{K}$ の濃度) を減少させても、PSI が $MV\text{-DKDKC}_{12}\text{K}$ に可溶化されることで、自動的に MV^{2+} 基が PSI 近傍に存在し、分子間の系に比べて効率のよい電子移動が達成できたためと考えられた。しかしこのような効果は、 MV^{2+} の濃度が高い領域では顕著にみられなかった。これは、 $MV\text{-DKDKC}_{12}\text{K}$ における $\text{DKDKC}_{12}\text{K}$ の部位と MV^{2+} 部位の間のリンカー長さや構造が完全に最適化されていないために、擬似分子内反応の効果が活かしきれていないためと考えられる。

3-3-4-5 ITO 基板の上に吸着させた **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化された PSI の光電流測定

7-carboxy-1-heptanethiol で SAM 修飾を行った ITO 基板の上に吸着した PSI について、紫外可視吸収スペクトルを測定することで、クロロフィル色素の脱離に伴う変性がみられるか評価を行った。PSI は、**MV-DKDKC₁₂K** により可溶化されたサンプルを用いた。

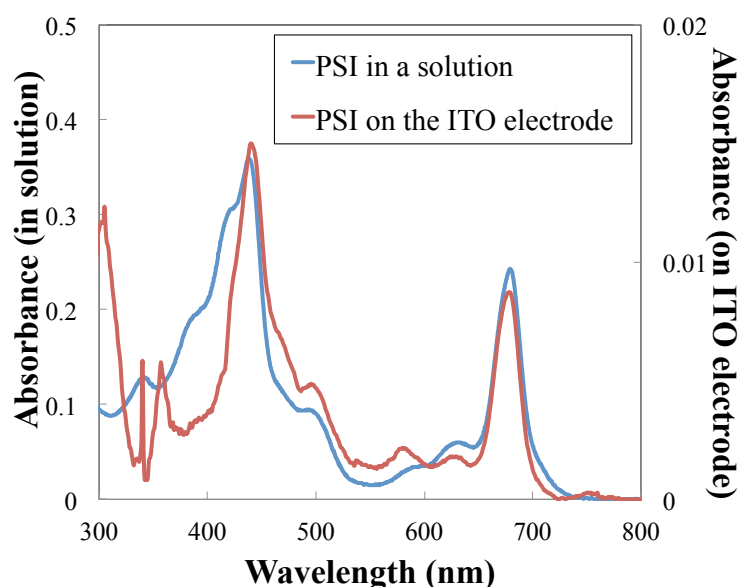


図 3-41 ITO 電極上に吸着した PSI の吸収スペクトル

図 3-4 1 に示すように、**MV-DKDKC₁₂K** により可溶化された PSI の溶液中の吸収スペクトルと、ITO 基板上の吸収スペクトルの比較から、680 nm に存在する Qy バンドの λ_{\max} に一致がみられ、PSI がクロロフィル色素の脱離なく ITO 基板上に固定化できていることが分かった。全体的に吸光度が小さいのは、基板上に単層で吸着させたことで、単位断面積当たりの PSI 濃度が薄くなったためである。

3-3-4-6 ITO 基板へ吸着された PSI の光電流測定

前項の検討から、7-carboxy-1-heptanethiol で SAM 修飾を行った ITO 基板上に **MV-DKDKC₁₂K** により可溶化された PSI を変性させることなく固定化できてい

る事が確認されたため、次にこの PSI からの光電流測定を行った。

PSI は、アニオン性の基板表面に対して P700 側から優先的に吸着する事が知られており、光励起された場合には、電子移動により生成される P700⁺に電子を補完するため、電極から電子が供給される（その結果、光電流はカソード電流として観測される）。一方で、光照射により生成される電子は、電解液中に存在するメチルビオロゲンなどの電子受容体に移動し、最終的に対極に渡される。このため、作用電極上で観測される光電流は、カソード電流となる。今回は、**MV-DKDKC₁₂K** により可溶化された PSI を ITO 基板の上に固定化するため、PSI の近傍に MV²⁺基が存在する事で、PSI からの効率の良い電子の引き抜きと、それに伴う電極からのカソード電流応答が期待された。

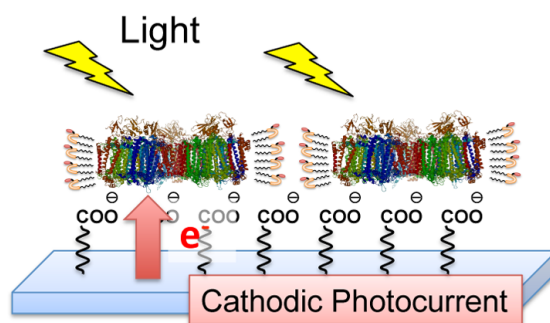


図 3-42 光電流測定模式図

まず、コントロールとなる β -DDM で可溶化した PSI を 7-carboxy-1-heptanethiol で SAM 修飾を行った ITO 基板に固定化したサンプルからの光電流の評価を行った。7-carboxy-1-heptanethiol で表面 S 修飾を行った ITO 電極上に β -DDM に可溶化された PSI を吸着させた後、電解液中に電子メディエーターとして 0.1 mM MV²⁺分子を導入し、ITO 電極に負電位 (-0.2 V vs Ag / AgCl) を印加しながら、光電流測定を行った。

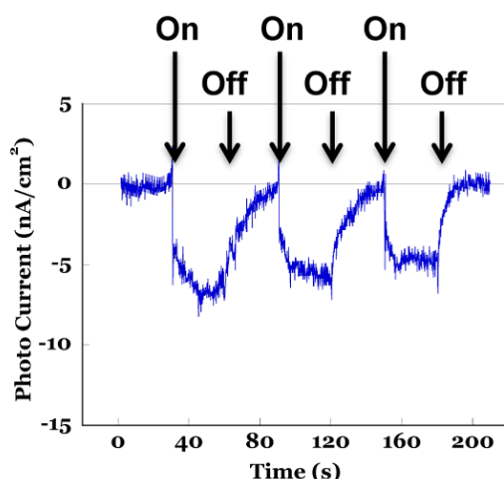


図 3-43 β -DDM にて可溶化を行ったサンプルについての光電流測定

その結果を図 3-4 3 に示した。440 nm のパルス型の光照射に応答し、矩形型の光誘起電流（光電流）応答が観測された、また電流の方向は、予想通りカソード方向に観測された。このことは、P700 側が比較的優先的に ITO 電極側に面していることも示唆している。また、光照射に伴い観測される光電流の立ち上がりが、ポルフィリンなどの低分子を吸着して観測される光電流応答に比べて、遅延する傾向が見られた。これは、PSI から電解液中に存在する MV^{2+} 分子への電子移動効率が悪い事によると、予測された。

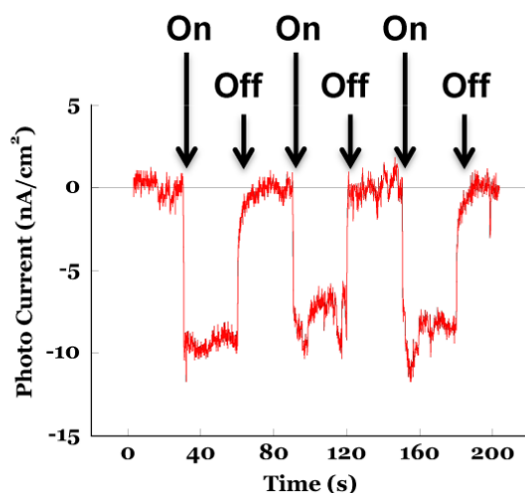


図 3-44 MV-DKDKC₁₂K にて可溶化を行ったサンプルについての光電流測定

同様に MV-DKDKC₁₂K を用いた系について、次に評価を行った。ITO 電極上に PSI/MV-DKDKC₁₂K を吸着させた後、ITO 電極に負電位 (-0.2 V vs Ag/AgCl)

を印加しながら、440 nm の光照射を行い、光電流を観察した。 β -DDMにより可溶化された PSI を吸着させた ITO 基板と同様に、カソード電流として光電流が得られた事から、PSI の P700 側が優先的に電極に面していることが示唆された。また光電流は、 β -DDM を用いた系と比較し、光照射後の応答が素早くなる事がわかった。これは、PSI の近傍に MV-DKDKC₁₂K に付加された MV²⁺が存在する事で、PSI から MV²⁺への効率の良い電子移動が達成された事によると推測された。また、光エネルギー変換の量子収率を計算すると 0.03%であった。

3-4 まとめ

本章では新規膜蛋白質可溶化試薬の開発を行った。その基本骨格としてとしてアルキルアミド鎖を側鎖に持つシステイン残基を2つ持つリポペプチド誘導体であるペプチドジェミニ型界面活性剤 (PG-surfactant) を選択し、ペプチド部位の配列スクリーニングにより、中性で安定化に溶解できる誘導体として、**DKDKC₁₂K** 及び **DKDKC₁₂D** の取得に成功した。

当初、アルキルアミド鎖を側鎖に持つ2つのシステイン間のペプチド配列として、水溶性アミノ酸であるアスパラギン酸、リジン、アルギニン、ヒスチジン、セリン等が3つあるいは4つ連続したオリゴペプチド配列を選択し、これらの溶解度の検討を行ったが、意外な事にいずれも中性の緩衝液中では溶解しなかった。一方で、リジンとアスパラギン酸を交互に2回並べ、N-末端側にリジンやアスパラギン酸を一つ導入した誘導体である **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** では、中性条件下で十分な溶解度を示すことがわかった。これは、酸性、塩基性のアミノ酸を交互に配置したことにより、確実にカチオン、アニオンが生成してイオン性を帯びる事で、上手く中性の緩衝液中で溶解することができたと思われる。

物性評価の方法として、表面張力法、蛍光プローブ法を用いて臨界凝集濃度 (cac) の算出を行った。表面張力法について、今回検討を行ったすべての PG-surfactant について濃度上昇に伴う表面張力の変化に、1つの変曲点がみられ、cac 値の算出が可能であった。しかし、**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** では変曲点以降も表面張力の減少がみられたため、プレート上への強い吸着挙動が正確な cac 値の算出を困難としていることが推測された。そのため、**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** については、蛍光プローブ法を用いて cac 値の算出を行った。PG-surfactant の濃度上昇に対して、蛍光強度変化に1つの変曲点がみられ、cac 値を定義することができた。この方法では変曲点以降に蛍光強度の減少はみられず、cac 値を算出する事が可能であった。2本のアルキル鎖を一つの分子内に持っているため、膜蛋白質可溶化試薬として広く用いられている β -DDM に比べて遥かに低い cac 値が算出された。このことは、より少ない量で膜蛋白質を可溶化できることを意味し、膜蛋白質の変性を抑えた可溶化に対して優位な物性と考えられた。

中性緩衝中での **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** の会合挙動に関して、動的光散乱

(DLS)測定により検討を行った。その結果、いずれの界面活性剤も、cac 値以上の濃度でミセル様の会合体形成が確認された。1 mM の濃度以上の領域でも引き続きミセル形成のみしか観測されなかった事から、従来のペプチド配列を含む界面活性剤と異なり、ペプチド部位同士での意図しない会合は抑制できることが示唆された。

続いて PG-surfactant **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** をもちいて、光合成関連膜蛋白質である光化学系 I、光化学系 II (PSI、PSII) の可溶化の実験を行うことで、新規膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価を行った。特に個々の膜蛋白質への影響を詳細に検討するため、ここでは界面活性剤置換法による検討を行った。室温での吸収スペクトル測定、77K での定常光蛍光スペクトル測定では、膜貫通領域に存在するアンテナクロロフィル色素の集合状態に関して、その変成度合いの評価が可能であるが、まずはこれらの測定から **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** が PSI、PSII を変性させる事なく可溶化できている事が分かった。

光照射により生成する P700* の電荷分離状態の寿命を過渡吸収スペクトル測定により見積もる事で、PSI 膜外ドメインに存在するサブユニット蛋白質 PsaC、PsaD、PsaE の離脱に伴う変性が、PG-surfactant で可溶化することにより起こっているか検討を行った。その結果、室温で扱う範囲では、全く変性が起こっていない事が確認された。これらのことから、**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** は非常に良い、新規の膜蛋白質可溶化試薬である事が確認された。また **DKDKC₁₂D** を用いた際には β -DDM を用いた際に比べて、熱耐性の向上も見られている。

さらに、PSI、PSII の機能である光誘起電子移動について評価を行ったところ、 β -DDM により可溶化された場合と同様な値が得られ、機能の面からも PSI、PSII の新規膜蛋白質可溶化試薬として有用である事が分かった。

これらの結果を踏まえ、PSI の機能である光電子移動活性を経て生成される還元電子を受け取る事が可能な電子受容体(メチルビオロゲン)を新規の膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** に修飾した **MV-DKDKC₁₂K** を合成し、ミセル形成能などの基本物性から、膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価、MV²⁺部位への電子移動効率の評価などを行った。

MV-DKDKC₁₂K の濃度変化に伴う蛍光プローブの蛍光強度変化から、**MV-DKDKC₁₂K** の cac 値の算出を行った。その結果、MV²⁺部位を未修飾の **DKDKC₁₂K** と同様に濃度に対する蛍光強度変化に 1 つの変曲点がみられ、cac 値を定義することができた。また、その算出された cac 値は、MV²⁺部位を未修

飾の **DKDKC₁₂K** とほぼ同様の値を示した。

DLS 測定により **MV-DKDKC₁₂K** の水溶液中での会合挙動の検討を行った結果、cac 値以上の濃度では約 6 nm オーダーの DLS ピークのみが観測され、**MV²⁺**部位を未修飾の **DKDKC₁₂K** と同様にミセル様会合体のみの形成が示唆された。

そこで次に、**MV-DKDKC₁₂K** の膜蛋白質可溶化能について評価を行った。方法は **MV²⁺**部位を未修飾の **DKDKC₁₂K** と同様に、界面活性剤置換法により行った。コントロールとなる β -DDM を用いて可溶化した PSI の吸収スペクトルとの比較から、膜内ドメインに存在するアンテナクロロフィルの集合構造を維持した可溶化がなされている事が確認された。この結果は、PG-surfactant **DKDKC₁₂K** の分子骨格を用いる事で、メチルビオロゲンの様な膜蛋白質の可溶化には直接関与しない機能分子を修飾しても、膜蛋白質可溶化能を失わないことを意味し、他の機能性分子を修飾することも可能であることが示唆された。

MV-DKDKC₁₂K を用いることによる PSI 周辺領域への **MV²⁺**の濃縮効果(擬似分子間反応)を確認するため、酸素電極を用いた PSI から **MV²⁺**部位への光誘起電子移動活性の評価を行った。その結果、 β -DDM を用いて PSI を可溶化した系に **MV²⁺**分子を同濃度添加した系(分子間反応)と比較し、特に **MV²⁺**濃度が低い領域にて、擬似分子間反応の効果が顕著に見られる結果となった。これは **MV-DKDKC₁₂K** で可溶化を行うことで PSI の周辺領域に **MV²⁺**が自発的に濃縮され、分子間反応の系よりも衝突頻度が高くなる事で効率よく電子を受け取ることができたためと考えられる。

ITO 基板上に吸着固定化したあとの、PSI からの光電流測定では、**MV-DKDKC₁₂K** で可溶化したものに関して、 β -DDM で可溶化し電解液中に同濃度の **MV²⁺**分子を添加した系と比較して、電子移動効率やエネルギー変換効率の向上、さらに光照射に対するシャープな電流発生挙動などが観測された。

参考文献

- 1) 須藤 雄気、蛋白質科学会 アーカイブ#009
- 2) F. M. Menger, C. A. Littau, *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 1451-1452 (1991).
- 3) R. Zana, M. Benraou, R. Rueff, *Langmuir*, **7**, 1072-1075 (1991).
- 4) Y.-P. Zhu, A. Masuyama, Y. I. Kirito, M. Okahara, M. Rosen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **69**, 626-632 (1992).
- 5) F. M. Menger, J. S. Keiper, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 1906-1920 (2000)
- 6) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauu, *Nature*, **411**, 909-917 (2001).
- 7) Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, N. Kamiya, *Nature*, **473**, 55-60 (2011).
- 8) 彦坂 幸毅 低温科学 vol.67(光合成研究法), 67-71.
- 9) M.-K. Oh, S.-E. Bae, J.-H. Yoon, M. F. Roberts, E. Cha, C.-W. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.* **25**, 715-720 (2004).
- 10) E. D. Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato, V. Bocchini, *Anal. Biochem.*, **115**, 278-286(1981).
- 11) H. M. Tavish, R. Picorel, M. Seibert, *Plant Physiol.*, **89**, 452-456 (1989).
- 12) S. Hoshina, R. Sakurai, N. Kunishima, K. Wada, S. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 61-68 (1990).
- 13) K. Sonoike, H. Hatanaka, S. Katoh, S. Itoh, *Plant Cell Physiol.*, **31**, 865-870 (1990)
- 14) 沈 健仁 低温科学 vol.67(光合成研究法), 551-560.
- 15) F. Müh, A. Zouni, *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 219-228 (2005).
- 16) A. K. Manocchi, D. R. Baker, S. S. Pendley, K. Nguyen, M. M. Hurley, B. D. Bruce, J. J. Sumner, C. A. Lundgren, *Langmuir*, **29**, 2412-2419 (2013).
- 17) A. Domínguez, A. Fernández, N. González, E. Iglesias, L. Montenegro, *J. Chem. Educ.*, **74(10)**, 1227-1231 (1997).

第4章 膜蛋白質抽出試薬としての PG-surfactant の設計

4-1 緒言

膜蛋白質は天然の生体膜中で、物質輸送や細胞接着、細胞間のシグナル伝達などの幅広い生理学的機能を担っている。そのため、現在膜蛋白質機能に着目した研究が進められている。例えば、G 蛋白質共役受容体 (**G-Protein Coupled Receptor**, **GPCR**) (図 4-1) ^{1),2)} が注目を集めている。GPCR は細胞外の刺激を細胞内部に伝える刺激受容とシグナル伝達に関与する膜蛋白質であり、GPCR をターゲットとしてシグナル伝達を制御する医薬品の研究が行われている。しかしながら、膜蛋白質の結晶化や膜蛋白質を用いた研究のためには、安定に膜蛋白質を可溶化し、単離精製する必要があるが、膜蛋白質の単離精製に用いることができる界面活性剤の報告例は少ない³⁾。そのため、膜蛋白質の単離精製に用いることができる「膜蛋白質抽出試薬」の開発ニーズは依然として高い。

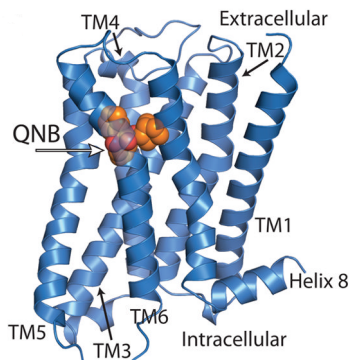


図 4-1 GPCR の結晶構造の一例 (ヒト・ムスカリン M2 受容体)¹⁾

これまでの検討から、2 種類の PG-surfactant (**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D**) は、光化学系 I (PSI)、光化学系 II (PSII) などの膜蛋白質を、変性を抑えつつ、水中に可溶化させることが可能であると分かった。しかし一方で、PSI、PSII が組み込まれている生体膜 (シアノバクテリアのチラコイド膜) からの抽出には利用できなかった。我々は、前者の膜蛋白質を水中に凝集させることなく分散可溶化させることを「可溶化 (Solubilization)」、後者の生体膜を崩して膜蛋白質をバッファー溶液中へ取り出すことを「抽出 (Extraction)」と区別しているが、膜蛋白質の単離精製の際に用いる試薬には「可溶化」の能力とともに「抽出」の能力も求められる (このような試薬のことを、一般に膜蛋白質抽出試薬と呼ぶ)。そのため、膜蛋白質の単離精製の際に用いることを目的とした PG-surfactant ベ

一スの膜蛋白質抽出試薬の開発のためには、膜蛋白質の変性を抑えた「可溶化」の能力に加えて、「抽出」能力を備えた **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** とは異なる新たな分子の設計が必要であった。

我々は **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** が生体膜から PSI、PSII を「抽出」できない原因として、チラコイド膜を構成する脂質に着目した。チラコイド膜は主に Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) や Digalactosyl diacylglycerol (DGDG) ら (図 4-2) の糖脂質からなることが知られている⁴⁾。これらの糖脂質は親水部である糖の部分が分子間で水素結合することで、他の脂質膜と比較しより強固な会合状態を形成することが考えられている。一方で、これまでに検討を行っていた 2 種類の PG-surfactant (**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D**) は、いずれも極性基部分が親水性アミノ酸のみから構成され、また特徴的な 2 次構造も形成しない、言わば柔軟な構造をもつ膜蛋白質可溶化試薬であった。そのため、これらの PG-surfactant は強固な会合状態を形成しているチラコイド膜構造を乱すことができず、膜蛋白質の抽出を行うことができないのではないかと考えた。

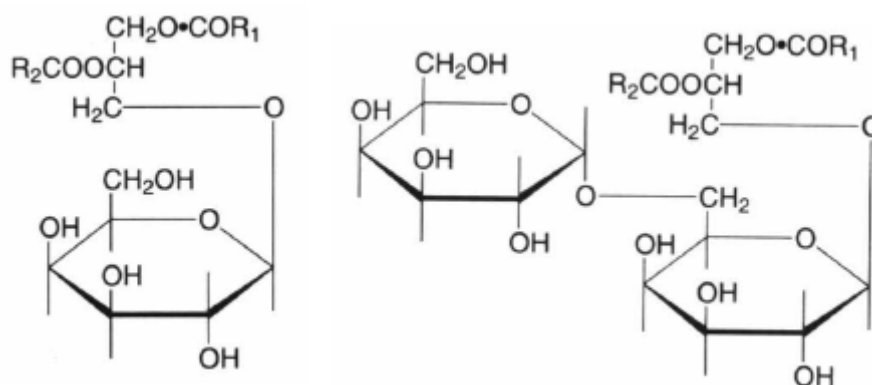


図 4-2 チラコイド膜を構成する主な糖脂質分子
 (左) Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG)の構造
 (右) Digalactosyl diacylglycerol (DGDG)の構造

そこで本研究では、リンカーペプチド部位に比較的疎水性が高く、且つ特定の 2 次構造をとることで剛直性を持つペプチド配列を含んだ PG-surfactant ベースの新規界面活性剤の設計合成を検討した。具体的には、ターン構造をとるペプチド配列に着目した。β-ターンモチーフを形成する配列の例には、ユビキチンの分子内に存在する「-Thr-Leu-Thr-Gly-Lys-」配列が知られている⁵⁻⁷⁾。また Searle らによって、「-Asn-Pro-Asp-Gly-」配列も同様に β-ターン構造をとること

が報告されている (図 4-3)⁵⁾。我々のこれまでの検討から、PG-surfactant のリンカーペプチド部位のアミノ酸配列は 3 から 4 残基程度が良いということが分かっているため、ここでは後者の「-Asn-Pro-Asp-Gly-」配列を PG-surfactant 分子内のリンカーペプチド部位 (X の部分) に導入することとした。一方で疎水性のペプチド配列を含むことで懸念される中性緩衝液への溶解性減少を改善するために、Y の部分に Lys または Asp を導入した **NPDGC₁₂K**、**NPDGC₁₂KK**、**NPDGC₁₂D**、**NPDGC₁₂DD** を設計し検討することとした。また、β-ターン構造を形成する効果を明らかにするために、「-Asn-Pro-Asp-Gly-」配列の内の Asn を Asp に変えた β-ターン構造形成能を下げた **DPDGC₁₂KK** も同様に合成した。また、他に非天然のアミノ酸⁸⁾からなる「-β-Ala-Nip(-)-Nip(+)-β-Ala-」配列が β-ターン構造をとることが知られているため⁹⁾、こちらをリンカーペプチド部位 (X の部分) に導入した PG-surfactant **A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂D** についても、同様に検討を行った。

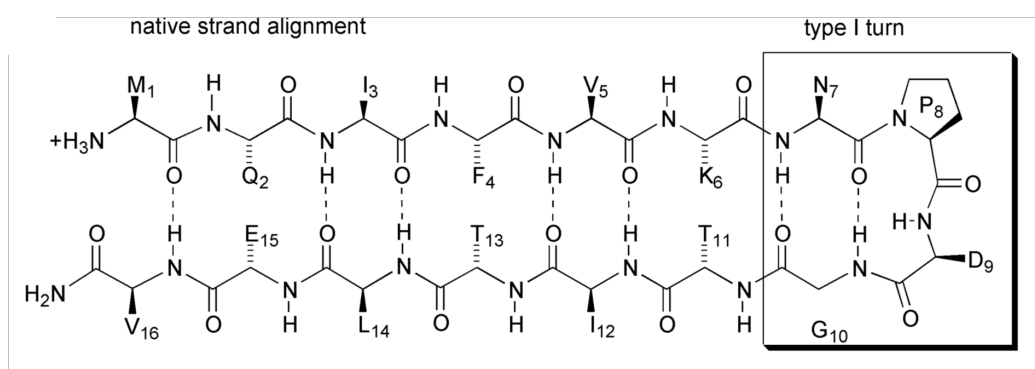


図 4-3 β-ターン構造を形成するペプチド配列 [-Asn-Pro-Asp-Gly-]

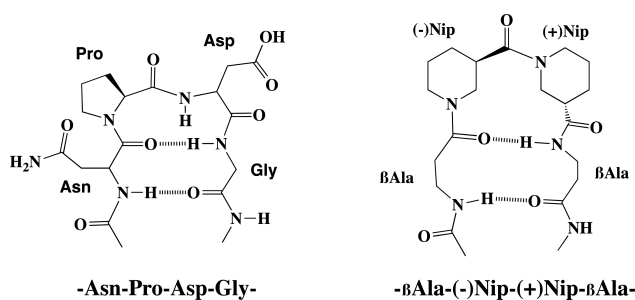


図 4-4 β-ターン構造をとるペプチドの化学構造

はじめに、新規化合物である β -ターン構造をとるペプチドモチーフを導入した PG-Surfactant の基礎的なミセル形成能や臨界会合濃度、会合能を明らかにするため、蛍光プローブ法を用いた PG-surfactant の臨界会合濃度 (cac 値) の算出、動的光散乱 (DLS) を用いた溶液中での会合挙動の評価を行った。次に、具体的にこれらの膜蛋白質の抽出能力の評価のためには、チラコイド膜 (図 4-5) からの PSI、PSII の膜蛋白質抽出系を用いた。中性緩衝液中で十分な溶解度と、PSI、PSII に対して可溶化能を示した PG-surfactant (NPDGC₁₂KK、DPDGC₁₂KK、A^bNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^bC₁₂K) について、チラコイド膜からの PSI、PSII の抽出を行い、吸収スペクトル、Native PAGE により抽出成分の評価を行った。

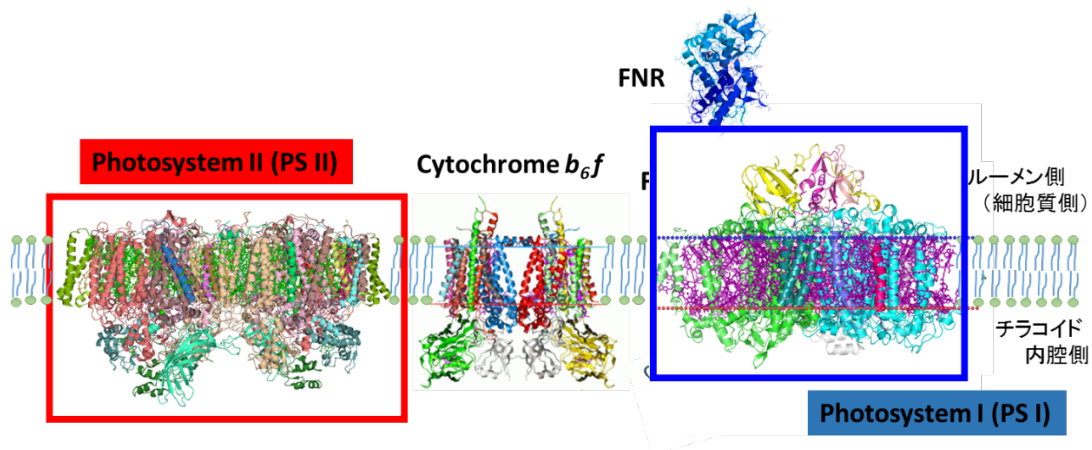


図 4-5 チラコイド膜の模式図

4-2 実験項

4-2-1 PG-surfactant の合成

第2章 2-2-1 項の方法と同様に、長鎖アルキルアミド鎖をあらかじめ Fmoc-Cys-OH 側鎖に導入した Fmoc-Cys(C₁₂)-OH 誘導体を合成し、PG-surfactant はすべて Fmoc 固相合成用の樹脂担体上で合成する方法をとった。

4-2-1-1 種々の PG-surfactant の樹脂担体上での合成

本章で検討した PG-surfactant は、次のような配列をもち、それぞれの収量、収率、高分解能質量分析による同定データも以下に示した。

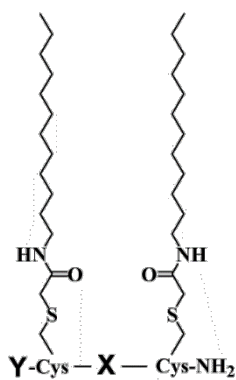


図 4-6 PG-surfactant の構造

表 4-1 評価を行ったペプチドジェミニニ界面活性剤 (PG-surfactant) の一覧

PG-surfactant	-X-部のペプチド配列	Y-部のペプチド配列
NPDGC₁₂K	-Asn-Pro-Asp-Gly-	Ac-Lys
NPDGC₁₂KK	-Asn-Pro-Asp-Gly-	Ac-Lys-Lys
NPDGC₁₂D	-Asn-Pro-Asp-Gly-	Ac-Asp
NPDGC₁₂DD	-Asn-Pro-Asp-Gly-	Ac-Asp-Asp
DPDGC₁₂KK	-Asp-Pro-Asp-Gly-	Ac-Lys-Lys-
A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K	-β-Ala-(-)Nip-(+)Nip-β-Ala-	Ac-Lys-
A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂D	-β-Ala-(-)Nip-(+)Nip-β-Ala-	Ac-Asp

NPDGC₁₂K: HRMS (EI-TOF, [M + H]⁺): calcd. for C₅₇H₁₀₃N₁₂O₁₃S₂, 1227.7209; found, 1227.7206

NPDGC₁₂D: HRMS (EI-TOF, [M + Na]⁺): calcd. for C₅₅H₉₅N₁₁O₁₅S₂+Na, 1236.6348; found, 1236.6323

NPDGC₁₂DD: HRMS (EI-TOF, [M + Na]⁺): calcd. for C₅₉H₁₀₀N₁₂O₁₈S₂ + Na, 1351.6618; found, 1351.6609

DPDGC₁₂KK: HRMS (EI-TOF, [M + H]⁺): calcd. for C₆₃H₁₁₄N₁₃O₁₅S₂, 1356.7999; found, 1356.7997

A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K: HRMS (ESI-TOF, [M + H]⁺): calcd. for C₆₀H₁₁₀N₁₁O₁₀S₂, 1208.7879; found, 1208.7887.

A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂D: HRMS (EI-TOF, [M + Na]⁺): calcd. for C₆₂H₁₀₇N₁₁O₁₅S₂ + Na, 1332.7287; found, 1332.7264.

4-2-2 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定¹⁰⁾

第 3 章 3-2-2 項に記述してあるのと同様に、ANS を蛍光プローブに用いる方法にて評価を行った。

4-2-3 DLS 測定による水溶液中での会合体挙動の評価

第 3 章 3-2-3 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

4-2-4 シアノバクテリア由来の光合成膜蛋白質、光化学系 I (PSI)、光化学系 II (PSII) の単離精製

本章で用いた PSI、PSII は、第 3 章 3-2-4 項と類似の方法で単離精製したものをを用いた。PSI¹¹⁾⁻¹³⁾、PSII^{11), 14)}ともに、好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* のものをを用いた。

4-2-4-1 本実験で使用した buffer 一覧

第 3 章 3-2-4-3 項に記述してある buffer と同様の組成のものをを用いた。

4-2-5 界面活性剤置換法による膜蛋白質可溶化

第3章 3-2-5 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

4-2-6 PG-surfactant で可溶化された PSI、PSII の、吸収スペクトル測定による変性度合いの評価

第3章 3-2-6 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

4-2-7 PG-surfactant で可溶化された PSI の 77K における蛍光測定による、PSI への構造的影響の評価¹⁵⁾

第3章 3-2-7 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

4-2-8 過渡吸収測定による PSI の P700* の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI の構造的影響の評価¹⁶⁾

第3章 3-2-8 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

4-2-9 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価¹⁷⁾

第3章 3-2-9 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

4-2-10 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSII の光誘起電子移動活性の評価¹⁷⁾

第3章 3-2-10 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

4-2-11 シアノバクテリア由来のチラコイド膜

実験には *T. vulcanus* 由来のチラコイド膜を用いた。集菌したシアノバクテリア *T. vulcanus* を Lysozyme 処理、フレンチプレス処理あるいは浸透圧ショックにより外膜を破壊し、これを除去することによりチラコイド膜サンプルは得た。得られたチラコイド膜サンプルは、使用するまで極低温冷凍庫 (-78°C) にて保

存した。

4-2-12 抽出実験で使用する buffer 一覧

洗浄用 buffer ; Buffer C (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2)、100mM MgCl₂)

抽出用 buffer ; Buffer D (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.2)、100 mM MgCl₂、
25 %(w/v)グリセロール)

4-2-13 チラコイド膜からの膜蛋白質抽出

4-2-11 に記載した方法で得られたチラコイド膜の懸濁溶液 (0.1 mg Chl a)に 100 mL の Buffer C を加え、懸濁した後に遠心分離にかけた。遠心分離後上澄みは捨て、再度 100 mL の Buffer C を加え懸濁した後に遠心分離にかけた。この操作を 3 回繰り返すことで、膜結合性の水溶性蛋白質フィコビリソームのサブユニットであるアロフィコシアニンの大部分を除去した (この操作では完全には、除けない)。その後、洗浄を終えたチラコイド膜に対して Buffer C に溶かした 1 %(w/v)の PG-surfactant を加えて懸濁し、暗黒下氷上で 30 min 静置することで、膜蛋白質 PSI、PSII の抽出を行った。この溶液を遠心分離し (15,000 × g、45 min)、可溶化された膜成分を上清溶液に得た。PSI、PSII の抽出効率は、メタノールを用いて PSI、PSII 内の Chl a を抽出し、紫外可視吸収スペクトル測定により定量をすることにより行った ($\epsilon_{665} = 79.95 \text{ mgChl } a^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ in methanol)^{18),19)}。

4-2-14 吸収スペクトル測定によるチラコイド膜から PG-surfactant で抽出された成分の評価

4-2-13 に記載した方法で、PG-surfactant により抽出された成分について、吸収スペクトル測定により評価を行った。1 wt% β -DDM を含む Buffer C により抽出された成分とスペクトルを比較することで、PSI、PSII などの Chl a を含む膜蛋白質成分の抽出量および抽出効率について評価した。

4-2-15 Native-PAGE によるチラコイド膜から PG-surfactant で抽出された成分の評価^{18),20),21)}

4-2-13 に記載した方法にて、PG-surfactant により抽出された蛋白質成分を、Native-PAGE により分析をおこなった。10 mg Chla 色素成分を含む膜蛋白質量を泳動した (濃度を変えた場合に、Native-PAGE の泳動パターンが変化してしまう

ため)。PG-surfactant により抽出された成分については、泳動パターンが β -DDM で可溶化されたサンプルと変わらなくするため、4-2-5 に記載された方法にて 0.1% β -DDM に界面活性剤置換したサンプルを準備し、泳動サンプルとして用いた（界面活性剤を変えると、Native-PAGE の泳動パターンが変化してしまうため）。電気泳動は、4 mA で 90 分間、その後 300 V で 6 時間泳動した。泳動後のゲルは、クロロフィル色素などにより色を持つ膜蛋白質成分の分離パターンを未染色で評価するとともに、CBB で染色しそれ以外の混在する蛋白質成分についても評価を行った。

4-2-15-1 Native-PAGE で使用する Buffer 一覧

泳動 Buffer

Cathode Buffer : 50 mM トリシン、7.5 mM イミダゾール、0.05 % (w/v)
デオキシコール酸ナトリウム

Anode Buffer : 25 mM イミダゾール (pH 7.0) (HCl を添加し pH7.0 に調製)

ゲル作成用 Buffer

3× Gel Buffer : 75 mM イミダゾール (pH 7.0)、1.5 M 6-アミノヘキサン酸
AB conc (37.5:1) : 60 % アクリルアミド、1.6 % ビスアクリルアミド

4-2-15-2 ゲルの組成

Native-PAGE で使用する、ゲルの組成を次の表に示す。

表 4-2 ゲルの組成

	Stack gel		Gradient separation gel	
	4.0 % AB conc	5 % ABconc	12 % AB conc	
AB conc	0.4 ml	0.75 ml	1.8 ml	
3× Gel Buffer	2.0 ml	3.0 ml	3.0 ml	
グリセロール	-	-	2.0 g	
水	3.6 μ l	5.25 μ l	2.62 ml	
10% APS	50 μ l	40 μ l	30 μ l	
TEMED	5.0 μ l	4.0 μ l	3.0 μ l	

4-3 結果と考察

4-3-1 β -ターンペプチド配列を導入した PG-surfactant

4-3-1-1 pH 7 の中性緩衝溶液中での PG-surfactant の会合挙動に関する考察

膜蛋白質抽出試薬として PG-surfactant を用いるためには、中性で水に可溶、もしくはミセルのような会合構造をとり水中に分散していることが必要である。そこで、それぞれの PG-surfactant を pH 7 の 20 mM リン酸緩衝溶液に溶かした。溶解度の判定は目視観察とした。以下表に結果をまとめる。

表 4-3 各 PG-surfactant の溶解性

PG-surfactant	pH 7 における溶解性
NPDGC₁₂K	×
NPDGC₁₂KK	○
NPDGC₁₂D	×
NPDGC₁₂DD	×
DPDGC₁₂KK	○
A^{β}Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^{β}C₁₂	×
A^{β}Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^{β}C₁₂K	○
A^{β}Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^{β}C₁₂D	△

今回合成を行った PG-surfactant の中で、中性のバッファー中に溶解したのは **NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A ^{β} Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂K** のみであった。ペプチド配列の X の部分に β -ターン構造をとるペプチド配列のみを導入した **NPDGC₁₂**、さらにペプチド配列の Y の部分にリジンまたはアスパラギン酸をいくつか導入した **NPDGC₁₂K**、**NPDGC₁₂D**、**NPDGC₁₂DD**、**NPDGC₁₂DK**、**A ^{β} Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂** などは、電荷の中和、もしくは導入する親水性アミノ酸残基の数が足らなかったためか、中性のバッファーに溶解しなかった。**A ^{β} Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂D** については始め溶けているが、30 分ほどで凝集してしまう挙動が確認され、こちらも同様の理由が考えられた。以上の結果から、中性 pH の条件下で十分な溶解度を示した **NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A ^{β} Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂K** を用いて今後の評価を行った。

4-3-1-2 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値の算出

2-2-2-2 と同様に、ANS を蛍光プローブとして用いて cac 値の算出を行った。また各 PG-surfactant の対数濃度 対 蛍光プローブの相対蛍光強度のプロットを、以下の図 4-7 に示した。なお縦軸の相対蛍光強度については、界面活性剤非存在下における蛍光強度を 1 とした。

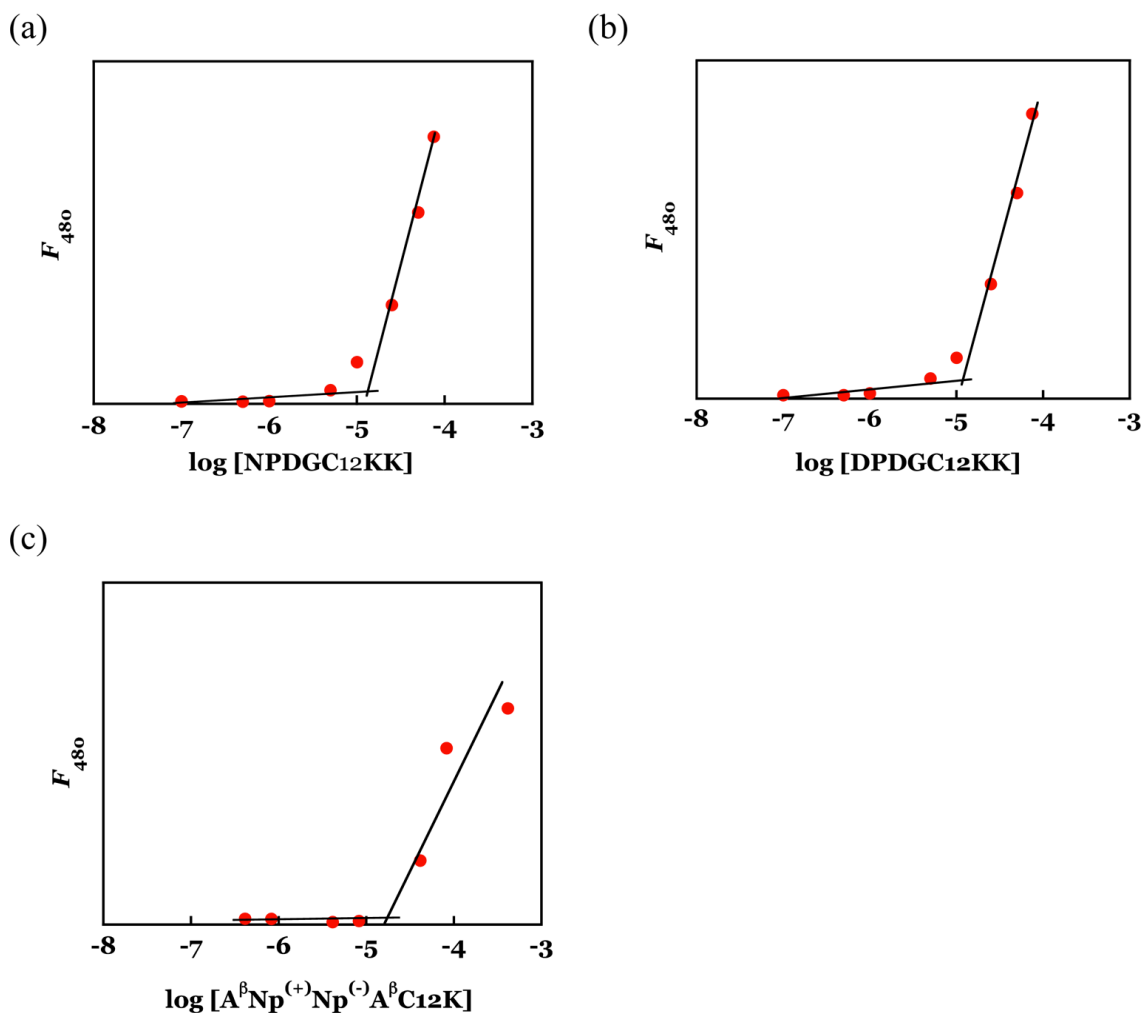


図 4-7 各界面活性剤における対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロット $\text{NPDGC}_{12}\text{KK}$ (a), $\text{DPDGC}_{12}\text{KK}$ (b), $\text{A}^{\beta}\text{Np}^{(+)}\text{Np}^{(-)}\text{A}^{\beta}\text{C}_{12}\text{K}$

図 4-7 から、いずれの PG-surfactant についても濃度が上昇した時に、ある濃度を境に蛍光強度が急激に大きくなることが確認された。図の変曲点前後の 2 近似直線の交点から算出される各 PG-surfactant の cac 値を、表 4-4 にまとめた。

表 4-4 各 PG-surfactant の cac 値

PG-surfactant	cac /mM
NPDGC₁₂KK	0.0337
DPDGC₁₂KK	0.0353
A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K	0.0089

各 PG-surfactant について、濃度の上昇に伴い蛍光強度変化に 1 つの変曲点が見られ、単分子分散している状態からミセルあるいは何らかの会合体への相転移がおこっていることが示唆された。第 3 章にて評価を行った膜蛋白質可溶化試薬として機能する PG-surfactant **DKDKC₁₂K** と比較をすると、cac 値が上昇する傾向があることがわかった。これは β ターン構造に用いているアミノ酸配列「-Asn-Pro-Asp-Gly-」や「-β-Ala-Nip(-)-Nip(+)-β-Ala-」が、**DKDKC₁₂K** に含まれる「-Asp-Lys-Asp-Lys-」に比べて構造的に硬く、分子同士の会合がしにくくなったためと考えられた。

4-3-1-3 DLS 測定による水溶液中での会合体挙動の評価

いずれの PG-surfactant についても、cac 以上の濃度において単分子での分散状態から何らかの会合体への構造転移が示唆された。そこで、溶液中での各 PG-surfactant の会合挙動を、DLS 測定により評価を行った。ここでは、中性条件下で水に可溶で、膜蛋白質抽出試薬としての検討を考えている、**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K** に関して評価を行い、各界面活性剤濃度（1～0.0001%(w/v)）にて評価をおこなった。測定結果を、図 4-8 に示した。

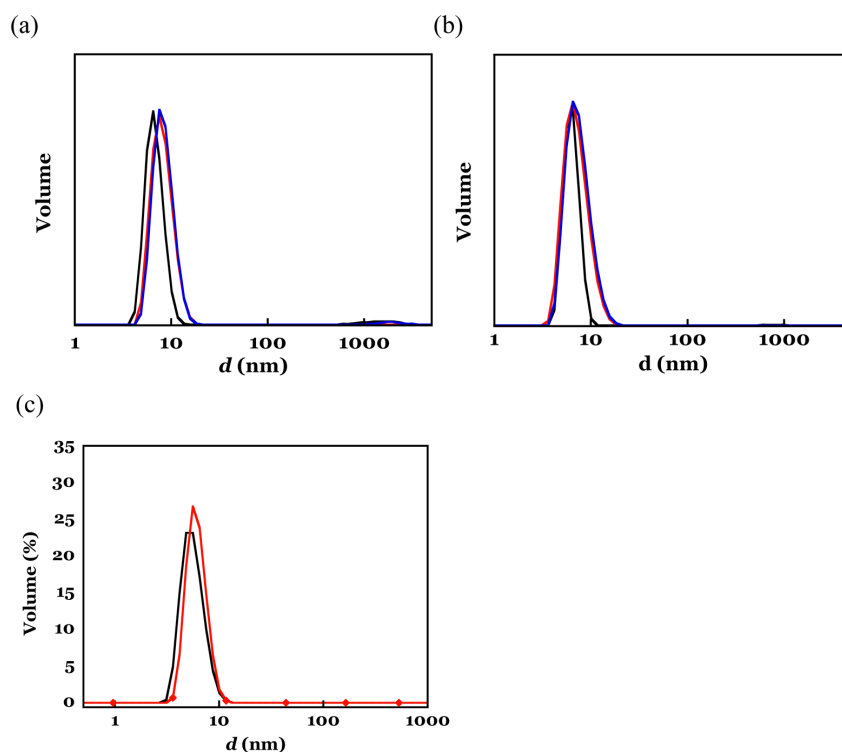


図4-8 各界面活性剤におけるDLSピーク: $\text{NPDGC}_{12}\text{KK}$ (a), $\text{DPDGC}_{12}\text{KK}$ (b), $\text{A}^{\beta}\text{Np}^{(-)}\text{Np}^{(+)}\text{A}^{\beta}\text{C}_{12}\text{K}$ (c) on 0.01 wt % (black line), 0.1 wt % (red line), and 1 wt % (blue line) in 20 mM phosphate buffer (pH 7).

以上の結果から、 $\text{NPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{DPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{A}^{\beta}\text{Np}^{(-)}\text{Np}^{(+)}\text{A}^{\beta}\text{C}_{12}\text{K}$ は、いずれも cac 値以上の濃度では、7 nm 程度の粒径のみしか観測されなかった。これは $\text{NPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{DPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{A}^{\beta}\text{Np}^{(-)}\text{Np}^{(+)}\text{A}^{\beta}\text{C}_{12}\text{K}$ などが 2 分子対合したサイズと一致するため、いずれの PG-surfactant についても、緩衝液中でミセル様の会合体のみを選択的に形成していることが示唆された。

4-3-2 β ターン形成配列を含む PG-surfactant を用いた PSI、PSII の可溶化

続いて中性 pH 緩衝液内でミセル形成能を持つ $\text{NPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{DPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{A}^{\beta}\text{Np}^{(-)}\text{Np}^{(+)}\text{A}^{\beta}\text{C}_{12}\text{K}$ について、膜蛋白質可溶化試薬としての評価を行った。

4-3-2-1 吸収スペクトルによる PSI²²、PSII²³への構造的影響

界面活性剤置換により 0.1 wt% の各 PG-surfactant ($\text{NPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{DPDGC}_{12}\text{KK}$ 、 $\text{A}^{\beta}\text{Np}^{(-)}\text{Np}^{(+)}\text{A}^{\beta}\text{C}_{12}\text{K}$) で可溶化された PSI、PSII サンプルを調製し、PSI、PSII

に変性がみられるかどうか吸収スペクトルにより検討を行った。比較対象として、PSI、PSII を変性させないことが知られている 0.1 wt% β -DDM で可溶化したサンプルを準備し、比較を行った。これらの吸収スペクトル測定結果を、図 4-9、4-10 に示した。

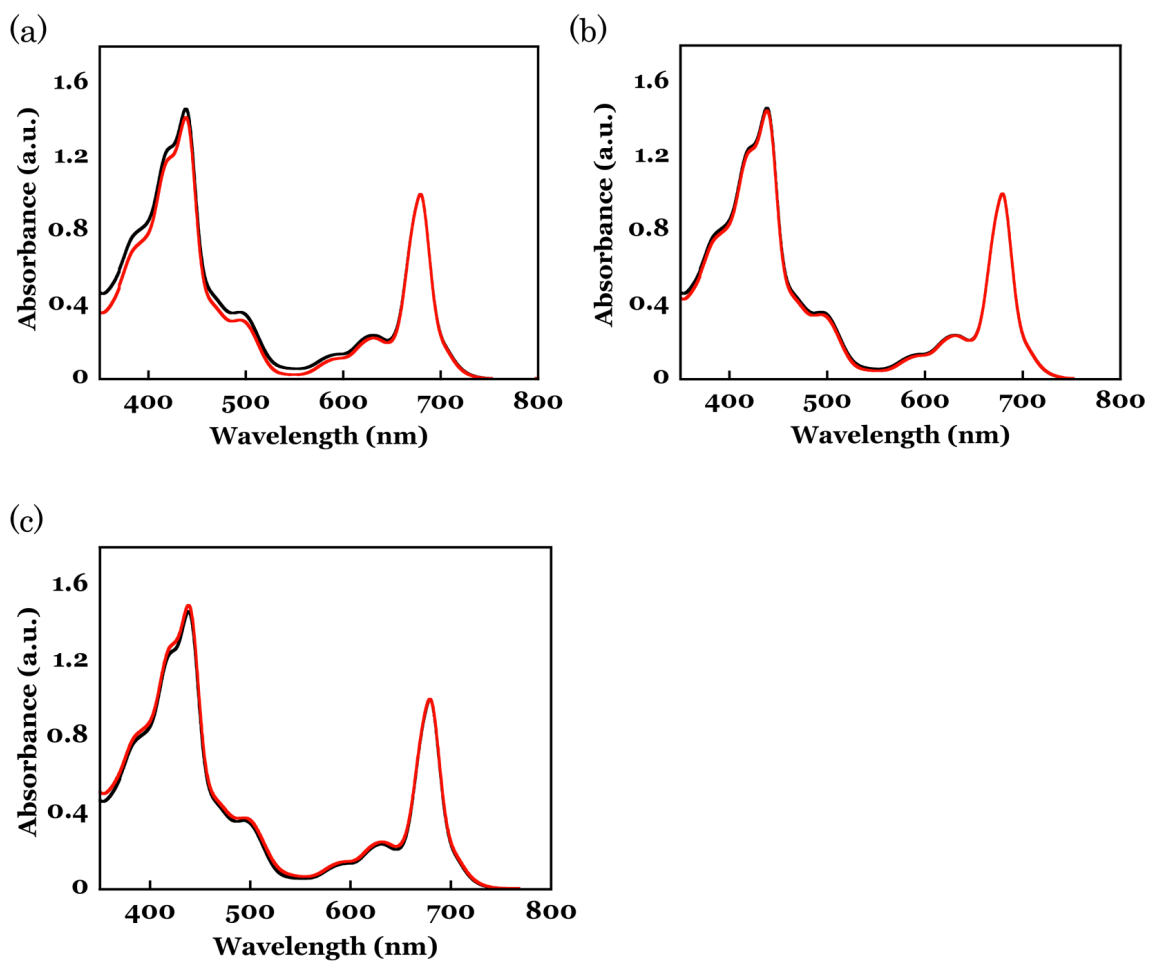


図 4.9 それぞれの PG-surfactant で可溶化した PSI の吸収スペクトル 0.1 wt % β -DDM (black line) (NPDGC₁₂KK (a), DPDGC₁₂KK (b), A ^{β} Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂K (c))(red line)

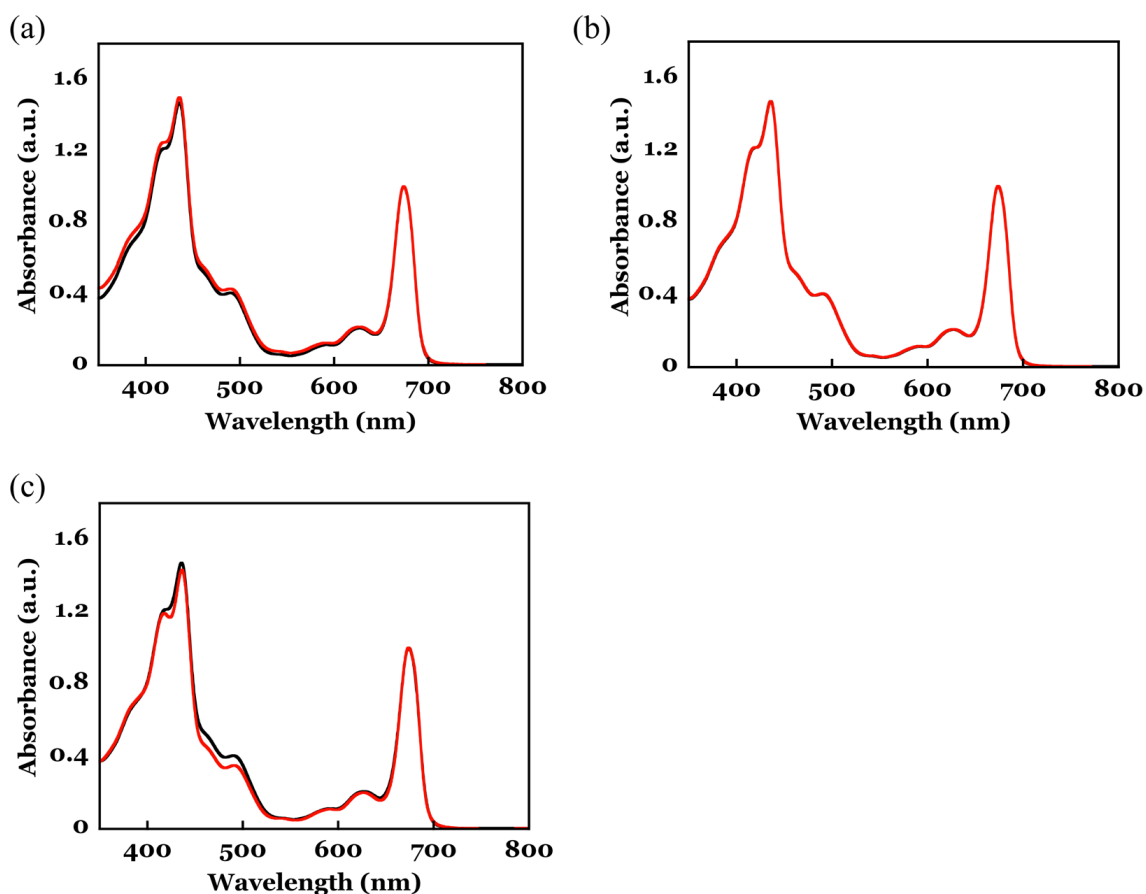


図 4-10 それぞれの PG-surfactant で可溶化した PSII の吸収スペクトル; 0.1 wt % β -DDM (black line) (NPDGC₁₂KK (a), DPDGC₁₂KK (b), A ^{β} Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂K (c))(red line)

これらの結果より、PSI、PSII ともにいずれの PG-surfactant を用いた場合においても、 β -DDM で可溶化したスペクトルと一致が見られたことから、膜蛋白質の膜貫通領域に存在するクロロフィル色素の脱離に基づく変性はみられないということがわかった。

4-3-2-2 77 K における蛍光スペクトルによる PSI への構造的影響

第 3 章 3-3-2-3 項で記述したように、PSI は液体窒素温度 (-196°C、77 K) まです冷却すると、レドクロロフィル a 状態と呼ばれる P700 より長波長側 (708 ~714 nm) の光を吸収できる「アンテナ Chl a 色素の状態」が生成し、この S0 状態から S1 状態への光遷移から S0 状態への緩和にともない、715-735nm に蛍光発光が観測されるようになる。このレドクロロフィル状態は、アンテナ Chl a 色素の集合状態が維持されていないと観測されず、また Chl a 色素の離脱が起

こった場合には、680 nm 付近に、フリーの Chl *a* 色素由来の蛍光発光ピークが観測されるため、PSI の変成状態の評価に有効である。

界面活性剤置換により各 PG-surfactant (NPDGC₁₂KK、DPDGC₁₂KK、A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K) で可溶化された PSI サンプルについて、PSI に変性がみられるかどうか 77K における蛍光スペクトル測定を行った。光励起は 430 nm により行った。比較対象として、PSI を変性させないことが知られている 0.1 wt% β-DDM で可溶化したサンプルについても測定を行った。これらの 77K における蛍光スペクトルを、図 4-11 に示した。

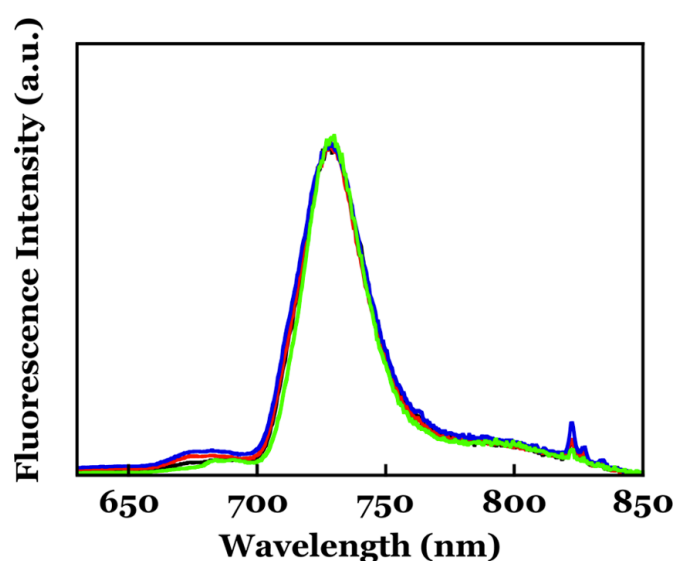


図4-11 それぞれのPG-surfactantで可溶化したPSIの77Kにおける蛍光測定結果 (0.1 wt % β-DDM (black line), NPDGC₁₂KK (red line), DPDGC₁₂KK (blue line), A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K (green line))

いずれの PG-surfactant (NPDGC₁₂KK、DPDGC₁₂KK、A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K) を用いた場合にも、735 nm に蛍光スペクトルのピークトップが確認された。この蛍光最大波長は、PSI のレドクロロフィル a 状態に特徴的な波長であり、PSI に変性が促されていないことを意味している。実際に、PSI を変性させる事がないと報告されている 0.1 wt%β-DDM で可溶化された PSI でも同様な蛍光スペクトルが観測された。

4-3-2-3 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700*の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI の変性度合いの評価

第 3 章 3-3-2-6 項と同様の操作を行い、P700*への逆電子移動速度を観測する事で膜外ドメインの変性の確認をおこなった。界面活性剤置換により 0.1 wt%の PG-surfactant (NPDGC₁₂KK、DPDGC₁₂KK、A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K) を含む緩衝液で可溶化された PSI について A₆₉₈の時間変化を測定し、3 成分の寿命を持つ理論式で非線形カーブフィッティング (解析ソフト Origin) を行った。結果を以下にまとめた。

表 4-5 各 surfactant で可溶化された PSI の P700*寿命の評価と、それを元にした PSI の変性割合の比較

Surfactant	P700*の寿命
β-DDM	1ms (0%), 30 ms (30%), 270 ms (70%)
NPDGC ₁₂ KK	1ms (0%), 30 ms (48%), 392 ms (52%)
DPDGC ₁₂ KK	1ms (0%), 30 ms (18%), 289 ms (82%)
A ^β Np ⁽⁻⁾ Np ⁽⁺⁾ A ^β C ₁₂ K	1ms (0%), 30 ms (62%), 101 ms (38%)

もし仮に、PsaC の離脱に伴う変性が見られる場合は 1 ms の寿命成分が見られるようになり、一方で変性が見られない場合には 30 ms の寿命成分のみが観測される。また溶液中に添加している、電子移動メディエーター (DCIP や PMF) を経由したアスコルビン酸ナトリウムによる直接還元が 100~400 ms の成分として見られるが、今回の測定では、これら成分は無視しても問題とならない。表 4-5 の結果より、いずれの PG-surfactant (NPDGC₁₂KK、DPDGC₁₂KK、A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K) を用いた場合でも PsaC の離脱に対応する 1 ms の成分は見られず、膜外ドメインに関する変性は観測されなかった。同様の結果は、PSI を変性させない場合のコントロールとなる 0.1 wt%の β-DDM を含む緩衝液で可溶化したサンプルについても観測された。

4-3-2-4 PG-surfactant で可溶化された PSI、PSII の酸素電極を用いた光誘起電子移動活性評価

4-3-2-4-1 PG-surfactant で可溶化された PSI の酸素電極を用いた光誘起電子移動活性評価

前述のように酸素電極を用いて酸素濃度の減少速度をモニタリングすることにより、PSI の光誘起電子移動活性の評価を行った。PSI の光誘起電子移動活性の測定結果を以下に示す。界面活性剤濃度は、この測定方法で一般に用いられている 0.001 % (w/v) の濃度で評価を行った (本来 cmc 値以下の条件となるが、グリセロールが溶媒に溶けているためか、評価は可能である)。以下の式を用いて、酸素減少速度の傾き ($\text{mM} \cdot \text{O}_2 / \text{mgChl} \cdot \text{h}$) から PSI 1 ユニット当たりの電子伝達速度 ($\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}$) を求めた。

$$(\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}) = \frac{2}{3.886 \times 10^{-3} \times 3600} \times \frac{1}{3} (\mu\text{M} \mu\text{O}_2 / \text{mgChl} \times \text{h})$$

表 4-6 各膜蛋白質可溶化試薬に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度の比較

Surfactant	電子移動速度 ($\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}$)
β -DDM	41 \pm 2.1
NPDGC₁₂KK	44 \pm 1.4
DPDGC₁₂KK	49 \pm 1.7
A^{β} Np⁽⁺⁾ Np⁽⁺⁾ A^{β} C₁₂ K	41 \pm 0.7

表 4-6 の結果から、いずれの PG-surfactant を用いた場合も、PSI を変性させないコントロールとなる 0.1 wt% β -DDM で可溶化された場合と同程度の 40 $\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}$ 程度の電子移動活性が保たれていたことが確認された。すなわち、PSI の光誘起電子移動活性の面からも、今回検討を行っている PG-surfactant は優れた膜蛋白質可溶化試薬であることが分かった。

4-3-2-4-2 PG-surfactant で可溶化された PSII の酸素電極を用いた光誘起電子移動活性評価

PSI の場合と同じように PSII についても、光誘起電子移動活性を酸素電極にて評価を行った。以下の式を用いて、溶存酸素濃度の増加量の時間に対する傾き($\text{mM}\cdot\text{O}_2/\text{mgChl}\cdot\text{h}$)から PSII 1 ユニット当たりの電子伝達速度 ($\text{PSII}^{-1}\text{s}^{-1}$) を求めた。

$$(\text{PSII}^{-1}\text{s}^{-1}) = \frac{4}{15.99 \times 10^{-3} \times 3600} \times \frac{1}{2} (\mu\text{M}\mu\text{O}_2 / \text{mgChl} \times \text{h})$$

結果を次のページに示す。

表 4-7 各膜蛋白質可溶化試薬に可溶化された PSII の光誘起電子移動速度の比較

Surfactant	電子移動速度 ($\text{PSII}^{-1}\text{s}^{-1}$)
β -DDM	156 ± 0.9
NPDGC₁₂KK	152 ± 7.0
DPDGC₁₂KK	160 ± 0.3
A^{β}Np⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^{β}C₁₂K	140 ± 9.1

上記の表 4-7 の結果から、PSII についてもいずれの PG-surfactant を用いた場合も、PSII を変性させないコントロールとなる 0.1 wt% β -DDM で可溶化された場合と同程度の $150 \text{PSII}^{-1} \text{s}^{-1}$ 程度の電子移動活性が保たれていたことが確認された。すなわち、PSII の光誘起電子移動活性の面からも、今回検討を行っている PG-surfactant は優れた膜蛋白質可溶化試薬であることが分かった。

4-3-3 チラコイド膜からの PSI, PSII の抽出¹¹⁾

4-3-3-1 チラコイド膜

T. vulcanus のチラコイド膜は主に Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG) や Digalactosyl diacylglycerol (DGDG) らの糖脂質(図 4-1 2)からなる脂質二重膜であり、グラナと呼ばれるチラコイド膜の積層構造が、ラメラと呼ばれるチラコイド膜が細長く伸びたものによって結び付けられている(図 4-1 3)。

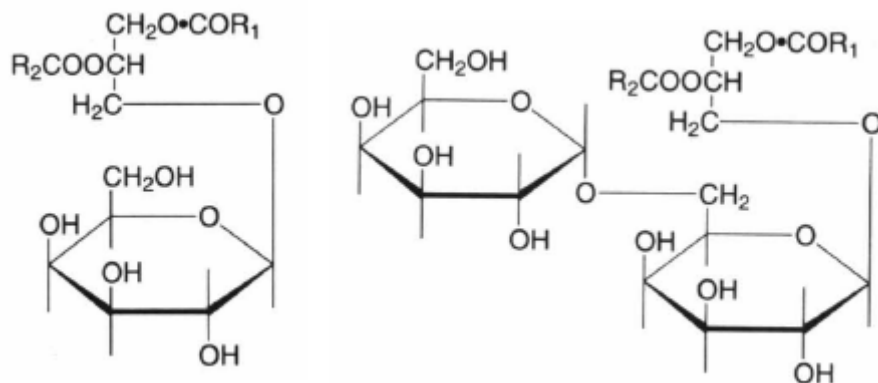


図 4-12 チラコイド膜を構成する主な糖脂質分子(左) Monogalactosyl diacylglycerol (MGDG)の構造 (右) Digalactosyl diacylglycerol (DGDG)の構造

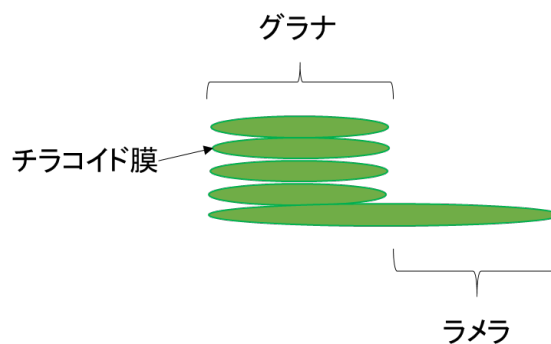


図 4-13 チラコイド膜のグラナ構造とラメラ構造

チラコイド膜を構成する膜蛋白質は主に、PSI、PSII、シトクロム *b₆f*、ATP 合成酵素から構成される。本章では PG-surfactant を用いて抽出された、色素含有膜蛋白質 PSI、PSII について主に評価を行った。

4-3-3-2 吸収スペクトル測定によるチラコイド膜から PG-surfactant によって抽出された成分の評価

1 wt%の PG-surfactant を含む緩衝液により抽出された成分について、紫外可視吸収スペクトル測定を用いて評価を行った。コントロールとして、1 wt%の β -DDM を含む緩衝液用いて抽出した成分の評価も行った。吸収スペクトル測定は、抽出成分をバッファーにて 100 倍に希釈し測定した。結果を以下に示す。

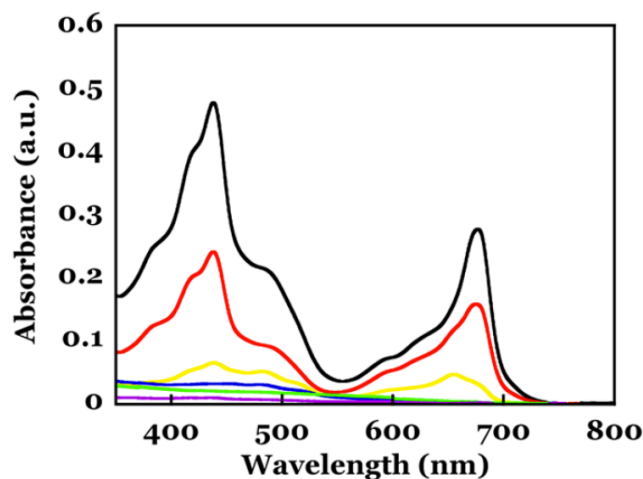


図4-14 PG-surfactantによりチラコイド膜より抽出された成分の紫外可視吸収スペクトルによる評価 (1 wt % β -DDM (black line), **DKDKC₁₂K** (light green line), **DKDKC₁₂D** (purple line), **NPDGC₁₂KK** (red line), **DPDGC₁₂KK** (yellow line), and **A ^{β} Np⁽⁺⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂K** (blue line).)

表 4-8 チラコイド膜からの抽出効率

Surfactant	Chl 濃度 (mgChl/ml)	抽出効率 (%)
β -DDM	0.305	31
NPDGC₁₂KK	0.278	28
DPDGC₁₂KK	0.024	2.4
A^{β}Np⁽⁺⁾Np⁽⁺⁾A^{β}C₁₂K	0	0

紫外可視吸収スペクトル測定より、**NPDGC₁₂KK** を用いることで β -DDM を用いた場合と同様に、チラコイド膜からクロロフィル成分を含む膜蛋白質の抽出が可能であることが確認された。また、各 PG-surfactant で抽出された成分のスペクトル概形が一致していることから、抽出される膜蛋白質成分の割合は、 β -DDM を用いた場合と大きく変わらないことが示唆された。一方で、 β -turn 構造を不安定化させる変異を導入した **DPDGC₁₂KK** を用いた場合に抽出効率の大きな低下がみられたことから、高い抽出能を与えるためには、 β -turn 構造を含むことが必須であることがわかった。しかし β -turn 構造を含んでいても、異なる配列である **A ^{β} Np⁽⁺⁾Np⁽⁺⁾A ^{β} C₁₂K** では、クロロフィル成分を含む膜蛋白質の抽出はされなかった。これらのことは、界面活性剤に膜蛋白質抽出能力を与えるためには、構造安定化と共に親水性-疎水性のバランスが重要であることが示唆された。

4-3-3-3 Native PAGE によるチラコイド膜から PG-surfactant で抽出された成分の評価^{24), 25)}

PG-surfactant によりチラコイド膜からの抽出された成分が何であるか同定するため、Native-PAGE により検討を行った。比較対象として、すでに Native-PAGE 分析を行った際に、各バンドがどの膜蛋白質成分であるか報告されている、 β -DDM を用いて抽出されたサンプルについても、同様に評価を行った。結果を以下に示す。

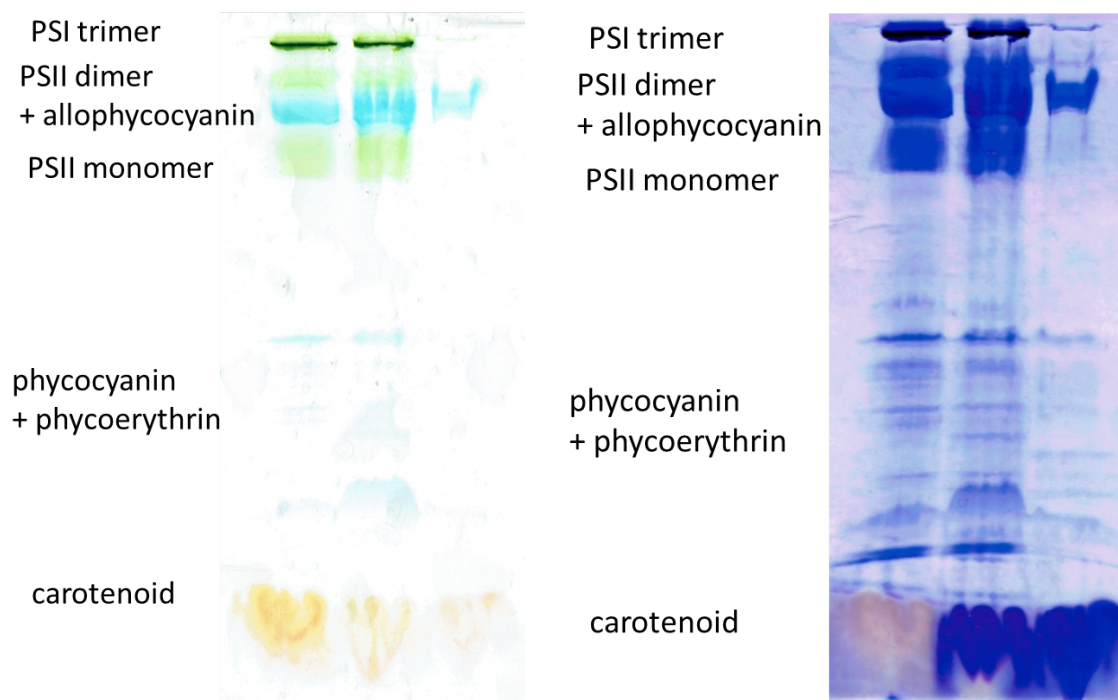


図 4-14 チラコイド膜より抽出された成分の Native PAGE による評価(左 ; CBB 染色前、右 ; CBB 染色後) 各レーン ; β -DDM (左)、NPDGC₁₂KK (中央)、DPDGC₁₂KK (右)

NPDGC₁₂KK により抽出された各色素成分を含む膜蛋白質は、いずれも β -DDM により抽出した場合とパターンが似ており、また各バンドの濃度からも効率の良い抽出がされていることがわかった。一方で、 β -turn 構造を不安定化させることで抽出能力が低下した DPDGC₁₂KK を用いて得られたサンプルでは、膜蛋白質成分の抽出はほとんど見られず、チラコイド膜表面に残存しているフィコビリソーム由来のアロフィコシアニンのバンドのみが優先的に確認された。また、CBB 染色から、Native-PAGE で観測された色素成分を含むバンドが、た

しかに膜蛋白質由来であることが確認され、それ以外の蛋白質成分の抽出は殆ど見られなかった。また **PG-surfactant** を用いて抽出した際に、カロテノイドのバンドに重なって濃いバンドが確認されたが、これは系内に残存している **PG-surfactant** 由来のバンドであると考えられた。

4-4 まとめ

本章では、PG-surfactantをベースとした新規膜蛋白質抽出試薬の開発を行った。第3章における検討から、2種類のPG-surfactant (**DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D**) が、PSI、PSIIに対して、変性を抑えつつ水中に単分子分散できる（すなわち可溶化できる）、新規の膜蛋白質可溶化試薬として機能することは明らかになった。しかし一方でPSI、PSIIが組み込まれている生体膜（チラコイド膜）からの抽出には利用できなかった。我々は、膜蛋白質を水中に凝集させることなく分散可溶化させることを「可溶化 (Solubilization)」、生体膜を崩して膜蛋白質をバッファー溶液中へ取り出すことを「抽出 (Extraction)」と区別して考えているが、膜蛋白質の単離精製の際に用いる試薬には「可溶化」の能力とともに「抽出」の能力も求められる（このような試薬のことを、一般に膜蛋白質抽出試薬と呼ぶ）。そこで本章では、PG-surfactantのリンカーペプチド部位にβ-ターン構造を形成するペプチド配列「-Asn-Pro-Asp-Gly-」あるいは「-β-Ala(-)Nip-(+)Nip-β-Ala-」を選択した。膜蛋白質抽出試薬として用いるためには中性の緩衝液中に溶解する必要がある。今回合成を行ったPG-surfactantの中では**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁺⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K**のみがこの要件を満たしたために、以降の可溶化試薬、抽出試薬としての機能評価を行った。リンカーペプチドXの部分に**NPDGC₁₂**を持ち、周辺ペプチドYの部分にリジンまたはアスパラギン酸をいくつか導入した**NPDGC₁₂K**、**NPDGC₁₂D**、**NPDGC₁₂DD**、**DPDGC₁₂KK**については、中性の緩衝液中には溶解しなかった。リンカーペプチドXの部分に[-β-Ala(-)Nip-(+)Nip-β-Ala-]、Yの部分にアスパラギン酸を導入したものに関しても、中性バッファー中での溶解度は悪かった。

ミセル形成能の評価として、まずは臨界凝集濃度 (cac) の算出を行った。蛍光プローブ法ではPG-surfactantの濃度を上昇した時に、ある濃度を境に蛍光スペクトルの最大強度が急激に大きくなるため、この前後の測定データに対する近似曲線の交点から、cac値の算出が可能である。**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁺⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K**についても、濃度上昇に対して蛍光強度上昇の変曲点がみられ、cac値を算出することができた。続いて動的光散乱(DLS)測定により、溶液中での会合挙動に関して評価を行った。その結果、cac値以上の濃度では**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁺⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K**はミセル様の会合体を形成することがわかった。

次に、**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K** が膜蛋白質可溶化試薬としての機能を保持するか検討を行った。機能評価を行う膜蛋白質としては、PSI、PSII を用いた。各 PG-surfactant で可溶化した PSI、PSII サンプル調製は、PEG1450 を沈殿剤に用いる界面活性剤置換法を用いた。単離精製された PSI、PSII 質を利用し、native 状態の PSI、PSII の諸物性と比較をする事で、新規膜蛋白質可溶化試薬の性能評価が可能となった。はじめに室温での紫外可視吸収スペクトル測定と 77 K における蛍光測定による評価を行った。これらの測定は、膜貫通領域に存在するクロロフィル色素の集合構造の変成度合いの評価を可能とするが、**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K** いずれの PG-surfactant を用いた場合にも、β-DDM を可溶化試薬として用いた場合と全く同じスペクトルを与えた事から、PSI の膜貫通領域に存在するクロロフィル色素の集合構造に対する変性は観測されなかった。次に、光照射により生成する P700⁺ の電荷分離状態の寿命を過渡吸収測定により見積もる事で、PSI の膜外ドメインに存在するサブユニット蛋白質 PsaC、PsaD、PsaE の離脱に伴う変性が、**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K** で可溶化することにより起こっているか検討を行った。その結果、室温で扱う範囲では、全く変性が起こっていない事が確認された。更に、PSI、PSII の持つ光誘起電子移動活性に於ける変性度合いを、酸素電極を用いて検討を行った。**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K** で可溶化された PSI、PSII の酸素吸収速度、酸素発生速度による間接的な評価から、いずれの膜蛋白質についても、光誘起電子移動活性に於ける変性は見られなかった。以上のことから、**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K** は PSI、PSII に対して利用可能な、新規膜蛋白質可溶化試薬として有望である事が分かった。

上記の検討から可溶化試薬として機能することがわかった PG-surfactant (**NPDGC₁₂KK**、**DPDGC₁₂KK**、**A^βNp⁽⁻⁾Np⁽⁺⁾A^βC₁₂K**) について、チラコイド膜からの膜蛋白質の抽出能力の評価を行った。紫外可視吸収スペクトルから、**NPDGC₁₂KK** を用いた場合でのみ、β-DDM を用いた場合と同様にクロロフィル色素成分を含む膜蛋白質の抽出が確認された。一方でリンカーペプチド部位の二次構造を不安定化するように Asn 残基を Asp に変異を加えた **DPDGC₁₂KK** を用いた場合には、抽出効率の大きな低下が見られ、PG-surfactant の二次構造の違いが抽出効率に影響を与えていることがわかった。β-turn 構造をとること知られているが異なるアミノ酸配列を持つ[-βAla-Nip(-)-Nip(+)-βAla-]をリンカーペプ

チド部位に用いた場合にも抽出効率の大幅な低下がみられたことから、界面活性剤に膜蛋白質抽出能力を与えるためには、単純に構造の硬さを与えるだけではなく、それと共に親水性-疎水性のバランスなどのチューニングも重要であることが示唆された。続いて、Native PAGE により、**NPDGC₁₂KK** により抽出された膜蛋白質成分の詳細な分析を行った。その結果、1 wt% β -DDM を用いて抽出を行った場合と各膜タンパク質のバンドパターンが一致していたことから、抽出性能に関して、特定の膜蛋白質を多く抽出できるなどの特異性は見られないものの、 β -DDM と同様な膜蛋白質の抽出能力を持つことがわかった。

以上の結果から、**NPDGC₁₂KK** はチラコイド膜から PSI、PSII を、変性を抑えつつ抽出できる新たな膜蛋白質抽出試薬として有効であることがわかった。本論文ではチラコイド膜からの膜蛋白質抽出のみ検討を行っているが、他の生体膜からの膜蛋白質抽出にも利用可能と期待される。

参考文献

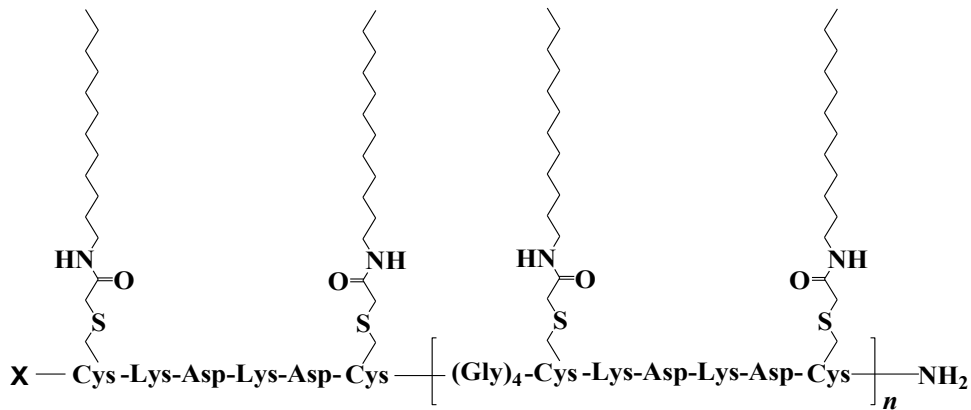
- 1) K. Haga, A. C. Kruse, H. Asada, T. Y. Kobayashi, M. Shiroishi, C. Zhang, W. Weis, T. Okada, B. K. Kobilka, T. Haga, T. Kobayashi, *Nature*, **482**, 547-551 (2012).
- 2) B. Trzaskowski, D. Latek, S. Yuan, U. Ghoshdastider, A. Debinski, S. Filipek, *Curr. Med. Chem.*, **19**, 1090–1109 (2012).
- 3) B. T. Arachea, Z. Sun, N. Potente, R. Malik, D. Isailovic, R. E. Viola, *Protein Expression Purif.*, **86**, 12–20 (2012)
- 4) S. G. Sprague, *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, **19**, 691-703 (1987).
- 5) M. S. Searle, *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, **2**, 1011–1020 (2001).
- 6) E. D. de Alba, A. Jimenez, M. Rico, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 175–183 (1997).
- 7) R. Zerella, P. A. Evans, J. M. C. Ionides, L. C. Packman, B. W. Trotter, J. P. Mackay, D. H. Williams, *Protein Sci.*, **8**, 1320–1331 (1999).
- 8) B. R. Huck, J.D. Fisk, S. H. Gellman, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 2607-2610 (2000).
- 9) Y. J. Chung, B. R. Huck, L. A. Christianson, H. E. Stanger, S. Krauthauser, D. R. Powell, S. H. Gellman, *J. Am. Chem.Soc.*, **122**, 3995–4004 (2000).
- 10) E. D. Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato, V. Bocchini, *Anal. Biochem.*, **115**, 278–286 (1981).
- 11) J.-R. Shen, N. Kamiya, *Biochemistry*, **39**, 14739–14744 (2000).
- 12) P. Fromme, H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1365**, 175–184 (1998).
- 13) K. Takasaka, M. Iwai, Y. Umena, K. Kawakami, Y. Ohmori, M. Ikeuchi, Y. Takahashi, N. Kamiya, J.-R. Shen, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1797**, 278–284(2010)
- 14) K. Kawakami, Y. Umena, M. Iwai, Y. Kawabata, M. Ikeuchi, N. Kamiya, J.-R. Shen, *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, **1807**, 319–325 (2011).
- 15) 秋本 誠志 低温科学 vol.67 (光合成研究法), 449-452.
- 16) S. Hoshina, R Sakurai, N. Kunishima, K. Wada, S. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1015**, 61–68 (1990).
- 17) 沈 健仁 低温科学 vol.67 (光合成研究法), 551-560.
- 18) R. J. Porra, W. A. Thompson, P. E. Kriedemann, *Biochim. Biophys. Acta.*, **975**, 384-394 (1989).
- 19) M. Latasa, K. V. Lenning, J. L. Garrido, R. Scharek, M. Estrada, F. Rodriguez, M.

- Zapata, *Chromatographia*, **53**, 385-391 (2001).
- 20) I. Wittig, M. Karas, H. Schägger, *Mol. Cell. Proteomics*, **6**, 1215–1225 (2007).
- 21) K. Kawakami, Y. Umena, M. Iwai, Y. Kawabata, M. Ikeuchi, N. Kamiya, J. R. Shen, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1807**, 319–325 (2011).
- 22) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, N. (2001) *Nature*, **411**, 909–917 (2001).
- 23) Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, *Nature*, **473**, 55–60 (2011).
- 24) M. Watanabe, M. Iwai, R. Narikawa, M. Ikeuchi, (2009) *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1674–1680 (2009).
- 25) M. Watanabe, H. Kubota, H. Wada, R. Narikawa, M. Ikeuchi, (2011) *Plant Cell Physiol.* **52**, 162–168 (2011).

第5章 分子量の大きな膜蛋白質可溶化試薬の開発

5-1 緒言

第3章における検討から、我々の開発した PG-surfactant 骨格ベースの新規膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** は、可溶化試薬としての新規性だけではなく、膜蛋白質表面への種々の官能基の集積化を可能とすることも明らかとなった。しかし、より大きな官能基（例えば高分子鎖や蛋白質¹⁾、そのリガンドペプチド²⁾などを PG-surfactant に修飾し、これにより導入した官能基を膜蛋白質表面に集積させるには、分子量が 1 kDa 程度の **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** では膜蛋白質との結合力が弱いことで、表面修飾ができないことが危惧された。そこでこれまでの知見を生かしつつ、より大きな官能基の導入を可能とする膜蛋白質表面修飾試薬の開発を目指す方向性として、「より分子量の大きな膜蛋白質可溶化試薬の開発」を検討した。



PG-surfactant	X	n
Bis-K₃-DKDKC₁₂	Ac-Lys-Lys-Lys	1
Bis-D₃-DKDKC₁₂	Ac-Asp-Asp-Asp	1
Tris-K₃-DKDKC₁₂	Ac-Lys-Lys-Lys	2
Tris-D₃-DKDKC₁₂	Ac-Asp-Asp-Asp	2

図 5-1 設計した高分子量化 PG-surfactant の分子構造

高い分子量をもつ新規膜蛋白質可溶化試薬の設計指針として、図5-1のような分子設計を考えた。我々が既に開発に成功している **DKDKC₁₂K** や **DKDKC₁₂D** の分子構造内にあるジェミニ骨格のコア部分に当たる[-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-]の部分を柔軟なりンカーである(Gly)₄ でタンデムに2つあるいは3つ連結し、一方で N-末端側に親水性を確保するための親水性クラスター(Asp)₃、あるいは(Lys)₃を連結した(なお Gly は、アミノ酸の一般的なヘリックス傾向から特定の立体構造を取りにくくなると考えられたため、ジェミニ骨格のコア部分の連結に用いた)。膜蛋白質を **DKDKC₁₂K** や **DKDKC₁₂D** で可溶化している際には、複数の[-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-]の部分が直接膜蛋白質表面に結合集積しているため、これらの相互作用を邪魔しないように柔軟なりンカーで結べば、膜蛋白質を変性させることなく疎水表面に結合できる **DKDKC₁₂K** や **DKDKC₁₂D** の性質を活かしつつ、界面活性剤の総分子量の増加が期待できる。そこで、これらの高分子量化 PG-surfactant (**Bis-K₃-DKDKC₁₂**、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-K₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂**) を Fmoc 固相合成法により合成した。

はじめに高分子量化 PG-Surfactant のミセル形成能や会合挙動を明らかにするため、蛍光プローブ法による臨界会合濃度(cac 値)の算出、動的光散乱(DLS)を用いた会合サイズの評価を行った。次に膜蛋白質 PSI、PSII を使い、これら高分子量化 PG-Surfactant が膜蛋白質可溶化試薬としての機能を維持しているか検討を行った。最後に、これら高分子量化 PG-Surfactant と膜蛋白質との親和性の向上を評価するために、通常膜蛋白質可溶化試薬が使用される、0.1 – 0.01 wt% の濃度範囲より、10 倍から100 倍薄い濃度条件下での可溶化能の評価を行った。仮に、多量化による親和性の上昇により、高分子量化 PG-Surfactant が持つ cac 値よりも低い濃度で可溶化が可能となれば、この親和性向上の証明になると考えた。

5-2 実験項

5-2-1 多量化 PG-surfactant の合成

2-2-1 項と同様に多量化 PG-surfactant についても、長鎖アルキルアミド基をあらかじめ Fmoc-Cys-OH 側鎖に導入した Fmoc-Cys(C₁₂)-OH 誘導体を合成し、PG-surfactant をすべて固相合成用の樹脂担体上で合成する方法をとった。また、精製は RP-HPLC で行い、化合物の同定は ESI-MS による高分解能質量分析法 (HRMS) により行った。

Bis-K₃-DKDKC₁₂

(Ac-(Lys)₃-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂)

HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd for C₁₃₆H₂₅₀N₃₁O₃₂S₄, 2957.7771; found, 2957.7988.

Bis-D₃-DKDKC₁₂

(Ac-(Asp)₃-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂)

HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd for C₁₃₀H₂₂₉N₂₈O₃₈S₄, 2918.5730; found, 2918.5793.

Tris-K₃-DKDKC₁₂

(Ac-(Asp)₃-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂)

HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd for C₁₉₈H₃₆₀N₄₅O₄₈S₆, 4328.5576; found, 4328.5437.

Tris-D₃-DKDKC₁₂

(Ac-(Asp)₃-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-(Gly)₄-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂)

HRMS (ESITOF, [M+H]⁺): calcd for C₁₉₂H₃₃₉N₄₂O₅₄S₆, 4289.3396; found, 4289.3745.

5-2-2 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定³⁾

第3章 3-2-2 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-3 DLS 測定による水溶液中での会合体挙動の評価

第3章 3-2-3 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-4 シアノバクテリア由来の光合成膜蛋白質、光化学系 I (PSI)、光化学系 II (PSII)

今回の章で用いている PSI, PSII は第3章 3-2-4 項にて説明を行ったものと同じもので、PSI^{4),6)}、PSII^{4),7)}ともに好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* のものを用いた。

5-2-4-1 本実験で使用した buffer 一覧

第3章 3-2-4-3 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-5 界面活性剤置換法による膜蛋白質の各 PG-surfactant による可溶化

第3章 3-2-5 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-6 PG-surfactant で可溶化された PSI、PSII の、吸収スペクトル測定による変性度合いの評価

第3章 3-2-6 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-7 PG-surfactant で可溶化された PSI の 77K における蛍光測定による、PSI への構造的影響の評価⁸⁾

第3章 3-2-7 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-8 過渡吸収測定による PSI の P700⁺ の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI の構造的影響の評価⁹⁾

第3章 3-2-8 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-9 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価¹⁰⁾

第3章 3-2-9 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-10 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSII の光誘起電子移動活性の評価¹⁰⁾

第3章 3-2-10 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

5-2-11 界面活性剤に溶解された PSI、PSII の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察とエネルギー分散型 X 線 (EDX) 分析

TEM 測定、EDX 測定は、フォルムバール支持膜を貼った銅グリッド (PVF-C10、STEM Cu100P グリッド仕様、応研商事株式会社) に、PSI、PSII の界面活性剤を含むバッファー溶液をキャストしたものをを用いた。具体的には、膜蛋白質濃度を 5 $\mu\text{gChl/ml}$ (19 nM) とし、0.1-0.0001 wt% の各 PG-surfactant を含むバッファー溶液で可溶化した可溶化溶液を Cu グリッド上に 30 μL 滴下し、室温で 5 分静置した。その後液滴をろ紙で吸い取り、リンタングステン酸にて染色を行った。過剰のリンタングステン酸を取り除くため 3 回純水で洗浄を行い、その後乾燥させることで測定サンプルを作成した。測定は JEM-z2500 (日本電子社製) を用い、加速電圧 100 kV にて観察を行った。

EDX 測定も同じサンプルを用いて観察をおこなった。電子線をサンプルに照射した際に発生する特性 X 線を検出することで、観測範囲内にある成分の元素分析をおこなった。今回 Cu グリッドに由来するピークが確認されたが、これは膜蛋白質には存在しない元素であるため、無視して考えた。

5-3 結果と考察

5-3-1 多量化 PG-surfactant の設計と機能評価

5-3-1-1 蛍光プローブ法による cac 値測定³⁾

ANS を蛍光プローブとして用い、cac 値の算出を行った。環境応答性の蛍光色素である ANS は、分子周辺が疎水性環境となることで蛍光強度が大きく増加する特徴を持つ。界面活性剤と共存させた系では、蛍光プローブが界面活性剤ミセル中に取り込まれ疎水性環境におかれることで、これに応答し蛍光強度は短波長シフトと共に増大する。このことから、界面活性剤溶液の濃度に対して蛍光プローブの蛍光強度が大きく変化する変曲点から、CMC 値の概算が可能となる。各 PG-surfactant の対数濃度 対 蛍光プローブの相対蛍光強度のプロットを、図 5-2 に示した。なお後者の縦軸の相対蛍光強度は、界面活性剤が非存在下での蛍光強度を 1 とした。

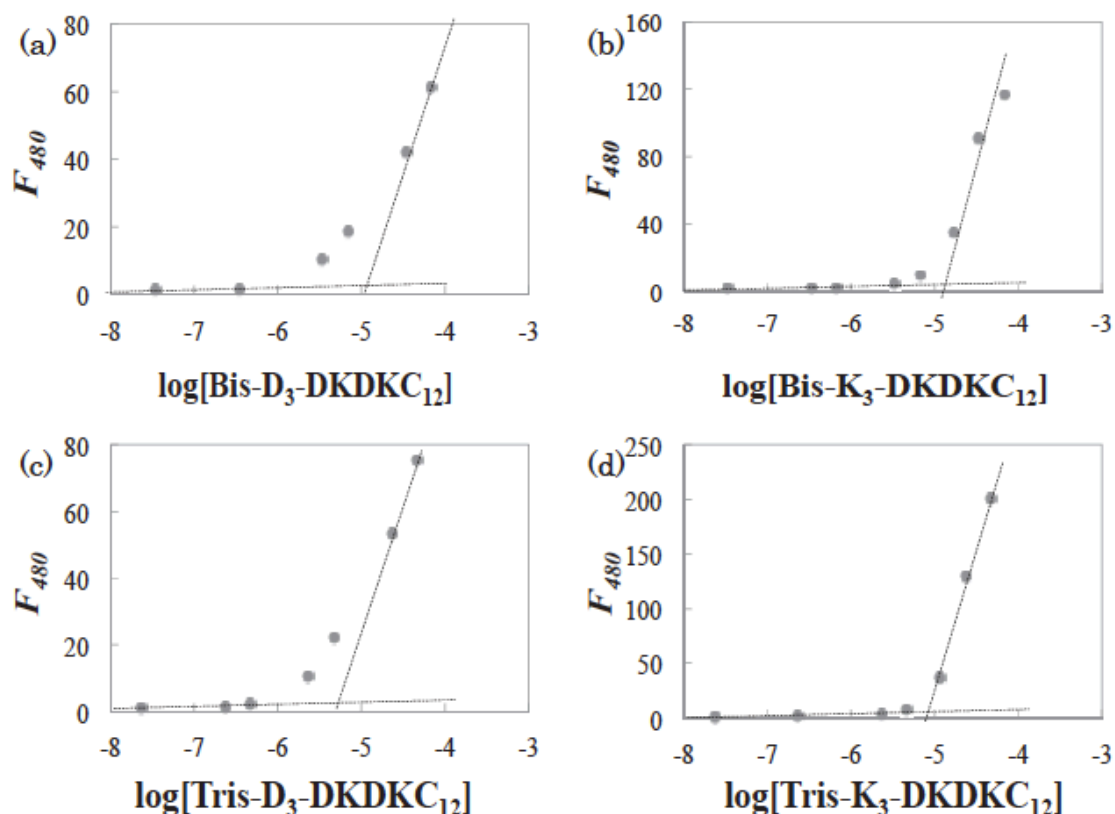


図 5-2 各界面活性剤の対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロット

(a) Bis-K₃-DKDKC₁₂、(b) Bis-D₃-DKDKC₁₂、(c) Tris-K₃-DKDKC₁₂、(d) Tris-D₃-DKDKC₁₂

図5-2から、いずれのPG-surfactantについても、濃度上昇時にそれぞれある濃度を境に蛍光強度が急激に大きくなっていくことがわかった。これは、この濃度を境に、ミセルあるいは何らかの会合体の形成を示唆するものであった。変曲点前後の2つの近似直線の交点から、各PG-surfactantのcac値を算出した(表5-1)。

表5-1 各PG-surfactantのcac値

Surfactant	CAC/mM
Bis-K₃-DKDKC₁₂	0.0088
Bis-D₃-DKDKC₁₂	0.0079
Tris-K₃-DKDKC₁₂	0.0084
Tris-D₃-DKDCC₁₂	0.0021
cf. DKDKC₁₂K	0.0083
cf. DKDKC₁₂D	0.0079

二量体型PG-surfactantとなる**Bis-K₃-DKDKC₁₂**および**Bis-D₃-DKDKC₁₂**では、単量体型のPG-surfactantとなる**DKDKC₁₂K**および**DKDKC₁₂D**に近い値となる、7.9 および 8.8 μM にそれぞれのcac値は算出された。これらの結果は、**Bis-K₃-DKDKC₁₂** および **Bis-D₃-DKDKC₁₂** に含まれる [-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-]部位の疎水パッキングが、(Gly)₄ リンカーが十分に柔軟であるが故に阻害されていないことを示唆した。対照的に、三量体型のPG-surfactantとなる**Tris-D₃-DKDKC₁₂**では、単量体型、二量体型PG-surfactantと比較し、若干低いcac値(2.1 μM)が見積もられた。このcac値の減少は、[-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-]ユニットが1つの分子へまとめられたことによる、多量体化の効果が顕在化したものと思われた。

5-3-1-2 DLS による会合水溶液中での会合挙動の評価

いずれの PG-surfactant についても cac 以上の濃度において何らかの会合体の形成が示唆された。ここでは膜蛋白質可溶化試薬としての利用を考えているためミセル様の会合体のみを形成することが望ましい。多量化 PG-surfactant が、どのような会合形態を中性緩衝液中で形成しているか、DLS 測定によって検討を行った。界面活性剤濃度が 1、0.1、0.01 wt% の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) を作成し、それぞれの濃度における会合体の粒径評価を行った。この測定結果を以下の図 5-3 に示した。

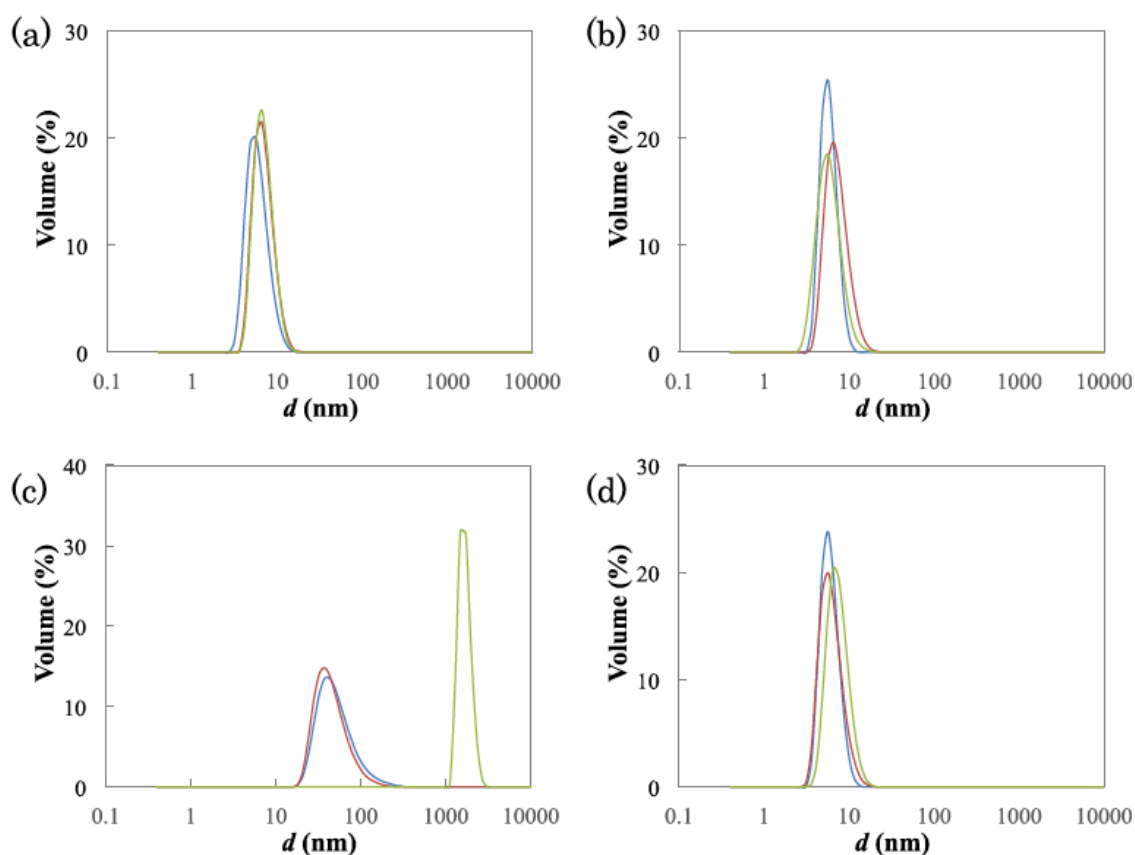


図 5-3 DLS による会合体粒径分布評価 1 wt % (青)、0.1 wt % (赤)、0.01 wt % (緑) in 50 mM phosphate buffer (pH 7) [(a) Bis-K₃-DKDKC₁₂, (b) Bis-D₃-DKDKC₁₂, (c) Tris-K₃-DKDKC₁₂, (d) Tris-D₃-DKDKC₁₂]

Tris-K₃-DKDKC₁₂を除くいずれの多量化 PG-surfactant も、1~0.01 %(w/v)の濃度範囲では、5 ~ 8 nm 程度の単一の会合体形成を示唆する DLS ピークのみが観測された。このサイズは、多量体化 PG-surfactant に対して、単量体型

PG-surfactant といえる **DKDKC₁₂K**、**DKDKC₁₂D** がミセルを形成した場合の会合サイズ（約 6 nm）とよい一致が見られたことから、広い濃度範囲に於いて、多量化 PG-surfactant も同様に、ミセル様の会合体のみを形成することが分かった。一方で、**Tris-K₃-DKDKC₁₂** では、約 50 nm 程度の水和直径を持つ会合体の（比較的選択的な）形成が見られた。会合形態を決定する要因として、ペプチド配列に基づく特異的相互作用の他に、分子内の親水性と疎水性のバランスが考えられる。**Tris-K₃-DKDKC₁₂** では [-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys -Cys(C₁₂)-] 部位 3 つに対して、N-末端側に (Lys)₃ が存在する。しかし、同様に [-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-] 部位 3 つに対して (Lys)₃ の代わりに (Asp)₃ を持つ **Tris-D₃-DKDKC₁₂** ではミセル形成のみしか見られなかったことから、現状単純な解釈を与えることは難しい。しかし、これらが集合した形態をとったときの各アミノ酸側鎖の電離状態が、微妙に異なること、あるいは特異的な水素結合の形成などが、このような集合形態の変化を生んでいると考えられる。

以下の実験では、広い濃度範囲においてミセル様の会合体のみを形成した **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Bis-K₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** についてのみ、膜蛋白質に対する可溶化試薬としての機能評価を行った。

5-3-2 多量化 PG-surfactant を用いた PSI、PSII の可溶化

5-3-2-1 界面活性剤置換法による PSI、PSII の可溶化

Bis-D₃-DKDKC₁₂、**Bis-K₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** などの多量化 PG-surfactant が、ミセル様の会合体のみを選択的に形成することが確認されたため、次にこれらの試薬の膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価を行った。ここでは、代表的な膜蛋白質として PSI、PSII を用いた。これらの膜蛋白質は 2-1-3-2 項に記載してある通り、その構造中に非常に多くの色素を含み、これらの色素に特徴的な分光学的性質の変化から、膜蛋白質の具体的にどの位置にダメージがあるのかの評価も可能となる。これらの膜蛋白質を 3-2-5 項に記載した界面活性剤置換法により、 β -DDM から各多量化 PG-surfactant に置き換え、膜蛋白質機能への影響評価を行った。

その結果、負電荷を持つ **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** では PSI の可溶化が確認されたのに対して、正電荷を持つ **Bis-K₃-DKDKC₁₂** では PSI の可溶化が

できなかった。これは、PSI 表面がトータルで負に帯電していることにより¹²⁾、界面活性剤で可溶化された際に全体の電荷が中和され、凝集沈殿化してしまったからと考えられた。一方で PSII に関しては、負電荷を持つ **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂**、正電荷を持つ **Bis-K₃-DKDKC₁₂** ともに、可溶化が可能であった。

5-3-2-2 吸収スペクトルを用いた、各多量化 PG-surfactant の PSI、PSII への構造的影響の評価

PSI、PSII はクロロフィル a やカロテノイドなどの多くの色素成分を含むことから、吸収スペクトルが native 状態のスペクトルと一致していることは、蛋白質が適切な立体構造を維持していることの大きな証明の一つとなる。そこで、300-800nm の範囲の吸収スペクトル測定を行い、0.1 wt% β -DDM を含む緩衝溶液中における PSI、PSII の吸収スペクトルと比較を行った (図 5-4)。これは、PSI、PSII ともに、0.1 wt% β -DDM を含む緩衝溶液中では、native 状態を維持できていることが知られているためである。

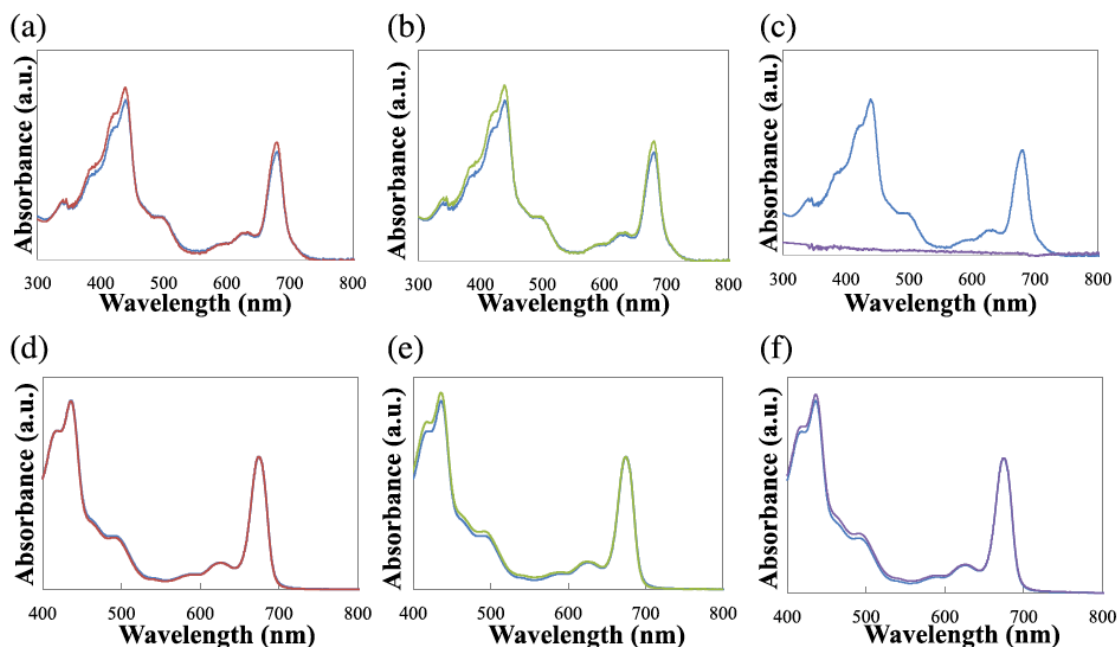


図 5-4 (a) **Bis-D₃-DKDKC₁₂** (赤)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSI の吸収スペクトル
 (b) **Tris-D₃-DKDKC₁₂** (緑)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSI の吸収スペクトル
 (c) **Bis-K₃-DKDKC₁₂** (紫)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSI の吸収スペクトル
 (d) **Bis-D₃-DKDKC₁₂** (赤)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSII の吸収スペクトル
 (e) **Tris-D₃-DKDKC₁₂** (緑)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSII の吸収スペクトル
 (f) **Bis-K₃-DKDKC₁₂** (紫)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSII の吸収スペクトル

PSI、PSII などの膜蛋白質からからクロロフィル色素 (Chl a) の脱離がみられる場合、680nm のアンテナクロロフィル a 由来の吸収バンドがブルーシフトすることが知られている。しかし、**Bis-D₃-DKDKC₁₂** と **Tris-D₃-DKDKC₁₂** とともに、0.1wt% β -DDM を含む緩衝溶液中のスペクトルと完全な一致が見られ、クロロフィル色素 (Chl a) を脱離させることなく可溶化できることがわかった。

PSII については、負電荷を持つ **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂**、正電荷を持つ **Bis-K₃-DKDKC₁₂** とともに 0.1 % β -DDM を含むバッファー溶液中のスペクトルとの一致が見られ、同様にクロロフィル色素 (Chl a) を脱離させることなく可溶化出来ることがわかった。

5-3-2-3 77K における蛍光スペクトルによる PSI への構造的影響

Bis-D₃-DKDKC₁₂、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** で可溶化された PSI についてさらに詳細な検討を行うために、77K における蛍光スペクトル測定を行った。3-1-3-2-4 項に記載されている様にここで得られる蛍光スペクトルは、PSI 骨格内で形成されるレッドクロロフィルに由来するものであり、アンテナ色素として働くクロロフィル a (Chl a) に離脱が見られた場合、native 状態が維持された場合に観測される 720 nm のスペクトルピークの代わりに、フリーのクロロフィル由来の 680nm にスペクトルピークを持つ蛍光スペクトルが観測される¹³⁾。以下に測定結果を示す。

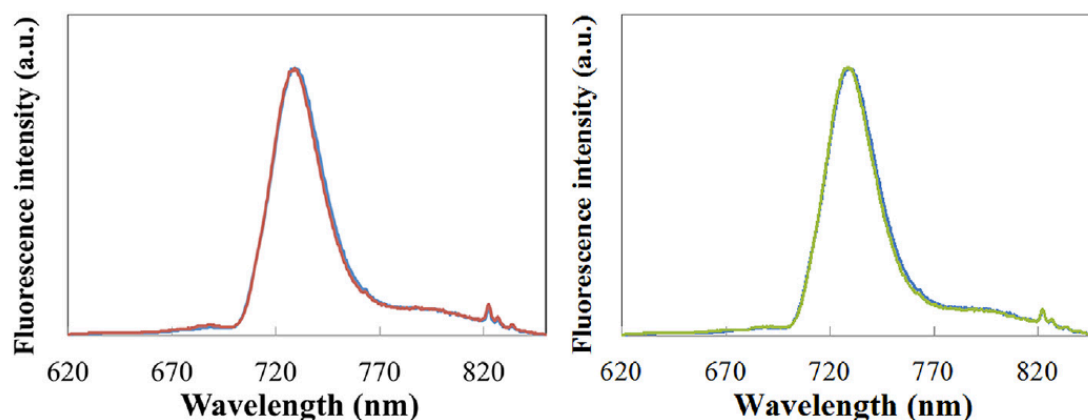


図 5-5 (左) **Bis-D₃-DKDKC₁₂** (赤)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSI の 77K における蛍光スペクトル (右) **Tris-D₃-DKDKC₁₂** (赤)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSI の 77K における蛍光スペクトル

0.1wt% **Bis-D₃-DKDKC₁₂**, **Tris-D₃-DKDKC₁₂** を含む緩衝溶液に可溶化されたいずれの PSI サンプルについても、0.1 wt% β -DDM を含む緩衝溶液中のスペクトルと同様に 720nm にのみ蛍光スペクトルピークが観測され、PSI に変性は見られなかった。

5-3-2-4 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700* の寿命評価を利用した PG-surfactant で可溶化された PSI の構造的影響の評価

さらに膜蛋白質の膜外ドメイン構造への影響を詳細に評価するために、PSI についてスペシャルペア P700 の光励起後の、P700 由来の過渡吸収スペクトル測定を行った^{11), 14), 15)}。3-1-3-2-6 項に記載した通り、PSI のスペシャルペア P700 が光励起された場合、光励起により生成された励起電子は、PSI 内のクロロフィルやフィロキノンを経由し、最終的に膜外ドメインにある PsaC の[4Fe-4S]クラスター (F_a , F_b) まで運ばれる。一方で電子の移動とともに P700 にはホールが生成し (P700*)、この状態が電荷分離状態と呼ばれる。このとき、電子受容体となるフェレドキシンや酸化活性な分子が系内に存在しない場合、不安定な電荷分離状態解消のために、逆電子移動による電荷再結合が起こる。もし、膜外ドメインの変性により PsaC の離脱、あるいは[4Fe-4S]クラスター (F_a , F_b) 機能の失活が見られた場合には、膜内ドメインに存在する[4Fe-4S]クラスター (Fx) までしか電荷分離が起こらないため、この再結合の速度は、1 ms 程度となる一方で、膜蛋白質に変性が見られず[4Fe-4S]クラスター (F_a , F_b) まで無事に電子が運ばれた場合には、この寿命は 30 ms と長くなる。従って、P700* の寿命を過渡吸収スペクトル測定から評価することで、膜外ドメインに関する変性の度合いを評価可能である。 A_{698} の経時変化から非線形カーブフィッティングによる求められる P700* の 1ms (変性状態)、30 ms (native 状態) さらにそれより長い寿命の成分の割合に関して、表にまとめた。

表 5-2 各界面活性剤で可溶化された PSI の P700⁺の寿命

	P700 ⁺ の寿命 (ms) (各寿命成分の割合)	変性割合(%)
β -DDM	1 (0)、30 (0.22)、179 (0.78)	0
DKDKC₁₂D	1 (0)、30 (0.36)、80 (0.64)	0
DKDKC₁₂K	1 (0)、30 (0.32)、135 (0.68)	0
Bis-D₃-DKDKC₁₂	1 (0)、30 (0.12)、120 (0.88)	0
Tris-D₃-DKDKC₁₂	1 (0)、30 (0.11)、123 (0.89)	0

30 ms より寿命の長い成分は、溶液中に存在するアスコルビン酸から電子移動メデイエーターを介して直接 P700⁺が還元された際の寿命に対応するので、今回の評価とは関係がない。この結果、0.1 wt% **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂**いずれを含む緩衝液に PSI を溶かした場合においても、PSI の膜外ドメインの変性に対応する 1 ms の寿命成分が見られず、30 ms の成分のみしか観測されなかったことから、膜外ドメインに変性はみられないことが分かった。以上のことから、多量化 PG-surfactant **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂**は、PSI の膜内ドメインの立体構造、膜外ドメインの立体構造ともに、変性を促さないことが確認された。

5-3-2-5 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI、PSII の光誘起電子移動活性評価^{10),16)}

続いて、酸素電極を用いた光誘起電子移動活性に関して評価を行った。3-3-2-7 項で記載した通り、P700 の光励起に伴う溶存酸素濃度の減少速度を酸素電極により追跡することで、PSI 内部での電子移動速度を擬似的に見積もることが可能である。この酸素減少速度から、多量化 PG-surfactant **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂**に可溶化された PSI 1 ユニットあたりの光誘起電子移動速度を見積もった結果を表 5-3 にまとめた。

表 5-3 多量化 PG-surfactant に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度の比較

Solubilization surfactant	Electron transfer rate in PSI ($\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}$)
β -DDM	35.8 ± 1.1
Bis-D₃-DKDKC₁₂	37.0 ± 0.6
Tris-D₃-DKDKC₁₂	39.4 ± 0.7

native 状態のコントロールとなる 0.1 wt% β -DDM を含むバッファー溶液で可溶化された PSI の電子伝達速度は、 $35.8 \pm 1.1 \text{ PSI}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、これに対して 0.1 wt% **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** を含むバッファー溶液に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度は、それぞれ $37.0 \pm 0.6 \text{ PSI}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $39.4 \pm 0.7 \text{ PSI}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。このことから、いずれの界面活性剤を用いた場合においても、PSI の光誘起電子移動活性に関しても維持されていることが分かった。

同様に PSII の光誘起電子移動活性に関しても酸素電極を用いて評価を行った。こちらでも 3-3-2-7 項で記載した通り、P680 の光励起に伴う光誘起電子移動速度を、溶液中の酸素濃度の上昇速度から擬似的に見積もった。この上昇速度を酸素電極により測定することで算出された光誘起電子伝達速度を、表 5-4 にまとめた。

表 5-4 多量化 PG-surfactant に可溶化された PSII の光誘起電子移動速度の比較

Solubilization surfactant	Electron transfer rate in PSII ($\text{PSII}^{-1} \text{s}^{-1}$)
β -DDM	156.3 ± 8.4
Bis-D₃-DKDKC₁₂	151.9 ± 7.6
Tris-D₃-DKDKC₁₂	157.1 ± 4.6
Bis-K₃-DKDKC₁₂	151.8 ± 3.6

PSII の native 状態のコントロールとなる 0.1 wt% β -DDM を含む緩衝溶液で可溶化された PSII の電子伝達速度は $156.3 \pm 8.4 \text{ PSII}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であるのに対して、負電荷を持つ **Bis-D₃-DKDKC₁₂** と **Tris-D₃-DKDKC₁₂** で可溶化された場合が、 $151.9 \pm 7.6 \text{ PSII}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $157.1 \pm 4.6 \text{ PSII}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、正電荷を持つ **Bis-K₃-DKDKC₁₂** で $151.8 \pm 3.6 \text{ PSII}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であったことから、PSII に関してもいずれの多量化 PG-surfactant を用いた場合においても、光誘起電子移動活性の維持が確認された。

以上分光学的な性質や光誘起電子移動活性などの詳細な評価から、今回検討を行った多量化 PG-surfactant は、PSI、PSII の構造や機能を維持したまま可溶化出来る優れた可溶化試薬として機能することが明らかとなった。

5-3-3 多量化 PG-surfactant の低濃度領域での膜蛋白質可溶化能力の評価

種々の分光学的測定により、多量化 PG-surfactant についても、単量体型の PG-surfactant と同様に 0.1 wt%程度の濃度において膜蛋白質を変性させることなく、単一ユニットごとに（膜蛋白質を凝集させることなく）可溶化できることが確認された。そこで次に、より薄い濃度領域における多量化 PG-surfactant の可溶化能力について、主に DLS を用いた評価を行った。これは、もし多量化により膜蛋白質可溶化試薬と膜蛋白質の親和性が増加しているのであれば、より低い濃度領域においてこそ、単量体型の界面活性剤の膜蛋白質可溶化能力に対して優位性が発揮されると考えたためである¹⁷⁾。それぞれの界面活性剤について 0.1-0.0001wt%まで濃度を振り、この範囲内のそれぞれの濃度の界面活性剤を含む緩衝溶液中に可溶化された膜蛋白質の、水和直径を評価する方法をとった。もし水中にうまく膜蛋白質が凝集することなく分散できていれば、膜蛋白質の分子サイズに対応する水和直径が観測されると予測した。ちなみに今回用いている PSI、PSII は、X線結晶構造解析による評価から、長軸側の直径は約 20nm と見積もられている^{17),18)}。所定の濃度の各多量化 PG-surfactant で可溶化されたサンプル調製は、前述したような界面活性剤置換の手法を用いてあらかじめ 0.1 wt%の濃度で可溶化した溶液を調製後、所定の界面活性剤濃度へ薄めることで作成した。

5-3-3-1 低濃度の多量化 PG-surfactant で可溶化した際の PSI, PSII の水和直径の DLS 測定による評価

異なる濃度の各種界面活性剤を用いて PSI を可溶化した際の、DLS 測定結果を表 5-5 (次ページ) にまとめた。全ての界面活性剤において、0.1wt%の濃度条件下においては 7 nm 程度の位置にのみ、DLS ピークが観測された。このピークは、膜蛋白質と相互作用していない界面活性剤の分子数が、膜蛋白質の分子数に比べて相対的に多いため、結果として界面活性剤の形成するミセルに基づく水和直径のみが優先的に観測されたためと考えられる。一方で、0.01 wt%の界面活性剤濃度の条件下においては、いずれの界面活性剤を用いた場合においても、約 20 nm 前後の位置にのみ DLS ピークが観測された。これは、界面活性剤濃度が 0.01 wt%以下の濃度条件であれば、PSI に由来する分子サイズ¹⁷⁾を観測可能であることを示すと同時に、この濃度条件下ではいずれの界面活性剤を用いた場合においても PSI が単分子で分散可溶化されていることがわかった。しかし、さらに 1/10 の濃度 (0.001 wt%) まで界面活性剤濃度を下げると、PSI を変性させることなく可溶化出来る試薬として一般に用いられている β -DDM、さらに単量体型の PG-surfactant である **DKDKC₁₂D**、**DKDKC₁₂D** でも、PSI を単分子として分散可溶化できなくなり、凝集体に由来する 1000 nm 以上サイズの DLS ピークのみが観測されるようになった。これは、可溶化試薬の濃度が臨界ミセル濃度以下になることで、膜蛋白質の疎水性部分 (膜貫通領域) に結合することで、膜タンパク質どうしの凝集を抑制できる効果が失われたためと示唆された。一方、多量化 PG-surfactant では、それよりもさらに 1/10 の界面活性剤濃度となる 0.0001wt%の濃度の条件下においても、数 10 nm の分子サイズを維持しており、膜蛋白質を十分に分散可溶化できていることが示唆された。この結果は、多量化することで膜蛋白質の疎水部分 (膜貫通領域) への PG-surfactant の相互作用が強くなり、その結果膜蛋白質から界面活性剤が剥がれにくくなることで、より低い濃度領域においても膜蛋白質を可溶化出来る機能が発現したためと思われる。

表 5-5 各界面活性剤濃度におけるそれぞれの PG-surfactant により可溶化された PSI が形成する水和直径

Concentration (wt%)	Size/nm				
	β -DDM	DKDKC₁₂D	DKDKC₁₂K	Bis-D₃-DKDKC₁₂	Tris-D₃-DKDKC₁₂
0.1	6.9	7.1	6.9	6.7	7.1
0.01	18	23	21	15	19
0.001	2000	2000	1500	37	32
0.0001	3500	3100	1300	68	57

表 5-6 各界面活性剤濃度におけるそれぞれの PG-surfactant により可溶化された PSII が形成する水和直径

Concentration (wt%)	Size/nm					
	β -DDM	DKDKC₁₂D	DKDKC₁₂K	Bis-D₃-DKDKC₁₂	Tris-D₃-DKDKC₁₂	Bis-K₃-DKDKC₁₂
0.1	5.9	6.2	6.4	7.6	7.8	9.2
0.01	1200	23	12	16	12	13
0.001	1900	1600	19	25	26	29
0.0001	2000	1100	220	32	28	980

一方各試薬の cac は表 5-1 に示すように、 β -DDM、**DKDKC₁₂D**、**DKDKC₁₂D**、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Bis-K₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-K₃-DKDKC₁₂** で、それぞれ 180 μ M、7.9 μ M、8.3 μ M、7.9 μ M、8.8 μ M、8.4 μ M、2.1 μ M であった。例えば β -DDM あれば、0.01 wt%と 0.001 wt%の界面活性剤濃度は、196 μ M と 19.6 μ M と換算され、cac 以上となる 0.01 wt%の界面活性剤濃度においては分散可溶化できているのに対して、cac 以下となる 0.001 wt%では膜蛋白質が可溶化出来ないことは、DLS の測定結果と合理的な一致が見られる。単量体型の PG-surfactant である **DKDKC₁₂D**、**DKDKC₁₂K** も同様に、cac 以下の濃度 (0.001 wt% で 7.5 μ M) になると可溶化できなくなり、これは DLS の測定結果とも一致した。ところが多量化 PG-surfactant の場合、0.001 wt%の濃度は、二量体型 PG-surfactant が 3.4 μ M、三量体 PG-surfactant が 2.3 μ M と換算され、これは cac 以下の濃度であるにもかかわらず、膜蛋白質を単分子で分散可溶化できていることがわかる。これは cac が、界面活性剤どうしの相互作用のしやすさを示す指標であるのに対して、膜蛋白質の可溶化に於いては、膜蛋白質の疎水性部位と界面活性剤の相互作用の強さが重要となり、これが多量化効果により強くなることで、より低い濃度領域においても膜蛋白質の可溶化が可能となったと示唆された。

同様に PSII についても評価を行い、DLS の測定結果を表 5-6 に示した。**DKDKC₁₂K** を用いた場合を除き、PSII でも β -DDM や単量体型の PG-surfactant では低濃度領域 (>0.001 wt%) では、単分子で分散可溶化することができなかつた一方で、多量化 PG-surfactant ではさらに 1/10 の低濃度領域 (0.0001 wt%) であっても、単分子で分散可溶化することが可能であることが分かった。**Bis-K₃-DKDKC₁₂** については、他の多量化 PG-surfactant に比べて凝集しやすい傾向が見られた。これは、可溶化の際にも述べていたように正電荷の界面活性剤は今回の膜蛋白質が負電荷を帯びているために、全体の電荷が中和されることで、低濃度条件において相互作用が弱くなり凝集しやすくなったためと考えられる。また、多量化 PG-surfactant を用いることで、PSI を可溶化する場合と同様に、cac 以下の濃度領域 (0.0001 wt%) であっても、膜蛋白質を可溶化できていることは、非常に興味深い。

5-3-3-2 低濃度で可溶化を行った際の TEM による形態観察

DLS 測定により観測された数十 nm の DLS ピークが、PSI や PSII を単分子で確かに可溶化できていることに因るかを更に考察するために、多量化 PG-surfactant の濃度が 0.01 wt% と 0.0005 wt% の条件下で PSI、PSII を可溶化したサンプルに関して、TEM でその粒子直径の評価を行った。図 5-6、図 5-8 に各多量化 PG-surfactant を用いて可溶化された PSI、PSII の TEM 像を示したが、いずれのサンプルに関しても、約 20 nm 程度の粒径をもつ粒子しか観測されなかった。PSII を 0.0005 wt% Bis-D₃-DKDKC₁₂ にて可溶化を行った場合は凝集物とみられる TEM 像が得られた。これは、サンプル調製の際に溶液を乾燥させることで銅グリッド上に吸着させるが、その際に凝集してしまったと考えられる。またここで観測されている粒子が、PSI、PSII あるいは多量化 PG-surfactant の会合体に由来することを確認するために、Energy-Dispersive X-ray (EDX) spectroscopy の測定を行った。その結果、ここで観測された粒径約 20nm の粒子には、有機化合物に由来する C, N, O の他に、PSI、PSII に特徴的な金属元素 (PSI の場合 Fe¹⁸⁾、PSII の場合 Mn¹⁹⁾) が確認されたことから (図 5-7、図 5-9)、ここで観測されている粒子は PSI、PSII が多量化 PG-surfactant により単一分子で分散可溶化されているものを観測しており、DLS を用いた考察と矛盾しないことが分かった。

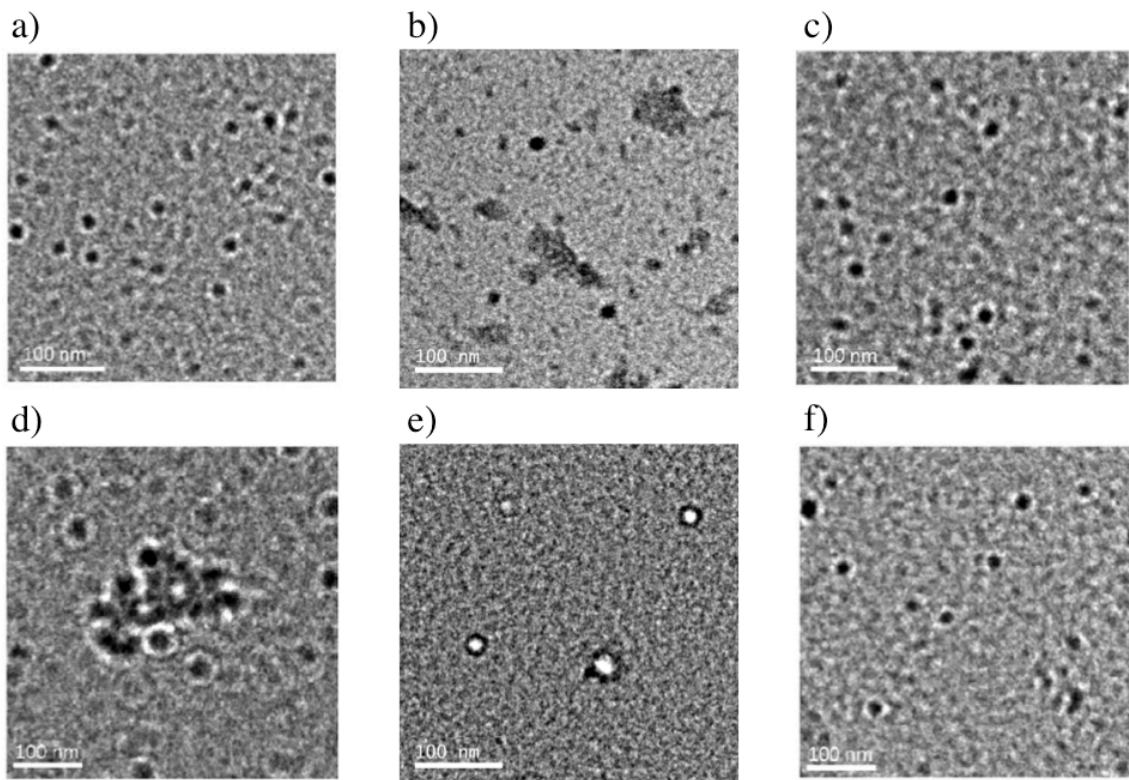


図 5-6 各濃度の界面活性剤に可溶化された三量体 PSI の TEM 画像。各試料はリンタングステン酸によりネガティブ染色を行った。(a) 0.01 wt% β -DDM、(b) 0.01 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(c) 0.01 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**、(d) 0.0005 wt% β -DDM (e) 0.0005 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(f) 0.0005 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**

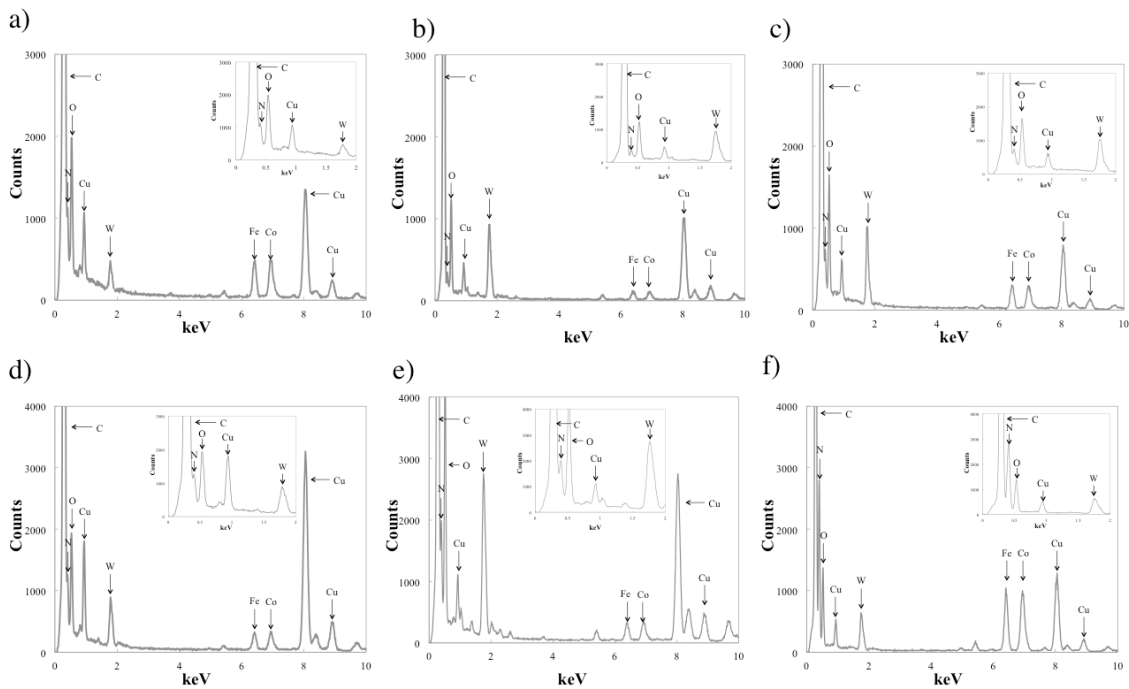


図 5-7 各濃度の界面活性剤に可溶化された三量体 PSI の EDX スペクトル。各試料はリンタングステン酸によりネガティブ染色を行った。(a) 0.01 wt% β -DDM、(b) 0.01 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(c) 0.01 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**、(d) 0.0005 wt% β -DDM (e) 0.0005 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(f) 0.0005 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**

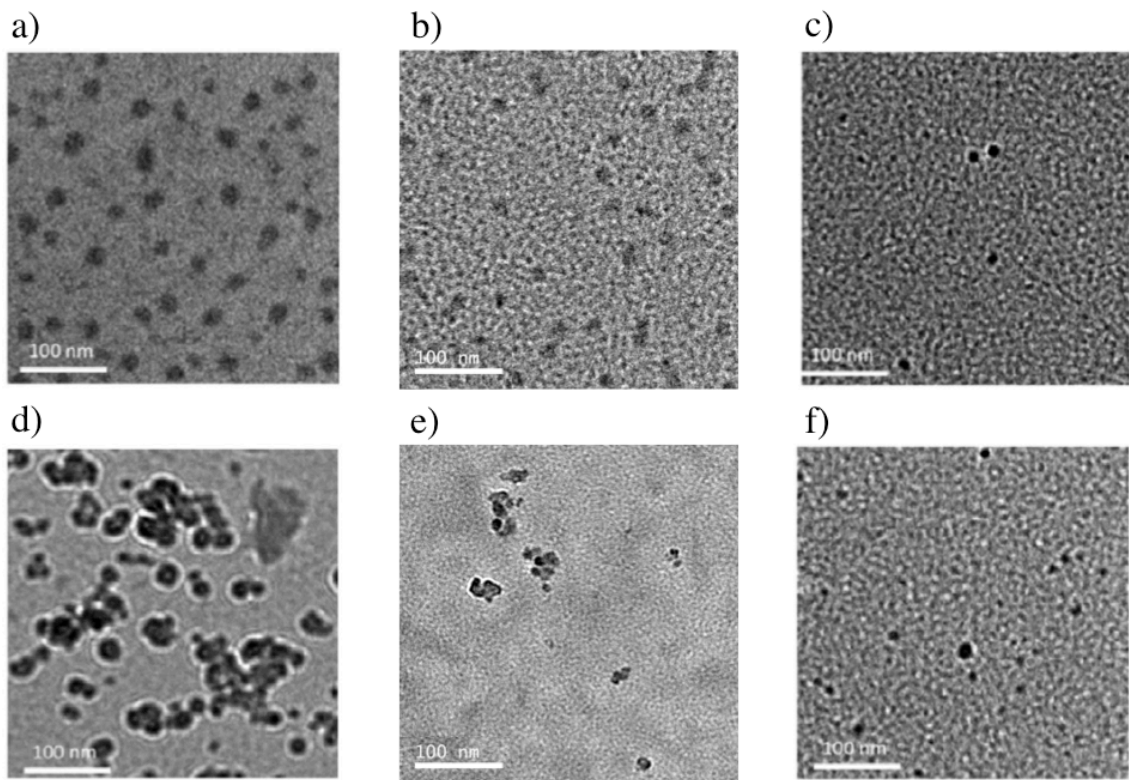


図 5-8 各濃度の界面活性剤に可溶化された二量体 PSII の TEM 画像.各試料はリンタングステン酸によりネガティブ染色を行った。(a) 0.01 wt% β -DDM、(b) 0.01 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(c) 0.01 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**、(d) 0.0005 wt% β -DDM (e) 0.0005 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(f) 0.0005 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**

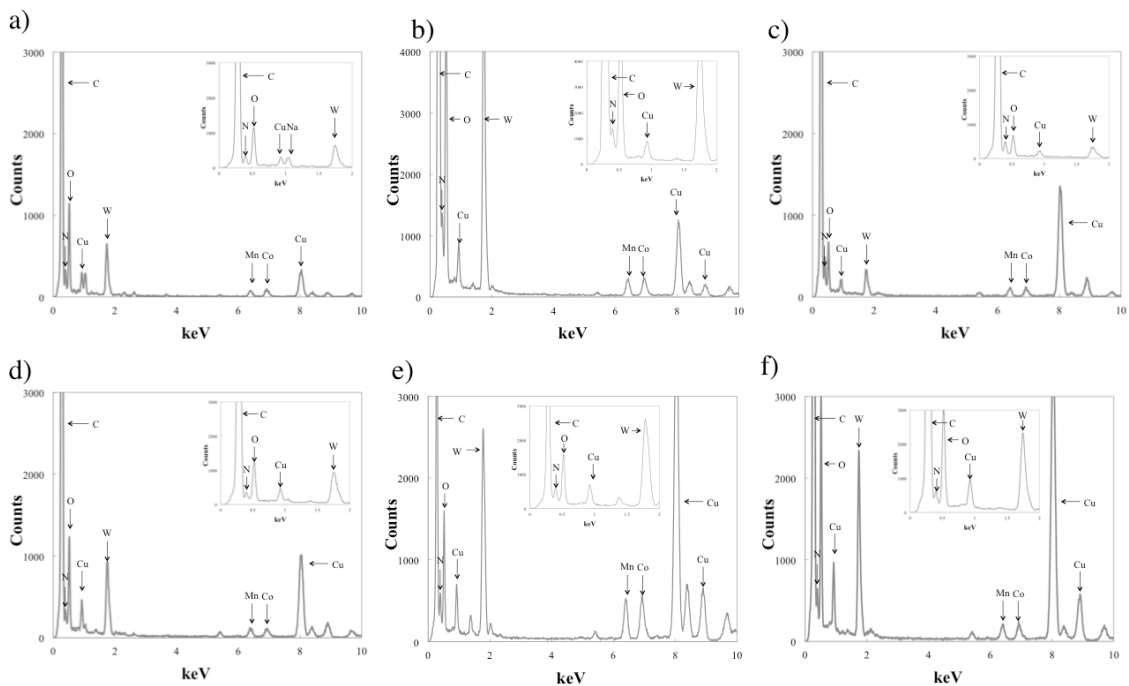


図 5-6 各濃度の界面活性剤に可溶化された二量体 PSII の EDX スペクトル。各試料はリンタングステン酸によりネガティブ染色を行った。(a) 0.01 wt% β -DDM、(b) 0.01 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(c) 0.01 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**、(d) 0.0005 wt% β -DDM (e) 0.0005 wt%**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、(f) 0.0005 wt%**Tris-D₃-DKDKC₁₂**

5-4 まとめ

この章では、第3章で新規の可溶化試薬として見出した **DKDKC₁₂D** および **DKDKC₁₂K** のコア配列を、柔軟な(Gly)₄ リンカーでつないで多量化することにより、高分子量化した **Bis-D₃-DKDKC₁₂** (Mw ~3 kDa)、**Bis-K₃-DKDKC₁₂** (Mw ~3 kDa)、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** (Mw ~4.3 kDa) の設計を行った。PG-surfactant の多量化を行った際に親水性・疎水性のバランスに変化が生じ界面活性剤の性質が失われていないことを確認するため、蛍光プローブ法を用いて臨界凝集濃度 (cac) の算出、また中性緩衝中での会合挙動に関して、動的光散乱(DLS)測定により検討を行った。cac 値の算出を行ったところ、二量体型の **Bis-K₃-DKDKC₁₂** および **Bis-D₃-DKDKC₁₂** では、単量体型 PG-surfactant と近い値となった。対照的に、三量体型の PG-surfactant となる **Tris-D₃-DKDKC₁₂** では、単量体型、二量体型 PG-surfactant と比較し、若干低い cac 値が見積もられた。この cac 値の減少は、[-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-]ユニットが 1 つの分子へまとめられたことによる、多量体化の効果が顕在化したものと思われた。

中性緩衝液中での会合挙動に関して、動的光散乱(DLS)測定により検討を行った。その結果、**Tris-K₃-DKDKC₁₂** を除くいずれの多量化 PG-surfactant について cac 値以上の濃度で、ミセル様の会合体のみを形成することが分かった。一方で、**Tris-K₃-DKDKC₁₂** では、約 50 nm 程度の水和直径を持つ会合体の比較的選択的な形成が見られた。会合形態を決定する要因として、ペプチド配列に基づく特異的相互作用の他に、分子内の親水性と疎水性のバランスなどが考えられる。**Tris-K₃-DKDKC₁₂** では、これらが集合したときの各アミノ酸側鎖の電離状態が、微妙に異なること、あるいは特異的な水素結合の形成などが、このような集合形態の変化を生んでいると考えられた。

続いて高分子量化 PG-surfactant **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Bis-K₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** が、膜蛋白質可溶化試薬として機能を維持できているか評価を行うため、界面活性剤置換法を用い PSI、PSII の可溶化実験を行うことで、機能評価を行った。なお、PSI に対しては、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** のみが、十分な可溶化能力を示した。一方で、PSII に対しては、上記 3 種類 **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Bis-K₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** 全てにおいて、十分な可溶化能力が見られた。室温での吸収スペクトル測定、77K での定常光蛍光スペクトル測定により、膜貫通領域に存在するアンテナクロロフィル色素の集合状

態に関して、PSI、PSII を変性させる事なく可溶化できている事が分かった。光照射により生成する P700* の電荷分離状態の寿命を過渡吸収スペクトル測定により見積もる事で、PSI 膜外ドメインに存在するサブユニット蛋白質 PsaC、PsaD、PsaE の離脱に伴う変性が、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** で可溶化することにより起こっているか検討を行った。その結果、多量化 PG-surfactant **Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** は、PSI の膜外ドメインの立体構造の変性を促さないことが確認された。さらに、PSI、PSII の機能である光誘起電子移動について評価を行ったところ、β-DDM により可溶化された場合と同様な値が得られ、機能の面からも PSI、PSII の膜蛋白質可溶化試薬として有用である事が分かった。

PG-surfactant を多量化しても可溶化試薬として機能することが確認されたことから、多量化による膜蛋白質との親和性の増加を、より薄い濃度領域で DLS を用いることで確認を行った。全ての界面活性剤において、0.1 wt% の濃度条件では界面活性剤の形成するミセルに基づく水和直径のみが優先的に観測され、0.01 wt% の濃度条件では PSI、PSII が単分子で可溶化されているサイズが観測された。0.001 wt% まで濃度を下げると β-DDM、さらに単量体型の PG-surfactant である **DKDKC₁₂D**、**DKDKC₁₂D** では PSI を単分子として分散可溶化できなくなり、凝集体に由来する 1000 nm 以上サイズの DLS ピークのみが観測されるようになった。多量化 PG-surfactant ではさらに薄い濃度となる 0.0001wt% においても数 10 nm の分子サイズを維持しており、膜蛋白質を十分に分散可溶化できていることが示唆された。この結果は、多量化することで膜蛋白質の疎水部分（膜貫通領域）への PG-surfactant の相互作用が強くなり、その結果膜蛋白質から界面活性剤が剥がれにくくなることで、より低い濃度領域においても膜蛋白質を可溶化出来る機能が発現したためと思われる。DLS により観測されたピークが、PSI や PSII を単分子で確かに可溶化できていることに因るかを更に考察するために、TEM や EDX により評価を行った。その結果、薄い濃度であっても多量化 PG-surfactant を用いることで PSI、PSII が単一粒子で分散可溶化されていることが観測でき、DLS を用いた考察と矛盾しないことが分かった。以上のことから、多量化 PG-surfactant は基本ユニットとなる [-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-] のユニットを多量化することで、膜蛋白質との相互作用が向上し（多量化効果）、これにより膜蛋白質の特に疎水領域との相互作用が強くなることで、より低濃度領域においても PSI、PSII といった膜蛋白質を、単一分子で水

中に分散可溶化できる試薬として働くことが分かった。

参考文献

- 1) C. J. Fee, J. M. Alstin, *Chem. Eng. Sci.*, **61**, 924-939 (2006).
- 2) V. J. Hruby, F. al-Obeidi, W. Kazmierski *Biochem J.*, **268(2)**, 249-262 (1990).
- 3) E. D. Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato, V. Bocchini, *Anal. Biochem.*, **115**, 278-286 (1981).
- 4) J.-R. Shen, N. Kamiya, *Biochemistry*, **39**, 14739-14744 (2000).
- 5) P. Fromme, H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1365**, 175-184 (1998).
- 6) K. Takasaka, M. Iwai, Y. Umena, K. Kawakami, Y. Ohmori, M. Ikeuchi, Y. Takah, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1797**, 278-284 (2010).
- 7) K. Kawakami, M. Iwai, M. Ikeuchi, N. Kamiya, J.-R. Shen, *FEBS Lett.*, **581**, 4983-4987 (2007)
- 8) 秋本 誠志 低温科学 vol.67 (光合成研究法), 449-452.
- 9) S. Hoshina, R. Sakurai, N. Kunishima, K. Wada, S. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 61-68 (1990).
- 10) 沈 健仁 低温科学 vol.67(光合成研究法), 551-560.
- 11) K. Sonoike, H. Hatanaka, S. Katoh, S. Itoh, *Plant Cell Physiol.*, **31**, 865-870 (1990).
- 12) J. Liu, X. Zhang, M. Wang, J. Liu, M. Cao, J. Lu, Z. Cui, *Photosynth. Res.*, **112**, 63-70 (2012).
- 13) R. Zana, H. Levy, K. J. Kwetkat, *Colloid Interface Sci.*, **197**, 370-376 (1998).
- 14) S. Itoh, I. Masayo, I. Isamu, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1507**, 115-138 (2001).
- 15) J. R. Shen, *Low Temp. Sci.*, **67**, 551-560 (2009).
- 16) K. Matsumoto, M. Vaughn, B. D. Bruce, S. Koutsopoulos, S. J. Zhang, *Phys. Chem. B*, **113**, 75-83(2009).
- 17) R. W. J. Egan, *Biol. Chem.*, **251**, 4442-4447 (1976).
- 18) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauu, *Nature*, **411**, 909-917 (2001).
- 19) Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, N. Kamiya, *Nature*, **473**, 55-60 (2011).

第6章 高分子ゲル中での膜蛋白質安定性を向上させる界面活性剤の開発

6-1 緒言

現在膜蛋白質を機能分子として応用する研究が進められている。これは、リパーゼ¹⁾などの加水分解酵素やペルオキシダーゼ²⁾のような酸化酵素、抗体³⁾といった水溶性蛋白質だけではなく、光エネルギー変換機能を持つ光合成関連膜蛋白質⁴⁾、ホルモンなどに対するレセプター膜蛋白質⁵⁾、イオンチャンネルやポンプなどの膜蛋白質⁶⁾などの機能も利用した半人工分子デバイス構築へと興味広がっているためと考えられる。通常生体膜内に収まっている膜蛋白質を機能分子として利用するためには、某かの担体材料へとどめることが望ましい⁷⁻⁹⁾。これは操作性の向上と共に、担体への固定化により膜蛋白質の安定性向上、機能性向上も期待されるためである（例えば、膜蛋白質のトポロジー制御した固定化は、固体担体上での膜蛋白質の機能向上に重要である）。有機-無機ハイブリッドからなるメソポーラス構造の内部表面に、光合成関連膜蛋白質を吸着固定化する報告が稲垣らによりされている¹⁰⁾。伊藤らにより、ナノ細孔を内部に持ったガラスの細孔表面に、同様に光合成関連膜蛋白質を固定化する報告もされている¹¹⁾。レセプター膜蛋白質やイオンチャンネルは、MEMS技術により作製されたナノパターン化された固体流路内に脂質膜を伴って固定化され、例えば電気信号により特定の有機物やイオンを検出可能な半人工デバイスの構築なども検討されている^{12),13)}

しかし、これまでに報告されている膜蛋白質を用いた半人工デバイス構築の系の問題点として、多くの系が固体担体の「表面への固定化」を利用している点が挙げられる。この方法では、固定化された膜蛋白質が常に外的環境に晒され続けざるをえないため、本質的に膜蛋白質の長期安定性、実用的な利用要件は期待できない。また、元々生体膜に存在することを意識し、単分子膜を形成させた固定化に固執するあまり、例えばセンサーデバイス構築の際に必要なとされる、「十分な検出感度を得るために必要な分子数」が、固体担体の「表面への固定化」では稼げないなどの、本質的矛盾もある。私は、これに対する解決策として、担体の「表面」ではなく「内部」に固定化する手法を検討したい。これは、担体内部に固定化することで上記2点の問題点を解決できると期待した為である。例えば、固定化される膜蛋白質が担体に覆われることで、外的環境に曝される機会が大幅に減り、外部環境変化（溶媒、塩強度、温度の変化、膜

蛋白質機能を阻害する酵素や阻害剤の添加)に基づく変性失活の緩和が期待される。また担体内部に固定化することで、固定化担体の単位体積あたりに固定化出来る膜蛋白質の分子数を格段に向上させることが可能となり、デバイス化の際に問題とされる感度の確保も可能となる。

しかし一方で、担体内部に固定化する際には以下の2つの問題点解決が必要となる。1つ目は、担体内部に固定化することにより、担体成分(担体を構成する高分子材料や無機材料など)と固定化する膜蛋白質の間の直接的な相互作用頻度が増えることで起こる、膜蛋白質の変性失活である。2つ目は、担体内部に固定化することで、膜蛋白質が機能を果たすために直接相互作用しなくてはならない分子やイオンなどの担体内部での拡散速度が制限、あるいは遮断されることによる、膜蛋白質機能の阻害である。2点目は、網目構造を内部に持ったナノ繊維、あるいはナノフィルム状に成型した架橋性高分子からなるハイドロゲルなどを担体として利用することで、ある程度解決可能と考えられる。しかしこれまでに、具体的に1点目の問題点を直接的に解決できている方法論は存在しない。そこで本章では、この1点目の、「担体内部に固定化」した時に問題となる、「担体成分(担体を構成する高分子材料や無機材料など)との直接的な相互作用頻度が増えることで起こる膜蛋白質の変性失活」を緩和することが可能な試薬開発に取り組んだ。

ここで我々が着目したのは、膜蛋白質可溶化試薬の利用である。第3章でも検討を行ったが、膜蛋白質可溶化試薬は「膜蛋白質の膜貫通領域に選択的に結合する分子」ともみなすことが可能である。そこで、ここに意図する官能基や機能分子を修飾した誘導体を用いることで、これらの分子の膜蛋白質表面への集積化が期待される。ただこの時に、この膜蛋白質可溶化試薬そのものの分子量がある程度大きくないと、さらに膜蛋白質可溶化試薬が膜蛋白質表面と比較的強く結合していない場合には、導入する機能分子によっては膜蛋白質表面から剥がれ、それらの分子の効果で膜蛋白質に変性失活が促されてしまうなどの問題がある。そこで、第5章にて検討を行った、高分子量化したPG-surfactantベースの膜蛋白質可溶化試薬の利用を考えた。また、膜蛋白質の固定化する担体成分との直接的な相互作用を緩和できる機能分子として、ポリエチレングリコール(PEG)鎖の利用を検討した。PEG鎖は、一般に膜蛋白質から水和に寄与する水分子を奪うことで沈殿剤として機能するが、膜蛋白質の変性失活を積極的に促すことはない。また仮にPEG鎖と高濃度に混在した状態においても、膜蛋

白質に対して変性失活を積極的に促すこともない。そこで、このPEG鎖で膜蛋白質表面を被覆することが可能となれば、膜蛋白質の担体成分との直接的な相互作用を緩和できることが期待された。

高分子量化した PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬には、第 5 章にて検討を行った **Bis-D₃-DKDKC₁₂** を用いた。また、PEG 鎖には、分子量 2000、5000 ものを検討した。**Bis-D₃-DKDKC₁₂** の N 末端側に分子量 2000 の PEG 鎖を修飾したものは **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、分子量 5000 の PEG 鎖を修飾したものは **PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** と名付けた。いずれも、Fmoc 固相合成により、樹脂担体上で合成し、樹脂から切り出し後逆相 HPLC により単離精製を行ったものを用いた。また、比較として、高分子量化していない PG-surfactant となる、コア配列 **DKDKC₁₂** を 1 つのみ持ち、PEG 鎖を修飾した **PEG₂₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂** も同様に Fmoc 固相合成により、固相担体上で合成し、単離精製を行ったものを用いた。

はじめに PEG 修飾 PG-Surfactant のミセル形成能や会合能を明らかにするため、蛍光プローブ法での臨界会合濃度 (cac 値) の算出、動的光散乱 (DLS) による溶液中での会合サイズの評価を行った。また同様に PEG を修飾した PG-Surfactant も膜蛋白質に対して可溶化能を失わないか、PEG 修飾 PG-surfactant にて可溶化を行うことで膜蛋白質に変性を促さないかについて、これまでの章と同様に光合成関連膜蛋白質である PSI を用いた検討を行った。その後、この PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化した PSI をアクリルアミドゲル中に導入し、アクリルアミドゲル中での PSI の長期安定性についても検討を行った。

6-2 実験項

6-2-1 PEG 修飾 PG-surfactant の合成¹⁴⁾

第2章 2-2-1 項と同様に多量化 PG-surfactant についても、長鎖アルキルアミド基をあらかじめ Fmoc-Cys-OH の側鎖に導入した Fmoc-Cys(C₁₂)-OH 誘導体を合成し、Fmoc 固相合成用の樹脂担体上で合成する方法をとった。

6-2-1-1 アミノ化 PEG を用いた樹脂担体上での PEG 修飾 PG-surfactant の合成

樹脂担体上で、PG-surfactant の N 末端側にはじめにカルボキシル基を導入し、次にアミノ基を持つ PEG と縮合した。カルボキシル基の導入には、無水コハク酸、アミノ基を持つ PEG には、m-PEG₂₀₀₀-NH₂、m-PEG₅₀₀₀-NH₂ (Nanocs 社製) を用いた。ペプチド部位のアミノ酸の縮合では、2-2-1-1-4 と同様の縮合剤、反応溶媒を用いた。

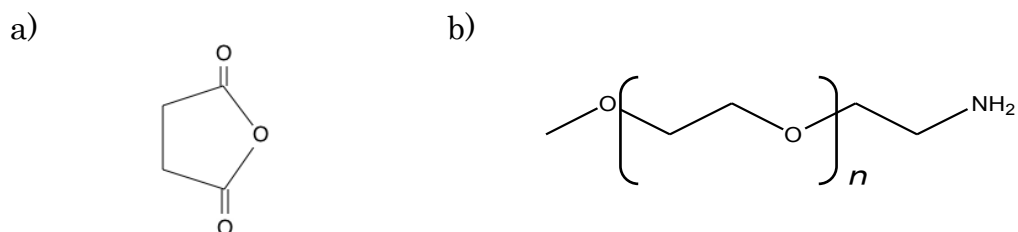


図 6-1 a)無水コハク酸の分子構造 b)アミノ化 PEG 分子構造

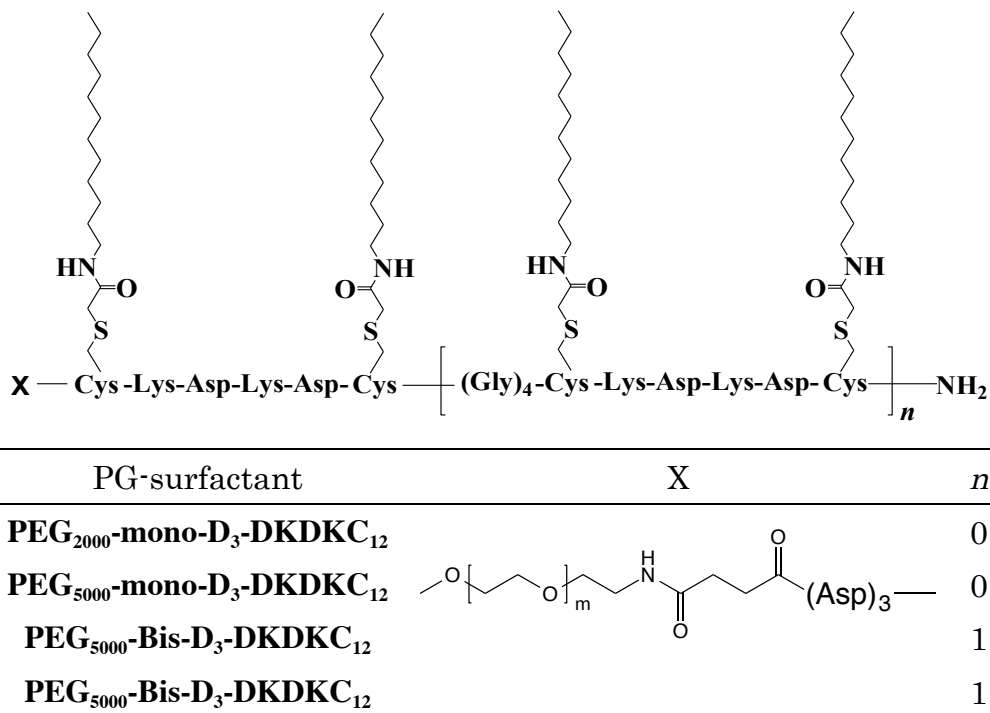
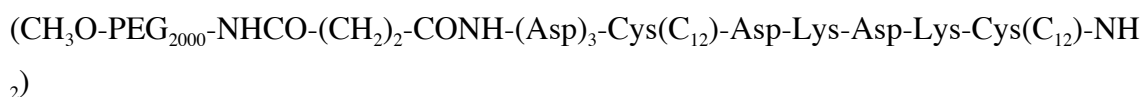
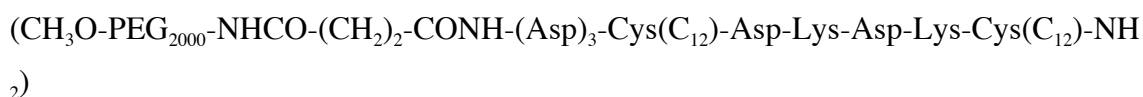


図 6-2 設計した高分子量化 PG-surfactant の分子構造

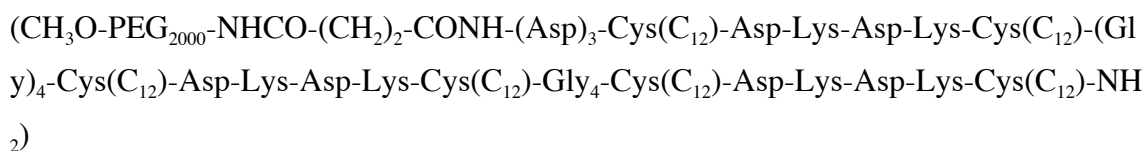
PEG₂₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂



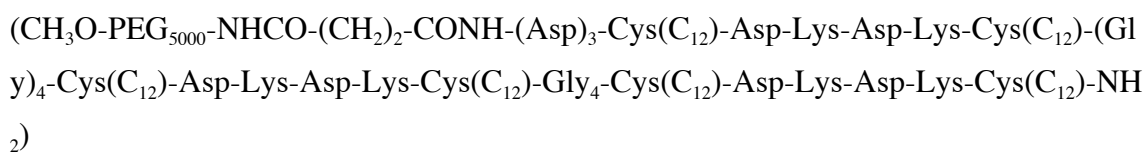
PEG₅₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂



PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂



PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂



6-2-2 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定¹⁵⁾

第3章 3-2-2 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

6-2-3 DLS 測定による水溶液中での会合体挙動の評価

第3章 3-2-3 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

6-2-4 シアノバクテリア由来の光合成膜蛋白質、光化学系 I (PSI)

今回の章で用いている PSI は第3章 3-2-4 項にて説明を行ったものと同じもので、PSI は好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* のものを用いた^{7,9)}。

6-2-4-1 本実験で使用した buffer 一覧

第3章 3-2-4-3 項に記述してある PSI に用いる buffer (Buffer K2, BufferK4) を用いた。

6-2-5 界面活性剤置換法による膜蛋白質可溶化

第3章 3-2-5 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

6-2-6 PG-surfactant で可溶化された PSI の、吸収スペクトル測定による変性度合いの評価

第3章 3-2-6 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

6-2-7 PG-surfactant で可溶化された PSI の 77K における蛍光測定による、PSI への構造的影響の評価¹⁹⁾

第3章 3-2-7 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

6-2-8 過渡吸収測定による PSI の P700⁺ の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI の構造的影響の評価²⁰⁾

第 3 章 3-2-8 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

6-2-9 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価²¹⁾

第 3 章 3-2-9 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

6-2-10 PSI や各種蛍光色素を内部に固定化したポリアクリルアミドゲルの調製

表 6-1 ポリアクリルアミドゲルの調製に用いた各溶液の組成

		最終濃度
30%アクリルアミド溶液 ^{a)}	50 μ L	15 %
500 mM APS	3 μ L	15 mM
500 mM TEMED	3 μ L	15 mM
10×Buffer K2	10 μ L	1×に希釈
H ₂ O	34 μ L	
Total volume	100 μ L	

^{a)} 30%アクリルアミド溶液 (acrylamide : Methylene-bis-acrylamide = 29:1 の水溶液)

またポリアクリルアミドゲル内に担持させる分子として、分子量の異なる蛍光色素 (フルオレセイン、ローダミン B、FITC-PEG₁₀₀₀²²⁾、FITC-PEG₂₀₀₀²²⁾ (ゲル内での終濃度は 0.2 mM とした))、PEG 修飾した PG-surfactant か β -DDM で可溶化を行った PSI 溶液 (ゲル内での終濃度は 50 μ g Chl*a*/mL) を用いた。

6-2-11 ポリアクリルアミドゲルから、ゲルを浸漬するバッファー溶液中への蛍光色素分子の漏えい評価

作成したゲル (24 mm × 32 mm × 130 μ m) を buffer K2 10 mL 中に浸漬し、所定時間 (1~5 min) 振とう後、この溶液の吸収スペクトル測定を行い、各蛍光色

素のゲルからの漏洩量の評価を行った。100 %漏えいした場合の蛍光色素の量は、作成時にゲル (24 mm × 32 mm × 130 μm) 当たりに導入した蛍光色素を、buffer K2 10 mL に溶解し、こちらの吸収スペクトル測定を行うことで計算した。

6-2-12 ゲル中に固定化された PSI の光誘起電子移動活性の酸素電極を用いた評価²¹⁾

第3章 3-2-9 項に示すような酸素電極を用いて評価を行った。まず Buffer K4 を測定セルに (1 mL) 満たし、そこへ電子移動メディエーターとして終濃度 0.5 mM になるように dichloroindophenol (DCIP)、電子受容体として methyl viologen (MV²⁺) を終濃度 0.5 mM になるようにそれぞれ加え、装置が (溶存酸素濃度の測定値が) 安定するまでしばらく待った。ついで、PSI が固定化されたポリアクリルアミドゲル (24 mm × 32 mm × 130 μm) を入れ、最後に還元的犠牲試薬であるアスコルビン酸ナトリウムを終濃度 2 mM となるように加えた。ゲル内部に試薬が浸透するまで約 5 分攪拌し、その後光源を点灯することで、光誘起電子移動活性の測定を、溶存酸素濃度の変化を追うことにより開始した。また、今回はポリアクリルアミドゲルをあらかじめ buffer K2 に 1 時間、24 時間浸漬させたものと、予め浸漬させずにそのまま用いたものについても測定を行った。

6-3 結果と考察

6-3-1 ポリエチレングリコールを修飾した PG-surfactant の合成

Fmoc 固相合成用の樹脂担体 Rink-amide-AM-resin 上で、通常の Fmoc-固相合成法のプロトコールに従い多量化 PG-surfactant 部位のペプチド部分の合成を行い、この N-末端アミノ基に対して無水コハク酸で処理することで、まずはカルボキシル基の導入を行った。ついで、m-PEG-NH₂ をアミド結合により縮合を行った。PEG 鎖の分子長による影響を評価するため、分子量 2000 と 5000 の PEG の修飾を行った。樹脂から切り出したあとは、逆相 HPLC により単離精製を行った。

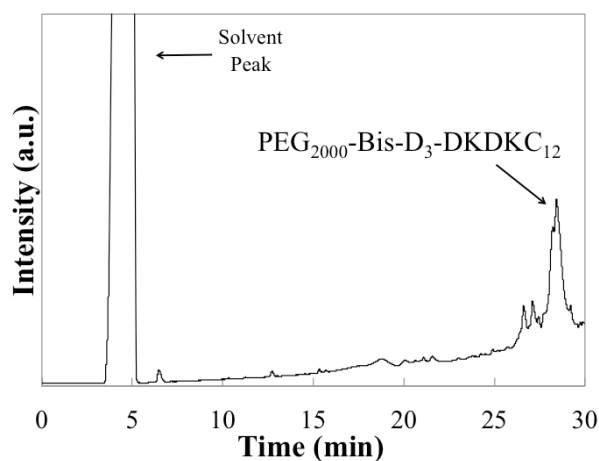


図 6-3 PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂ 精製時の HPLC のクロマトグラム

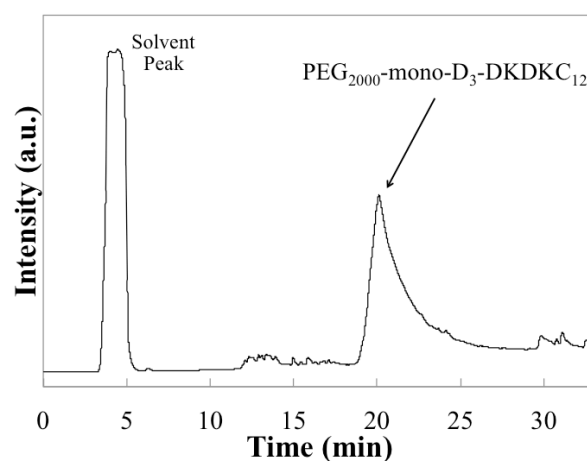


図 6-4 PEG₂₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂ 精製時の HPLC のクロマトグラム

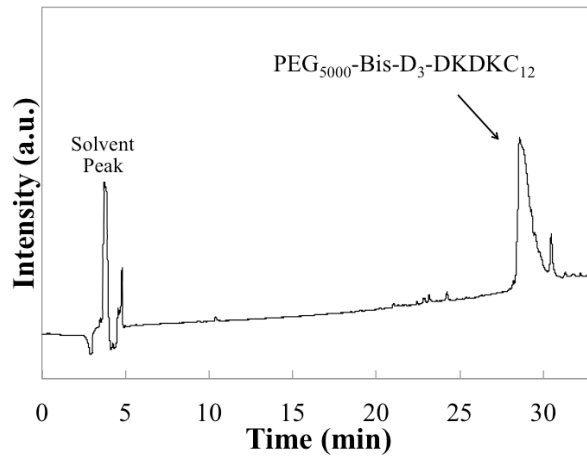


図 6-5 PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂ 精製時の HPLC のクロマトグラム

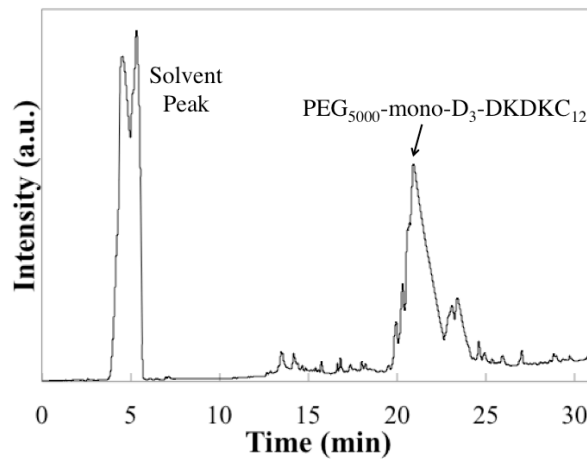


図 6-6 PEG₅₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂ 精製時の HPLC のクロマトグラム

膜蛋白質可溶化試薬として PG-surfactant を用いるためには、中性で水に可溶、もしくは、ミセルを形成して水中に分散していることが望ましい。そこで、それぞれの PEG 修飾 PG-surfactant を 20 mM phosphate buffer (pH 7.0) に 0.1 wt % の濃度となるように溶かし、まずは溶解性の確認を行った。溶解度の評価は、目視により行った。以下表に結果をまとめる。

表 6-2 各 PG-surfactant の溶解性

PG-surfactant	20 mM phosphate buffer pH7
PEG₂₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂	○
PEG₅₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂	○
PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂	○
PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂	○

mono 体、Bis 体ともに、pH 7 の phosphate buffer 中に十分な溶解度で溶解した。高分子量を持つ PEG 修飾を行っても PG-surfactant 部分が界面活性剤としての機能を有しているか、あるいは PEG 鎖の水溶性により単分子で溶解しているかはわからないため、cac 値の算出及び、DLS による分子会合サイズの評価を次に行った。

6-3-1-1 蛍光プローブ法による cac 値測定¹⁵⁾

ANS を用いた蛍光強度変化による cac 値測定を行った。各 PG-surfactant 対数濃度 対 蛍光プローブの相対蛍光強度のプロットを、図 6-7 に示した。なお縦軸の相対蛍光強度については、界面活性剤が非存在下のときの蛍光強度を 1 とした。

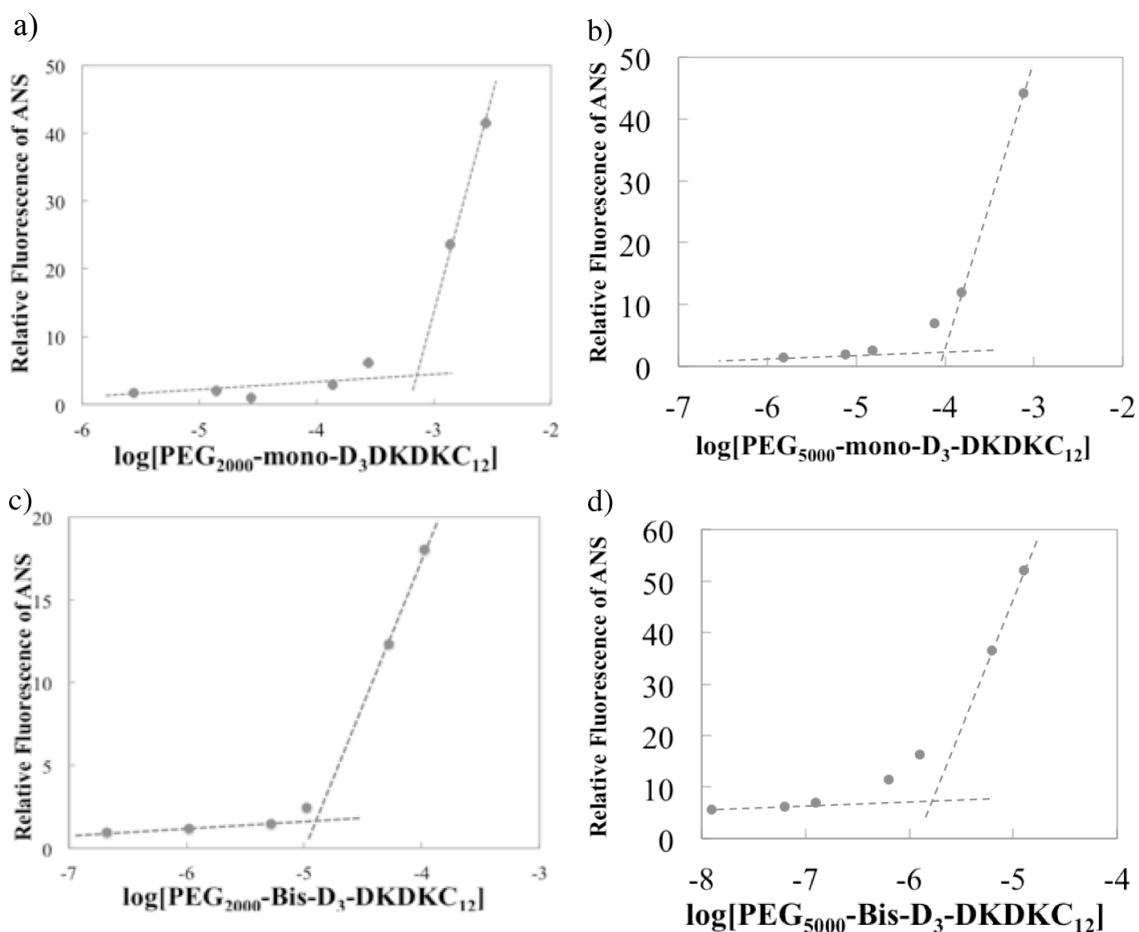


図 6-7 各界面活性剤に対する対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度のプロット
 [(a) $\text{PEG}_{2000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$ 、(b) $\text{PEG}_{5000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$ 、(c) $\text{PEG}_{2000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$ 、(d) $\text{PEG}_{5000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$]

図の変曲点前後の 2 直線の交点から算出される各 PG-surfactant の cac 値を、表 6-3 にまとめた。

表 6-3 各 PG-surfactant の cac 値

Surfactant	cac/mM
$\text{PEG}_{2000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$	0.62
$\text{PEG}_{5000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$	0.096
$\text{PEG}_{2000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$	0.0082
$\text{PEG}_{5000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$	0.0018
$\text{DKDKC}_{12}\text{D}$	0.0079
$\text{Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$	0.0079

PG-surfactant の濃度の上昇に伴い、測定している物理量に 1 つの変曲点がみられ、ミセル形成が示唆された。mono 体については、PEG を修飾することで cac 値が 100 倍近く大きくなった。これは、PEG 鎖が存在していることで、疎水性と親水性のバランスが崩れ、薄い濃度では会合体形成ができなくなったためと思われた。また、PEG 鎖の分子量を 2000 から 5000 へ高分子量化することで cac 値が小さくなることがわかった。これは、PEG 鎖の分子量増加による疎水性増加がその原因と考えられた。一方で Bis 体に関しては、PEG 修飾を行ったとしても、元の **Bis-D₃-DKDKC₁₂** と比較し大きく cac 値の低下は見られなかった。このことは、PG-surfactant を多量化することで PEG 鎖を修飾しても、基本的な性質維持が起こるためと推定された。なお、PEG 鎖の分子量を 2000 から 5000 へ高分子量化することで cac 値が小さく減少は、同様にみられた。

6-3-1-2 DLS による水溶液中での会合挙動の評価

いずれの PEG-surfactant についても cac 以上の濃度において何らかの会合体の形成が示唆された。そこで、合成した PEG 修飾 PEG-surfactant がどのような会合形態を中性バッファー中で示すか、動的光散乱測定により、検討を行った。界面活性剤濃度が 0.1~0.001%(w/v)にて、50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) において評価を行った。この測定結果を図 6-8 に示す。

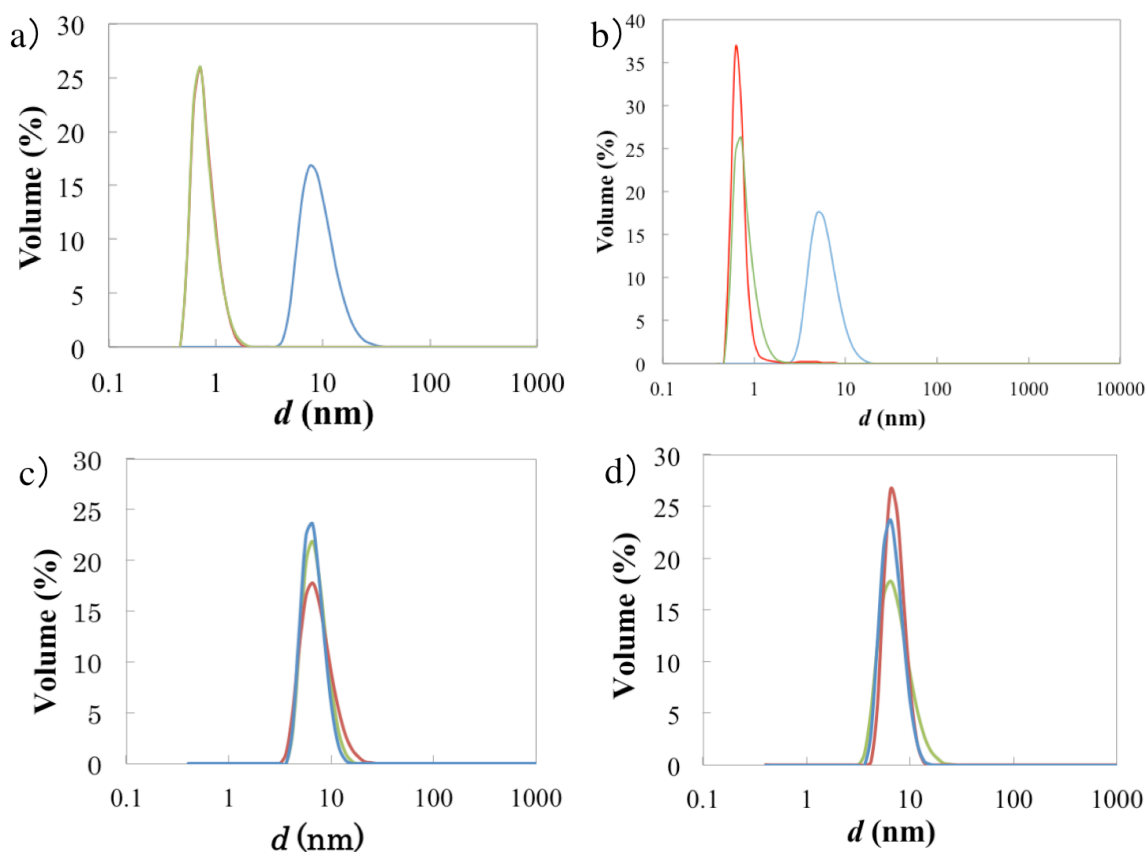


図 6-8 DLS による会合体粒径分布評価 0.1 wt % (青), 0.01 wt % (赤), 0.001 wt % (緑) in 50 mM phosphate buffer (pH 7) [(a) $\text{PEG}_{2000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$, (b) $\text{PEG}_{2000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$, (c) $\text{PEG}_{2000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$, (d) $\text{PEG}_{5000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$].

いずれの PEG 修飾 PEG-surfactant についても、cac 値以上の濃度で 5 ~ 10 nm 程度の単一の会合体に由来するピークのみが確認された。このサイズは、単量体に対応する $\text{DKDKC}_{12}\text{K}$ 、 $\text{DKDKC}_{12}\text{D}$ がミセルを形成した場合の会合サイズ(約 6 nm) と一致していたことから、PEG 修飾 PEG-surfactant も同様にミセル様の会合体のみを形成することが分かった。mono 体である $\text{PEG}_{2000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$ 、 $\text{PEG}_{5000}\text{-mono-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$ については cac 値が Bis 体である $\text{PEG}_{2000}\text{-}$

Bis-D₃-DKDKC₁₂、**PEG₅₀₀₀- Bis-D₃-DKDKC₁₂**と比べ大きく、薄い濃度ではうまくミセルを形成できないことが確認された。また一般的な傾向として、PEG を修飾しても cac 以上の濃度であれば、PG-surfactant の水溶液中での会合挙動は大きく変わらないこともわかった。

以下の実験では、より薄い濃度範囲においてもミセル様の会合体のみを形成した **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis- D₃-DKDKC₁₂**を用いて検討をおこなった。

6-3-2 PEG-PG-surfactant を用いた PSI 可溶化

PEG 修飾 PG-surfactant が、ミセル様の会合体のみを選択的に形成することが確認されたため、次にこれらの試薬の、膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価を行った。ここでは、前述の章と同様に PSI を機能評価を行う膜蛋白質として用いた。PSI は 2-1-3-2 項に記載した通り、その構造中に非常に多くの色素を含み、これら色素の分光学的な性質の変化から蛋白質の変性度合いの評価が容易である。2-2-5 項に記載した界面活性剤置換法により、β-DDM から PEG 修飾 PG-surfactant に置き換え、PSI の膜蛋白質機能への影響評価を行った。

6-3-2-1 吸収スペクトルを用いた、PEG 修飾 PG-surfactant に可溶化された PSI の変性度合いの評価²³⁾

界面活性剤置換法により、β-DDM (0.1 wt%) から PEG 修飾 PG-surfactant **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis- D₃-DKDKC₁₂** (0.1 wt%) に置換を行った PSI サンプルに関して、PSI に変性がみられるかどうか吸収スペクトル測定により評価を行った。PSI に変性が見られないコントロールとして、0.1 wt% β-DDM を含む緩衝液に可溶化した PSI の測定も行った。以下に測定結果を示す。

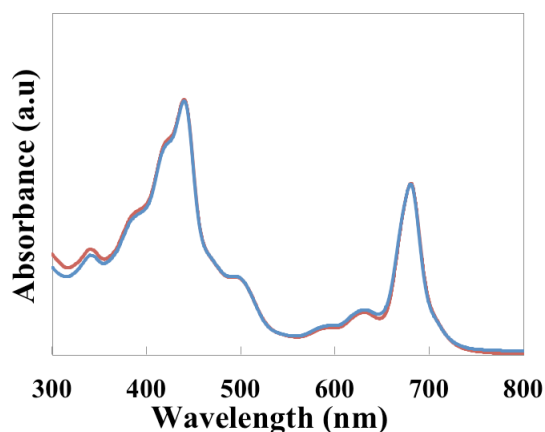


図 6-9 PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂ で可溶化した PSI の吸収スペクトル (青; β -DDM 赤; PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂)

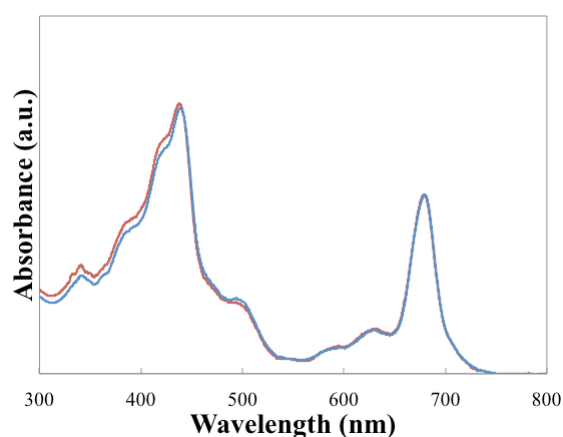


図 6-10 PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂ で可溶化した PSI の吸収スペクトル (青; β -DDM 赤; PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂)

膜蛋白質から色素の脱離がみられる場合 680nm のアンテナクロロフィル a 由来の吸収バンドがブルーシフトすることが知られているが、PEG 修飾 PG-surfactant では、0.1 wt% β -DDM を含むバッファー溶液中のスペクトルとの一致が見られ、色素の脱離なく可溶化できていることがわかった。

6-3-2-2 77K における蛍光スペクトル測定を利用した、PEG 修飾 PG-surfactant に可溶化された PSI の変性度合いの評価¹⁹⁾

PSI についてさらに詳細な変性度合いを評価するために、77 K における蛍光スペクトル測定を行った。2-1-3-2-4 項に記載されている様に、ここで得られる蛍光スペクトルは PSI 骨格内で形成されるレッドクロロフィルに由来するものである。アンテナ色素として働くクロロフィル a に離脱が見られた場合、native 状態で観測される 720 nm のスペクトルピークの代わりに、フリーのクロロフィルに由来する 680nm に蛍光スペクトルピークが観測されることが知られている²⁴⁾。以下に測定結果を示す。

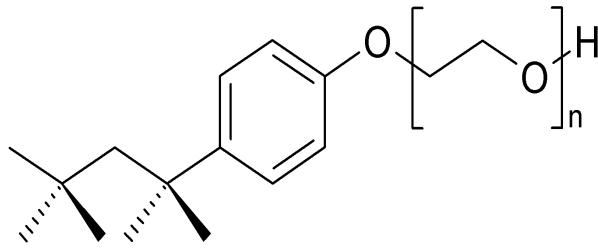


図 6-11 TritonX-100 の構造式

結果を図 6-12 に示す。

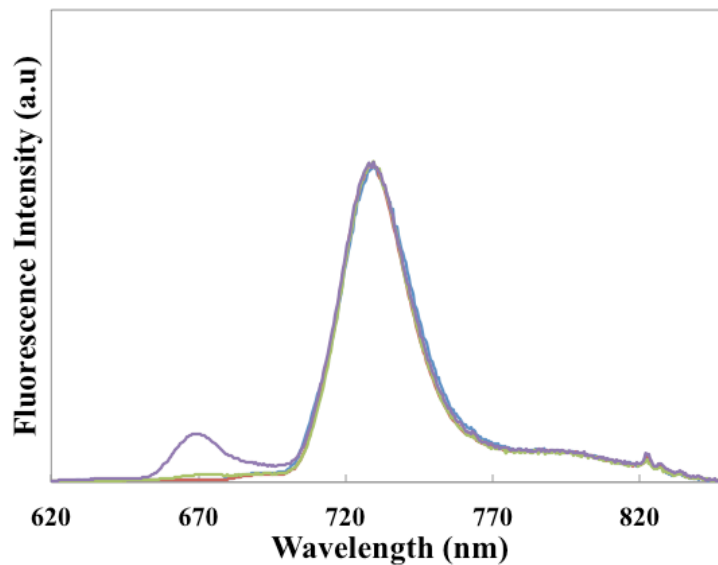


図 6-12 各 surfactant で可溶化した PSI の 77K における蛍光スペクトル
(青: β -DDM, 紫:TritonX-100, 赤: PEG₂₀₀₀-Bis-D₃, 緑: PEG₅₀₀₀-Bis-D₃)

0.1wt% PEG 修飾した PG-surfactant を含むバッファー溶液に可溶化されたいずれの PSI サンプルについても、720nm にのみ蛍光スペクトルピークが観測され、いずれの界面活性剤を用いた場合においても、PSI に変性は見られなかった。対照実験として、一般的に PSI 可溶化に用いられている β -DDM、PEG 修飾 PG-surfactant と同様にポリオキシエチレン骨格を持つ Triton X-100 を用いた。その結果、PEG 修飾 PG-surfactant と同様にポリオキシエチレン骨格を持つ Triton X-100 では、680 nm 付近にもピークが確認された。これは、クロロフィル a が PSI 内から脱離したことによりエネルギー準位に違いが生じ、スペクトルのピー

クが変わったと考えられる。このことから、ただ単に PEG 鎖を界面活性剤の分子骨格内に含むだけでは、膜蛋白質を変性させることなく可溶化ができないことがわかった。これは PG-surfactant の分子骨格が、PEG 鎖のような大きな官能基との直接的な相互作用を緩和できる機能も保持していることが、考えられた。

6-3-2-3 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700* の寿命評価を利用した PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化された PSI の変性度合いの評価

さらに PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化することの、膜蛋白質膜外ドメインへの影響を評価するために、PSI についてスペシャルペア P700 の光励起後の、P700 由来の過渡吸収スペクトル測定を行った^{25),26),27)}。3-3-2-6 項に記載した通り、PSI のスペシャルペア P700 が光励起された場合、光励起により生成された励起電子は、PSI 内のクロロフィルやフィロキノンを経由し、最終的に膜外ドメインにある PsaC の[4Fe-4S]クラスター(F_a 、 F_b)まで運ばれる。一方で電子の移動とともに P700 にはホールが生成し (P700*)、この状態は電荷分離状態と呼ばれる。このとき、電子受容体となるフェレドキシンや酸化活性な分子が系内に存在しない場合、不安定な電荷分離状態解消のために、逆電子移動による電荷再結合が起こる。もし、膜外ドメインの変性により PsaC の離脱、あるいは[4Fe-4S]クラスター (F_a 、 F_b) 機能の失活が見られた場合には、膜内ドメインに存在する[4Fe-4S]クラスター (F_x) までしか電荷分離が起こらないため、この再結合の速度は、1 ms 程度となる一方で、膜蛋白質に変性が見られず[4Fe-4S]クラスター (F_a 、 F_b) まで無事に電子が運ばれた場合には、この寿命は 30 ms と長くなる。従って、P700* の寿命を過渡吸収スペクトル測定から評価することで、膜外ドメインに関する変性の度合いを評価可能である。 A_{698} の経時変化から非線形カーブフィッティングによる求められる P700* の 1 ms (変性状態)、30 ms (native 状態) さらにそれより長い寿命の成分の割合に関して、表にまとめた。

表 6-4 各界面活性剤で可溶化された PSI の P700* の寿命

	P700* の寿命 (ms) (各寿命成分の割合)	Denaturation degree (%)
β -DDM	1 (0)、30 (21.8)、179 (78.2)	0
PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂	1 (0)、30 (23.4)、172 (76.6)	0
PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂	1 (0)、30 (12.6)、134 (86.4)	0

30 ms より寿命の長い成分は、溶液中に存在するアスコルビン酸から電子移動メディエーターを介して直接 P700* が還元された際の寿命に対応するので、今回の評価とは関係がない。表 6-4 の結果から、0.1 wt% **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** いずれを含むバッファーに PSI を溶かした場合においても、PSI の膜外ドメインの変性に対応する 1ms の寿命成分が見られなかったことから、膜外ドメインに変性はみられないことが分かった。以上のことから、PEG 修飾 PG-surfactant **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** は、PSI の膜内ドメインの立体構造、さらに膜外ドメインの立体構造ともに、変性を促さないことが確認された。

6-3-2-4 酸素電極を用いた、PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性評価²¹⁾

続いて、酸素電極を用いた光誘起電子移動活性に関して評価を行った。3-3-2-7 項で記載した通り、P700 の光励起に伴う溶存酸素濃度の減少速度を酸素電極により追跡することで、PSI 内部での電子移動速度を擬似的に見積もることが可能である。この酸素減少速度の速度から、PEG 修飾 PG-surfactant に可溶化された PSI 1 ユニットあたりの光誘起電子移動速度を見積もった結果を表 6-5 にまとめた。

表 6-5 PEG 修飾 PG-surfactant に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度の比較

Solubilization surfactant	Electron transfer rate in PSI ($\text{PSI}^{-1} \text{s}^{-1}$)
β -DDM	39.1 ± 1.2
PEG₂₀₀₀-Bis- D₃-DKDKC₁₂	37.3 ± 1.3
PEG₅₀₀₀-Bis- D₃-DKDKC₁₂	38.6 ± 2.0

PSI が native 状態を維持している場合のコントロールとなる、0.1 wt% β -DDM を含むバッファー溶液で可溶化された PSI の電子伝達速度は、 $39.1 \pm 1.2 \text{ PSI}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であり、これに対して 0.1 wt% **PEG₂₀₀₀-Bis- D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis- D₃-DKDKC₁₂** を含むバッファー溶液に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度は、それぞれ $37.3 \pm 1.3 \text{ PSI}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、 $38.6 \pm 2.0 \text{ PSI}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であった。このことから、いずれの界面活性剤を用いた場合においても、PSI の光誘起電子移動活性についても維持されていることが分かった。

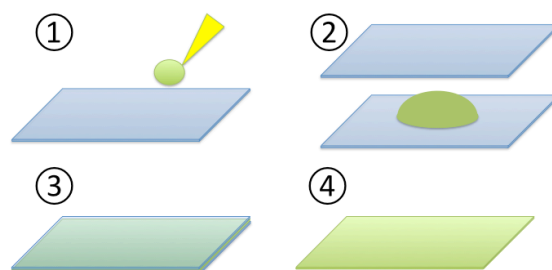
以上分光学的な性質や光誘起電子移動活性などの詳細の評価から、今回検討を行っている PEG 修飾 PG-surfactant は、PEG を膜蛋白質周辺に集積させつつも PSI の構造や機能を維持したまま可溶化出来る可溶化試薬として機能することが明らかとなった。

6-3-3 ポリアクリルアミドゲル内部に固定化した膜蛋白質 PSI の機能評価

6-3-3-1 膜蛋白質 PSI を内部に固定化したポリアクリルアミドゲルの作製

高分子のバルク材（フィルムやブロック）内部へ膜蛋白質を導入固定化した場合、バルク材由来の高分子鎖との相互作用から、膜蛋白質が変性失活してしまうことが危惧される。しかし、PEG などの膜蛋白質に対して変性を促さない高分子鎖で予め膜蛋白質表面を被覆することで、高分子担体内部においても、適度な水和状態の維持とともに、担体由来の高分子鎖との相互作用が緩和され担体内部においても機能活性の維持が期待される。ここでは、このような担体「内部」での固定化の検討が初めてという状況から、比較的膜蛋白質に対してソフトな固定化担体として、ポリアクリルアミドゲルの利用を検討した。ポリアクリルアミドゲルは一般的に蛋白質の電気泳動分析に用いられており、泳動条件を選択することで、膜蛋白質の超分子複合体構造を壊すことなく泳動することも知られている（Native-PAGE のように、SDS などの界面活性剤を用いない泳動法による）。しかし、依然として長期間の保存条件下では、やはり膜蛋白質に変性失活を促すことが危惧される。そこで、このような長期間の保存条件下での、PEG 鎖被覆の効果の検討を行っていく。

ポリアクリルアミドゲルは、モノマーとしてアクリルアミド、架橋剤として N-N'-メチレンビスアクリルアミド、重合開始剤として過硫酸アンモニウム + N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミンを用いた、フリーラジカル重合により行った。なお、種々の分光学的測定法や、酸素電極による光誘起電子移動活性の評価の都合上、2枚のガラス板の間で薄膜化したゲルを作成し、利用した。



手順として、

- ①カバーガラス（24 mm×m して、）上に重合開始剤を添加したモノマー溶液（100 μL ）を滴下する
- ②ゲルが固まる前に同じ大きさのカバーガラス（24 mm×32 mm）で挟む
- ③カバーガラスで挟むことで、2枚のカバーガラス（24 mm×32 mm）の間にモノマー溶液を均一な厚みで広げ、ゲルの硬化を待つ。
- ④ゲルの硬化後にカバーガラスを取り除くことで、薄いゲルを作成した
用いた溶液は100 μL であり、24 mm×32 mm のカバーガラスを使用したため、

$$\text{ゲルの厚さ} = \frac{0.1 \times 10^{-6} \text{m}^3}{24 \times 32 \times 10^{-6} \text{m}^2} \approx 1.3 \times 10^{-4} \text{m}$$

約 130 μm の厚さのゲルの作成を行った。

6-3-3-2 ゲル内部に固定化した各種蛍光色素の漏えい挙動の評価

前述したポリアクリルアミドゲルの中へ、蛍光色素としてローダミン B、フレオロセイン、PEG₁₀₀₀-FITC⁽²²⁾、PEG₂₀₀₀-FITC⁽²²⁾を終濃度 0.2 mM となるように加えて固定化した。色素を内包したゲル（24 mm×32 mm×130 μm ）を buffer K2（10 mL）へ浸すことで、外液に色素が漏洩する。この漏洩量の時間変化を、外液に滲み出た蛍光色素の吸収スペクトルを測定することで評価を行った。この測定は、PSI をポリアクリルアミドゲル内に固定化し光誘起電子移動活性を評価する際に、電子移動メディエーター DCIP、電子受容体 MV²⁺、還元的犠牲試薬であるアスコルビン酸ナトリウムなどの、ゲル内に固定化された PSI とやり取りをしなくてはならない分子の拡散速度がどの程度影響をするか、事前評価をするために行った。

表 6-6 各蛍光色素の漏えい割合の比較

	漏えい割合 (%)
フルオレセイン (Mw = 332.31)	72.3 %
ローダミン B (Mw = 479.02)	66.8 %
PEG ₁₀₀₀ -FITC (Mw = 1388.3)	63.5 %
PEG ₂₀₀₀ -FITC (Mw = 2388.3)	60.5 %

各種蛍光色素を内部に固定化したポリアクリルアミドゲルを浸漬した外液の吸収スペクトルの時間変化を図 6-1 2、5 分後における蛍光色素の漏えい割合を表 6-5 に示した。まず基本的に、分子量の小さいものの方がより漏えい割合が大きくなる傾向が確認された。また時間変化に若干のばらつきはあるものの、いずれも 5 分以内にその漏洩は止まる傾向が見られた。漏洩量に固定化した分子の分子量依存性がでるのは、ポリアクリルアミドゲルの持つ 3 次元ネットワーク構造に起因する、分子の拡散しやすさに影響されたものと考えられた。また一方で、この漏洩が 5 分以内に止まり、さらに漏洩量に分子量依存性があるというのは、ゲルが外液に接している表面から、物質拡散が可能な深さが、固定する分子の分子量に依存しており、この深さまでの分子は比較的早い時間に移動が可能であると考えられた。この測定では外液を交換していないため、5 分以内に各蛍光色素の分配が、外液とゲル内部の間で平衡状態に落ち着いた現象を観測しているという解釈もあるが、外液を順に交換して測定したとしても全ての固定化した分子が漏洩し切ることはなかった。そこで、現在のところは前者の解釈をしている。なおこの測定では、ゲルの内部から浸漬した外液への移動を観測したが、この時に観測される分子量に依存した分子の移動挙動は、外液からゲル内部への物質拡散過程にも反映されると推測された。したがって、PSI をポリアクリルアミドゲル内に固定化し光誘起電子移動活性を評価する際に問題となる、電子移動メディエーター DCIP (Mw 268)、電子受容体 MV²⁺ (2 塩化物の状態 Mw 257)、還元的犠牲試薬であるアスコルビン酸ナトリウム (Mw 198) などは、十分な拡散速度が得られる分子量範囲に有ることがわかった。

6-3-3-3 ポリアクリルアミドゲルへの PSI の導入

PSI を PEG 修飾 PG-surfactant (**PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**) にて可溶化したサンプルを、ポリアクリルアミドゲル内部に固定化した。ゲルの前駆体溶液 100 μL (表 6-1 参照) に PSI 可溶化溶液を PSI のゲル内での終濃度が 5 $\mu\text{gChl/ml}$ となるように添加し、その後重合開始剤を入れて素早く 2 枚のカバーガラス間に挟んだ。これにより、フリーラジカル重合により PSI を固定化した薄膜状のゲルサンプルを作製した。PEG 修飾 PG-surfactant を用いる効果を評価するため、コントロールとして β -DDM あるいは PEG 修飾を行っていない PG-surfactant (**Bis-D₃-DKDKC₁₂**) により可溶化した PSI を用い、同様に薄膜状のポリアクリルアミドゲルサンプルの作製も行った。いずれの作成したゲルも、PSI のクロロフィル a 色素に由来する緑色のゲルとなった (図 6-15)。



図 6-15 作成を行った PSI 内包ポリアクリルアミドゲル

6-3-3-4 吸収スペクトル測定を用いた、ゲルへ封入することの PSI への構造的影響

アクリルアミド、ビスアクリルアミドのフリーラジカル重合により、PSI を内部に固定化したポリアクリルアミドゲルの作成を行っているため、ラジカルによる膜蛋白質の変性失活が懸念された。そこでゲル作成の前後で吸収スペクトル測定を行い、PSI の変性に伴うスペクトル変化が見られないか検討を行った。

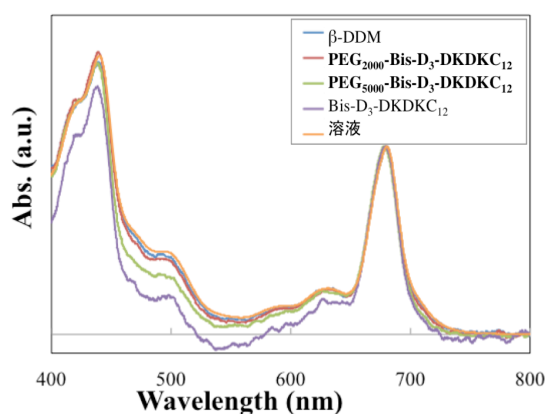


図 6-16 ポリアクリルアミドゲル中に内包した各界面活性剤で可溶化を行った PSI の吸収スペクトルと β -DDM 溶液中で可溶化を行った PSI の吸収スペクトルの比[(blue line) β -DDM, (red line) $\text{PEG}_{2000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$, (green line) $\text{PEG}_{5000}\text{-Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$, (purple line) $\text{Bis-D}_3\text{-DKDKC}_{12}$, (orange line) β -DDM at buffer]

各可溶化試薬を用いて可溶化して作成した PSI ゲルの吸収スペクトル測定の結果を、図 6-16 に示した。なお、「溶液」と表記をしているのは、0.1 wt% の β -DDM に可溶化された PSI サンプルの吸収スペクトルであり、PSI が変性失活をしていない場合のコントロールとなる。いずれの可溶化試薬を用いて作成したゲルサンプルのスペクトルにおいても、コントロールとなる「溶液系」の吸収スペクトルと、クロロフィル色素の吸収極大波長、吸光度比などに一致が見られ、ラジカル重合にて作成するゲル内部に固定化することにより、色素の脱離に伴う顕著な変性失活は見られなかった。

また、作成した PSI 固定化ゲル (24 mm \times 32 mm \times 130 μ m) を、buffer K2 (10 mL) 中に 1 時間、24 時間浸漬させ、その後の吸収スペクトルを浸漬前のものと比較することで、外液に PSI が漏えいしているかどうかの確認を行った。この測定結果を図 6-14 に示した。

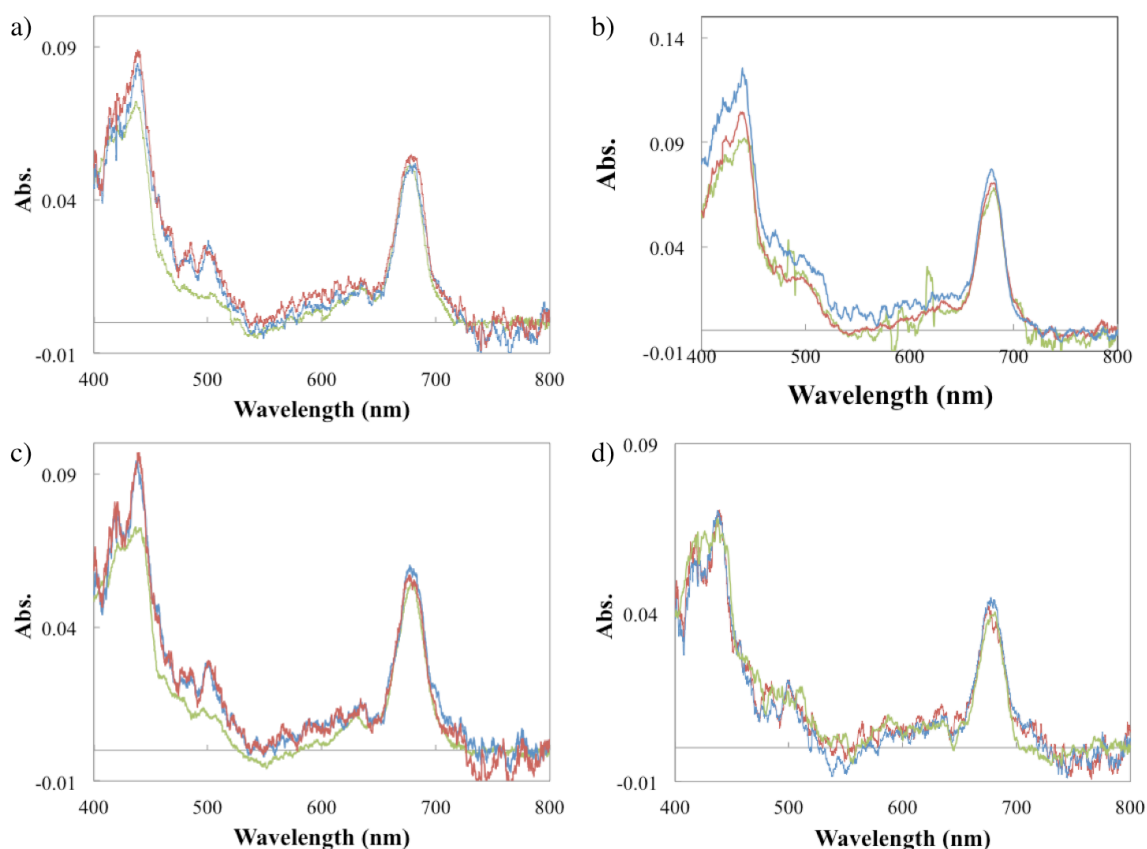


図 6-17 アクリルアミドゲル作成後直後と 1 時間 buffer に浸漬した状態でのゲルの吸収スペクトル (blue line)ゲル作成直後、(red line)buffer 浸漬 1 時間、(green line)buffer 浸漬 24 時間、[(a) PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂, (b) PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂, (c) β -DDM, (d) Bis-D₃-DKDKC₁₂]

1 時間、24 時間と buffer K2 に浸漬することでゲルの膨潤度が変化しノイズが大きくなってしまったが、buffer K2 浸漬前後の吸収スペクトルには、いずれの可溶化試薬を用いたサンプルについても大きな形状変化は見られなかった。これは、buffer K2 への浸漬が、PSI の膜貫通領域に存在するアンテナ Chl a の脱離に伴う変性失活を促していないことを示唆している。また吸光度そのものもほとんど変化が見られなかったことから、ゲル内部からの PSI の漏えいは観察されなかった。これは、アクリルアミドゲルの 3 次元ネットワーク構造が、PSI をゲル内部に留めるために十分機能していることを示唆している。

6-3-3-5 77K における蛍光スペクトル測定を用いた、ゲル内部に固定化した PSI の変性度合いの評価

ゲルに内包された PSI についてさらに詳細な変性度合いを評価するために、77K における蛍光スペクトル測定を行った。2-1-3-2-4 項に記載されている様に

ここで得られる蛍光スペクトルは、PSI 骨格内で形成されるレッドクロロフィル状態に由来するものであり、アンテナ色素として働くクロロフィル a に離脱が見られた場合、native 状態で観測される 720 nm のスペクトルピークの外に、フリーのクロロフィルに由来する蛍光スペクトルピークが 680 nm に観測されることが知られている。ここでは、サンプルホルダー内に作成したゲルを詰めることで評価を行った。

図 6-18 に、各種可溶化試薬を用いて作成した PSI ゲルの測定結果をまとめた。

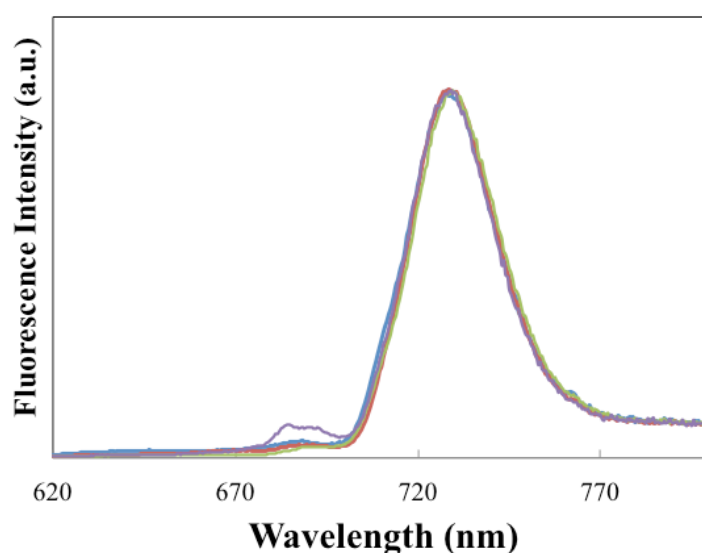


図 6-18 アクリルアミドゲル中へ内包した各 surfactant で可溶化した PSI の 77K における蛍光スペクトル [β -DDM (blue line)、PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂ (red line)、PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂ (green line)、Bis-D₃-DKDKC₁₂ (purple line)]

色素の脱離が起きていると 680 nm 付近にフリーのクロロフィル色素に由来する蛍光スペクトルが観測されるが、 β -DDM で可溶化されているもの、PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂、PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂ によって可溶化された PSI に関しては、色素の脱離に伴う変性が見られなかった。これは、前項の吸収スペクトルの測定結果を反映したものと推測された。一方で PEG 修飾がされていない多量化 PG-surfactant (Bis-D₃-DKDKC₁₂) によって可溶化された PSI に関しては、若干では有るが色素の脱離に伴う変性が見られた。より分子量の小さい可溶化試薬である β -DDM を用いた際には変性が見られなかったことを含めて解釈を行うと、ゲル形成にともなう PSI に対する物理的ストレスを Bis-D₃-DKDKC₁₂ が緩和できなかったことがその原因として考えられた。

6-3-3-6 ゲルへ内包された PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化された PSI の、酸素電極による光誘起電子移動活性の比較

ゲル内部へ固定化された PSI が機能を維持しているか評価を行うため、酸素電極を用いた PSI の光誘起電子移動活性の評価を行った。また、ゲル内部に長時間固定化された場合の長期安定性への効果の評価するため、1 時間、24 時間と Buffer K2 への事前の浸漬時間を変えた PSI ゲルについても、同様に PSI の光誘起電子移動活性の評価を行った。この溶存酸素減少速度から計算した、各サンプルにおける PSI の光誘起電子移動速度を表 6-7 にまとめた。また比較として、溶液状態の PSI についても室温で 24 時間置くことによる変性度合いの確認を行った (表 6-8)。

表 6-7 ポリアクリルアミドゲル中の各可溶化試薬に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度の比較

	電子移動速度 [$\text{PSI}^{-1}\text{s}^{-1}$]		
	浸漬なし	1h	24h
β -DDM	29.8	27.0	13.7
Bis-D₃-DKDKC₁₂	28.6	22.5	14.4
PEG₂₀₀₀- Bis-D₃-DKDKC₁₂	27.5	27.2	19.5
PEG₅₀₀₀- Bis-D₃-DKDKC₁₂	29.0	29.7	23.7

表 6-8 Buffer K2 溶液中の各可溶化試薬に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度の比較

	電子移動速度 [$\text{PSI}^{-1}\text{s}^{-1}$]	
	0h	24h
β -DDM	39.1±1.2	38.7±2.0
Bis-D₃-DKDKC₁₂	37.3±1.3	37.5±1.5
PEG₂₀₀₀- Bis-D₃-DKDKC₁₂	40.5±0.7	39.8±2.6
PEG₅₀₀₀- Bis-D₃-DKDKC₁₂	38.9±2.0	39.2±0.3

まず、溶液状態で 24 時間室温に置いたサンプルについて、光誘起電子移動活性の評価を行ったところ、可溶化後すぐに測定を行ったものと、活性が変わらないことが分かった。

次にポリアクリルアミドゲル中に固定化し、時間をおかずに (Buffer K2 への

事前の浸漬なしに) 光誘起電子移動活性を評価した際にも、いずれの可溶化試薬を用いた場合でもその活性に大きな違いは見られなかった。一方で、1時間 Buffer K2 への事前の浸漬を行った PSI ゲルについては、PEG 修飾をした PG-surfactant である **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** では全く活性低下が見られなかったのに対して、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、 β -DDM を用いた際には、**Bis-D₃-DKDKC₁₂** \gg β -DDM の順に光誘起電子移動速度の活性低下が見られた。**Bis-D₃-DKDKC₁₂** についてより大きく活性が低下した原因として、前項の蛍光スペクトル測定から示唆されていたように、**Bis-D₃-DKDKC₁₂** がゲルマトリックスからの物理的ストレスを緩和できない影響がその原因として考えられた。さらに Buffer K2 への事前の浸漬時間を 24 時間に延ばしたサンプルに関しては、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、 β -DDM を用いたサンプルではいずれも 60% 近くまでの大きな活性低下が見られたのに対して、**PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** を用いた際には 30% 程度、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** を用いた際には、活性低下を 20% 程度に抑制できることがわかった。

PEG 鎖の分子量を 5000 から 2000 への小さくした **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** では、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** に比べてこの緩和効果が低くなったことから、PEG 鎖の分子量による違いが大きく現れた。PSI の周辺に PEG 鎖が被覆されることでポリアクリルアミドゲル中の安定性の向上が発現していると考えているが、この効果が、分子量が大きくなることでより顕著に安定性向上に寄与できたと考えられた。

以上の結果から、PG-surfactant を介して PSI 表面を PEG 鎖により被覆することが、この膜蛋白質のポリアクリルアミドゲルマトリックス中での長期安定性に、大きく寄与していることが示唆された。

6-4 まとめ

本章では第5章にて検討を行った高分子量化 PG-surfactant に PEG 鎖を修飾した PEG 修飾 PG-surfactant (**PEG₂₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**) を新たに設計合成し、膜蛋白質を高分子担体内部に固定化する際に、膜蛋白質の変性失活を緩和できる「高分子の表面修飾試薬」として機能するか評価を行った。

まず PEG 鎖を修飾した PG-surfactant であっても、未修飾の PG-surfactant (**DKDKC₁₂D** など) と同様に中性 pH の緩衝液中で十分な溶解度が維持された。これらの臨界凝集濃度 (cac) を算出したところ、mono 体型のものに PEG を修飾した **PEG₂₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂** では、**DKDKC₁₂D** と比較し 100 倍程度、**PEG₅₀₀₀-mono-D₃-DKDKC₁₂** では 10 倍程度大きくなった。これは、PEG 鎖が追加されたことで、疎水性と親水性のバランスが崩れ、薄い濃度では会合体を作ることができなくなったためと考えられた。Bis 体型では、PEG 鎖を導入したとしても、未修飾の **Bis-D₃-DKDKC₁₂** と同様の cac 値が維持された。これは、コア骨格[-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-]を二量化することで、PEG 鎖導入の影響を緩和できたためと考えられた。また、導入する PEG 鎖の分子量を大きくすることで cac 値は低下することがわかった。このことから、多量化した PG-surfactant を用いることで PEG を修飾しても元々のミセル形成能を維持でき、薄い濃度であってもこのミセル形成能は維持されることも確認された (cac 以上の濃度では約 6~10 nm オーダーの会合体ピークのみが確認された)。

これらのことから、薄い濃度領域でもミセル形成能を示した **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** について、次に膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価を行った。

0,1 wt% の各 PEG 修飾 PG-surfactant を含むバッファー溶液で可溶化された PSI の吸収スペクトルを 0,1 wt% β-DDM を含むバッファー溶液で可溶化された PSI の吸収スペクトルと比較をすることで、アンテナクロロフィル a の脱離に伴う変性が促されていないか検討を行ったところ、いずれの PEG 修飾 PG-surfactant を用いた場合についても、アンテナクロロフィル a の脱離に伴う PSI の変性は促してはいないことが明らかとなった。この結果は、77K におけるレッドクロロフィル由来の蛍光スペクトル測定からも示唆された。ちなみに、PEG 修飾 PG-surfactant と同様にポリオキシエチレングリコール骨格を持つ界面活性剤で

ある TritonX-100 を用いた場合には、アンテナクロロフィルの脱離に伴う PSI の変性に伴う 680 nm 付近の蛍光スペクトルピークが観測された。したがって、同じように PEG 鎖を持つ界面活性剤であっても大きく性質が異なっていることがわかった。次に、酸素電極を用いた PSI の光誘起電子移動活性の評価を、各 PEG 修飾 PG-surfactant により可溶化された PSI サンプルに関して評価を行った。その結果、いずれの PEG 修飾 PG-surfactant で可溶化された PSI に関しても、PSI が native 状態を保っており、光誘起電子移動活性の面からも、PEG 修飾 PG-surfactant は PSI を変性させることなく可溶化出来ていることがわかった。以上のことから、PEG 修飾 PG-surfactant は通常の膜蛋白質可溶化試薬と同様に PSI を変性失活させることなく、PEG 鎖を膜蛋白質表面に集積可能であることがわかった。

そこで次に、PEG 修飾 PG-surfactant を介した膜蛋白質表面への PEG 鎖の集積・被覆が、実際に高分子担体内部に膜蛋白質を固定化した際の膜蛋白質機能の維持に効果があるか、検討を行った。ここでは、このような高分子担体「内部」への膜蛋白質固定化の検討が初めてという状況から、比較的膜蛋白質に対してソフトな固定化担体として、ポリアクリルアミドゲルの利用を検討した。ポリアクリルアミドゲルは一般的に蛋白質の電気泳動分析に用いられており、泳動条件を選択することで、膜蛋白質の超分子複合体構造を壊すことなく泳動できることも知られている (Native-PAGE のように、SDS などの界面活性剤を用いない泳動法による)。PEG 修飾 PG-surfactant により可溶化された PSI をポリアクリルアミドゲルの前駆体溶液に混合し、フリーラジカル重合により各 PSI 固定化ゲルの作製を行った。

まずは、ゲル内部に固定化された PSI の吸収スペクトル、蛍光スペクトルを、PSI が native 状態を保っている場合のコントロールとなる 0.1wt% の β -DDM を含むバッファー溶液で可溶化されたスペクトルと比較をすることで、PSI に対して、どの程度のアンテナクロロフィルの脱離に由来する変性失活が起こっているか検討を行った。その結果、PEG 修飾を行っていない PG-surfactant に関してはアンテナクロロフィルの脱離に伴う変性失活が見られたのに対して、PEG 修飾 PG-surfactant を用いた場合には、この変性失活が一切見られなかった。この結果は、PEG 修飾 PG-surfactant を介して PSI 表面へ PEG 鎖を集積、被覆することが、ポリアクリルアミドゲル内での、ゲルマトリックスを構成する高分子鎖による PSI へのダメージを緩和する効果が機能していることを示唆した。

さらに、酸素電極を用いた光誘起電子移動活性の評価から、PEG 修飾 PG-surfactant を用いることによる、ポリアクリルアミドゲル内部に固定化した際の長期安定性への寄与の評価を行った。ゲルを作成し、時間をおかずに (Buffer K2 への事前の浸漬なしに) 光誘起電子移動活性を評価した際には、いずれの可溶化試薬を用いた際にもその活性に大きな違いは見られなかった一方で、1時間 Buffer K2 への事前の浸漬を行った PSI ゲルについては、PEG 修飾をした PG-surfactant である **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** では全く活性低下が見られなかったのに対して、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、 β -DDM を用いた際には、光誘起電子移動速度の活性低下が見られた。さらに Buffer K2 への事前の浸漬時間を 24 時間に延ばしたサンプルに関しては、**Bis-D₃-DKDKC₁₂**、 β -DDM を用いたサンプルでは、60%近くまで活性の低下が見られたのに対して、**PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** を用いた際には 30 %程度、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** を用いた際には、20%程度に抑制できることがわかった。PEG の分子量を小さくした **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** では、この効果が低くなったことから、PEG 鎖を PSI に表面修飾することが、ポリアクリルアミドゲル中における安定性向上に寄与していることが示唆された。

参考文献

- 1) M. T. Reetz, A. Zonta, J. Simpelkamp, *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 527-534 (1996).
- 2) L. Goton, G. J.-Pettersson, E. Csöregi, K. Johansson, E. Domínguez, G. M.-Varga, *Analyst*, **117**, 1235-1241, (1992).
- 3) L. C. Shriver-Lake, B. Donner, R. Edelstein, K. Breslin, S. K. Bhatia, F. S. Ligler, *Biosens. Bioelectron.*, **12(11)**, 1101-1106 (1997).
- 4) P. N. Ciesielski, A. M. Scott, C. J. Faulkener, B. J. Berron, D. E. Cliffel, G. K. Jennings, *ACS nano*, **2(12)**, 2465-2472 (2008).
- 5) G. Favero, L. Campenella, S. Cavallo, A. D'Annibale, M. Perrella, E. Mattei, T. Ferri, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 8103-8111 (2005).
- 6) R. Kawano, Y. Tsuji, K. Sato, T. Osaki, K. Kamiya, M. Hirono, T. Ide, N. Miki, S. Takeuchi, *Scientific Reports*, **3**, 1995(2013).
- 7) M. Tanaka, E. Sackmann, *Nature*, **437**, 656-663 (2005).
- 8) D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.*, **250**, 203-211 (1997).
- 9) A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Leccomte, M. T. G.-Ortoni, Lojou, E. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 953-956 (2012).
- 10) H. Takeda, M. Ohashi, Y. Goto, T. Ohsuna, T. Tani, S. Inagaki, *Chem.-Eur. J.*, **20(29)**, 9130-9136 (2014).
- 11) T. Noji, C. Kamidaki, K. Kawakami, J. R. Shen, T. Kajino, Y. Fukushima, T. Sekitoh, S. Itoh, *Langmuir*, **27**, 705-713 (2011).
- 12) C.-H. Chen, R.-Z. Hwang, L.-S. Huang, S.-M. Lin, H.-C. Chen, Y.-C. Yang, Y.-T. Lin, S.-A. Yu, Y.-S. Lin, Y.-H. Wang, N.-K. Chou, S.-S. Lu, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **56(2)**, 462-470 (2009).
- 13) K. Takahashi, R. Ozawa, H. Oyama, M. Futagawa, F. Dasai, M. Ishida, K. Sawada, *IEDM, 2012 IEEE International*, 24-6 (2012).
- 14) M. Lumbierers, J. M. Palomo, G. Kragol, S. Roehrs, O. Müller, H. Waldmann, *Chem.-Eur. J.*, **11**, 7405-7415 (2005).
- 15) E. D. Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato, V. Bocchini, *Anal. Biochem.*, **115**, 278-286 (1981).
- 16) J. R. Shen, N. Kamiya, *Biochemistry*, **39**, 14739-14744 (2000).
- 17) P. Fromme, H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1365**, 175-184 (1998).

- 18) K. Takasaka, M. Iwai, Y. Umena, K. Kawakami, Y. Ohmori, M. Ikeuchi, Y. Takah,
Biochim. Biophys. Acta Bioenerg., **1797**, 278-284 (2010).
- 19) 秋本 誠志 低温科学 vol.67 (光合成研究法), 449-452.
- 20) S. Hoshina, R. Sakurai, N. Kunishima, K. Wada, S. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta*,
1015, 61–68 (1990).
- 21) 沈 健仁 低温科学 vol.67(光合成研究法), 551-560.
- 22) K. Yasuhara, T. Kawataki, S. Okuda, S. Oshima, J. Kikuchi, *Chem. Commun.*, **49**,
665–667 (2013).
- 23) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, N. (2001)
Nature, **411**, 909–917 (2001).
- 24) R. Zana, H. Levy, K. J. Kwetkat, *Colloid Interface Sci.*, **197**, 370-376 (1998).
- 25) S. Itoh, I. Masayo, I. Isamu, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1507**, 115-138
(2001).
- 26) J.-R. Shen, *Low Temp. Sci.*, **67**, 551-560 (2009).
- 27) K. Sonoike, H. Hatanaka, S. Katoh, S. Itoh, *Plant Cell Physiol.*, **31**, 865–870
(1990).

第7章 反応性官能基を修飾した PG-surfactant を用いた 新規膜蛋白質ゲル化手法の開発

7-1 緒言

現在膜蛋白質を機能分子として応用する研究が進められている。これは、水溶性蛋白質だけではなく、生体膜で機能を果たしている膜蛋白質なども半人工分子素子構築における機能分子として興味を持たれるようになったためと考えられる。通常生体膜内に収まっている膜蛋白質を機能分子として利用するためには、何か担体材料へとどめることが望ましい¹⁾³⁾。これは操作性の向上と共に、担体への固定化により膜蛋白質の安定性向上、機能性向上も期待されるためである。第6章においては、架橋性高分子からなるハイドロゲル内部へ膜蛋白質を固定化する際の、長期安定性向上に寄与できる、膜蛋白質に対する PEG 鎖表面修飾試薬の開発と機能評価を行った。本章では、化学反応性の官能基を保持した膜蛋白質可溶化試薬を利用した、膜蛋白質を変性させることなくゲル化させる新たな手法を検討した。膜蛋白質可溶化試薬の本来の機能は、疎水性の膜貫通領域表面に結合することで、水に溶けない膜蛋白質を水溶媒中に単分子で分散可溶化することである。しかし見方を変えると、あらゆる膜蛋白質が持つ「疎水性の膜貫通領域に選択的に結合可能な分子」とも考えられる。そこでこの膜蛋白質可溶化試薬に化学反応性の置換基を導入すれば、この置換基を膜貫通領域に膜蛋白質の変性を抑えて自発的に集積可能となり、さらにこれらの官能基を介した化学反応によって、膜蛋白質表面の修飾、集積化などが期待された。そこで、第3章にて開発を行った PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** を利用し検討を行った。

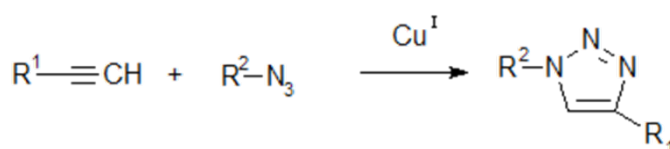


図 7-1 銅(I)触媒下でのアジド-アルキン特異反応(ヒュスゲン環化反応)

また化学反応性の置換基としては、生体直行反応の1つとして知られているアジド-アルキン間の銅触媒下での Huisgen 環化付加反応に注目した(図7-1)⁴⁾⁸⁾。そこで、アルキニル基を PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** に1つ、あるいは2つ導入した誘導体 **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を設計合成した(図7-2、表7-1)。

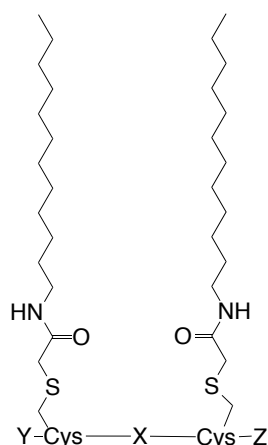


図 7-2 PG-surfactant の構造

表 7-1 評価を行ったペプチドジェミニ界面活性剤 (PG-surfactant) の一覧

	X 部のペプチド配列	Y 部のペプチド配列	Z 部のペプチド配列
DKDKC₁₂K	-Asp-Lys-Asp-Lys-	Lys	-NH ₂
DKDKC₁₂D	-Asp-Lys-Asp-Lys-	Asp	-NH ₂
Alk-DKDKC₁₂K	-Asp-Lys-Asp-Lys-		-NH ₂
Bis-Alk-DKDKC₁₂K	-Asp-Lys-Asp-Lys-		

これらのアルキニル基を含む膜蛋白質可溶化試薬で膜蛋白質を可溶化している状態で、アジド基を両端に持つ PEG 誘導体と Huisgen 環化付加反応により反応させることで、膜蛋白質同士の擬似的な架橋を介して膜蛋白質のゲル化が可能か検討を行った。なおこの方法によっても、膜蛋白質はゲル状の固定化担体の「内部」にそのまま固定化されるため、「担体内部」に固定化することで外部環境変化（溶媒、塩強度、温度の変化、膜蛋白質機能を阻害する酵素や阻害剤の添加）に基づく変性失活の緩和も期待される。

さらにこのゲル化のプロセスを押出形の 3D プリンターと組み合わせることで、膜蛋白質の固定化された立体格子状のゲル構造体の構築も検討した。

7-2 実験項

7-2-1 反応性官能基を修飾した PG-surfactant の合成

2-2-1-1 項と同様に、長鎖アルキルアミド基をあらかじめ Fmoc-Cys-OH 側鎖に導入した Fmoc-Cys(C₁₂)-OH 誘導体を合成し、PG-surfactant をすべて樹脂担体上で合成する方法をとった。5-ヘキシン酸を用いることで、アルキニル基の導入は行った。樹脂から切り出し後は、RP-HPLC により単離精製を行った。化合物の同定は、HRMS により行った。構造については図 7-2、表 7-1 に記載した

Alk-DKDKC₁₂K

(Alk-Lys-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-NH₂)

HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd for C₆₆H₁₁₈N₁₂O₁₅S₂, 1382.83; found, 1382.86.

Bis-Alk-DKDKC₁₂K

(Alk-Lys-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-Lys(Alk)-NH₂)

HRMS (ESI-TOF, [M+H]⁺): calcd for C₇₈H₁₃₈N₁₅O₁₆S₂, 1604.98; found, 1604.99.

7-2-2 蛍光プローブ法による PG-surfactant の cac 値測定⁹⁾

第 3 章 3-2-2 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

7-2-3 DLS 測定による反応性膜蛋白質可溶化試薬の水溶液中での会合挙動の評価

第 3 章 3-2-3 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。

7-2-4 Hüisgen 環化付加反応による反応性膜蛋白質可溶化試薬溶液のゲル化⁴⁾⁻⁸⁾

Hüisgen 環化付加反応は、PG-surfactant のもつアルキニル基と、架橋剤となるアジド基を両端に持つ PEG 鎖の間で反応させた。これにより、高分子ネットワークが形成され、溶液のゲル化は進行していく。反応条件の最適化から、アジド基を両末端に持つ PEG には分子量が 2000 の bis-azide-PEG₂₀₀₀ を使い、アジド基とアルキニル基の比が、1 : 2 になる割合で各試薬は利用した。なお、実験

の都合上、アルキニル基を1つ持つ PG-surfactant **Alk-DKDKC₁₂K** と2つ持つ PG-surfactant **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を混合して用いた (2.5 wt% **Alk-DKDKC₁₂K**、2.5 wt% **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** に 8 wt% bis-azide-PEG、2.5 mM 塩化銅(II)二水和物、25mM アスコルビン酸ナトリウムを以下の組成で混合し利用した。)

表 7-2 Hüisgen 感化反応を用いたゲルの調製に用いた各溶液の組成

	最終濃度
5 wt% Alk-DKDKC₁₂K	2.5 %
5 wt% Bis-Alk-DKDKC₁₂K	2.5 %
bis-azide-PEG ₂₀₀₀	8 %
CuCl ₂	25 mM
アスコルビン酸ナトリウム	125mM
Total volume (bufferK2 にて希釈)	100 μL

7-2-5 シアノバクテリア由来の光合成膜蛋白質、光化学系 I (PSI)

今回の章で用いている PSI は第 3 章 3-2-4 項にて説明を行ったものと同じもので、PSI は好熱性シアノバクテリア *T.vulcanus* のものを用いた¹⁰⁾⁻¹²⁾。

7-2-5-1 本実験で使用した buffer 一覧

第 3 章 3-2-4-3 項に記述してある PSI に用いる buffer (Buffer K2, BufferK4) を用いた。

7-2-5 界面活性剤置換法による反応性膜蛋白質可溶化試薬による膜蛋白質可溶化

第 3 章 3-2-5 項に記述してあると同様の方法にて、評価を行った。

7-2-6 3D プリンターによる立体ゲル格子構造体の作製

3D プリンターを用いることで、プログラム制御により任意の構造体形成が可

能となる。ここでは、繊維状の膜蛋白質ゲルを格子状に積み上げた 3D 格子状ゲル構造体の作製を行った。アルキニル基を 1 つ持つ PG-surfactant **Alk-DKDKC₁₂K** と 2 つ持つ PG-surfactant **Bis-Alk-DKDKC₁₂K**、bis-azide-PEG2000、塩化銅(II)、アスコルビン酸ナトリウムなどを 2 液に分け、この 2 液を、マイクロキャピラリーを介して混合することで、(1) 銅(II)イオンから銅(I)イオンへの還元、(2) Hüisgen 環化反応によるゲル化の進行、が連続的に起こる系を組むことで、3D 格子状ゲル構造体の作製を行った。より強固な 3D 格子状ゲル構造体の作製を行うため、格子状ゲル構造体の印刷途中で 5 wt% グルタルアルデヒドを用い **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** の分子内に存在するアミノ基のどうしの架橋反応による二次架橋を施した。最終的に 6 段まで積み上げた 3D 格子状ゲル構造体の作製を行った。

7-2-7 反応性膜蛋白質可溶化試薬で可溶化された PSI の吸収スペクトル測定による変性度合いの評価

第 3 章 3-2-6 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。Hüisgen 環化付加環化反応によりゲル化を行った PSI サンプルについては、透明ガラス板上にゲルを薄く塗布したものをを用いて、評価を行った。

7-2-8 反応性膜蛋白質可溶化試薬で可溶化された PSI の 77K における蛍光測定による、PSI への構造的影響の評価¹³⁾

第 3 章 3-2-7 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。Hüisgen 環化付加環化反応によりゲル化を行った PSI サンプルについては、測定セル中でゲル化を行ったものをを用いて、評価を行った。

7-2-9 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700* の寿命評価を利用した、反応性膜蛋白質可溶化試薬で可溶化された PSI への構造的影響の評価^{14), 15)}

第 3 章 3-2-8 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。Hüisgen 環化付加環化反応によりゲル化を行った PSI サンプルについては、測定セル中

でゲル化を行ったものを用いて、評価を行った。

7-2-10 酸素電極による反応性膜蛋白質可溶化試薬で可溶化された PSI の光誘起電子移動活性の評価¹⁶⁾

第3章 3-2-9 項に記述してあるのと同様の方法にて、評価を行った。まず Buffer K4 (1 mL) を測定セルに満たし、そこへ電子移動メディエーターである dichloroindophenol (DCIP)、電子受容体である methyl viologen (MV^{2+}) を終濃度 0.5 mM になるようにそれぞれ加え、装置が (溶存酸素濃度の測定値が) 安定するまでしばらく待った。ついで、反応性膜蛋白質可溶化試薬で可溶化された PSI の終濃度が 24 nM となるように PSI 溶液を加え (ゲル化したサンプルについては PSI ゲルを)、最後に還元的犠牲試薬であるアスコルビン酸ナトリウムを終濃度 2 mM となるように加えた。その後、光源を点灯することで、光電子移動活性の測定を溶存酸素濃度の変化を追うことにより開始した。

7-3 結果と考察

7-3-1 反応性官能基としてアルキニル基を修飾した PG-surfactant

第3章において、PG-surfactant の N-末端側へ機能性官能基としてメチルビオロゲン (MV^{2+}) を導入した **MV-DKDKC₁₂K** の設計合成を行った。こちらは **DKDKC₁₂K** の持つ膜蛋白質可溶化試薬としての機能を失うことなく MV^{2+} の導入に成功した例であるが、本章では化学反応性の官能基の導入を試みた。具体的には、生体直交性反応として知られている Huisgen 環化付加反応に利用可能な、アルキニル基を選択した。膜蛋白質可溶化試薬にアルキニル基を導入することで、膜蛋白質の疎水表面に化学反応性のアルキニル基を集積可能となり、それにより膜蛋白質表面近傍での Huisgen 環化反応を介した機能性分子の導入が期待された。膜蛋白質可溶化試薬である **DKDKC₁₂K** をベースとし、これに対して 5-ヘキシシン酸を 1 つあるいは 2 つ導入した **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** の設計合成を行った (図 7-2、表 7-1)。5-ヘキシシン酸を 2 つ導入した **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** については、**DKDKC₁₂K** の C 末端側に Lys を追加し、側鎖にヘキシシン酸を修飾させることにより行った。1 つの分子内に 2 つのアルキニル基を持つことで、**Alk-DKDKC₁₂K** よりも、より効率よく Huisgen 環化反応が進行すると期待した。

7-3-1-1 蛍光プローブ法による cac 値の算出⁹⁾

蛍光プローブとして環境応答性の蛍光色素である ANS を用いて cac 値の算出を行った。図 7-3 に、各 PG-surfactant 対数濃度 対 ANS の 480 nm における相対蛍光強度のプロットを示した。なお縦軸の相対蛍光強度は、界面活性剤が非存在下での蛍光強度を 1 とした。

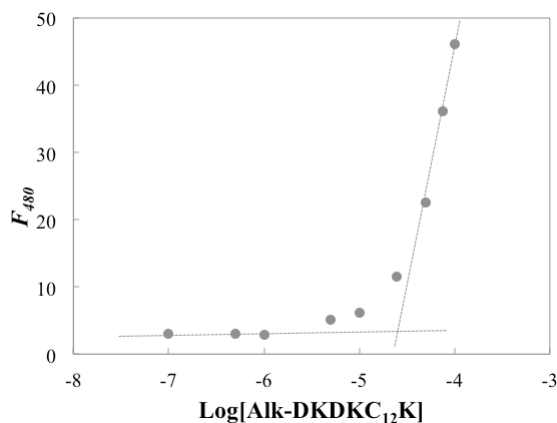


図 7-3 Alk-DKDKC₁₂K の対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度 (480 nm) のプロット

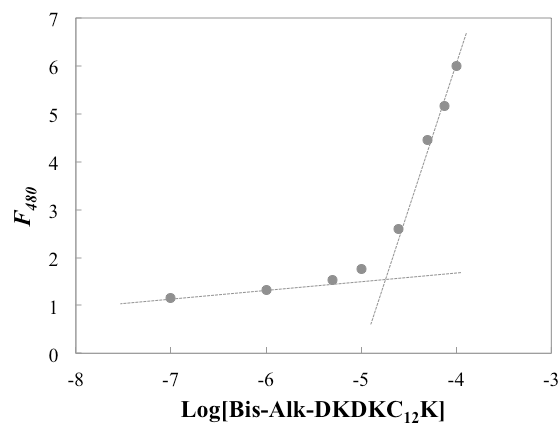


図 7-4 Bis-Alk-DKDKC₁₂K の対数濃度 対 ANS の相対蛍光強度 (480 nm) のプロット

図 7-3、図 7-4 から、Alk-DKDKC₁₂K、Bis-Alk-DKDKC₁₂K とともに、濃度上昇時に、ある濃度から蛍光強度が急激に大きくなる挙動が確認された。この変曲点前後の 2 本の近似直線の交点からそれぞれの各 PG-surfactant の cac 値を算出し、以下の表 7-3 にまとめた。

表 7-3 各 PG-surfactant の cac 値

Surfactant	cac/mM
Alk-DKDKC₁₂K	0.0263
Bis-Alk-DKDKC₁₂K	0.0225
DKDKC₁₂K	0.0083

ここに示すように、測定している物理量に変曲点が 1 つのみ観測されたことから、単分子分散している状態からミセル様会合体へと相転移が起こっていることが示唆された。今回アルキニル基を導入する際の、元の PG-surfactant となる DKDKC₁₂K と比べ、Alk-DKDKC₁₂K、Bis-Alk-DKDKC₁₂K とともに cac 値は 3 倍ほど大きくなった。これは、疎水性の 5-ヘキシシン酸を修飾することで、ジェミニ骨格同士のミセル様会合体への分子の集合が、立体障害や疎水性官能基修飾などにより、若干悪くなったためと思われる。

7-3-1-2 DLS による水溶液中での会合挙動

Alk-DKDKC₁₂K、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** ともに *cac* 以上の濃度においてミセル様の会合体形成が示唆されたが、実際に溶液中での DLS による粒径評価から、実際にミセル様会合体を形成しているかどうかの確認を行った。界面活性剤濃度が 1~0.01%(w/v)の濃度範囲となる、0.1、0.01、0.001 wt%の各濃度の 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7) サンプルを各々調製し、DLS 測定を行った。この測定結果を以下の図 7-5 に示した。

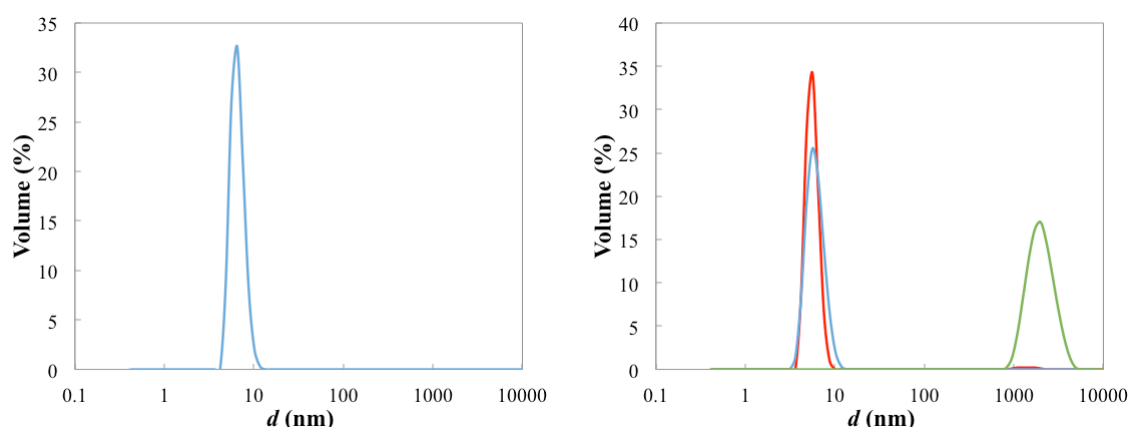


図 7-5 DLS による会合体粒径分布評価 1 wt % (青), 0.1 wt % (赤), 0.01 wt % (緑) in 50 mM phosphate buffer (pH 7) [(左) **Alk-DKDKC₁₂K**、(右) **Bis-Alk-DKDKC₁₂K**]

Alk-DKDKC₁₂K、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** が、共に蛍光プローブ法にて算出された *cac* 値以上の濃度では、約 7-8 nm 程度のサイズの会合体のみを形成していることが確認された。*cac* 値以下の濃度で大きな粒径のものが確認されたが、これは濃度が低くなることで、相対的にゴミ由来のピークを観察したためと思われるため、今回の議論とは関係ない。以上のことから、**DKDKC₁₂K** はアルキニル基を 1 つあるいは 2 つ導入した誘導体 **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** としても、元々 **DKDKC₁₂K** が保持している選択的なミセル形成能を維持していることが明らかとなった。

7-3-2 **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を用いた PSI の可溶化

Alk-DKDKC₁₂K、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を用いた PSI の可溶化を行う際においても、界面活性剤置換の手法を用いた。PEG1450 を用い一旦沈殿化された PSI に

対して、1 wt%の **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を含むバッファー溶液を添加し可溶化することで、**Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** に可溶化された PSI サンプルの調製は行った。このサンプルに関して、種々の分光学的測定、光誘起電子移動活性などを評価することで、これらのアルキニル基修飾 PG-surfactant が PSI に変性失活を促しているかの確認を行った。

7-3-2-1 吸収スペクトルを用いた、**Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** で可溶化することによる PSI への構造的影響の評価¹⁷⁾

PSI はクロロフィル a やカロテノイドなどの多くの色素成分を含むことから、吸収スペクトルが native 状態のものと一致していることは、蛋白質が適切な立体構造を維持していることの大きな証明の一つとなる。そこで、300-800 nm の範囲の吸収スペクトル測定を行い、0.1 % β -DDM を含むバッファー溶液中における PSI の吸収スペクトルとの比較を行った (図 7-6)。これは、PSI は 0.1% β -DDM を含むバッファー溶液中において native 状態を保っていることが知られているためである。

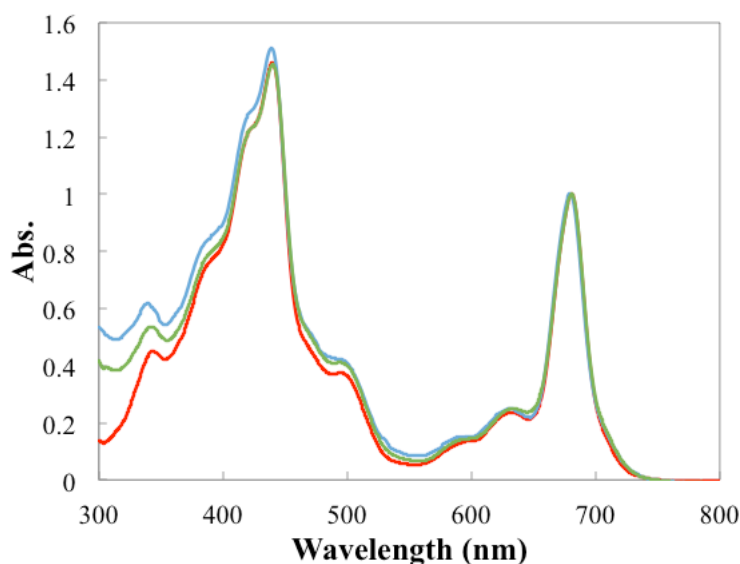


図 7-6 β -DDM(青)、Alk-DKDKC₁₂K(赤)、Bis-Alk-DKDKC₁₂K(緑)で可溶化を行った PSI の吸収スペクトル

PSI からクロロフィル色素の脱離がみられる場合、680 nm のアンテナクロロフィル a 由来の吸収バンドがブルーシフトしたり、吸光度の低下が見られたり

するが、0.1 wt%の濃度の **Alk-DKDKC₁₂K**、 **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を用いて可溶化された PSI は、ともに、0.1 % β -DDM を含むバッファー溶液中のスペクトルとの一致が見られ、色素の脱離なく可溶化できていると考えられた。短波長側に向けてベースラインの若干の上昇が見られたが、これは **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** に由来する吸収体によるものと思われる。

7-3-2-2 77K における蛍光スペクトルによる **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** で可溶化された PSI の変性度合いの評価

さらに詳細な変性度合いを評価するために、77 K における PSI の蛍光スペクトル測定を行った。ここで得られる蛍光スペクトルは、PSI 骨格内で形成されるレドクロロフィル状態に由来するものであり、アンテナ色素として働くクロロフィル a に離脱が見られた場合、native 状態で観測される 720 nm のスペクトルピークの他に、フリーのクロロフィルに由来する 680nm に蛍光スペクトルピークが観測されることが知られている。

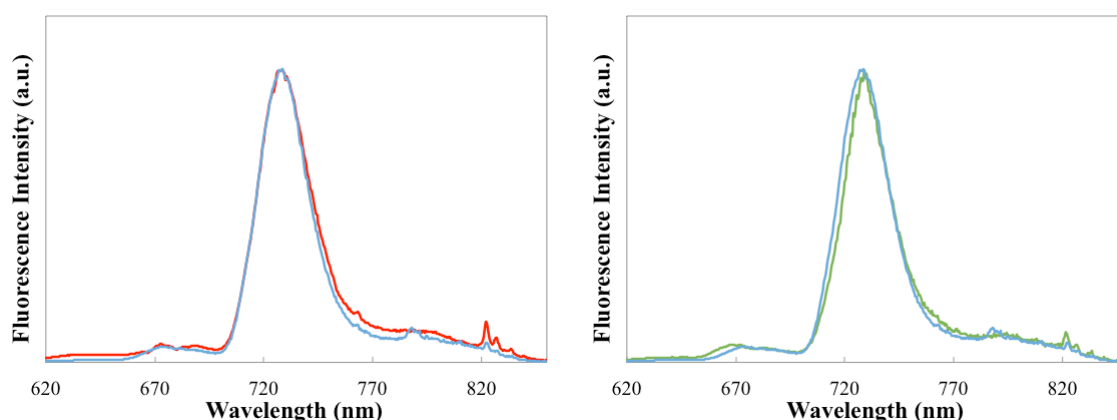


図 7-7 (左) **Alk-DKDKC₁₂K** (赤)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSI の 77K における蛍光スペクトル (右) **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** (赤)と β -DDM(青)で可溶化を行った PSI の 77K における蛍光スペクトル

図 7-7 にそれぞれの測定結果をまとめた。0.1 wt%の **Alk-DKDKC₁₂K**、あるいは **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を含むバッファー溶液に可溶化されたいずれの PSI サンプルについても、0.1 wt% β -DDM にて可溶化された PSI サンプルの蛍光スペクトルと一致し、720 nm にのみ蛍光スペクトルピークが観測された。これは、前項の吸収スペクトル測定からも示唆されていたように、どちらの界面活性剤

を用いた場合においても、膜貫通領域のクロロフィル色素の脱離に伴う PSI の変性は見られないことが分かった。

7-3-2-3 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700⁺ の寿命評価を利用した、PG-surfactant で可溶化された PSI への構造的影響の評価^{14), 15)}

さらに PSI の膜外ドメインへの影響を詳細に評価するために、PSI のスペシャルペア P700 の光励起後の、過渡吸収スペクトル測定を行った。P700 は光励起後電荷分離を起こし P700⁺ が生成するが、逆電子移動により元の P700 へ戻る速度（この逆数が、P700⁺ の寿命）を解析することで、膜外ドメインの変性割合の評価が可能となる。

表 7-4 各界面活性剤で可溶化された PSI の P700⁺ の寿命

	Lifetime of P700 ⁺ (ms)
	(それぞれの寿命成分の比率)
β -DDM	1 (0)、30 (0.45)、447 (0.55)
Alk-DKDKC₁₂K	1 (0)、30 (0.17)、306 (0.83)
Bis-Alk-DKDKC₁₂K	1 (0)、30 (0.47)、846 (0.53)

もし仮に、膜外ドメインに存在する PsaC の離脱に伴う変性が見られる場合は 1 ms の寿命成分が見られるようになり、一方で変性が見られない場合には 30 ms の寿命成分のみが観測される。また溶液中に添加している、電子移動メディエーター (DCIP や PMF) を経由したアスコルビン酸ナトリウムによる直接還元が 100~1000 ms の成分として見られるが、今回の測定では、これら成分は無視しても問題とならない。3成分の寿命を仮定した非線形カーブフィッティングにより、得られた結果について、表 7-4 にまとめた。その結果、**Alk-DKDKC₁₂K** か **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を 0.1 wt% の濃度で含むバッファーに PSI を溶かした場合は、PSI の膜外ドメインの変性に対応する 1 ms の寿命成分が見られなかった。これは、0.1 wt% β -DDM で可溶化している状況と同様に、膜外ドメインに変性をきたしていないことを意味した。以上のことから、アルキニル基を 1 つ、あるいは 2 つ修飾した PG-surfactant **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** は、PSI の膜内ドメインの立体構造、さらに膜外ドメインの立体構造ともに、変性を促さないことが確認された。

7-3-2-4 酸素電極による PG-surfactant で可溶化された PSI, PSII の光誘起電子移動活性評価

続いて、酸素電極を用いた光誘起電子移動活性に関して評価を行った。光照射下での溶存酸素濃度の減少速度から、**Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** に可溶化された PSI 1 ユニットあたりの光誘起電子移動速度を見積もった結果を表 7-5 にまとめた。

表 7-5 各可溶化試薬で可溶化を行った PSI の光誘起電子移動速度

Solubilization surfactant	Electron transfer rate in PSI (PSI ⁻¹ s ⁻¹)
β-DDM	40.5±0.3
Alk-DKDKC₁₂K	41.1±0.1
Bis-Alk-DKDKC₁₂K	39.7±0.3

PSI が native 状態のコントロールとなる、1 wt% β-DDM を含むバッファー溶液で可溶化された PSI の電子伝達速度は 40.5±0.3 PSI⁻¹s⁻¹ であり、これに対して 1 wt% **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を含むバッファー溶液に可溶化された PSI の光誘起電子移動速度は、それぞれ 41.1±0.1 PSI⁻¹s⁻¹、39.7±0.3 PSI⁻¹s⁻¹であった。このことから、いずれの界面活性剤を用いた場合においても、PSI の光誘起電子移動活性の維持が確認され、機能の面からも今回のアルキニル基を持つ界面活性剤は、PSI に変性失活を全く促していないことが証明された。

7-3-3 Azide-PEG との Huisgen 環化付加反応による PSI のゲル化

今回設計を行ったアルキニル基を修飾した PG-surfactant は、アジド基を持つ分子と Huisgen 環化付加反応をすることが可能である。ここでは Huisgen 環化付加反応を介した、ゲル化を目指す。そのため両末端にアジド基を持つ PEG 誘導体となる Polyoxyethylene bis(azide) (Bis-Azide-PEG) を用い、膜蛋白質を可溶化している PG-surfactant 同士を、PEG 鎖を介して架橋することで、PSI のゲル化を試みた。

7-3-3-1 Huisgen 環化付加反応⁴⁾⁻⁸⁾

はじめに、可溶化試薬に修飾したアルキニル基に対して Huisgen 環化付加反応が進行するか評価を行った。こちらは、**Alk-DKDKC₁₂K** と **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を共に 2.5 wt% ずつ含むバッファー溶液に対して、触媒となる塩化銅(II)二水合物 (12.5 mM)、銅を還元するためのアスコルビン酸ナトリウム (125 mM)、両末端にアジド基を持つ PEG 誘導体 Bis-Azide-PEG₂₀₀₀ (36.2 mM) を加え、軽く攪拌した後氷上に 10 分静置することで行った。反応後遠心分離によりゲル状反応物の存在を確認した。



図 7-8 **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** と Bis-Azide-PEG₂₀₀₀ の Huisgen 環化付加反応による溶液のゲル化挙動

7-3-3-2 IR 測定を用いた、ゲル作製に対する各試薬濃度の最適化

Huisgen 環化付加反応により系内のアジド基が消費されると、アジド基由来の約 2100 cm^{-1} の IR ピークが減少する。そこで定量用の基準ピークとして、一定量のポリアクリロニトリル (2250 cm^{-1} に IR ピークを持つ) を作製後のゲルに混合し、このピークを基準にしてゲル内に存在するアジド基の反応割合の定量化を

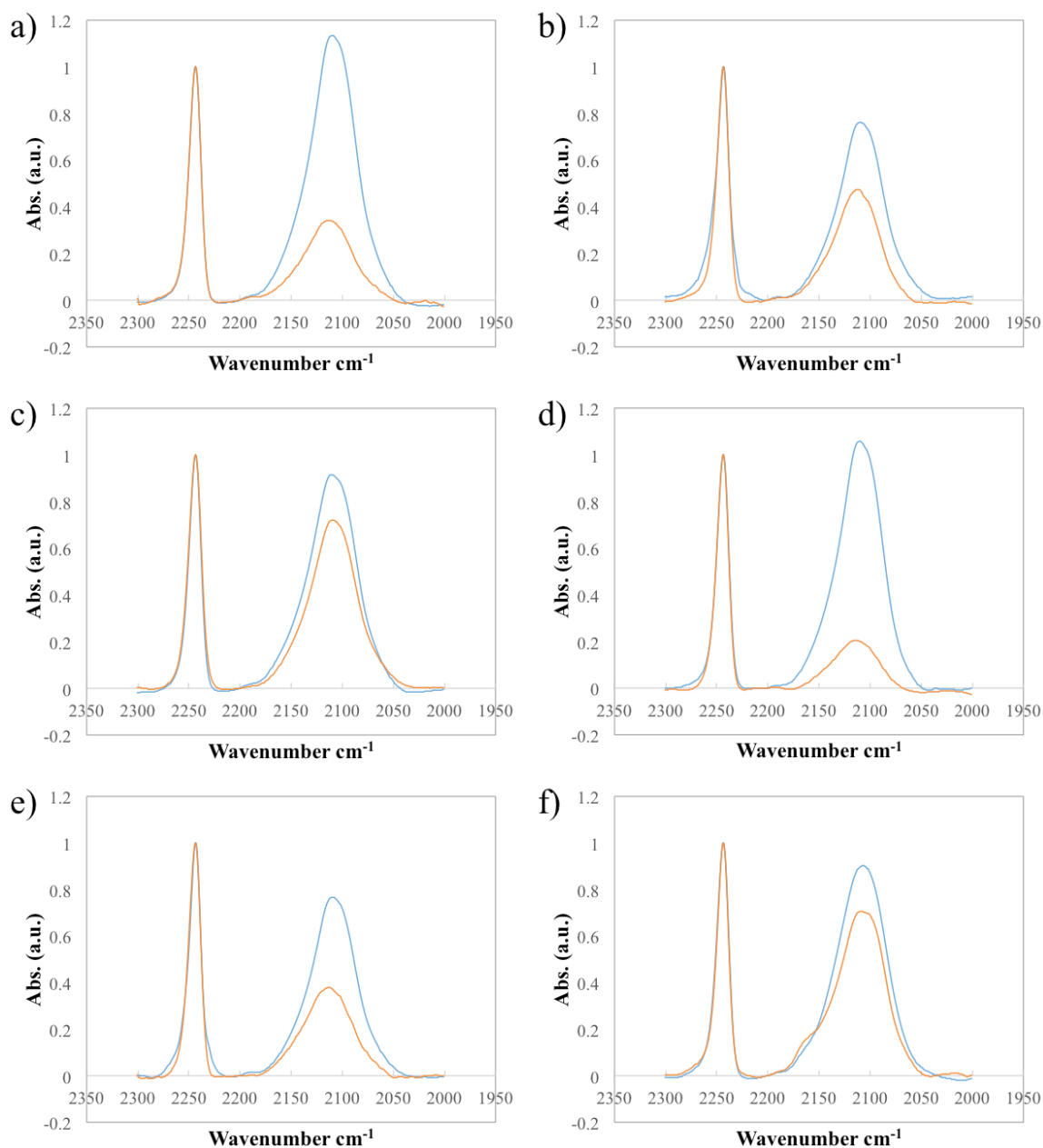


図 7-9 アジド基の濃度を振った際における反応前後の IR スペクトル変化 (青)反応前 (橙) 反応後[(a) 1 等量 bis-azide-PEG₂₀₀₀ (b) 2 等量 bis-azide-PEG₂₀₀₀ (c) 3 等量 bis-azide-PEG₂₀₀₀ (d) 1 等量 bis-azide-PEG₅₀₀₀ (e) 2 等量 bis-azide-PEG₅₀₀₀ (f) 3 等量 bis-azide-PEG₅₀₀₀]

行った。IR 測定用のサンプルは、各条件でゲルを作成後凍結乾燥により溶媒を除去して一定量のポリアクリロニトリルを加え、これを KBr 法によりペレットとして行った。反応条件の最適化のため、アルキニル基に対してアジド基を 1 等量、2 等量、3 等量と変化させ（表 7-6）、各条件時の反応割合を算出した。両端にアジド基を持つ PEG の誘導体には bis-azide-PEG₂₀₀₀ の他に、より分子量の大きな bis-azide-PEG₅₀₀₀ も用いて評価を行った。

図 7-9 に、それぞれの条件下で反応したサンプルに関する IR スペクトル測定結果を纏めた。まずいずれのサンプルに関しても、Huisgen 環化付加反応の反応後にアジド基由来のピーク強度の減少が確認され、たしかに Huisgen 環化付加反応が進行していることがわかった。また、この測定結果を元に算出された、アジド基の残存率から見積もられた、アルキニル基の実際の反応率を表 7-7 にまとめた。

表 7-6 ゲル作成時に使用した各試薬の量のまとめ

	1 等量	2 等量	3 等量
Alk-PG-surfactant	2.5 wt% (18.1 mM)	2.5 wt% (18.1 mM)	2.5 wt% (18.1 mM)
Bis-azide-PEG ₂₀₀₀	4 wt% (18.1 mM)	8 wt% (36.2 mM)	12 wt% (54.3 mM)
Bis-azide-PEG ₅₀₀₀	10 wt% (18.1 mM)	20 wt% (36.2 mM)	30 wt% (54.3 mM)
ポリアクリロニトリル	0.24 M	0.37 M	0.45 M

表 7-7 アルキニル基に対してアジドの反応効率

アジド基:アルキニル基	1:1	2:1	3:1
Bis-azide-PEG ₂₀₀₀	69 %	83 %	63 %
Bis-azide-PEG ₅₀₀₀	82 %	98 %	62 %

表 7-7 の結果から、分子量の大きな Bis-azide-PEG₅₀₀₀ を用いた方が、全体的に反応効率が高いことがわかった。これは、両端のアジド基がより離れていることで、アジド基どうしの自由度が大きくなり反応効率が上昇したためだと考えられる。しかし、分子量の大きな Bis-azide-PEG₅₀₀₀ を用いた場合には溶液の粘度が高くなりすぎてしまい、その後の 3D プリンターでの操作を行うにあたり不具合が出てきてしまうことが懸念された。このことから、今後の Huisgen 環化付加反応に関しては、ほどほどの粘度を維持することができる分子量 2000 の Bis-azide-PEG₂₀₀₀ を用い、この条件下で最も反応率の高い、アジド基をアルキニ

ル基に対して 2 等量となる量を添加し、ゲル作製を行うこととした。

7-3-3-3 Hüisgen 環化付加反応の PSI への影響

アルキニル基を修飾した PG-surfactant **Alk-DKDKC₁₂K** と **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** が、膜蛋白質である PSI を変性させることなく可溶化できることが、前項までの検討で明らかとなっている。このことは、PSI を変性させることなく、膜蛋白質の膜貫通領域表面に多量のアルキニル基を集積できたことも意味する。そこで、続いて Hüisgen 環化付加反応によって、**Bis-azide-PEG₂₀₀₀** を膜蛋白質表面のアルキニル基と反応させた時に、PSI に変性をきたさないか確認を行った。実験項に記述したように、可溶化を行った PSI 溶液 (2.5 wt% **Alk-DKDKC₁₂K** と 2.5 wt% **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を共に含む緩衝液で可溶化した) に **Bis-azide-PEG₂₀₀₀** 溶液を添加し、その後塩化銅(II)二水和物、アスコルビン酸ナトリウムを加えることで PSI のゲル化を行った (下表参照)。こちらでも遠心分離をかけることでゲルの回収を行った。

表 7-8 Hüisgen 感化反応を用いたゲルの調製に用いた各溶液の組成

	最終濃度
5 wt% Alk-DKDKC₁₂K	2.5 %
5 wt% Bis-Alk-DKDKC₁₂K	2.5 %
Bis-azide-PEG₂₀₀₀	8 %
CuCl ₂	25 mM
アスコルビン酸ナトリウム	125mM
Total volume (Buffer K2 にて希釈)	100 μ L

ゲル化された PSI を種々の分光学的手法により測定するため、透明なガラス板 (EAGLE XG、米国コーニング社製) にゲルを塗布し、そのサンプルを用いて検討をおこなった。



図 7-9 Alk-DKDKC₁₂K、Bis-Alk-DKDKC₁₂K により可溶化された PSI と Bis-Azide-PEG₂₀₀₀ の Hüisgen 環化付加反応による溶液のゲル化挙動 (左)、得られたゲルをガラス板に塗布したもの (右)

7-3-3-3-1 吸収スペクトル測定を用いた、ゲル中での PSI の変性割合の評価

ガラス板に塗布した PSI ゲルのサンプルについて、ゲル化により PSI が変性を起こしていないか、反応前後の吸収スペクトル測定を行い、この比較を行った。これらの吸収スペクトル測定結果を以下の図 7-10 に示した。

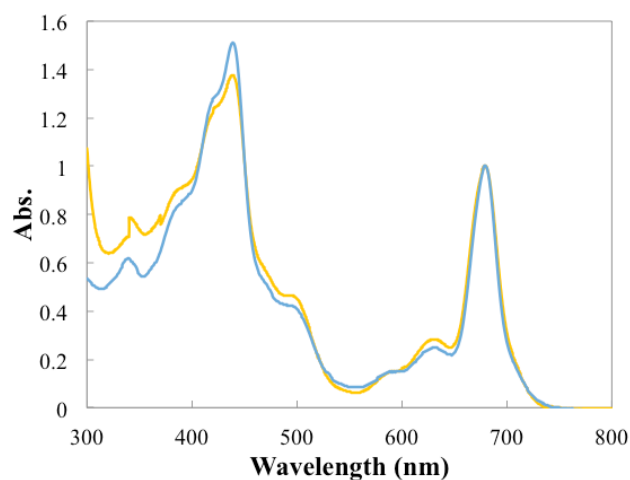


図 7-10 Hüisgen 環化付加反応前後での吸収スペクトルの変化(青:Hüisgen 環化付加反応前, 黄:Hüisgen 環化付加反応後)

膜蛋白質からアンテナクロロフィル色素の脱離がみられる場合 680nm のアンテナクロロフィル a 由来の吸収バンドがブルーシフトしたり、吸光度が低下したりすることが知られている。しかし、両スペクトルを比較した際に各ピーク波長の一致と共に、吸光度の維持が見られたことから、Hüisgen 環化付加反応後に PSI が変性しているということは考えられない。ゲル中へ内包させたことによる光散乱により短波長側のベースライン上昇が若干見られたが、クロロフィ

ル色素の脱離にともなう変性なく Hüisgen 環化付加反応が進行したと考えられる。

7-3-3-3-2 77 K における蛍光スペクトル測定を用いた PSI の変性度合いの評価¹³⁾

前項と関連するが、アンテナクロロフィル色素の脱離に伴う変性が見られるか検討を行うために、Hüisgen 環化付加反応前後の 77 K における蛍光スペクトル測定を行い、この比較を行った。アンテナクロロフィル色素が蛋白質変性に伴い脱離し、フリーのクロロフィル a が存在する場合には、680 nm に新たなピークが確認され、変性が見られない場合には、アンテナクロロフィル色素のレッドクロロフィル状態に対応する 720 nm の蛍光スペクトルピークのみが観測されると知られている。

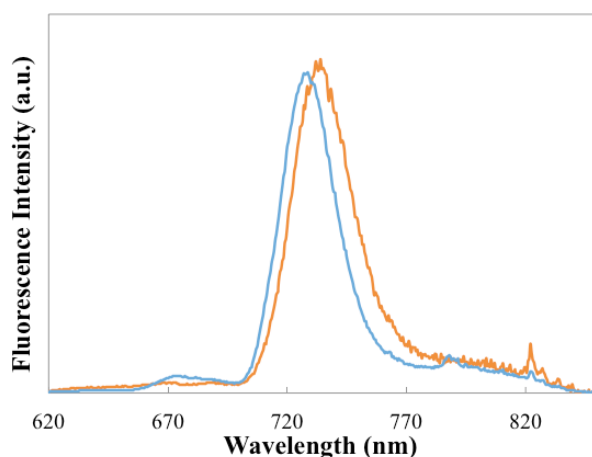


図 7-11 Hüisgen 環化付加反応前後での 77K における蛍光スペクトルの変化(青:Hüisgen 感化付加反応前, 黄:Hüisgen 感化付加反応後)

測定結果を、図 7-1 1 に示した。Hüisgen 環化付加反応後にゲル内部に PSI が取り込まれたサンプルに関しても 680 nm に蛍光スペクトルピークが確認されなかったことから、Hüisgen 環化付加反応によりアンテナクロロフィル色素の脱離に伴う変性は起こらなかったと言える。しかし、720 nm に観測されるピークの、数 nm 程度の長波長側へのシフトが確認された。これは PSI をゲルに固定化したことによるものと考えられる。ポリマーフィルムなどの中に内包することで、蛍光タンパク質などにおいて、若干蛍光最大波長位置が変化することが知られている¹⁸⁾。これは蛋白質骨格に対してゲルなどの媒体からの力学的ストレスがかかることで、微妙に構造摂動を受けることによると考えられる。今回の

系でも、ゲル中に内包したことにより若干の物理的ストレスが加わることで、蛍光の最大蛍光波長のシフトが確認されたが、フリーのクロロフィルに由来するピークは確認されなかった。したがって、ゲル内部の PSI に変性はきたされてはいないと考えられる。

7-3-3-3 過渡吸収スペクトル測定による PSI の P700⁺の寿命評価を利用した、PSI への Huisgen 環化反応の構造的影響の評価^{14),15)}

Huisgen 環化反応を介してゲル化した PSI について、膜外ドメインの脱離に伴う変性が起こっていないか確認をするため、過渡吸収スペクトル測定による P700⁺の寿命評価を行った。3-3-2-6 項に記載したように、PSI の膜外ドメインの 1 つである PsaC に脱離がある場合の P700⁺の寿命 (1 ms) とない場合の寿命 (30 ms) の割合を観測データから見積もることで、PSI の膜外ドメインに関する変性割合の評価が可能となる。

表 7-9 Huisgen 環化反応を介したゲルに内包された PSI の P700⁺の寿命

	Lifetime of P700 ⁺ (ms) (各寿命成分の割合)
PSI ゲル	1 (0), 30 (0.17), 306 (0.18), 4235 (0.66)

30 ms より寿命の長い成分は、溶液中に存在するアスコルビン酸から電子移動メディエーターを介して直接 P700⁺が還元された際の寿命に対応するので、今回の評価とは直接関係がない。しかし今回特に、明らかに長い寿命成分 (4235 s) として観測されたことは、電子移動メディエーターが溶液の時と比較しゲル内部では拡散しにくい影響を反映したものと考えられた。

一方で、ゲル中に内包していても膜外ドメインの脱離に伴う変性を示唆する 1ms の寿命成分が全く観測されなかったことから、Huisgen 環化反応を介してゲル化された PSI については、膜外ドメインである PsaC の脱離に伴う変性も起こっていないことがわかった。

7-3-4 3D プリンターを用いた立体的なゲルの作成

Huisgen 環化付加反応は、高収率かつ高い官能基選択性で進行する⁴⁾。また蛋白質表面に存在する、いかなるアミノ酸側鎖との反応も起こらない。適切な銅(I)触媒の添加によって、末端アルキンの場合には内部アルキンと比較し 100 万倍近く反応が加速されることも知られている^{19), 20)}。したがって適切な反応条件を選択することで、アルキン化合物の溶液とアジド化合物の溶液を混合するだけで、素早く架橋反応が起こせると期待される。前項までの検討から、**Alk-DKDKC₁₂K** や **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** といったアルキン化合物の溶液と bis-azide-PEG₂₀₀₀ からなるアジド化合物の溶液を混合することで、ゲル化が起こることが分かってきた。さらに数 μL ずつと少量の体積同士で混合することで、非常に素早く Huisgen 環化付加反応を介したゲル化が起きることも分かってきた。そこで、この反応を押出形の 3D プリンターに適応し、それぞれの溶液を混合直後に 3D プリンターのノズルから射出できる系を構築することで、様々な立体構造を持った PSI ゲルの作製が可能と期待された。

ゲル担体内部に PSI のような膜蛋白質を固定化する場合、担体内部に固定化することで、膜蛋白質機能を外的環境の変化から保護できることが期待できる。しかし一方で、膜蛋白質の機能を発揮させるために必要な、有機分子、蛋白質、リガンドペプチドなどのゲル媒体中での拡散速度の低下が問題点となり、膜蛋白質機能の発現阻害が危惧される。この問題を回避する方法として、膜蛋白質を含むゲルをナノ或いはマイクロサイズの繊維状に成形し、浸漬されたバッファー溶液との接触面積を大きくする方法が考えられる。そこで本項では、3D プリンターを用いて射出成形を行うことで、数 μm のファイバーを積層したファイバー積層立体構造を構築することを目指した。これにより、試薬の PSI ゲル中での拡散速度を稼ぐことで、膜蛋白質機能の効率良い発揮を期待した。

7-3-4-1 3D プリンターを用いた立体的なゲルの作成条件の最適化

溶液を 2 通り用意し、これらを、マイクロキャピラリーを介して混合することで瞬時にゲル化が進行する系の設計を行った。溶液①として [2.5 wt% **Alk-DKDKC₁₂K**、2.5wt% **Bis-Alk-DKDKC₁₂K**、8 wt% bis-azide-PEG₂₀₀₀ (アルキニル基に対してアジド基が 2 等量)、125 mM アスコルビン酸ナトリウムを混合し

た溶液]、溶液②として[2.5 wt% **Alk-DKDKC₁₂K**, 2.5wt% **Bis-Alk-DKDKC₁₂K**, 8 wt% bis-azide-PEG₂₀₀₀, 25 mM 塩化銅(II)水和物を混合した溶液]をそれぞれ 100 μ L ずつ準備した。これらをキャピラリーのコネクターを介して混合することで、アスコルビン酸ナトリウムにより Cu(II)が Cu(I)へ還元され触媒として働くようになり、Huisgen 環化付加反応が進行する。さらにこれら 2 つを、シリンジポンプで押し出すことで、ゲルが瞬時に固まりながら、任意のパターン構築が可能と期待された。

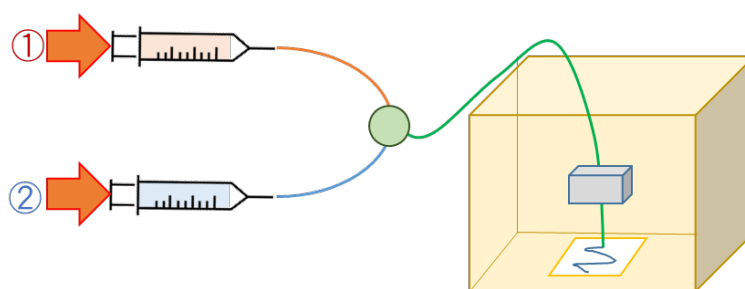


図 7-12 3D プリンターをマイクロキャピラリー流路を組み合わせた装置の概略図

7-3-4-2 3D プリンターを用いた立体格子ゲルの作成

前述した系を用いて、3D プリンターを用いた立体格子ゲルの構築を行った。具体的には、連続的な矩形のパターンにゲルを押し出し、それを積層していくことで格子状の立体格子を積み上げていった。しかし、残念ながら形成されるゲルの硬度が足りないために、1 段目のパターンはうまく構築することが可能であるが、2 段目以降のパターンを積み上げていく際に、ゲルの強度が足りないために 1 段目と熔融してしまい、それ以降の積み上げが不可能であった。そこで 1 段目ごとのパターンを構築するたびに二次架橋を行い、ゲルの強度をます方法をとった。これにより、2 段目以降の積層が可能となった。1 段目を構築したのちにグルタルアルデヒド溶液 (0.56 M, 1 回につき 1 mL) にゲルを室温で 10 分つけ、その後グルタルアルデヒド溶液を取り除いた後で再び、2 段目を積み上げた。グルタルアルデヒドは、**Alk-DKDKC₁₂K**, **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** に含まれる Lys 側鎖のアミノ基同士を架橋させることが期待され²¹⁾、この 2 次架橋により強固なゲルになることで、2 段目以降の積層が可能となった。ここでは、計 6 段目までの積層体の構築を行った。

また、PSI を固定化したゲルについても、同様の方法をとることで、立体格子ゲルとして構築することに成功した。

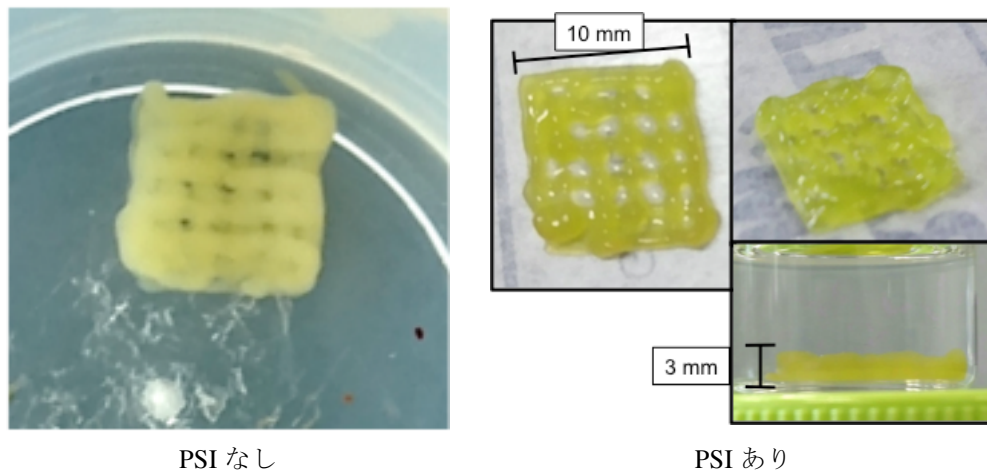


図 7-13 作成した立体格子ゲル（左：PSI なし、右：PSI あり）

7-3-4-3 立体格子ゲル中に内包された PSI の光誘起電子移動活性の評価

立体格子ゲルにしたことにより、分光学的手法での変性評価は光散乱が大きくなりすぎてしまうために難しい。そこで PSI の活性である光誘起電子移動活性を酸素電極により評価することで、ゲル内部に固定化された PSI の変性度合いの評価を行った。3-3-2-7 項で記載したように、P700 の光励起に伴う溶存酸素濃度の減少速度を酸素電極により追跡することで、PSI 内部での電子移動速度を擬似的に見積もることが可能である。今回 7-3-4-2 項にて作成を行った PSI 内包立体格子を酸素電極のセル中にいれ、溶存酸素の減少速度から光有機電子移動活性の評価を行った。この酸素減少速度を表 7-6 にまとめた。

表 7-6 可溶化溶液と立体格子ゲル中での酸素減少速度

	酸素減少速度 ($\mu\text{M}\cdot\text{O}_2 / \text{mgChl}\cdot\text{h}$)
1 wt% β -DDM 溶液中の PSI	263.1
立体格子ゲル中の PSI	231.1

1 wt% β -DDM 溶液中の PSI と比較して、格子ゲル内での酸素減少速度は 87.8 % と見積もられた。これまでの種々の分光学的な評価から、Huisgen 環化付加反応

を介して作製された PSI ゲル中の PSI には、膜内ドメイン、膜外ドメインともに変性は起こっていない。したがってここで観測された酸素減少速度の低下は、ゲル内部での物質拡散速度の低下によるものと考えられた。現状は、ゲル化条件の最適化がまだ不十分であるがゆえに、3D プリントのベストスペックとなる数 10 μm 径のゲルファイバーからなる積層構造の構築には成功していない。しかし、**Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** と **Bis-Azide-PEG2000** により形成されるゲルの架橋密度がそれほど高くないせいか、比較的高い溶存酸素減少速度が維持された。しかし、今後より細かいゲルファイバーを積層した立体格子ゲルの作製が可能となれば、ゲル内部に固定化しているのにも関わらず溶液中と大きく機能が低下しない、膜蛋白質のゲル構造体内部への新規の固定化法としての確立も期待される。

7-4 まとめ

本章では、膜蛋白質を用いた半人工分子素子開発につながる新たな膜蛋白質固定手法の確立を目指し、化学反応性を備えた膜蛋白質可溶化試薬の開発と利用法を考案した。膜蛋白質可溶化試薬の本来の機能は、疎水性の膜貫通領域表面に結合することで、水に溶けるない膜蛋白質を水溶媒中に単分子で分散可溶化することである。しかし見方を変えると、あらゆる膜蛋白質が持つ「疎水性の膜貫通領域に選択的に結合可能な分子」とも考えられる。そこでこの膜蛋白質可溶化試薬に化学反応性の置換基を導入すれば、この置換基を膜貫通領域に膜蛋白質の変性を抑えて自発的に集積可能となり、さらにこれらの官能基を介した化学反応によって、膜蛋白質表面への修飾、あるいは膜蛋白質同士の集積化などが期待された。ここで用いるベースの膜蛋白質可溶化試薬としては、第3章にて開発を行った PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** を利用した。第3章においても少し検討したが、一般に利用されている一本鎖型の膜蛋白質可溶化試薬と異なり、分子量がある程度大きいこと ($M_w \sim 1000$)、様々な官能基を導入したとしても、元々の膜蛋白質可溶化能力の維持が期待された。また、化学反応性の置換基としては、生体直行反応の1つとして知られているアジド-アルキン間の銅触媒下での Huisgen 環化付加反応に注目した。そこで、アルキニル基を PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** に1つ、あるいは2つ導入した誘導体 **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を設計合成し機能評価を行った。これらのアルキニル基を含む膜蛋白質可溶化試薬で膜蛋白質を可溶化している状態で、アジド基を両端に持つ PEG 誘導体と Huisgen 環化付加反応により反応させることで、膜蛋白質同士の擬似的な架橋を介した膜蛋白質のゲル化が可能か、検討を行った。さらにこのゲル化のプロセスを押し出し形の3Dプリンターと組み合わせることで、膜蛋白質の固定化された立体格子ゲルの構築も検討した。

DKDKC₁₂K のN末端にアルキニル基を導入した新規の化学反応性の膜蛋白質可溶化試薬 **Alk-DKDKC₁₂K** を設計合成した。さらにC末端に Lys を追加し、この Lys 側鎖のアミノ酸に対してアルキニル基をもう1つ導入した (1分子内に2つのアルキニル基を保持した) **Bis-Alk-DKDKC₁₂K** の設計合成も行った。いずれのアルキニル基を導入した PG-surfactant についても、親の PG-surfactant となる **DKDKC₁₂K** と同様に、中性バッファー溶液中で、広い濃度範囲に於いてミセ

ル様の会合体のみを形成した。また、若干ミセル形成能は低下したものの、**DKDKC₁₂K**と同様に数 10 μ M 程度の低い cac 値を示した。次に、アルキニル基を導入した PG-surfactant **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** について、膜蛋白質可溶化試薬としての機能評価を行った。代表的な膜蛋白質として PSI を用いて検討を行ったところ、PSI に対する種々の分光学的測定、酸素電極を用いた光誘起電子移動活性などの評価から、いずれのアルキニル基を導入した PG-surfactant についても、膜蛋白質を変性させることなく可溶化出来ることが確認された。これは、PG-surfactant に導入したアルキニル基を、変性をさせることなく、膜蛋白質表面に高度に集積化させることにも成功したことを意味した。

そこで続いて、銅触媒下での Huisgen 環化付加反応を試み、適切な反応条件を選択することで、アルキニル基を導入した PG-surfactant **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** のアルキニル基とアジド基を含む PEG 誘導体が、水溶媒中で効率よく特異的な付加環化反応を起こすことが、IR スペクトル測定から確認された。ここで用いるアジド基を含む化合物として PEG 鎖の両末端にアジド基を持つ Bis-Azide-PEG₂₀₀₀ を選択することで、PEG 鎖を介した架橋反応により、溶液全体をゲル化させることにも成功した。そこで次に、PG-surfactant **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** で PSI を可溶化しているサンプルに対して Bis-Azide-PEG₂₀₀₀ を添加し、さらに Cu²⁺イオンとアスコルビン酸を添加することで、PSI のゲル化の検討を行った。その結果、PG-surfactant に導入したアルキニル基を介した PEG 鎖によるクロスリンクにより、同様に PSI 溶液のゲル化に成功した。ゲルに固定化された PSI について、種々の分光学的測定を行い評価を行ったところ、一連の過程で PSI には全く変性が起きていないことがわかった。すなわち、これまでに全く報告例のない、新たな膜蛋白質ゲル化手法の確立に成功した。

そこで最後に、この Huisgen 環化付加反応により PSI をゲル化させるプロセスと、押出形の 3D プリンターと組み合わせることで、細いゲル繊維を積層することでできる立体格子ゲルの作製を検討した。3D プリンターにて積層構造を作成するためには、押し出されたゲルは、直ちに十分な硬さのゲルになる必要がある。今回検討した Huisgen 環化付加反応を用いた系は、混合されると同時に素早くゲル化が進行するため、3D プリンターによるゲルの造形に向いていると考えられたが、本検討では押し出して作製されたゲルの強度が足らなかったために、グルタルアルデヒドを用いた、**Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** に含まれる

リジン残基同士の2次架橋反応によって、十分な硬度を持ったゲルとなるように工夫した。最後に、この格子ゲルの内部に固定化された PSI に関して、光誘起電子移動活性による機能活性の評価を行ったところ、ゲル内部の試薬の拡散速度に基づく見かけの活性低下は見られたが、85%以上の活性維持が確認された。以上のことから、反応性官能基を保持した膜蛋白質可溶化試薬を用いた、膜蛋白質のゲル内部への固定化手法は、今後様々な膜蛋白質を用いた半人工分子素子の構築に応用できる新手法となることが明らかとなった。

参考文献

- 1) M. Tanaka, E. Sackmann, *Nature*, **437**, 656-663 (2005).
- 2) D. Guschin, G. Yershov, A. Zaslavsky, A. Gemmell, V. Shick, D. Proudnikov, P. Arenkov, A. Mirzabekov, *Anal. Biochem.*, **250**, 203-211 (1997).
- 3) A. Ciaccafava, P. Infossi, M. Ilbert, M. Guiral, S. Leccomte, M. T. G.-Orticoni, Lojou, E. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **51**, 953-956 (2012).
- 4) R. Huisgen, in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry* (Ed.: A. Padwa.), Wiley, New York, 1-176 (1984).
- 5) V. D. Bock, H. Hiemstra, J. H. Maarseveen, *Eur. J. Org. Chem.*, 51-68 (2006).
- 6) J. C. Jewet, E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 3688-3690 (2010).
- 7) R. Manetsch, A. Karasiniski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylar, K. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12809-12818 (2004).
- 8) D. D. Díaz, S. Punna, P. Holzer, A. K. Mcpherson, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, M. G. Finn, *J. Polym. Sci. A. Polym. chem.*, **42(17)**, 4392-4403 (2004).
- 9) E. D. Vendittis, G. Palumbo, G. Parlato, V. Bocchini, *Anal. Biochem.* **115**, 278-286 (1981).
- 10) J. R. Shen, N. Kamiya, *Biochemistry*, **39**, 14739-14744 (2000).
- 11) P. Fromme, H. T. Witt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1365**, 175-184 (1998).
- 12) K. Takasaka, M. Iwai, Y. Umena, K. Kawakami, Y. Ohmori, M. Ikeuchi, Y. Takah, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1797**, 278-284 (2010).
- 13) 秋本 誠志 低温科学 vol.67 (光合成研究法), 449-452.
- 14) S. Hoshina, R. Sakurai, N. Kunishima, K. Wada, S. Itoh, *Biochim. Biophys. Acta*, 1015, 61-68 (1990).
- 15) K. Sonoike, H. Hatanaka, S. Katoh, S. Itoh, *Plant Cell Physiol.*, **31**, 865-870 (1990).
- 16) 沈 健仁 低温科学 vol.67 (光合成研究法), 551-560.
- 17) P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, N. (2001) *Nature*, **411**, 909-917 (2001).
- 18) T. Nakabayashi, M. Kinjo, N. Ohta, *Chem. Phys. Lett.*, **457**, 408-412, (2008).
- 19) P. Wu, V. V. Fokin, *Aldrichimica Acta*, **40(1)**, 7-17, (2007)
- 20) T. R. Chan, Robert Hilgraf, K. B. Shrapless, V. V. Fokin, *Org. Lett.*, **6(17)**,

2853-2855 (2004).

- 21) A. Bigi, G. Cojazzi, S. Panzavolta, K. Rubini, N. Roveri, *Biomaterials*, **22(8)**, 763-768 (2001).

第8章 結言

ペプチド部位を含む界面活性剤の開発は、バイオテクノロジー分野において利用可能な、様々な機能分子の創出を期待させる。本論文では特に、膜蛋白質の可溶化、あるいは膜蛋白質を用いた半人工分子素子構築をサポートする新規試薬の開発に、ペプチド部位を含む界面活性剤を利用することを着想した。さらにその分子骨格には、これまでに報告の非常に限られていた、ペプチド配列を含むジェミニ型界面活性剤 (PG-surfactant) を利用した。従来のペプチド部位を含む界面活性剤 (両親媒性分子) は、ペプチド部位間の強い水素結合、疎水鎖同士の強い疎水性相互作用などにより、ファイバー、ラメラ、シートといった非常に複雑精緻なナノ会合体を作製できる反面、「特定の蛋白質に対する高い親和性」といった「ペプチド配列本来の持つ生理活性を活かした機能分子の創出」には不向きという欠点も兼ね備えていた。しかし、ジェミニ型分子骨格のリンカー部位にペプチド配列を持つ PG-surfactant では、大抵のペプチド配列をリンカー部位に選択した場合でも、ミセル様の会合形態のみしか水中で取らないという特異な性質により、様々なペプチド部位を含む機能分子の創出を可能とした。本論文では具体的には、ペプチド配列を含む新規の膜蛋白質可溶化試薬の開発、新規の膜蛋白質抽出化試薬の開発、膜蛋白質を内包可能な新規二分子膜形成分子の開発、またさらに膜蛋白質を用いた半人工分子素子構築をサポートする、膜蛋白質に対する PEG 鎖の表面修飾を可能とする膜蛋白質表面修飾試薬の開発、膜蛋白質表面近傍での化学反応を可能とする新規化学反応性膜蛋白質可溶化試薬の開発などに成功し、これらを各章にて論じた。以下に、各章の内容を簡潔にまとめた。

第1章は序論であり、本研究着想の研究背景についてまとめた。

第2章では、二分子膜形成分子としてリンカーペプチド部分にオリゴアスパラギン酸の配列を持つ PG-surfactant D_nC_{12} , $cr-D_nC_{12}$ を合成し、これらの二分子膜形成挙動の評価を行った。その結果、分子内にジスルフィド結合を有し、分子コンホメーションを固定化した $cr-D_2C_{12}$ が、膜蛋白質である LH2 (Light-Harvesting Complex 2) を、自身の形成する二分子膜中に安定に固定化出来ることを見出した。

第3章では、PG-surfactantの分子骨格を持つ新規膜蛋白質可溶化試薬の開発を行った。主に、リンカーペプチド部位の配列スクリーニングにより、中性で安定に溶解し、膜蛋白質可溶化試薬として機能する **DKDKC₁₂K** 及び **DKDKC₁₂D** の開発に成功した。光化学系 I、II (PSI、II) といった膜蛋白質を用い検討したところ、これら試薬が膜蛋白質を変性させることなく可溶化できることを見出した。また、膜蛋白質に対する表面修飾試薬としての応用利用が可能かの検証のため、電子受容体 (メチルビオロゲン、MV²⁺) を導入した、MV²⁺修飾誘導体 **MV-DKDKC₁₂K** も設計した。この試薬により可溶化することで、MV²⁺分子は自発的に膜蛋白質表面に集積するため、光照射時の PSI 内部からの電子引き抜き効率向上が見られた。

第4章では、PG-surfactantの分子骨格を持つ新規の膜蛋白質抽出試薬の開発を行った。二分子膜からの膜蛋白質抽出能の向上のためには、界面活性剤そのものの疎水性の増加とともに、アルキル鎖の脂質膜への挿入効率の上昇が必要と推測された。そこでリンカーペプチド部位に、より剛直な立体構造となる β -ターン構造をとるペプチド配列を導入し、PG-surfactant **NPDGC₁₂KK** を開発した。シアノバクテリアのチラコイド膜を用いた膜蛋白質抽出実験を検討したところ、PSI、PSII などに対して効率の良い抽出に成功した。

第5章では、第3章で少し検討した PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬を「膜蛋白質表面への官能基修飾試薬」へ応用する方法論を、より大きな官能基、機能分子 (高分子鎖、リガンドペプチド、蛋白質など) でも可能とするために、分子量の大きな PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬の開発を行った。第3章で開発した膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂D** および **DKDKC₁₂K** のコア配列部分 [-Cys(C₁₂)-Asp-Lys-Asp-Lys-Cys(C₁₂)-] を柔軟な (Gly)₄ リンカーにより二量化、三量化した PG-surfactant **Bis-D₃-DKDKC₁₂** (Mw ~ 3 kDa)、**Bis-K₃-DKDKC₁₂** (Mw ~ 3 kDa)、**Tris-D₃-DKDKC₁₂** (Mw ~ 4.3 kDa) を設計し検討を行った。その結果、多量化による分子量増加の効果により、それぞれの試薬の cac よりも低い濃度領域であっても、膜蛋白質と親和性を保ち、結果可溶化できるという、特異な機能の発現が見られた。この結果は、これら分子量の大きな膜蛋白質可溶化試薬が、膜蛋白質の膜貫通領域と高い親和性を持つために、膜蛋白質表面への様々な官能基修飾を可能とする土台分子として有効であ

ることを示唆するものであった。

第6章では、第5章にて開発を行った分子量の大きな膜蛋白質可溶化試薬 **Bis-D₃-DKDKC₁₂** の N-末端側に PEG 鎖を導入した、PEG 修飾高分子量化 PG-surfactant **PEG₂₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂**、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** の開発を行った。この試薬で、膜蛋白質 PSI を可溶化した際には、PSI を変性させることなく PEG 鎖が PSI 表面に集積されていることが推定された。そこで、この状態の PEG 修飾 PSI をハイドロゲルであるポリアクリルアミドゲルに固定化し、24時間後の光誘起電子移動活性の評価を行った。その結果興味深いことに、 β -DDM や、PEG 鎖未修飾の高分子量化 PG-surfactant **Bis-D₃-DKDKC₁₂** といった PEG 鎖を持たない可溶化試薬で可溶化された PSI では、6割程度の PSI に変性が見られたのに対して、**PEG₅₀₀₀-Bis-D₃-DKDKC₁₂** を用いた場合には、2割程度しか PSI に変性は見られなかった。これは、膜蛋白質表面が PEG 鎖で安定に被覆されることにより、ハイドロゲルを構成する高分子鎖との過渡な相互作用が緩和され、結果ポリアクリルアミドゲル内での PSI の長期安定性が向上されたと考えられた。

第7章では、膜蛋白質を用いた半人工分子素子開発につながる新たな膜蛋白質固定手法の確立を目指し、化学反応性を備えた膜蛋白質可溶化試薬の開発と利用法を考案した。アルキニル基を PG-surfactant ベースの膜蛋白質可溶化試薬 **DKDKC₁₂K** に1つ、あるいは2つ導入した誘導体 **Alk-DKDKC₁₂K**、**Bis-Alk-DKDKC₁₂K** を設計合成し、**Bis-Azide-PEG₂₀₀₀** との銅触媒下での Huisgen 環化付加反応により、PSI を擬似的に架橋することでそのままゲル化可能か検討を行った。その結果、それぞれの溶液の混合後迅速なゲル化が観測され、特にそれぞれの溶液量を μL サイズまで下げることで、混合後瞬時にゲル化が可能となった。そこでさらに押出形の3Dプリンター技術に、マイクロキャピラリーを利用したそれぞれの溶液の微量混合系を組み合わせることで、Huisgen 環化付加反応を利用した PSI ゲルの3次元構造化にも成功した。

第8章は、結言であり、本研究の成果をまとめた。

以上のように、本論文では新規のペプチド配列を含むジェミニ型界面活性剤 PG-surfactant の合成と機能評価から始まり、新規の膜蛋白質可溶化試薬の開発、

膜蛋白質抽出試薬の開発、膜蛋白質を内包可能な新規二分子膜形成分子の開発、またこれらを応用することで、膜蛋白質を用いた半人工分子素子構築をサポートする新規試薬の開発へと取り組んだ。本研究で行ったペプチド配列を含む界面活性剤では、ペプチド配列の違いにより、様々な機能を有することが確認された。膜蛋白質を集積させ、デバイス化を行うためには、ただ集めるだけでなく、膜蛋白質の配向性や、複数の膜蛋白質を組み合わせる必要性が出てくる。今回の研究では1種類の膜蛋白質をもちいて集積化（ゲル化）させる検討にとどまったが、これらの知見は今後様々な膜蛋白質の固定化と機能制御を可能とする PG-surfactant 誘導体の設計と検討において有用な知見を与えるものであると考える。また、自然界の中で様々な酵素反応を担っている複数の膜蛋白質を組み合わせる事で、高度な機能を持った半人工分子素子を作製する事に対する学術的興味は古くからあったが、これまでその実現にはなかなか至ってこなかった。本研究で提案した様々な機能を持つ膜蛋白質可溶化試薬の開発を元にした戦略が、今後これらの課題解決の一助になる事を期待する。

【論文リスト】

第2章

1. “Formation of Planar Bilayer Membranes on Solid Supports Using Peptide Gemini Surfactants”

Katsunari Umezaki, Shunsuke Sakai, **Shuheï Koeda**, Yasushi Yamamoto, Masaharu Kondo, Atsushi Ikeda, Takehisa Dewa, Keijiro Taga, Toshiki Tanaka, Toshihisa Mizuno

Chem Lett., **41**, 1430–1432 (2012).

2. “Creation of Cross-Linked Bilayer Membranes That Can Incorporate Membrane Proteins from Oligo-Asp-Based Peptide Gemini Surfactants”

Shuheï Koeda, Katsunari Umezaki, Ayumi Sumino, Tomoyasu Noji, Atsushi Ikeda, Yasushi Yamamoto, Takehisa Dewa, Keijiro Taga, Mamoru Nango, Toshiki Tanaka, Toshihisa Mizuno

Langmuir, **29**, 11695–11704 (2013).

第3章

3. “Application of Peptide Gemini Surfactants as Novel Solubilization Surfactants for Photosystems I and II of Cyanobacteria”

Shuheï Koeda, Katsunari Umezaki, Tomoyasu Noji, Atsushi Ikeda, Keisuke Kawakami, Masaharu Kondo, Yasushi Ikeda, Jian-Ren Shen, Keijiro Taga, Takehisa Dewa, Shigeru Ito, Mamoru Nango, Toshiki Tanaka, Toshihisa Mizuno

Langmuir, **29**, 11667–11680 (2013).

第 4 章

4. “Design of New Extraction Surfactants for Membrane Proteins from Peptide Gemini Surfactants”

Masahide Shibata, **Shuhei Koeda**, Tomoyasu Noji, Keisuke Kawakami, Yuya Ido, Yuichi Amano, Naoki Umezawa, Tsunehiko Higuchi, Takehisa Dewa, Shigeru Itoh, Nobuo Kamiya, Toshihisa Mizuno

Bioconjugate Chem., **27**, 2469–2479 (2016)

第 5 章

5. “Rational design of novel high molecular weight solubilization surfactants for membrane proteins from the peptide gemini surfactants (PG-surfactants)”

Shuhei Koeda, Tomoyuki Suzuki, Tomoyasu Noji, Keisuke Kawakami, Shigeru Itoh, Takehisa Dewa, Nobuo Kamiya, Toshihisa Mizuno

Tetrahedron, **72**, 6898–6908 (2016)

第 6 章

6. “Development of PEG modified Surfactants for membrane protein stability in polymer gels”

Shuhei Koeda, Tomoyuki Suzuki, Tomoyasu Noji, Keisuke Kawakami, Shigeru Itoh, Takehisa Dewa, Nobuo Kamiya, Toshihisa Mizuno

under preparation

第7章

7.“Design of Chemically Reactive-Solubilization Surfactants for membrane proteins and Bio-orthogonal Chemical Reaction onto the Membrane protein Surface”

Aki Taniguchi, **Shuhei Koeda**, Tomoyasu Noji, Keisuke Kawakami, Shigeru Itoh,

Toshihisa Mizuno

under preparation

関連した学術論文

6.“Construction and Characterization of Protein-Encapsulated Electrospun Fibermats Prepared from a Silica/Poly(γ -glutamate) Hybrid”

Shuhei Koeda, Kentaro Ichiki, Norihiko Iwanaga, Koji Mizuno, Masahide Shibata,

Akiko Obata, Toshihiro Kasuga, Toshihisa Mizuno

Langmuir, **32**, 221–229 (2016)

謝辞

本論文は筆者が名古屋工業大学大学院工学研究科共同ナノメディシン科学専攻博士後期課程に在学中に行った研究をまとめたものである。

本研究をまとめるにあたり、多くの方々にご助言をいただきましたことを深く感謝いたします。なかでも、ご多忙中にもかかわらず直接ご指導いただいた、名古屋工業大学 水野稔久准教授に厚く御礼申し上げます。学部4年生の時から博士課程修了までの6年間、本研究のみならず様々な分野の知識と研究に対する考え方をご教授賜り、また自ら学び、考え、実験に取り組むような環境をご提供いただいたと共に、行き詰まった際親身になってご指導頂きましたこと、さらに学会等、多くの学ぶ機会を与えてくださったこと、誠にありがたく思っています。本当にお世話になりました。

査読をしていただいた名古屋工業大学 山下啓司教授、出羽毅久教授、名古屋市立大学 尾関 哲也教授には本論文を完成させるにあたり、大変有意義かつ的確なご意見をいただき深く感謝しております。

PSI, PSII の研究について多くのご助言をいただきました大阪市立大学 野地智康先生には深く御礼申し上げます。また、PSI, PSII を提供していただいた大阪市立大学 川上恵典特任准教授、過渡吸収測定において多大なるお力添えをいただいた名古屋大学 伊藤繁教授に厚く御礼申し上げます。

名古屋市立大学 梅澤直樹准教授には β -ターンペプチドに関して実験や解析についてご指導いただきました。感謝いたします。

日頃よりゼミで様々なご助言をいただいた近藤政晴助教に感謝いたします。

本研究を進める上で多大な御協力を頂き、また名古屋工業大学工学部生命物質工学科における1年間および同学大学院工学研究科物質工学専攻博士前期過程における2年間、同学大学院工学研究科共同ナノメディシン科学専攻博士後期課程3年間計6年間の研究室生活においても御支援を頂きました水野研究室並びに青木研究室、奥研究室、出羽研究室、山下研究室の先輩や同輩、後輩諸氏に心より感謝いたします。

最後になりましたが、今日に至るまで経済的にも精神的にも支えてくれた家族に、心より感謝します。

本研究は JSPS 科研費 JP15J07454 の助成を受けたものです。