

バイヘリカル構造を有する  
ナノディスク骨格ペプチド (NSP)  
の創製と機能評価

2016

假屋園 大和

# 目次

<b>1. 背景</b>	<b>1</b>
1.1 ナノディスク	1
1.2 apoA-I 模倣ペプチド	1
<b>2. ナノディスク骨格ペプチド (NSP) の創製</b>	<b>3</b>
2.1 ナノディスク骨格ペプチド (NSP) の設計	3
2.2 固相合成法によるペプチドフラグメント合成	5
2.3 ネイティブケミカルライゲーション及び脱硫による NSP の合成	7
2.4 疎水性パラメータ	9
<b>3. NSP によるナノディスク形成と物性評価</b>	<b>10</b>
3.1 コール酸透析法によるナノディスク形成	10
3.2 ナノディスク上でのペプチドの二次構造	13
3.3 ナノディスク上におけるペプチド-リン脂質間相互作用	14
3.4 リン脂質/ペプチド質量比によるナノディスクサイズ制御	15
3.5 POPC ベシクルからの自発的ナノディスク形成	16
3.6 小括	17
<b>4. NSP ナノディスクの物理的安定性</b>	<b>18</b>
4.1 ペプチドナノディスクの希釈安定性	18
4.2 ナノディスクの熱安定性	19
4.3 小括	22
<b>5. 結語</b>	<b>23</b>
<b>6. 実験</b>	<b>24</b>
6.1 材料	24
6.2 固相ペプチド合成	24
6.2.1 SEAlide ペプチド (1)	24
6.2.2 Cys ペプチド (2)	24
6.2.3 4F	25
6.2.4 14A	25
6.3 ネイティブケミカルライゲーション (NCL)	25
6.4 脱硫	25
6.5 コール酸透析法によるナノディスク調製	26
6.6 動的光散乱 (DLS) 測定	26
6.7 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察	26
6.8 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)	26
6.9 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定	26

6.10	Trp 蛍光測定	27
6.11	POPC クリアランス	27
6.12	直接可溶化による NSP-POPC ナノディスク調製	27
7.	参考文献	28
8.	謝辞	32

## 略号表

ApoA-I: アポリポタンパク質 A-I (apolipoprotein A-I)

CAC: 臨界面合濃度 (critical association concentration)

CD: 円偏光二色性 (circular dichroism)

DIEA: *N,N'*-diisopropylethylamine

DIPCI: *N,N'*-diisopropylcarbodiimide

DLS: 動的光散乱法 (dynamic light scattering)

DMF: *N,N*-dimethylformamide

DMPC: dimyristoyl phosphatidylcholine

ESI-TOF: エレクトロスプレーイオン化-飛行時間型 (electrospray ionization-time-of-flight)

Fmoc: 9-fluorenylmethyloxycarbonyl

GRAVY: grand average of hydropathicity

HATU: *O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HOBt: 1-hydroxybenzotriazole

MLV: multilamellar vesicle

MPAA: 4-mercaptophenylacetic acid

MSP: 膜骨格タンパク質 (membrane scaffold protein)

NCL: ネイティブケミカルライゲーション (native chemical ligation)

NSP: ナノディスク骨格ペプチド (nanodisc scaffold peptide)

POPC: 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine

RP-HPLC: 逆相高速液体クロマトグラフィー  
(reverse phase high performance liquid chromatography)

SEAlide: *N*-sulfanylethylamide

SEC: サイズ排除クロマトグラフィー (size exclusion chromatography)

SPPS: 固相ペプチド合成 (solid phase peptide synthesis)

TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine

TEM: 透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscopy)

TFA: trifluoroacetic acid

WMF: 最大蛍光波長 (wavelength of maximum fluorescence)

# 1. 背景

## 1.1 ナノディスク

ナノディスクは、両親媒性 $\alpha$ -ヘリックス構造を有する骨格タンパク質とリン脂質二重膜により形成される直径 10 nm 前後の可溶性リン脂質-タンパク質複合体である。骨格タンパク質には主としてアポリポタンパク質 A-I (apoA-I) やその変異体が用いられ、 $\alpha$ -ヘリックス構造を形成した骨格タンパク質 2 分子がリン脂質分子のアシル鎖部分と相互作用し、ナノディスクの周囲を逆並行に覆うことでダブルベルトモデルと呼ばれる構造をとる<sup>1</sup> (Fig. 1)。

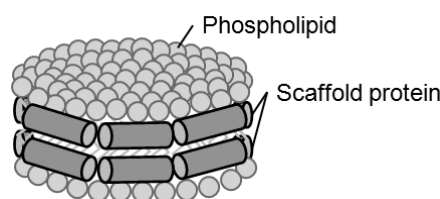


Fig. 1. Structure of nanodiscs

ナノディスクのリン脂質二重膜領域には膜タンパク質の組み込みが可能であり、界面活性剤に代わる膜タンパク質可溶性の足場として注目されている<sup>2</sup>。ナノディスク表面は細胞膜と同じく平面構造であるため、界面活性剤ミセル中よりも膜タンパク質が天然に近い状態であると考えられる<sup>3</sup>。また、同じリン脂質二重膜からなるリポソームとは異なる開放系という特徴は、ファージライブラリーを用いた抗膜タンパク質一本鎖抗体スクリーニング<sup>4</sup>や SNARE タンパク質による膜融合過程<sup>5</sup>の研究などへの応用に優れている。これまでにナノディスクへの組み込みが報告された膜タンパク質は G タンパク質共役受容体<sup>6</sup>、受容体型チロシンキナーゼ<sup>7</sup>や CD4<sup>8</sup>と多岐に渡り、膜貫通領域の大きさも各々異なる。ナノディスクのサイズによっては組み込んだ膜タンパク質を不安定化する可能性も存在することから、膜タンパク質の大きさに合わせたナノディスクのサイズ制御が求められる<sup>9,10</sup>。

## 1.2 apoA-I 模倣ペプチド

ApoA-I はリン脂質との組成比に依存してディスクサイズを変化させることが報告されている<sup>11</sup>。しかし、様々なサイズ分布をもつナノディスクの混合物であり均一なサイズのナノディスクを得るためにはサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により精製を行う必要がある。Sligar らは、apoA-I のアミノ酸配列を基として膜骨格タンパク質 (MSP) を設計しており<sup>12</sup>、MSP に $\alpha$ -ヘリックス領域を挿入もしくは欠損させることでディスクサイズ制御を行っている<sup>10,13</sup>。

一方、apoA-I の部分ペプチドおよび apoA-I 模倣ペプチドは、特徴的な非極性と極性 (荷電) アミノ酸の分布を持つ両親媒性ヘリックスモチーフ (クラス A) を有しており、apoA-I と同じくリン脂質とナノディスクを形成する<sup>14,15</sup>。アポリポタンパク質模倣ペプチドの一つである 18A (DWLKAIFYDKVAEKLKEAF) は、アポリポタンパク質の両親媒性ヘリックス領域を

基に設計されており<sup>16</sup>、ナノディスク形成時に dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) との組成比を変えることで様々な大きさのナノディスクを形成する<sup>17</sup>。18A の N 末端、C 末端をそれぞれアセチル化、アミド化することで $\alpha$ -ヘリックス形成性および脂質親和性を向上させた 2F (Ac-18A-NH<sub>2</sub>) も、18A と同様に DMPC との組成比によりディスクサイズの制御が可能であり<sup>18</sup>、これらペプチドは調製時のリン脂質/ペプチド組成比の調整のみでディスクサイズ制御が可能なナノディスク骨格として期待されている<sup>19</sup>。また、2F の 4 アミノ酸残基欠損誘導体である Ac-DYLKAFYDKLKEAF-NH<sub>2</sub> (本論文中では 14A と表記) は、apoA-I 変異体で形成例のない直径約 30 nm という NMR の磁場中で配向可能な大きいナノディスク (マクロディスク) を形成する<sup>20</sup>。また、apoA-I 模倣ペプチドの特徴として、高いリン脂質可溶化能による自発的な 1-palmitoyl-2-oleoyl phosphatidylcholine (POPC) ナノディスクの形成があげられる<sup>21</sup>。これに対して apoA-I は中性 pH で POPC ベシクルを可溶化できないため<sup>22</sup>、自発的な POPC ナノディスク形成は困難である。そのため、コール酸のような界面活性剤を用いてナノディスク調製が行われる<sup>23</sup>。

一方、ペプチドを基にしたナノディスクは安定性の低さが課題である。ナノディスクへの膜タンパク質組み込みに際して、“空”のナノディスクやナノディスクに組み込まれなかった膜タンパク質の除去はカラムクロマトグラフィーにより行われる<sup>4,24</sup>。2F が形成する DMPC ナノディスクは SEC にて分離可能である<sup>25</sup>が、細胞膜構成脂質である POPC をリン脂質とする 2F-POPC ナノディスクはカラム上で分解され、SEC による精製は困難である<sup>26</sup>。膜タンパク質の機能・活性は周囲の脂質分子に依存するため<sup>24,27</sup>、POPC により形成されるナノディスクの安定性が低いことは膜タンパク質可溶化への応用の際に問題となる。

2F の両親媒性ヘリックス領域の中心にある Leu を Phe へと置換した 4F (Ac-DWFKAFYDKVAEKFKKEAF-NH<sub>2</sub>) は、脂質への親和性<sup>21</sup>と共に形成するナノディスクの SEC に対する安定性が向上する<sup>28</sup>。また、Pro を介して 18A を 2 個結合させた 37pA (18A-Pro-18A) POPC ナノディスクも SEC に対して安定である<sup>29</sup>。このように脂質親和性やタンデムヘリカル構造化により SEC に対する安定性は向上するが、ペプチドと apoA-I が形成するナノディスクの安定性を熱力学的に比較した報告はない。

以上の背景から本論文では、ディスクサイズの制御が可能かつ熱力学的に安定なナノディスクを形成する骨格ペプチドの創製を目的とした。

## 2. ナノディスク骨格ペプチド (NSP) の創製

### 2.1 ナノディスク骨格ペプチド (NSP) の設計

ナノディスク骨格用ペプチドの設計に際して、4F を基本配列として安定性を向上させるため、Pro を介して両親媒性ヘリックスを N 末端側に結合させたバイヘリカル構造とした。対称バイヘリカル構造を持つ 4F-Pro-4F について、DMPC ナノディスクを自発的に形成するにも関わらず、POPC ベシクル可溶化能が低いことが Getz らにより報告されている<sup>30</sup>。その要因はヘリックス間相互作用の強さと考えられる。実際、モノヘリカルペプチドにおいて疎水性の増加がペプチド間相互作用を増大させ、卵黄ホスファチジルコリンベシクルに対する可溶化能の低下を引き起こすことが報告されている<sup>21</sup>。これらの報告から、脂質親和性とペプチド内 (間) 相互作用のバランスが自発的なナノディスク形成に重要であると推定される。37pA の C 末端側両親媒性ヘリックス中の Leu および Phe を Ala に置換した 5A (H<sub>2</sub>N-DWLKAFYDKVAEKLKEAF-P-DWAKAAYDKAAEKAKEAA-OH) は、疎水性の低下にも拘わらずヘリックス間相互作用が弱くなるため、37pA より DMPC 可溶化速度が速くなる<sup>31</sup>。これらの報告を基に、筆者は Pro を介して 4F の N 末端側に 2F をつなげた非対称型バイヘリカル構造の NSP (Ac-DWLKAFYDKVAEKLKEAA-P-DWFKAFYDKVAEKFKKEAF-NH<sub>2</sub>) を設計した。

迅速な合成を可能にするため、ヘリックス領域同士をライゲーション法により縮合させることとした (Scheme 1)。ネイティブケミカルライゲーション (NCL) のライゲーション部位として N 末端側ヘリックス中 18 番目の Phe を Cys に置換し、縮合後に脱硫することで Cys を Ala へと変換して目的の NSP を合成する。2F の配列中に存在する Glu16-Ala17 をライゲーション部位とした場合、C 末端 Glu チオエステルが酸無水物を形成し、 $\gamma$ -ブランチペプチドを副生成物として生じる可能性があるため、Phe18Ala 変異を導入した<sup>32</sup>。Remaley らは、この Phe18Ala 変異が 5A の脂質親和性に大きな影響を与えないことを報告しており<sup>33</sup>、NSP に関しても脂質親和性への影響は少ないと予想される。





## 2.2 固相合成法によるペプチドフラグメント合成

### ・ *N*-sulfanylethylamide (SEAlide) ペプチド (1)

NCL では C 末端にチオエステルを有するペプチドフラグメントが必要となるが、一般的なペプチド合成法である 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) 固相合成法ではペプチドチオエステルの直接合成は困難である。そこで、NCL 中に *in situ* でチオエステル化するため、チオエステル前駆体として SEAlide ペプチドを合成した<sup>34</sup>。SEAlide ペプチドは NCL 法に用いるリン酸緩衝液中で自発的な *N*-*S* アシル基転移反応によりチオエステルへ変換される。

Rink amide AM 樹脂へ Ala を導入後、液相法にて得られた Ala-SEAlide(Trt)を縮合した。その後、Fmoc 固相合成法によりアミノ酸を順次縮合させ、保護ペプチド樹脂を得た。樹脂からペプチドを切り出し、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) により精製することで目的の SEAlide ペプチド (1: Ac-DWLKAFYDKVAEKLKEA-SEAlide-A-NH<sub>2</sub>) を得た (Fig. 2A, B)。

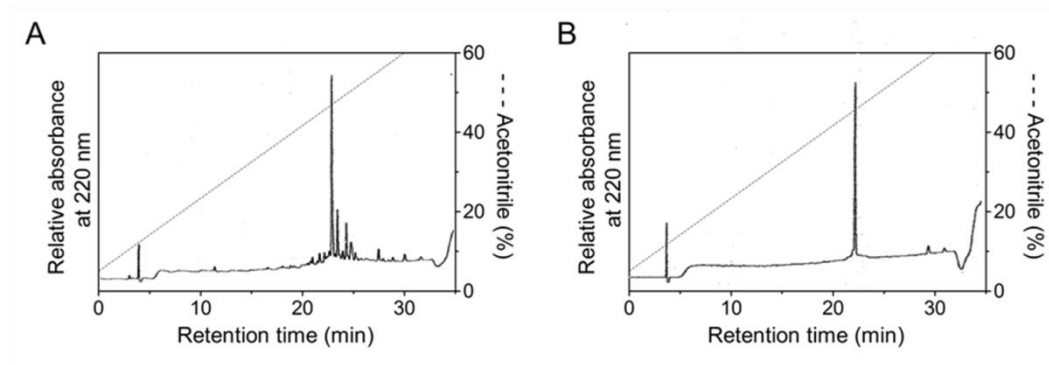


Fig. 2. RP-HPLC profile of SEAlide peptide (1), (A) Crude, (B) After purification. RP-HPLC conditions: Column: Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II column (4.6 × 250 mm), eluent: 0.1% TFA containing aqueous acetonitrile, flow rate: 1.0 ml/min.

・ Cys ペプチド (2)

Rink amide AM 樹脂を原料として、Fmoc 固相合成法により Cys ペプチド (2: CPDWFKAFYDKVAEKFKKEAF-NH<sub>2</sub>) を得た (Fig. 3A, B)

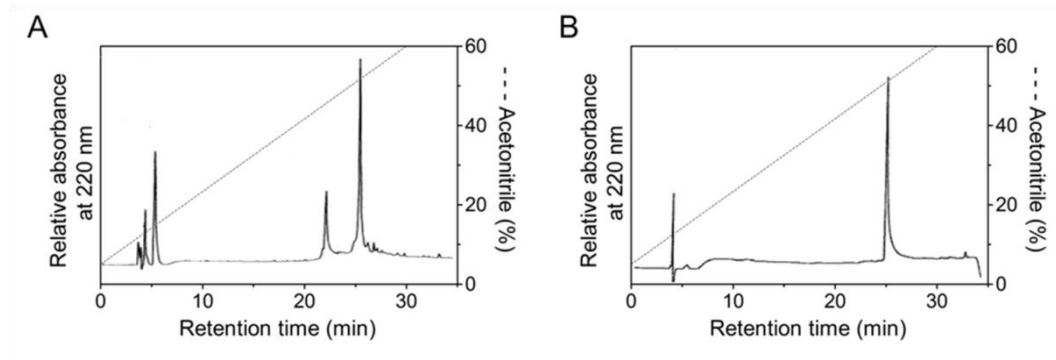


Fig. 3. RP-HPLC profile of Cys peptide (2), (A) Crude, (B) After purification. RP-HPLC conditions: Column: 5C<sub>18</sub>-AR-II column (4.6 × 250 mm), eluent: 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) containing aqueous acetonitrile, flow rate: 1.0 ml/min.

## 2.3 ネイティブケミカルライゲーション及び脱硫による NSP の合成

### ・ NCL による NSP/A18C の合成

2.2 で合成した SEALide ペプチド **1** (1.1 mg, 0.47  $\mu\text{mol}$ ) と Cys ペプチド **2** (1.2 mg, 1.0 equiv.) を 50 mM 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA)、30 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) 及び 3M グアニジン存在下 500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中で NCL により縮合させた (Fig. 4A, B)。37°C にて 23 時間反応後、NSP/A18C (**3**) の生成を質量分析により確認、RP-HPLC による精製を行い、目的物 1.1 mg を得た (収率: 52%)。

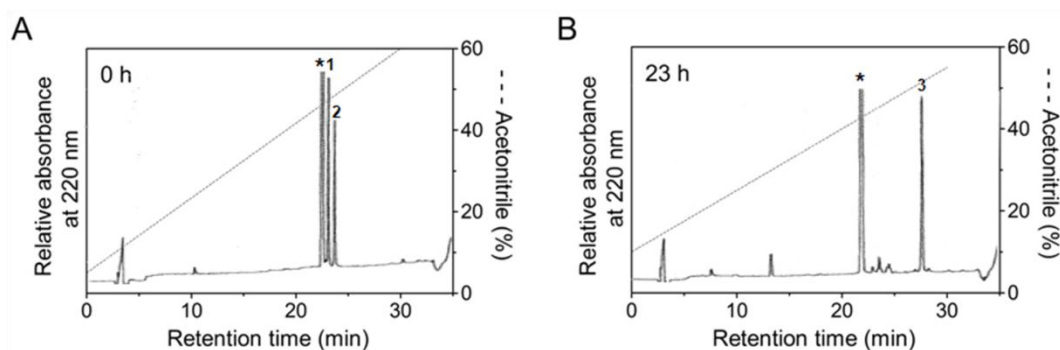


Fig. 4. Native chemical ligation reaction with SEALide peptide (**1**) and Cys peptide (**2**) at 0 h (A) , 23 h (B). \* indicated MPAA. RP-HPLC conditions: Column: 5C<sub>18</sub>-AR-II column (4.6 × 250 mm), eluent: 0.1% TFA containing aqueous acetonitrile, flow rate: 1.0 ml/min.

・脱硫による NSP の合成

NCLにて得られた NSP/A18C (7.0 mg, 1.54  $\mu$ mol) を、Danishefsky らの報告<sup>35</sup>を基に 10 mM glutathione (reduced)、40 mM TCEP 及び 3M グアニジン存在下 500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中にて脱硫した。ペプチドをリン酸緩衝液に溶解後、ペプチドに対して 20 等量の VA-044 を加えることで反応を開始した (Fig. 5A-C)。24 時間反応後、NSP (**4**) の生成が確認され、RP-HPLC により精製することで 95% 以上の純度で目的ペプチドを得た (2.7 mg, 収率 37%)。

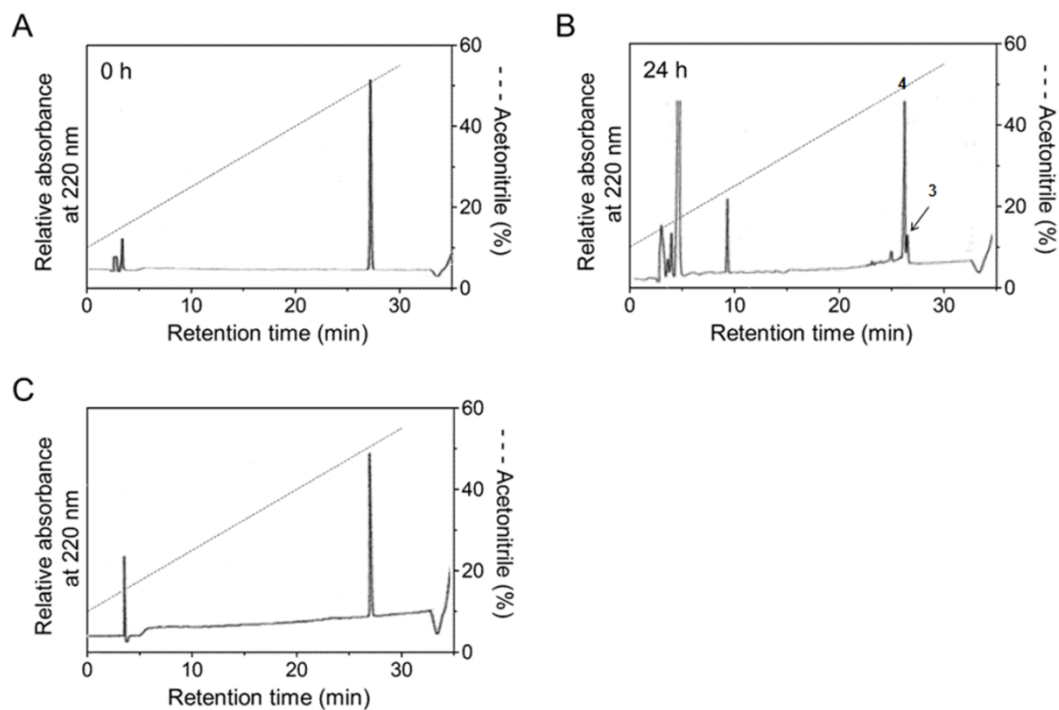


Fig. 5. Desulfurization of NSP/A18C (**3**) at at 0 h (A), 24 h (B) and after isolation of **4** (C). RP-HPLC conditions: Column: 5C<sub>18</sub>-AR-II column (4.6  $\times$  250 mm), eluent: 0.1% TFA containing aqueous acetonitrile, flow rate: 1.0 ml/min.

## 2.4 疎水性パラメータ

各ペプチドのアミノ酸配列および疎水性パラメータを Table 1 に示した。NSP は 4F よりもアミノ酸残基数が約 2 倍であるが、RP-HPLC における保持時間の差は 1 分程度であった。ProtPram<sup>36</sup> で計算した grand average of hydropathicity (GRAVY) 値も NSP は 4F と同じ値を示したことから、NSP と 4F はほぼ同程度の疎水性であるといえる。一方、14A は、RP-HPLC における保持時間も短く、GRAVY 値も大きいことから、NSP や 4F と比較して疎水性が低い。

Table 1. Amino acids sequence and hydrophobic parameter of scaffold peptides used in this study

Peptide	Amino acids	Sequence	Mw	Retention time (min) <sup>a</sup>	GRAVY
NSP	37	Ac-DWLKAFYDKVAEKLKEAAP-DWFKAFYDKVAEKFKEAF-NH <sub>2</sub>	4514.1	26.9	-0.611
4F	18	Ac-DWFKAFYDKVAEKFKEAF-NH <sub>2</sub>	2310.6	25.6	-0.611
14A	14	Ac-DYLKAFYDKLKEAF-NH <sub>2</sub>	1790.1	23.2	-0.571

<sup>a</sup> The retention times were the time taken for peptides to elute from 5C<sub>18</sub>-AR-II column (4.6 × 250 mm) using the gradient from 5% to 60% of aqueous acetonitrile containing 0.1% TFA in 30 min

### 3. NSP によるナノディスク形成と物性評価

#### 3.1 コール酸透析法によるナノディスク形成

NSP が他の apoA-I 模倣ペプチドと同様にリン脂質/ペプチド組成比に依存してディスクサイズを変化させるか検証を行った。コール酸透析法により調製した POPC ナノディスクの動的光散乱 (DLS) 測定結果を Fig. 6A-C に示す。NSP は 14A と同様に POPC/ペプチド質量比に応じて異なるサイズのナノディスクを形成し、リン脂質との組成比を変えるだけでサイズ制御可能であることが示された (Fig. 6A and B)。ペプチドがリン脂質/ペプチド質量比に応じてサイズを変化させるのに対して、apoA-I ではサイズ分布変化が見られず (Fig. 6C)、リン脂質との質量比を変えるだけではサイズ制御は困難であった。これまでにコレステロール含有 apoA-I ナノディスクにおける脂質/タンパク質比に依存したサイズ変化が報告されているが<sup>11,37</sup>、様々なサイズ分布を持つナノディスクの混合物であり、目的とするサイズ領域のナノディスクを分離する必要がある。ApoA-I がナノディスクを構成する際、1 分子でナノディスクの外周を一周しており<sup>1</sup>、円周の長さは apoA-I の $\alpha$ -ヘリックス形成アミノ酸残基数に依存する<sup>13</sup>。そのため、apoA-I や apoA-I の変異体である MSP を骨格としてナノディスクのサイズを制御する場合、ヘリックス形成領域の挿入もしくは欠損が必要となる<sup>10,13,38</sup>。一方、ペプチドを骨格とした場合、リン脂質との組成比に依存してナノディスクの外周を覆うペプチドの分子数が変化するため、容易にサイズ変化が可能と考えられる。

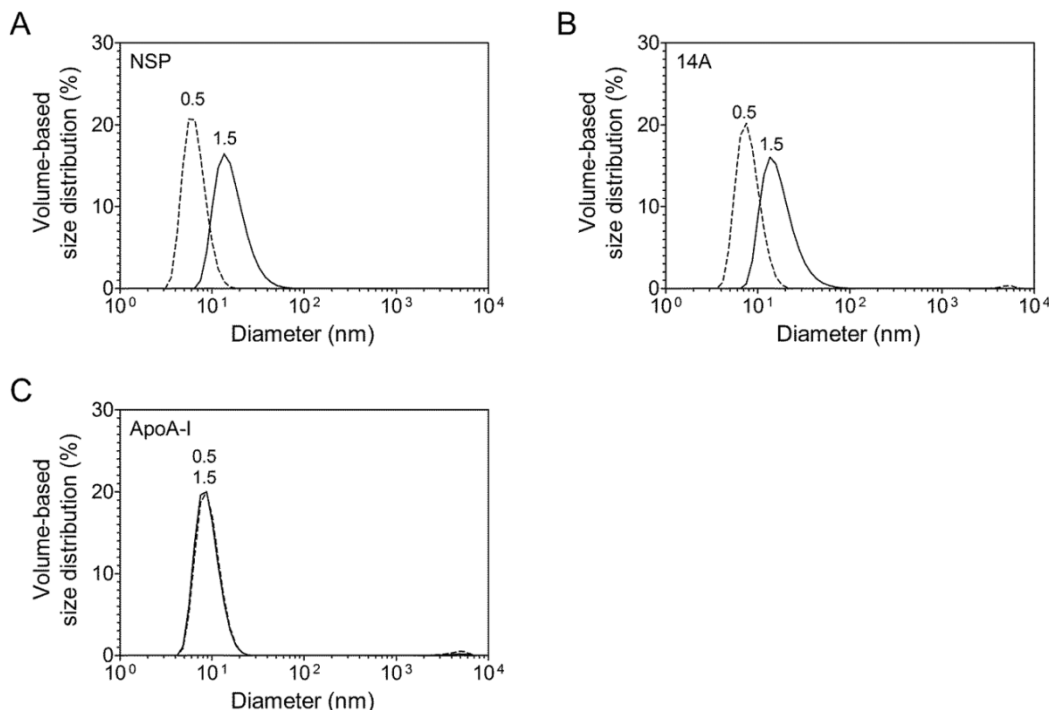


Fig. 6. Size distribution of peptides and apoA-I based nanodiscs with POPC/peptide weight ratio 1.5 (solid line) or 0.5 (dashed line). NSP (A), 14A (B) and apoA-I (C)

POPC/NSP 質量比 1.8 にて調製したナノディスクの形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) により観察したところ、apoA-I-POPC ナノディスクと同じく円盤状構造が確認された(Fig. 7)。

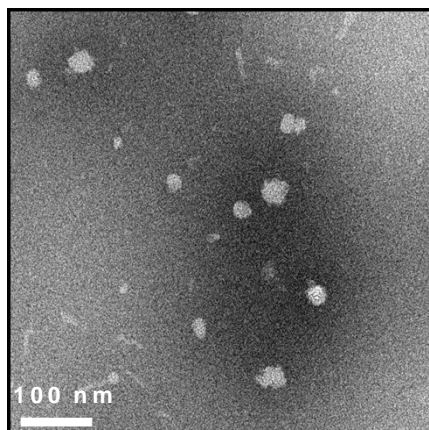


Fig. 7. TEM image of NSP-POPC nanodiscs. Scale bar indicated 100 nm. [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

NSP が形成した POPC ナノディスクは SEC に対して安定で分取可能であった。POPC/NSP 質量比 1.8 で調製したナノディスクの SEC による溶出プロファイルを Fig. 8A に示した。実線は NSP-POPC ナノディスク、破線は NSP のみの溶出パターンを表しているが、ナノディスクの溶出プロファイルにおいてペプチドに相当する位置にピークは存在せず、100%近い効率でナノディスクを形成していると考えられる。Fig. 8A 中に矢印で示したフラクションを回収し、サイズ分布を DLS 測定により求めた結果、平均直径は 11.7 nm であった (Fig. 8B)。このフラクションを以後の物性解析に用いた。

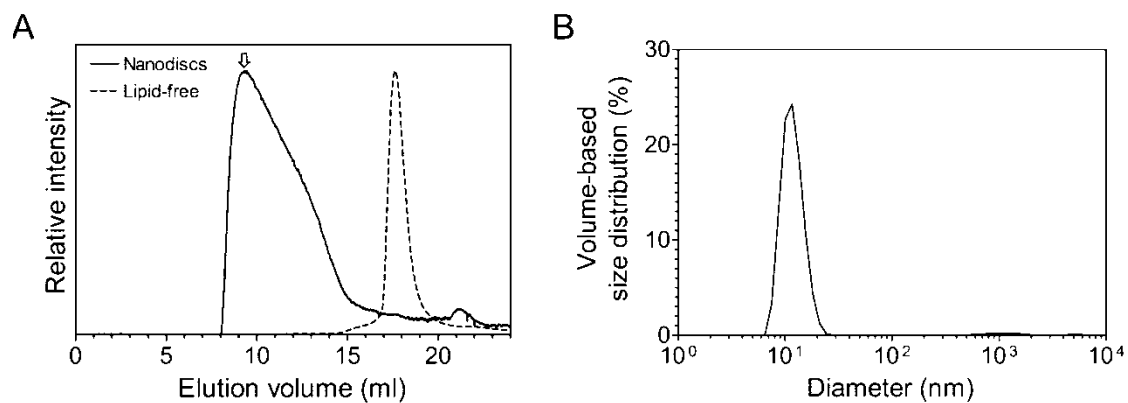


Fig. 8. Formation of NSP-POPC nanodiscs. (A) SEC elution profile of NSP-POPC nanodiscs (solid line) and lipid-free NSP (dashed line) with Superdex 200 column. The nanodiscs were prepared by cholate dialysis method and initial POPC/NSP weight ratio of 1.8. (B) Volume-based size distribution of isolated nanodiscs. [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より一部を変更して転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]



### 3.2 ナノディスク上におけるペプチドの二次構造

ナノディスク形成に伴い、apoA-I はライダムコイル構造から $\alpha$ -ヘリックス構造へと大きく二次構造を変化させる<sup>39</sup>。我々の研究室では、この構造変化が apoA-I によるナノディスク形成時の駆動力であることを見出した<sup>40</sup>。同様に apoA-I 模倣ペプチドにおいても、ナノディスク形成の際に $\alpha$ -ヘリックス構造の関与が報告されている<sup>18,41</sup>。そこで、ナノディスク上での NSP の二次構造を円偏光二色性 (CD) スペクトル測定により評価した (Fig. 9)。

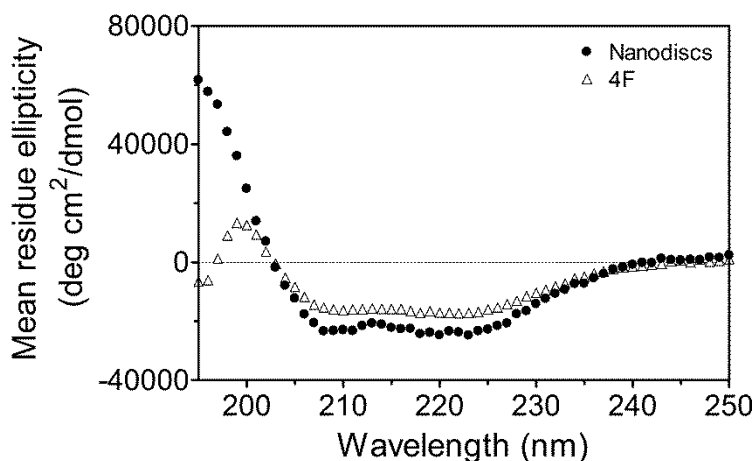


Fig. 9. CD spectra of peptides on nanodiscs. NSP (closed circle) and 4F (open triangle). [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より一部を変更して転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

他の apoA-I 模倣ペプチドと同じように、NSP はナノディスク上において $\alpha$ -ヘリックス構造を形成した。NSP は 4F と比較して $\alpha$ -ヘリックス含量率が高値であったが (Table 2)、バイヘリカル構造が $\alpha$ -ヘリックス形成を促進していると考えられる。

Table 2 Characterization of peptides on nanodiscs.

Peptide	Diameter (nm)	$\alpha$ -Helix (%)
NSP	11.7	69
4F	11.3	52
apoA-I	9.8	82

[*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より一部を変更して転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

### 3.3 ナノディスク上でのペプチド-リン脂質間相互作用

ナノディスク上におけるペプチド-リン脂質間相互作用を評価するために、ペプチド中 Trp 由来の蛍光スペクトルを測定した。Trp は周囲の環境に応じて蛍光特性を変化させることから、apoA-I 模倣ペプチドと脂質との相互作用解析に利用されている<sup>42</sup>。ペプチドが脂質分子へ結合した際、Trp 周囲の疎水性が増加し、最大蛍光波長 (WMF) の短波長シフトと共に蛍光強度が上昇する。NSP と 4F の両者において、水溶液中からナノディスクへの移行に伴い、Trp 蛍光の短波長シフトおよび蛍光強度上昇が見られた (Fig. 10A and B)。POPC ナノディスク上における NSP 中 Trp の WMF は 332 nm と 4F (336 nm) に比べて短波長であり、蛍光強度も大きく上昇した。このことから、NSP 中の Trp 残基は、4F 中 Trp 残基と比較して、深くリン脂質二重膜のアシル鎖内へと挿入されていることが示唆された。

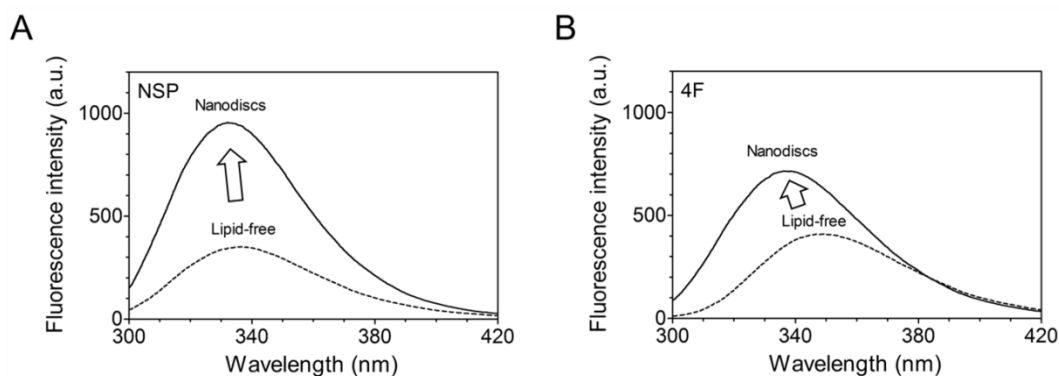


Fig. 10. Fluorescence spectra of intrinsic Trp in peptides. In aqueous solution (dotted line) or on isolated nanodiscs (solid line). (A) NSP; (B) 4F. [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より一部を変更して転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

### 3.4 リン脂質/ペプチド質量比によるナノディスクサイズ制御

Fig. 6 より NSP はリン脂質/ペプチド質量比に依存したディスクサイズ制御の可能性が示唆されたことから、ディスクサイズの制御が可能な範囲を検討した。調製時の POPC/NSP 質量比を 1.2-4.2 までの間で調整し、コール酸透析法にてナノディスクを作製後、未精製の状態で DLS 測定によりディスクサイズの評価を行った。形成される NSP-POPC ナノディスクのサイズ分布は直径 7.5-23.4 nm 間で変化し、未精製の状態においても単一のサイズ分布を示した (Fig.11A)。4F も同様に 8.8-21.0 nm の範囲でナノディスクのサイズを変化させた。形成したナノディスクの主ピークのサイズと調製時の POPC/ペプチド質量比の関係を Fig.11B にプロットした。調製時の POPC/ペプチドに依存してディスクサイズが変化しており、NSP を骨格としたナノディスクが 4F と同様にリン脂質/ペプチド質量比を変えるだけでサイズ制御可能なことを示している。

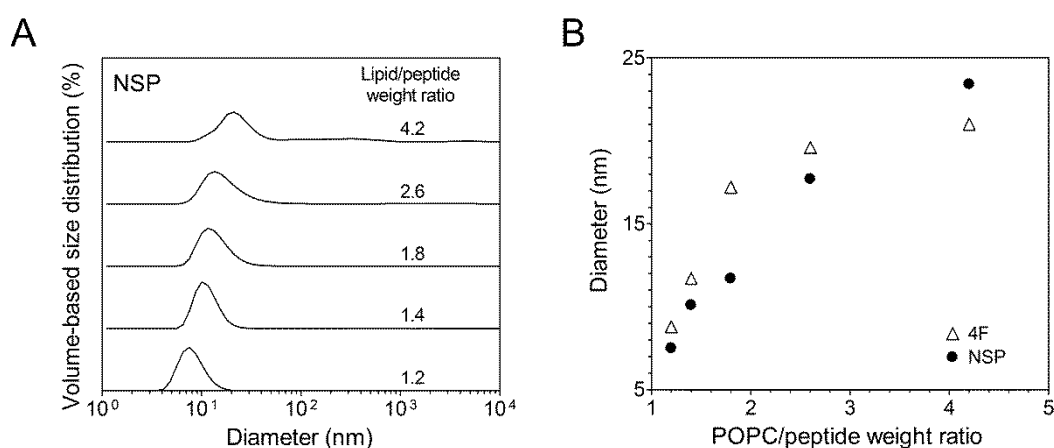


Fig.11. Volume-based size distributions of peptide based nanodiscs prepared with different POPC/peptide weight ratios. (A) Change in nanodisc diameter depending upon initial POPC/peptide weight ratio. NSP (closed circle) and 4F (open triangle). [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より一部を変更して転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

### 3.5 POPC ベシクルからの自発的ナノディスク形成

ApoA-I および apoA-I 模倣ペプチドは、常温でゲル-液晶相転移温度にある DMPC から構成される不安定なベシクルを可溶化し、ナノディスクを形成することが報告されている<sup>43</sup>。一方で、apoA-I は中性条件下で POPC のような安定なリン脂質で形成されたベシクルを可溶化できない<sup>22</sup>。界面活性剤非存在下において、自発的にナノディスク形成可能な点は apoA-I 模倣ペプチドをナノディスク骨格とする利点の一つである。そこで POPC multilamellar vesicles (MLVs) クリアランス実験により NSP の POPC ベシクル可溶化能を評価した (Fig. 12A)。

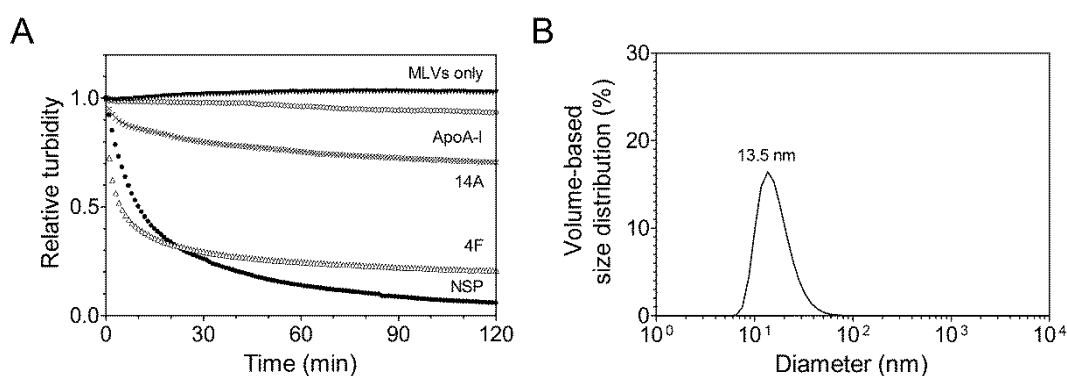


Fig. 12. Solubilization of POPC MLVs by peptides and apoA-I. (A) Time course of decreasing absorbance at 325 nm. NSP (closed circle), 4F (open triangle), 14A (cross mark), apoA-I (open diamond), and MLVs only (closed inverted triangle). (B) Volume-based size distribution of NSP-POPC nanodiscs after incubation of NSP with POPC MLVs (initial POPC/NSP weight ratio was 1.8). [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より一部を変更して転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

NSP は、apoA-I と異なり、2 時間で 90% 以上の POPC MLVs を可溶化した。NSP が 4F よりも初速度が遅い要因として、分子内ヘリックス間相互作用の関与が考えられ、4F の対称バイヘリカルペプチド 4F-Pro-4F は POPC ベシクル可溶化能が低いことが報告されている<sup>30</sup>。別グループの報告からは、対称バイヘリカルペプチド 37pA の C 末端側ヘリックスの疎水性を低下させた非対称バイヘリカルペプチド 5A は 37pA よりも DMPC 可溶化速度が速くなることが示されている<sup>31</sup>。NSP も、同様に非対称バイヘリカル構造とすることで 4F-Pro-4F の POPC ベシクル可溶化能を改善した。一方、4F と同じモノヘリカル構造である 14A は POPC ベシクルの可溶化速度が遅く、2 時間後にも 2 割程度の濁度減少しか見られなかった。以上の結果およびこれまでの報告から、脂質可溶化能には脂質親和性と分子内 (分子間) ヘリックス間相互作用のバランスが重要であると考察される<sup>21</sup>。

さらに、POPC ベシクル可溶化に伴う自発的なナノディスク形成を確認するため、NSP と POPC MLVs を 4°C にて一晩反応後、DLS 測定によりサイズ分布を測定した。その結果、約 14 nm のサイズをもつナノディスク粒子が確認された (Fig. 12B)。本結果から、NSP は他

のアポリポタンパク質模倣ペプチドと同様に POPC のような安定なリン脂質からなるリポソームを自発的に可溶化し、ナノディスクを形成することが示された。

### 3.6 小括

NSP は、調製時の POPC/ペプチド質量比に依存してナノディスクのサイズを変化させ (Fig.11)、形成後のナノディスクは SEC に対して安定であった (Fig. 8A)。この結果は、膜タンパク質の大きさに合わせたナノディスクのサイズ制御が容易かつ組み込み後に精製可能なことを示している。

NSP は他の apoA-I 模倣ペプチドと同じくナノディスク上で $\alpha$ -ヘリックス構造を形成しており、 $\alpha$ -ヘリックス含有率が  $4F < NSP < apoA-I$  の順に増加したことから、タンデムヘリカル構造が $\alpha$ -ヘリックス形成を促進すると考察される。内在性 Trp 蛍光測定から、NSP は 4F と比較して POPC のリン脂質中アシル鎖領域へ深く埋もれていることが示され、バイヘリカル構造によりリン脂質二重膜との相互作用が増大したと考えられる。

また、POPC ベシクル可溶化能を評価したところ、NSP は 4F と同じく POPC ベシクルを可溶化し、自発的に POPC ナノディスクを形成した (Fig. 12)。界面活性剤を用いないナノディスク形成は、将来的に細胞膜からの膜タンパク質直接可溶化への応用が期待される。

## 4. NSP ナノディスクの物理的安定性

### 4.1 ペプチドナノディスクの希釈安定性

モノヘリカルペプチド 2F は SEC に対して不安定であることが報告されている<sup>26</sup>。我々の研究においても 2F の欠損誘導体である 14A は、ナノディスク形成が DLS 測定により確認されたが、SEC においてはカラム内での分解によりピークは検出されなかった (Fig. 13A and B)。Imura らの報告によると、apoA-I の 10 番目ヘリックス領域の配列をもつペプチドを骨格にしたナノディスクは臨界会合濃度 (CAC) を持ち、CAC 以下ではナノディスクを形成出来ない<sup>44</sup>。2F や 14A は SEC のカラム上で CAC 以下に希釈され、ナノディスクが崩壊すると考えられる。ナノディスクへの膜タンパク質組み込みを考えた場合、膜タンパク質が組み込まれていない”空”のナノディスクをカラム操作により除去する方が好ましい。そのため、カラム操作に対する安定性はペプチドを骨格としたナノディスクの課題の 1 つとなる。

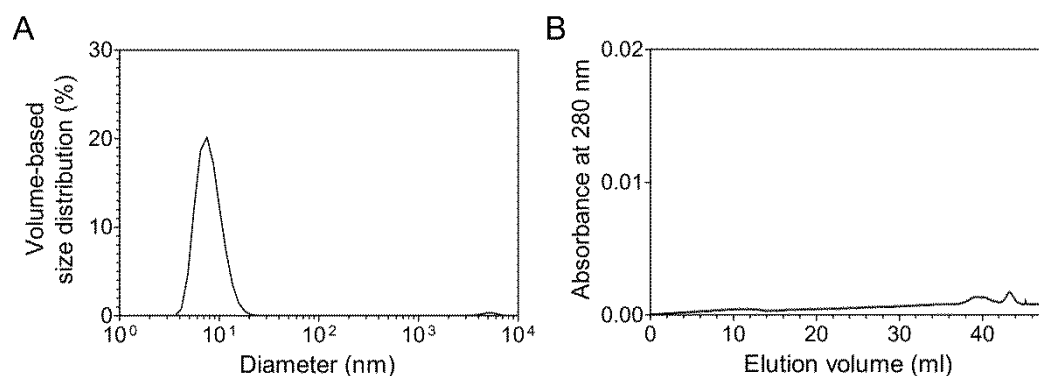


Fig. 13 Nanodiscs preparation with 14A. (A) Volume-based size distribution of 14A nanodiscs. (B) SEC elution profile of 14A-POPC nanodiscs.

4F および 37pA が SEC に対して安定であることは、これまでに報告されている<sup>28,29</sup>。4F と 37pA のハイブリッドである NSP も SEC に安定で分取可能であった (Fig. 8A)。そこで、カラム操作に対する安定性の指標として、NSP および 4F の希釈安定性をサイズ分布変化の測定により行った (Fig. 14)。

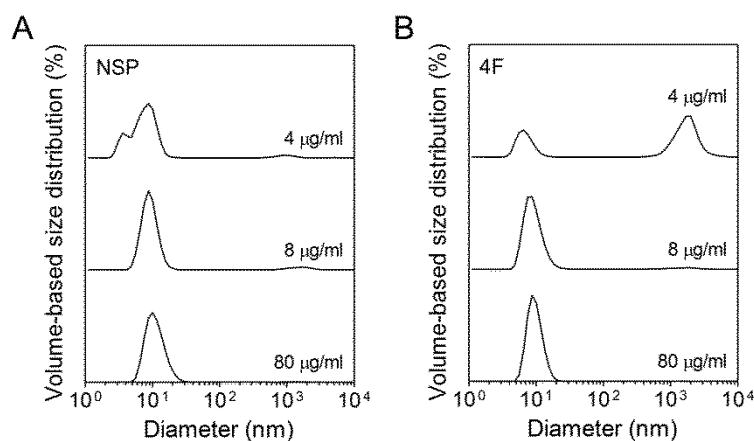


Fig. 14 Dilution stability of peptide based nanodiscs. (A) NSP-POPC nanodiscs and (B) 4F-POPC nanodiscs.

ペプチド濃度 80  $\mu\text{g/ml}$  から 8  $\mu\text{g/ml}$  (10倍希釈)、4  $\mu\text{g/ml}$  (20倍希釈) と希釈測定した結果、4F ナノディスクは 4  $\mu\text{g/ml}$  において完全に分解した。一方、NSP は一部がサイズ変化しているのみであり、NSP は 4F と比べて希釈安定性が高いことが示された。

#### 4.2 ナノディスクの熱安定性

次に、ナノディスクの熱安定性を、温度変化によるペプチドあるいは apoA-I 中の  $\alpha$ -ヘリックスの変性を指標として評価した (Fig. 15)。モノヘリカル構造の 4F は 43°C を変性中点として、60°C で完全に変性した。一方で、バイヘリカル構造の NSP は 4F よりも安定で 90°C でも完全に変性せず、apoA-I と同程度の安定性を示した<sup>45</sup>。

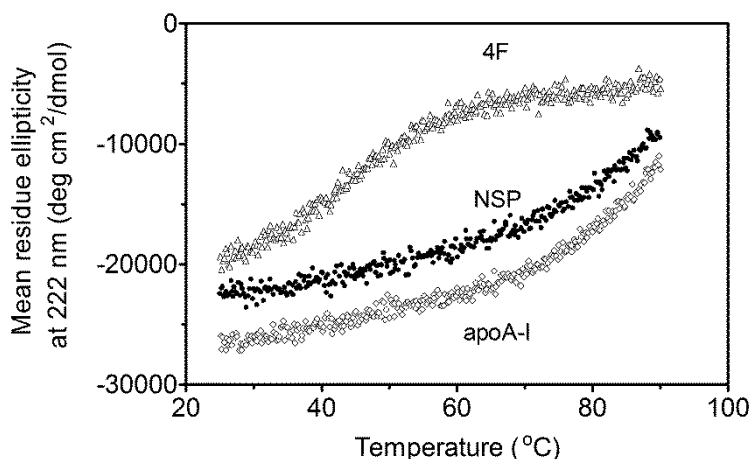


Fig. 15 Thermal stability of peptides or apoA-I on POPC nanodiscs. NSP (closed circle), 4F (open triangle) and apoA-I (open diamond). [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

次に、ナノディスク上の骨格ペプチドおよび apoA-I の熱変性による粒子サイズの変化を DLS 測定により追跡した (Fig. 16A and B)。ApoA-I ナノディスクは 70°C 付近から次第に粒子径が大きくなり、ペプチドの熱変性実験結果とよく一致していた。また NSP ナノディスクの場合、90°C 付近まで大きなサイズ変化が生じず、90°C で急激に粒子径を変化させた。

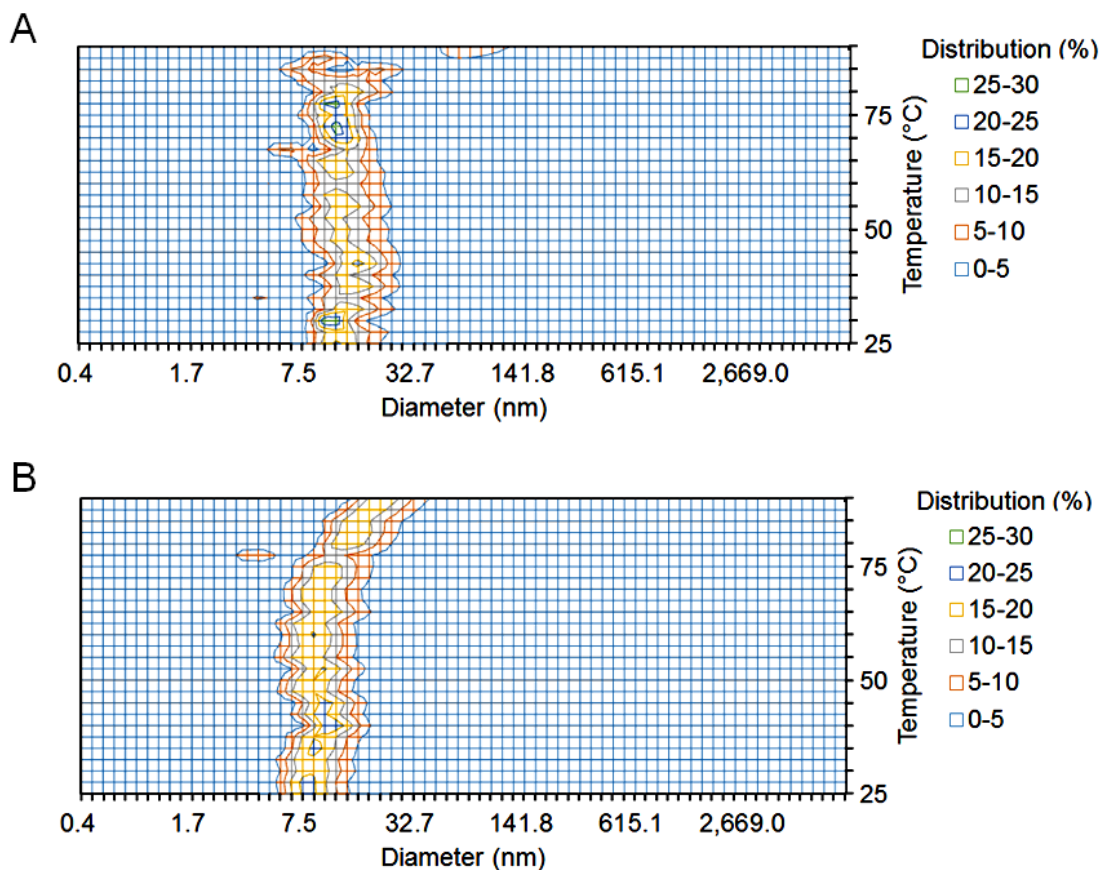


Fig. 16 Heat induced change of size distribution of nanodiscs. (A) NSP-POPC nanodiscs and (B) apoA-I-POPC nanodiscs.



代表的な温度におけるサイズ分布を Fig. 17 に示したが、NSP ナノディスクは 60°C で一部の小さな粒子が存在するがサイズに変化は生じず、90°C で完全に分解していた。ApoA-I ナノディスクについても 90°C で完全に粒子径が変化していた。

熱による粒子径変化測定の結果からも NSP ナノディスクは apoA-I ナノディスクと同程度熱に対して安定であることが示された。また、ナノディスク自体の熱安定性は、骨格タンパク質あるいはペプチド中  $\alpha$ -ヘリックスの安定性に強く依存すると考察される。

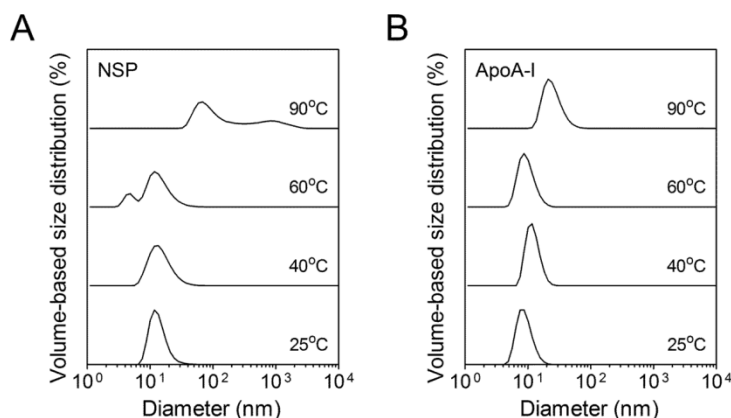


Fig. 17 Heat-induced changes in size distribution of nanodiscs of apoA-I (A) and NSP (B). Nanodisc samples were analyzed by DLS measurements without SEC isolation procedure. [*J. Pept. Sci.* (DOI 10.1002/psc.2847) より一部を変更して転載、©2016 European Peptide Society and John Wiley & Sons, Ltd.]

ペプチドナノディスクの安定性に関する要素として、両親媒性ヘリックスの疎水面に存在するアミノ酸残基の疎水性および芳香族性が考えられる。事実、疎水面のアミノ酸残基は脂質との相互作用に影響することが知られており<sup>46</sup>、2Fの疎水性面の中心にある2残基のLeuをPheに置換した4Fは、SECに対する安定性が向上する<sup>28</sup>。本研究においても、2Fの欠損体である14AはSECに対して不安定であり、疎水性面の疎水性および芳香族性がSEC安定性に関連していると考えられた。一方で、NSPと同程度の疎水性をもつモノヘリカル構造の4Fは、40°C付近といった生体内の温度に近い条件から $\alpha$ -ヘリックス構造が変性し始め、60°Cで完全に変性する。バイヘリカル構造のNSPおよびapoA-Iでは、40°Cでは $\alpha$ -ヘリックス構造に変化は見られず、60°C以上において熱変性が始まり90°Cにおいても完全な変性は見られないなど、安定性はほぼ同じであった。ナノディスク中NSP、apoA-Iの $\alpha$ -ヘリックス構造の熱変性結果は熱による粒子径変化とよく一致しており、NSP、apoA-I共に60°C付近からナノディスクが崩壊し始めることを示した。今回、ペプチド中 $\alpha$ -ヘリックス構造の熱変性結果と粒子径変化結果の一致からナノディスク自体の安定性に $\alpha$ -ヘリックス構造は深く関連していると考えられる。

### 4.3 小括

NSP は 4F よりも希釈安定性や熱安定性に優れており、apoA-I と同程度の安定性を示した。4F と NSP は同程度の疎水性をもつが (Table 1)、ナノディスク上における $\alpha$ -ヘリックス含有率はバイヘリカルペプチドである NSP の方が高く (Table 2)、 $\alpha$ -ヘリックス構造がナノディスクの熱力学的安定性に重要であると考えられる。 $\alpha$ -ヘリックス構造は、apoA-I ナノディスク形成時において重要な役割を担っている<sup>39,47</sup>。同様に apoA-I 模倣ペプチドにおいても $\alpha$ -ヘリックス構造と脂質-ペプチド相互作用の関連が報告されており<sup>41</sup>、 $\alpha$ -ヘリックス構造を固定した”Stapled peptide”は DMPC 可溶化能が上昇する<sup>48</sup>。Imura らは、apoA-I の部分ペプチドの自己会合性と $\alpha$ -ヘリックス構造がナノディスク形成に重要であることを報告している<sup>44</sup>。本研究において、バイヘリカルペプチド NSP はモノヘリカルペプチド 4F より高い $\alpha$ -ヘリックス含有率をもち (Table 2)、ナノディスク上でリン脂質と強く相互作用していること (Fig. 10) を示した。我々の知見と一致するように、18A の二量体である 37pA は、モノヘリカルペプチド 2F と比較して $\alpha$ -ヘリックス含有率が高く、安定なナノディスクを形成する<sup>17,29</sup>。Pro を介した両親媒性ペプチドの結合は、協同的効果によって $\alpha$ -ヘリックス構造形成性および脂質親和性を上昇させると考察される<sup>42</sup>。

## 5. 結語

安定なナノディスクを形成する骨格ペプチドを目指し、新規ナノディスク骨格ペプチド NSP を創製した。モノヘリカルペプチド 4F を基に Pro を介して N 末端側に 2F を結合させた非対称バイヘリカル構造を有する NSP は、調製時のリン脂質/ペプチド質量比に依存したナノディスクサイズの調製が可能であった。従来のナノディスク骨格タンパク質である apoA-I や MSP を用いてディスクのサイズ制御をする場合、目的とするサイズに合わせた欠損変異体もしくは挿入変異体を調製する必要がある。リン脂質との組成比のみでディスクサイズの制御が可能であることはペプチドをナノディスク骨格とする利点の一つである。一方で、ペプチドを骨格としたナノディスクは一般的に不安定であり<sup>26</sup>、本研究においても 14A ナノディスクは SEC により分解することが示された (Fig. 13)。我々が創製した NSP は、4F を基本骨格としタンデムヘリカル構造化することにより SEC に対して安定 (Fig. 8A) かつ 4F よりも希釈安定性の高いナノディスクを形成した (Fig. 14)。

さらに、ナノディスク上 4F は生体内温度に近い 40°C 付近から変性し始め 60°C で完全に変性するのに対して、NSP は 90°C 付近でも完全に変性せず apoA-I と同程度の高い熱安定性を示した (Fig. 15)。このナノディスク上ペプチドの熱に対する安定性はナノディスク自体の安定性をよく反映しており (Fig. 16)、骨格ペプチド中  $\alpha$ -ヘリックス構造がナノディスク自体の安定性を規定していると考えられる。ペプチド骨格ナノディスクの欠点である安定性の改善に成功し、apoA-I と同程度の熱安定性をもつナノディスクを形成するペプチドを本研究で初めて報告する。NSP は 4F よりも高い  $\alpha$ -ヘリックス含量を有しており (Table 2)、ナノディスク中でリン脂質二重膜のアシル鎖部分と強く相互作用している (Fig. 10)。同じように 18A を 2 分子結合させた 37pA は 18A よりも脂質との相互作用が強くなることから、バイヘリカル構造がペプチドの  $\alpha$ -ヘリックス形成性と安定性を向上させると考察される。これらの知見は、新たにナノディスク骨格ペプチドを設計していく上で有用な情報となる。

また、apoA-I と異なり、NSP は中性条件下で POPC のような安定なベシクルを可溶化し、自発的にナノディスクを形成することが可能である。このような界面活性剤フリーのナノディスク調製は、ディスク調製時の作業コストを減らすだけでなく、細胞膜をナノディスクへ直接変換できる可能性を秘めている。NSP ペプチドを骨格としたナノディスクが apoA-I や MSP などのタンパク質骨格ナノディスクと同程度の安定性を示すことから、今後、ペプチドとタンパク質それぞれの特徴を活かした応用が進むことを期待したい。

## 6. 実験

### 6.1 材料

Fmoc アミノ酸誘導体、樹脂は Merck Millipore より、その他の使用した試薬は、関東化学、シグマアルドリッチ、東京化学工業、和光純薬、ペプチド研究所、渡辺化学より購入した。POPC は日油 (株) から入手した。ApoA-I は、大腸菌発現系により作製した<sup>49</sup>。

### 6.2 固相ペプチド合成

#### 6.2.1 SEALide ペプチド(1)

Rink amide AM 樹脂 400 mg (0.6 mmol/g, 0.24 mmol) を *N,N*-diethylformamide (DMF) にて洗浄 (1 分間×3) 後、20% piperidine/DMF 溶液にて脱保護を行った (5、25 分間)。樹脂を DMF にて洗浄 (1 分間×6) 後、DMF (2.9 ml) に溶解した Fmoc-Ala-OH (448 mg, 4.0 equiv.)、1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (195 mg, 4.0 equiv.) 及び *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIPCI) (223  $\mu$ l, 4.0 equiv.) と室温で 1 時間半反応させた。DMF にて洗浄 (1 分間×6) 後、20% piperidine/DMF 溶液にて脱保護を行った (5、25 分間)。再び樹脂を DMF にて洗浄 (1 分間×6) 後、DMF (1.4 ml) に溶解した Fmoc-Ala-SEALide(Trt)-OH (528 mg, 2.0 equiv.)、*O*-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HATU) (246 mg, 1.8 equiv.) 及び *N,N'*-diisopropylethylamine (DIEA) (125  $\mu$ l, 2.0 equiv.) と室温で 2 時間半反応させた。DMF にて洗浄 (1 分間×6) 後、DMF (2 ml) に溶解した acetic anhydride (113  $\mu$ l, 10.0 equiv.) 及び pyridine (96  $\mu$ l, 10.0 equiv.) と 25 分間反応させた。得られた Fmoc-Ala-SEALide-Ala 樹脂に対して、Fmoc 固相合成法のプロトコールに従い、順次 Fmoc アミノ酸を縮合させていくことで、目的の保護ペプチド樹脂を得た (1060 mg)。得られた保護ペプチド樹脂のうち、400 mg を 80:5:5:5:5 v/v/v/v/v trifluoroacetic acid (TFA)/thioanisole/*m*-cresol/ethanedithiol/H<sub>2</sub>O 20 ml にて、2 時間処理した。樹脂をろ過後、TFA 溶液を窒素ガスにて濃縮し、冷 Et<sub>2</sub>O を加えることで、ペプチドを沈殿させた。沈殿したペプチドを冷 Et<sub>2</sub>O にて 2 回洗浄後、0.1% TFA を含むアセトニトリル水溶液に溶解、RP-HPLC にて精製を行った。この時、溶離液には 0.1% TFA アセトニトリル水溶液を用い、流速は、10.0 ml/min とした。分離用カラムには Cosmosil 5C18-AR-II column (20 × 250 mm) (ナカライテスク) を使用した。分取したフラクションを凍結乾燥することで目的の SEALide ペプチド (**1**: Ac-DWLKAFYDKVAEKLKEA-SEALide-A-NH<sub>2</sub>) 28.14 mg を得た (収率: 13%)。目的物の確認は、Waters MICROMASS<sup>®</sup> LCT PREMIER (Waters) により質量分析することで行った。MS (ESI-TOF): found *m/z* 1173.0, calculated for (M+ 2H)<sup>2+</sup> 1172.6。

#### 6.2.2 Cys ペプチド (2)

Rink amide AM 樹脂 170 mg (0.6 mmol/g, 0.10 mmol) を原料として、Fmoc 固相合成を行うことで保護ペプチド樹脂 314 mg を得た。80:5:5:5:5 v/v/v/v/v

TFA/thioanisole/*m*-cresol/ethanedithiol/H<sub>2</sub>O により保護ペプチド樹脂 100 mg からペプチドを切り出した後に RP-HPLC を用いて精製することで目的の Cys ペプチド (**2**) 5.49 mg を得た (収率: 7%)。

MS (ESI-TOF): found *m/z* 823.2, calculated for (M+ 3H)<sup>3+</sup> 823.4.

#### 6.2.3 4F

NovaSynTGR 樹脂 155 mg (0.25 mmol/g, 0.04 mmol) を原料として、Fmoc 固相合成を行うことで保護ペプチド樹脂 240 mg を得た。80:5:5:5:5 v/v/v/v/v TFA/thioanisole/*m*-cresol/ethanedithiol/H<sub>2</sub>O により保護ペプチド樹脂 240 mg からペプチドを切り出した後に RP-HPLC を用いて精製することで 4F 21.6 mg を得た (純度:>95%、収率: 25%)。

MS (ESI-TOF): found *m/z* 770.7, calculated for (M+ 3H)<sup>3+</sup> 770.4.

#### 6.2.4 14A

Rink amide AM 樹脂 210 mg (0.6 mmol/g, 0.13 mmol) を原料として、Fmoc 固相合成を行うことで保護ペプチド樹脂 445 mg を得た。80:5:5:5:5 v/v/v/v/v TFA/thioanisole/*m*-cresol/ethanedithiol/H<sub>2</sub>O により保護ペプチド樹脂 240 mg からペプチドを切り出した後に RP-HPLC を用いて精製することで目的の 14A 62 mg を得た (純度:>95%、収率: 49%)

MS (ESI-TOF): found *m/z* 896.1, calculated for (M+ 2H)<sup>2+</sup> 895.5.

### 6.3 ネイティブケミカルライゲーシオン (NCL)

SEAlide ペプチド **1** (1.1 mg, 0.47 μmol) と Cys ペプチド **2** (1.2 mg, 1.0 equiv.) を 50 mM 4-mercaptophenylacetic acid (MPAA)、30 mM tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)、3M グアニジン、500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解した。37°C にて 23 時間反応後、RP-HPLC により目的物を分取した。分取したフラクションを凍結乾燥することで NSP/A18C (**3**) 1.1 mg を得た (収率: 52%)。

MS (ESI-TOF): found *m/z* 1505.0, calculated for (M+ 3H)<sup>3+</sup> 1504.8

### 6.4 脱硫

得られた NSP/A18C **3** (7.0 mg, 1.54 μmol) を 10 mM glutathione (reduced)、40 mM TCEP 及び 3M グアニジン存在下 500 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) にペプチドを溶解後、ペプチドに対して 20 等量の VA-044 を加え、37 °C にて 24 時間反応させた。RP-HPLC を用いて、目的の NSP (**4**) を単離した(2.7 mg, 収率 37%)

MS (ESI-TOF): found *m/z* 1155.2, calculated for (M+ 2H)<sup>2+</sup> 1155.1.

## 6.5 コール酸透析法によるナノディスク調製<sup>23</sup>

POPC ナノディスクはコール酸透析法により調製した。調製時の POPC/ペプチド質量比は、1.4-2.6 とした (apoA-I の場合は、2.7 で調製した)。

## 6.6 動的光散乱 (DLS) 測定

粒子径の測定は、Zetasizer Nano ZS (マルバーン) により測定した。使用光源は He-Ne レーザー(波長: 633 nm、散乱角: 173°) を用い、25°C にて測定を行った。ナノディスクサンプルはペプチド (タンパク質) 濃度が 25 µg/ml となるように希釈して測定に供した。機器付属のソフトウェアで光散乱データを解析することで体積平均粒子径分布を得た。熱安定性評価時は、各温度までセルを加熱後、DLS 測定を行った。

## 6.7 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

5 µl のサンプルを炭素でコートした glowdischarged Cu grid (G300-C3, 300mesh, Gilder Grids) へ滴下後、100–200 µl の 2% phosphotungstic acid 溶液 (NaOH により pH 7.4 へ調整) を加えた。1 分間インキュベートした後に、過剰の染色液をろ紙で除去した。Grid をランプヒーターで乾燥し、FEI Tecnai F20 transmission electron microscope を用いて 120 kV にて観察を行った。

## 6.8 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC)

調製したナノディスクは、BioLogic DuoFlow システム (Bio-Rad 社) を用いて、Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL カラム (GE ヘルスケア) により精製を行った。溶離液には 100 mM NaCl を含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) を使用し、流速は 0.5 ml/min とした。ナノディスク画分の検出は、280 nm における吸光度にて行った。Fig. 8A に SEC プロファイルの例を示すが、矢印で示したナノディスク画分を回収して物性評価に供した。ペプチド、アポ A-I 濃度は 280 nm における吸光度により、モル吸光係数 (NSP: 13,980 M/cm, 4F: 6,990 M/cm, and apoAI: 32,430 M/cm) を用いて求めた。

## 6.9 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定

CD スペクトルは、J-1500 (日本分光) により測定した。サンプルをペプチド、タンパク質濃度が 25 µg/ml となるように 10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈後、測定に供した。用いたセルは光路長 2 mm、測定温度は 25°C で実施した。(1)式により 222 nm におけるモル楕円率 ( $[\theta]_{222}$ ) から $\alpha$ -ヘリックス含量を算出した<sup>50</sup>。

$$\alpha\text{-ヘリックス含量 (\%)} = [(-[\theta]_{222} + 3000)/(36000 + 3000)] \times 100 \quad (1)$$

熱変性実験は、25°C から 90°C へとサンプル温度を上昇させた際の $[\theta]_{222}$  変化を測定することで行った<sup>49</sup>。

## 6.10 Trp 蛍光測定

蛍光スペクトルは、25°C 下で Hitachi F-7000 spectrophotometer (日立) により測定した。励起波長には 290 nm を用い、300–420 nm 間の蛍光スペクトルを計測した。ペプチドおよび apoA-I 濃度は 10 µg/ml とした。

## 6.11 POPC クリアランス

各ペプチドの脂質可溶化能評価は、POPC MLVs 可溶化に伴う濁度の経時変化を測定することで行った。0.25 mg/ml POPC MLVs に対して、0.1 mg/ml ペプチド (もしくは apoA-I) 溶液を混合後、25°C で 2 時間反応させた際の 325 nm における吸光度変化を Hitachi U-3900H spectrometer (日立) を用いて計測した。

## 6.12 直接可溶化による NSP-POPC ナノディスク調製

POPC MLVs に対して、POPC/NSP 質量比で 1.8 となるように NSP 溶液を混合後、4°C にて一晩反応させることで調製した。

## 7. 参考文献

1. Li, L., *et al.* Double belt structure of discoidal high density lipoproteins: molecular basis for size heterogeneity. *J Mol Biol* **343**, 1293-1311 (2004).
2. Bayburt, T.H. & Sligar, S.G. Membrane protein assembly into Nanodiscs. *FEBS Lett* **584**, 1721-1727 (2010).
3. Mi, L.Z., *et al.* Functional and structural stability of the epidermal growth factor receptor in detergent micelles and phospholipid nanodiscs. *Biochemistry* **47**, 10314-10323 (2008).
4. Pavlidou, M., Hänel, K., Möckel, L. & Willbold, D. Nanodiscs allow phage display selection for ligands to non-linear epitopes on membrane proteins. *PLoS One* **8**, e72272 (2013).
5. Shi, L., *et al.* SNARE proteins: one to fuse and three to keep the nascent fusion pore open. *Science* **335**, 1355-1359 (2012).
6. Serebryany, E., Zhu, G.A. & Yan, E.C. Artificial membrane-like environments for in vitro studies of purified G-protein coupled receptors. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 225-233 (2012).
7. Wang, Z., *et al.* Tyrosine phosphorylation of mig6 reduces its inhibition of the epidermal growth factor receptor. *ACS Chem Biol* **8**, 2372-2376 (2013).
8. Glück, J.M., *et al.* Integral membrane proteins in nanodiscs can be studied by solution NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc* **131**, 12060-12061 (2009).
9. Wang, X., Mu, Z., Li, Y., Bi, Y. & Wang, Y. Smaller Nanodiscs are Suitable for Studying Protein Lipid Interactions by Solution NMR. *Protein J* **34**, 205-211 (2015).
10. Hagn, F., Etzkorn, M., Raschle, T. & Wagner, G. Optimized phospholipid bilayer nanodiscs facilitate high-resolution structure determination of membrane proteins. *J Am Chem Soc* **135**, 1919-1925 (2013).
11. Cavigiolio, G., *et al.* The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. *Biochemistry* **47**, 4770-4779 (2008).
12. Bayburt, T.H., Grinkova, Y.V. & Sligar, S.G. Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Letters* **2**, 853-856 (2002).
13. Denisov, I.G., Grinkova, Y.V., Lazarides, A.A. & Sligar, S.G. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc* **126**, 3477-3487 (2004).
14. Ikeda, K. & Nakano, M. Self-reproduction of nanoparticles through synergistic self-assembly. *Langmuir* **31**, 17-21 (2015).
15. Imura, T., *et al.* Minimum amino acid residues of an  $\alpha$ -helical peptide leading to lipid nanodisc formation. *J Oleo Sci* **63**, 1203-1208 (2014).
16. Kanellis, P., *et al.* Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Effect of charged amino acid residue topography on lipid affinity. *J Biol Chem* **255**, 11464-11472 (1980).



17. Anantharamaiah, G.M., *et al.* Studies of synthetic peptide analogs of the amphipathic helix. Structure of complexes with dimyristoyl phosphatidylcholine. *J Biol Chem* **260**, 10248-10255 (1985).
18. Venkatachalapathi, Y.V., *et al.* Effect of end group blockage on the properties of a class A amphipathic helical peptide. *Proteins* **15**, 349-359 (1993).
19. Midtgaard, S.R., *et al.* Self-assembling peptides form nanodiscs that stabilize membrane proteins. *Soft Matter* **10**, 738-752 (2014).
20. Park, S.H., *et al.* Nanodiscs versus macrodiscs for NMR of membrane proteins. *Biochemistry* **50**, 8983-8985 (2011).
21. Datta, G., *et al.* Effects of increasing hydrophobicity on the physical-chemical and biological properties of a class A amphipathic helical peptide. *J Lipid Res* **42**, 1096-1104 (2001).
22. Fukuda, M., *et al.* Conformational change of apolipoprotein A-I and HDL formation from model membranes under intracellular acidic conditions. *J Lipid Res* **49**, 2419-2426 (2008).
23. Matz, C.E. & Jonas, A. Micellar complexes of human apolipoprotein A-I with phosphatidylcholines and cholesterol prepared from cholate-lipid dispersions. *J Biol Chem* **257**, 4535-4540 (1982).
24. Ranaghan, M.J., Schwall, C.T., Alder, N.N. & Birge, R.R. Green proteorhodopsin reconstituted into nanoscale phospholipid bilayers (nanodiscs) as photoactive monomers. *J Am Chem Soc* **133**, 18318-18327 (2011).
25. Mishra, V.K., *et al.* Association of a model class A (apolipoprotein) amphipathic alpha helical peptide with lipid: high resolution NMR studies of peptide.lipid discoidal complexes. *J Biol Chem* **281**, 6511-6519 (2006).
26. Miyazaki, M., Tajima, Y., Handa, T. & Nakano, M. Static and dynamic characterization of nanodiscs with apolipoprotein A-I and its model peptide. *J Phys Chem B* **114**, 12376-12382 (2010).
27. Tamagaki, H., *et al.* Coupling of transmembrane helix orientation to membrane release of the juxtamembrane region in FGFR3. *Biochemistry* **53**, 5000-5007 (2014).
28. Mishra, V.K., Palgunachari, M.N., McPherson, D.T. & Anantharamaiah, G.M. Lipid complex of apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F is a novel platform for paraoxonase-1 binding and enhancing its activity and stability. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 975-980 (2013).
29. Gomaschi, M., *et al.* Anti-inflammatory and cardioprotective activities of synthetic high-density lipoprotein containing apolipoprotein A-I mimetic peptides. *J Pharmacol Exp Ther* **324**, 776-783 (2008).
30. Wool, G.D., Reardon, C.A. & Getz, G.S. Apolipoprotein A-I mimetic peptide helix number and helix linker influence potentially anti-atherogenic properties. *J Lipid Res* **49**, 1268-1283 (2008).
31. Sethi, A.A., *et al.* Asymmetry in the lipid affinity of bihelical amphipathic peptides. A structural

- determinant for the specificity of ABCA1-dependent cholesterol efflux by peptides. *J Biol Chem* **283**, 32273-32282 (2008).
32. Villain, M., Gaertner, H. & Botti, P. Native chemical ligation with aspartic and glutamic acids as C-terminal residues: Scope and limitations. *European Journal of Organic Chemistry* **2003**, 3267-3272 (2003).
  33. Sviridov, D.O., *et al.* Hydrophobic amino acids in the hinge region of the 5A apolipoprotein mimetic peptide are essential for promoting cholesterol efflux by the ABCA1 transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **344**, 50-58 (2013).
  34. Sato, K., *et al.* N-sulfanylethylanilide peptide as a crypto-thioester peptide. *Chembiochem* **12**, 1840-1844 (2011).
  35. Wan, Q. & Danishefsky, S.J. Free-radical-based, specific desulfurization of cysteine: a powerful advance in the synthesis of polypeptides and glycopolypeptides. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**, 9248-9252 (2007).
  36. URL: <http://web.expasy.org/protparam/>.
  37. Massey, J.B. & Pownall, H.J. Cholesterol is a determinant of the structures of discoidal high density lipoproteins formed by the solubilization of phospholipid membranes by apolipoprotein A-I. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 245-253 (2008).
  38. Grinkova, Y.V., Denisov, I.G. & Sligar, S.G. Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers. *Protein Eng Des Sel* **23**, 843-848 (2010).
  39. Saito, H., *et al.* Alpha-helix formation is required for high affinity binding of human apolipoprotein A-I to lipids. *J Biol Chem* **279**, 20974-20981 (2004).
  40. Saito, H., Lund-Katz, S. & Phillips, M.C. Contributions of domain structure and lipid interaction to the functionality of exchangeable human apolipoproteins. *Prog Lipid Res* **43**, 350-380 (2004).
  41. Zheng, Y., Patel, A.B., Narayanaswami, V. & Bielicki, J.K. Retention of  $\alpha$ -helical structure by HDL mimetic peptide ATI-5261 upon extensive dilution represents an important determinant for stimulating ABCA1 cholesterol efflux with high efficiency. *Biochem Biophys Res Commun* **441**, 71-76 (2013).
  42. Mishra, V.K., *et al.* Effect of the arrangement of tandem repeating units of class A amphipathic alpha-helices on lipid interaction. *J Biol Chem* **270**, 1602-1611 (1995).
  43. Kono, M., *et al.* Disruption of the C-terminal helix by single amino acid deletion is directly responsible for impaired cholesterol efflux ability of apolipoprotein A-I. *J Lipid Res* **51**, 809-818 (2010).
  44. Imura, T., *et al.* Surfactant-like Properties of an Amphiphilic  $\alpha$ -Helical Peptide Leading to Lipid Nanodisc Formation. *Langmuir* **30**, 4752-4759 (2014).
  45. Jayaraman, S., Benjwal, S., Gantz, D.L. & Gursky, O. Effects of cholesterol on thermal stability of discoidal high density lipoproteins. *J Lipid Res* **51**, 324-333 (2010).

46. Mishra, V.K., *et al.* Effect of leucine to phenylalanine substitution on the nonpolar face of a class A amphipathic helical peptide on its interaction with lipid: high resolution solution NMR studies of 4F-dimyristoylphosphatidylcholine discoidal complex. *J Biol Chem* **283**, 34393-34402 (2008).
47. Tanaka, M., *et al.* Influence of tertiary structure domain properties on the functionality of apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **47**, 2172-2180 (2008).
48. Sviridov, D.O., *et al.* Helix stabilization of amphipathic peptides by hydrocarbon stapling increases cholesterol efflux by the ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **410**, 446-451 (2011).
49. Saito, H., *et al.* Domain structure and lipid interaction in human apolipoproteins A-I and E, a general model. *J Biol Chem* **278**, 23227-23232 (2003).
50. Handa, D., *et al.* Kinetic and thermodynamic analyses of spontaneous exchange between high-density lipoprotein-bound and lipid-free apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **54**, 1123-1131 (2015).

## 8. 謝辞

本研究を進めるに当たり終始ご指導とご鞭撻を賜りました現京都薬科大学薬品物理化学分野の齋藤博幸教授に心より感謝の意を表します。齋藤教授には、研究テーマに関するだけでなく研究に対する考え方をお教えいただきました。徳島大学大学院医歯薬学研究部の奥平桂一郎准教授には、研究に関する知識をご教授いただきましたことを深く感謝いたします。

徳島大学大学院歯薬学研究部 大高章教授、重永章講師には、ペプチド合成を始めとして様々にご教授をいただきました。

産業技術総合研究所の馬場照彦博士には、実験に関するだけでなく、論文作成時に終始丁寧にご指導をいただきました。心よりお礼申し上げます。産業総合研究所 TIA EM チームの巖康敏博士と広瀬恵子博士には電子顕微鏡画像撮影をしていただきましたこと、お礼申し上げます。

また、徳島大学薬学部・薬科学教育部機能分子合成薬学研究室の辻耕平博士、宮島凜学士には、SEAlide の合成、ペプチド合成においてお世話になりました。

在籍いたしました製剤分子設計学研究室の皆様には、種々の点でお世話になりましたこと、感謝いたします。特に新村航学士、木村仁学士、灘井亮君には、本研究を進めるに当たって、実験面で大きく助けていただきました。現国立医薬品食品衛生研究所 原矢佑樹博士とは、お互いの研究について議論することで多くを学ぶことが出来ました。

最後になりましたが、これまで終始支え続けてくれました家族に感謝いたします。中でも、博士後期課程在籍中に新しく家族となりました妻と娘に心より感謝いたします。