

新 制
理
968
京大附図

学位申請論文

石黒 亮

膜融合活性ペプチドと脂質二重膜との相互作用に関する  
分光学的研究

石黒 亮

京都大学大学院 理学研究科 生物物理学専攻

1996年

## 論文要旨

インフルエンザウイルスは膜タンパク質、hemagglutinin を用いてウイルス膜と宿主細胞とを融合させ、宿主細胞に感染する。hemagglutinin は酸性 pH 環境下で活性化するが、hemagglutinin の活性部位と目される疎水性領域 (融合ペプチドと呼ばれている) と同じアミノ酸配列を持つ 20 残基長の合成ペプチドもまた、酸性 pH において、共存する中性リン脂質のリポソーム (人工脂質二重膜小胞) の融合を引き起こす。これまでに、このペプチドのアミノ酸配列をもとに多くの類似ペプチドが合成され、その立体構造や膜融合活性についての研究がなされてきた。これらのペプチドはリポソームに結合して両親媒性  $\alpha$  ヘリックス構造をとるが、その膜融合活性はアミノ酸配列に大きく依存しており、それらのアミノ酸配列上の特徴が脂質二重膜内におけるペプチドのどのような挙動につながり、どのようにして膜融合活性を引き起こすのかは不明であった。

今回 ATR (attenuated total reflection) 法を用いて、基板上に調製した中性リン脂質 (phosphatidylcholine) の平面脂質二重膜の赤外線吸収スペクトルを測定し、ペプチドの脂質二重膜への結合に伴うスペクトルの変化を解析することによって、膜融合活性ペプチドの脂質二重膜との結合挙動と、膜平面に対するペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸の配向、およびペプチドの結合による脂質の炭化水素鎖の配向の変化を決定した。

その結果、膜融合活性ペプチドは活性を示す酸性 pH において脂質二重膜との協同的な結合挙動を示し、その結合等温線の解析から、膜内においてペプチドが 2 量体化することが示唆された。また、ペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸は膜平面に対してほぼ平行であった。同時に、脂質の炭化水素鎖の配向はペプチドの結合量に伴って変化しており、膜融合活性ペプチドの結合によって脂質二重膜構造が不安定化する過程が観察された。一方、活性を示さない中性 pH では、ペプチドと脂質二重膜との結合に協同性は観察されず、また、ペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸は酸性 pH の場合よりも傾くか、または配向性が低下した。

次に、様々な両親媒性 $\alpha$ ヘリックス型ペプチドに対して同様の解析をおこなったところ、膜融合活性を持つペプチドではペプチドの2量体化による脂質二重膜との協同的結合が観察されたのに対し、膜融合活性を持たないペプチドではそのような協同性は観察されなかった。また、両親媒性ペプチドの $\alpha$ ヘリックス軸はいずれも膜平面に対してほぼ平行な配向をとったが、膜への結合の初期課程において、膜融合活性を持つペプチドでは結合に伴ってその配向性が向上したのに対し、膜融合活性を持たないペプチドでは結合に伴って配向性は低下した。

以上のようなペプチド・脂質二重膜の相互作用と膜融合活性との相関から、膜融合を誘起するのに必要な両親媒性 $\alpha$ ヘリックス型ペプチドの構造的特徴や膜内挙動、および hemagglutinin によって引き起こされる膜融合過程における融合ペプチドの役割について考察する。

## 目次

<b>序論</b>	<b>1</b>
1. 膜融合とタンパク質	1
2. インフルエンザウィルスの膜融合活性タンパク質：HA	2
3. 融合ペプチドと脂質二重膜の相互作用	7
4. $\alpha$ ヘリックス型膜融合活性ペプチドの構造的特徴	10
5. 本研究の目的	11
6. ATR分光法について	12
<b>実験方法</b>	<b>15</b>
1. ペプチドの合成と精製	15
2. ペプチドの定量	16
3. リポソームの調製	17
4. ペプチドの膜融合活性測定	17
5. 円偏光二色性 (CD) スペクトル	18
6. 平面脂質二重膜の調製	19
7. フーリエ変換赤外 (FTIR) スペクトル	23
<b>結果</b>	<b>28</b>
1. フーリエ変換赤外 (FTIR)-ATR スペクトルの解析	28
2. 平面多層脂質二重膜内での脂質およびペプチドの配向	35
3. 脂質単分子膜と平面単層脂質二重膜の物性	37
4. 平面単層脂質二重膜へのペプチドの結合	39
5. 平面単層脂質二重膜内でのペプチドの配向および脂質の配向	44
6. 膜融合活性と膜への結合、および膜内配向との相関	46
<b>考察</b>	<b>58</b>
1. ペプチド 脂質二重膜相互作用の pH 依存性	59
2. ペプチド 脂質二重膜相互作用のアミノ酸配列依存性	63

3. 膜融合活性とペプチドの膜内挙動	72
付録A：ATR 分光法の原理	76
1. 厚膜試料（平面多層脂質二重膜）	77
2. 薄膜試料（平面単層脂質二重膜）	81
付録B：分子の配向と吸光度の異方性	83
付録C：ペプチド・脂質二重膜結合等温線の解釈について	88
1. Langmuir の吸着等温式	88
2. 結合における協同性について	89
謝辞	92
引用文献	93

## 略号

ANTS	8-aminonaphthalene-1, 3, 6-trisulfonic acid
ATR	attenuated total reflection
BHA	bromelain-released fragment of hemagglutinin
Boc	<i>tert</i> -butyloxycarbonyl
CD	circular dichroism
DCC	<i>N, N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DMS	dimethyl sulfide
DOPC	dioleoyl-L- $\alpha$ -phosphatidylcholine
DPX	<i>p</i> -xylene-bis-pyridinium bromide
egg PC	egg yolk phosphatidylcholine
Fmoc	fluorenylmethyloxycarbonyl
FT	Fourier transform
HA	hemagglutinin
HEPES	2-hydroxyethylpiperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
IR	infrared
LB	Langmuir-Blodgett
MES	2-morpholinoethanesulfonic acid
NBD-PE	<i>N</i> -(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl)phosphatidylethanolamine
PAM	4-(hydroxymethyl)phenylacetamidomethyl-
PC	phosphatidylcholine
R18	octadecylrhodamine
SUV	small unilamellar vesicles
TBHA2	trypsin- and thermolysin-released fragment of BHA
TFA	trifluoroacetic acid
TFMSA	trifluoromethanesulfonic acid

# 序論

## 1. 膜融合とタンパク質

本研究の対象である膜融合とは、脂質二重膜によってつくられた複数の小胞が会合し、一つの小胞へと再構成される現象である。このとき、複数の小胞の内水相および脂質分子が一つの小胞内で混合される。膜融合の詳細な機構は未だに不明であるが、親水部の電荷の中和や浸透圧の変化、炭化水素鎖の相転移等によって引き起こされる物理化学的な現象として捉えられている。

脂質二重膜は生体を機能単位 (細胞や細胞内小器官など) に分割する生体膜として用いられており、膜融合はそれらの機能単位間で脂質二重膜を介した物質の輸送や交換をおこなうための重要な手段の一つである。受精、エンドサイトーシス、タンパク質の細胞内輸送と細胞外分泌、シナプスにおける神経伝達物質の放出、細胞融合、ウイルスの感染などにおける一過程として膜融合現象が観察、または推定されている。しかし、生体を外界から分離し、さらに機能単位に分割する生体膜本来の役割とは相反する現象であるから、生体内での膜融合はその対象と時期を制御されなければならない。多くの場合、生体内の膜融合は膜融合活性タンパク質によって誘起され、その活性は pH や GTP、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度などによって制御されている。

近年、X線結晶構造解析などによるタンパク質の高次構造に関する知識の膨大な蓄積に後押しされ、タンパク質を分子機械として捉え、その立体構造および物性がいかにして機能を発現しているのかを理解しようとする動きが活発になってきた。ここで注意しなければならないのは、タンパク質の構造やその安定性 (動的性質を含む) に関する問題は、高分子物理化学や統計熱力学などの巨視的な視点からはいくらかの解釈が可能であるが、量子化学や量子統計力学などの微視的な視点から扱うには系がやや複雑すぎるということである。一方、酵素などに見られる化学反応の触媒活性などの機構は量子化学的な解釈を必要とする問題を本質的に含んでおり、これらを立体構造上の特徴から説明するのは容易なことではない。現在のところタンパク質の構造・機能相関の研究は、立体構造から説明される基質特異性や、静電ポ

テンシヤルによるイオンや電子の移動などの比較的簡単な問題に対象が絞られており、酵素の反応機構等のより複雑な問題に対しては反応経路の推定や反応速度についての定性的な解釈にとどまらざるを得ない状況である。

冒頭に述べたように膜融合は巨視的な現象であり、タンパク質の構造や物性との相関を高分子物性の観点から解釈することが理論的に可能な生理活性である。この意味で膜融合活性タンパク質は、タンパク質の構造 機能相関の研究対象として理想的である。その反面、脂質二重膜を含む実験系は他の水溶性タンパク質の場合とは異なり、均一系とはなり得ない。そのため、一部の分光学的手法が使用できない、あるいは結晶試料の調製が困難であるなど実験方法に多くの制約があり、新しい方法論の開発が特に望まれる研究分野である。

## 2. インフルエンザウィルスの膜融合活性タンパク質：HA

生体内の膜融合現象の中で、インフルエンザウィルスの感染機構における膜融合は非常によく研究がなされた一例である (White et al., 1983; Stegmann et al., 1989; White, 1992; Zimmerberg et al., 1993)。インフルエンザウィルスはエンベロープウィルスとして分類され、らせん対称を持つヌクレオキャプシドがウィルス膜 (脂質二重膜) で覆われた構造を持つ。ウィルス膜にはスパイク型膜タンパク質、HA が存在し、宿主への感染の初期過程において重要な役割を果たしている。

まずウィルス粒子は HA を介して宿主細胞膜と結合し、細胞のエンドサイトーシスによってエンドソーム内に取り込まれる。エンドソーム内の pH がその膜上に存在するプロトンポンプによって低下すると HA の膜融合活性が発現し、ウィルス膜とエンドソーム膜が融合する。その結果、ヌクレオキャプシドが宿主細胞内に放出される。リン脂質のリポソーム (人工脂質二重膜小胞) や赤血球を用いた実験によると、HA は pH 5.5 以下で膜融合活性または溶血活性を示す (Maeda & Ohnishi, 1980; Maeda et al., 1981; Doms et al., 1986)。

HA は HA1 鎖と HA2 鎖の、二つのペプチド鎖がジスルフィド結合でつながったサブユニット 3 つから構成されるホモ 3 量体であり、HA2 鎖の C 末端付近をウィルス膜に貫通させ、HA2 鎖の N 末端側の大部分と HA1 鎖をウィルス膜の外側に配置

させている。HA の膜外ドメインはブロメライン処理によって水溶性フラグメント、BHA として切り出すことができ、X線結晶構造解析によって中性 pH における立体構造が明らかにされている (図 1a, b) (Wilson et al., 1981)。ここで HA の構造および物性と膜融合活性との相関について現在までに得られている知見をまとめておく。

HA の、膜融合活性の標的である脂質二重膜との結合の形式には二種類ある。一つは感染の第一段階で見られる、HA1 鎖による細胞表面との結合である。この結合は細胞膜の糖脂質や糖タンパク質のシアル酸残基に特異的であり (Weis et al., 1988; Sauter et al., 1992)、脂質の脂肪酸部位との相互作用はない。もう一つはエンドソーム内の酸性 pH に誘発される、膜融合を伴う結合である (Doms et al., 1985)。疎水性光反応修飾の実験によると、このときの結合部位は HA2 鎖の N 末端 20 残基ほどの疎水性領域であり、中性リン脂質二重膜と疎水性相互作用で結合している (Brunner, 1989; Harter et al., 1989; Stegmann et al., 1991)。この領域は、アミノ酸配列が変異株間でよく保存されていること、また、アミノ酸置換によって HA の膜融合活性が影響を受けることから (Gething et al., 1986)、膜融合に直接関与する部分であると考えられており、融合ペプチドと呼ばれている (図 2)。

BHA の X線結晶構造によると、中性 pH では、融合ペプチドはタンパク質内部の、HA のスパイク構造の根元のあたり (ウイルス膜に近い部分) に埋もれている (図 1a, b)。したがって融合ペプチドが標的脂質二重膜と相互作用するためには、酸性 pH における HA の大幅な立体構造変化が必要である。pH の低下によって引き起こされる HA の構造変化は、プロテアーゼ耐性、抗体の認識、トリプトファンの蛍光スペクトルなどの変化や電子顕微鏡像などによって示唆されている (Skehel et al., 1982; Doms et al., 1985; Ruigrok et al., 1986; White & Wilson, 1987; Wharton et al., 1988a)。Carr らと Bullough らは合成ペプチドを用いた研究 (Carr & Kim, 1993) と、BHA から疎水性部分 (融合ペプチドを含む) を除いたフラグメント、TBHA2 の酸性 pH における X線結晶構造解析 (Bullough et al., 1994) からそれぞれ独立に、融合ペプチドにつながる  $\alpha$ ヘリックスループ- $\alpha$ ヘリックス構造が pH 低下に応答して一本の  $\alpha$ ヘリックス構造へと転移し、サブユニット間で 3 本鎖コイルド コイルを形成することで安定化するというモデルを提出した (図 1c, d)。融合ペプチドはこの構

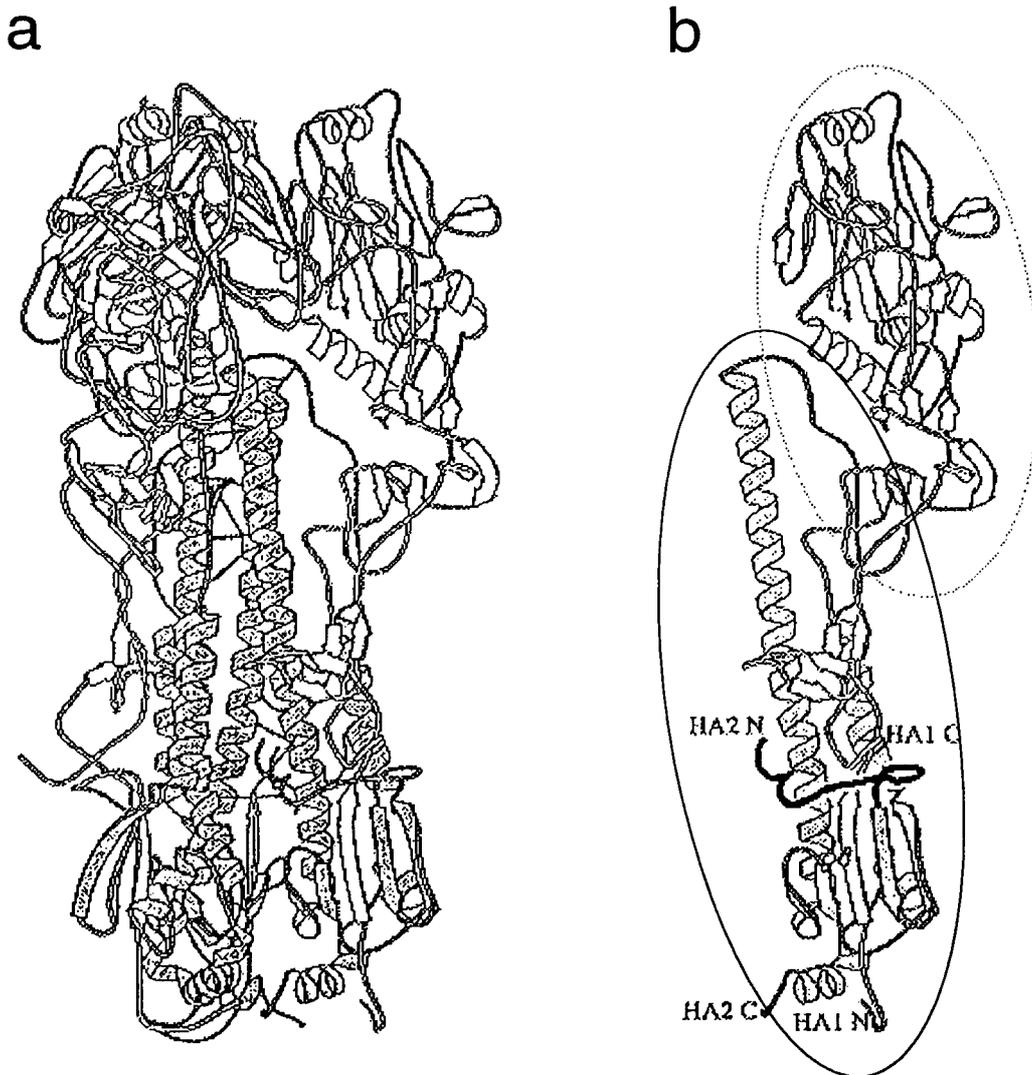


図 1： X線結晶構造解析による、HAの水溶性フラグメントの立体構造 ((Bullough et al., 1994) より転載)。a は中性 pH における HA の膜外ドメイン (BHA) の 3 量体構造であり、b はそのサブユニットの構造である。図中の HA1 N, HA2 N, HA1 C, HA2 C はそれぞれ BHA の HA1, HA2 鎖の N, C 末端を示す。b の実線で囲まれている部分は主に HA2 鎖からなるドメインであり、HA ではその C 末端で膜貫通  $\alpha$  ヘリックスとつながっている。また、その N 末端には融合ペプチドと呼ばれる疎水性領域 (太線でフォローしてある) があり、3 量体内部ではサブユニット間の隙間に挟み込まれている。点線で囲まれている部分は主に HA1 鎖からなるドメインであり、細胞表面のシアル酸残基と特異的に結合する。(次ページへ続く)

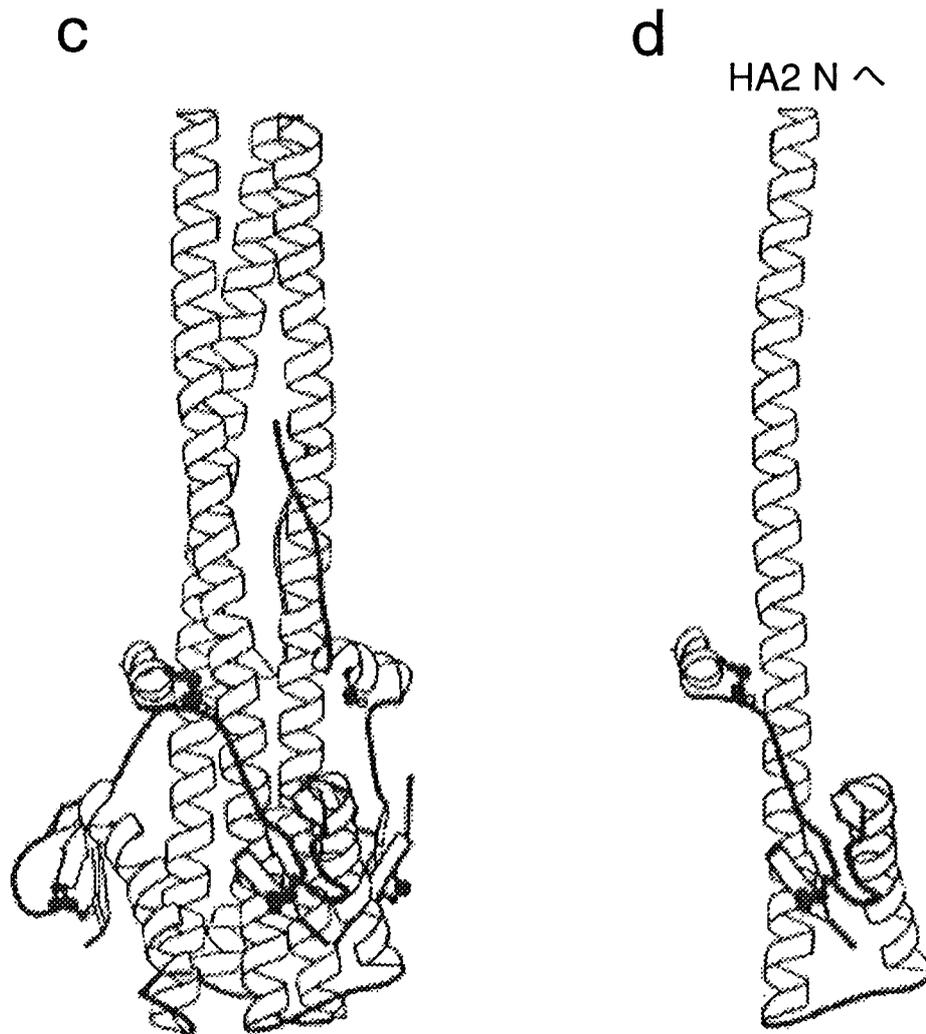


図1 (前ページの続き) cは酸性pHにおける、BHAからシアル酸結合ドメインおよび融合ペプチド領域を除いたフラグメント(TBHA2)の3量体構造であり、dはそのサブユニットの構造である。a,bにおける $\alpha$ ヘリックスループ- $\alpha$ ヘリックスの部分がc,dでは一本の長い $\alpha$ ヘリックスになっており、それらが3量体内で3本鎖コイルドコイルを形成することによって、HA2鎖N末端の融合ペプチドがHAのスパイク構造の頂点まで移動すると考えられている。

造変化に伴って 100 Å もの距離を移動し、スパイク構造の頂点へ達すると考えられる。

さらに、膜融合活性の速度論的、あるいは化学量論的解析から、膜融合活性の発現には上述の構造変化および標的脂質二重膜との結合につづいて 3 ~ 5 分子の HA の会合が必要であることが明らかになり (Morris et al., 1989; Sarkar et al., 1989; Ellens et al., 1990; Stegmann et al., 1990)、この会合体の中央に融合孔が形成されるというモデルが提出されている。融合孔とは膜融合の中間段階において存在すると予想される、二枚の脂質二重膜を貫通するチャンネル構造であり、この孔を通じて内水相の混合がはじまると考えられている。Spruce らは電気測定によって融合孔の形成過程やその内径について研究をおこない、このモデルを支持する結果を得ている (Spruce et al., 1989, 1991)。

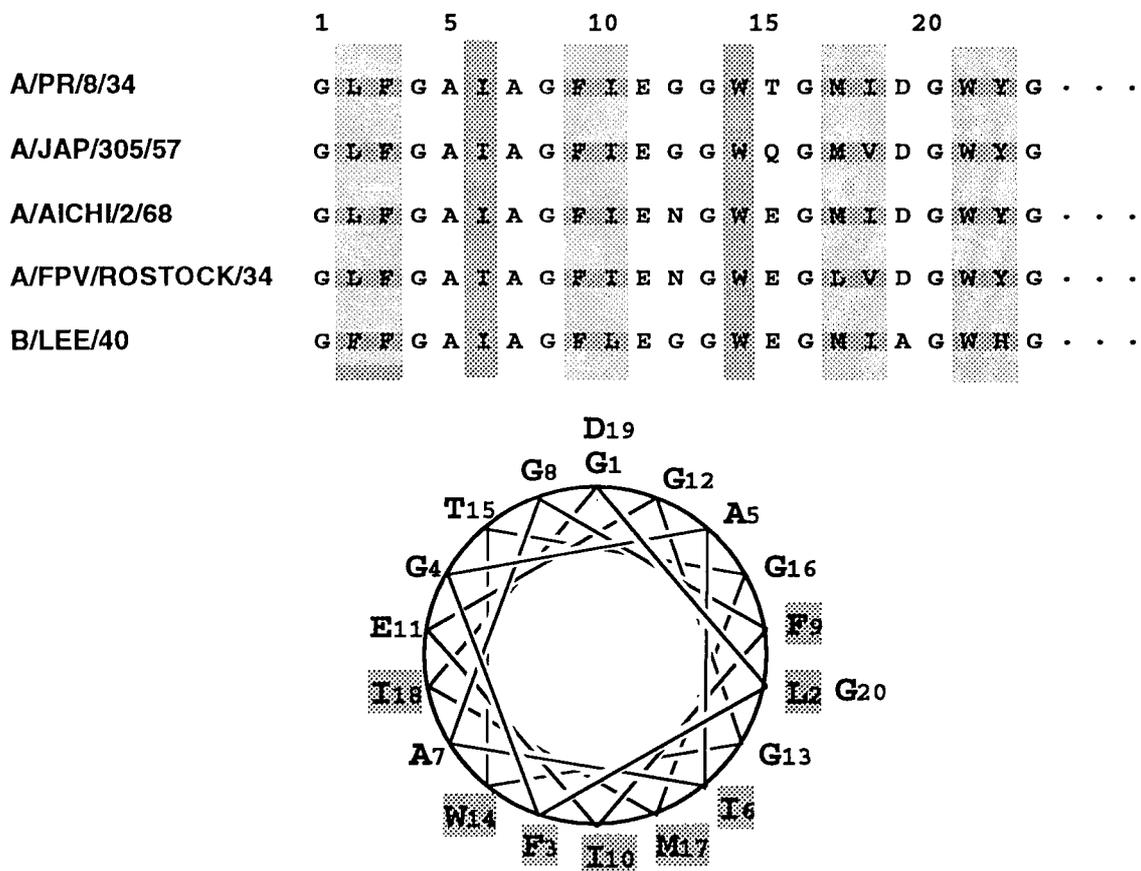


図2 インフルエンザウイルス各株の HA の融合ペプチド領域のアミノ酸配列と、A/PR/8/34 株のペプチドの  $\alpha$  ヘリックス投影図 (ヘリックス軸方向から見たアミノ酸残基の空間配置図)。陰影をつけた記号は疎水性残基をあらわす。

HAによって引き起こされる脂質二重膜の物性の変化については、今のところ、あまり研究成果はあがっていない。一般に膜融合過程は、脂質の層状構造から中間状態としての別の構造(ヘキサゴナルII構造や逆ミセル構造、茎状構造など)への相転移を経由すると考えられている。最近の熱力学的な研究によれば、HAによる膜融合におけるこの中間状態はヘキサゴナルII構造や逆ミセル構造ではなく (Stegmann, 1993; Alford et al., 1994)、茎状構造であるとされているが (Siegel, 1993; Kemble et al., 1994)、決定的な証拠が挙げられているわけではない。

### 3. 融合ペプチドと脂質二重膜の相互作用

融合ペプチドと標的脂質二重膜との結合が膜融合活性の重要な要因であるとして、これらのペプチドは脂質二重膜内でどのような構造や物性を示すのであろうか。また、それらの性質が脂質二重膜に対してどのような影響があり、膜融合過程全体のなかでどのような役割を果たすのであろうか。

Brunnerらは彼らの疎水性光反応修飾の実験において、炭化水素鎖部に修飾剤を導入したリン脂質二重膜とBHAとを酸性pH下で結合させ、修飾剤の局在位置と修飾されたアミノ酸残基の結果から、HAの融合ペプチドが両親媒性 $\alpha$ ヘリックス構造をとり(図2)、脂質二重膜の外側の一重膜中に偏在していることを示した (Brunner, 1989; Harter et al., 1989)。20残基からなる $\alpha$ ヘリックスは約30 Åの長さであり、これは脂質二重膜の炭化水素鎖層の厚さとほぼ同じであるから、すくなくとも融合ペプチドは膜貫通型ではないことになる。

村田らはA/PR/8/34株のインフルエンザウィルスのHAの融合ペプチドと同じアミノ酸配列を持つ20残基のペプチド(図3のペプチドI)を合成し、egg PC リポソームとの相互作用を観察した (Murata et al., 1987a)。その結果、この合成ペプチドがHAと同様にegg PC リポソームに対してpH依存性膜融合活性(pH 6.2以下で活性をもち、pH 4.8で最大活性を示す)や、リポソーム内包物の漏洩活性を持つことがわかった。ところで、このペプチドは側鎖に電荷を持つアミノ酸残基としてはグルタミン酸とアスパラギン酸しか持っていない。村田らは、やはり酸性pHでのみ膜融合活性を持つスクシニル化メリチン(メリチンの4個のアミノ基をスクシニル化し

ペプチド		1	5	10	15	20															
I (+)		G	L	F	G	A	I	A	G	F	I	E	G	G	W	T	G	M	I	D	G
III (+)		G	L	F	E	A	I	A	E	F	I	E	G	G	W	E	G	L	I	E	G
IV (+)		G	L	L	E	A	L	A	E	L	L	E	G	G	W	E	G	L	L	E	G
VIII (-)		G	L	L	E	E	L	L	E	L	L	E	E	L	W	E	E	L	L	E	G
III - G1E (-)		E	L	F	E	A	I	A	E	F	I	E	G	G	W	E	G	L	I	E	G
III - G13L (-)	G	G	L	F	E	A	I	A	E	F	I	E	G	L	W	E	G	L	I	E	G

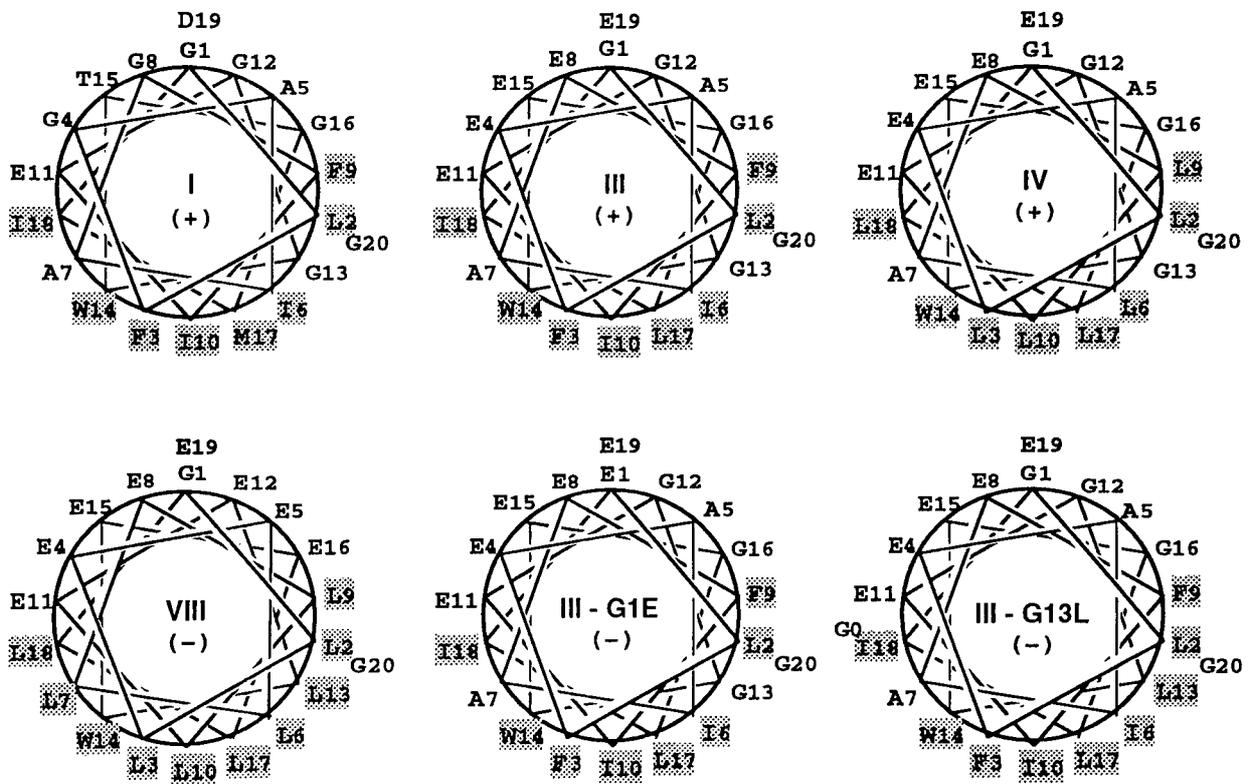


図3： 本研究で用いられた合成ペプチドのアミノ酸配列と、その $\alpha$ ヘリックス投影図。陰影をつけた記号は疎水性残基をあらわす。また、(+)はペプチドが膜融合活性をもつこと、(-)は膜融合活性をもたないことを示す。膜融合活性の有無の判断については「結果」の表3を参照されたい。

たもの) についての研究をおこなっており、そのカルボキシル基の pK が egg PC リポソームの共存によって高 pH 側にシフトしていたことから、酸性 pH におけるこれらのペプチドのカルボキシル陰イオンのプロトン化が膜融合を引き起こすと考えた (Murata et al., 1987b)。

他の株の HA の融合ペプチドについても同様の結果が報告されており (Lear & DeGrado, 1987; Wharton et al., 1988b; Rafalski et al., 1991)、また、他の膜融合活性タンパク質の融合ペプチドについても合成ペプチドを用いた研究がおこなわれている (Martin et al., 1991, 1993a, 1993b, 1994; Düzgünes & Shavnin, 1992; Epand et al., 1992; Muga et al., 1994; Nieva et al., 1994; Rapaport & Shai, 1994)。リン脂質二重膜との相互作用はペプチドによって異なるが、これらのペプチドすべてに共通しているのは膜構造を不安定化するはたらき (リポソーム内包物の漏洩など) である。

Epand らは HA の融合ペプチドを模した合成ペプチドが、酸性 pH 下でリン脂質の、二重膜構造からヘキサゴナル構造への相転移温度を下げることを示した (Epand et al., 1992)。先に述べたように HA による膜融合現象において、脂質はヘキサゴナル構造を中間状態としてとっておらず、この実験事実の意味するところは明瞭ではないが、すくなくとも融合ペプチドが脂質の一状態としての二重膜構造を不安定化していることは明らかである。同時に、これらの合成ペプチドが膜融合を引き起こす場合でも、その融合過程が膜融合活性タンパク質のそれと同じである保証はないことに留意すべきであろう。

ところでこれらのペプチドはいずれも脂質二重膜に結合して二次構造をとるが、インフルエンザウイルスの HA やセンダイウイルスの F タンパク質のように  $\alpha$  ヘリックス構造をとるものもあれば、精子と卵の膜融合を制御する PH-30 のように  $\beta$  構造をとるもの、ヒト免疫不全ウイルスの gp41 やサル免疫不全ウイルスの gp32 のように環境によってどちらの構造もとるものもある。本研究は HA の融合ペプチドに関しておこなわれたため、以下の議論は  $\alpha$  ヘリックス構造をとるペプチドに焦点を絞っている。

#### 4. $\alpha$ ヘリックス型膜融合活性ペプチドの構造的特徴

膜融合を引き起こす合成ペプチドがもつべき構造の特徴とはどのようなものであろうか。上記の融合ペプチドの例から考えると、両親媒性 $\alpha$ ヘリックス構造が必要であることが予想される。ParenteらやLeeらは、単純な繰り返し配列からなる両親媒性 $\alpha$ ヘリックス型の合成ペプチドがリン脂質のリポソームに対して膜融合活性をもち得ることや、そのような単純な系では両親媒性の乱れや $\alpha$ ヘリックス含量の低下が膜融合活性の低下につながることを示し (Parente et al., 1988; Lee et al., 1992)、すくなくとも両親媒性 $\alpha$ ヘリックス構造が膜融合活性の必要条件であることを明らかにした。

村田らは前述のペプチドIの研究をさらに押し進め、各アミノ酸残基の物理化学的性質を保ちつつアミノ酸配列を単純化することによって、融合活性ペプチドの構造的特徴をより明瞭にすることを試みた (Takahashi, 1990; Murata et al., 1992)。もともとペプチドIは疎水性が非常に高く、難水溶性であった。そのため、活性測定やCDスペクトルの測定における取扱いが困難であり、またペプチドの非特異的な会合によって溶液内のペプチドの実質的な濃度が低下し、これらの測定結果に影響を与えている可能性があった。そこで、まず水に溶けやすくするために $\alpha$ ヘリックス投影図上で特に親水性が強いと思われる領域の5残基をすべてグルタミン酸とし、また、副生物の生成を除外するためにメチオニンをロイシンとしたペプチドを合成した (図3のペプチドIII)。さらに、アミノ酸組成を簡略化するためイソロイシン、フェニルアラニンをすべてロイシンとした (図3のペプチドIV)。この二つのペプチドはいずれもペプチドIと同じく egg PC や DOPC のリポソームに対して pH 依存性膜融合活性および漏洩活性を持つ。中性 pH の水溶液中ではランダムコイルであるが、酸性 pH の水溶液中では $\alpha$ ヘリックスおよび $\beta$ 構造から構成されると思われる二次構造をとり (ペプチドIVは、 $\alpha$ ヘリックス構造指向性の高いロイシン残基のため、中性および酸性 pH における $\alpha$ ヘリックス含量がペプチドIやIIIよりも高い)、その二次構造含量が濃度に依存することから、ペプチドの会合が二次構造を安定化していると考えられる。また、どちらのペプチドも pH によらずリポソームに結合して $\alpha$ ヘリックス構造をとる。

さらに村田らはペプチド III の N 末端と C 末端のそれぞれ 10 残基の配列を様々に組み合わせたペプチドや、配列内に  $\alpha$  ヘリックス構造阻害因子としてプロリンを入れたペプチドを合成し、アミノ酸配列とヘリックス含量が合成ペプチドの膜融合活性や漏洩活性に与える影響についての研究をおこなった (Murata et al., 1993)。その結果は以下のようにまとめられる。ペプチド III の膜融合活性には安定な  $\alpha$  ヘリックス構造と C 末端側 10 残基のアミノ酸配列が必要である。ところが C 末端側 10 残基は  $\alpha$  ヘリックス構造指向性がそれほど高くなく、それ自身として安定な  $\alpha$  ヘリックス構造をつくり得ないため、 $\alpha$  ヘリックス構造指向性の高い N 末端 10 残基との共存が必要となるらしい。逆に N 末端側 10 残基はペプチドの  $\alpha$  ヘリックス構造を安定化するものの、やはり単独では膜融合を引き起こさない。また、アミノ酸配列をより単純化したペプチド VIII (図 3 の、グルタミン酸とロイシンのみからなる両親媒性ペプチド) が漏洩活性を示しながらも膜融合活性を示さなかったことから、単なる脂質二重膜構造の不安定化とも異なる膜融合につながるはたらきがアミノ酸配列に依存して引き起こされることが示唆される。

他にもタンパク質のアミノ酸置換技術や合成モデルペプチドを用いた、HA の融合ペプチドに要求されるアミノ酸配列に関する研究が多くのグループによっておこなわれており (Gething et al., 1986; Wharton et al., 1988b; Rafalski et al., 1991)、例えば融合ペプチドの N 末端 (1 残基目) のグリシンをグルタミン酸に置換した HA や合成ペプチドが膜融合活性を失ったという結果が得られている。

## 5. 本研究の目的

アミノ酸残基の二次構造指向性と疎水性を考慮すれば、様々な両親媒性  $\alpha$  ヘリックス型ペプチドを設計することが可能である。しかし、それらのうちの限られたものだけが限られた環境下 (酸性 pH など) で膜融合活性を持ち、あるいは膜融合活性タンパク質の機能部位の一つとなりうると考えられる。それでは、脂質二重膜内の両親媒性  $\alpha$  ヘリックス構造のどのような挙動が膜融合を引き起こしうるのでしょうか。また、その挙動は膜融合活性を持たない場合とどのように異なり、あるいはその違いがアミノ酸配列や pH とどのように結びつくのでしょうか。

本研究ではこれらの点を明らかにするために、先に述べた村田らの設計した膜融合活性ペプチド (図 3) の、酸性および中性 pH 下、egg PC や DOPC の脂質二重膜内における挙動を赤外 (IR)-ATR 分光法を用いて解析した。また、ペプチド III と部分的に異なるアミノ酸配列を持つペプチドのうち、リポソームに対する膜融合活性や漏洩活性が有意に減少したペプチド III-G1E と III-G13L (高橋, 平成 7 年)、および典型的な両親媒性  $\alpha$  ヘリックス構造をもちながら膜融合活性をもたないペプチド VIII についても同様の測定をおこない、膜融合活性とペプチドの膜内挙動との相関を明らかにすることを試みた。

脂質として egg PC および DOPC を選んだのは、親水部の大きさが二重膜構造をとるのに適当で、かつ電荷が中和されているため膜の安定性が pH やカチオンの存在などの影響を受けないこと、二重膜の炭化水素鎖層の厚みが生体膜と近いこと (DOPC は一カ所の不飽和結合を持つ  $C_{18}$  の脂肪酸残基からなり、egg PC も全体の 3 割を占める最も主要な脂肪酸残基は不飽和  $C_{18}$  である)、また、どちらもゲル・液晶転移温度が低いため (DOPC,  $-22^{\circ}\text{C}$ ; egg PC,  $-15^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ )、生体膜と同様に常温で液晶状態 (二重膜構造を保ちながら、液相のように横方向の流動性を保っている状態) であることなどを考慮したためである。

## 6. ATR 分光法について

分子の基準振動 (分子内における原子配置の変位を調和振動として分離したもの) が双極子モーメントの変化を生じるとき、その振動数と遷移モーメントに対応した赤外光の吸収が起こる。基準振動の振動数は原子団に特異的であるため、分子構造を反映した赤外吸収スペクトルを得ることができる。また、基準振動は水素結合などの非共有結合力の束縛によって影響をうけるため、特定の吸収帯の振動数のシフトから、分子間相互作用の変化や高分子の高次構造の情報を得ることが可能である。

タンパク質やペプチドの構造解析において、赤外分光法は構造情報の空間分解能という点で X 線結晶構造解析や NMR に、あるいは感度という点で紫外分光法に劣っている。その反面、結晶試料を必要としない、核種を選ばない、分子運動など

による緩和現象を必要としない、紫外光に比べて波長が長く比較的散乱の影響をうけない、などの特徴のため、試料の種類や形状にあまり制限されことなく簡便な測定をおこなうことが可能である。ATR分光法は、試料の形状を選ばないという赤外分光法の長所を最大限に伸ばした測定法のひとつである。

ATR分光法は、内部反射を利用した一種の吸収スペクトル法である。その測定原理を模式的に図4に示す。プリズム上に試料を密着させ、プリズム側から入射光を入れる。このとき、入射角 $q$ が臨界角よりも大きければプリズム-試料界面で入射光の全反射が起こるが、導体面での反射ではないから自由端反射であり、従って界面における電場は零ではない。そのため試料側に、界面からの距離によって減衰する定在波がうまれる。この界面における試料側への光の浸み出しのため、全反射面において試料による光の吸収がおり、それが吸収スペクトルとしてあらわれる。入射光を全反射させるにはプリズムの屈折率が試料のそれよりも大きい必要があり、屈折率の高い光学材料が得られる赤外分光に適した測定技術であると言える。

ATR分光法は試料に入射光を透過させる必要がなく、プリズム面に試料を密着させるだけで試料表面の吸収スペクトルを得ることができる。そのため加工困難な試料を測定することができ、生体組織や本研究の試料である平面脂質二重膜などの複雑な構造体を非破壊の状態で測定することが可能である。また、フーリエ変換赤外

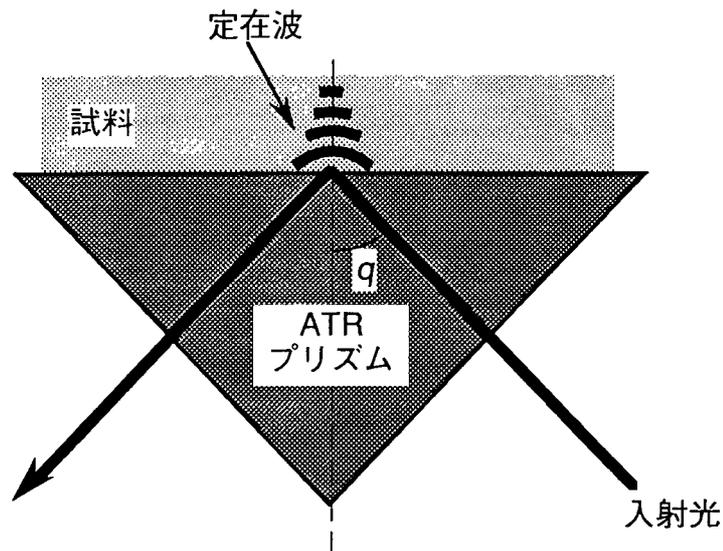


図4： ATR法による赤外分光法の模式図。

分光光度計を用いてスペクトルの積算をおこない、台形プリズムを用いて試料面の反射回数を増やすことによって、赤外分光法の感度の低さを補うことができる。

ATR 分光法のもう一つの利点は、入射光に偏光を用いることによって、試料の特定の吸収帯について吸光度の異方性を決定し、その吸収帯から帰属される遷移モーメントの、プリズム平面に対する配向を見積もることができる点である。注目している分子の立体構造に対する遷移モーメントの位置や角度が既知ならば、分子の配向に関する情報をも得ることができる。

今回用いたペプチドが膜内で主に  $\alpha$  ヘリックス構造をとっていることは過去の実験から明らかである。本来剛直な  $\alpha$  ヘリックスが膜融合活性の有無に対応して挙動の違いを示すならば、その違いはペプチドの会合状態や  $\alpha$  ヘリックス軸の配向角度の変化などにあらわれると考えられる。本研究では ATR プリズム上に平面脂質二重膜を調製し、膜に結合するペプチドの赤外吸収スペクトルを測定することによって、膜平面に対するペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸の配向、およびペプチドの結合に伴う脂質二重膜構造の配向の変化を決定した。さらに、スペクトルを定量的に解析することによってペプチド 脂質二重膜の結合等温線を決定し、ペプチドと膜との親和性や膜との結合に伴うペプチドの会合についての知見を得た。

ATR 分光法の原理については、「付録 A：ATR 分光法の原理」、「付録 B：分子の配向と吸光度の異方性」を参照されたい。

# 実験方法

## 1. ペプチドの合成と精製

本研究において用いられたペプチド (図 3 のペプチド I, III, IV, VIII, および III のアミノ酸残基置換体) は固相法によって合成し、液体クロマトグラフィーによって精製した。この作業は京都大学化学研究所の高橋 敏教授をはじめ、多くの方々の協力によっておこなわれたが (Murata et al., 1987; Takahashi, 1990; Murata et al., 1992; Murata et al., 1993)、ここでは私が特に中心となっておこなったペプチド IV の合成と精製について述べる。

**ペプチド IV の固相合成** Merrifield らの方法 (Mitchell et al., 1976; Merrifield et al., 1982) に従い、PAM 樹脂を担体とし、 $\alpha$  アミノ基を Boc 基で保護したアミノ酸を用いて固相合成をおこなった。担体上でのペプチド鎖の伸長は、DCC によるジクロロメタン溶媒中での *N*-Boc 化アミノ酸のカップリング (対称酸無水物を主中間体として進行する) と、TFA による担体上のペプチド鎖 *N* 末端の脱保護 (Boc 基の除去) の反復によっておこなわれた。担体上で合成されたペプチドは TFMSA / TFA / DMS 混合液によって担体から切り出した (Tam et al., 1986)。ペプチド鎖の伸長の間、グルタミン酸残基とトリプトファン残基の側鎖はそれぞれベンジル基とフォルミル基によって保護されており、これらはペプチドの担体からの切り出しに伴って除去される。

**高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるペプチド IV の精製** 切り出したペプチドを COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR カラム (ナカライテスク) を用いた逆相 HPLC (日本分光の TRI ROTAR-III を使用) によって精製した。溶媒として 10 mM 酢酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルの混合液を用い、その混合比を (80 / 20) から (60 / 40) まで連続的に変化させることによって溶出をおこなった。図 5 に精製前と精製後のペプチド IV のクロマトグラムを示す。

その他のペプチド 本研究で用いられたその他のペプチドは手動操作またはペプチド自動合成機 (Applied Biosystems の 431A Peptide Synthesizer および MilliGen の 9050 PepSynthesizer) により、Boc 法や Fmoc 法などを用いて合成した。ほとんどのペプチドは逆相 HPLC によって精製したが、特に難水溶性のペプチド I に限り Sephadex G-25 medium (Pharmacia Fine Chemicals) を用いたゲル濾過による精製にとどめた。また切り出し後および精製後のすべてのペプチドは凍結乾燥によって保存した。

## 2. ペプチドの定量

実験に際して調製した溶液のペプチド濃度は以下の手順に従い、イオン交換樹脂によるアミノ酸分析 (日本分光のアミノ酸自動分析機プロトタイプを使用) によって決定した。ペプチド溶液の適当量を酸加水分解 (6 N 塩酸に溶かして減圧封管中、120°C で 24 時間加熱する) によってアミノ酸に分解し、Shodex HC-095 (昭和電工)

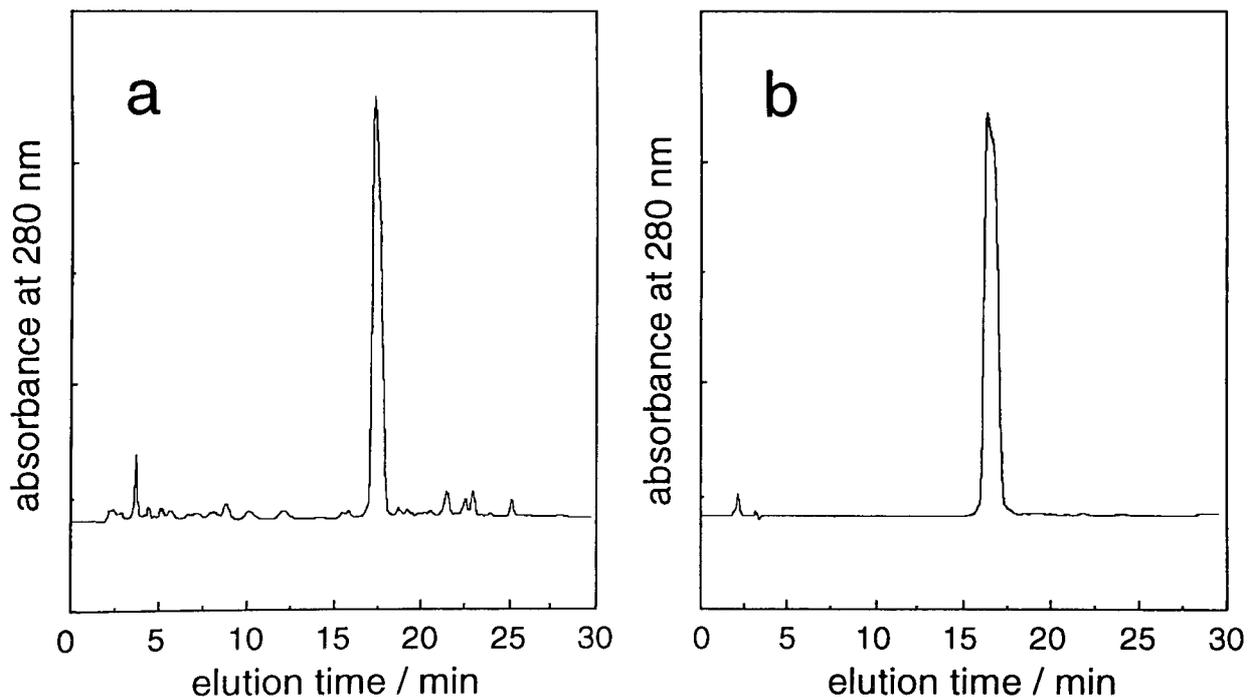


図 5: ペプチド IV の HPLC クロマトグラム。10 mM 酢酸アンモニウム水溶液 / アセトニトリルの混合溶媒を混合比 (80 / 20) から (60 / 40) まで 30 分間かけて勾配溶出し、流路上のフローセルで 280 nm の吸光度を測定したもの。a は精製前のもの、b は上記と同じ溶出条件で精製したものである。b では、周辺小ピークが消失している。

のカラムを用い、Moore-Stein の溶出条件 (Moore et al., 1958; Spackman et al., 1958) に従って各アミノ酸に分離した。分離したアミノ酸を高橋のニンヒドリン発色法 (Takahashi, 1978) によって発色させ、流路上のフローセルを用いて定量した (570 nm の吸光度を測定する)。

### 3. リポソームの調製

egg PC や DOPC の小型 1 枚膜リポソーム (SUV) 懸濁液を超音波処理法によって以下のように調製した。egg PC および DOPC は Avanti Polar Lipids より購入し、薄層クロマトグラフィーによって純度を確認した (Arvidson, 1965)。これらの脂質のクロロホルム溶液を減圧乾燥することによってガラス容器内壁上に脂質薄膜を調製し、Vortex ミキサーを用いて実験用緩衝水溶液または水中に分散させた。つづいて窒素気流下、0°C でトミー精工の UD-200 型超音波発生機を用いて 30 W の超音波照射をおこなうことにより、直径数百 Å の SUV を得た (Huang, 1969)。調製した SUV 懸濁液の濃度は Bartlett のリン定量法 (Bartlett, 1959) によって決定した。

### 4. ペプチドの膜融合活性測定

リポソームを用いた膜融合活性測定には大きくわけて 2 種類ある。一つは複数のリポソーム上にある脂質の混合を測定するもの、もう一つは複数のリポソームの内水相の混合を測定するものである。いずれの場合も蛍光色素などのプローブ分子 (脂質混合測定の場合は脂溶性のもの、内水相混合測定の場合は水溶性のもの) が用いられる。

**膜融合活性測定法** 本研究において用いられたペプチドの膜融合活性測定は京都大学理学部の村田昌之博士をはじめとする多くの方々の協力によっておこなわれた (Murata et al., 1987a; Murata et al., 1992; Murata et al., 1993) (高橋, 平成 5 年, 平成 7 年)。脂質混合測定には脂溶性蛍光色素である R18 と NBD-PE をともに含むリポソームとそれらを含まないリポソームを混合した系が用いられ、R18 へのエネルギー

ギー移動によって抑えられていた NBD-PE の蛍光強度が、脂質混合に伴う蛍光色素の希釈によって増加する過程が測定された (NBD-PE の励起波長は ~470 nm、蛍光波長は ~530 nm、R18 の励起波長は ~560 nm、蛍光波長は ~590 nm である)。内水相混合は水溶性蛍光色素である ANTS を内水相に含むリポソームとその消光剤である DPX を内水相に含むリポソームの混合系において、ANTS と DPX の混合に伴う蛍光の消光として測定された (ANTS の励起波長は ~350 nm、蛍光波長は ~520 nm である)。またリポソームの漏洩は ANTS と DPX をともに内水相に含むリポソームの系において、内水相の希釈による蛍光消光の解消として測定された。

**脂質混合の測定** 以下に私がおこなった、酸性 pH においてペプチドがひきおこす脂質混合の測定についてより詳細に述べる。「3. リポソームの調製」に従って NBD-PE と R18 をそれぞれモル比で 1% ずつ含む DOPC の SUV (標識リポソーム) と蛍光色素を含まない SUV (無標識リポソーム) を調製し、これらをモル比 1/1 でふくむ測定系 (DOPC (SUV), 1.5 mM; KCl, 100 mM; sodium citrate, 50 mM; pH 5.0) を調製した。この水溶液にペプチド水溶液 (KCl, 145 mM; HEPES, 5 mM; peptide, ~1 mM; pH 7.4) を加え、日本分光の FP-550 型分光蛍光光度計を用いて励起波長 470 nm、蛍光波長 535 nm での蛍光強度 (NBD-PE の蛍光) の変化を測定した。ペプチドを加える前の蛍光強度を脂質混合率 0% レベル、0.3% (W/V) 当量の Triton X-100 (30% (W/V) 水溶液) を加えてすべての SUV を可溶化したときの蛍光強度を脂質混合率 100% レベルとして測定結果の処理をおこない、ペプチドによる脂質混合率の値を評価した (ペプチドや Triton X-100 の水溶液を加えたことによる希釈の効果をも考慮した)。

## 5. 円偏光二色性 (CD) スペクトル

CD スペクトルは日本分光の J-20 型自記旋光分散計の、偏光変調素子をポッケルセルから石英偏歪素子に改変し、EG & G PRINCETON APPLIED RESEARCH 社の MODEL 5209 LOCK-IN AMPLIFIER に接続したものをを用いて測定した。セルは光路長が 0.1 mm から 10 mm のものを使用した。

## 6. 平面脂質二重膜の調製

脂質二重膜の赤外 (IR)-ATR スペクトルの測定にあたり、以下の手順に従ってゲルマニウム製の多重反射式 (台形) ATR プリズム上に平面脂質二重膜を調製した。

**平面単層脂質二重膜** 平面単層脂質二重膜は Langmuir-Blodgett 法とベシクル融合現象を組み合わせた方法 (Fringeli, 1989; Frey & Tamm, 1991; Kalb et al., 1992) によって調製した。図 6 にその手順を模式的に示す。

ATR プリズムはあらかじめクロロホルム/メタノールの体積比 4 / 1 の混合溶媒で洗浄し、使用する直前にプラズマ洗浄 (日立製作所の E101 型イオンスプッターを使用) をおこなうことによって、プリズム表面上の有機物を取り除いた。つぎに Wilhelmy 型表面圧計および Langmuir 水槽 (山友技術製作) を用いて egg PC および DOPC の水面単分子膜を調製し、垂直引き上げ法によって ATR プリズム上に LB 膜として転写した。図 7 に単分子膜調製装置の概略を示す。Langmuir 水槽とは表面をテフロン加工した浅い角形の水槽であり、また Wilhelmy 型表面圧計とは、天秤から垂直に吊るした Wilhelmy 板と呼ばれる親水性薄板 (ここではすりガラスの板) の下端を水面に接触させ、板にはたらく下向きの力を水面の表面張力として測定する装置である (板の重力および浮力は差し引く)。本研究ではヘキサン/クロロホルム/メタノールのモル比 3 / 3 / 1 の混合溶媒に溶かした PC をこの水槽にはった水面上に展開して脂質の水面単分子膜を調製し、表面圧を測定しながらやはりテフロン加工した仕切り板で圧縮制御した。水面単分子膜の表面圧 (脂質分子間の反発による平面内の圧力) は単分子膜展開前と展開後の水面の表面張力 (25°C における水の表面張力は  $72 \text{ mN m}^{-1}$ ) の差として現れ、その値は脂質分子の構造と 1 分子あたりの表面占有面積によって決まる。図 8 に、この装置を用いて測定した egg PC 水面単分子膜の表面圧と分子占有面積の相関関係 ( $\pi$ -A 曲線) を示す。表面圧は膜の圧縮に伴って増加し、 $40 \text{ \AA}^2$  付近で上限 ( $42 \text{ mN m}^{-1}$ ) に達する。このときの占有面積が単分子膜としての最小の値であり、これ以下の値では膜の多層化が起こっていると考えられている。egg PC および DOPC の ATR プリズムへの転写は表面圧を  $32 \text{ mN m}^{-1}$  に保つように単分子膜を圧縮制御しながらおこなわれ、その転写率 (転写に伴う水面の圧縮

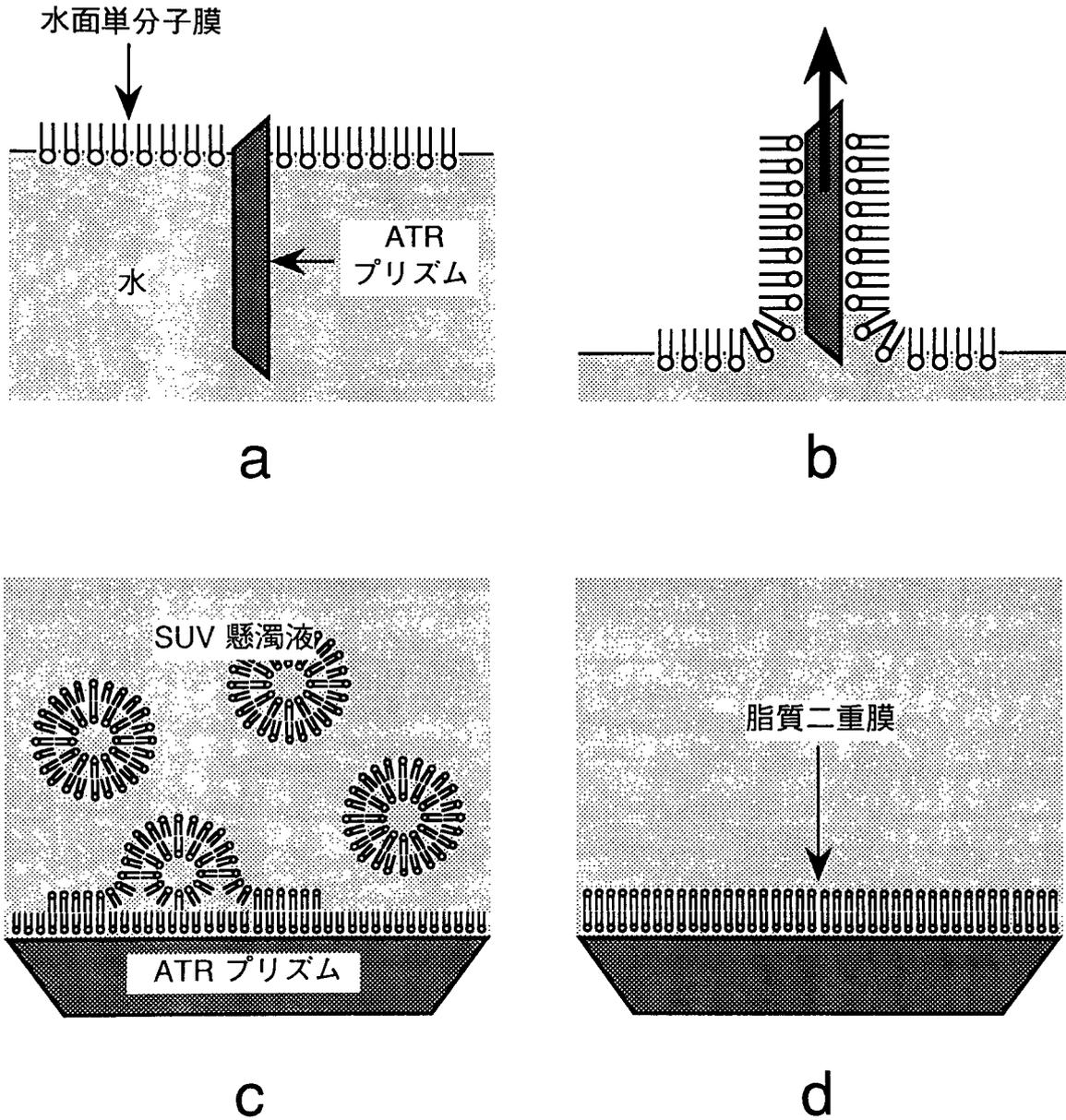


図 6： 平面単層脂質二重膜の調製手順。まず、脂質の水面単分子膜を調製し (a)、垂直引き上げ法により ATR プリズム上に LB 膜として転写する (b)。この LB 膜を SUV 懸濁液に浸して SUV と LB 膜の自発的融合を促し (c)、余剰の SUV を水および測定緩衝液を用いて洗い流す (d)。

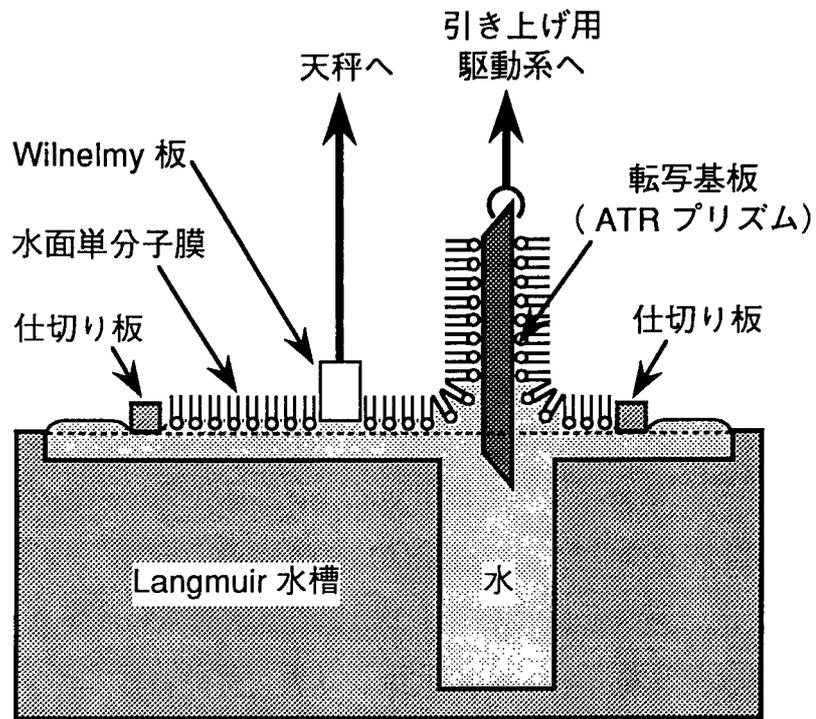


図 7: 単分子膜調製装置 (Langmuir 水槽と Wilhelmy 型表面圧計) の略図。

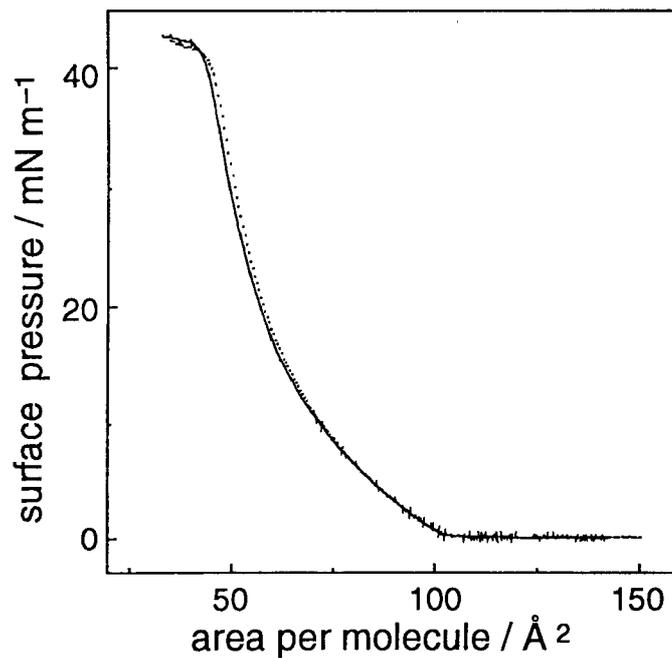


図 8 egg PC の  $\pi$ -A 曲線。縦軸は水面単分子膜の表面圧、横軸は脂質 1 分子あたりの表面占有面積を意味する。実線と点線は異なる測定によって得られた結果であり、よい再現性を示している。

面積に対するプリズムの表面積の比)は  $1 \pm 0.05$  となった。 $\pi$ -A 曲線によるとこのときの脂質 1 分子あたりの表面占有面積は約  $50 \text{ \AA}^2$  と見積もられるが、これは PC 親水部の占有面積として報告されている値であり (Hauser et al., 1981)、LB 膜内の PC の炭化水素鎖についてはほぼ最適な配向状態が得られると期待される。またカーボン支持膜上に転写した LB 膜を電子顕微鏡 (日立製作所の H300 型透過型電子顕微鏡、加速電圧 70 kV) を用いて倍率 3000、暗視野法で観察し、垂直引き上げ法による脂質の LB 膜が均一であることを確認した。

図 6 や図 7 に示したように、垂直引き上げ法によって調製した LB 膜はその表面に疎水部 (炭化水素鎖) を向けている。この単分子膜を脂質二重膜の半片と考え、1 mM の SUV 懸濁液 (sodium phosphate, 10 mM; KCl, 150 mM; pH 7.5) に浸すことによって SUV と LB 膜の疎水性相互作用による自発的融合を促し、プリズム上に脂質二重膜を形成させた。5 時間後、残りの SUV を水で洗い流し、接触溶液 (平面脂質二重膜と接する溶液) を pD 6.8 または pD 5 のスペクトル測定用重水緩衝溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM) で置換した。

脂質二重膜にペプチドを結合させるために、調製した平面単層脂質二重膜を、既知量のペプチドを溶かした上記のスペクトル測定用重水緩衝溶液に浸して平衡化させた。ペプチドの結合に伴う脂質二重膜の ATR スペクトルの時間変化の測定によれば、平衡化には約 5 時間を要するが、ペプチドが脂質二重膜に結合することによって溶液内のペプチドの濃度が減少するため、溶液の交換に伴う新たなペプチドの結合が起こらなくなるまで同様の操作を繰り返した。これらの、脂質単分子膜と SUV との融合や、平面単層脂質二重膜へのペプチドの結合を促すプリズム接触溶液の交換をおこなうために、アクリル製のプリズムホルダーを自作し、分光器にプリズムを設置したままでの溶液の交換を可能にした。

この平面単層脂質二重膜は過剰の水の存在によってはじめて安定になる構造であるため、測定中はプリズム表面が常に (溶液の置換の際にも) 接触溶液に浸かっていることに留意した。また本研究における IR スペクトルの解析ではおもにペプチドのアミド I 吸収帯 ( $1600 \sim 1700 \text{ cm}^{-1}$ ) に注目しているが、同じ領域に水の変角振動の強い吸収があるため、測定溶媒には水の代わりに重水を用いた。

**平面多層脂質二重膜** egg PC の 10 mM SUV 懸濁液 0.5 ml と 1 mM ペプチド水溶液 0.2 ml (どちらも pH 緩衝剤を含まない) の混合物の pH を HCl および NaOH を用いて調整し、窒素気流下で蒸発乾固させて ATR プリズム表面 (1.8 cm × 5 cm) 上に平面多層脂質二重膜 (egg PC / ペプチドの モル比は 25 / 1) を調製した (図 9)。この膜を窒素気流および飽和水蒸気下、常温で 24 時間静置し、再び乾燥させることによって膜内の脂質の配向性を向上させた。この乾燥膜と、これを重水の飽和蒸気と平衡化させることによって調製した水和膜について ATR スペクトルの測定をおこなった。脂質二重膜内での egg PC の一分子あたりの表面占有面積を  $70 \text{ \AA}^2$ 、二重膜一層の幅を  $45 \text{ \AA}$  とすると (Blaurock, 1982; Cornell & Separovic, 1983)、平面多層脂質二重膜の厚さは約  $5 \mu\text{m}$  と計算できる。

## 7. フーリエ変換赤外 (FT / IR) スペクトル

IR-ATR スペクトルの測定には以下に述べる二つのフーリエ変換赤外分光光度計を使用した。フーリエ変換赤外分光法とは、マイケルソン干渉計を用いて光源からの赤外光を各波数成分に比例する周波数に変調した交流信号 (インターフェログラム) として出力し、これをフーリエ変換することによって光の強度の波数依存性 (スペクトル) を得る方法である。干渉計の移動鏡の位置をレーザーで測距しているため、分光に回折格子を用いる分散型分光法に比べてスペクトルの波数精度が非常によい。そのため、多数回の積算が可能であり、弱い吸収を検知しなければならない場合に有効である。

**平面単層脂質二重膜の測定** 平面単層脂質二重膜の IR-ATR スペクトルの測定は日本分光の FT / IR-7300 型フーリエ変換赤外分光光度計を用いておこなった。MCT 検知器 ( $\text{Hg}_{1-x}\text{Cd}_x\text{Te}$  半導体を用いた長波長用光伝導検知器) を用いてインターフェログラムを 6400 回積算し、分解能  $4 \text{ cm}^{-1}$  のスペクトルデータを得た。アポダイジング関数 (インターフェログラムにスペクトルとともに畳み込まれていると仮定される近似的装置関数。移動鏡の移動距離、つまり干渉計の光路差に制限があるため、このような関数の定義が必要になる) には modified cosine curve を用いた。ペ

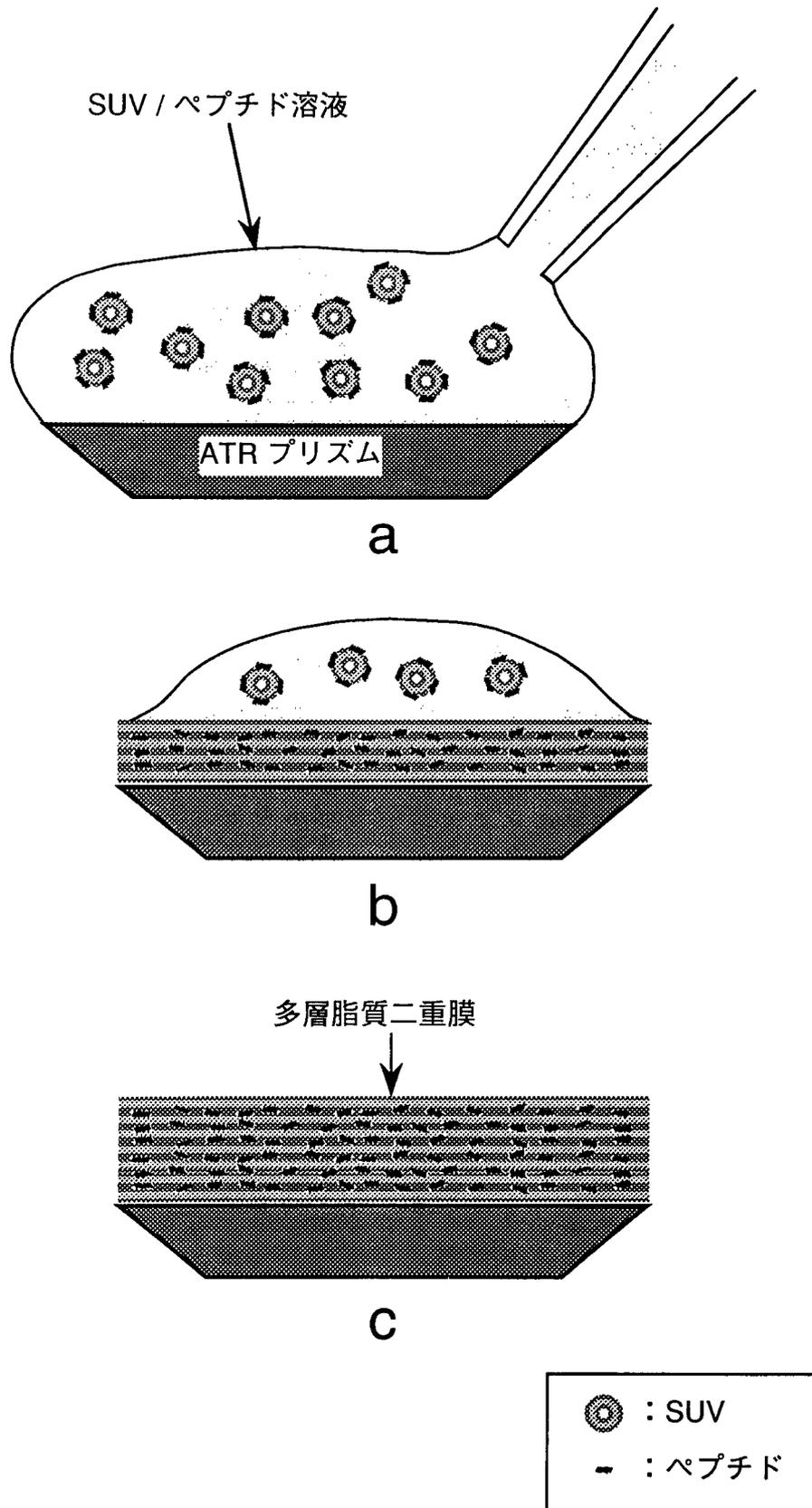


図9 平面多層脂質二重膜の調製手順。pHを調整したSUV / ペプチド溶液を窒素気流下、ATR プリズム表面上で蒸発乾固して平面多層脂質二重膜 (egg PC / ペプチドのモル比は 25 / 1) を調製する。

プチドの吸収帯 (アミド I) 付近に存在する水 (水蒸気) の強い吸収を除くため、スペクトルの測定の間、分光器内部を乾燥空気で置換する必要がある。そこで、空気圧縮機 (日立製作所の 0.2 OP-5S 型小型空気圧縮機) から分光器への空気の流路に、水分子選択透過膜 (PERMA PURE DRYER, model PD-625-24AF) を用いた空気乾燥機 (ジーエルサイエンス社の AD-214 型 Air ドライヤー、出口露点  $-10^{\circ}\text{C}$ )、東京理化の ECS-50 型投げ込みクーラーを用いた  $-50^{\circ}\text{C}$  の冷却トラップ、分子篩型乾燥剤 (和光純薬の合成ゼオライト、A-4 型) のカラム (出口露点  $-70^{\circ}\text{C}$ ) を順につなぐことによって、流量  $5\text{ l / min}$  の乾燥空気を分光器内に導入した。

脂質二重膜の IR-ATR スペクトルの測定系の概略を図 10 に示す。ATR プリズムには多重反射式 (台形) のゲルマニウム製のものを選び、日本分光の入射角  $45^{\circ}$ 、試料面における反射回数が 5 のものと、Spectra-Tech 社の入射角  $30^{\circ}$ 、反射回数が 21 (脂質二重膜がはられた部分の反射回数は 17) のものを用いた。また KRS-5 板上につくられたワイヤー グリッド型の偏光子を用いて入射偏光 (p 偏光, 偏光面が入射面に平行; s 偏光, 偏光面が入射面に垂直) を得た。

**平面多層脂質二重膜の測定** 平面多層脂質二重膜の IR-ATR スペクトルの測定は Nicolet 社の 6000C 型フーリエ変換赤外分光光度計を用いておこなった。積算回数を 2000 回とし、ATR プリズムに入射角  $45^{\circ}$ 、反射回数が 12 のものを用いたほか、測定条件は平面単層脂質二重膜の場合と同じである。

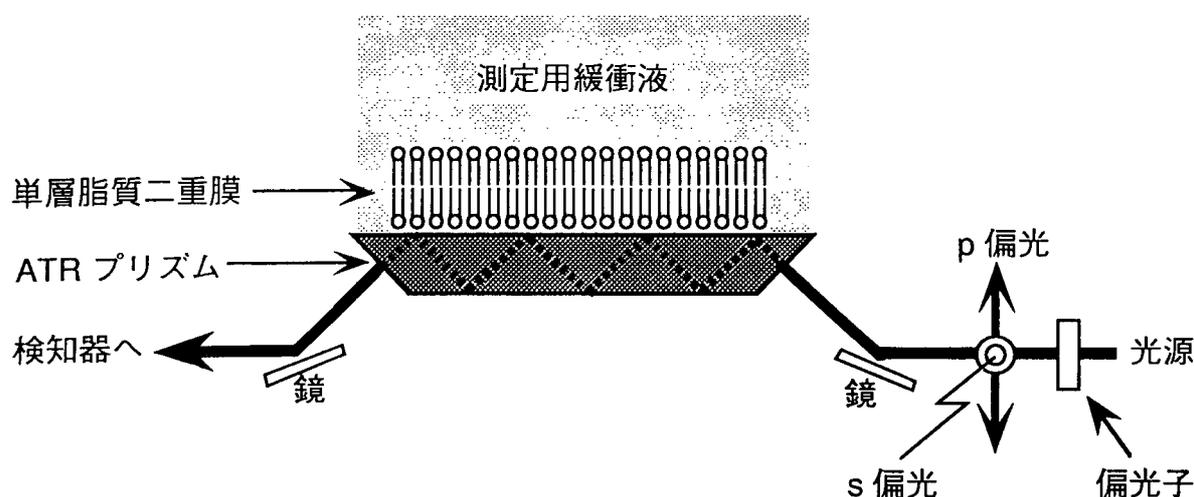


図 10： 入射光に偏光を用いた脂質二重膜の IR-ATR スペクトル測定系。

スペクトルの計算機処理 アミド I 吸収帯の波数はリン脂質の C=O 伸縮振動に起因する吸収帯と近く、すその部分で重なっている。また、その波数はペプチドの二次構造によって異なるため、ペプチドが複数種の二次構造を持つとすればその吸収帯は幾つかのピークの重ね合わせとなる。そこで、平面多層脂質二重膜のスペクトルのアミド I 吸収帯を含む領域に対し、Nicolet 社から供給された波形処理プログラム "FOCAS" を用いて Fourier self-deconvolution およびピークの当てはめをおこない、スペクトルからアミド I 吸収帯およびその各二次構造成分に帰属されるピークを分離した。Fourier self-deconvolution とはスペクトルのある設定領域を時間軸に逆変換し、適当なアポダイジング関数 (解析に用いたものよりも長い光路差をもつ干渉計を仮定したもの) とともに再び波数軸に変換することによって、すべてのピーク幅を狭くしたスペクトルを得る方法である。この操作によって埋もれていたピークの位置を決定し、各ピークをローレンツ曲線と仮定して、もとのスペクトルに対し最小自乗法による各ローレンツ曲線の当てはめをおこなった。

一方、平面単層脂質二重膜のスペクトルは吸収の絶対値が小さいため、ピークの分離はできなかった。また、移動鏡やプリズム設置位置の誤差による位相のずれがインターフェログラムに畳み込まれるためにフーリエ変換赤外分光光度計によって得られるスペクトルには微少な干渉縞が重ね合わされているが、今回のように吸収の小さなスペクトルではこれらはしばしば無視しがたいレベルとなって現れる。そこで、日本分光から供給された再フーリエ変換プログラムを用いてこれらの干渉縞を除去した。

平面単層脂質二重膜の ATR スペクトルの信頼性 平面単層脂質二重膜や脂質単分子膜を観察するには非常に高感度の ATR 測定が必要になる。これらの薄膜の吸収は試料のスペクトルからリファレンス スペクトル (膜が調製される前の ATR プリズムを用いて測定したブランクのスペクトル) を差し引くことによって得られるため、リファレンス・スペクトルの精度が特に重要になる。この場合の「精度」とは試料のスペクトルの測定の際に、リファレンス スペクトルの測定条件 (検知器や光路などの分光器内の状態) がいかに精度よく再現できるか、ということの意味する。ところがプリズム上に平面単層脂質二重膜を調製するためには、リファレンス ス

ペクトルの測定後、プリズムを分光器から取り外す必要がある。その結果、試料測定時のプリズムの再設置に際して光路の微妙なずれが伴い、本来ならリファレンス・スペクトルとの差し引きによって消失するはずの分光器内部の吸収の一部やベースラインのうねりがスペクトル上に現れる(この分光器内部の吸収はMCT検知器によるリファレンス・スペクトル上で通常的に確認できるものであり、検知器の組立において付随するものか、または気相の有機化合物が検知器や窓板などに吸着したものと思われるが、同定はできなかった。無論その吸収は微弱なものであり、リファレンス・スペクトルとの差し引きによってほとんど消失するため、分光器の一般的な使用に際してはなんら問題はない)。平面単層脂質二重膜では多層膜に比べて光路上の分子数が非常に少ないために試料の吸光度が非常に小さくなり、スペクトル上に現われる分光器内部の吸収が試料の吸収に比べて無視できないレベルとなる。そのため、脂質単分子膜や平面単層脂質二重膜のスペクトルの精度はあまり高くなく、そこから得られる配向のデータにも不確実性が残る。しかしながら、脂質単分子膜の調製されたプリズムを一旦分光器内に設置してしまえば、以後の操作(SUVと単分子膜との融合による脂質二重膜の調製や、接触溶液の交換による脂質二重膜へのペプチドの導入)はプリズムの再設置による光路のずれを伴わない。したがって、調製直後の平面単層脂質二重膜のスペクトルを基準としてそれ以後の操作によるスペクトルの変化を解析することにより、十分な精度の結果を得ることができた。詳細については「結果」の各節において述べる。

## 結果

### 1. フーリエ変換赤外 (FTIR)-ATR スペクトルの解析

平面多層脂質二重膜および単層脂質二重膜の偏光 IR-ATR スペクトルの解析は Harrick らの方法に従っておこなった (Harrick & du Pré, 1966; Harrick, 1967) (「付録 A・ATR 分光法の原理」および「付録 B 分子の配向と吸光度の異方性」を参照されたい)。ATR 法によって得られる赤外吸収スペクトルにおいて、ある物質の吸光度は、その分子吸光係数、試料とプリズムの相対屈折率、入射角、プリズム表面に発生する evanescent wave (プリズム表面からの距離によって減衰する定在波) の電場の振幅によって決定される。さらに、入射光として直線偏光を用いることによって特定の吸収帯の吸光係数の異方性を求めることができ、そこから分子の平均配向角度を計算することができる。本研究では、ペプチドのアミド I およびアミド II 吸収帯と脂質の  $\text{CH}_2$  逆対称および対称伸縮振動吸収帯に注目し、その p 偏光 (偏光面が入射面に平行) と s 偏光 (偏光面が入射面に垂直) の吸光度の比  $A_p/A_s$  (二色比) から、ペプチドの  $\alpha$  ヘルックス軸と脂質の炭化水素鎖の膜平面に対する配向を調べた。配向を表すパラメーターは、分子軸の秩序パラメーター  $f$  と、分子軸が膜平面の法線となす平均の角度  $\gamma$  である。 $f$  と  $\gamma$  の関係は (B3) 式によって定義されている。

平面多層脂質二重膜の IR-ATR スペクトル 図 11a に pH 2.5 の SUV 懸濁液より調製し、重水飽和蒸気下で水和させた、ペプチド IV と egg PC の平面多層脂質二重膜 (egg PC / ペプチドのモル比は 25 / 1) の p および s 偏光 ATR スペクトルを示す。3100 ~ 2800  $\text{cm}^{-1}$  に C-H 結合の伸縮振動吸収帯 (図 11b)、2500  $\text{cm}^{-1}$  付近に重水の伸縮振動に起因する強力な吸収帯、1800 ~ 1400  $\text{cm}^{-1}$  にエステルの C=O 結合の伸縮振動およびアミドの振動に起因する吸収帯 (図 11c)、1400  $\text{cm}^{-1}$  以下に重水の変角振動 (1200  $\text{cm}^{-1}$ )、 $\text{PO}_2$  の対称伸縮振動 (1090  $\text{cm}^{-1}$ )、リン酸エステルの C-O の伸縮振動 (1050  $\text{cm}^{-1}$ )、また図 11a では重水の吸収に隠れているが、 $\text{PO}_2$  の逆対称伸縮振

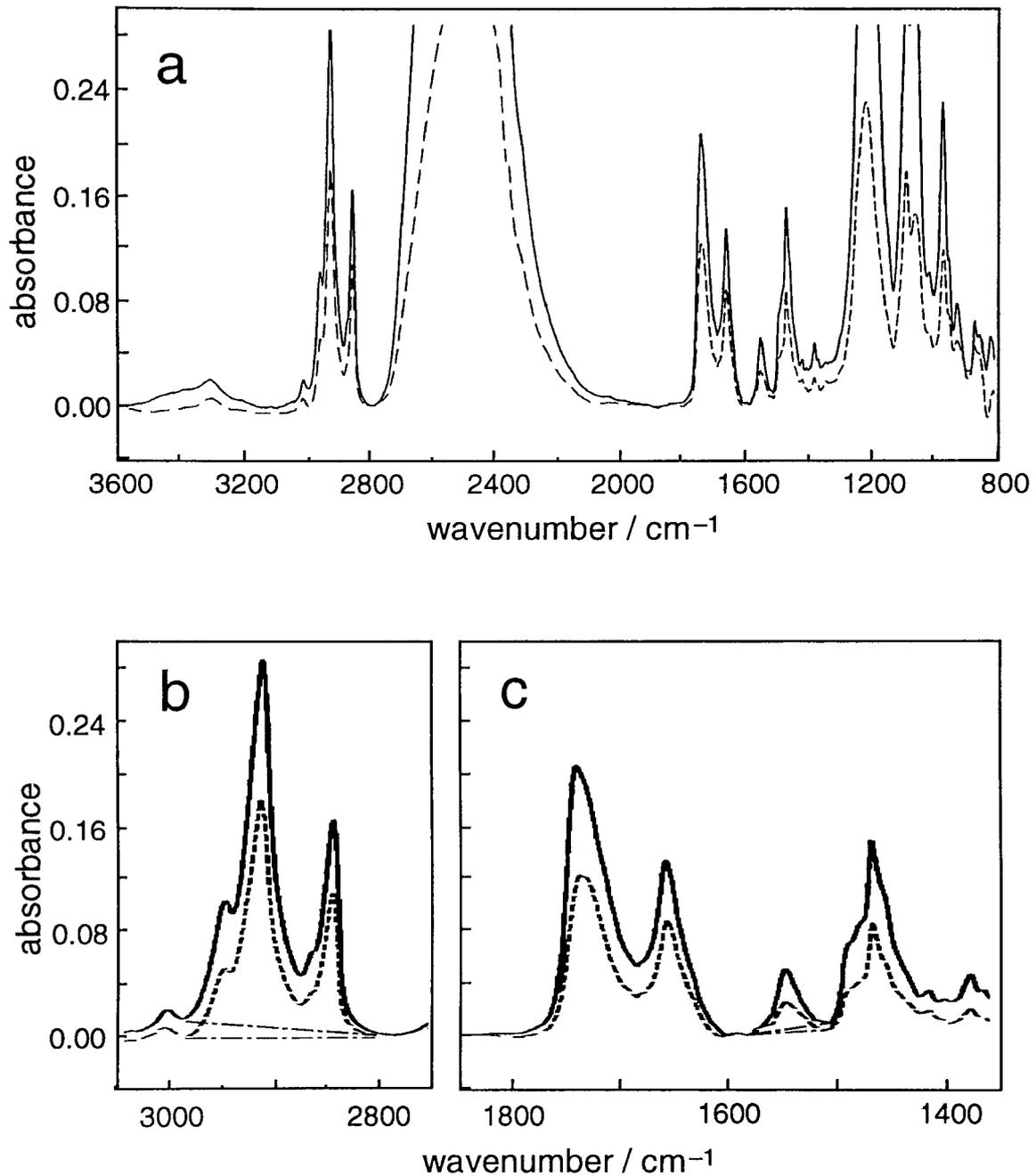


図 11 egg PC SUV とペプチド IV の混合液 (egg PC, 7.14 mM; peptide IV, 0.29 mM; pH 2.5) から調製した平面多層脂質二重膜の IR-ATR スペクトル。実線と破線はそれぞれ入射光に p 偏光と s 偏光を用いたものである。b は C-H 結合の伸縮振動領域、c は C=O 結合の伸縮振動領域およびアミド領域を示す。また、b と c 内の一点鎖線はそれぞれ  $\text{CH}_2$  逆対称および対称伸縮振動とアミド II 吸収帯の吸光度の決定に用いたベースラインである。

動 ( $1240\text{ cm}^{-1}$ ) やエステルの C-O 伸縮振動 ( $1180\text{ cm}^{-1}$ ) などに起因する多くの吸収帯がある。図 11b および図 11c をさらに詳細に解説すると、高波数側から順に、 $-\text{CH}=\text{CH}-$  の C-H 逆対称伸縮振動 ( $3010\text{ cm}^{-1}$ )、 $\text{CH}_3$  の逆対称伸縮振動 ( $2950\text{ cm}^{-1}$ )、 $\text{CH}_2$  の逆対称伸縮振動 ( $2920\text{ cm}^{-1}$ )、 $\text{CH}_3$  の対称伸縮振動 ( $2870\text{ cm}^{-1}$ )、 $\text{CH}_2$  の対称伸縮振動 ( $2850\text{ cm}^{-1}$ )、エステルの C=O 伸縮振動 ( $1720\text{ cm}^{-1}$ )、アミド I (主にペプチド結合部の C=O 伸縮振動に起因する) ( $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$ )、アミド II (主にペプチド結合部の N-H 面内変角振動に起因する) ( $\sim 1550\text{ cm}^{-1}$ ) などの吸収帯が観察される。また  $1460\text{ cm}^{-1}$  付近に見られる吸収帯は、水素 重水素交換の起こったペプチドのアミド II、 $\text{CH}_2$  変角振動、HOD ( $\text{D}_2\text{O}$  の混入物として存在する) の変角振動に起因する吸収帯の重ね合わせと考えられる。これらの吸収帯の帰属は Fringeli の記述 (Fringeli, 1977) に従った。

平面多層脂質二重膜における脂質の炭化水素鎖の配向の計算 「付録 B・分子の配向と吸光度の異方性」の (B4) 式を用いることにより、適当な吸収帯の  $A_p/A_s$  から、膜平面に対する分子軸の配向パラメーター、 $f$  および  $\gamma$  を計算することができる。この場合、遷移双極子モーメントと分子軸のなす角  $a$  が小さいほど配向を精度よく決定できるが、炭化水素鎖の配向を決定するのに最もよく用いられる  $\text{CH}_2$  の横揺れ振動の吸収帯 ( $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ ) (遷移モーメントは炭化水素鎖に平行であり、 $a = 0^\circ$ ) は今回のような液晶状態の系ではほとんど消失してしまう。そのため、今回は  $\text{CH}_2$  の逆対称伸縮振動 ( $2920\text{ cm}^{-1}$ ) および対称伸縮振動 ( $2850\text{ cm}^{-1}$ ) (どちらの遷移モーメントも炭化水素鎖に対して垂直であり、 $a = 90^\circ$ ) を使い、図 11b のようにベースラインを引いてそれぞれの吸収帯頂点の吸光度を読みとり、それらの値を用いて  $A_p/A_s$  を決定した。

平面多層脂質二重膜におけるペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸の配向の計算 高橋らの結果によれば、本研究で用いたペプチドはすべて pH によらず脂質二重膜に結合して主に  $\alpha$  ヘリックス構造をとり、CD スペクトルの結果からその含量は少なくとも 6 ~ 7 割と見積もられる (Takahashi, 1990; Murata et al., 1993)。したがってその二次構造のすべてを  $\alpha$  ヘリックスと仮定すれば、炭化水素鎖の配向決定と同様にア

ミド I ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ;  $a = 27^\circ$ ) およびアミド II ( $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ ;  $a = 90^\circ$ ) の  $A_p/A_s$  値から、 $\alpha$ ヘリックス軸の  $f$  および  $\gamma$  を計算することができる。アミド II については図 11c のようにベースラインを引いて吸収帯頂点の吸光度を読みとり、 $A_p/A_s$  値を決定した。ところがアミド I 吸収帯は、図 11c のようにエステルの C=O 伸縮振動 ( $1720 \text{ cm}^{-1}$ ) と重なっているためベースラインを引くことが困難であった。そこで、Fourier self-deconvolution および最小自乗法によるピーク分解をおこなってスペクトルからアミド I 吸収帯およびその各成分を分離した。

図 11 の p 偏光スペクトルのアミド I 吸収帯のピーク分解の結果を図 12 に示す。 $\alpha$ ヘリックスおよびランダムコイルに帰属されるアミド I 吸収帯の波数はどちらも  $1660 \sim 1645 \text{ cm}^{-1}$  であり、両者をその波数によって区別することは困難であるが、重水中でアミドの水素が重水素と交換することによってランダムコイルの波数が  $1645 \sim 1635 \text{ cm}^{-1}$  へシフトし、 $\alpha$ ヘリックスと区別できるようになる。一方、アミド II 吸収帯は水素 重水素交換によって  $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  から  $\sim 1460 \text{ cm}^{-1}$  へと大幅にシフトするため、 $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  の吸光度変化をペプチドの重水素交換率の指標として用いることができる。アミド I と  $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$  のアミド II の強度比の変化の観察によると、重水の飽和蒸気下での 3～4 時間の平衡化によって平面多層脂質二重膜内のペプチドのアミドの水素の約 3 割が重水素と交換し、定常状態 (24 時間経過後も変化しない) に至った。ランダムコイル内での水素・重水素交換は規則構造内に比べ迅速におこると考えられているため、この時点でほとんどのランダムコイルのアミドの水素は重水素と置換しているとみなすことができる。図 12 の各ピークの波数はそれぞれ  $1680.2, 1668.6, 1656.9, 1643.0, 1629.9 \text{ cm}^{-1}$  であり、Cabiaux らに従ってそれぞれターン (または  $\beta$  構造)、ターン、 $\alpha$ ヘリックス、ランダムコイル、 $\beta$  構造に帰属できる (Cabiaux et al., 1989)。このうち  $\alpha$ ヘリックスに帰属されるピークの吸光度面積を用いてアミド I 吸収帯の  $A_p/A_s$  値を決定した。一方、(重水素交換をおこなっていない) 乾燥膜の場合には  $1645 \sim 1660 \text{ cm}^{-1}$  のピークをすべて  $\alpha$ ヘリックスによるものと仮定して  $A_p/A_s$  値を決定した。

平面単層脂質二重膜における脂質及びペプチドの配向と、ペプチド結合量の計算

平面単層脂質二重膜における分子配向の解析も基本的には多層膜の場合と同様

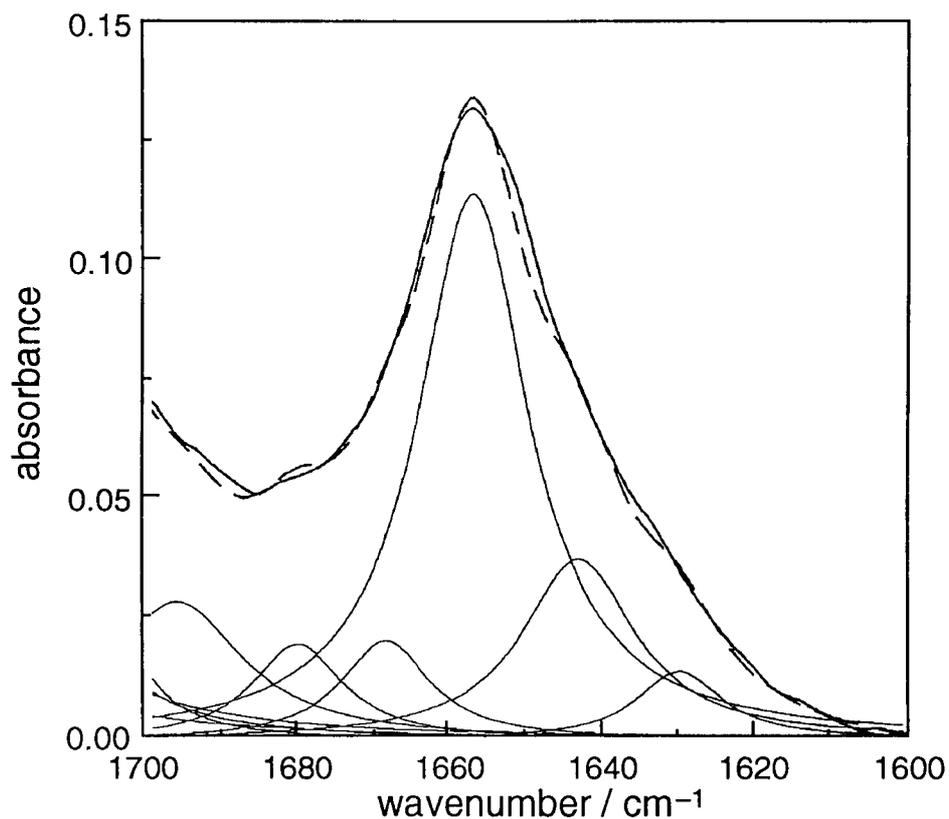


図 12: egg PC / ペプチド IV 平面多層脂質二重膜の IR-ATR スペクトルのアミド I 吸収帯を Fourier self-deconvolution および最小自乗法によってピーク分解した結果。実線は図 11c の p 偏光スペクトルと、それをピーク分解して得られた各吸収帯 (ローレンツ曲線として近似されている) であり、破線は分離した吸収帯を再び重ね合わせたものである。スペクトルから分離された各アミド I 吸収帯の波数はそれぞれ 1680.2, 1668.6, 1656.9, 1643.0, 1629.9 cm<sup>-1</sup> であり、このうち 1659.6 cm<sup>-1</sup> のピークが  $\alpha$  ヘリックスに帰属され、 $\alpha$  ヘリックス構造に対応するアミド I 吸収帯の吸光度の決定に用いられた。

であり、 $\text{CH}_2$  逆対称および対称伸縮振動とアミド I の吸収帯の  $A_p/A_s$  値をスペクトルから決定し、「付録 B 分子の配向と吸光度の異方性」の (B5) 式に代入することによって脂質の炭化水素鎖および  $\alpha$  ヘリックス軸の膜平面に対する配向パラメーター、 $f$  および  $\gamma$  を計算した。

図 13a に egg PC の平面単層脂質二重膜の IR-ATR スペクトル (C-H 結合の伸縮振動領域) を示す。図中に記したベースラインをもとに  $\text{CH}_2$  逆対称伸縮振動および対称伸縮振動の吸収帯頂点における吸光度を読みとり  $A_p/A_s$  値を決定した。

「実験方法」において述べたように、平面単層脂質二重膜の ATR スペクトルには分光器内の吸収などの強いバックグラウンドが重なっており、定量的な解析を直接おこなうことには疑問が残る。そこで平面単層脂質二重膜内におけるペプチドの ATR スペクトルは、ペプチド溶液との平衡化によってペプチドを結合させた脂質二重膜と、ペプチド結合前の脂質二重膜との差スペクトルとして得ることにした (ペプチド溶液との平衡化の操作にはプリズムの着脱を要しないため、「光路のずれ」は生じない)。以上のようにして得た、平面単層脂質二重膜に結合したペプチド IV の ATR スペクトルを図 13b に示す。図中に記したベースラインをもとにアミド I 吸収帯の吸光度面積を読みとり  $A_p/A_s$  値を決定した (平面単層脂質二重膜のスペクトルでは吸光度の絶対値が小さすぎてピーク分解をおこなうことができず、アミド I 吸収帯のすべてを  $\alpha$  ヘリックスに起因するものと仮定して計算した)。同様な理由から、本研究では平面単層脂質二重膜内における脂質の炭化水素鎖の配向 ( $f$ ) の絶対値についてはあまり厳密な考察をおこなわず、ペプチドを含まない平面単層脂質二重膜のスペクトルを基準にした、ペプチドの結合による  $f$  の変化 ( $\Delta f$ ) について考察するにとどめた。

また、平面単層脂質二重膜の実験におけるペプチドははじめから重水溶液として調製されるため、アミド II はほぼ完全に  $1460\text{ cm}^{-1}$  にシフトしている。既に述べたようにこの吸収帯は重水に混入している HOD の変角振動と重なっているため、単層膜のスペクトルについてはアミド II の解析はおこなわなかった。

さらに、以上のようにして得られたペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸の  $f$  値を (B2) 式に代入して分子吸光係数  $\epsilon_x, \epsilon_y, \epsilon_z$  をそれぞれ計算し、(A12) 式および (A13) 式を用いて平面単層脂質二重膜に結合しているペプチドの表面密度  $\Gamma$  (膜平面の単位面積あたり

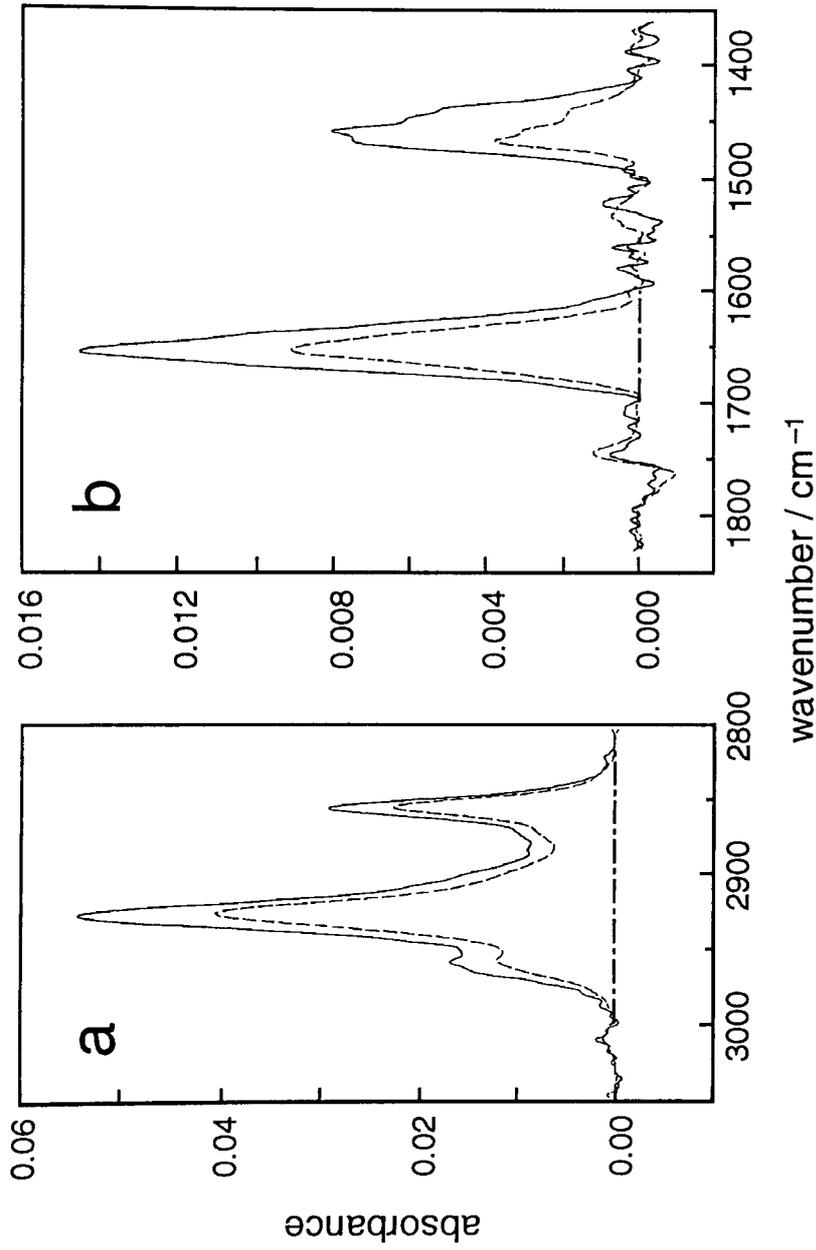


図 13: a は egg PC 平面単層脂質二重膜の IR-ATR スペクトル (C-H 結合の伸縮振動領域)、b は 0.33  $\mu\text{M}$  のペプチド IV 重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pD5) との平衡化によって egg PC 平面単層脂質二重膜に結合したペプチドの IR-ATR スペクトル (アミド領域) であり、ペプチドを結合させた脂質二重膜と、ペプチド結合前の脂質二重膜との差スペクトルとして得られたものである。実線と破線はそれぞれ入射光に p 偏光と s 偏光を用いたものであり、一点鎖線はそれぞれ  $\text{CH}_2$  逆対称および対称伸縮振動とアミド I 吸収帯の吸光度の決定に用いたベースラインである。

のペプチドのモル数)を決定した。この場合、アミド I 吸収帯の遷移モーメントが持ちうる最大の分子吸光係数  $\epsilon_m$  値が必要になる。本研究では KBr 錠剤法を用いてペプチドの透過 IR スペクトルを測定し、アミド I 吸収帯の吸光度面積と KBr 錠剤内のペプチド濃度かける錠剤の厚さの検量線を作成することによって  $\epsilon_m$  を決定した (KBr 錠剤内におけるペプチドが完全な無配向状態であるとする、(B2) および (B3) 式より、このときの分子吸光係数は  $\epsilon_x = \epsilon_y = \epsilon_z = \epsilon_m / 3$  と計算でき、この値が検量線の傾きとして現れる)。図 14 にペプチド IV の検量線を示す。この傾きから、ペプチド IV の  $\epsilon_m$  として  $501 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^2$  が得られた。

## 2. 平面多層脂質二重膜内での脂質およびペプチドの配向

上記の手順に従って解析した平面多層脂質二重膜内における egg PC の炭化水素鎖と、膜融合活性ペプチド IV および III の  $\alpha$  ヘルックス軸の配向を表 1 に示す。ペプチド IV と III はどちらも pH 6 以下でリポソームの膜融合を誘起するが、炭化水素鎖

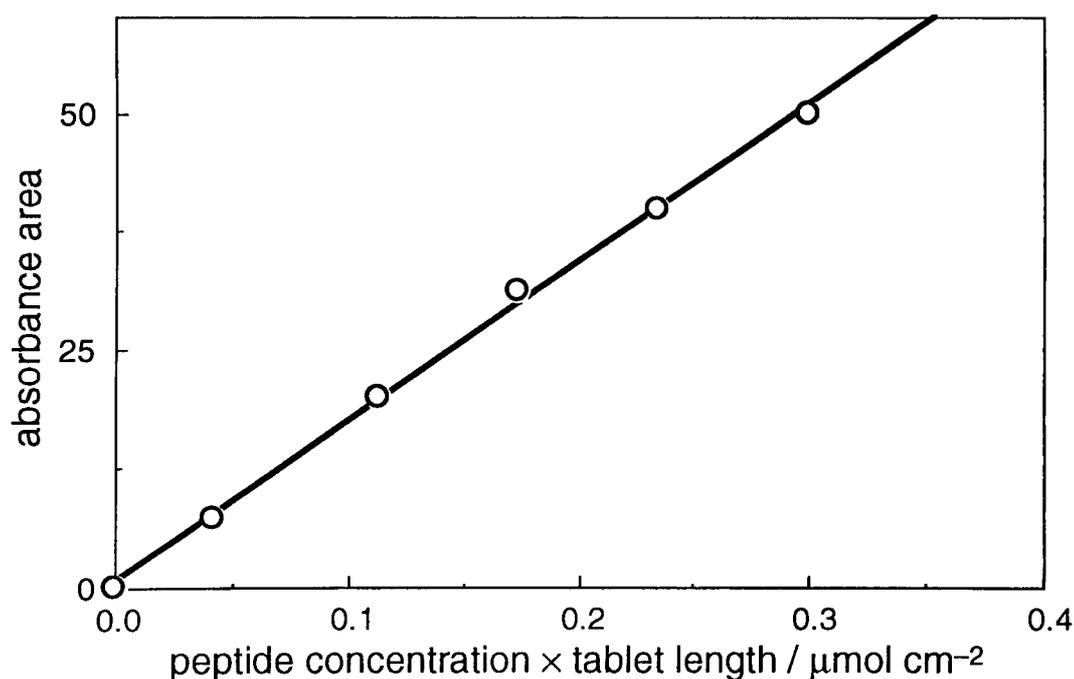


図 14: KBr 錠剤法による透過 IR スペクトルの解析から得られた、ペプチド IV のアミド I 吸収帯の検量線。縦軸はアミド I 吸収帯の吸光度面積、横軸は錠剤内のペプチドの濃度かける錠剤の厚さである。

表 1 egg PC 多層脂質二重膜の偏光 ATR スペクトル解析

ペプチド	egg PC の炭化水素鎖				ペプチドの $\alpha$ ヘリックス軸				
	CH <sub>2</sub> 逆対称伸縮振動		CH <sub>2</sub> 対称伸縮振動		アミド I		アミド II		
	$f$ ( $\pm 0.1$ )	$\gamma$ / degree ( $\pm 4$ )	$f$ ( $\pm 0.2$ )	$\gamma$ / degree ( $\pm 8$ )	$f$ ( $\pm 0.1$ )	$\gamma$ / degree ( $\pm 6$ )	$f$ ( $\pm 0.2$ )	$\gamma$ / degree ( $\pm 12$ )	
-	dry	0.4	39	0.3	43	-	-	-	-
IV	pH 2.5, dry	0.3	43	0.3	43	-0.3	69	-0.2	63
IV	pH 2.5, wet	0.3	43	0.3	43	-0.3	69	-0.1	59
IV	pH 5, dry	0.4	39	0.5	35	-0.4	75	-0.2	63
IV	pH 5, wet	0.4	39	0.4	39	-0.3	69	-0.2	63
IV	pH 8, dry	0.4	39	0.5	35	-0.3	69	-0.2	63
III	pH 2.5, dry	0.2	47	0.3	43	-0.4	75	-0.2	63
III	pH 2.5, wet	0.2	47	0.3	43	-0.3	69	-0.2	63
III	pH 5, dry	0.4	39	0.4	39	-0.3	69	-0.3	69
III	pH 5, wet	0.4	39	0.5	35	-0.3	69	-0.1	59
III	pH 8, dry	0.3	43	0.3	43	-0.3	69	-0.3	69

$f$  は膜平面に対する分子軸 (炭化水素鎖または  $\alpha$  ヘリックス軸) の配向の秩序パラメーター、 $\gamma$  は  $f$  から導かれる配向角度 (膜平面の法線と分子軸のなす角度)。同種分子全ての  $\gamma$  を一定と仮定して計算したものである。括弧内の値は同一データのばらつきから予想される最大誤差である。表 2 列目は製膜および測定条件であり、製膜に用いた SUV / ペプチド溶液の pH 値および測定時の膜の状態 (dry は乾燥膜、wet は重水水和膜) を示す。また、膜内における egg PC / ペプチドのモル比は 25 / 1 である。

の配向はこれらのペプチドの有無や pH、水和状態によらずほとんど変化しなかった ( $f$  は 0.2 ~ 0.4、 $\gamma$  は 40° 付近)。この配向値は NMR や ESR を用いて測定された液晶状態における脂質の脂質炭化水素鎖の配向とよく一致しており (Marcelja, 1974; Seelig & Seelig, 1977)、今回調製された膜が確かに多層二重膜構造をとっていることが確認できた。また、ペプチドの配向にも明らかな pH 依存性は見られず、 $\alpha$  ヘルックス軸は膜平面に対してほぼ平行であった ( $f$  は -0.3 ~ -0.4、 $\gamma$  は 70° 付近)。

測定に用いられた平面多層脂質二重膜における egg PC / ペプチドのモル比は 25 / 1 である。この値はペプチド IV および III のリポソームに対する膜融合活性が蛍光プローブ法や電子顕微鏡観察などによって確認されている範囲内 (脂質 / ペプチドのモル比が 20 / 1 ~ 80 / 1) で、より高い吸光度を得られる条件として選ばれたものである。その結果、アミド I 吸収帯については解析に十分な吸光度が得られたが、アミド II のデータはばらつきが大きく、解析には適さなかった。これは、もともとアミド II の吸光度がアミド I に比べて小さいこと、 $a$  値が大きいため  $f$  値に対する  $A_p / A_s$  の感度がアミド I の場合よりも低いことなどによる。

表 1 中の pH はプリズム上で蒸発乾固する SUV / ペプチド水溶液について調整した値であり、この値の、乾燥多層膜や重水和多層膜の系における意味は明らかではない。しかしながら、序論で述べたようにこれらのペプチドの膜融合活性はそのグルタミン酸側鎖の解離状態と密接な関係があることが予想されており、水溶液中のペプチド側鎖の解離の割合が多層膜内においても保存されているとすれば、多層膜内のペプチドのふるまいはリポソーム上のそれを反映するものと思われる。また、pH 8 で調製された多層膜は重水の水和によってプリズムから剥離してしまい、水和膜としての測定ができなかった。これはおそらく膜に結合しているペプチドの親水面の電荷によって単層二重膜間で電荷反発が起こり、二重膜の多層構造が不安定になったためと考えられる。

### 3. 脂質単分子膜と平面単層脂質二重膜の物性

ATR プリズム上における脂質単分子膜や平面単層脂質二重膜の形成は、IR スペクトルによって確認された。「実験方法」において述べたように、脂質単分子膜 (脂質

二重膜の半片の一重膜に対応する)のスペクトルの吸光度値にはいくらかの不確実性があるが、Langmuir-Blodgett法は既によく確立された手法であり、脂質単分子膜の形成については疑う余地はない。また、SUVの脂質単分子膜への融合に伴って脂質の吸光度は約2倍になり、この増加はすべての実験において同レベルであった。これらの事実はATRプリズム上における平面単層脂質二重膜の形成を示唆するものである。

脂質単分子膜と平面単層脂質二重膜内における、egg PCおよびDOPCの炭化水素鎖の配向パラメーター、 $f$ および $\gamma$ を表2にまとめる。表2によれば、平面単層脂質二重膜中における脂質炭化水素鎖は、データのばらつきのためにやや信頼性は低いものの、前出の平面多層脂質二重膜のIR-ATRスペクトルによる結果や、NMRやESRによるリポソーム内の脂質についての結果( $f \approx 0.4, \gamma \approx 40^\circ$ )と比べて明らかに配向性が低かった。一方FringeliらはIR-ATR法を用いて、液晶状態にある平面多層脂質二重膜(PCではない)内における炭化水素鎖が無配向状態に近いことを示しており( $f = 0 \sim 0.1$ ) (Fringeli et al., 1976)、今回の結果と一致している。液晶状態にある平面単層脂質二重膜や脂質単分子膜内における脂質配向は未だ報告されていないため、これらの不一致は実験系の違いによる可能性もあるが、上述の脂質単分子膜スペクトルの吸光度決定に関する不確実性による可能性もあり、現時点では平面単層脂質二重膜における脂質の配向値の決定は困難であると判断した。

表2 脂質単分子膜および単層脂質二重膜内における脂質炭化水素鎖の配向

	CH <sub>2</sub> 逆対称伸縮振動		CH <sub>2</sub> 対称伸縮振動	
	$f$	$\gamma$	$f$	$\gamma$
DOPC 二重膜	0.03 ± 0.11	54 ± 4	0.09 ± 0.15	51 ± 6
DOPC 一重膜	0.22 ± 0.08	46 ± 3	0.27 ± 0.07	45 ± 3
egg PC 二重膜	0.14 ± 0.03	49 ± 1	0.19 ± 0.04	47 ± 2
egg PC 一重膜	0.39 ± 0.16	40 ± 6	0.27 ± 0.07	45 ± 3

$f$ は膜平面に対する炭化水素鎖の配向の秩序パラメーター、 $\gamma$ は $f$ から導かれる平均配向角度(膜平面の法線と炭化水素鎖のなす角度)である。複数回の実験間のデータのばらつきを付記する。

#### 4. 平面単層脂質二重膜へのペプチドの結合

本節では平面単層脂質二重膜の IR-ATR スペクトルの解析より得られた、膜に結合している膜融合活性ペプチド IV の表面密度  $\Gamma$  と、膜と平衡状態にある重水溶液のペプチド濃度との結合等温線の形状から、脂質二重膜への結合挙動とその pH 依存性について述べる（「付録 C・ペプチド 脂質二重膜結合等温線の解釈について」を参照されたい）。高橋によれば、ペプチド IV は一連の膜融合活性ペプチドのうちで最も  $\alpha$  ヘリックス含量が高く (Takahashi, 1990)、アミド I 吸収帯のすべてを  $\alpha$  ヘリックスに起因するものと近似せざるを得ない平面単層脂質二重膜の実験系に最も適したペプチドである。図 15 にペプチド IV の CD スペクトルを示す。これらは pH の低下やリポソームとの共存によってペプチド IV の  $\alpha$  ヘリックス含量が増大することを示しており、酸性 pH に特異的な膜融合活性に  $\alpha$  ヘリックス構造が関与しているというモデルを支持するものである。

中性 pH におけるペプチド IV の脂質二重膜への結合 中性 pH (pD 6.8) におけるペプチド IV と egg PC 平面単層脂質二重膜との結合等温線を図 16 に示す。高橋らの研究によれば (高橋, 平成 5 年)、一連の膜融合活性ペプチドは中性 pH 下、1 mM 以上の高濃度範囲においてペプチドの会合によると思われる二次構造含量の増加を示すが、図 16 のような低濃度においてはその効果は現れない。従って、溶液内におけるペプチドの濃度依存性会合が結合等温線に与える影響については考えなくともよい。この結合等温線には、結合定数  $K$  が  $42.5 \text{ mM}^{-1}$ 、飽和表面密度  $\Gamma_m$  が  $0.0325 \text{ nmol cm}^{-2}$  の Langmuir の吸着等温線 (C3) 式) を当てはめることができる (図 16)。これら二つのパラメーターは、 $c/\Gamma$  の  $c$  に対するプロットから最小自乗法によって得られた直線の切片と傾きから求めたものである。Langmuir の吸着等温線に従うことは、すなわち吸着分子 (この場合ならばペプチド) が結合定数  $K$  に従ってそれぞれ独立に界面 (脂質二重膜) に結合し、かつその結合には協同的な効果がないことを意味している。

また脂質の C=O 伸縮振動吸収帯の観察によると、ペプチドの結合が進み、表面密度  $\Gamma$  が飽和表面密度  $\Gamma_m$  に近づくとつれて、脂質二重膜中の egg PC の分子数は減少

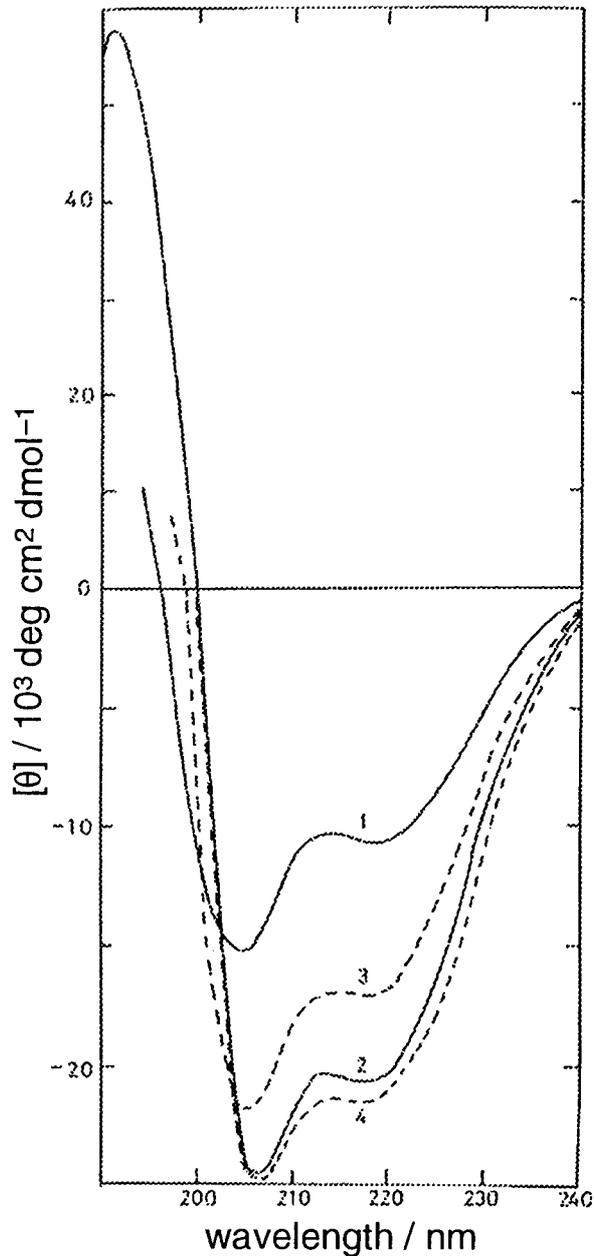


図 15： ペプチド IV の CD スペクトル ((Takahashi, 1990) より転載)。1 (pH 7.26) と 2 (pH 4.95) は、MES, 5 mM; KCl, 100 mM 緩衝溶液中、ペプチド濃度  $9.25 \times 10^{-4}$  M で測定したもの、3 (pH 7.02) と 4 (pH 5.37) は同緩衝溶液中、egg PC SUV 4 mM の共存下で、ペプチド濃度  $1.98 \times 10^{-4}$  M で測定したものである。共存する SUV の散乱の影響を考慮すると  $[\theta]$  (残基モル楕円率) の値にあまり信頼をおくことはできないが、スペクトルの形状から判断して、リポソーム共存下のペプチド IV の二次構造は明らかに  $\alpha$  ヘリックス優勢である。散乱の影響を無視するならば、たとえば酸性 pH、リポソーム共存下でのペプチドの  $\alpha$  ヘリックス含量は約 7 割と見積もることができる (通常、波長 222 nm における楕円率は  $\alpha$  ヘリックス含量にほぼ比例すると考えられており、 $\alpha$  ヘリックス含量 100 % の楕円率として -33000 がよく用いられる)。

していき、ついには外側の一重膜の5割にも及ぶ egg PC が脂質二重膜上から消失した(図 16)。これは、ペプチドが脂質二重膜に結合することによって脂質分子と置換したか、あるいは脂質分子を可溶化したためと思われる。アミノ酸側鎖のかさ高さを考慮して  $\alpha$  ヘリックスのモデルを構築すると、20 残基長のペプチド IV は半径 5 Å、長さが 30 Å の円筒とみなすことができ、ペプチド単量体当たりの表面占有面積はその配向や脂質二重膜への結合の深さによって 80 ~ 300 Å<sup>2</sup> の値をとる。従って、 $\Gamma = \Gamma_m$  の場合、ペプチドは脂質二重膜の外側の一重膜の 17 ~ 65 % の脂質と置換することが可能である。

酸性 pH におけるペプチド IV の脂質二重膜への結合 一方、酸性 pH (pD 5) におけるペプチド IV と平面単層脂質二重膜との結合等温線は図 17 のようになった。

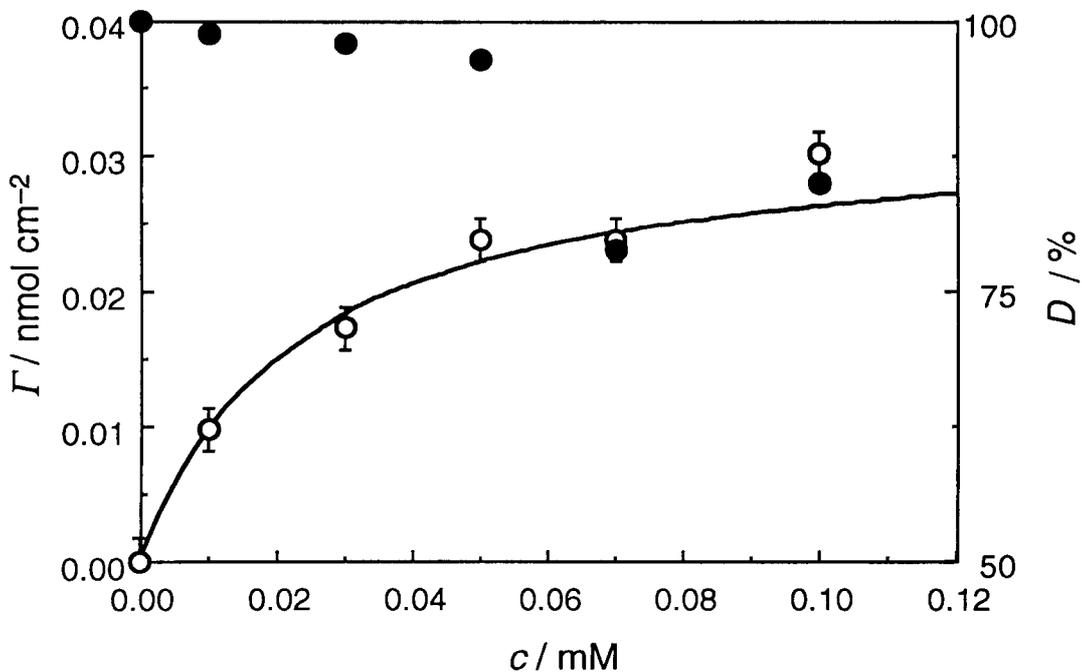


図 16： 中性重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pD 6.8) 中でのペプチド IV の egg PC 平面単層脂質二重膜との結合等温線。横軸  $c$  は脂質二重膜と平衡化している接触溶液中のペプチドの濃度である。縦軸は白丸が  $\Gamma$  (ペプチドの表面密度、脂質二重膜の単位面積当たりのペプチドのモル数) であり、実線はこれに Langmuir の吸着等温線を当てはめたものである。また、誤差幅はスペクトルのノイズレベルから見積もられた。黒丸は  $D$  として、脂質の C=O 伸縮振動吸収帯 (1690 ~ 1770 cm<sup>-1</sup>) の吸光度面積をペプチド結合前の脂質二重膜との比として計算したものであり、ペプチドの結合による脂質分子の減少を表す。

ペプチドは中性 pH の場合の 100 倍以上薄い濃度で、より大量に脂質二重膜に結合することができ、その結合は  $\Gamma$  が小さい範囲において協同的な性質を示した。また中性 pH の場合と対照的に、ペプチドと脂質分子との置換は観察されなかった。

図 18 に、CD スペクトルを用いて測定した、酸性 pH におけるペプチド IV の  $\alpha$  ヘリックス含量の濃度依存性を示す。この結果によると、ペプチド IV は pH 5 において、濃度依存性の会合によって  $\alpha$  ヘリックス構造を安定化させていると思われるが、 $1 \mu\text{M}$  以下の濃度においてはその兆候を示さなかった。したがって、ペプチド IV は結合等温線の濃度範囲において溶液内ではランダムコイル構造をとる単量体であり、前述のように脂質二重膜に結合して  $\alpha$  ヘリックス構造をとると考えられる。従って、図 17 の結合等温線は溶液内におけるペプチドの濃度依存性会合の影響をうけていない。

溶液中で単量体として存在するペプチド IV が、脂質二重膜に結合して  $n$  量体を形成すると仮定すると、 $\Gamma$  が小さい範囲での結合等温線は (C8) 式のように表され、結合等温線を両対数表示すれば、傾き  $n$  の直線を得ることができるはずである。

図 19 は図 17 の結合等温線を両対数表示したものである。傾きは DOPC と egg PC

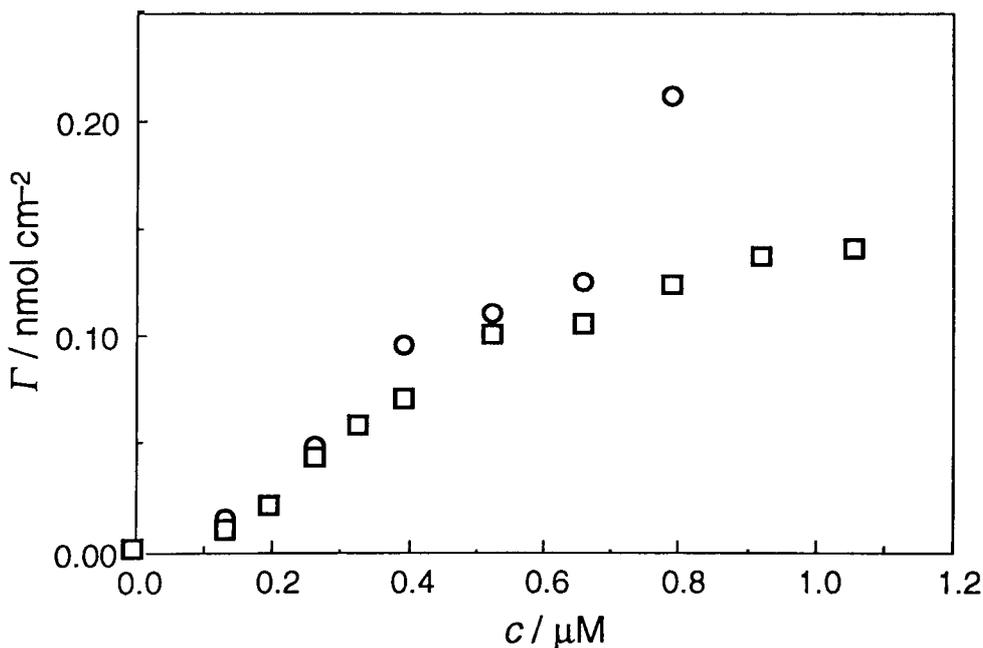


図 17： 酸性重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pD 5) 中でのペプチド IV の平面単層脂質二重膜との結合等温線。丸は DOPC、四角は egg PC の場合を表す。スペクトルのノイズレベルから推定される誤差は、印の幅よりも小さい。

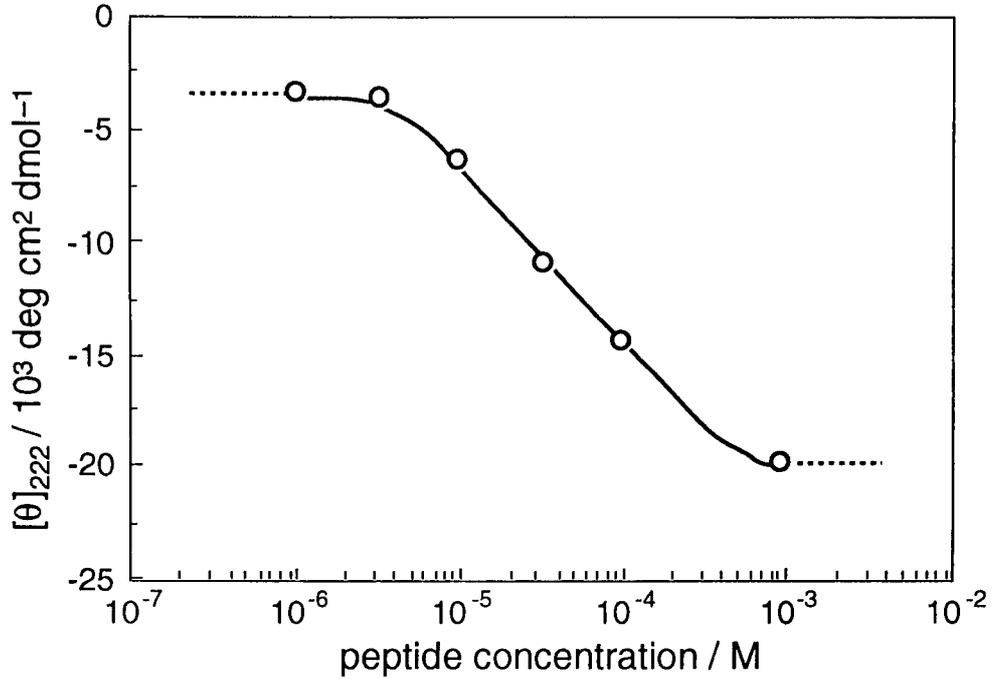


図 18： 酸性水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pH 5; 水と重水の違いを除けば、組成および pH (pD) は図 17 と同じである) 中でのペプチド IV の、波長 222 nm における  $[\theta]$  (残基モル楕円率 CD スペクトルの測定値) のペプチド濃度依存性。縦軸の大きさは  $\alpha$  ヘリックス含量にほぼ比例すると考えられている。

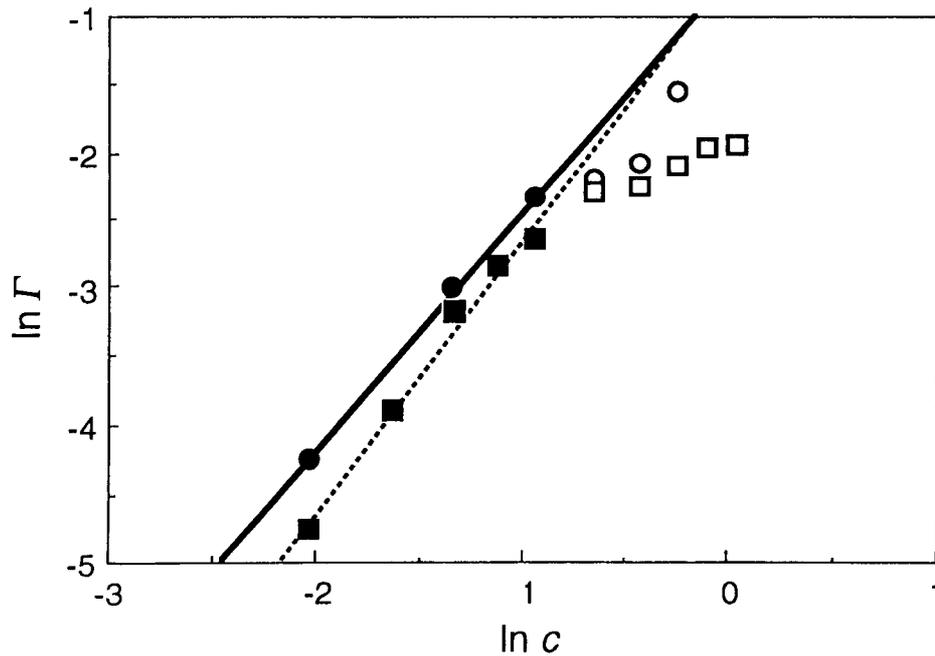


図 19： 図 17 の両対数表示。丸は DOPC、四角は egg PC の場合を表す。実線および点線は、 $\Gamma$  が小さい範囲 (黒塗りの印で示す) に対して最小自乗法で当てはめた直線であり、それぞれ 1.75, 1.99 の傾きをもつ。

の場合に対してそれぞれ 1.75, 1.99 となり、このことから脂質二重膜上におけるペプチドの会合数は 2 であると推定され、この会合のために脂質二重膜との結合が協同的になると考えられる。

## 5. 平面単層脂質二重膜内でのペプチドの配向および脂質の配向

本節では IR-ATR スペクトルによって観察された、膜融合活性ペプチドの結合量に依存するペプチドと脂質の配向の変化について述べる。これらの変化は各結合過程におけるペプチドと脂質との相互作用を反映していると考えられる。

ペプチド IV の  $\alpha$  ヘリックス軸の配向 平面単層脂質二重膜内におけるペプチド IV の  $\alpha$  ヘリックス軸の配向を図 20 に示す。中性 pH (pD 6.8) の接触溶液中での egg PC 脂質二重膜内の  $\alpha$  ヘリックス軸は、ほとんど無配向であるか、または膜平面の法線と約  $54.7^\circ$  の角度をなす、傾いた配向をとった (「付録 B . 分子の配向と吸光

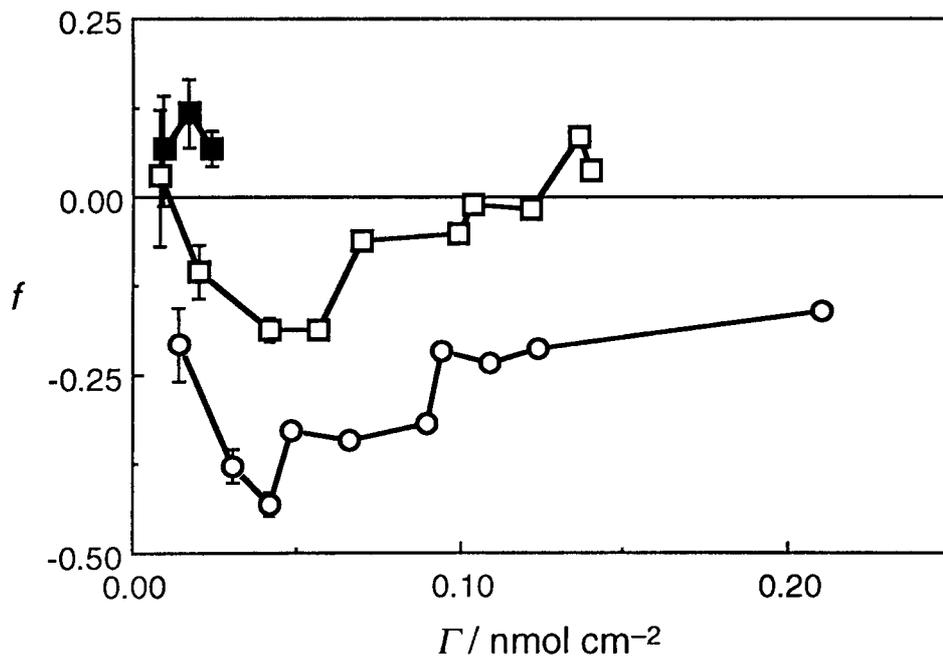


図 20： 重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM) 中、平面単層脂質二重膜内におけるペプチド IV の配向。 $\Gamma$  はペプチドの表面密度、 $f$  は  $\alpha$  ヘリックス軸の秩序パラメーターである。丸は DOPC、四角は egg PC、白抜きは pD 5、黒塗りは pD 6.8 の場合を表す。誤差幅はスペクトルのノイズレベルから見積もられた。

度の異方性」参照されたい)。一方、酸性 pH (pD 5) 下での egg PC 内の  $\alpha$  ヘリックス軸の配向は膜平面に対してより平行になり、DOPC 内ではさらに平行になった。 $\Gamma$  が小さい範囲では、ペプチドの結合がすすむにつれて  $\alpha$  ヘリックス軸の配向は膜平面に対してより平行になるが、 $\Gamma = 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  を越えたあたりで急激に傾くか、あるいは配向性が低下した。 $\alpha$  ヘリックスのモデルから、膜平面に対して平行に結合するペプチド単量体当たりの表面占有面積を  $300 \text{ \AA}^2$  と仮定すると、 $\Gamma = 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  は膜平面に対して平行に結合することができるペプチドの最大の  $\Gamma$  と見積もられる。従って、それ以上のペプチドが脂質二重膜に結合するためには、図 20 のような配向角度の変化が必要となるのであろう。

脂質の炭化水素鎖の配向 図 21 に酸性 pH (pD 5) 下、ペプチド IV の結合による脂質の炭化水素鎖の配向の変化を示す。egg PC および DOPC の炭化水素鎖はペプチドの結合に伴って、膜平面に対してより垂直になった。この配向の変化は、例え

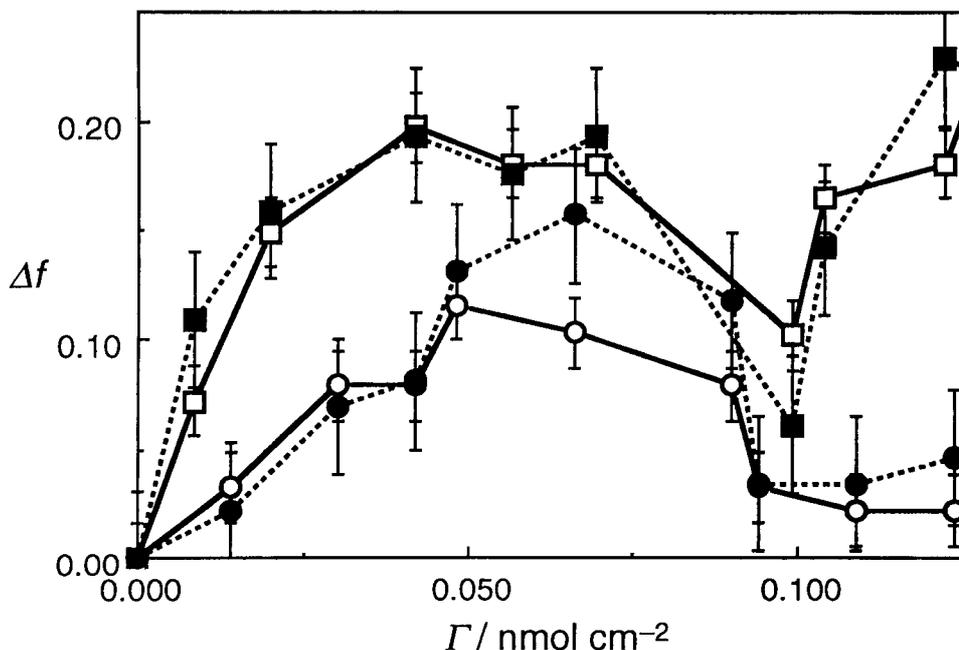


図 21 酸性重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pD 5) 中、平面単層脂質二重膜内における脂質の配向に対するペプチド IV の影響。 $\Delta f$  は  $\text{CH}_2$  逆対称 (白抜き) および対称 (黒塗り) 伸縮振動吸収帯の  $A_p / A_s$  から計算した、脂質の炭化水素鎖の秩序パラメーター  $f$  の変化であり (ペプチドが結合していない脂質二重膜についての値を基準にしている)、 $\Gamma$  はペプチドの表面密度である。丸は DOPC、四角は egg PC の場合を表す。

ば図 8 の  $\pi$ -A 曲線における脂質 1 分子あたりの表面占有面積の減少と、膜の表面圧および表面エネルギーの増大、つまり膜表面の不安定化を意味する。また、脂質の配向変化は  $\Gamma = 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  付近で最大になるが、それ以上のペプチドの結合にはあまり影響を受けなかった。これは上述のペプチドの配向性の低下に対応しており、脂質二重膜の不安定化が、ペプチドが膜平面に対して平行に結合できるときに最も効率よくおこなわれることを意味している。

## 6. 膜融合活性と膜への結合、および膜内配向との相関

ペプチドと平面単層脂質二重膜との結合等温線やそれらの分子の配向の変化によって表されるペプチドと脂質二重膜との相互作用は、ペプチドの構造や膜融合活性によって異なってくる。本節では一連の合成ペプチド (膜融合活性を持つものおよび持たないもの) についておこなった各種測定の結果についてまとめる。

**膜融合活性のアミノ酸配列依存性** 表 3 に、本研究においてとりあげた両親媒性  $\alpha$  ヘリックス構造をとる一連の合成ペプチド (図 3) の、酸性 pH (pH 5) におけるリポソームに対する活性をまとめる。測定値のばらつきのためにやや信頼性に欠けるところもあるが、傾向を概説すると、ペプチド I, III, IV はいずれも膜融合と思われる活性 (リポソームの脂質混合、内水相混合、および漏洩) を示すが、ペプチド VIII ではその活性は低下した。また、ペプチドの N 末端側にグリシン残基を伸ばしても (III-G1G<sub>2</sub>)、活性には影響しなかった。

高橋らはペプチド III を基本にして、アミノ酸残基の置換が膜融合活性にもたらす影響について調べたが (高橋, 平成 7 年)、その中で最も特徴的な例は、13 残基目のグリシンのロイシンへの置換である (III-G13L)。図 3 の  $\alpha$  ヘリックス投影図によるとこのグリシン残基は疎水性表面側に位置しており、ロイシンに置換されることによってペプチドの疎水性および両親媒性が増大し、かつ  $\alpha$  ヘリックス構造が安定化する (グリシンは  $\alpha$  ヘリックス構造を最も不安定化するアミノ酸残基として知られている) と予想されるにもかかわらず、このアミノ酸残基置換は膜融合活性を低下させた。また、多くのグループが HA の残基置換実験や合成ペプチドを用いておこなっ

表3 酸性pHにおけるペプチドの膜融合活性測定結果

ペプチド	脂質混合 (SUV)		脂質混合 (LUV)		内水相混合		漏洩		判定
	DOPC <sup>1</sup> (L/P = 20)	egg PC <sup>2,3</sup> (L/P = 40)	DOPC <sup>4</sup> (L/P = 40)	egg PC <sup>3</sup> (L/P = 40)	egg PC <sup>2,3</sup> (L/P = 40)	DOPC <sup>4</sup> (L/P = 40)	egg PC <sup>2,3</sup> (L/P = 40)		
I	1.7 ± 0.1	1							+
III	1.0 ± 0.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.0	1.0 ± 0.0	1.0	1.0 ± 0.0		+
III-G1G <sub>2</sub>	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.7			1.3 ± 0.4		1.0		+
III-G1E		<u>0.6 ± 0.7</u>			<u>0.1 ± 0.4</u>		<u>0.5 ± 0.0</u>		-
III-G13L	<u>0.7 ± 0.1</u>	<u>0.6 ± 0.7</u>			<u>0.3 ± 0.4</u>		<u>0.7 ± 0.0</u>		-
IV	1.9 ± 0.1	1.1 2.3 ± 0.7		1.3	1.7 <u>0.8 ± 0.4</u>		1.0 1.0 ± 0.0		+
VIII	1.1 ± 0.1		<u>0.2</u>				<u>0.7</u>		-

数値はペプチド III の活性を  $1.0 \pm 0.0$  とおいたときの他のペプチドの相対的な活性であり、さらに測定値のばらつきから予想される誤差を付記したものである。L/P は脂質とペプチドのモル比を表す。ペプチド III を下回る活性値は下線で表されている。ペプチド III の活性測定の絶対値は、脂質混合および内水相混合が 10 ~ 20 %、漏洩が ~ 80 % である。

最右列の判定は脂質混合、内水相混合、漏洩の結果を総合して、ペプチドの膜融合活性の有無を判断したものである。ペプチド III と比較して、同様以上の活性を保持したものを「膜融合活性を示す」(+)、活性が有意に抑制されたものを「膜融合活性を示さない」(-) とみなした。

G1G<sub>2</sub> はペプチドの N 末端にグリシンをつなげたもの、G1E は 1 残基目のグリシンをグルタミン酸に置換したもの、G13L は 13 残基目のグリシンをロイシンに置換し、さらに N 末端にグリシンをつなげたものである。

これらのデータは京大理学部村田昌之博士をはじめとする多くの方々の協力によっておこなわれたものであり、表 2 行目の右上付の数字によって以下の出典であることを示す。<sup>1</sup> 石黒, 本研究における未発表論文; <sup>2</sup> 松本, 未発表論文 (高橋, 平成 7 年); <sup>3</sup> 村田, (Murata et al., 1992); <sup>4</sup> 村田, (Murata et al., 1993)。また、付記されている誤差はすべて私が見積もったものである。

た実験の結果と同様に (Gething et al., 1986; Wharton et al., 1988; Rafalski et al., 1991)、N 末端 (1 残基目) のグリシンのグルタミン酸への置換 (III-G1E) も膜融合活性を低下させた。

高橋らは CD スペクトルを用いてこれらのペプチドの溶液構造についての研究をおこなった (Takahashi, 1990; Murata et al., 1993)。例として、ペプチド III の CD スペクトルを図 22 に示す。また本研究において新たに測定した、ペプチド III-G13L とペプチド III-G1E の CD スペクトルを図 23 に示す。これらの結果によると、一連の合成ペプチドは膜融合活性の有無に関わらず酸性 pH とリポソームとの共存によって (程度の差はあれ) その  $\alpha$  ヘリックス構造が安定化されており、 $\alpha$  ヘリックス構造が膜融合活性の十分条件ではないことを示している。

脂質二重膜への結合特性のアミノ酸配列依存性 図 24a, b, c, d に、酸性 pH (pD 5) におけるこれらのペプチドの DOPC 平面単層脂質二重膜との結合等温線を示す。また図 25 に、CD スペクトルを用いて測定した、酸性 pH (pH 5) におけるペプチドの  $\alpha$  ヘリックス含量の濃度依存性を示す。この結果によると、ペプチド III-G1E を除くペプチドが単量体の会合によると思われる構造転移を示している。ペプチド III の構造転移は図 24 の結合等温線の濃度範囲 ( $1 \mu\text{M}$  以下) ではまだはじまっていない。また、ペプチド VIII, III-G13L の場合については低濃度側の構造転移開始点を正確に特定することはできなかったが (CD の感度の制限により、 $1 \mu\text{M}$  以下の濃度での測定ができなかった)、結合等温線の解析はさらに低い濃度領域 ( $c = 0 \sim 0.2 \mu\text{M}$ ) についておこなわれるため、図 17 の場合と同様に、図 24 の結合等温線に対するこれらのペプチドの会合の影響はないものとした。

それぞれのペプチドの結合等温線を比較すると、以下のようにまとめられる。 $\Gamma$  が小さい範囲において、膜融合活性をもつペプチド (ペプチド I, III, IV) が協同的な結合挙動を示したのに対し、膜融合活性を持たないペプチド (ペプチド VIII, III-G13L, III-G1E) は協同効果を示さなかった。このことは結合等温線を両対数表示することによってより明瞭になり (図 26)、ペプチド I, III, IV の直線の傾き (それぞれ 1.65, 1.70, 1.75) から、これらの膜融合活性をもつペプチドは脂質二重膜上で会合し、2 量体を形成していると思われる。

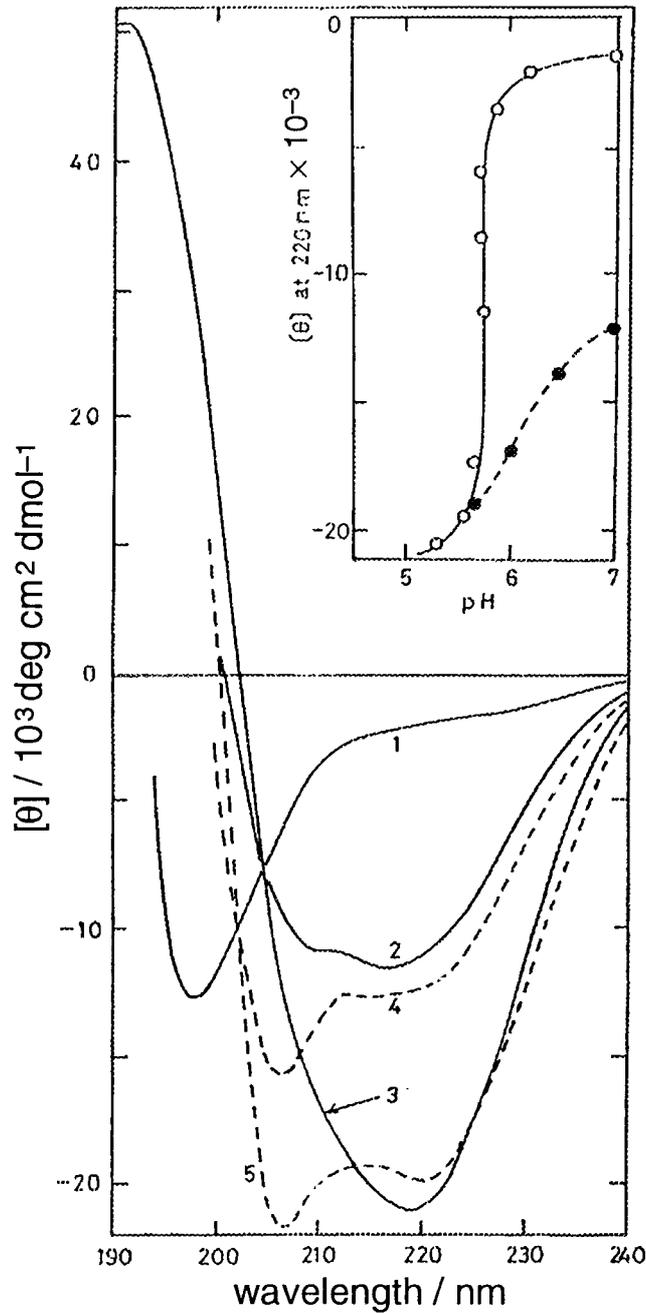


図 22： ペプチド III の CD スペクトル ((Takahashi, 1990) より転載)。1 (pH 7.0)、2 (pH 5.73)、3 (pH 5.28) は、MES, 10mM; KCl, 100 mM 緩衝水溶液中、ペプチド濃度  $7.34 \times 10^{-4}$  M で測定したもの、4 (pH 7.0) と 5 (pH 5.6) は同緩衝水溶液中、egg PC SUV 5 mM の共存下で測定したものである。挿入されている図は 220 nm における  $[\theta]$  (残基モル楕円率) の pH 依存性であり、白丸と実線は SUV が共存していない場合、黒丸と破線は SUV が共存している場合を表す。

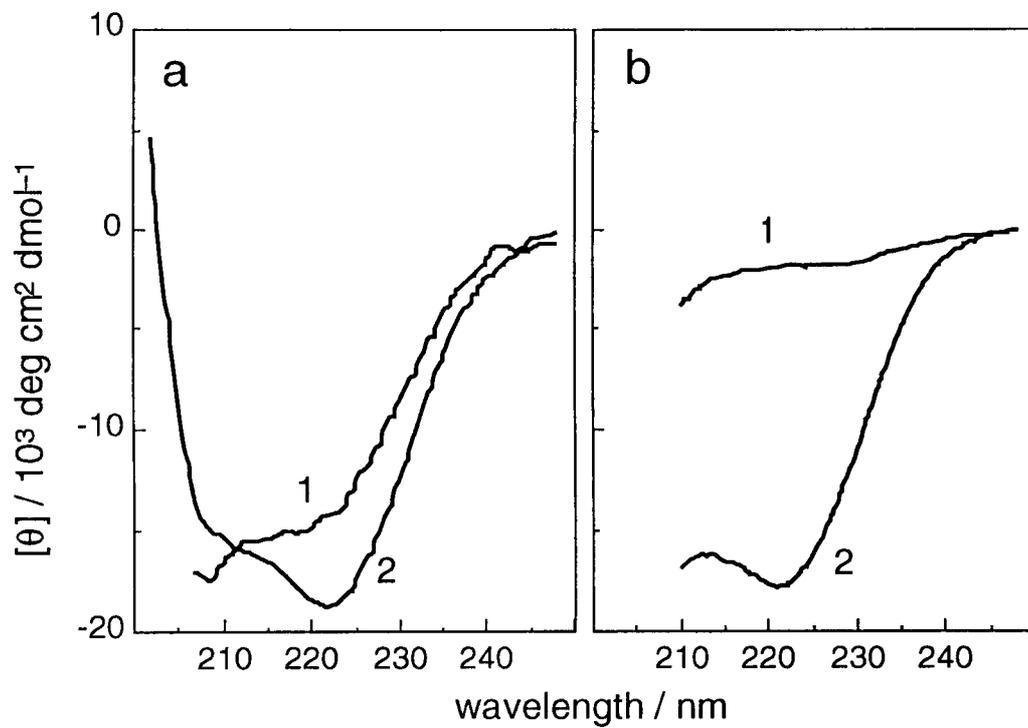


図 23： a はペプチド III-G13L の CD スペクトル (松本, 未発表論文)。no buffer; KCl, 100 mM; pH 5 水溶液中、ペプチド濃度  $3.75 \times 10^{-5}$  M で、DOPC SUV 1.5 mM を含まない場合 (1) と、含む場合 (2) について測定したもの。b はペプチド III-G1E の CD スペクトル。MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pH 5 水溶液中、ペプチド濃度  $3.33 \times 10^{-5}$  M で、DOPC SUV 1.33 mM を含まない場合 (1) と、含む場合 (2) について測定したもの。

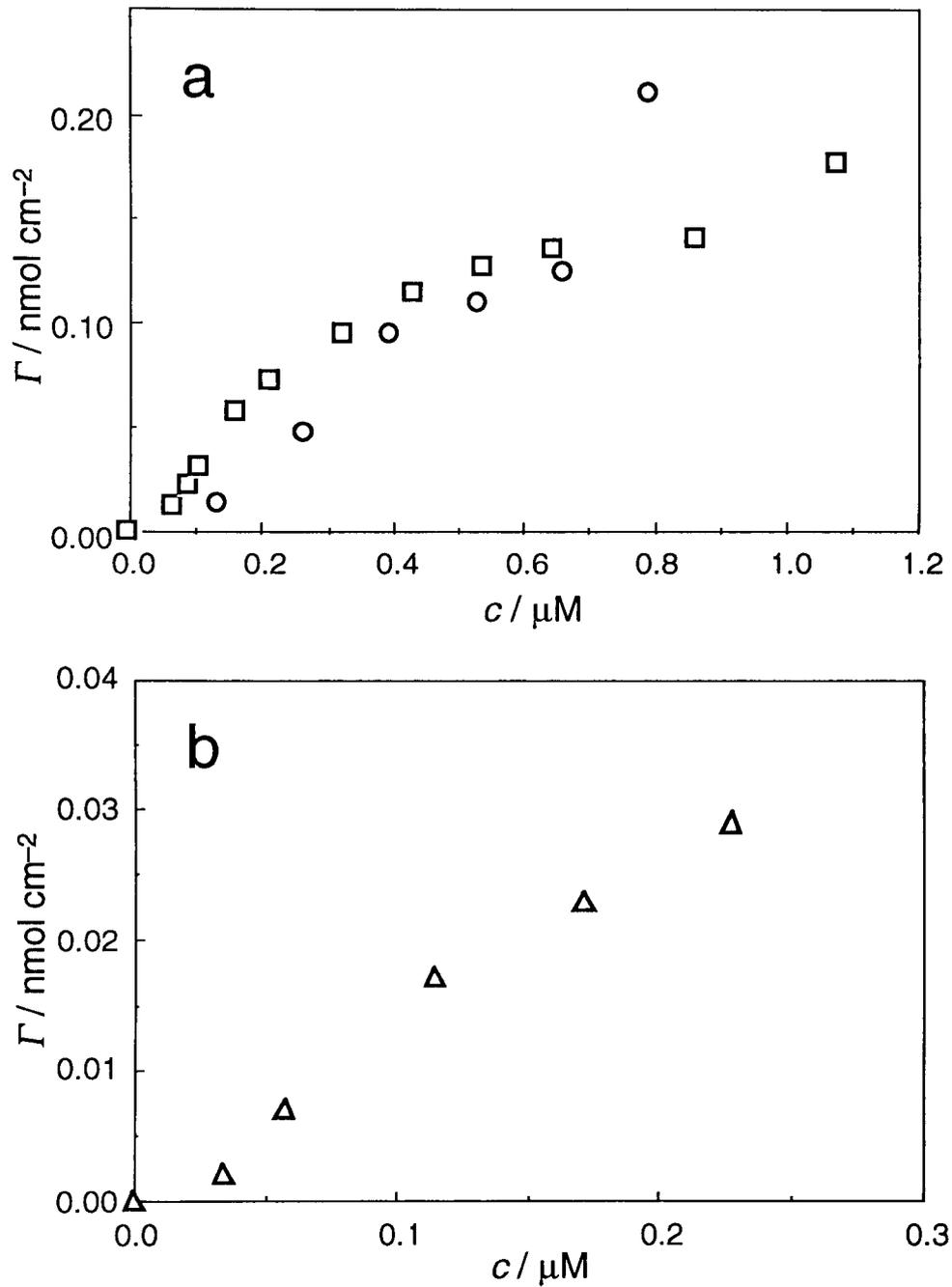


図 24： 酸性重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pD 5) 中、一連の合成ペプチドの DOPC 平面単層脂質二重膜との結合等温線。膜融合活性を持つペプチド (ペプチド I, III, IV) は白抜き印、膜融合活性を持たないペプチド (ペプチド VIII, III-G13L, III-G1E) は黒塗りの印として表されている。a: 白丸, ペプチド IV; 白四角, ペプチド III. b: 白三角, ペプチド I. (次ページへ続く)

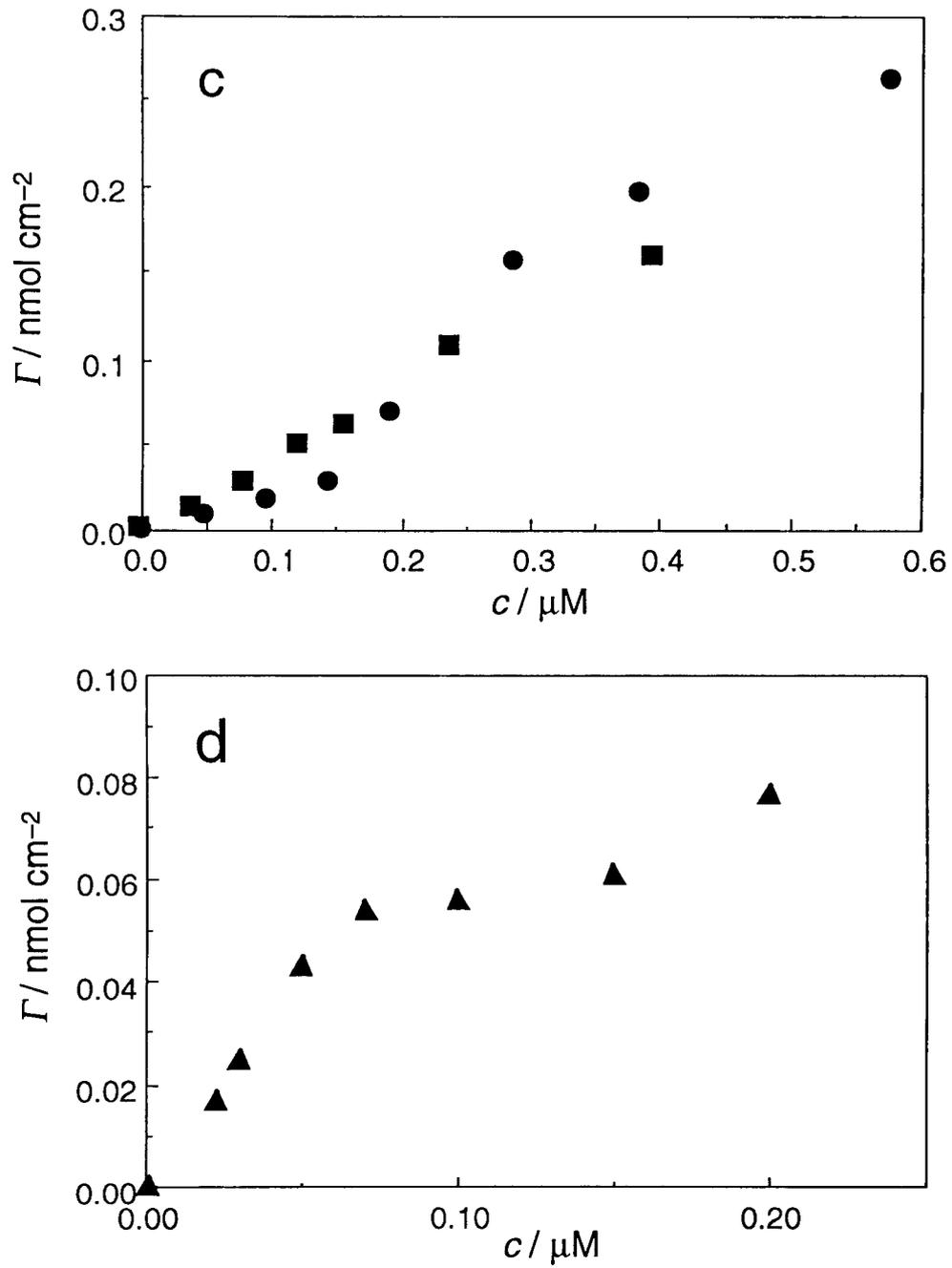


図 24： (前ページの続き) c 黒丸，ペプチド VIII；黒四角，ペプチド III-G13L。  
d 黒三角，ペプチド III-G1E。

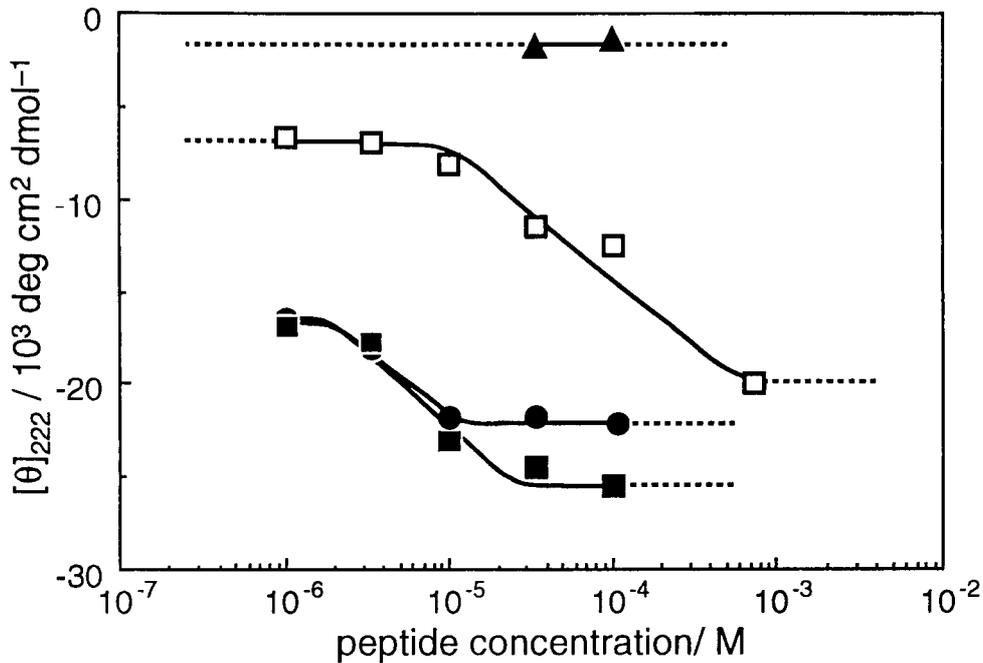


図 25 酸性水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pH 5; 水と重水の違いを除けば、組成および pH (pD) は図 24 と同じである) 中、ペプチド III, IV, VIII, III-G13L, III-G1E の、波長 222 nm における  $[\theta]$  (残基モル橢円率: CD スペクトルの測定値) のペプチド濃度依存性。白四角, ペプチド III; 黒丸, ペプチド VIII; 黒四角, ペプチド III-G13L; 黒三角, ペプチド III-G1E。これらの表記は図 24 と統一してある。

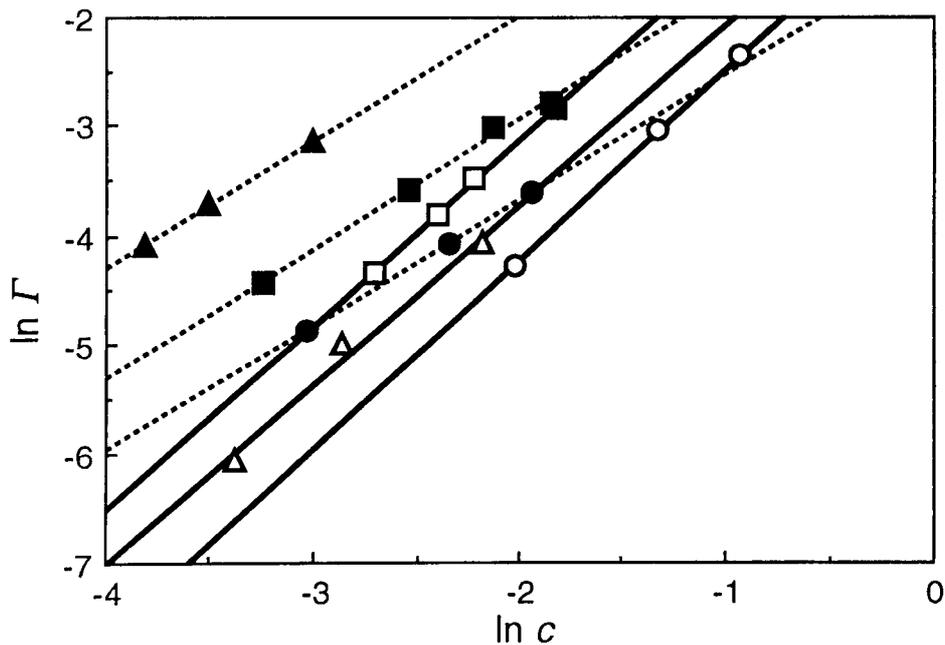


図 26 . 図 24 の両対数表示 (それぞれについて、 $\Gamma$  が小さく、直線を当てはめることができる範囲のみを示す) と、最小自乗法を用いて当てはめた直線。白抜き印および実線と、黒塗りの印および点線は、それぞれ膜融合活性をもつペプチドと持たないペプチドを表す。白丸, ペプチド IV (傾き 1.75); 白四角, ペプチド III (傾き 1.70); 白三角, ペプチド I (傾き 1.65); 黒丸, ペプチド VIII (傾き 1.14); 黒四角, ペプチド III-G13L (傾き 1.19); 黒三角, ペプチド III-G1E (傾き 1.15)。

ペプチド I (図 24b) はもともと難水溶性であり、特にペプチドが電荷を失う酸性 pH 下での取り扱いが大変困難であった。そのため、水溶液中のペプチドが析出し、実質上のペプチド濃度が溶液調製において決定される値よりも低くなる恐れがあった。実際、このペプチドについてはその強い疎水性にもかかわらず  $\Gamma = 0.04 \text{ nmol cm}^{-2}$  以上の脂質二重膜への結合は観察されなかった。しかしながら、上述の濃度決定のずれは結合等温線で見かけの負の協同性として現れることが予想されるにもかかわらず、 $c = 0.15 \text{ }\mu\text{M}$  以下の濃度において協同的結合挙動が観察された。

ペプチド VIII では  $c = 0.15 \text{ }\mu\text{M}$  以上と以下の濃度範囲において結合等温線の形状が異なっており (図 24c)、このことから  $c = 0.15 \text{ }\mu\text{M}$  以上の濃度において溶液内でペプチドが会合し、結合等温線に影響を与えていることが推定される。

また、ペプチド III-G1E は N 末端のグリシンのグルタミン酸への置換のため、全体の疎水性はペプチド III よりも低いにもかかわらず、本研究で用いられたペプチドの中で、脂質二重膜との親和性が最も強かった (図 24d)。

ペプチドおよび脂質の膜内配向のアミノ酸配列依存性 酸性 pH (pD 5) 下、DOPC 平面単層脂質二重膜内におけるこれらのペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸の配向を図 27a, b に示す。どのペプチドも、多少の違いはあれ  $f = 0 \sim -0.5$  の値をとったことから、 $\alpha$  ヘリックス軸は脂質二重膜に対してほぼ平行であると結論できる。

膜融合活性との相関関係を見てみると、 $\Gamma$  が小さい範囲において、膜融合活性をもつペプチドでは結合がすすむにつれてその  $\alpha$  ヘリックス軸の配向は膜平面に対してより平行になるが、膜融合活性をもたないペプチドでは結合がすすむにつれて傾くか、あるいは配向性が低下した。また、 $\Gamma \approx 0.02 \text{ nmol cm}^{-2}$  (PC の表面占有面積を  $75 \text{ \AA}^2 / \text{molecule}$  と仮定すると、DOPC / ペプチドのモル比が 25 / 1 の場合に対応すると計算できる) において比較すると、膜融合活性を持つペプチドの配向が  $f = 0 \sim -0.3$  ( $\gamma = 55^\circ \sim 69^\circ$ ) の値をとるのに対し、膜融合活性を持たないペプチドでは  $f = -0.4 \sim -0.5$  ( $\gamma = 75^\circ \sim 90^\circ$ ) となった。

個々のペプチドを比較すると、膜平面に対して全般的に最も平行な配向をとったものはペプチド VIII であり、最も傾いた、あるいは配向性が低かったものはペプチ

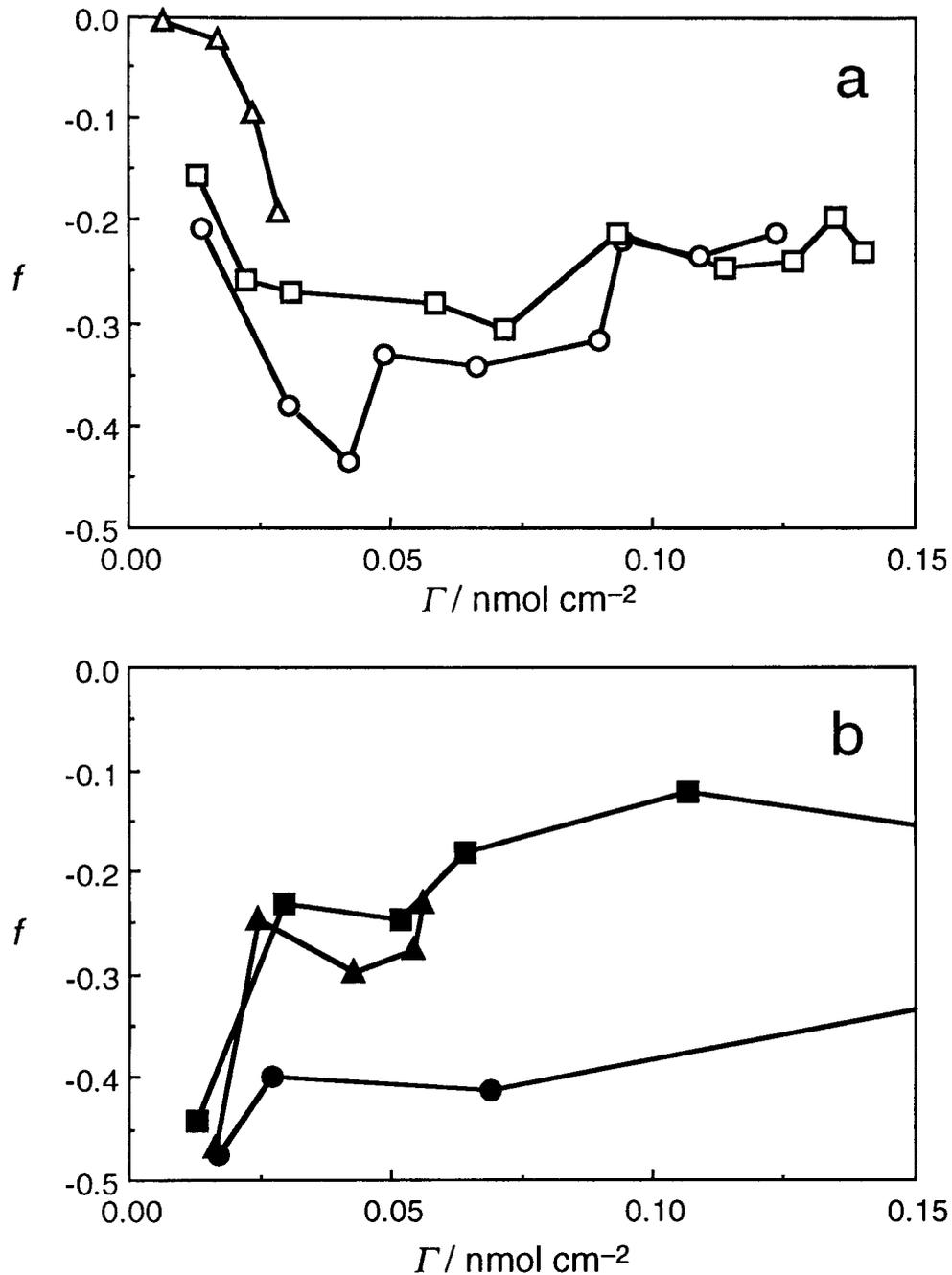


図 27 重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pD 5) 中、DOPC 平面単層脂質二重膜内における一連の合成ペプチドの配向。 $\Gamma$  はペプチドの表面密度、 $f$  は  $\alpha$  ヘリックス軸の秩序パラメーターである。膜融合活性を持つペプチド (ペプチド I, III, IV) は白抜き印、膜融合活性を持たないペプチド (ペプチド VIII, III-G13L, III-G1E) は黒塗りの印として表されている。a 白丸, ペプチド IV; 白四角, ペプチド III; 白三角, ペプチド I. b: 黒丸, ペプチド VIII; 黒四角, ペプチド III-G13L; 黒三角, ペプチド III-G1E.

ドIであった。また、ペプチドIIIはペプチドIVほど膜平面に対して平行になり得なかったが、ペプチドIVと異なり、その配向性は $\Gamma > 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$ においてもあまり低下しなかった。これは、ペプチドIIIの配向がIVよりも斜めであるために、表面占有面積がIVよりも小さいためであると理解できる。

次に、これらのペプチドの結合による脂質の炭化水素鎖の配向の変化を図28に示す。どのペプチドの場合にも、脂質の炭化水素鎖の配向はペプチドの結合により膜平面に対してより垂直になり、膜平面の不安定化が示唆された。

個々のペプチドの場合を比較すると、 $\Gamma = 0 \sim 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$ においてはペプチドVIIIが最も効率よく脂質二重膜と相互作用しており、ついでペプチドIII-G1Eと続き、ペプチドI, III, III-G13L, IVの膜との相互作用は最も小さかった。このことは、

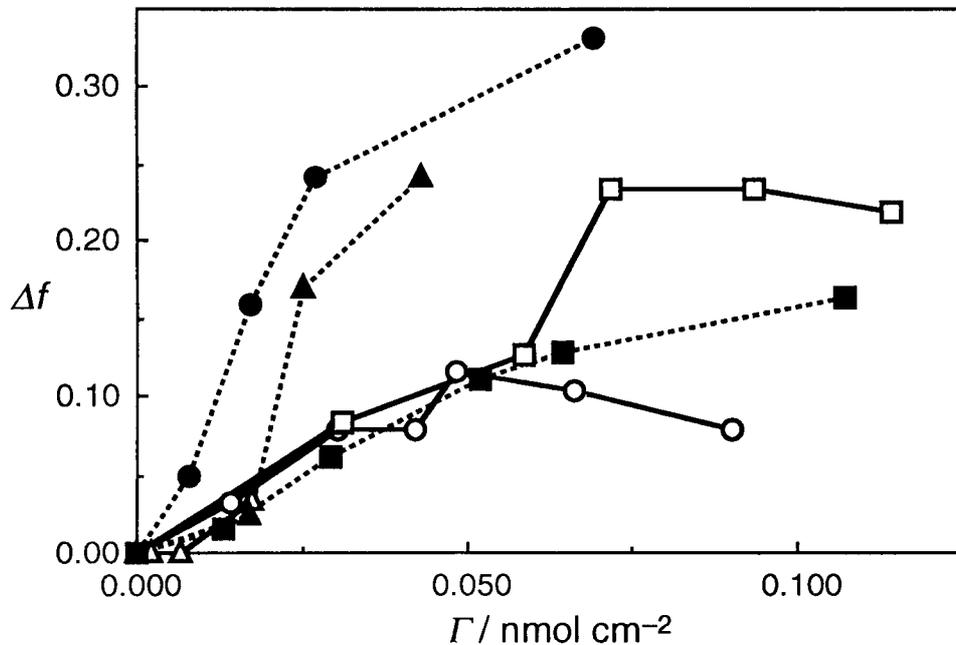


図28： 酸性重水溶液 (MES, 10 mM; KCl, 150 mM; pD 5) 中、DOPC 平面単層脂質二重膜内における脂質の配向に対する一連の合成ペプチドの影響。 $\Delta f$  は  $\text{CH}_2$  逆対称伸縮振動吸収帯の  $A_p / A_s$  から計算した、脂質の炭化水素鎖の秩序パラメーター  $f$  の変化であり (ペプチドが結合していない脂質二重膜についての値を基準にしている)、 $\Gamma$  はペプチドの表面密度である。膜融合活性を持つペプチド (ペプチド I, III, IV) は白抜きの印および実線、膜融合活性を持たないペプチド (ペプチド VIII, III-G13L, III-G1E) は黒塗りの印および点線として表されている。白丸, ペプチド IV; 白四角, ペプチド III; 白三角, ペプチド I; 黒丸, ペプチド VIII; 黒四角, ペプチド III-G13L; 黒三角, ペプチド III-G1E.

## 結果

脂質二重膜の不安定化が必ずしも膜融合活性と結びつかないことを示している。また、膜融合活性ペプチド III と IV の膜との相互作用を比較すると、 $\Gamma = 0 \sim 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  ではほとんど差は見られず、 $\Gamma > 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  においてペプチド III はペプチド IV よりも効率よく脂質二重膜と相互作用することができた。

## 考察

村田、高橋らが合成したペプチド I, III, IV は、酸性 pH でリポソームの融合を引き起こすが、中性 pH ではその活性を持たない (Murata et al., 1987a, 1992)。しかし、これらのペプチドは pH によらずリポソームと相互作用して、主として  $\alpha$  ヘリックス構造をとる (Takahashi, 1990)。したがって、膜融合誘起の引き金は両親媒性  $\alpha$  ヘリックスの親水性表面に存在するカルボキシル基のプロトン化であることが予想された (Murata et al., 1987b)。このプロトン化が残基の疎水性を増大させ、それによってペプチドと脂質二重膜との相互作用が変化し、結果的に膜融合を引き起こすことは可能であろう。

これらのペプチドがリポソームの融合を誘起するには、リポソームの会合、脂質の混合、リポソーム接合面における融合孔の形成と、それに続く内水相の混合が必要である。また、ペプチドの膜融合活性は両親媒性やアミノ酸組成だけでなくアミノ酸配列そのものにも大きく依存しており、配列に特異的な相互作用が存在すると思われる (Murata et al., 1993) (高橋, 平成 7 年)。これらの現象に伴うペプチドの挙動を直接に観察することは不可能であるが、 $\alpha$  ヘリックスは剛直な棒状の構造体であるため、pH やアミノ酸配列による (膜融合活性に関係するような) 脂質二重膜との相互作用の違いは膜との結合過程や膜内における  $\alpha$  ヘリックス軸の傾きに反映するものと思われた。そこで本研究では、IR-ATR スペクトルを用いてこれらのペプチドの脂質二重膜との結合等温線や  $\alpha$  ヘリックス軸の配向を決定した。

IR-ATR スペクトルは、オピオイドペプチド、ホルモン、生体内界面活性物質、タンパク質の輸送先を決定するシグナルペプチドなど、さまざまな生理活性ペプチドの二次構造、および脂質二重膜内におけるそれらの配向の決定に用いられてきた (Gremlich et al., 1983; Erne et al., 1985; Schwyzer, 1986; Cornell et al., 1989; Pastrana et al., 1991; Vandenbussche et al., 1992; Bauer et al., 1994)。また、膜タンパク質の膜貫通  $\alpha$  ヘリックスと目される幾つかのフラグメントやそのモデルペプチドについて、その  $\alpha$  ヘリックス軸の配向が実際に膜平面に垂直であるかどうかの確認にもしばしば用いられている (Smith, S. O. et al., 1994; Arkin et al., 1995; Tatulian et al.,

1995; Zhang et al., 1995)。

本章では、両親媒性  $\alpha$ ヘリックス型ペプチドが膜融合活性をもつ場合、およびもたない場合についてのペプチド 脂質二重膜の結合等温線や  $\alpha$ ヘリックス軸の配向などの結果から、膜融合活性を誘起するペプチドと脂質とのより詳細な相互作用の推定を試みる。また、これらのペプチドによる膜融合と HA による膜融合が本質的に異なるものである可能性を考慮に入れたうえで、HA における融合ペプチドが HA による膜融合過程において果たす役割についても可能な限り考察したい。

## 1. ペプチド・脂質二重膜相互作用の pH 依存性

一連の膜融合活性ペプチドの中でもっとも  $\alpha$ ヘリックス含量が高いペプチド IV を例として、その脂質二重膜との相互作用の pH 依存性について考察する。

**ペプチド・脂質二重膜の結合特性** ペプチド IV は膜融合活性をもつ酸性 pH で、平面単層脂質二重膜と協同的に結合する (図 17)。CD スペクトルの結果 (図 18) や結合等温線の解析 (図 19) などによれば、ペプチド IV は pH 5 の水溶液内において、濃度  $1 \mu\text{M}$  以下でランダムコイル構造の単量体であり、脂質二重膜と結合して  $\alpha$ ヘリックス構造をとり、引き続いて膜内で会合して 2 量体を形成すると考えられる。このような協同的な結合はアラメチシンやマガイニンについても観察されているが、これらはどちらも抗菌活性ペプチドであり、会合によって  $\alpha$ ヘリックス バンドル型イオンチャネルを形成すると考えられている (Fringeli, 1980; Matsuzaki et al., 1994, 1995)。

また、 $\Gamma > 0.10 \text{ nmol cm}^{-2}$  においては、 $\alpha$ ヘリックスの表面占有面積の見地からも図 17 の結合等温線の形状からも、ペプチドの結合が単分子層吸着の限度を超えており、多分子層吸着 (膜に結合しているペプチドに対してさらにペプチドが結合する) がはじまっていると考えられるが、この現象は本研究の対象ではないためここでは考察しない。

それに対して、ペプチド IV が膜融合活性を持たない中性 pH では、結合に際して協同的な性質が観察されなかった (結合等温線に Langmuir の吸着等温線をあてはめ

ることができた)ことから(図16)、CDスペクトルによる研究の結果とも併せて(高橋,平成5年)、中性pHの溶液内および脂質二重膜内においてこのペプチドは単量体を保っていると推定される。また中性pHにおける結合は酸性pHの場合と比較すると非常に弱く、結合定数で約100倍の開きがある。さらに、脂質膜内のペプチドの量が飽和表面密度に近づくと、ペプチドと脂質分子との置換、あるいはペプチドによる脂質の可溶化が起こる。これはペプチドの親水性表面に存在する電荷のためにペプチドが界面活性剂的な振る舞いをするためと考えられる。この時点で平面単層脂質二重膜が既に生体膜のモデルとしての役割を果たさなくなっている可能性があるため、以後のペプチドの配向の問題などにおいては、中性pH、 $\Gamma \approx \Gamma_m$ における実験の結果についての考察はおこなわない。

**$\alpha$ ヘリックス軸の膜内配向** ペプチドIVが膜融合活性を示す酸性pHでは、その $\alpha$ ヘリックス軸は膜平面に対してほぼ平行である。egg PC平面単層脂質二重膜の結果によれば、この配向はペプチドの表面密度に依存して変化し、たとえば $\Gamma \approx 0.01 \text{ nmol cm}^{-2}$  および  $\Gamma > 0.1 \text{ nmol cm}^{-2}$  ではほとんど無配向状態であるか、あるいは傾いており( $\gamma \approx 55^\circ$ )、 $\Gamma \approx 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  において最も平行になる( $\gamma \approx 63^\circ$ ) (図20)。ペプチドの配向角度はDOPC平面単層脂質二重膜内ではより平行に近くなり、 $\gamma$ は $62 \sim 78^\circ$ となる。これはegg PCが様々な炭化水素鎖長を持つPCの混合物であるのに対し、DOPCは単一の分子種からのみ構成されており、そのためにDOPC脂質二重膜表面がegg PCに比べてより平坦であることが原因であると考えられる。また、ペプチドの結合に伴って脂質の炭化水素鎖は膜平面に対してより垂直な配向をとるようになり、 $\Gamma \approx 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  において最も垂直になる(図21)。一方、egg PC平面多層脂質二重膜中では脂質/ペプチドのモル比が25/1 ( $\Gamma \approx 0.02 \text{ nmol cm}^{-2}$  に対応する)のとき、ペプチドの $\alpha$ ヘリックス軸の配向は $\Gamma \approx 0.02 \text{ nmol cm}^{-2}$ の単層膜の場合よりもより平行になる( $\gamma \approx 70^\circ$ ) (表1)。

中性pH(ペプチドIVが膜融合活性をもたないpH)では、単層膜と多層膜での結果はより大きく食い違う。egg PC単層膜内での $\alpha$ ヘリックス軸はほとんど無配向であるか傾いている( $\gamma = 50 \sim 60^\circ$ )のに対し(図20)、egg PC多層膜内では酸性pHの場合と同様に $\gamma \approx 70^\circ$ の配向をとる(表1)。

単層膜系と多層膜系での結果の違いには次の2つの理由が考えられる。第一に、pH調整の問題がある。平面単層脂質二重膜では接触溶液にpH緩衝剤(MES)を用いることによってpHを正確かつ直接に制御することができるが、多層膜では膜調製前のSUV/ペプチド溶液のpHを調整することによってペプチドの解離状態をあらかじめ制限することしかできない。しかも中性pH条件として調製した多層膜は乾燥膜としてのみ測定が可能で、水和状態での測定ができなかった(「結果」の2を参照されたい)。このような乾燥膜系における解離基の状態(解離基がプロトンと結合しているのか、それとも他の対イオンと塩を形成しているのか)と、あるpHに調整された水溶液中におけるリポソーム上の解離状態とを関係づけるのは困難である。

第二に、単層膜と多層膜の物性そのものの問題がある。同じ水和膜同士であっても、飽和蒸気下で平衡化させただけの多層膜と、常に水相(この場合は重水)にさらされている単層膜とでは、膜内に侵入してくる水分子の数や脂質分子との相互作用などが異なってくる可能性は非常に高い。また、Kalbらの全反射蛍光顕微鏡技術を用いた実験によると、本研究において採用した平面単層脂質二重膜ではリポソーム上においてみられる脂質分子の横方向の流動性がよく保存されているが(Kalb et al., 1992)、それが多層膜においてどの程度再現できているかは不明である。

今回のように、脂質二重膜内におけるペプチドの構造や配向の測定結果が、生体膜のモデルとして採用した実験系によって異なってしまった例として、メリチンとアラメチシンがある。メリチンはハチ毒から単離された26残基からなるペプチドであり、中心付近に折れ曲がりを含む両親媒性 $\alpha$ ヘリックス構造をとり、脂質二重膜に対して漏洩活性を持つ。また、アラメチシンは電位感受性のイオンチャネル活性を持つペプチドであり、脂質二重膜貫通型の $\alpha$ ヘリックス構造をとり、さらに会合して $\alpha$ ヘリックスバンドル型の孔を形成することによって、イオンの膜透過を助けていると考えられている。CDスペクトル、NMR、IR-ATRスペクトルを用いた研究によると、乾燥平面多層脂質二重膜内でのメリチンおよびアラメチシンの $\alpha$ ヘリックス軸は膜平面に対して垂直であった(Fringeli & Fringeli, 1979; Brauner et al., 1987; Vogel, 1987; Weaver et al., 1992; de Jongh et al., 1994; Smith, R. et al., 1994)。それに対して、IR-ATRスペクトルを用いて決定した、平面単層脂質二重膜内でのメリ

チンの  $\alpha$  ヘリックス軸の配向は膜平面に対して平行であり (Frey & Tamm, 1991)、NMR を用いたアミドの水素・重水素交換の実験によっても、リポソーム上に結合しているメリチンの  $\alpha$  ヘリックス軸がやはり膜平面に対して平行であることが示唆された (Dempsey & Butler, 1992)。また、Vogel は多層膜内におけるメリチンやアラメチシンの  $\alpha$  ヘリックス軸の配向が膜の水和状態や温度に依存して、膜平面に対して垂直～無配向～平行、と大きく変化することを示し (Vogel, 1987)、さらに Fringeli らはアラメチシンの場合について、膜の水和状態がペプチドの二次構造にすら影響を及ぼすことを明らかにした (Fringeli & Fringeli, 1979)。

これらの事実は、基板上に調製した平面単層脂質二重膜や多層脂質二重膜を生体膜のモデル系として扱うことの危険性を示している。前述のように、pH 調整、水和状態、流動性などの点から見れば平面単層脂質二重膜の方がより生体膜やリポソームの脂質膜に近いと思われるため、今回のように単層膜と多層膜で結果が異なった場合は、単層膜による結果を採用せざるを得ない。しかしながら、Vogel や Fringeli らがメリチンやアラメチシンの場合について考察したように、異なる実験系によって得られた異なる二次構造や配向は、それらのペプチドが潜在的に持っている性質でもあり、例えば生理活性に必要な単寿命の構造などがそれらの実験系によって安定化されたと考えることもできる。

以上のことを踏まえて、ペプチド IV の  $\alpha$  ヘリックス軸の配向についてあらためて考察する。 $\alpha$  ヘリックス軸の秩序パラメーター  $f$  に関しては平面単層脂質二重膜での結果を採用するとして、その場合の  $f$  の持つ意味を以下のように解釈した。平面多層脂質二重膜内において  $\alpha$  ヘリックス軸の配向が pH によらず膜平面に対してほぼ平行であることと、その  $\alpha$  ヘリックスが両親媒性をもつことを考慮すると、ペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸の配向は基本的には膜平面に対してほぼ平行であり、 $f$  が 0 に近づくのは配向角度が傾くためではなく、揺らぎによって配向状態そのものが乱される (配向性が低下する) ためであると考えられる。

中性 pH ではペプチドは側鎖に電荷を持っているため、脂質二重膜の疎水性層の深部までは到達できず、膜との結合力が弱いために配向性は低い。また、乾燥した多層膜の場合には脂質二重膜間の間隔が制限されるため、膜との結合が浅いペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸は膜平面に対して平行にならざるを得ない。

酸性 pH では、ペプチドの結合量が少ないときには脂質の流動性のためにペプチドの配向は大きく乱されている。ペプチドの結合がすすむと、疎水性アミノ酸側鎖が脂質二重膜内に挿入されて脂質の表面圧および表面エネルギーが増加し(脂質二重膜構造の不安定化)(図 21)、その結果、脂質分子の流動性が抑えられ、ペプチド本来の、膜平面に対してより平行な  $\alpha$  ヘリックス軸の配向が観測できるようになる。そしてペプチドが膜平面に平行に結合できる上限、 $\Gamma \approx 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  においてその配向状態は最も理想的になる。それに対して、多層膜では脂質の流動性が保存されていないために、このような配向の乱れは起こらない。

また、平面単層脂質二重膜の IR-ATR スペクトルの解析によると、今回用いられた膜融合活性ペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸は、程度の差はあれいずれも膜平面に対して平行な配向をとるが、これと対照的に幾つかの  $\alpha$  ヘリックス型膜融合活性ペプチドについて、膜平面に対して傾いた、もしくはほぼ垂直な配向値が得られている。Lünenberg らは本研究と独立に、IR-ATR スペクトルを用いて多層脂質二重膜内のペプチド I の配向を決定し、 $\gamma = 45^\circ$  という結果を得た(Lünenberg et al., 1995)。HIV ウイルスの膜融合活性タンパク質 gp41 や SIV ウイルスの膜融合活性タンパク質 gp32 の  $\alpha$  ヘリックス型融合ペプチドについても、同様な傾いた配向が多層脂質二重膜の IR-ATR スペクトルの解析から得られている(Martin et al., 1991, 1993a, 1993b, 1994)。しかしながら、これらの測定はいずれも平面多層膜についておこなわれており、今回得られた単層膜の結果と単純に比較することはできない。

## 2. ペプチド・脂質二重膜相互作用のアミノ酸配列依存性

ペプチドと平面単層脂質二重膜との相互作用を、酸性 pH において膜融合活性を示すペプチド I, III, IV と膜融合活性を示さないペプチド VIII, III-G13L, III-G1E について比較し、それらのアミノ酸配列依存性や膜融合活性との相関を調べた。

ペプチド・脂質二重膜の結合特性および膜内配向 酸性 pH における結合等温線によると(図 24)、膜融合活性を持つペプチドは脂質二重膜との結合において協同性を示し、膜融合活性を持たないペプチドではその傾向は見られない。このことは

結合等温線を両対数表示することによってより明瞭になり (図 26)、膜融合活性ペプチドが膜上で 2 量体を形成することが示唆される。また、結合の強さで比較すると、ペプチド III-G1E がこれらのペプチドのうち、最も低濃度で脂質二重膜と結合することができる。

つぎにペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸および脂質の炭化水素鎖の膜内配向について比較する (図 27, 28)。上述のペプチド IV についての考察に用いた仮定をそのまま適用すると、膜融合活性を持つペプチドは結合量が少ない場合にはその配向は大きく乱されているが、結合がすすむにつれて本来の、膜平面に対してより平行な配向がとれるようになる。また、そのときの、膜平面に対してほぼ平行な配向角度がペプチドの両親媒性の強さや疎水性のバランスなどによって決まり、アミノ酸配列に依存して異なることは容易に予想できる。

この観点からペプチド III と IV を比較すると、ペプチド IV は  $\Gamma > 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  において、その表面占有面積のために最適な配向状態をとれなくなり、脂質との相互作用も頭打ちになる。それに対し、ペプチド III は IV ほど膜平面に対して平行に配向できない代わりに表面占有面積が小さく、そのため  $\Gamma > 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  においても配向があまり乱れず、脂質との相互作用もペプチドの結合量に比例してさらに大きくなる。また、 $\Gamma < 0.05 \text{ nmol cm}^{-2}$  においてペプチド III と IV の脂質二重膜との相互作用の大きさにはほとんど差がない。これらのことは、膜融合活性ペプチドが最も効率よく膜と相互作用できるペプチドの配向角度がアミノ酸配列によって異なることを示している。

対照的に、膜融合活性をもたないペプチドでは、その結合量が小さい場合に膜平面に対して最も平行な配向をとり、結合がすすむにつれて配向性は低下する。このことから、これらのペプチドが膜融合活性をもつペプチドよりも効率よく、脂質の流動性を抑えていると考察できる。脂質の流動性は脂質の配向と単純に結びつけることはできないが、ペプチド VIII や III-G1E は他のペプチドよりも脂質の配向に与える影響が大きく、膜融合活性をもつペプチドともたないペプチドとで脂質二重膜との相互作用の性質が異なる可能性は高い。また、膜融合現象の本来の性質から考えても、(もしできるならば) 脂質の流動性をなるべく保持しながら二重膜構造を不安定化することが、膜融合活性ペプチドの性質として最もふさわしいと思われる。

アミノ酸配列などから推定されるペプチドの性質 ペプチドの脂質二重膜への結合は、ペプチドの溶液構造に大きく依存すると思われる。CD スペクトルの結果によれば(図 18, 25)、pH5 におけるこれらのペプチド(難水溶性のため、絶対濃度が明確でないペプチド I を除く)の濃度依存性会合による構造転移は結合等温線実験の濃度範囲でははじまっていないと思われるが、その単量体構造はペプチドによって異なる。pH5、濃度 1  $\mu\text{M}$  における CD スペクトルによって比較すると、これらのペプチドのうち、ペプチド III-G1E は最もランダムコイルに近い。ペプチド III や IV では  $\alpha$  ヘリックスや  $\beta$  構造と思われる構造が部分的に残っており、ペプチド VIII や III-G13L では全二次構造の約 50% が  $\alpha$  ヘリックスである。

図 29 に、これらのペプチドのアミノ酸配列の各部分のもつ  $\alpha$  ヘリックス構造指向性を示す。ここで用いる  $\alpha$  ヘリックス構造指向性は、Chou らがタンパク質の立体構造やアミノ酸配列のデータから統計的に算出した、各アミノ酸残基の  $\alpha$  ヘリックス構造指向性 (Chou & Fasman, 1978) を 7 残基のウィンドウ毎に平均して得た値で

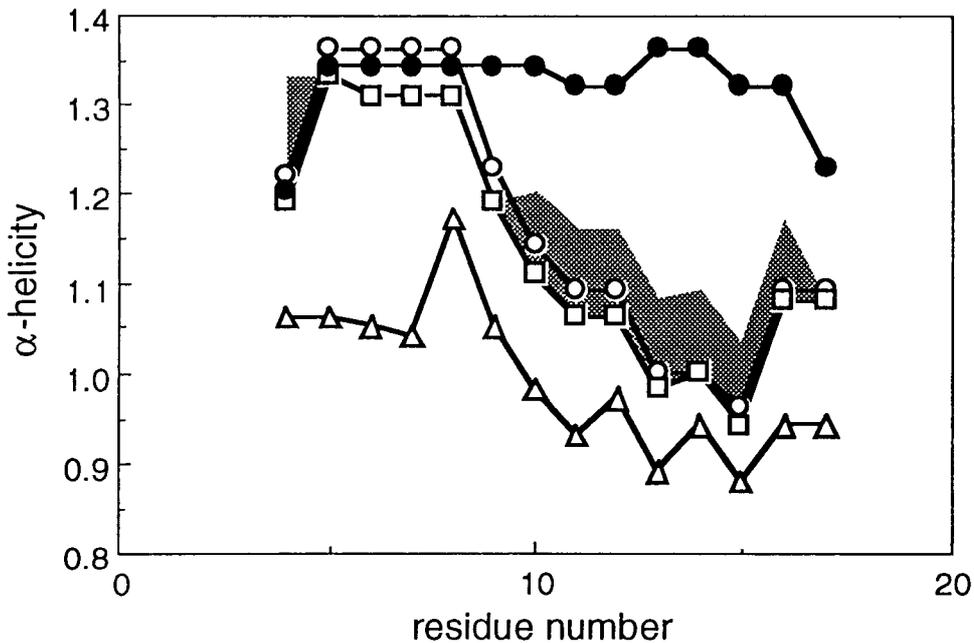


図 29 一連の合成ペプチドの各部分が持つ  $\alpha$  ヘリックス構造指向性。縦軸は Chou らが統計的に求めたそれぞれのアミノ酸残基の  $\alpha$  ヘリックス構造指向性を、横軸に表示した残基番号を中心とした 7 残基について平均したものである。白丸, ペプチド IV; 白四角, ペプチド III; 白三角, ペプチド I; 黒丸, ペプチド VIII。影のついた部分はペプチド III を残基置換 (III-G1E, III-G13L) したことによる  $\alpha$  ヘリックス構造指向性のずれを意味する。

ある。この図によると、ペプチド VIII と III-G13L が最も  $\alpha$  ヘリックス構造指向性が強く、CD スペクトルの結果と一致している。しかし、III よりも  $\alpha$  ヘリックス構造指向性が強いはずのペプチド III-G1E は、CD スペクトルによれば最もランダムコイルに近い構造を持つ。おそらく、N 末端に存在するグルタミン酸と他のグルタミン酸との反発によって、コンパクトな構造をつくりにくくなっているのであろう (pH5 では、まだ半分以上のグルタミン酸側鎖が解離したままだと考えられる)。また、この性質のためにペプチド III-G1E の疎水性残基は他のペプチドよりも外部に露出しており、結果として図 24 のように、他のペプチドよりも脂質二重膜との結合が強いのではないかと想像できる。

次に、脂質二重膜内でのペプチドの構造について考察する。高橋による、CD スペクトルや IR スペクトルを用いた酸性 pH、リポソーム共存下でのこれらのペプチドの溶液構造の研究によると、(ペプチドの種類にもよるが)  $\alpha$  ヘリックスに混じって少量の  $\beta$  構造らしきものが観察された (Takahashi, 1990)。また今回測定された平面多層脂質二重膜の IR-ATR スペクトル (図 12) にも、 $\beta$  構造が確認されている。結合等温線の結果によれば、酸性 pH 溶液ではこれらのペプチドのほとんどがリポソームに結合しているとみなすことができる。しかしながら、溶液試料の測定においては溶液内のペプチドの絶対濃度が十分に濃いことが必要であるため、リポソームに結合したペプチドに起因するスペクトルに、溶液内会合のためリポソームに結合できなくなったペプチドによるものが重ね合わせられている可能性がある。図 30 に、本研究において新たに ATR 法を用いて測定された、酸性 pH におけるペプチド III の IR-ATR スペクトルを示す。この結果によれば、リポソームが共存しない酸性 pH 溶液中のペプチド III が最も多くの  $\beta$  構造を含み、リポソーム共存下ではその割合はやや減少し、平面脂質二重膜に結合しているペプチドでは  $\beta$  構造に起因するピークは確認できなかった。このことから、リポソームに結合しているペプチドの二次構造はほとんどが  $\alpha$  ヘリックスであり、ペプチド/SUV 混合溶液のスペクトルなどにおいて観察される  $\beta$  構造はリポソームに結合していないペプチド会合体によるものと推定できる。ただし、平面単層脂質二重膜の IR-ATR スペクトルの精度では、膜に結合しているペプチドの二次構造中にランダムコイルやごく少量の (全体の 1 割をきるような)  $\beta$  構造が存在する可能性は否定できない。

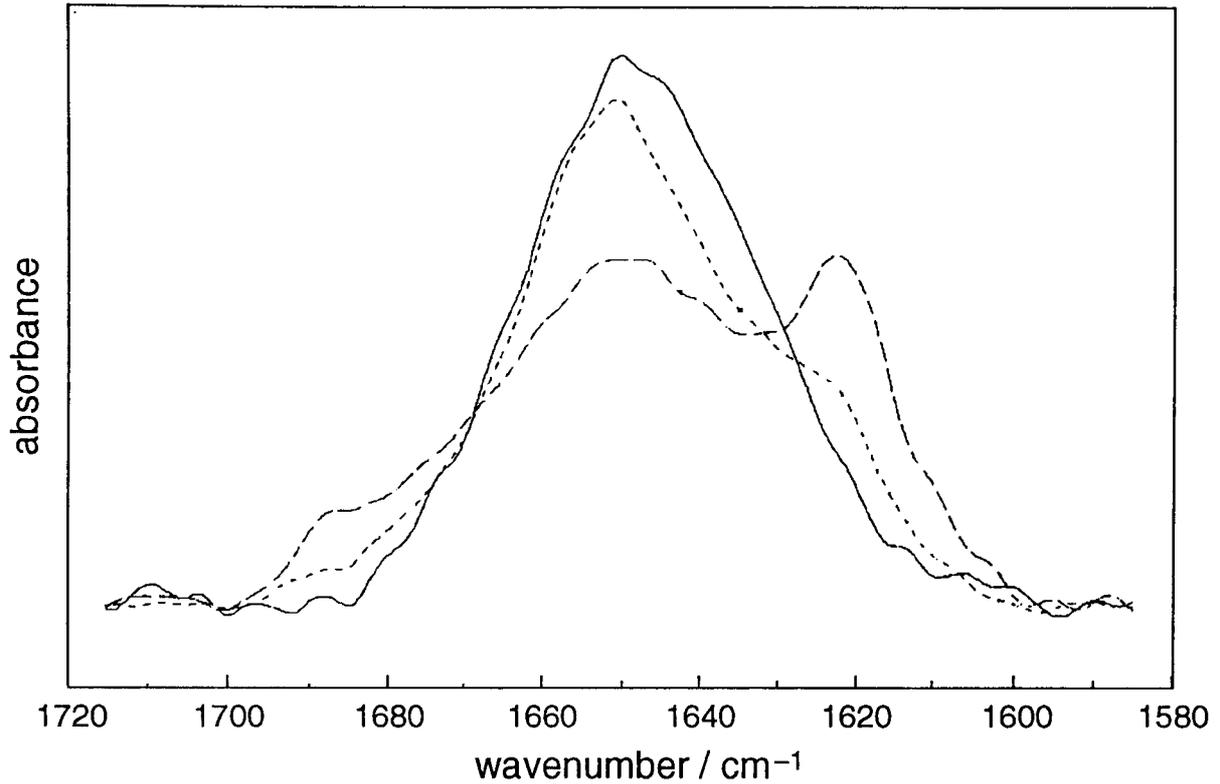


図 30： 酸性 pD におけるペプチド III の IR-ATR スペクトル。実線は本論文において記述されてきた、DOPC 平面単層脂質二重膜に結合したペプチドのスペクトル (脂質二重膜を  $0.11 \mu\text{M}$  のペプチド III 重水溶液 (MES,  $10 \text{ mM}$ ; KCl,  $150 \text{ mM}$ ; pD5) と平衡化させることによって調製したもの。ペプチドの膜への吸着量に比べて溶液内のペプチドの濃度が十分に小さいため、溶液内のペプチドの寄与は無視できる)、点線は pD 5 の重水溶液中 (pH 緩衝剤、塩などを含まない)、 $5 \text{ mM}$  の DOPC SUV 共存下、 $0.25 \text{ mM}$  のペプチド III のスペクトル (平面単層脂質二重膜を調製していない ATR プリズムを用いて測定したもの)、破線は pD 5 の重水溶液中 (pH 緩衝剤、塩などを含まない)、 $0.25 \text{ mM}$  のペプチド III のスペクトル (測定条件は SUV を含まない点を除いて、点線のスペクトルと同じである)。スペクトルの比較を容易にするため、これら 3 つのアミド I 吸収帯は、それぞれ適当な補正因子を掛け合わせるによって面積強度がそろえられている。 $1650 \text{ cm}^{-1}$  付近のピークは  $\alpha$  ヘリックスまたはランダムコイルに、 $1620, 1690 \text{ cm}^{-1}$  付近のピークは  $\beta$  構造に帰属される。

図 31 に、これらのペプチドのアミノ酸配列の各部分のもつ疎水性を示す。ここで用いる疎水性は、Eisenberg らが、これまでに提出された 5 種類の疎水性指数 (実験的に得たものや統計的に算出したものを含む) のコンセンサスとして得た各アミノ酸残基の疎水性指数 (Eisenberg et al., 1982) を 7 残基のウィンドウ毎に平均して得た値である。この図によると、平均して最も疎水性の高いのはペプチド I であるが、そのために難水溶性を示し、他のペプチドとの比較は難しい。膜融合活性を持ち、構造や脂質との相互作用も共通していると予想されるペプチド III と IV について比較すると、脂質二重膜に対してより強く結合するペプチド III のほうが疎水性も高い。ペプチドの N 末端側と C 末端側の疎水性のバランスについて比較すると、N 末端から C 末端にかけて最も均一な疎水性をもつペプチドはペプチド VIII であるが、最も偏っているのはペプチド I である。膜融合活性を持つペプチドで比較すると、ペプチド I, III, IV の順番に疎水性のバランスがよくなる。この傾向が、ペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸が膜平面に対して最も平行に近くなるときの配向の順番に対応していることから (図 27)、このような疎水性のバランスが、ペプチドの配向角度がアミ

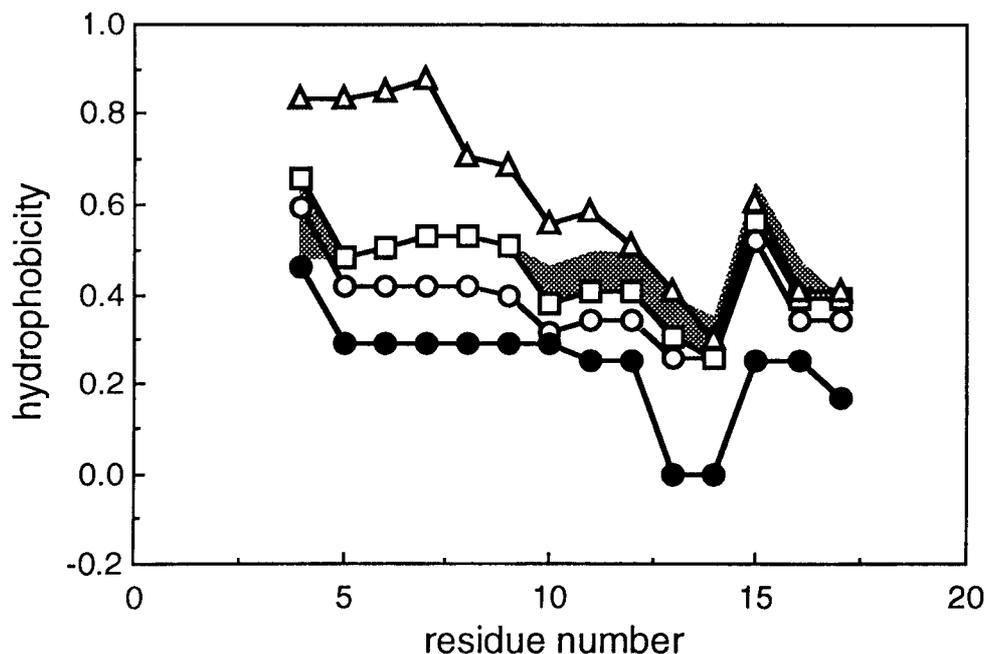


図 31： 一連の合成ペプチドの各部分が持つ疎水性。縦軸は Eisenberg らが用いたそれぞれのアミノ酸残基の疎水性指数を、横軸に表示した残基番号を中心とした 7 残基について平均したものである。白丸，ペプチド IV；白四角，ペプチド III；白三角，ペプチド I；黒丸，ペプチド VIII。影のついた部分はペプチド III を残基置換 (III-G1E, III-G13L) したことによる疎水性のずれを意味する。

ノ酸配列によって異なることの一因であると考えられる (膜融合活性を持つものと持たないものとは、配向の  $\Gamma$  依存性が異なるため、比較は難しい)。また、ペプチド I, III, IV はいずれも N 末端側の方が疎水性が強いため、これらのペプチドは主に N 末端側によって脂質二重膜の炭化水素鎖層と相互作用すると考えられる。

図 32 に、これらのペプチドのアミノ酸配列の各部分のもつ疎水性モーメントを示す。疎水性モーメントとは  $\alpha$  ヘリックスや  $\beta$  シートなどにおける疎水性残基の配置の偏りを示すものであり、両親媒性の強さを定量的に表すために Eisenberg らによって提唱された概念である (Eisenberg et al., 1982)。 $\alpha$  ヘリックス フラグメントの疎水性モーメント  $\mu_H$  は次式によって表される。

$$\mu_H = \left\{ \left[ \sum_{n=1}^N H_n \sin(\delta n) \right]^2 + \left[ \sum_{n=1}^N H_n \cos(\delta n) \right]^2 \right\}^{1/2} \quad (1)$$

$N$  はフラグメントの残基長であり、図 32 のプロットでは 7 を用いた。 $H_n$  は  $n$  番目

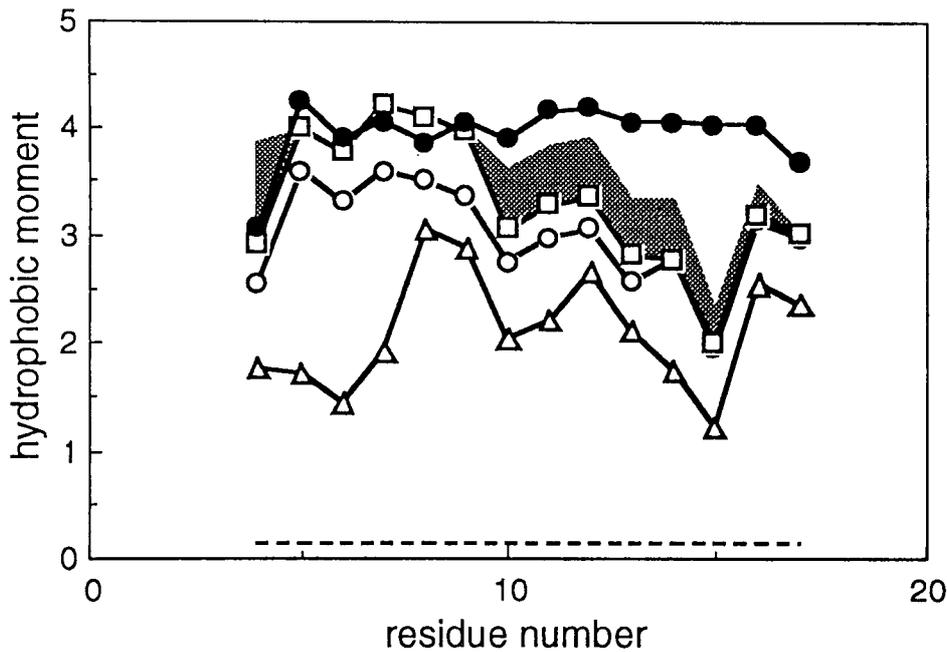


図 32 一連の合成ペプチドの各部分が持つ疎水性モーメント。縦軸は Eisenberg らの定義した  $\alpha$  ヘリックスの疎水性モーメントを、横軸に表示した残基番号を中心とした 7 残基について計算したものである。白丸, ペプチド IV; 白四角, ペプチド III; 白三角, ペプチド I; 黒丸, ペプチド VIII. 影のついた部分はペプチド III を残基置換 (III-G1E, III-G13L) したことによる疎水性モーメントのずれを意味する。また、破線はポリアラニンについて計算した結果である。

のアミノ酸残基の疎水性指数である。 $\delta$ は $\alpha$ ヘリックス構造において、連続するアミノ酸残基の相対位置をヘリックス軸まわりの回転角度として表示したものであり、普通 $100^\circ$ が用いられる。本研究で用いられたペプチドはすべて、脂質二重膜に結合することによって $\alpha$ ヘリックス構造が安定化するため、それらの疎水性モーメント(両親媒性の強さ)をペプチド毎に、または同じペプチド内の各部分について比較することは非常に興味深い。

これらのペプチドの中で疎水性モーメントが最も大きいのはペプチド VIII であり、最も小さいのはペプチド I であるが、これらは全体的な疎水性の高さそのものが異なるため、単純に比較はできない。比較的配列の似ているペプチド IV, III およびそのアミノ酸置換体について比較すると、ペプチド IV, III とともに N 末端側に比べて C 末端側の疎水性モーメントが小さい。これは図 3 のアミノ酸配列から容易に想像できるように、13 残基目のグリシンが両親媒性  $\alpha$ ヘリックスの疎水性表面側に存在しているからである。ペプチド III-G13L では C 末端側の疎水性モーメントがペプチド III よりも大きくなり、ペプチドの N 末端側と C 末端側のバランスもよくなる。これらの疎水性モーメントのバランスの違いがペプチド III と III-G13L の膜内の高次構造や配向の違いを生み、結果として膜融合活性に影響を与えていると考えられる。

結合等温線の解析によれば(図 24, 26)、膜融合活性を持つペプチドは脂質二重膜内で会合して 2 量体を形成する。それでは、この会合において用いられる相互作用とはどのような種類のものであろうか? ペプチド III の 13 残基目のグリシンをロイシンに置換したペプチド III-G13L が膜融合活性および膜内での会合能を失ったことから、13 残基目のグリシンをふくむ領域がその相互作用に関与していることは明らかである。

第一に、ペプチド III-G13L は N 末端側と C 末端側の疎水性及び疎水性モーメントのバランスがよいために、溶液内で既に 2 量体を形成している、という可能性がある。この場合、溶液内での会合は両親媒性  $\alpha$ ヘリックスの疎水性表面間の相互作用が用いられ、そのために脂質二重膜との親和性が抑えられてしまうことが予想されるが、ペプチド III と III-G13L の脂質二重膜との親和性にはあまり大きな差は見られないことから、この可能性はないと判断した。

第二に、これらのペプチドは主に N 末端側によって脂質二重膜と相互作用し、C 末端側は脂質二重膜内のそれほど深くないところには位置するため、C 末端側を用いて疎水性相互作用で会合できる、という可能性である。しかし、同じく膜融合活性を示すペプチド IV ではその  $\alpha$  ヘリックス軸は膜平面に対してほとんど平行になり、N 末端側と C 末端側との脂質二重膜内における深さの差は期待できない。また、第一の可能性についても言えることであるが、これらの相互作用はアミノ酸 1 残基の置換でドラスティックに変化するものとは考えにくい。その意味では、ペプチド III と III-G13L の間に二次構造上の違いが存在すると考えた方がつじつまが合う。

第三に、ペプチドの C 末端側で  $\alpha$  ヘリックスがほぐれ、分子間  $\beta$  構造などの水素結合によって会合が起こっている可能性がある。本研究において測定された IR-ATR スペクトルでは脂質二重膜に結合しているペプチド中に  $\beta$  構造を確認することはできなかったが、1～2 残基長の短い  $\beta$  構造に起因するピークならばその他の  $\alpha$  ヘリックスやランダムコイルのピークに埋もれてしまい、その存在を検知できない可能性は高い。図 29 において示したように本研究で取り上げた膜融合活性ペプチドはいずれも C 末端側において  $\alpha$  ヘリックス構造指向性が低下している。また、両親媒性の  $\alpha$  ヘリックス構造への寄与を考えると、13 残基目のグリシンは明らかに両親媒性を乱しており、さらに、グリシン残基は  $\alpha$  ヘリックス構造阻害因子として知られている。ここで仮に、ペプチド III の  $\alpha$  ヘリックスが 13 残基目のグリシンから数残基の領域でほぐれ、他の構造を形成しているとしよう。図 33 に、 $\alpha$  ヘリックスの「ほぐれ」と疎水性モーメントの相関を示す。ペプチド III の 13～14 残基目を縮めた配列や、13～15 残基目を縮めた配列では疎水性モーメントは大きく低下するが、13 残基目のグリシンのみを削った配列では疎水性モーメントはあまり変化せず、むしろ全体的にはペプチド III よりも疎水性モーメントは高くなる。 $\alpha$  ヘリックスの分断や短い  $\beta$  構造は一般にはエネルギー的に不利であるが、このような疎水性界面における相互作用がそれらを安定化しうると考えられる。Dubovskii らの NMR スペクトルを用いた結果によると (Dubovskii & Akasaka, personal communication)、界面活性剤のミセル懸濁液中、酸性 pH において、ペプチド III の N 末端側は  $\alpha$  ヘリックス構造をとったが、C 末端側は伸びた構造をとる。この結果も上記の可能性を支

持していると考えられる。

### 3. 膜融合活性とペプチドの膜内挙動

**膜融合活性ペプチド** 本研究における結果やその解釈を総合し、脂質二重膜内における膜融合活性ペプチドの挙動について以下のように推察した(図 34)。

これらのペプチドは脂質二重膜に結合して $\alpha$ ヘリックス構造をとり、そのヘリックス軸は膜平面に対してほぼ平行である。この時の配向角度はペプチドの疎水性バランスによって決まり、また、N末端側のほうがC末端側よりも膜との疎水性相互作用が強く、脂質二重膜内により深く沈み込んでいる。さらに、C末端側の $\alpha$ ヘリックスの一部がほぐれており、その領域の分子間 $\beta$ 構造などの水素結合によって、脂質二重膜上で2量体を形成している。

これらのペプチドの疎水性は脂質二重膜構造を不安定化するが、ペプチドは膜平面に対して平行に配向しているため、ペプチドが直接相互作用できるのは外側の一

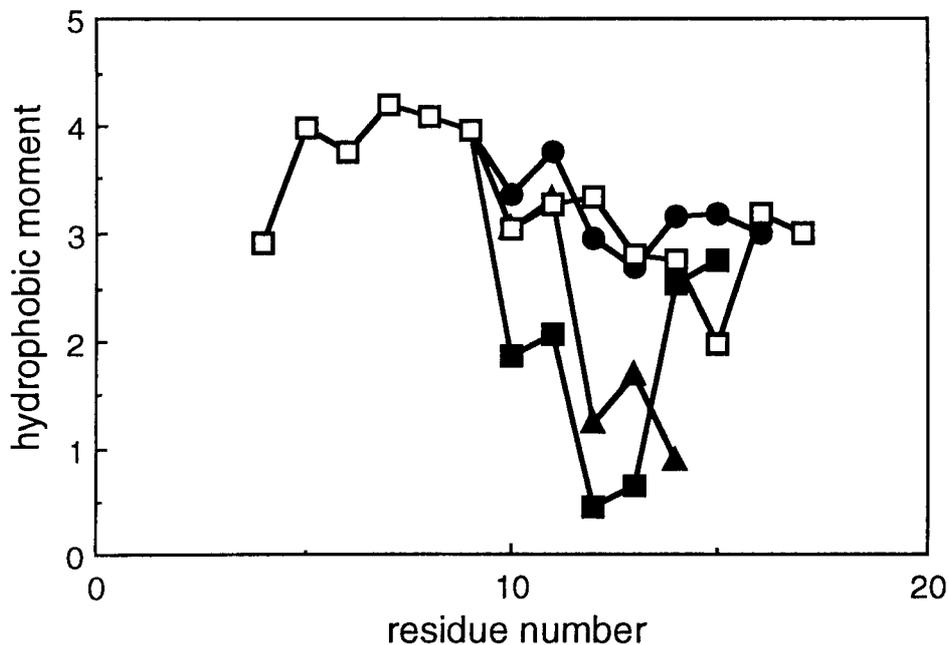


図 33  $\alpha$ ヘリックスの「ほぐれ」が疎水性モーメントに与える影響。縦軸と横軸は図 32 と同じ計算法で得た疎水性モーメントと残基番号である。白四角はペプチド III、黒塗り印は、ペプチド III の 13 残基目のグリシンから  $n$  残基を縮めた配列に対して計算した結果。黒丸,  $n=1$ ; 黒四角,  $n=2$ ; 黒三角,  $n=3$ 。

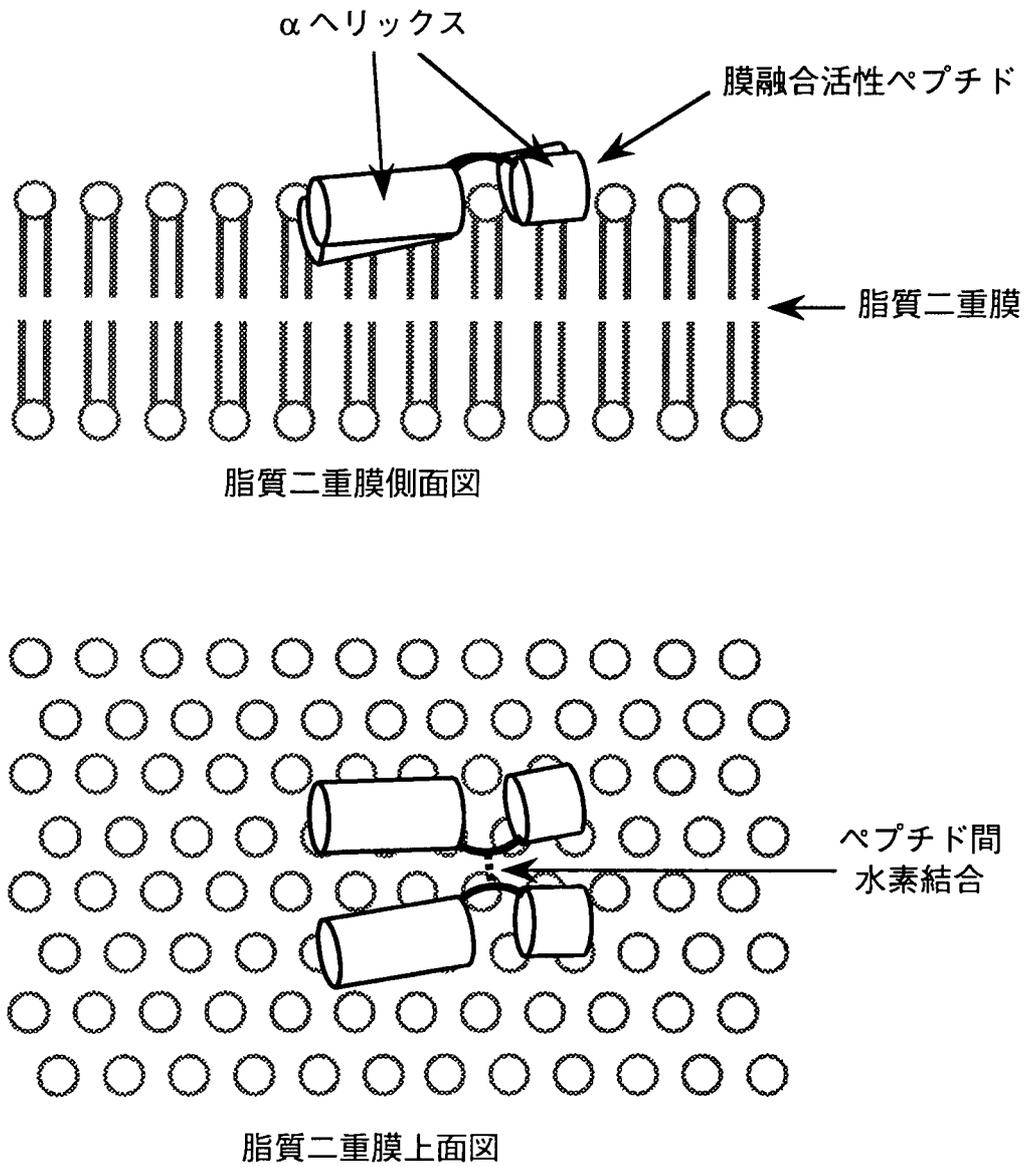


図 34 脂質二重膜内における膜融合活性ペプチドの予想図

重膜のみである。しかしながら、脂質二重膜構造はその炭化水素鎖の層が PC の親水性残基によって水相から隔てられることによって安定化しているため、二重膜構造の不安定化はペプチドが一重膜と相互作用するだけでも十分に可能である。

以上のようなリポソーム表面の不安定化や異なるリポソームに結合しているペプチド間の会合がリポソームの会合を引き起こし、さらに膜融合へつながると考えられる。

**HA の融合ペプチド** 最後に、インフルエンザの HA による膜融合現象における融合ペプチドの役割について考察する。HA は酸性 pH 下において立体構造変化を起こし、それによってタンパク質表面に露出した融合ペプチドを介して脂質二重膜に結合できるようになる (Gething et al., 1986; Brunner, 1989; Harter et al., 融合ペプチドは、合成ペプチドの場合と同様に脂質二重膜構造を不安定化すると考えられるが、それに引き続いて膜融合活性を完了させるための他の融合活性機構が存在するという仮説が多くの研究者によって提出されている (Morris et al., 1989; Sarkar et al., 1989; Spruce et al., 1989, 1991; Ellens et al., 1990; Stegmann et al., 1990)。彼らはそれぞれの実験結果 (様々な条件下での速度論的および化学量論的解析や脂質膜の電気測定など) から、脂質二重膜に結合した HA の 3 ~ 5 分子が会合してチャネル型の融合孔を形成するというモデルを構築した。

私は今回の結果から、融合ペプチドの 2 量体化が HA の会合の原動力であるという可能性を提示しようと思う (図 35)。HA は同一種のサブユニットから構成される 3 量体タンパク質であるから、HA は 1 分子あたり 3 本の融合ペプチドを持つ。従って、これらの融合ペプチドが脂質二重膜上で 2 量体化すれば HA が膜上で会合することになり、結果的に HA の多量体化を促すことになる。Stegmann らは、HA が会合するためにはそれらが既に標的脂質二重膜に結合していることが必須であることを示しており (Stegmann et al., 1990)、これは本研究において明らかになった膜融合活性ペプチドの会合挙動と一致する。また、Rapaport らはセンダイウィルスの融合ペプチドに関して、同様な考察をおこなっている (Rapaport et al., 1994)。

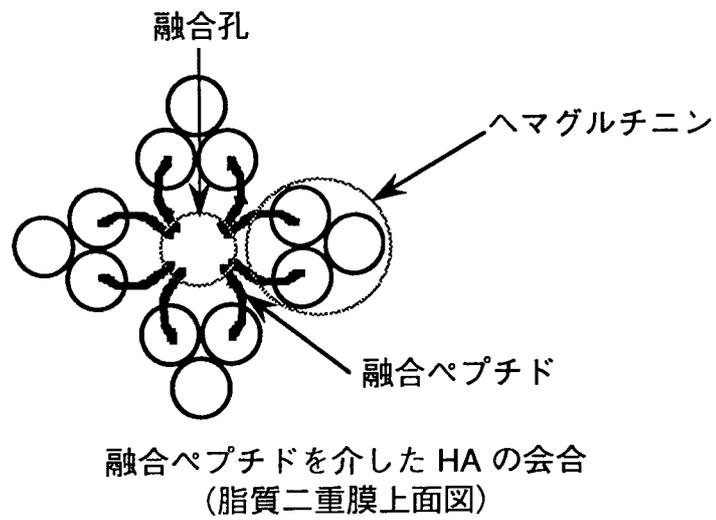
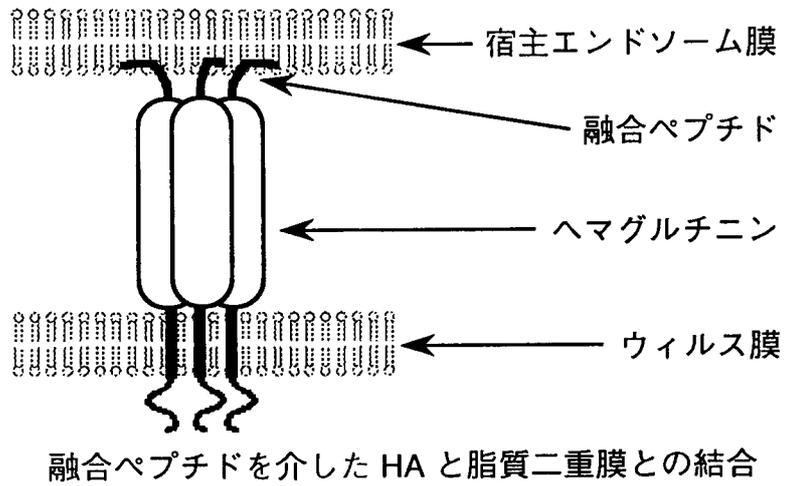


図 35 脂質二重膜に結合している HA および融合ペプチドの予想図

## 付録A：ATR 分光法の原理

ATR 分光法の原理は Harrick の著書によくまとめられている (Harrick, 1967)。序論の図 4 のように ATR プリズムと試料との界面に対してプリズム側から入射光をいれて全反射させると、界面から試料側に向けて減衰定在波が発生する。この全反射光のプリズム外への浸み出しによって試料の吸収スペクトルを測定することができ、さらに入射光に偏光を用いることによって吸光度の異方性を求め、試料内の分子の配向に関する情報を得ることができる。本章では ATR 分光法の理論的な背景を紹介するとともに、本研究において ATR スペクトルの解析に用いられる式の導出をおこなう。

本研究ではプリズム上に調製した多層および単層の脂質二重膜試料の測定をおこなっているが、膜の厚さによって解析法が若干異なるため、それぞれの場合について節を分けて述べることにする。

また ATR スペクトルの解析において使用した絶対屈折率の値は Frey らの論文 (Frey & Tamm, 1991) から借用したものである。その値を表 4 に示す。

表 4 ATR スペクトルの解析において使用した絶対屈折率  $n$  の値

波数 / $\text{cm}^{-1}$	吸収帯	$n_1$		$n_3$	
		ATR プリズム (ゲルマニウム)	試料 (脂質二重膜)	$\text{N}_2$	$\text{D}_2\text{O}$
~ 2920	$\text{CH}_2$ 逆対称伸縮振動	4.0	1.50	1.00	1.20
~ 2850	$\text{CH}_2$ 対称伸縮振動	4.0	1.50	1.00	1.20
~ 1650	アミド I	4.0	1.40	1.00	1.32
~ 1550	アミド II	4.0	1.40		

## 1. 厚膜試料（平面多層脂質二重膜）

いまプリズム（媒質1）と試料（媒質2）の界面における媒質1側の全反射を考える（図36）。直交座標系を、Z軸を界面に垂直に、Y軸を入射光に垂直にとる。Fresnelの反射と屈折の式に従って媒質1内の入射光および反射光についてのMaxwellの方程式を定義すると、その足し合わせによって界面に垂直な定在波が媒質1内に合成され、その界面での電場の振幅 $E_0$ は

$$E_{0x} = E_{ix} \frac{2 \cos q \sqrt{\sin^2 q - n_{21}^2}}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 q - n_{21}^2}}$$

$$E_{0y} = E_{iy} \frac{2 \cos q}{\sqrt{1 - n_{21}^2}}$$

$$E_{0z} = E_{iz} \frac{2 \cos q \sin q}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 q - n_{21}^2}} \quad (\text{A1})$$

とあらわされる (Harrick, 1965)。ここで $E_i$ は入射光の電場の振幅、 $q$ は入射角、 $n_{21} = n_2 / n_1$ は媒質2の屈折率( $n_2$ )と媒質1の屈折率( $n_1$ )の比、添字 $x, y, z$ は $E_0$ または $E_i$ の各座標成分をあらわしている。

全反射条件下( $q$ が臨界角より大)では媒質2中にあらわれる屈折光の電場の振幅は複素関数となり、電場の位相項を時間を含む部分と $z$ (界面からの垂直距離)を含む部分とに分割すると、 $z$ に伴って指数関数的に減衰する関数であることがわかる。この媒質2側にあらわれた定在波の電場の振幅 $E$ は

$$E = E_0 \exp(-z / d_p) \quad (\text{A2})$$

とあらわされる。 $d_p$ は光の媒質2側への浸み込みの深さ(界面の電場の振幅 $E_0$ が $1/e$ に減衰する深さ)として

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 q - n_{21}^2}} \quad (\text{A3})$$

と定義され (Born & Wolf, 1964)、 $\lambda$ は真空中での入射光の波長を意味する。この減衰定在波のエネルギーの時間平均を計算すると零になり、界面を通過するエネルギーの流れがないことが確認できる。また反射率 $R$ (入射光と反射光のエネルギーの比)は1になり、全反射においてエネルギーの損失がなかったことがわかる。

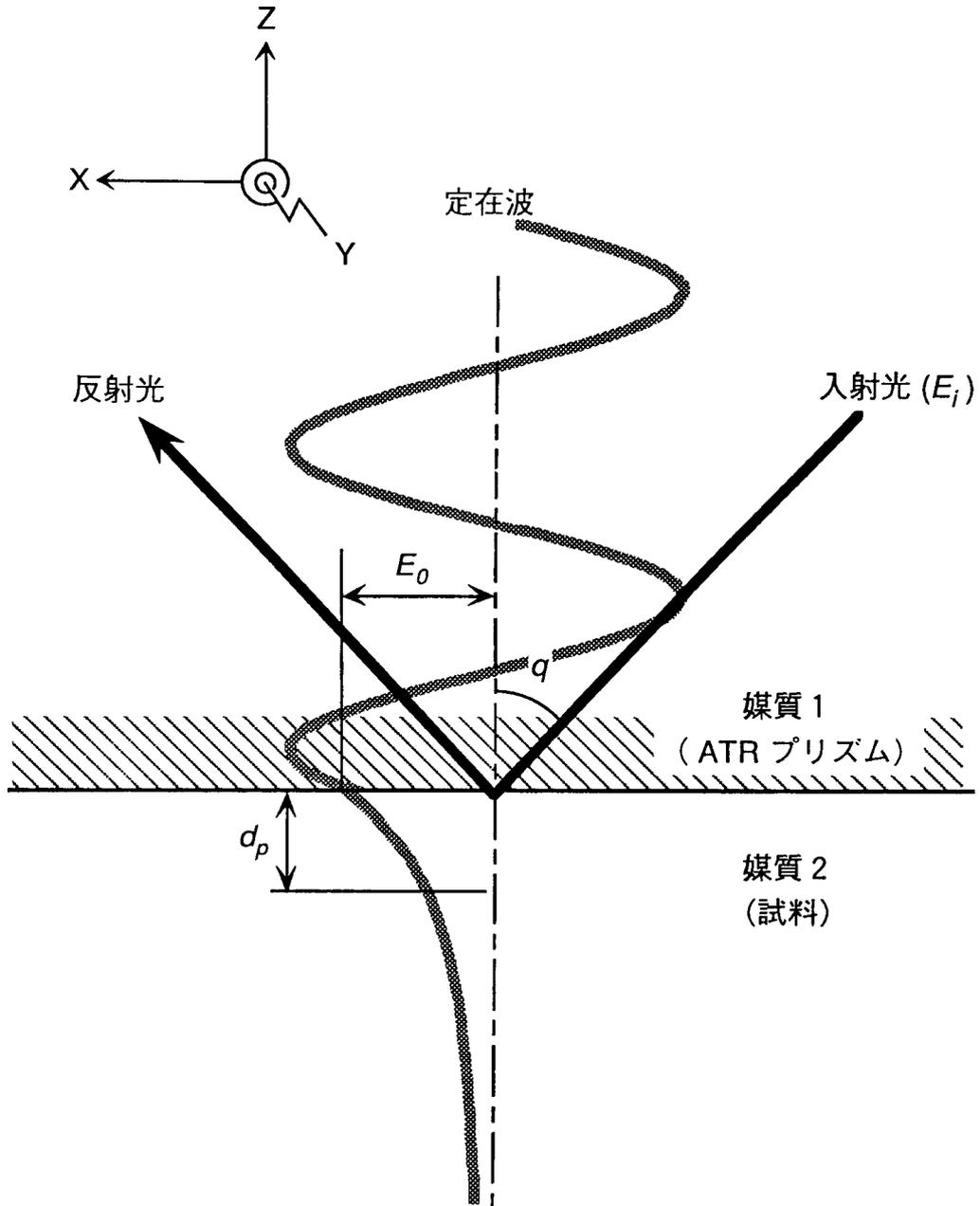


図 36 ATR プリズム表面における全反射についての模式図。左上は本文中で用いられる座標系の向きを表す。

つぎに媒質2が吸光係数をもつ場合を考える。一般に光が吸収係数 $\alpha$ をもつ厚さ $d$ の媒質を通過するとき、透過率は Lambert の法則に従って、

$$I/I_0 = \exp(-\alpha d) \approx 1 - \alpha d \quad (\text{A4})$$

とあらわされる(ただし、吸収が小さく、 $\alpha d \ll 1$ のとき)。 $I_0, I$ はそれぞれ入射光と透過光のエネルギー( $nE^2$ )である。これと同様に ATR 分光法における反射率 $R$ (透過率に対応している)と媒質の吸収係数との相関を

$$R = 1 - \alpha d_e \quad (\text{A5})$$

とおき、また台形の多重反射プリズムを用いて $N$ 回の内部反射による測定をした場合は

$$R^N = (1 - \alpha d_e)^N \approx 1 - N \alpha d_e \quad (\text{A6})$$

と書き直すことができるとする。(A4)式と(A6)式を比較すると $N d_e$ が $d$ に対応しており、 $d_e$ を反射1回あたりのみかけの光路長とみなすことができる。Harrickは $d_e$ を、減衰定在波による媒質2への浸入の深さを振幅 $E_i$ の光が媒質2を通過した距離に換算したものとみなし、次のように定義した(Harrick, 1965)。(A4)式によれば $\alpha d$ は試料によって吸収される光のエネルギー分率 $(I_0 - I) / I_0$ に等しい。ATR分光法ではもともと試料に侵入してくる光のエネルギーが入射光の $(n_2 E^2) / (n_1 E_i^2)$ であるからまずその補正をおこない、また浸み込みの深さに対して入射角による光路の延長の補正 $(1 / \cos q)$ をおこなうと

$$d_e = \frac{n_{21}}{\cos q} \int_0^{\infty} \left( \frac{E}{E_i} \right)^2 dz \quad (\text{A7})$$

が得られ、さらに(A2)式を代入すると

$$d_e = \frac{n_{21}}{2 \cos q} \left( \frac{E_0}{E_i} \right)^2 d_p \quad (\text{A8})$$

が得られる。ここで $d_e$ および $\alpha$ が異方性を持つことを考慮に入れて(A6)式を変形すると

$$\ln R^N = -N (\alpha_x, \alpha_y, \alpha_z) \cdot (d_{ex}, d_{ey}, d_{ez}) \quad (\text{A6}')$$

となり、さらに吸光度 $A = -\log R^N$ 、吸収体分子のモル吸光係数 $\epsilon = \alpha / (c \ln 10)$ およびモル濃度 $c$ を用いて

$$A = N c (\varepsilon_x, \varepsilon_y, \varepsilon_z) (d_{ex}, d_{ey}, d_{ez}) \quad (A6'')$$

と書き直すことができる。

以上をまとめると、偏光スペクトルの吸光度に関して次式を得る。

$$A_p = \frac{N n_{21} c d_p}{2 \cos q} \left\{ \varepsilon_x \left( \frac{E_{0x}}{E_{ix}} \right)^2 + \varepsilon_z \left( \frac{E_{0z}}{E_{iz}} \right)^2 \right\}$$

$$A_s = \frac{N n_{21} c d_p}{2 \cos q} \varepsilon_y \left( \frac{E_{0y}}{E_{iy}} \right)^2 \quad (A9)$$

$A_p, A_s$  はそれぞれ入射光として p 偏光 (偏光面が入射面に平行)、s 偏光 (偏光面が入射面に垂直) を用いた場合の吸光度をあらわす。本研究では次章「付録B：分子の配向と吸光度の異方性」に述べる方法に従って  $\varepsilon_x, \varepsilon_y, \varepsilon_z$  を分子の秩序パラメーター  $f$  (分子軸の配向性の指標) の関数としてあらわし、それらを (A9) 式に代入して  $A_p / A_s$  の実験値から脂質二重膜内におけるペプチドの  $\alpha$  ヘリックス軸や脂質の炭化水素鎖の配向を解析している。

また Hansen と Flournoy らは複素屈折率の概念 (屈折率の虚数項として消衰係数を導入し、媒質による光の吸収を表現する) を用いて Fresnel の式から反射率  $R$  に対する媒質 2 の吸光係数の効果を直接導き出し、同様の結果を得ている (Flournoy et al., 1966; Hansen, 1967)。

ところで以上の計算は試料の厚さが光の浸み込みよりも厚いという仮定の下におこなわれている。減衰定在波の試料に対する浸み込みの深さ  $d_p$  は (A3) 式によって計算でき、例えば  $q = 30^\circ$  のゲルマニウム製プリズム ( $n_1 = 4.0$ ) をもちいて脂質二重膜試料 ( $n_2 \approx 1.5$ ) の測定をおこなう場合、 $d_p$  は波長の 0.12 倍となり、 $1650 \text{ cm}^{-1}$  (アミド I 吸収帯) の光では  $0.75 \mu\text{m}$  となる。本研究において調製した平面多層脂質二重膜では膜厚は  $5 \mu\text{m}$  におよび、光の浸み込みの深さよりも十分に厚い。一方、平面単層脂質二重膜では膜厚は  $5 \text{ nm}$  程であり、光の浸み込みにくらべて非常に薄い。したがって (A9) 式は多層脂質膜系の解析には用いることができるが、単層脂質膜系の解析には次節で述べるような別の仮定が必要になる。

## 2. 薄膜試料 (平面単層脂質二重膜)

ここではプリズム (媒質 1) と試料 (媒質 2) に加え、試料に接する第三の層 (媒質 3) をも考慮せねばならない。本研究における媒質 3 とは空気や溶媒 (重水) である。厚膜試料の場合と同じように Fresnel の反射と屈折の式に従って媒質 1 内および媒質 2 内における界面に垂直な定在波を計算すると、そのプリズム・試料界面での電場の振幅  $\bar{E}_0$  は

$$\begin{aligned}\bar{E}_{0x} &= E_{ix} \frac{2 \cos q \sqrt{\sin^2 q - n_{31}^2}}{\sqrt{1 - n_{31}^2} \sqrt{(1 + n_{31}^2) \sin^2 q - n_{31}^2}} \\ \bar{E}_{0y} &= E_{iy} \frac{2 \cos q}{\sqrt{1 - n_{31}^2}} \\ \bar{E}_{0z} &= E_{iz} \frac{2 n_{32}^2 \cos q \sin q}{\sqrt{1 - n_{31}^2} \sqrt{(1 + n_{31}^2) \sin^2 q - n_{31}^2}}\end{aligned}\quad (\text{A10})$$

とあらわされる (Harrick, 1966)。

つぎに (A7) 式を用いてみかけの光路長  $d_e$  を求める。この場合膜厚  $d$  は  $d_p$  に比べて非常に小さいのだから  $z$  の積分範囲は  $0 \sim d$  であり、またこの間の定在波の減衰を無視できるとすると次式を得ることができる。

$$d_e = \frac{n_{21}}{\cos q} \left( \frac{\bar{E}_0}{E_i} \right)^2 d \quad (\text{A11})$$

これらの式を用いて厚膜試料の場合と同様に偏光スペクトルの吸光度を計算すると、

$$\begin{aligned}A_p &= \frac{N n_{21} c d}{\cos q} \left\{ \epsilon_x \left( \frac{\bar{E}_{0x}}{E_{ix}} \right)^2 + \epsilon_z \left( \frac{\bar{E}_{0z}}{E_{iz}} \right)^2 \right\} \\ A_s &= \frac{N n_{21} c d}{\cos q} \epsilon_y \left( \frac{\bar{E}_{0y}}{E_{iy}} \right)^2\end{aligned}\quad (\text{A12})$$

が得られる。

本研究における平面単層脂質二重膜の実験では (A12) 式を用いてペプチドや脂質の秩序パラメーター  $f$  を決定するほか、水溶液から膜に結合してくるペプチドの絶対量を表面密度  $\Gamma$  (膜平面の単位面積当たりのペプチドのモル数) として決定してい

る。  $\Gamma$  は

$$\Gamma = c d \tag{A13}$$

によって (A12) 式と関係づけられる。

## 付録B : 分子の配向と吸光度の異方性

分子による特定波長の光の吸収は、一定周期で振動する交流電場によって誘起される分子内電気双極子によるものとして古典的に説明することができる。たとえば赤外光は分子振動とおなじ周波数領域の光であり、そのために分子振動に伴う誘起双極子 (遷移双極子) によって吸収される。

電磁波によって電気双極子が誘起される場合、誘起双極子方向の成分の電場をもつ電磁波のみが分子分極に用いられて吸収され、直交成分は分極に寄与しない。また誘起双極子は分子構造に依存し、その向きは分子内で固定されている (分子構造そのものが固定されていない場合は別とする)。したがって試料中の分子が全くの無配向状態でなく、なんらかの配向性を持つとすれば、試料の分子吸光係数は異方性を示すはずであり、異なる偏光面をもつ電磁波に対して異なる吸光度を与えるであろう。Fraser は平面膜試料内において試料平面の法線に対し一定の配向角で分布する分子を仮定し、その配向角度によって生じる吸光係数の異方性を計算した (Fraser, 1953)。以下にその方法を紹介する。

直交座標系を、Z 軸を試料平面 (本研究の系では脂質二重膜平面や ATR プリズム平面に対応する) に垂直にとる。いま注目分子の分子軸 M が Z 軸に対し角度  $\gamma$  で一様に分布しており、さらに遷移双極子モーメント  $\vec{\mu}$  が分子軸に対し角度  $a$  で一様に分布しているとする (図 37)。遷移モーメント  $\vec{\mu}$  がそれと平行な電場を持つ電磁波に対して分子吸光係数  $\epsilon_m$  を持つとすると、任意の直線偏光に対する吸光係数  $\epsilon$  は

$$\epsilon = \epsilon_m (\cos^2 \theta) \quad (\text{B1})$$

であらわされる。 $\theta$  は  $\vec{\mu}$  と電場ベクトルのなす角をしめし、 $\vec{\mu}$  成分の電場のみが吸収によって減衰することを意味する。

(B1) 式を用いて各座標成分の電場を持つ電磁波に対する  $\epsilon$  を球面積分によって計算すると以下の結果を得る。

$$\begin{aligned} \epsilon_x = \epsilon_y &= \epsilon_m \left\{ \frac{1}{2} f \sin^2 a + \frac{1}{3} (1-f) \right\} \\ \epsilon_z &= \epsilon_m \left\{ f \cos^2 a + \frac{1}{3} (1-f) \right\} \end{aligned} \quad (\text{B2})$$

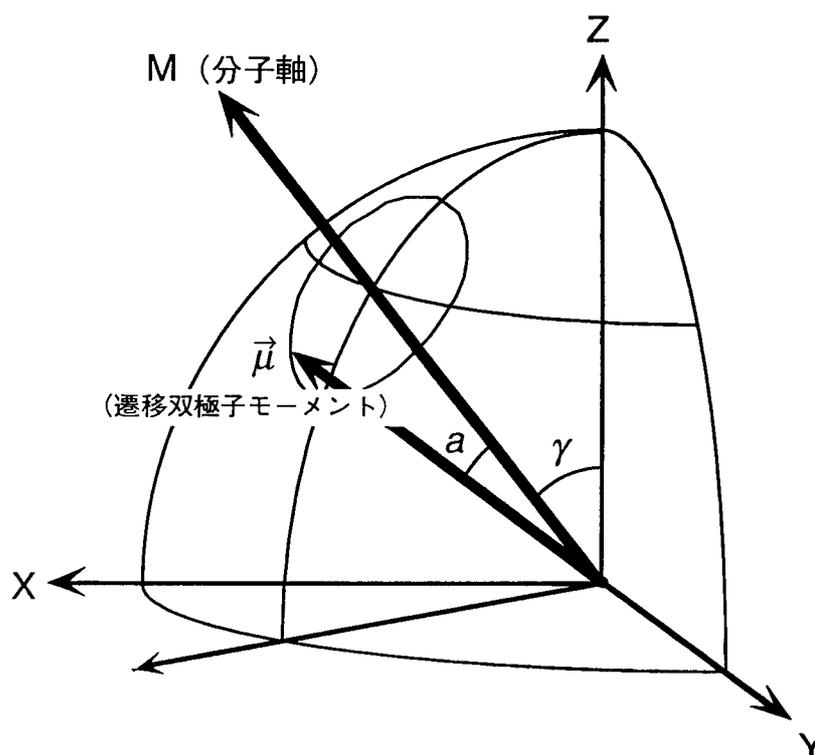


図 37： Z 軸 (脂質二重膜平面の法線) に対する分子軸の配向、および分子軸に対する遷移双極子モーメントの配向の模式図。それぞれが軸との角度  $\gamma, a$  を保って一様に分布している。

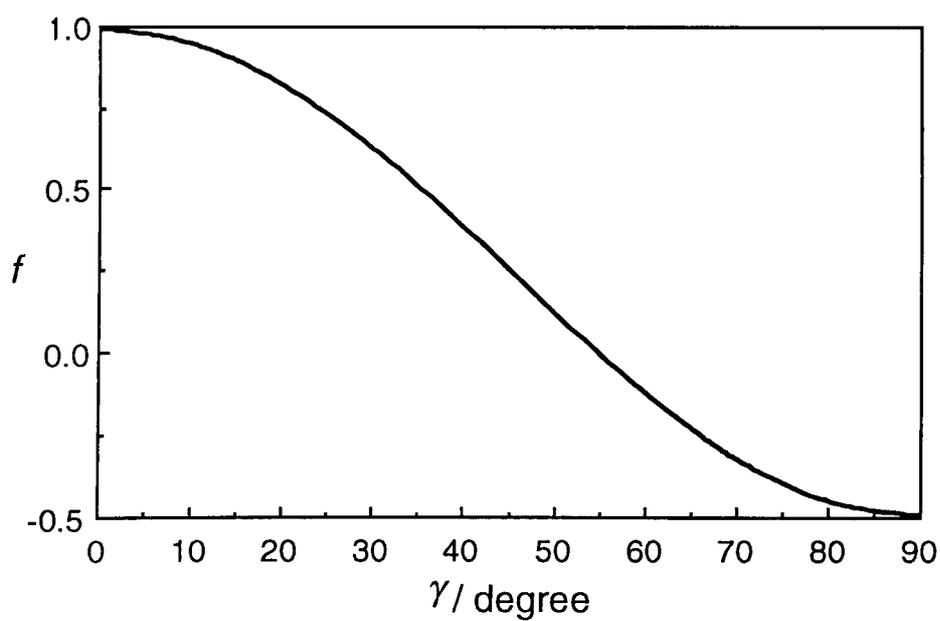


図 38 秩序パラメーター  $f$  と分子軸の配向角  $\gamma$  との相関。

ここで、 $f$  は秩序パラメーターとして次のように定義できる。

$$f = \frac{3 \cos^2 \gamma - 1}{2} \quad (\text{B3})$$

参考のために  $f$  と  $\gamma$  の相関をあらわすグラフを図 38 に示す。

(B2) 式を「付録A・ATR 分光法の原理」の (A9) 式に代入すると、厚膜試料の解析に関して次の式が得られる。

$$\frac{A_p}{A_s} = \frac{\left(\frac{E_{0x}}{E_{ix}}\right)^2}{\left(\frac{E_{0y}}{E_{iy}}\right)^2} + \frac{\left(\frac{E_{0z}}{E_{iz}}\right)^2 \left\{f \cos^2 a + \frac{1}{3}(1-f)\right\}}{\left(\frac{E_{0y}}{E_{iy}}\right)^2 \left\{\frac{1}{2}f \sin^2 a + \frac{1}{3}(1-f)\right\}} \quad (\text{B4})$$

本研究ではこの式にペプチドのアミド I および アミド II 吸収帯や脂質の  $\text{CH}_2$  逆対称および対称伸縮振動吸収帯の  $A_p / A_s$  の実験値を代入することによって、平面多層脂質二重膜内におけるペプチドの  $\alpha$  ヘルックス軸や脂質の炭化水素鎖の  $f$  を計算している。また、(B2) 式を (A12) 式に代入することによって、薄膜試料の解析に関する同様の計算式を得ることができる。

$$\frac{A_p}{A_s} = \frac{\left(\frac{\bar{E}_{0x}}{\bar{E}_{ix}}\right)^2}{\left(\frac{\bar{E}_{0y}}{\bar{E}_{iy}}\right)^2} + \frac{\left(\frac{\bar{E}_{0z}}{\bar{E}_{iz}}\right)^2 \left\{f \cos^2 a + \frac{1}{3}(1-f)\right\}}{\left(\frac{\bar{E}_{0y}}{\bar{E}_{iy}}\right)^2 \left\{\frac{1}{2}f \sin^2 a + \frac{1}{3}(1-f)\right\}} \quad (\text{B5})$$

(B2) 式をペプチドのアミド I 吸収帯 ( $\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$ ) の場合に当てはめるとつぎのようになる。アミド I 吸収帯はポリペプチドの最も主要な基準振動に対応するものであり、主にアミドのカルボニル基の  $\text{C}=\text{O}$  伸縮振動の寄与によるとされている。 $\alpha$  ヘルックス構造は 3 個隔てたアミノ酸残基間で主鎖の  $\text{C}=\text{O}$  と  $\text{N}-\text{H}$  が水素結合をつくることによって形成されているため、 $\text{C}=\text{O}$  結合軸およびその伸縮振動によって生じる遷移双極子モーメントは  $\alpha$  ヘルックス軸に対してほぼ平行に固定されていると考えられる (図 39a)。遷移双極子モーメントと  $\alpha$  ヘルックス軸のなす角度については多くの実験やモデル計算がなされているが、本研究では Rothschild らによる  $27^\circ$  という値を  $a$  として使用した (Rothschild & Clark, 1979)。またアミド II 吸収帯 ( $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ ) はアミドの  $\text{N}-\text{H}$  の面内変角振動の寄与によるとされているため、この

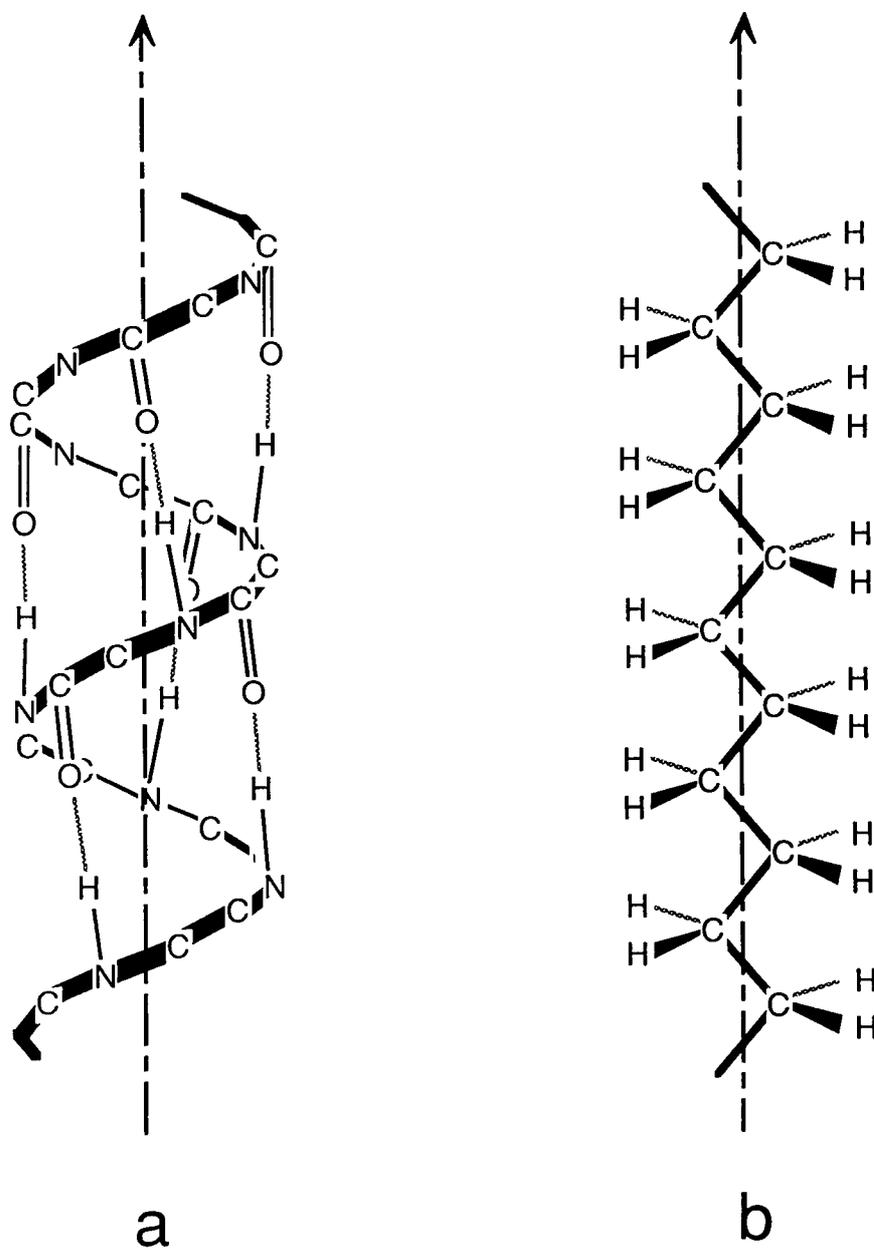


図 39 a はペプチドの  $\alpha$ ヘリックス構造、b は脂質の飽和炭化水素鎖の全トランス構造。中央の一点鎖線は本研究において仮定しているそれぞれの分子軸を表す。

場合の  $a$  は  $90^\circ$  となる。

次に脂質の  $\text{CH}_2$  逆対称伸縮振動 ( $\sim 2920 \text{ cm}^{-1}$ ) および対称伸縮振動 ( $\sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ ) 吸収帯の場合を考える。脂質の飽和炭化水素鎖が全トランス構造をとっていると仮定すると、その C-H 結合軸およびその伸縮振動によって生じる遷移双極子モーメントは炭化水素鎖の軸に垂直である (図 39b)。従ってこの場合の  $a$  は  $90^\circ$  である。

以上の計算は  $\gamma$  が一定であるという仮定の下におこなわれている。実際の  $\gamma$  にはある分布の幅が存在すると予想されるが、それを  $\epsilon$  の異方性から見積もることはできない。いま仮に試料中の注目分子が完全な無配向状態であると仮定して (B1) 式を計算すると (B2) 式における  $f$  は 0 になる。ところが (B3) 式によれば  $f = 0$  は  $\gamma = 54.7^\circ$  に対応しており、この場合には完全無配向状態と  $\gamma = 54.7^\circ$  の完全配向状態との区別ができないことになる。対照的に、 $f = -0.5$  と  $f = 1$  の点ではそれぞれ  $\gamma = 90^\circ$ 、 $\gamma = 0^\circ$  の配向角しかとり得ず、角度の分布はあり得ない。本研究では  $f$  が負の場合には脂質二重膜平面に対して分子軸が「平行である」、 $f$  が正の場合には「垂直である」とみなし、 $f$  が 0 に近づく場合には分子軸の「配向角度が傾く」のか「配向性が低下する (配向が乱される)」のかの明言は避け、どちらの可能性が高いかを考察するにとどめている。

## 付録C：ペプチド・脂質二重膜結合等温線の解釈について

「等温線」とは、物質の状態関数のうち、温度を一定に保って、他の2変数の関係を示す曲線を表すもので、実験データの熱力学的な解釈をするうえで重要な表示法である。また、「吸着等温線」とは、ある溶液と一つの界面が接触して平衡状態にいるとき、溶液内のある溶質の濃度とその溶質の界面への吸着量を表示したものであり、その曲線の形から吸着過程についての情報を得ることができる。

本論文では平面単層脂質二重膜へのペプチドの結合を界面への吸着とみなし、その「結合等温線」を解析することによってペプチドと膜との結合過程を考察している。

### 1. Langmuir の吸着等温式

溶液内から界面への溶質分子の単分子層吸着 (一つの吸着座席に一個の分子しか吸着できないような吸着様式) を考える。一定温度では、吸着平衡は溶質分子の界面への結合速度と界面からの遊離速度が等しいときに達成される。いま界面の吸着座席の表面密度を  $\Gamma_m$  とし、溶質の濃度が  $c$  のとき、吸着密度が  $\Gamma$  であるとする。古典的反應速度論の考え方をを用いると、界面への溶質分子の結合速度  $v_{\downarrow}$  はその衝突回数と空いた結合座席数とに比例すると考えられるから、

$$v_{\downarrow} = k_{\downarrow} c (\Gamma_m - \Gamma) \quad (C1)$$

となる。一方、界面からの分子の遊離速度  $v_{\uparrow}$  は吸着密度にのみ比例して、

$$v_{\uparrow} = k_{\uparrow} \Gamma \quad (C2)$$

となる。ここで、 $k_{\downarrow}$  および  $k_{\uparrow}$  はそれぞれの速度定数である。吸着平衡下では  $v_{\downarrow} = v_{\uparrow}$  であるから、結果として

$$\Gamma = \frac{\Gamma_m K c}{1 + K c} \quad (C3)$$

を得る。 $K$  は溶質と界面の結合定数であり、

$$K = \frac{v_{\uparrow}}{v_{\downarrow}} \quad (\text{C4})$$

と表される。(C3)式は Langmuir の吸着等温式として知られており、その  $\Gamma$  と  $c$  の関係は「結果」の図 16 の曲線のようになる。

(C3)式および図 16 の曲線の特徴を挙げると以下のようになる。 $c$  を無限大に近づけると  $\Gamma$  は  $\Gamma_m$  に近づく。したがって、 $\Gamma_m$  は飽和吸着密度と呼ばれる。また、 $c$  を 0 に近づけると吸着等温線は次第に一次関数的になり、

$$\Gamma = \Gamma_m K c \quad (\text{C5})$$

に近づく。

実際の吸着現象は単分子層吸着だけでは記述できず、特に  $c$  が大きい範囲において、吸着した溶質分子に対して更に溶質が吸着する、多分子層吸着の概念を必要とする場合が多い。しかし脂質二重膜上にペプチドが折り重なるという図は、リポソーム/ペプチドの比が比較的大きな場合でも膜融合を引き起こすことができるという膜融合活性ペプチドの性質に照らし合わせるとあまり現実的ではない。したがって、本研究では吸着等温線の、 $\Gamma$  および  $c$  が比較的小さな範囲に焦点を絞って解析をおこなうことにした。

## 2. 結合における協同性について

Langmuir の吸着等温式は、それぞれの吸着座席に対してそれぞれの溶質が独立に、等しい結合定数  $K$  によって相互作用しているという仮定のもとに導かれたものである。しかしながら、界面上の吸着量によって見かけの結合定数が変化し、溶質が協同的な吸着挙動を示す場合がある。これには二つの場合が考えられる(ただし実験範囲での  $c$  が十分に小さく、溶液内における溶質の会合状態は 1 種類しかないとする)。

まず一つには溶質自身が大きな電荷を持っており、吸着がすすむにつれて界面のイオン雰囲気に変化する場合がある。この場合には  $\Gamma$  が大きいほど結合は阻害され、吸着は負の協同性を示す。しかし、 $\Gamma$  が小さい範囲ではあまり大きな効果を期待できないので、特に解析はおこなわなかった。

もう一つは、溶質が界面上で会合する場合である。界面上における会合体の量は当然  $\Gamma$  に依存し、また最初の仮定から、溶質は溶液内では安定な会合体をつくり得ないのだから、会合体のままの界面からの遊離もあり得ない。その結果、 $\Gamma$  が大きいほど界面からの遊離が阻害され、吸着は正の協同性を示す。

界面上での溶質の会合が Langmuir 吸着等温線に与える影響を考えると以下のようになる。図 40 に示したように溶質は溶液内において単量体であり、吸着座席との結合定数を  $K$  とする。吸着した溶質は界面上で会合して  $n$  量体を形成し、その会合定数を  $K_n$  とする。また、単純化のために会合体には 1 種類しかないとすると、吸着密度  $\Gamma$  は

$$\Gamma = \Gamma_1 + n \Gamma_n \quad (C6)$$

と表される。 $\Gamma_1, \Gamma_n$  はそれぞれ単量体及び  $n$  量体の密度であり、

$$\Gamma_n = K_n (\Gamma_1)^n \quad (C7)$$

という関係が成り立つ。 $\Gamma$  が小さい範囲では  $\Gamma_1$  に対して (C5) 式が成り立ち、また  $K_n$  が十分に大きく、(C6) 式において  $\Gamma_1$  が無視できるとすると、

$$\Gamma = n K_n (\Gamma_m K c)^n \quad (C8)$$

が得られる。溶質が会合しない場合には  $n$  および  $K_n$  が 1 になるわけだから、(C8) 式は (C5) 式と等しくなる。

以上のべてきた近似的な解釈によって、溶質の会合によって生じる協同的な吸着現象を少なくとも定性的に表現することが可能である。その吸着等温線は、 $\Gamma$  が小さい範囲では (C8) 式のような多次元関数的になるために、全体としてはシグモイダルな形状をとる。また (C8) 式によれば、 $\Gamma$  と  $c$  を両対数表示すればその傾きは  $n$  に等しくなるはずである。実際の吸着は、異なる  $n$  値を持つ (C8) 式の重ね合わせとして表されることが考えられるが、本研究では実験から得た  $\ln \Gamma$  と  $\ln c$  のプロットの  $\Gamma$  が小さい範囲での傾きから、平均の、または主要な会合体の会合数として  $n$  を見積もることにした。

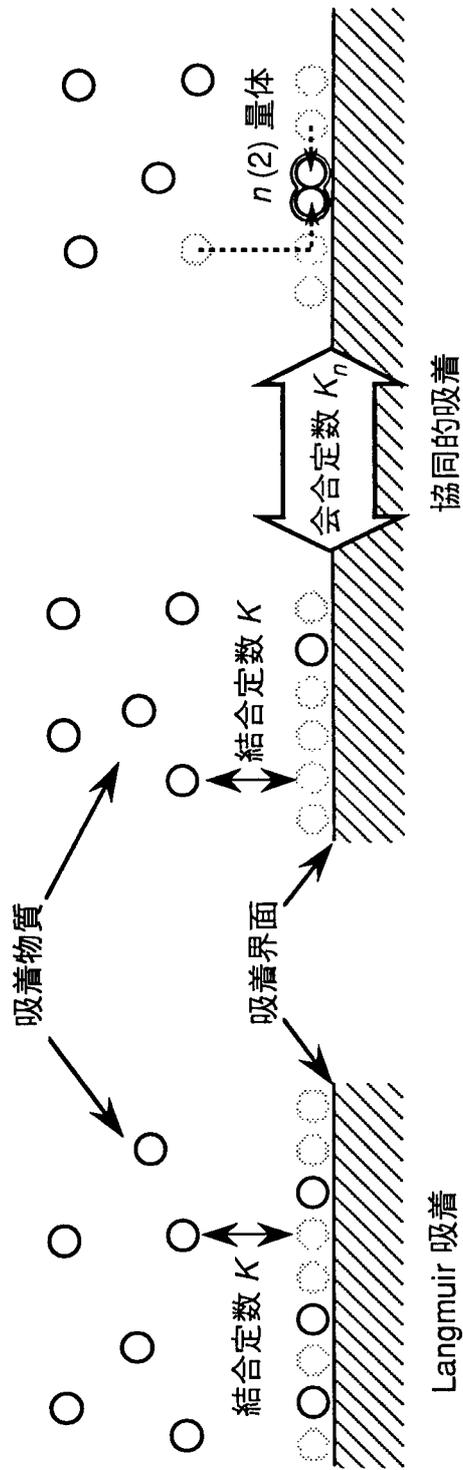


図 40: Langmuir 吸着と吸着物質の会合による協同的吸着の模式図

## 謝辞

本研究の遂行にあたって終始御指導くださいました京都大学化学研究所の高橋 敏先生に深く感謝いたします。また多大なる御協力と適切な御助言をいただきました京都大学理学部の大西俊一先生と伊藤忠直先生に深く感謝いたします。

本研究で用いられたペプチドの合成および精製と CD スペクトルの測定に関しては京都大学化学研究所の高橋 敏先生、松本友治君、京都大学理学部の村田昌之先生、京都工芸繊維大学の Jeannette Leenders さん、沼田佳博君、清水 彩さんに御協力いただきました。

ペプチドによる膜融合の活性測定は京都大学理学部の村田昌之先生に御指導いただきました。また本論文中に借用させていただいた活性測定データは村田先生をはじめとする旧大西研究室の皆様と京都大学化学研究所の松本友治君によるものです。

ATR スペクトルの測定法に関しては京都大学化学研究所の木村功之先生に御指導いただきました。また永森浩司氏をはじめとする日本分光株式会社の皆様、京都大学化学研究所の竹中 亨先生、梅村純三先生、木村功之先生、岡村恵美子先生と、旧竹中研究室の皆様には FT / IR スペクトルの測定に関して便宜を図っていただきました。

LB 膜の調製と電子顕微鏡による観察については京都大学化学研究所の松本陸朗先生に御指導いただきました。またこれらの実験に関しては京都工芸繊維大学の清水 彩さんに御協力いただきました。

神戸大学の赤坂一之先生と Peter Dubovskii 先生には NMR によるペプチドの構造情報および有益な御助言をいただきました。

以上の方々に深く感謝いたします。

最後に、公私にわたって御助力を賜った高橋研究室の皆様、金久研究室の皆様をはじめ、京都大学の皆様方に深く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 高橋 徹 (平成 5 年) 「膜融合活性ペプチドの膜内配向の決定による融合開始機構の研究」 平成 3 ~ 4 年度科学研究費補助金 (一般研究 B) 研究成果報告書
- 高橋 徹 (平成 7 年) 「合成ペプチドによる膜融合活性に必須の一次構造および立体構造の決定」 平成 5 ~ 6 年度科学研究費補助金 (一般研究 A) 研究成果報告書
- Alford, D., Ellens, H., and Bentz, J. (1994) "Fusion of influenza virus with sialic acid-bearing target membranes." *Biochemistry* **33**, 1977-1987
- Arkin, I. T., Rothman, M., Ludlam, C. F. C., Aimoto, S., Engelman, D. M., Rothschild, K. J., and Smith, S. O. (1995) "Structural model of the phospholamban ion channel complex in phospholipid membranes." *J. Mol. Biol.* **248**, 824-834
- Arvidson, G. A. E. (1965) "Fractionation of naturally occurring lecithins according to degree of unsaturation by thin-layer chromatography." *J. Lipid Res.* **6**, 574-577
- Bartlett, G. R. (1959) "Phosphorus assay in column chromatography." *J. Biol. Chem.* **234**, 466-468
- Bauer, H. H., Müller, M., Goette, J., Merkle, H.P., and Fringeli, U.P. (1994) "Interfacial adsorption and aggregation associated changes in secondary structure of human calcitonin monitored by ATR-FTIR spectroscopy." *Biochemistry* **33**, 12276-12282
- Blaurock, A. E. (1982) "Evidence of bilayer structure and of membrane interactions from X-ray diffraction analysis." *Biochim. Biophys. Acta* **650**, 167-207
- Born, M., and Wolf, E. (1964) in *Principles of Optics*, Macmillan, New York
- Brauner, J. W., Mendelsohn, R., and Prendergast, F. G. (1987) "Attenuated total reflectance Fourier transform infrared studies of the interaction of melittin, two fragments of melittin, the  $\delta$ -hemolysin with phosphatidylcholines." *Biochemistry* **26**, 8151-8158
- Brunner, J. (1989) "Testing topological models for the membrane penetration of the fusion peptide of influenza virus hemagglutinin." *FEBS Lett.* **257**, 369-372

- Bullough, P. A., Hughson, F.M., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1994) "Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion." *Nature* **371**, 37-43
- Cabiaux, V., Brasseur, R., Wattiez, R., Falmagne, P., Ruyschaert, J.-M., and Goormaghtigh, E. (1989) "Secondary structure of diphtheria toxin and its fragments interacting with acidic liposomes studied by polarized infrared spectroscopy." *J. Biol. Chem.* **264**, 4928-4938
- Carr, C. M., and Kim, P.S. (1993) "A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin." *Cell* **73**, 823-832
- Chou, P. Y., and Fasman, G. D. (1978) "Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence." *Adv. Enzymol.* **47**, 45-148
- Cornell, B. A., and Separovic, F. (1983) "Membrane thickness and acyl chain length." *Biochim. Biophys. Acta* **733**, 189-193
- Cornell, D. G., Dluhy, R.A., Briggs, M.S., McKnight, J., and Gierasch, L.M. (1989) "Conformations and orientations of a signal peptide interacting with phospholipid monolayers." *Biochemistry* **28**, 2789-2797
- de Jongh, H. H. J., Goormaghtigh, E., and Killian, J.A. (1994) "Analysis of circular dichroism spectra of oriented protein-lipid complexes: Toward a general application." *Biochemistry* **33**, 14521-14528
- Dempsey, C. E., and Butler, G.S. (1992) "Helical structure and orientation of melittin in dispersed phospholipid membranes from amide exchange analysis in situ." *Biochemistry* **31**, 11973-11977
- Doms, R. W., Helenius, A., and White, J. (1985) "Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: The low pH-induced conformational change." *J. Biol. Chem.* **260**, 2973-2981
- Doms, R. W., Gething, M.-J., Henneberry, J., White, J., and Helenius, A. (1986) "Variant influenza virus hemagglutinin that induces fusion at elevated pH." *J. Virol.* **57**, 603-613
- Düzgünes, N., and Shavnin, S.A. (1992) "Membrane destabilization by N-terminal peptides of viral envelope proteins." *J. Membr. Biol.* **128**, 71-80

- Eisenberg, D., Weiss, R. M., Terwilliger, T. C., and Wilcox, W. (1982) "Hydrophobic moments and protein structure." *Faraday Symp. Chem. Soc.* **17**, 109-120
- Ellens, H., Bentz, J., Mason, D., Zhang, F., and White, J.M. (1990) "Fusion of influenza hemagglutinin-expressing fibroblasts with glycoprotein-bearing liposomes: Role of hemagglutinin surface density." *Biochemistry* **29**, 9697-9707
- Epand, R. M., Cheetham, J. J., Epand, R. F., Yeagle, P. L., Richardson, C. D., Rockwell, A., and DeGrado, W. F. (1992) "Peptide models for the membrane destabilizing actions of viral fusion proteins." *Biopolymers* **32**, 309-314
- Erne, D., Sargent, D.F., and Schwyzer, R. (1985) "Preferred conformation, orientation, and accumulation of dynorphin A-(1-13)-tridecapeptide on the surface of neutral lipid membranes." *Biochemistry* **24**, 4261-4263
- Flournoy, P. A., and Schaffers, W. J. (1966) "Attenuated total reflection spectra from surfaces of anisotropic, absorbing films." *Spectrochim. Acta* **22**, 5-13
- Fraser, R. D. B. (1953) "The interpretation of infrared dichroism in fibrous protein structures." *J. Chem. Phys.* **21**, 1511-1515
- Frey, S., and Tamm, L.K. (1991) "Orientation of melittin in phospholipid bilayers. A polarized attenuated total reflection infrared study." *Biophys. J.* **60**, 922-930
- Fringeli, U. P., Schadt, M., Rihak, P., and Günthard, Hs. H. (1976) "Hydrocarbon chain ordering in liquid crystals investigated by means of infrared attenuated total reflection (IR-ATR) spectroscopy." *Z. Naturforsch.* **31a**, 1098-1107
- Fringeli, U. P. (1977) "The structure of lipids and proteins studied by attenuated total reflection (ATR) infrared spectroscopy II. Oriented layers of a homologous series: Phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine." *Z. Naturforsch.* **32c**, 20-45
- Fringeli, U. P., and Fringeli, M. (1979) "Pore formation in lipid membranes by alamethicin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 3852-3856
- Fringeli, U. P. (1980) "Distribution and diffusion of alamethicin in a lecithin / water model membrane system." *J. Membrane Biol.* **54**, 203-212
- Fringeli, U. P. (1989). "Structure-activity relationship in biomembranes investigated

- by infrared-ATR spectroscopy." in *Biologically active molecules*, U. P. Schlunegger, ed., Springer-Verlag, Berlin, 241-252
- Gething, M.-J., Doms, R.W., York, D., and White, J. (1986) "Studies on the mechanism of membrane fusion: Site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus." *J. Cell Biol.* **102**, 11-23
- Gremlich, H.-U., Fringeli, U.-P., and Schwyzer, R. (1983) "Conformational changes of adrenocorticotropin peptides upon interaction with lipid membranes revealed by infrared attenuated total reflection spectroscopy." *Biochemistry* **22**, 4257-4264
- Hansen, W. N. (1967) "Electric fields produced by the propagation of plane coherent electromagnetic radiation in a stratified medium." *J. Opt. Soc. Am.* **58**, 380-390
- Harrick, N. J. (1965) "Electric field strengths at totally reflecting interfaces." *J. Opt. Soc. Am.* **55**, 851-857
- Harrick, N. J., and du Pré, F. K. (1966) "Effective thickness of bulk materials and of thin films for internal reflection spectroscopy." *Appl. Opt.* **5**, 1739-1743
- Harrick, N. J. (1967) in *Internal Reflection Spectroscopy*, Interscience Publishers, New York
- Harter, C., James, P., Bächli, T., Semenza, G., and Brunner, J. (1989) "Hydrophobic binding of the ectodomain of the influenza hemagglutinin to membranes occurs through the "fusion peptide" " *J. Biol. Chem.* **264**, 6459-6464
- Hauser, H., Pascher, I., Pearson, R. H., and Sundell, S. (1981) "Preferred conformation and molecular packing of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine." *Biochim. Biophys. Acta* **650**, 21-51
- Huang, C. (1969) "Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics." *Biochemistry* **8**, 344-352
- Kalb, E., Frey, S., and Tamm, L.K. (1992) "Formation of supported planar bilayers by fusion of vesicles to supported phospholipid monolayers." *Biochim. Biophys. Acta* **1103**, 307-316
- Kemble, G. W., Danieli, T., and White, J.M. (1994) "Lipid-anchored influenza hemagglutinin promotes hemifusion, not complete fusion." *Cell* **76**, 383-391

- Lear, J. D., and DeGrado, W.F. (1987) "Membrane binding and conformational properties of peptides representing the NH<sub>2</sub> terminus of influenza HA-2." *J. Biol. Chem.* **262**, 6500-6505
- Lee, S., Aoki, R., Oishi, O., Aoyagi, H., Yamasaki, N. (1992) "Effect of amphipathic peptides with different  $\alpha$ -helical contents on liposome-fusion." *Biochim. Biophys. Acta* **1103**, 157-162
- Lüneberg, J., Martin, I., Nübler, F., Ruyschaert, J.-M., and Herrmann, A. (1995) "Structure and topology of the influenza virus fusion peptide in lipid bilayers." *J. Biol. Chem.* **270**, 27606-27614
- Maeda, T., and Ohnishi, S. (1980) "Activation of influenza virus by acidic media causes hemolysis and fusion of erythrocytes." *FEBS Lett.* **122**, 283-287
- Maeda, T., Kawasaki, K., and Ohnishi, S. (1981) "Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 4133-4137
- Marcelja, S. (1974) "Chain ordering in liquid crystals II. Structure of bilayer membranes." *Biochim. Biophys. Acta* **367**, 165-176
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Mandieau, V., Nielsen, N.M., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., Ruyschaert, J.-M., and Vandenbranden, M. (1991) "Fusogenic activity of SIV (simian immunodeficiency virus) peptides located in the GP32 NH<sub>2</sub> terminal domain." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**, 872-879
- Martin, I., Dubois, M.-C., Saermark, T., Epand, R. M., and Ruyschaert, J.-M. (1993a) "Lysophosphatidylcholine mediates the mode of insertion of the NH<sub>2</sub>-terminal SIV fusion peptide into the lipid bilayer." *FEBS Lett.* **333**, 325-330
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R., and Ruyschaert, J.-M. (1993b) "Orientation and structure of the NH<sub>2</sub>-terminal HIV-1 gp41 peptide in fused and aggregated liposomes." *Biochim. Biophys. Acta* **1145**, 124-133
- Martin, I., Dubois, M.-C., Defrise-Quertain, F., Saermark, T., Burny, A., Brasseur, R., and Ruyschaert, J.-M. (1994) "Correlation between fusogenicity of synthetic

- modified peptides corresponding to the NH<sub>2</sub>-terminal extremity of simian immunodeficiency virus gp32 and their mode of insertion into the lipid bilayer: An infrared spectroscopy study." *J. Virol.* **68**, 1139-1148
- Matsuzaki, K., Murase, O., Tokuda, H., Funakoshi, S., Fujii, N., and Miyajima, K. (1994) "Orientational and aggregational states of magainin 2 in phospholipid bilayers." *Biochemistry* **33**, 3342-3349
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1995) "Translocation of a channel-forming antimicrobial peptide, magainin 2, across lipid bilayers by forming a pore." *Biochemistry* **34**, 6521-6526
- Merrifield, R. B., Vizioli, L. D., and Boman, H. G. (1982) "Synthesis of the antibacterial peptide cecropin A(1-33)." *Biochemistry* **21**, 5020-5031
- Mitchell, A. R., Erickson, B. W., Ryabstev, M. N., Hodges, R. S., and Merrifield, R. B. (1976) "tert-Butoxycarbonylaminoacyl-4-(oxymethyl)-phenylacetamidomethyl-resin, a more acid-resistant support for solid-phase peptide synthesis." *J. Am. Chem. Soc.* **98**, 7357-7362
- Moore, S., Spackman, D. H., and Stein, W. H. (1958) "Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins: An improved system." *Anal. Chem.* **30**, 1185-1190
- Morris, S. J., Sarkar, D.P., White, J.M., and Blumenthal, R. (1989) "Kinetics of pH-dependent fusion between 3T3 fibroblasts expressing influenza hemagglutinin and red blood cells. Measurement by dequenching of fluorescence." *J. Biol. Chem.* **264**, 3972-3978
- Muga, A., Neugebauer, W., Hiramata, T., and Surewicz, W.K. (1994) "Membrane interaction and conformational properties of the putative fusion peptide of PH-30, a protein active in sperm-egg fusion." *Biochemistry* **33**, 4444-4448
- Murata, M., Sugahara, Y., Takahashi, S., and Ohnishi, S. (1987a) "pH-dependent membrane fusion activity of a synthetic twenty amino acid peptide with the same sequence as that of the hydrophobic segment of influenza virus hemagglutinin." *J. Biochem.* **102**, 957-962

- Murata, M., Nagayama, K., and Ohnishi, S. (1987b) "Membrane fusion activity of succinylated melittin is triggered by protonation of its carboxyl groups." *Biochemistry* **26**, 4056-4062
- Murata, M., Takahashi, S., Kagiwada, S., Suzuki, A., and Ohnishi, S. (1992) "pH-dependent membrane fusion and vesiculation of phospholipid large unilamellar vesicles induced by amphiphilic anionic and cationic peptides." *Biochemistry* **31**, 1986-1992
- Murata, M., Takahashi, S., Shirai, Y., Kagiwada, S., Hishida, R., and Ohnishi, S. (1993) "Specificity of amphiphilic anionic peptides for fusion of phospholipid vesicles." *Biophys. J.* **64**, 724-734
- Nieva, J. L., Nir, S., Muga, A., Goni, F.M., and Wilschut, J. (1994) "Interaction of the HIV-1 fusion peptide with phospholipid vesicles: Different structural requirements for fusion and leakage." *Biochemistry* **33**, 3201-3209
- Parente, R. A., Nir, S., and Szoka, F.C. (1988) "pH-dependent fusion of phosphatidylcholine small vesicles. Induction by a synthetic amphipathic peptide." *J. Biol. Chem.* **263**, 4724-4730
- Pastrana, B., Mautone, A.J., and Mendelsohn, R. (1991) "Fourier transform infrared studies of secondary structure and orientation of pulmonary surfactant SP-C and its effect on the dynamic surface properties of phospholipids." *Biochemistry* **30**, 10058-10064
- Rafalski, M., Ortiz, A., Rockwell, A., Van Ginkel, L.C., Lear, J.D., DeGrado, W.F., and Wilschut, J. (1991) "Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: Interaction of HA2 N-terminal peptides with phospholipid vesicles." *Biochemistry* **30**, 10211-10220
- Rapaport, D., and Shai, Y. (1994) "Interaction of fluorescently labeled analogues of the amino-terminal fusion peptide of Sendai virus with phospholipid membranes." *J. Biol. Chem.* **269**, 15124-15131
- Rothschild, K. J., and Clark, N. A. (1979) "Polarized infrared spectroscopy of oriented purple membrane." *Biophys. J.* **25**, 473-488

- Ruigrok, R. W. H., Wrigley, N.G., Calder, L.J., Cusack, S., Wharton, S.A., Brown, E.B., and Skehel, J.J. (1986) "Electron microscopy of the low pH structure of influenza virus haemagglutinin." *EMBO J.* **5**, 41-49
- Sarkar, D. P., Morris, S.J., Eidelman, O., Zimmerberg, J., and Blumenthal, R. (1989) "Initial stages of influenza hemagglutinin-induced cell fusion monitored simultaneously by two fluorescent events: Cytoplasmic continuity and lipid mixing." *J. Cell Biol.* **109**, 113-122
- Sauter, N. K., Hanson, J.E., Glick, G.D., Brown, J.H., Crowther, R.L., Park, S.-J., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1992) "Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: Analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography." *Biochemistry* **31**, 9609-9621
- Schwyzler, R. (1986) "Estimated conformation, orientation, and accumulation of dynorphin A-(1-13)-tridecapeptide on the surface of neutral lipid membranes." *Biochemistry* **25**, 4281-4286
- Seelig, A., and Seelig, J. (1977) "Effect of a single cis double bond on the structure of a phospholipid bilayer." *Biochemistry* **16**, 45-50
- Siegel, D. P. (1993) "Energetics of intermediates in membrane fusion: Comparison of stalk and inverted micellar intermediate mechanisms." *Biophys. J.* **65**, 2124-2140
- Skehel, J. J., Bayley, P.M., Brown, E.B., Martin, S.R., Waterfield, M.D., White, J.M., Wilson, I.A., and Wiley, D.C. (1982) "Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 968-972
- Smith, S. O., Jonas, R., Braiman, M., and Bormann, B.J. (1994) "Structure and orientation of the transmembrane domain of glycophorin A in lipid bilayers." *Biochemistry* **33**, 6334-6341
- Smith, R., Separovic, F., Milne, T.J., Whittaker, A., Bennett, F.M., Cornell, B.A., and Makriyannis, A. (1994) "Structure and orientation of the pore-forming peptide, melittin, in lipid bilayers." *J. Mol. Biol.* **241**, 456-466

- Spackman, D. H., Stein, W. H., and Moore, S. (1958) "Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids." *Anal. Chem.* **30**, 1190-1206
- Spruce, A. E., Iwata, A., White, J.M., and Almers, W. (1989) "Patch clamp studies of single cell-fusion events mediated by a viral fusion protein." *Nature* **342**, 555-558
- Spruce, A. E., Iwata, A., and Almers, W. (1991) "The first milliseconds of the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during membrane fusion." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3623-3627
- Stegmann, T., Doms, R.W., and Helenius, A. (1989) "Protein-mediated membrane fusion." *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **18**, 187-211
- Stegmann, T., White, J.M., and Helenius, A. (1990) "Intermediates in influenza induced membrane fusion." *EMBO J.* **9**, 4231-4241
- Stegmann, T., Delfino, J.M., Richards, F.M., and Helenius, A. (1991) "The HA2 subunit of influenza hemagglutinin inserts into the target membrane prior to fusion." *J. Biol. Chem.* **266**, 18404-18410
- Stegmann, T. (1993) "Influenza hemagglutinin-mediated membrane fusion does not involve inverted phase lipid intermediates." *J. Biol. Chem.* **268**, 1715-1722
- Takahashi, S. (1978) "Sodium borohydride as a reducing agent for preparing ninhydrin reagent for amino acid analysis." *J. Biochem.* **83**, 57-60
- Takahashi, S. (1990) "Conformation of membrane fusion-active 20-residue peptides with or without lipid bilayers. Implication of  $\alpha$ -helix formation for membrane fusion." *Biochemistry* **29**, 6257-6264
- Tam, J. P., Heath, W. F., and Merrifield, R. B. (1986) "Mechanisms for the removal of benzyl protecting groups in synthetic peptides by trifluoromethanesulfonic acid-trifluoroacetic acid-dimethyl sulfide." *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 5242-5251
- Tatulian, S. A., Jones, L. R., Reddy, L. G., Stokes, D. L., and Tamm, L. K. (1995) "Secondary structure and orientation of phospholamban reconstituted in supported bilayers from polarized attenuated total reflection FTIR spectroscopy." *Biochemistry* **34**, 4448-4456
- Vandenbussche, G., Clercx, A., Clercx, M., Curstedt, T., Johansson, J., Jörnvall, H.,

- and Ruyschaert, J.-M. (1992) "Secondary structure and orientation of the surfactant protein SP-B in a lipid environment. A Fourier transform infrared spectroscopy study." *Biochemistry* **31**, 9169-9176
- Vogel, H. (1987) "Comparison of the conformation and orientation of alamethicin and melittin in lipid membranes." *Biochemistry* **26**, 4562-4572
- Weaver, A. J., Kemple, M. D., Brauner, J. W., Mendelsohn, R., and Prendergast, F. G. (1992) "Fluorescence, CD, Attenuated total reflectance (ATR) FTIR, and <sup>13</sup>C NMR characterization of the structure and dynamics of synthetic melittin and melittin analogues in lipid environments." *Biochemistry* **31**, 1301-1313
- Weis, W., Brown, J.H., Cusack, S., Paulson, J.C., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1988) "Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid." *Nature* **333**, 426-431
- Wharton, S. A., Ruigrok, R.W.H., Martin, S.R., Skehel, J.J., Bayley, P.M., Weis, W., and Wiley, D.C. (1988a) "Conformational aspects of the acid-induced fusion mechanism of influenza virus hemagglutinin. Circular dichroism and fluorescence studies." *J. Biol. Chem.* **263**, 4474-4480
- Wharton, S. A., Martin, S.R., Ruigrok, R.W.H., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1988b) "Membrane fusion by peptide analogues of influenza virus hemagglutinin." *J. Gen. Virol.* **69**, 1847-1857
- White, J., Kielian, M., and Helenius, A. (1983) "Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses." *Quart. Rev. Biophys.* **16**, 151-195
- White, J. M., and Wilson, I.A. (1987) "Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: Low-pH activation of the influenza virus hemagglutinin." *J. Cell. Biol.* **105**, 2887-2896
- White, J. M. (1992) "Membrane fusion." *Science* **258**, 917-924
- Wilson, I. A., Skehel, J.J., and Wiley, D.C. (1981) "Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution." *Nature* **289**, 366-373
- Zhang, Y.-P., Lewis, R. N. A. H., Henry, G. D., Sykes, B. D., Hodges, R. S., and McElhaney, R. N. (1995) "Peptide models of helical hydrophobic transmembrane

segments of membrane proteins. 1. Studies of the conformation, intrabilayer orientation, and amide hydrogen exchangeability of Ac-K<sub>2</sub>-(LA)<sub>12</sub>-K<sub>2</sub>-amide.”

*Biochemistry* **34**, 2348-2361

Zimmerberg, J., Vogel, S.S., and Chernomordik, L.V. (1993) “Mechanisms of membrane fusion.” *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**, 433-466