

## アミロイドペプチドのモデル薄膜の分子凝集構造に関する分光学的研究

神野 英毅 (応用分子化学科) 長谷川 健 (東工大)

### 1. 緒言

人間の脳内での $\beta$ -アミロイド(A $\beta$ )の凝集は、アルツハイマー病やプリオン病などの原因のひとつであると考えられているが、A $\beta$ の凝集構造や凝集沈着のメカニズムは解明されていない。そこで、A $\beta$ の凝集構造や凝集沈着のメカニズムを詳細に検討するため、A $\beta$ 中の主要なペプチドセグメント(II GLM)を含む両親媒性のモデル化合物C<sub>18</sub> II GLM-X (X=-NH<sub>2</sub>と-OH)を水面上に展開して単分子膜とした。これらの単分子膜に圧力を与えると、分子配向をそろえることができるため、単分子膜中の平均的な分子構造が一分子の構造によく対応するようになる。

第1部では、両親媒性のモデル化合物C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>を水面上に展開し、面内方向に圧力をかけて凝集させ、抗体基板上に作製して1層LB膜とし、赤外多角入射分解(赤外MAIR)分光法を始めとする種々の赤外分光法により構造異方性解析を行った。また、すでに研究されているC<sub>18</sub> II GLM-OHを1層LB膜の凝集構造<sup>1)</sup>とC<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>1層LB膜の凝集構造を比較した。

一方、Gongo red (CR) 分子は、アミロイドペプチドと結合することが知られている<sup>2)</sup>。この結合特性によりCR分子とC<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>分子が相互作用を示し、単分子膜の凝集を抑制することが期待される。

第2部では、C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>分子膜を希薄なCR水溶液を下層溶液として作製し、CR分子とC<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>分子の相互作用および分子配向を赤外分光法や紫外・可視分光法を用いて検討した。

### 2. 実験

本研究で用いた両親媒性化合物C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub> (Fig. 1 (a)、分子質量779.17)は、米国マイアミ大学のLeblancグループにより提供された。この化合物をクロロホルム-メタノール(体積比5:1)混合溶液(0.375 mg mL<sup>-1</sup>)とし、3種類の異なるCR (Fig. 1 (b))水溶液(0.1×10<sup>-7</sup>、1×10<sup>-8</sup>M)上に展開して単分子膜を作製した。その後、BAMにより、この単分子膜の凝集体の成長を観察すると同時に、表面圧-表面積( $\pi$ -A)と表面双極子

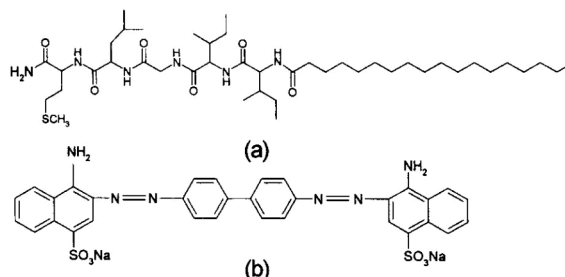


Fig. 1 Chemical structures of (a) C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub> and (b)aCR.

モーメント( $\Delta\mu_{\perp}$ )-A等温曲線を測定した。さらに、C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>1層LB膜をガラス基板上およびゲルマニウム(Ge)基板上にそれぞれ作製し、紫外・可視分光法と赤外MAIR分光法により解析をした。

### 3. 結果および考察

#### 3.1 水面上C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>展開単分子膜の検討

C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>分子を純水面上に展開して単分子膜とし、この展開単分子膜を、可動壁をスライドさせて膜面内方向に圧縮した。この時得た $\pi$ -A等温曲線をFig. 2 (実線)に示す。C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub>展開単分子膜の圧縮(膜面積の減少)に伴い、表面積1.7 nm<sup>2</sup> molecule<sup>-1</sup>付近で表面圧の上昇が始まった。 $\pi$ -A等温曲線は、その後、短い表面緩和領域を経て、凝集膜でよく見られる直線的な表面の上昇を示している。

また、極限面積( $\pi$ -A等温曲線を補外した直線の表面積軸切片の値;膜分子の断面積に相当)は、1.36 nm<sup>2</sup> molecule<sup>-1</sup>であった。

この値は、アルキル基鎖1本の断面積(約0.21 nm<sup>2</sup>

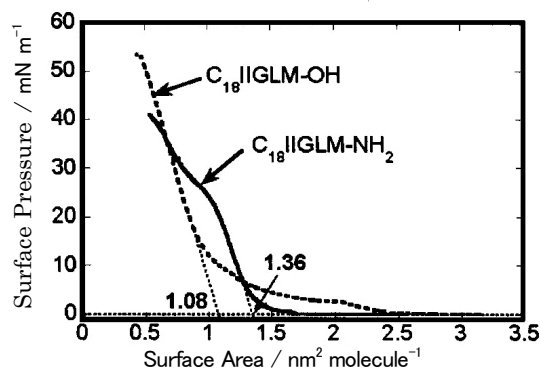


Fig. 2 Surface pressure-area isotherms of C<sub>18</sub> II GLM-NH<sub>2</sub> (solid line) and C<sub>18</sub> II GLM-OH (dashed line) measured at 18°C.

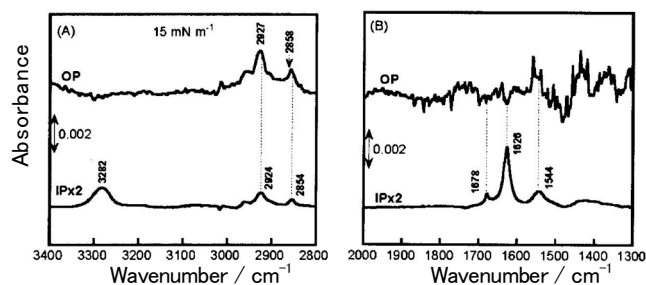


Fig. 3 FT-IR MAIRS spectra of the  $C_{18}$  II GLM- $NH_2$  monolayer LB film deposited on a Ge substrate at  $15 \text{ mN m}^{-1}$  (A)  $2800\text{--}3400 \text{ cm}^{-1}$  and (B)  $1300\text{--}2000 \text{ cm}^{-1}$ .

molecule<sup>-1</sup>) の約6倍にもなり、分子のペプチド部分に側鎖があることを考慮しても、直立した $C_{18}$  II GLM- $NH_2$ 分子の断面積としてはあまりにも大きすぎる。このことから、 $C_{18}$  II GLM- $NH_2$ 分子は直立しておらず、膜面に平行に配向していると考えられる。

我々は以前、末端基が $-NH_2$ 基の代わりに $-OH$ 基を持つ $C_{18}$  II GLM- $OH$ 分子からなる膜を研究した $C_{18}$  II GLM- $OH$ 展開単分子膜の $\pi$ - $A$ 等温曲線をFig. 2 (破線) に示す。極限面積は、 $1.08 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$ である。 $C_{18}$  II GLM- $NH_2$ 単分子膜の極限面積は、 $C_{18}$  II GLM- $OH$ 単分子膜の極限面積よりも有意に大きいため $C_{18}$  II GLM- $OH$ 単分子膜とは異なる凝集構造の単分子膜を形成していると考えられる。

$C_{18}$  II GLM- $NH_2$ 展開単分子膜を詳細に検討するために、表面圧の変化と同時に表面ポテンシャル変化の測定も行った。その際、表面ポテンシャルは、膜法線方向の表面双極子モーメントに変換した。表面双極子モーメントの変化は、大きな双極子モーメントを有する基の配向の変化を対応しているため、 $C_{18}$  II GLM- $NH_2$ 分子の場合、主として $C=O$ 結合や $N-H$ 結合の配向変化に対応している。一般に軟らかくて安定な単分子膜の場合、単分子膜圧縮に伴う表面双極子モーメントの第一段階の急激な上昇が終わってから、表面圧の上昇が始まるという特徴がある。 $C_{18}$  II GLM- $OH$ 単分子膜を圧縮した場合は、まさにこのような現象がみられた。

一方、 $C_{18}$  II GLM- $NH_2$ 単分子膜では、表面双極子モーメントの上昇は遅く、表面圧の上昇が始まってから、双極子モーメントの急激な上昇が見られる。このことから、 $C_{18}$  II GLM- $NH_2$ 単分子膜は、 $C_{18}$  II GLM- $OH$ 単分子膜を上まわるさらに強い分子凝集力により形成した硬い膜であると考えられる。さらに圧縮すると、表面圧 $22 \text{ mN m}^{-1}$ 付近で $\pi$ - $A$ 曲線の勾配 ( $-\Delta\pi/\Delta A$ ) が減少している。

このため、膜の崩壊が懸念される (Fig. 1)。しかし、表面圧は $40 \text{ mN m}^{-1}$ 付近まで再び増加し始めているので、表面圧 $22 \text{ mN m}^{-1}$ 以降の表面圧勾配の減少は、崩壊とは異

なる膜の凝集構造の変化を反映したものと考えられる。このことは、表面圧 $22 \text{ mN m}^{-1}$ 前後の表面圧 $15$ および $30 \text{ mN m}^{-1}$ での同じ単分子膜の繰り返し圧縮実験からも確認できた。

### 3.2 赤外MAIR分光法による構造異方性解析

分子の凝集構造を官能基レベルで検討するため、2つの表面圧 $15$ および $30 \text{ mN m}^{-1}$ でGe基板上に転写して1層LB膜とし、このLB膜の凝集状態を赤外MAIR分光法により解析した。

Fig. 3のスペクトルを見ると、表面圧 $15 \text{ mN m}^{-1}$ では、アミド I バンド (主として $C=O$ の伸縮振動バンド) が $1678$ および $1626 \text{ cm}^{-1}$ の2つの位置に分裂して現れている。このバンド位置は、膜分子が逆平行 $\beta$ シート構造を形成していることを示唆している。水素結合した $N-H$ 基に相当する $N-H$ 伸縮振動バンド ( $3282 \text{ cm}^{-1}$ ) は、IPスペクトルのみで現れており、そのMAIRS二色比は、 $N-H$ 基が膜面内方向に配向していることを示唆する。 $N-H$ 基は逆平行 $\beta$ シート構造にあたるので、 $\beta$ シート全体が水面に完全に平行に配向していると考えられる。また、この逆平行 $\beta$ シート構造は、大きな極限面積を説明でき、Fig. 2の結果を支持する。

次に、 $2800\text{--}3000 \text{ cm}^{-1}$ 領域での $CH$ 伸縮振動バンドに注目する。IPスペクトルでの $CH_2$ 対称および逆伸縮振動バンドは、それぞれ $2854$ および $2924 \text{ cm}^{-1}$ にあらわれている。一方、OPスペクトルでの $CH_2$ 対称および逆対称伸縮振動バンドは、それぞれ $2848$ および $2927 \text{ cm}^{-1}$ とIPに比べて高波数位置に現れている。このバンドシフトは、アルキル鎖が膜面に比較的垂直に立った状態で折りたたみ構造をもつ場合に見られることがわかっている<sup>4)</sup>。以上のことから、表面圧 $15 \text{ mN m}^{-1}$ での $C_{18}$  II GLM- $NH_2$  1層LB膜は膜面に平行な逆平行 $\beta$ シート構造をもち、アルキル鎖の秩序性が低いものであると考えられる。

一方、表面圧 $30 \text{ mN m}^{-1}$ での $C_{18}$  II GLM- $NH_2$  1層LB膜も同様に逆平行 $\beta$ シートを形成していることが確認できた。

また、アミド I バンドの分子配向角解析の結果、逆平行  $\beta$  シート構造を基本骨格としたアラインドドメインが膜面内にはほぼランダムに配向しており、表面圧  $15 \text{ mN m}^{-1}$  と同様にアルキル鎖が折りたたまれたモデルが得られた。主として逆平行  $\beta$  シート構造が単分子膜の構造を支配しており、アルキル鎖は支配的な要因にならないといえる。言い換えると、単分子膜構造は、膜分子が純水上に添加された直後の早い段階で逆平行  $\beta$  シート構造を形成し、それが圧縮により凝集することで決まるのである。この解析結果は、非常に硬い単分子膜を示唆する  $\pi$ -A,  $\Delta \mu_{\perp}$ -A 等温曲線の結果を支持している。

### 3.3 第1部のまとめ

$\text{C}_{18}$  II GLM-OH 単分子膜は、平行  $\beta$  シート構造を形成するのに対し、 $\text{C}_{18}$  II GLM-NH<sub>2</sub> 単分子膜は、‘逆’平行  $\beta$  シート構造を形成することが明らかになった。すなわち、小さな末端基がひとつ異なるだけで探開し膜の凝集構造が大きく異なることが明らかになった。また、異なる  $\beta$  シート構造をとるため、両者の極限面積に有意な差が表れたと考えられる<sup>5)</sup>。

### 3.4 Congo red (CR) 水溶液上 $\text{C}_{18}$ II GLM - NH<sub>2</sub> 展開単分子膜の検討

純水上で測定された  $\pi$ -A 等温曲線の面積は  $1.34 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$  となった (Fig. 1)。一方、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の濃度の CR 水溶液上で測定された  $\pi$ -A 等温曲線の極限面積は、 $1.44 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$  となった。純水および CR 水溶液上の極限面積を比較すると、CR 水溶液上の極限面積の方が 7.5% 大きい。これは、CR 水溶液との相互作用により単分子膜が広がることを意味する。

そこで次に、表面トポグラフィの違いを検討するために、低い表面圧 ( $\pi \approx 0$ ) での純水および CR 水溶液上の BAM 観察を行った。純水上では、多くの分子凝集に対応する斑点模様がほとんど見られなかった。CR 水溶液上での均一な BAM 像は、CR 分子と  $\text{C}_{18}$  II GLM - NH<sub>2</sub> 単分子膜間に特異的な分子相互作用を起こした結果であると考えられる。すなわち、相互作用により CR 分子が単分子膜に入り込み、極限面積を  $1.34 \rightarrow 1.44 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$  に増加させたと考えられる。

さらに、純水および  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の CR 水溶液上での配向変化を表面双極子モーメントにより検討した結果、以下の 2 つの点で互いに大きく異なった。

#### ① 表面双極子モーメントおよび表面圧の増加するタイミング

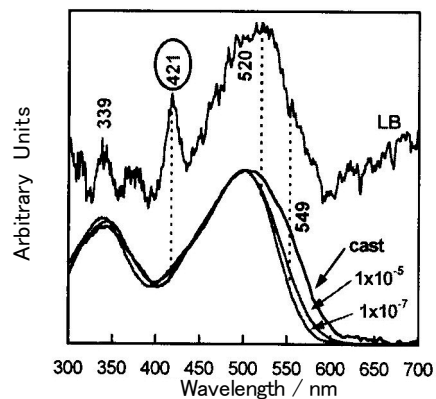


Fig. 4 UV-vis adsorption spectra of CR aqueous solutions of  $1 \times 10^{-7}$  and  $1 \times 10^{-5}$ , and a CR cast film. The upper spectrum is a transmission one of a single-monolayer LB film of  $\text{C}_{18}$  II GLM-NH<sub>2</sub> on CR aqueous solution of  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ .

#### ② 表面双極子モーメント曲線のスパイクノイズ強度と頻度

純水上での単分子膜を圧縮すると、表面圧の上昇 (表面積  $1.7 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$  付近) が表面双極子モーメントの上昇 (表面積  $1.4 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$  付近) よりも早くに始まっていた。一方、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の CR 水溶液上の展開単分子膜は純水上の展開単分子膜と異なった結果を示した。表面双極子モーメントの上昇は非常に早く、上昇の傾きは表面積  $1.5 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$  付近で大きくなった。同時に表面積が上昇し始めた。この一連の挙動は、軟らかい単分子膜の表面圧の上昇のパターンと同じであり、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の CR 水溶液上で作成した単分子膜は、純水上で作製した単分子膜より軟らかい膜であることを示唆する。これらの結果は、前述の BAM 像の観察結果と一致する。

表面双極子モーメント等温曲線で他に注目すべき点は、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の CR 水溶液上での等温曲線では、急激な増加を生じる前に、ピークのような大きなスパイクが多数観測されたことである。同様なスパイクは純水上で展開した単分子膜の表面双極子モーメント等温曲線上でも多少は見られたが、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の CR 水溶液上でのスパイクよりもはるかに弱かった。このピークのような大きなスパイクは、分子配向変化や緩和が繰り返すおこるということを示唆する。つまり  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  の CR 水溶液上での膜分子の凝集は、純水上に比べて緩くなっているといえる。

以上のことから、希薄な CR 下層水は  $\text{C}_{18}$  II GLM-NH<sub>2</sub> 単分子膜の分子凝集抑制に重要な役割をになっていることがわかった。したがって、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$  より濃度の高い CR 水溶液を使えば、さらなる凝集の抑制が期待された。そこで 100 倍の濃度にあたる  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$  の CR 水溶液を調整し、

これを下層水溶液として $C_{18}$  II GLM-NH<sub>2</sub>単分子膜を作製し、 $\pi$ -A等温曲線を測定した。予想に反して、極限面積は $1.39 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$ となった。この極限面積の値は、希薄な $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ の水溶液の極限面積の値 ( $1.44 \text{ nm}^2 \text{ molecule}^{-1}$ ) より明らかに小さい。この結果は、CR分子が $10^{-5} \text{ M}$ の濃度レベルでは会合し、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ の濃度ではCR分子がモノマーとして形成していることを示唆している。

### 3.5 $C_{18}$ II GLM-NH<sub>2</sub> 1層LB膜の構造異方性解析

そこで、CR分子と $C_{18}$  II GLM-NH<sub>2</sub>単分子膜間相互作用を検討するために、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ のCR水溶液上に作製した $C_{18}$  II GLM - NH<sub>2</sub>単分子を、表面圧 $15.0 \text{ mN m}^{-1}$ でGe基板上に転写し、1層LB膜とした後、赤外MAIR分光法により解析した。

その結果、IPスペクトルではアミドIバンドが $1678$ および $1626 \text{ cm}^{-1}$ の2つの位置に分裂して現れている。このバンド位置は、逆平行 $\beta$ シート構造を形成していることを示唆している。さらに、アミドIバンドに対応するN-Hの伸縮振動バンドもIPスペクトルに強く現れており、 $\beta$ シートが膜面内に配向しているといえる。

CR水溶液上の単分子膜のスペクトルで他に注目すべきことは、N-Hの伸縮振動バンド ( $3282 \text{ cm}^{-1}$ 付近) にブロードなバンドが重なっている点である。一方、純水上では、ブロードなバンドが見られない。これは、CR水溶液表面でCR分子と $C_{18}$  II GLM - NH<sub>2</sub>膜分子が相互作用することにより、膜中の水素結合様式が変化して分子凝集が阻害され、ブロードなバンドとして現れたことを示唆する。対応するアミドIバンドは、顕著にはブロード化していないが、バンド強度の減少は表面積補正後も29%と顕著であった。

以上のことから、赤外分光法によってもCR分子による $C_{18}$  II GLM - NH<sub>2</sub>分子の凝集抑制が裏づけられた。

### 3.6 紫外・可視分光法による分子配向解析

CR分子が膜中にどのように入り込んでいるかを検討するために、濃度の異なる3種類のCR試料(異なる分子会合程度；(1)  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ のCR溶液 (2)  $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ のCR溶液 (3) 石英基板上に転写したキャスト膜を調整し、紫外・可視分光法により測定した (Fig. 4) 特徴を以下にまとめる。

① 短波長側では会合が進むにつれ、 $338 \text{ nm} \rightarrow 345 \text{ nm}$ にバンドがシフトする。

② 長波長側では、 $500 \text{ nm}$  付近のバンドの他に、新

なバンドが $550 \text{ nm}$  付近に現れ (二次微分法により決定する)、会合が進むにつれ、バンド強度が増加する。

③  $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ のCR溶液のスペクトルには、 $423 \text{ nm}$ にバンド成分がある (二次微分法により確認)

異なる会合状態のCR分子の紫外・可視スペクトルの基本的な特徴を把握した後、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ のCR水溶液上で作製した $C_{18}$  II GLM - NH<sub>2</sub> 1層LB膜を紫外・可視分光法により測定した (Fig. 4)。 $C_{18}$  II GLM-NH<sub>2</sub> 1層LB膜のスペクトルには、 $520 \text{ nm}$  付近にブロードなバンドが現れている。このピーク位置はCR水溶液上のバンド ( $500 \text{ nm}$  付近) から長波長側にシフトして現れているように見える。しかし、バンドの幅は、 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ でのCR水溶液のバンド幅よりも右肩がより大きく膨らんでいる。このことから、 $500 \text{ nm}$ 付近のバンドと会合したCR分子種 ( $550 \text{ nm}$ ) のバンドが重なって、見かけ上シフトして現れていると考えられる。実際、 $339 \text{ nm}$ でのマーカーバンドが同時に現れていることから正しいといえる。すなわち、LB膜中にはCR分子の会合体とモノマーが共存していることを示唆する。

さらに、 $421 \text{ nm}$  に現れている非常にシャープなバンドはCR水溶液とキャスト膜のスペクトルでは見られないものである。このバンドが $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ のCR水溶液のスペクトルに含まれるバンド位置 ( $423 \text{ nm}$ ) とほとんど同じなので、LB膜中にモノマーCR分子が存在しているといえる。もし、会合したCR分子が存在しているならば、種々の状態を反映したブロードなバンドになるはずなので、バンドがシャープであるということは、モノマー由来のバンドであることを強く示唆する。一方、このバンドだけがスペクトル中で非常に強く表れているのは、単分子膜中のモノマーがCR分子の配向によるものであると考えられる。

すなわち、CR分子の長軸が膜面内方向に配向し、短軸が膜法線方向を向いた状態で、膜中に入り込む、膜分子の凝集阻害モデルを得た<sup>6)</sup>。

## 4. 参考文献

- 1) T. Tasegawa, et al., *J. Phys. Chem. B* **109**, 12856 (2005).
- 2) I. Roterman, et al., *Med. Sci. Mon.* **7**, 77 (2001).
- 3) V. Kaganer, et al., *Rev. Mon. Phys.* **71**, 779 (1999).
- 4) T. Hasegawa, *Anal Bioanal. Chem.* **388**, 7 (2007).
- 5) T. Hasegawa, et al., *J. Phys. Chem. B* (2008) in press.
- 6) T. Hasegawa, et al., *J. Phys. Chem. B* **111**, 14227 (2007).