



人工設計 α ヘリックス型ペプチドナノファイバーの 構造および熱力学解析

黒川, 南

(Degree)

博士 (理学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Date of Publication)

2025-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8852号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100490077>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

人工設計 α ヘリックス型ペプチドナノ
ファイバーの構造および熱力学解析

令和 6 年 1 月

神戸大学大学院理学研究科

黒川 南

1. はじめに

自然界において、多くのタンパク質が特定の集合体を形成することで、その機能を発揮する。特に、ケラチンやフィブリンなどは繊維状の形態に自己集合し、それによって機能を発揮している[1-4]。これらの天然の繊維状タンパク質は、主に α ヘリックス構造または β シート構造を基本骨格としていることが知られている。このような天然の繊維状タンパク質が示す自己集合システムに着想を得て、タンパク質やペプチドの構造を制御することで、所望の構造や機能を持つ人工設計ペプチドファイバーを開発できる可能性がある[5-7]。このアプローチはボトムアップ型であり、トップダウン型のアプローチでは難しい、より複雑で高度な構造や機能をもつファイバー材料の創製が可能となる[8-10]。さらに、タンパク質は生分解性の高分子であり、地球環境や生物に与える影響が少ないという利点も有している[11-13]。以上の背景から、タンパク質やペプチドを用いた自己集合性材料の開発が盛んに行われており、近年ではナノバイオテクノロジーの新たな研究分野として注目を集めている[14-17]。ペプチドを用いてファイバー構造を創製する研究例について、特に二次構造に焦点を当てると、 α ヘリックス構造をとる分子からなる α ヘリックス型ファイバーや、 β シート構造をとる分子からなる β シート型ファイバーや、そのほか環状分子からなるものなどが多様に存在するが[18-22]、なかでも β シート型ファイバーに関する研究が最多となっており[23-26]、 α ヘリックス型ファイバーに関する研究は数としてはあまり多くない。このような背景状況の根底には、 α ヘリックス型ファイバーを形成する際にヘリックス分子の側鎖が特異的に相互作用するのに対し、

β シート型ファイバーを形成する際には分子間の相互作用がより非特異的かつ多様であり、より多様な β シート型ファイバーが存在するためであると考えられる [27]。 α ヘリックス型ペプチドファイバーについては、報告例の数はあまり多くないが、 α ヘリカルバレル構造やクロス α 構造などの人工設計した α ヘリックス構造を構成単位として、 α ヘリックス型ファイバーを形成させる試みや、ドラッグデリバリーシステムの担体機能を付与する試みなどが報告されており [28-30]、応用が期待されている。さらに、 α ヘリックス型ファイバーは分子間の解離会合の制御がより容易で、ファイバーの長さを制御することも可能であり、ラテラル方向への相互作用を制御することも可能であるというアドバンテージを有しており、 β シート型ファイバーよりも有用な素材であると指摘されている [30]。このように α ヘリックス型ファイバーは様々な有用可能性を内包しており、その物理的性質を詳細に調べることで、 α ヘリックス型ファイバー材料に対する洞察をさらに深めることが可能であると考えられる。しかし、従来の α ヘリックス型ファイバーを対象とした研究においては、ペプチド分子により形成されるファイバー集合体の形態観察や、ファイバーを形成する単位構造を調べることに焦点が当てられおり、それらの熱安定性や状態変化といった物理的性質に関する詳細な研究は十分に行われてこなかった。そこで本研究において、 α ヘリックス型ファイバーを形成し得る種々の人工設計ペプチドを作成し、熱安定性や状態変化を詳細に調べる研究を行うこととした。ペプチドの設計においては、7 個のアミノ酸 LETLAKA が 3 回繰り返された 21 残基のアミノ酸からなり、水溶性の α ヘリックス型ファイバーを形成することが知られている $\alpha 3$ ペプチド [31] に着目した。 $\alpha 3$ ペプチドについては、そのファイバー化のメカニズムについても研究されており、分子がヘリックス構造をとって疎水性表面を隠すよ

うに 4 量体ユニットを形成し、そのユニットが束（バンドル）化することによって繊維が伸長すると推定されている [31, 32]。また、N 末端から C 末端までのアミノ酸配列が $\alpha 3$ と逆になっているペプチド r3 も報告されており、注目すべきことに、r3 ペプチドが形成するファイバーは $\alpha 3$ ペプチドのそれよりも高いヘリックス構造形成能を示し、より長いファイバーを形成した [33]。通常、ヘリックス分子は helix dipole を緩和するほどに安定化されるので [34-38]、N 末端付近に負に帯電したグルタミン酸、C 末端付近に正に帯電したリジンを持つ $\alpha 3$ 分子は、r3 分子よりも高いヘリックス安定性を示すと予想される。従って、r3 分子から形成される繊維の安定性も、 $\alpha 3$ 分子から形成される繊維の安定性よりも低くなると予想される。しかしながら、この予想に反して、r3 ペプチドで形成された繊維のヘリックス安定性は $\alpha 3$ ペプチドのそれよりも向上したのである。この現象の原因について、 $\alpha 3$ および r3 を創製した Kojima らは、helix dipole に基づく "magnetic interaction" によるものであると帰結している [33]。以上の $\alpha 3$ （本論文では $\alpha 3CF$ に相当）および r3（本論文では r3CF に相当）の配列を基に本研究で新たに作成した 6 つの変異体を含む、全 8 種のペプチドのアミノ酸配列を Table 1 に示す。

Table 1. 本研究でもちいた 8 つのペプチド変異体のアミノ酸配列.

Peptide	N 末端	Sequence	C 末端
Heptad repeat	A b c d e f g a b c d e f g a b c d e f g		
$\alpha 3CF^*$	$H_3N^+-L E T L A K A L E T L A K A L E T L A K A-COO^-$		
r3CF*	$H_3N^+-A K A L T E L A K A L T E L A K A L T E L-COO^-$		
HDM3CF	$H_3N^+-L E T L A K A L E H L A H A L E T L A K A-COO^-$		
rHDM3CF	$H_3N^+-A K A L T E L A H A L H E L A K A L T E L-COO^-$		

α 3CB	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{L E T L A K A L E T L A K A L E T L A K A}-\text{CONH}_2$
r3CB	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{A K A L T E L A K A L T E L A K A L T E L}-\text{CONH}_2$
HDM3CB	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{L E T L A K A L E H L A H A L E T L A K A}-\text{CONH}_2$
rHDM3CB	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{A K A L T E L A H A L H E L A K A L T E L}-\text{CONH}_2$

* これらはそれぞれ、遺伝子工学手法で生合成された α 3 および r3 と同一である [31, 33]。

新たに設計した 6 つの変異体は、1) 負電荷を潰して helix dipole を緩和させるために C 末端をアミド修飾する、2) 電荷状態を変化させることによりヘリックス分子間の相互作用を制御ができる可能性があるとして、中性 pH 付近で荷電状態が変化する His 残基を導入する、および 3) α 3 と比べて r3 の安定性が向上したという先行例に倣ってアミノ酸配列を反転させる、という 3 つの方針を適宜取り込むことにより開発した。なお、His 残基の導入位置は、ヘリックス形成後に親水性表面で立体的に隣接する場所とし、金属結合能の獲得とそれによる熱安定性のさらなる向上を期待したものであったが、実際には金属と混合すると粒子状の凝集体を生成したため、以後金属添加は行わなかった。また、C 末端のアミド修飾がないものを CF ペプチド、C 末端のアミド修飾があるものを CB ペプチドと命名した。さらに、 α 3CF のアミノ酸配列を N 末端から C 末端に反転させたペプチドをリバースペプチドと呼び、ペプチド名の頭に “r ”を付けた。

以上のペプチド変異体を用いて、熱測定手法、分光学的手法、形態学的手法を組み合わせ、状態変化を詳細に調べた。その結果、円偏光二色性スペクトルの温度依存性と示差走査熱量測定から、CB ペプチドは CF ペプチドに比べて耐熱性が最大 50 °C も向上し、熱変性温度が 130 °C にまで迫るものがあることが分かった。これは生体高分子としては例外的に高い温度である。また、熱力学解析と顕微鏡観察から、CB

ペプチドは液晶の相転移に似た熱転移を起こすこともわかった。さらに、このうち CB ペプチドのひとつについては、25 °C 付近で非常に小さいエンタルピー変化で急に相転移を起こす、“giga-bundle burst” ともいえる現象が見られた。これらの現象はペプチドが示す物性としては極めて珍しいものであり、その分子論的な根源を明らかにすることを試みた。

2. 実験方法

2.1 サンプル調製

ペプチドはPioneer Peptide Synthesis System (PerSeptive Biosystems, CA, USA) で Fmoc 固相化学反応を利用して合成した。この合成法では、不溶性の樹脂担体（レジジン）を開始点として、C 末端から N 末端へと順次アミノ酸を縮合重合させていく。合成後、82.5 % (v/v) TFA、5 % チオアニソール、2.5 % 1,2-エタンジチオール、0.8 M フェノールを含む溶液で樹脂からペプチドを切断した。精製は、0.1% TFA を含むアセトニトリル-水溶媒系の逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で行った。HPLC 精製の条件を以下の Table 2 に記す。

Table 2. HPLC 精製条件.

injection volume	20.00 μ L		
flow rate	1.0 ml/min		
wave length	220 nm		
column	SunFire C 18 5 μ m 4.6 $\times$ 150 mm		
solvent	A: H ₂ O in 0.1 % TFA, B: ACN in 0.1 % TFA		
gradient	min	%A	%B
	0	80	20
	20	10	90

精製後のペプチドの同定は、AXIMA-CFR (Shimadzu) を用いて、レーザー脱離飛行時間型質量分析により行った。次に、適量のペプチド粉末を秤量し、超純水 (Merck Millipore) に溶解して 800 μ M のペプチドストック溶液を調製した。以下のすべて

の実験において、このストック溶液を希釈することにより、20 mM pH 7.4 リン酸緩衝液中のペプチド濃度が 100 μ M になるようにサンプル溶液を調整した。pH 測定には pH メーター F-71 (HORIBA) を使用した。以降の実験では、どのサンプルにおいても濁りや沈殿は観察されなかった。

2.2 円偏光二色性 (CD) 分光法

Jasco J-720 spectropolarimeter (Tokyo, Japan) および光路長 1.0 mm の石英セルを用いて、CD スペクトルを取得した。測定波長 190–250 nm、データ取得間隔 0.2 nm、スキャン速度 100 nm/min、レスポンス時間 2 秒、バンド幅 1.0 nm で 8 回のスキャンを行った。測定結果を用いて、式(1)によりペプチドの平均残基モル橢円率 $[\theta]$ ($\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$) を、式(2)により定義されるヘリックス構造含有率 (以下、*helicity* (%) と呼ぶ) [39] を、式(3)によりコイルドコイルの指標として $[\theta_{222}]$: $[\theta_{208}]$ の比を、ヘリックスコイルドコイル構造の形成度 (以下、*coiled-coil indicator* と呼ぶ) を以下のように算出した。ここで、コイルドコイルとは、タンパク質の構造モチーフの 1 つで、2 つ以上の α ヘリックス分子が会合した構造をいう。

$$[\theta] = \frac{0.1 \times ([\theta_{\text{sample}}] - [\theta_{\text{base}}])}{c \cdot l} \times \frac{1}{n} \quad (1)$$

$$\text{helicity (\%)} = \frac{-([\theta_{222}] + 2340)}{30300} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{coiled-coil indicator} = \frac{[\theta_{222}]}{[\theta_{208}]} \quad (3)$$

また、 $[\theta_{\text{sample}}]$ はペプチドサンプル溶液の測定により得られた楕円率 (mdeg)、 $[\theta_{\text{base}}]$ はそのサンプルに対応するベース溶液の測定により得られた楕円率 (mdeg)、 c はペプチドの濃度 (M)、 l は光路長 (cm)、 n はペプチドの残基数、 $[\theta_{222}]$ および $[\theta_{208}]$ はそれぞれ 222 nm および 208 nm の平均残基モル楕円率である。ここで、ヘリックスバンドル（ヘリックス分子が会合して束になること）の形成に伴って 208 nm の平均モル楕円率は減少し、222 nm の平均モル楕円率は増加することが知られている。したがって、coiled-coil indicator を、ヘリックス分子間の会合の程度を示す数値指標として用いることができる。coiled-coil indicator の値が 1 より大きいと、バンドルの形成が促進されていることを示す[40-42]。

温度変化実験では、温度制御にペルチェ式恒温キュベットホルダー（PTC-348W；Jasco 社製）を用いた。基本的に、試料の温度は 60 °C/hr の温度勾配で変化させ、0 °C から 95 °C まで 5 °C ごとにスペクトルを測定する実験を行った。熱平衡に達するのに十分に待ち、各温度変化の 60 秒後に測定を開始した。さらに、固定波長 222 nm で測定した楕円率 $[\theta_{222}]$ を、0-95 °C の温度範囲で 1 °C ごとに追跡した。得られた熱転移曲線のカーブフィッティングでは、熱容量変化を伴わない 3 状態または 4 状態の平衡反応を仮定して解析を行った。解析には、ソフトウェア Igor Pro (WaveMetrics) を用いた。解析の詳細は、3.1 章で詳しく説明する。

また、温度変化実験で得られた 5 °C 刻みの 20 個のスペクトルセット（測定波長範囲：190-250 nm）について、式(4)に従って特異値分解（SVD）分析を行った[43]。これにより、温度上昇によって引き起こされる構造変化の経路の描像を得た。

$$M = U W V^T \quad (4)$$

ここで、CD スペクトルを 190–250 nm の波長域において間隔 0.2 nm でデータを取得していることから、 M (元データ)、 U (左特異行列)、 W (特異値行列)、 V^T (右特異行列) はそれぞれ 301×20 行列、 301×301 行列、 301×20 行列、 20×20 行列である。物理的な意味としては、 U の列が M を構成する主成分行列であり、それら行列の重みが W の対角成分によって記述され、 V^T の行が主成分行列の比率が温度変化する様子を表すものとして解釈できる。実際の解析は、CD スペクトルの元データ (301×20 行列) を対象に、ソフトウェア Igor Pro (WaveMetrics) を用いて、以下のコマンドを実行することにより行った。

```
*make/o/n=(301,20) heat_denaturation
```

```
*matrixsvd heat_denaturation
```

2.3 示差走査熱量測定 (DSC)

VP-DSC Micro Calorimeter (Microcal)を用いて、2 気圧 (29.4 psi) の圧力下で、0–120 °C または 0–130 °C の温度範囲で熱容量の温度変化を追跡した。信頼できるデータを得るために、測定は少なくとも 4 回繰り返した。昇温速度は 60, 15, 30, 90 °C min⁻¹ とした。サンプル溶液と緩衝液 (pH 7.4 リン酸緩衝液) は、25 °C で 5 分間、真空チャンバー内で脱気した後、サンプルセルとリファレンスセル (容量 ~0.52 mL) にそれぞれ注意深くロードした。サンプルセルとリファレンスセルの両方に緩衝液を入れて測定したバックグラウンドスキャンを、サンプル溶液と緩衝液のスキャンから差し引いた。サンプル溶液全体に対応する見かけの熱容量を、ORIGIN ソフトウェア (Microcal Inc.) を使用して記録した。DSC サーモグラムの解

析は、ソフトウェア Igor Pro (WaveMetrics) を用いて、 $N \rightleftharpoons D$ の 2 状態反応を仮定したカーブフィッティングを行った。解析の詳細は、3.3 章で詳しく説明する。

2.4 Atomic Force Microscopy (AFM)

原子間力顕微鏡 SPM-9700 (Shimadzu) および SPM-Sensor NCHR-20 (Nanoworld Innovation Technology) プローブを用いて、ペプチド会合体の形態を調べた。試料溶液の 5 μ L アリコートをし、劈開したばかりのマイカ基盤表面に固定し、特定の温度 (10–95 $^{\circ}$ C) で 5 分間放置した後、100 μ L の超純水で 3 回洗浄したのち窒素ガスで穏やかに乾燥させ、ダイナミックモードで観察した。すべての AFM 画像は 512 $\times$ 512 pixel の解像度で収集した。試料溶液の温度制御は、1.5 mL のマイクロチューブ (Watson) に 100 μ L の試料溶液を入れ、ブロックインキュベーター (ASTEL) を用いて行った。サンプリングから試料の乾燥まで、高温を含むすべての試料調製操作を一定温度で行うために、サンプルをブロックインキュベーター内で所定の温度まで昇温 (60 $^{\circ}$ C/hr) した後、所定の温度に保たれた恒温ブロックを備えた精密インキュベーター (SANYO DENKI, 保温性を高めるために耐熱カーテンを取り付けた) 内に試料溶液を移し、マイクロチューブから試料溶液を瞬時に取り出して所定の温度に保たれたマイカの上に置くという操作を行った。精密インキュベーター内の温度は、-20 $^{\circ}$ C から 200 $^{\circ}$ C の範囲を測定可能な水銀温度計 (Andokeiki) を用いてモニターした。得られた画像の 1 枚につき少なくとも 20 箇所をサンプリングし、繊維の高さ (繊維が円筒形の場合、直径に相当する) を、ソフトウェア SPM_Mgr (Shimadzu) を用いて推定した。

2.5 偏光顕微鏡観察

AFM 観察に加えて、昇温過程に伴うペプチドファイバーの形態変化を偏光光学顕微鏡で観察した。偏光光学顕微鏡は、2 枚の偏光板を備えている。直線偏光を試料に入射させると、偏光状態の変化が光の明るさや色として観察される。偏光状態の変化は、結晶構造の分子配向と光学異方性の変化を反映するため、ポリマーの内部構造の情報を得ることができる[44, 45]。例えば、観察対象の分子が強く配向している場合、偏光は複屈折や光学異方性を引き起こす。しかし、観測される物質の分子の並びが不規則であるか等方的な状態であれば、複屈折は起こらず、光学的異方性は示されない。したがって、複屈折の有無を調べることで、分子配向や結晶構造の有無を判断できる。また、偏光顕微鏡と温度制御装置とを組み合わせることで、相転移挙動を観察することができる。実際に、相転移挙動を検出し観察するために、2 つの直交した偏光フィルターを備えた偏光顕微鏡 (Nikon) を使用して観察を行った。このとき、鋭敏色板 (530 nm, Nikon) 、倍率 4 倍の対物レンズ、倍率 10 倍の接眼レンズを用いた。温度は、温度コントローラー (Linkam Scientific) によって制御し、昇温速度を 60 °C/hr に設定した。目標温度に達した瞬間に、DS-Fi2 および DS-L3 デジタル顕微鏡カメラ (Nikon) を使用して、観察視野を JPG 形式の画像で撮影した。観察試料は、20 μ L の試料溶液を 75 % (v/v) のエタノールで洗浄したスライドガラス (AS ONE) に置き、カバーガラス (AS ONE) で覆った後、耐熱ボンド (CEMEDINE) を使用してカバーガラスの周りを密閉することにより作成した。観察温度範囲は 10 °C から 90 °C までとした。

2.6 Helix dipole と疎水モーメントの計算

ヘリックス分子は、1/2 の正電荷を N 末端に、1/2 の負電荷を C 末端に配置したマクロなダイポールをもつと考えることができる。本研究では、ヘリックス分子全体がもつ双極子モーメント (helix dipole moment) を、Protein Dipole Moments Server [46]を用いて計算した。また、ヘリックス分子の両親媒性の高さを表す疎水モーメントの算出については、 α ヘリカルペプチドの両親媒性を決定する典型的な方法として、Eisenberg の式に Wimley-White scale のような経験値を適用する方法 [47, 48]、あるいは HeliQuest ソフトウェア [49, 50]を使用する方法があるが、これらの方法においてはヘリカルホイール (2 次元平面投影) に基づいて疎水モーメントを計算するため、3 次元的な構造は考慮されない。さらに、多くの手法では N 末端や C 末端の電荷状態を考慮していない。そこで本研究では、これらの欠点を克服する指標として 3D-HM (3 次元疎水モーメントベクトル) [51]を用いて、両親媒性を定量化した。この方法は、任意の形状の分子について、すべての親水性領域と疎水性領域の表面分布を評価することにより、分子の疎水モーメントを 3 次元のベクトルとして算出することが可能である。3D-HM アプリケーションを使用する際は、アミノ酸配列、N 末端と C 末端の荷電の有無、溶液の pH (pH 7.4)を指定した。可視化ツールとしては、VDM プログラムを使用した[52]。

3. 結果と考察

3.1 α ヘリカルファイバーの形態および熱測定実験から決定した相区分

Figure 1 は、10 °Cで固定したサンプルを AFM で観察した結果である。ペプチドの長さや幅にはばらつきがあるが、この温度ではすべてのペプチドがファイバー形態を示した。一方、ペプチド粉末を超純水に溶かして得たストック溶液 (pH 3.5) では、AFM 観察でファイバーは観察されなかった。従って、リン酸緩衝液 (20 mM、pH 7.4) 中で希釈調整することで、瞬時にファイバーが形成されたと考えられる。なお、His を含むペプチドでは、His の正電荷による静電反発のためと思われるが、pH 6.0 ではファイバーは観察されなかった (Figure S1)。そのため、このような電荷反発を避けるために pH を 7.4 に設定することとした。ここで、Figure 2 に示した 5–10 °Cおきの CD スペクトルは、すべてのペプチドについて 208 nm と 222 nm にピークを持つ α ヘリックス構造に特徴的なスペクトルを示しており [53]、Figure 1 に示したファイバーがすべて α ヘリックスファイバーであることを示唆している。CF ペプチドファイバー (Figure 1 の上段) と CB ペプチドファイバー (Figure 1 の下段) を比較すると、CB ペプチドではファイバー形成が大きく促進されていることがわかる。

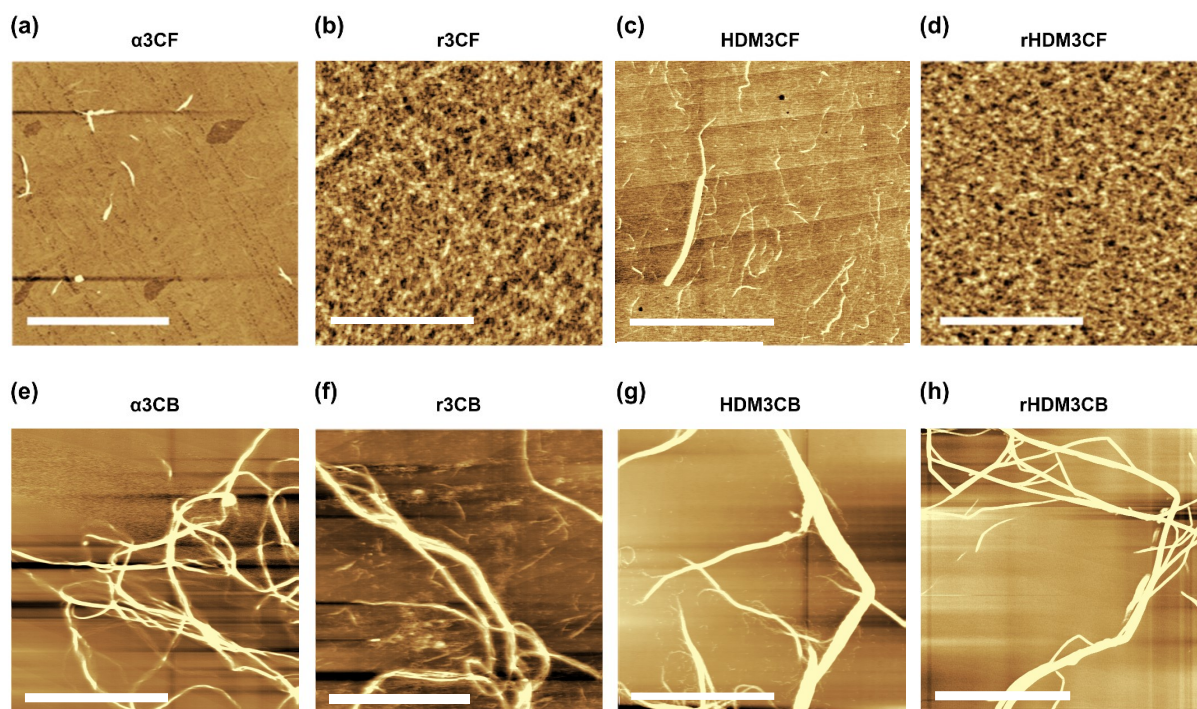


Figure 1. 10 °Cにおける各ペプチドの AFM 画像 (scale bar is 5.0 μm). (a) α 3CF, (b) r3CF, (c) HDM3CF, (d) rHDM3CF, (e) α 3CB, (f) r3CB, (g) HDM3CB, (h) rHDM3CB. AFM 画像から得られたファイバーの高さ (nm) は以下の通りであった ($n = 20$) : (a) 3.6 ± 0.7 , (b) N/A, (c) 2.9 ± 1.2 , (d) N/A, (e) 12.0 ± 4.1 , (f) 6.9 ± 2.2 , (g) 29.8 ± 19.5 , (h) 8.8 ± 4.2 .

全 8 種のペプチドの構造安定性を、0-95 °C の温度範囲で CD スペクトルを測定することによって調べた。スペクトルの一部を Figure 2 に示すが、 α ヘリックス構造に特徴的な波長でのスペクトル強度が温度の上昇とともに減少することがわかる。ここで、95 °C におけるヘリシティの値が 20 % 以下であればタンパク質が完全に変性していると思わせることから [54]、8 つのペプチドのうち r3CB と rHDM3CB を除く 6 つのペプチドについては、95 °C に達するまでに変性が完了していることがわかった。

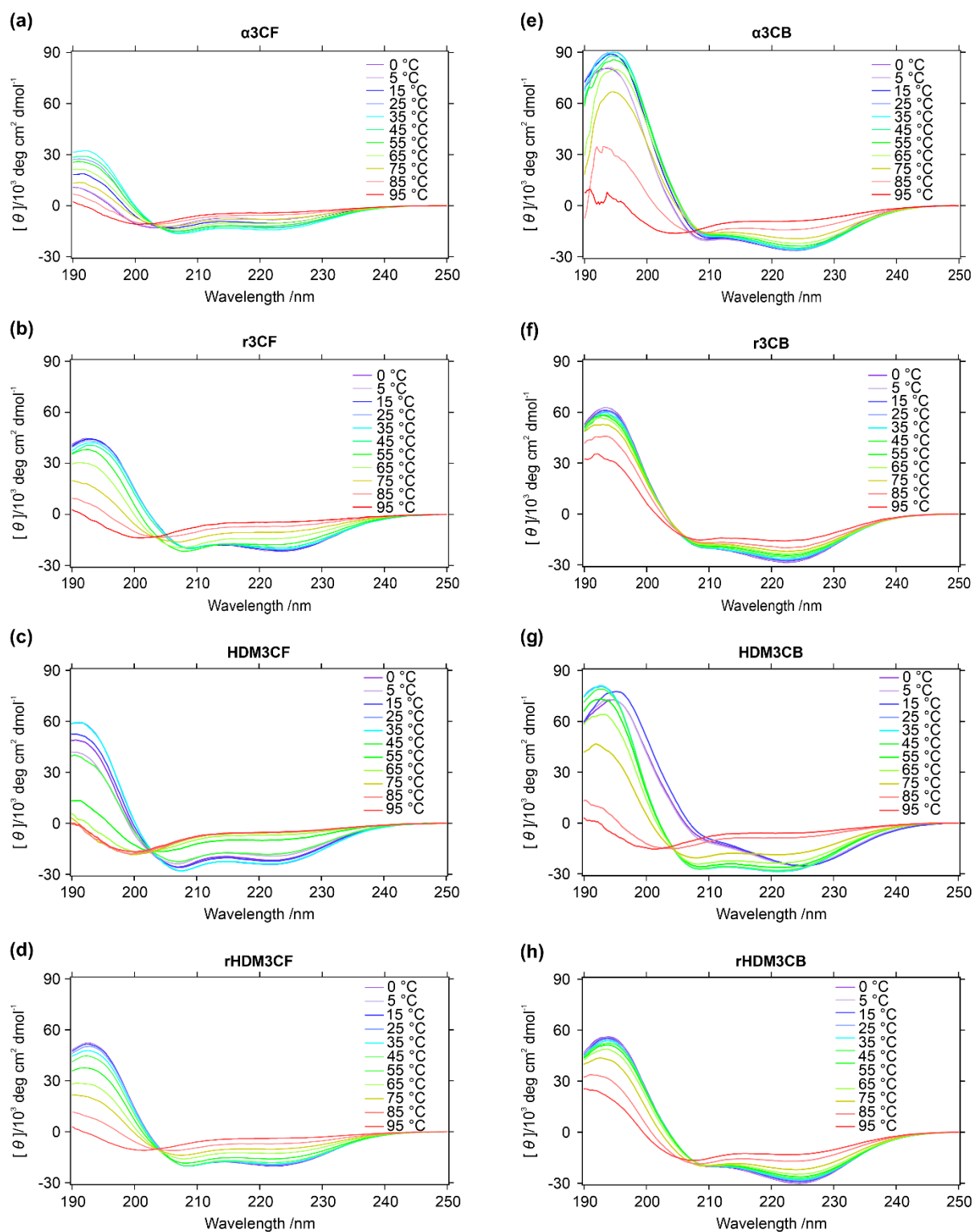
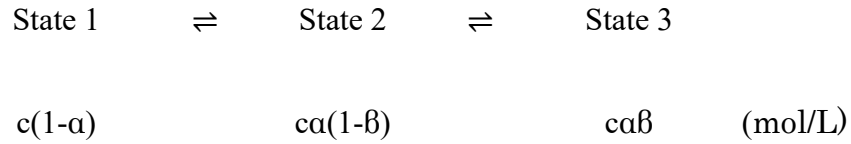


Figure 2. 0–95 °Cの温度変化（昇温速度：60 °C/hr）中、5–10 °C間隔で測定した各ペプチドの CD スペクトル. (a) $\alpha 3\text{CF}$, (b) $r3\text{CF}$, (c) $\text{HDM}3\text{CF}$, (d) $r\text{HDM}3\text{CF}$, (e) $\alpha 3\text{CB}$, (f) $r3\text{CB}$, (g) $\text{HDM}3\text{CB}$, (h) $r\text{HDM}3\text{CB}$.

変性完了が認められた 6 つのペプチドの 20 セットのスペクトルに対して SVD (特異値分解) 分析を行い、昇温に伴う構造変化に関する描像を得た。ここで、累積寄与率が 0.95 以上となる 3 成分目までを主要な特異ベクトルとした (Figure S2)。右特異行列の最初の行 (SV1)、2 番目の行 (SV2)、および 3 番目の行 (SV3) のスコアをプロットして、3 次元グラフを作成した (Figure S3)。また、Figure S4 に、温度変化が最も顕著な切断面を示した。Figure S3 と Figure S4 のプロットの軌跡から、6 つすべてのペプチドで類似した U 字型の変化をたどり、少なくとも 3 つの状態を経る熱転移を起こすことが示唆された[55]。これを踏まえ、3 つ以上の状態を仮定し、1 °C ごとに記録した $[\theta_{222}]$ (昇温速度 60 °C/hr) に対して、平衡論に基づいた熱力学解析を試みた。なお、Figure S5 に示す通り、熱変性反応が可逆的であることを実験的に確認している。解析の詳細を以下に記す。この解析においては、222 nm における平均モル橢円率が最小となる温度を、Native 状態が 100 % 存在する状態と見なしている。ここでは、わかりやすさのため、昇温開始温度の 0 °C において 222 nm における平均モル橢円率が最小である r3CF を例に取り上げる。このペプチドにおいては、0-95 °C において 3 つの相区分が存在すると仮定して解析を行った。なお、4 つの相区分を仮定した解析においても、フィッティングパラメータの数は増加するが、解析の手順は同様である。はじめに、0-95 °C の温度範囲で平衡にある 3 状態を、以下のようにそれぞれ State i ($i=1-3$) と表現することとする。ここでは、会合体が何量体で形成されているかまでは考慮せず、マクロな状態としての変化のみを追うこととする。また、State 1 を 100 % Native 状態とし、State 3 を 100 % Denatured 状態と見なす。さらに、State 1 の初濃度 (mol/L) を c とし、1-2 状態目の変化と、2-3 状態目の変化における解離度を表すパラメータおよび平衡定数をそ

れぞれ、 α と K_1 、 β と K_2 とする。各状態にある分子種の濃度を表すと、解離度 α および β を用いて以下のように書くことができる。



ここで、 i ($=1-3$) 番目の状態のみが存在する場合にそれぞれ示す 222 nm における平均残基モル橢円率を $[\theta_{222}]_i$ とし、 i ($=1-3$) 番目の状態にある分子種の存在割合を f_i と定義すれば、解析の対象とする $[\theta_{222}]-T$ グラフの縦軸の値 ($[\theta_{222}]$) は式 (5) のように表せる。

$$[\theta_{222}] = [\theta_{222}]_1 \times f_1 + [\theta_{222}]_2 \times f_2 + [\theta_{222}]_3 \times f_3 \quad (5)$$

また、式 (5) 中にある f_i ($i=1-3$) は、式 (6)–(8) のように書くことができる。

$$f_1 = 1-\alpha \quad (6)$$

$$f_2 = \alpha(1-\beta) \quad (7)$$

$$f_3 = \alpha\beta \quad (8)$$

さらに、解離度パラメータは平衡定数との間には、以下に示す関係が成り立つ (式 (9), (10))。

$$K_1 = \frac{[\text{State2}]}{[\text{State1}]} = \frac{\alpha}{1-\alpha} \quad (9)$$

$$K_2 = \frac{[\text{State3}]}{[\text{State2}]} = \frac{\beta}{1-\beta} \quad (10)$$

ここで、 $i-i+1$ ($i=1,2$) 番目の状態変化を考える。定圧熱容量に温度依存性が無いと仮定した場合のエンタルピー変化の温度依存性は、式(11)に示す Kirchhoff の式で表される。なお、 $\Delta H_{\text{VH}}(T)$ と $\Delta H_{\text{VH}}(T_m)$ はそれぞれ、任意の温度 $T(\text{K})$ および転移温度 $T_m(\text{K})$ における van' t Hoff エンタルピーの変化を表す。また、 ΔC_p は定圧熱容量の変化を表すが、主に二次構造の変化を反映する CD スペクトルにおいては、転移に伴う定圧熱容量の変化を鋭敏に検出することは困難であるとして、 $\Delta C_p = 0$ と仮定した。この仮定を踏まえると、 $i-i+1$ ($i=1,2$) 間の状態転移におけるエンタルピー変化 $\Delta H_{\text{VH}}(T)$ について、式(12)のように一般化して書くことができる。

$$\Delta H_{\text{VH}}(T) = \Delta H_{\text{VH}}(T_m) + \Delta C_p(T - T_m) \quad (11)$$

$$\Delta H_{\text{VH}}(T) = \Delta H_{\text{VH}}(T_{m,i-i+1}); i=1,2 \quad (12)$$

さらに、各状態転移間の van' t Hoff エンタルピーと平衡定数との間には、以下の関係式(13)が成り立つ。式(13)は、平衡定数の温度依存性を表す、いわゆる van' t Hoff の式である。なお、 K_i は平衡定数($i=1,2$)、 R は気体定数 ($8.31 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)を表す。

$$\frac{d \ln K_i(T)}{dT} = \frac{\Delta H_{\text{VH}}(T_{m,i-i+1})}{RT^2} \quad (13)$$

上記の式(12)を式(13)に代入したのち、両辺を転移温度 $T_{m,i-i+1}$ ($i=1,2$) から任意の温度 T までの温度区間で積分することにより、式(14)が得られる。ここで、 $K(T_{m,i-i+1}) = 1$ であるから、式(14)は式(15)に書き換えることができる。

$$\ln \frac{K_i(T)}{K(T_{m,i-i+1})} = - \frac{\Delta H_{\text{VH}}(T_{m,i-i+1})}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{m,i-i+1}} \right) \quad (14)$$

$$\ln K_i(T) = -\frac{\Delta H_{\text{VH}}(T_{\text{m},i-i+1})}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{m},i-i+1}} \right) \quad (15)$$

この式(15)をさらに変形すると、以下に示す式(16)となる。

$$K_i(T) = \exp \left\{ -\frac{\Delta H_{\text{VH}}(T_{\text{m},i-i+1})}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{\text{m},i-i+1}} \right) \right\} \quad (16)$$

以上までから、 $T_{\text{m},i-i+1}$ ($i=1-2$) および $\Delta H_{\text{VH}}(T_{\text{m},i-i+1})$ ($i=1-2$) が決まれば、平衡定数、解離度、分子種の存在割合を順次求めることができることが分かる。よって、 $T_{\text{m},i-i+1}$ および $\Delta H_{\text{VH}}(T_{\text{m},i-i+1})$ と、 $[\theta_{222}]_i$ ($i=1-3$) をフィッティングパラメータとして、式(5)に基づき、 $[\theta_{222}]-T$ グラフを対象に非線形の最小二乗法でフィッティングを行った。その結果として得られたフィッティング曲線が、Figure 4(b) 中の青線で示した曲線に相当する。ここで、視覚的な理解を深めるために、State1-3 の各状態にある分子種の存在割合 f_i ($i=1-3$) が温度変化に伴い変化する様子を描いたグラフを Figure 3 に示す。このグラフにおいて、 f_1 と f_2 の交点にあたる温度が $T_{\text{m},1-2}$ に相当し、 f_2 と f_3 の交点にあたる温度が $T_{\text{m},2-3}$ に相当する。なお、このグラフの作成にあたっては、フィッティングで得られたパラメータ $T_{\text{m},i-i+1}$ ($i=1-2$) および $\Delta H_{\text{VH}}(T_{\text{m},i-i+1})$ ($i=1-2$) を用いた。

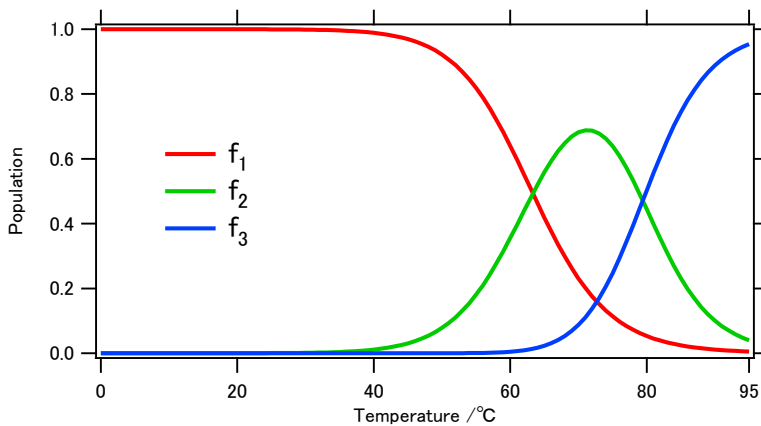


Figure 3. r3CF の $[\theta_{222}]-T$ グラフを基に、 f_i ($i=1-3$) の温度変化を描いたグラフ.

以上に示した方法で、各ペプチドについて解析を行った。その結果として得られたフィッティングの結果（実線）および各相間の転移温度（点線）を Figure 4 に示す。Figure 4(b) と (d) に関しては、3 つの相間の転移を仮定することで適切なフィットが得られた。また、これら 3 相に区分されたペプチドについては、低温側の相を “I II” と表し、最初の 2 つの相が 1 つに融合していると見なした。一方、Figure 4(a)、(c)、および (e) のデータに関しては、フィッティング誤差においてと視覚的に良好なフィットを得るためには、相を 4 つに拡張する必要があった。ただし Figure 4(g) の場合、phases I と phase II は 25 °C における段差によって視覚的に区分した。25 °C で生じるこの現象については、3.4 節で詳しく議論する。ここで、カーブフィッティングから得られた熱力学パラメータを、Table 3 に示す。この結果から、HDM3CF と HDM3CB の $T_m^{I \rightarrow II}$ の差はわずかに小さい（およそ 8 °C）ものの、CB ペプチドの熱安定性が、対応する CF ペプチドと比較して 10 °C 以上向上していることが示された。したがって、これらのヘリックスペプチドファイバーの C 末端のアミド修飾による熱安定性の向上は、普遍的なものを見なすことができる。さらに、AFM で観察された会合体の形態と相区分の相関は以下のようにまとめられる：1) CF ペプチドのうち、 α 3CF と HDM3CF は phase I と phase II の区別が可能であり、短くて細い繊維を形成する。Phase I から phase II への相転移は 20 °C 前後の比較的低い温度で起こり、この繊維の外見は安定性の低さに関連していると考えられる。2) 残りの CF ペプチドである r3CF と rHDM3CF では、phase I と phase II の区別が困難であり、細くて密な繊維を形成している。3) CB ペプチドでは、 α 3CB と HDM3CB は phase I

と phase II の区別が可能であり、r3CB と rHDM3CB はその区別がつきにくい、いずれも太く長い繊維を形成する。このように、各グループで形態と相転移との間に大まかな相関は見られたものの、AFM で観察された会合体の形態と phase の分類の相関をすべてのペプチドに共通するものとして扱うことは困難であった。

Table 3. Figure 4 の CD データをカーブフィットして得られた 6 種のペプチドの相転移の熱力学パラメータ.

	$T_m^{I \rightarrow II} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_{\text{vH}}^{I \rightarrow II} (\text{kJ/mol})$	$T_m^{II \rightarrow III} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_{\text{vH}}^{II \rightarrow III} (\text{kJ/mol})$	$T_m^{III \rightarrow IV} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta H_{\text{vH}}^{III \rightarrow IV} (\text{kJ/mol})$
α 3CF	19.7 ± 0.2	174.0 ± 7.9	60.0 ± 0.3	103.1 ± 3.0	74.7 ± 0.5	152.4 ± 3.3
r3CF	—	—	63.2 ± 1.7	168.9 ± 16.6	79.4 ± 1.2	219.0 ± 28.9
HDM3CF	18.8 ± 0.4	186.7 ± 20.2	50.4 ± 0.2	282.3 ± 17.6	67.5 ± 0.4	256.0 ± 15.6
rHDM3CF	—	—	61.7 ± 0.6	140.4 ± 14.1	84.1 ± 0.3	459.1 ± 65.5
α 3CB	48.8 ± 4.2	115.8 ± 24.6	72.9 ± 1.9	225.3 ± 69.5	84.5 ± 0.4	536.1 ± 155.0
HDM3CB	25.0^*	—	63.5 ± 1.3	129.2 ± 7.6	79.6 ± 0.1	310.0 ± 19.1

太字は、構造転移の中で最大のエンタルピー変化を示す。

* この値は、Figure 4 のグラフに基づいて視覚的に評価したものであり、誤差は含めない。

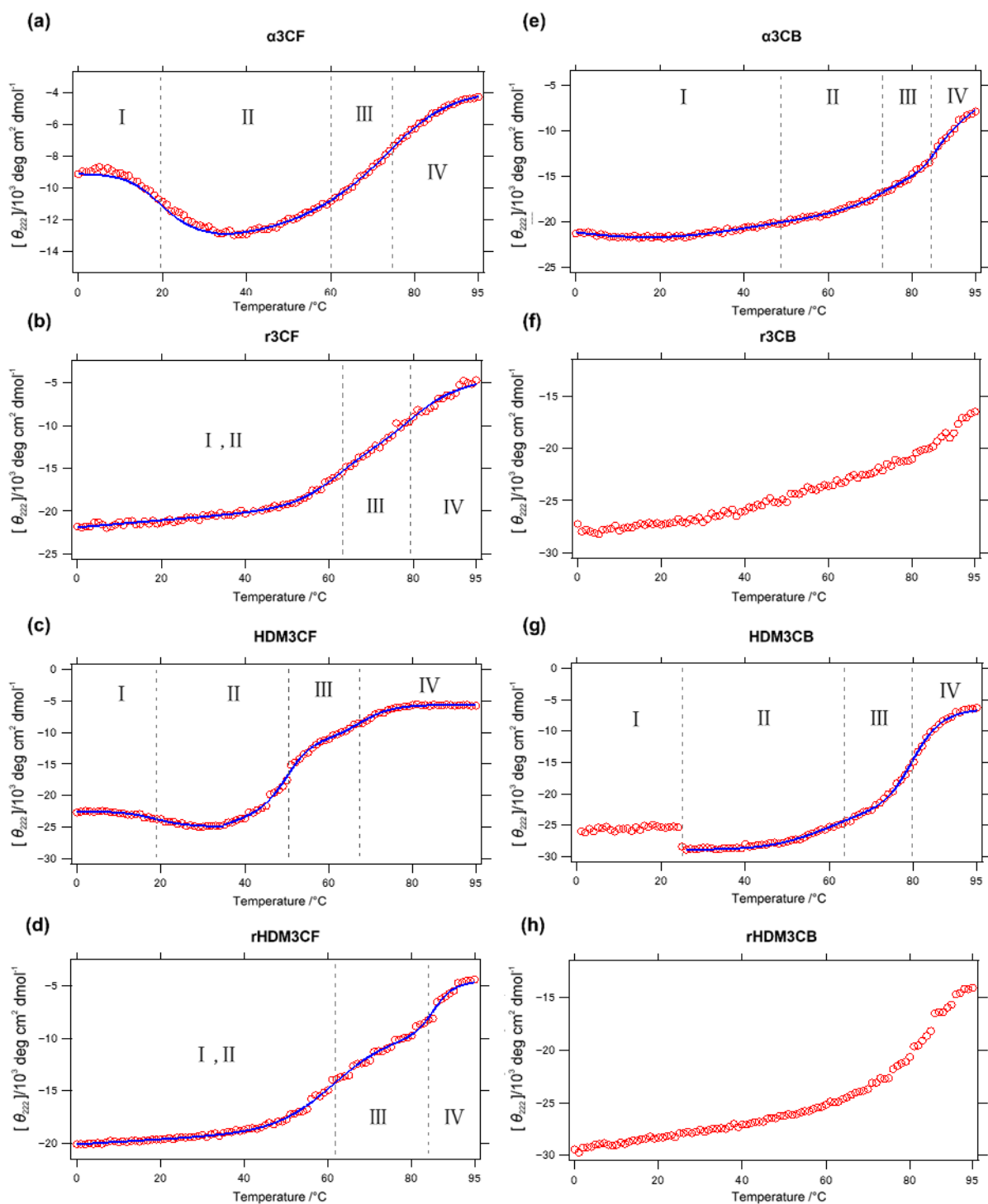


Figure 4. 波長 222nm におけるモル平均楕円率の温度依存性とカーブフィッティング。赤：実験値、青：カーブフィッティングの結果。破線は、Table 3 で定義した相間の転移温度を示す。(a) α 3CF, (b) r3CF, (c) HDM3CF, (d) rHDM3CF, (e) α 3CB, (f) r3CB, (g) HDM3CB, (h) rHDM3CB.

3.2 ヘリシティとバンドル形成度の温度変化

0-95 °Cで測定した CD スペクトルから、各温度での helicity および coiled-coil indicator の値を決定した (Figure S6) 。この結果から、全てのペプチドにおいて、温度上昇に伴って helicity と coiled-coil indicator の値が減少することが示された。また、同じ温度で比較して CB ペプチドは、対応する CF ペプチドよりも高い helicity と coiled-coil indicator の値を示した。実際に、0 °Cでの CF ペプチドの helicity の値は約 20~60 %である一方、CB ペプチドの helicity の値は約 80 %であり、CB ペプチドのヘリックス構造がより安定していることを示唆している。さらに、CF ペプチドの coiled-coil indicator の値はほとんどが 1 未満であるが、CB ペプチドのその最大値は 1.5 を超えている。このことは、AFM 観察 (Figure 1) でみられたファイバーが、CB ペプチドにおいて CF ペプチドよりも会合がより促進していたことと一致している。特筆すべきは、HDM3CB において、0 °Cから 25 °C までの coiled-coil indicator の値が 4.5 に近づいており、CB ペプチドの中で最も大きな値となっている点である。当ペプチドにおける coiled-coil の減少は、 $T_m^{I \rightarrow II}$ (25 °C) で最も大きく、会合度が急激に減少することが示唆されるものの、この減少の後も、低温で他の CB ペプチドと同程度の coiled-coil indicator の値を維持しており、高い会合度をもつことを示唆している。また注目すべきこととして、Table 3 に示されている最大のエンタルピー変化となる転移温度において、helicity と coiled-coil indicator の最大の変化が見られる。ただし、HDM3CB については、helicity と coiled-coil indicator の変化は協同的ではなく、helicity は phase III から phase IV への転移で最も減少し、coiled-coil indicator は phase I から

phase II への転移で最も減少するが、最も大きなエンタルピー変化は phase III から phase IV への転移で発生する。

3.3 繊維集合体の熱に対する 3 次構造安定性

Figure 5 に、すべてのペプチドについて DSC 測定 (60 °C/hr) を行った結果および Table 3 に記した転移温度を示す。いずれのペプチドについても、CD 測定の結果から決定した相転移温度付近の温度で、DSC サーモグラムに変化が見られた。ここで、本測定結果にみられる特徴の一つとして、通常の DSC サーモグラムではベースラインがほぼ平らであることが多い[56-58]にもかかわらず、各ペプチドの主要な転移がみられる前の温度区間において大きな負の傾きがついていることが挙げられる。この傾斜の度合いは、昇温速度 60 °C/hr で測定した結果において、すべてのペプチドにおいてほぼ同じとなっている (Figure S7 中において傾きは約 $-7.5 \times 10^{-5} \text{ J/K}^2$)。この負の傾斜が昇温速度に依存するかどうかを調べるため、 α 3CB と HDM3CB を用いて 90 °C/hr、30 °C/hr、および 15 °C/hr の昇温速度についても DSC 測定を行った。Figure 5 の (e) (α 3CB) および (g) (HDM3CB) のグラフに示すように、急激な転移の以前の温度域で C_p は明確な速度依存性を示し、解離や会合反応などの遅い速度論的プロセスが関与している可能性が示唆された。また、 α 3CB の昇温速度を 15 °C/hr にした場合に、負の傾きが見られなくなり、比較的遅い速度論的プロセスが昇温速度に追いつく様子が見られた。そこで、DSC 測定における熱変性反応が可逆的であることを確認した後 (Figure S8)、単純な 2 状態転移反応 ($N \rightleftharpoons D$) を仮定して熱力学解析を試みた。解析の詳細を以下に記す。はじめに、定圧熱容量に温度依存性があるとし、 C_N を N 状態の定圧熱容量、 C_D を D 状態の定圧熱容量とおき、そ

それぞれの温度範囲内で温度の 1 次関数 ($C_N=a+bT$, $C_D=c+dT$) で近似できると仮定した。続いて、エンタルピーと定圧熱容量の関係の定義式(17)の両辺を、転移温度 T_m から任意の温度 T まで積分することにより、温度 T におけるカロリメトリックエンタルピーの変化を表す式(18)を得た。

$$C_p = \frac{dH}{dT} \quad (17)$$

$$\Delta H_{cal}(T) = \int_{T_m}^T \Delta C_p dT = \Delta H_{cal}(T_m) + (c-a)(T-T_m) + \frac{1}{2}(d-b)(T^2-T_m^2) \quad (18)$$

なお、 ΔC_p は C_D と C_N の差であり、 $\Delta H_{cal}(T_m)$ は転移温度 T_m におけるカロリメトリックエンタルピーの変化である。その後、式(18)を式(15)に示した van' t Hoff の式に代入し、転移温度 T_m から任意の温度 T まで積分することで、以下の式(19)を得た。いま、 $N \rightleftharpoons D$ の反応における平衡定数を K としている。

$$\ln K(T) = - \frac{\Delta H_{cal}(T_m) - (c-a)T_m - \frac{1}{2}(d-b)T_m^2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{(c-a)}{R} \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) + \frac{(d-b)}{2R} (T - T_m) \quad (19)$$

この式(19)をさらに変形すると、以下に示す式(20)となる。

$$K(T) = \exp \left\{ - \frac{\Delta H_{cal}(T_m) - (c-a)T_m - \frac{1}{2}(d-b)T_m^2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) + \frac{(c-a)}{R} \ln \left(\frac{T}{T_m} \right) + \frac{(d-b)}{2R} (T - T_m) \right\} \quad (20)$$

ここで、熱容量 C_p が van' t Hoff エンタルピーの変化 (ΔH_{VH}) によってどのように表現されるかを考える。 $N \rightleftharpoons D$ の反応における解離度を表すパラメータを ξ 、Native 状態におけるエンタルピーを $H_N(T)$ 、Denatured 状態におけるエンタルピーを $H_D(T)$ と定義すると、任意の温度 T におけるエンタルピー $H(T)$ は式(21)で表すことができる。また、 $N \rightleftharpoons D$ の反応における解離度を ξ とすると、式(20)で表される平衡定数 K と解離度 ξ との間に、関係式(22)が成り立つ。

$$H_{\text{VH}}(T) = (1-\xi) H_{\text{N}}(T) + \xi H_{\text{D}}(T) \quad (21)$$

$$K(T) = \frac{\xi}{1-\xi} \quad (22)$$

式(17)に式(21)を代入して変形することで、任意の温度 T における熱容量を表す以下の式(23)を得る。

$$C_p = \frac{(\Delta H_{\text{VH}})^2}{RT^2} \xi(1-\xi) + (1-\xi)C_{\text{N}} + \xi C_{\text{D}} \quad (23)$$

ここで新たに、van' t Hoff エンタルピーとカロリメトリックエンタルピーを結びつける協同性のパラメータ φ を導入する (式(24))。

$$\Delta H_{\text{VH}} = \varphi \Delta H_{\text{cal}} \quad (24)$$

式(24)を式(23)に代入することで、最終的な式(25)を得る。

$$C_p = \frac{(\varphi \Delta H_{\text{cal}})^2}{RT^2} \xi(1-\xi) + (1-\xi)C_{\text{N}} + \xi C_{\text{D}} \quad (25)$$

以上の式(20), (22), (25) [59, 60]に基づき、 T_{m} および $\Delta H_{\text{cal}}(T_{\text{m}})$ と φ 、および C_{N} と C_{D} の1次関数の係数をフィッティングパラメータとして、84-85 °Cの非常に狭い温度範囲でサーモグラムの解析を行った (Figure S9)。この解析の結果、非常に小さい ΔH_{cal} の値 (4.3 kJ/mol) および非常に大きい φ の値 (約 1570) が得られた。ここで、協同性パラメータ φ は、 $\varphi = \Delta H_{\text{VH}} / \Delta H_{\text{cal}}$ で定義される物理量であり、通常のタンパク質における2状態転移反応においては、 φ は1に近い値となる ($\Delta H_{\text{cal}} \approx \Delta H_{\text{VH}}$) [59, 60]。したがって、この巨大な φ の値は、CB ペプチドにおいてヘリックス分子のバンドル化が促進されてエンタルピーを稼ぎ、その蓄積されたエンタルピーを非常に高い協同性で急激に放出することを示唆している。一般に、高い協同

性でもって熱転移し、DSC サーモグラムで鋭い吸熱ピークを示すのは、結晶性をもつ無機結晶[61, 62]やその他の固體材料、または液体と固體の両性質をもちあわせた液晶材料[63–65]などである。このことを踏まえると、CB ペプチドは液体状でありながら高い結晶性を有する、液晶のような特性を有していると考えられる。

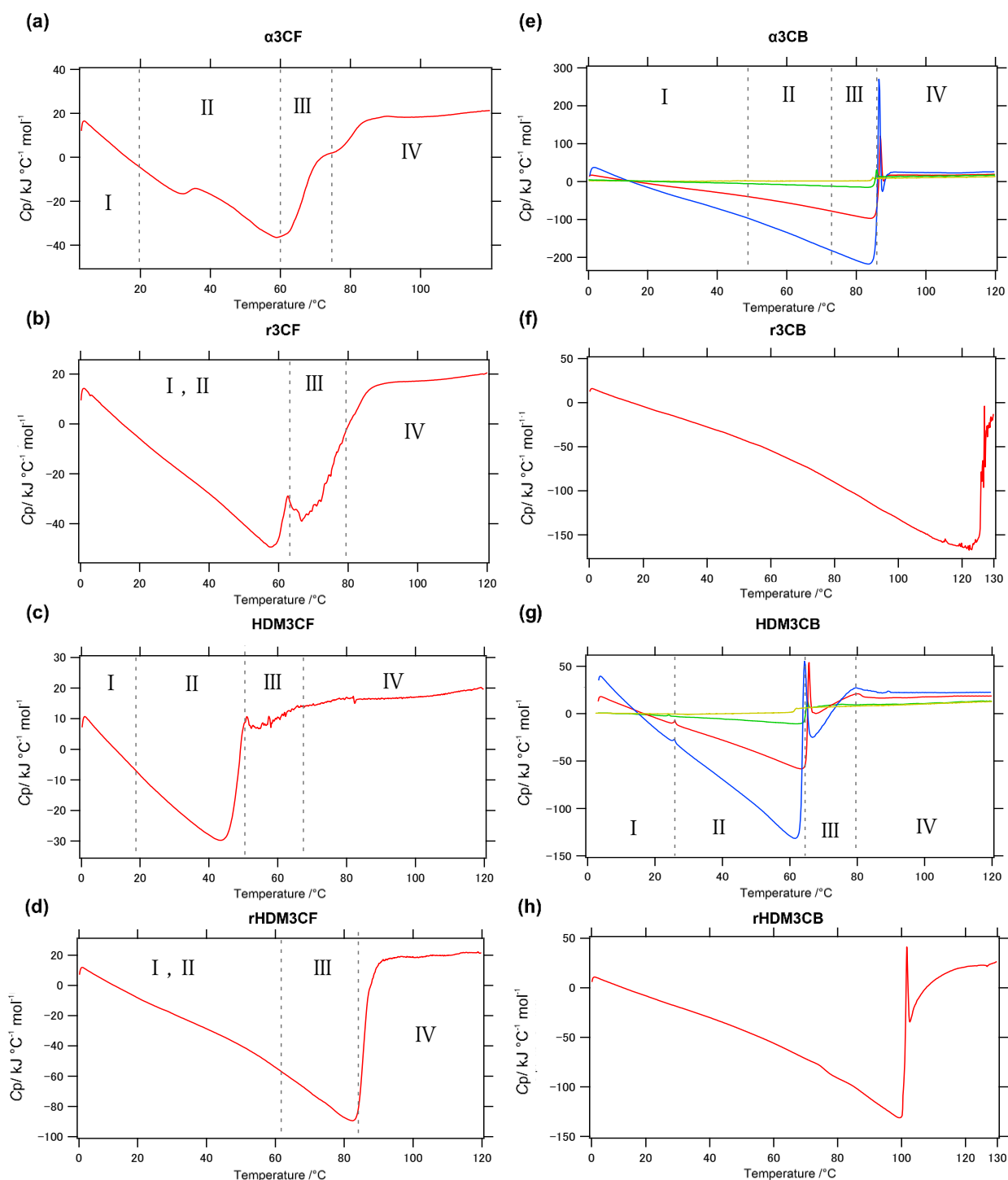


Figure 5. 全ペプチドの DSC 測定結果（昇温速度は以下のように色分けしている：
赤：60℃/hr；青：90℃/hr；緑：30℃/hr；黄：15℃/hr）。破線の縦線は、Table 3
で定義した相間の転移温度を示す。（a） α 3CF, (b) r3CF, (c) HDM3CF, (d)
rHDM3CF, (e) α 3CB, (f) r3CB, (g) HDM3CB, (h) rHDM3CB.

3.4 AFM と偏光顕微鏡で観察した会合体形態の温度変化

昇温（60℃/hr）に伴って繊維集合体の形態がどのように変化するかを、AFM を用いた画像観察で詳細に追跡した。その結果、すべてのペプチドで、温度が上がるにつれて会合体のサイズが小さくなることが示され、温度上昇に伴って繊維が解離していくことが示唆された（Figure S10）。Figure 6 は、代表的な例として、phase II-IV における HDM3CB の AFM 観察の結果を示している。Figure 6 と Figure 1(g)（後者は phase I に対応）を用いて行った会合体サイズ分析により、HDM3CB の繊維会合体のサイズは、phase I から phase II（転移温度：25℃）への転移中に最も減少することが分かった。

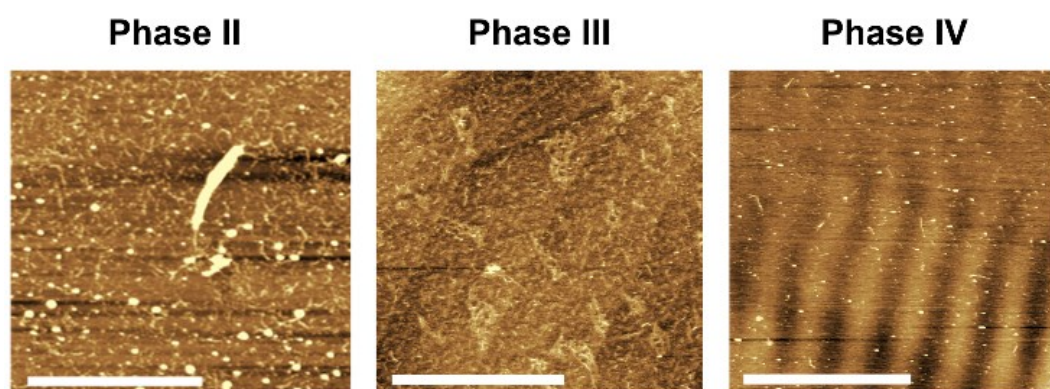


Figure 6. phase II (60 °C)、phase III (65 °C)、phase IV (90 °C)における HDM3CB の AFM 観察画像 (スケールバーは 5.0 μm)。ファイバーの高さ (nm) は以下の通りであった ($n = 20$) : (phase II) 2.4 ± 1.3 , (phase III) 1.0 ± 0.4 .

また偏光顕微鏡を使用して、昇温中の会合体形態と配向の変化を調査した。HDM3CB を 10 °C で観察すると、はっきりと色づいた繊維集合体が観察され、試料台を 90 ° 回転させると、その色が変わる様子がみられた (Figure 7(a) および (a'))。この光学異方性は、ヘリックス分子が繊維を形成する際に高度に配向していることを示しており、液晶の振る舞いと類似している。特に、25 °C 前後の非常に狭い温度範囲で、光学異方性を維持しつつ、巨大な集合体の数がかなり減少の様子が観察された (Figure 7(b) および (b'))。さらに、これらの巨大な集合体のサイズがおおよそ 300 μm x 300 μm (Figure 7(a)) であることから、集合体内の分子数はおおよそ 10 億に達すると見積もられる。この “giga-bundle” の分子が約 25 °C で爆発し (この現象を giga-bundle burst と呼ぶ)、細い繊維集合体に変化したようである。またこの giga-bundle burst では、CD に示されているように二次構造は不連続的に変化するが、 α ヘリックス構造は維持される (Figure 2(g))。この変化は、DSC 測定においても、phase I から phase II への転移温度 (すなわち 25 °C 付近) に、比較的鋭い吸熱ピークが昇温速度に関係なく観測された (Figure 5(g))。熱力学解析によって、このピークは、小さなカロリメトリックエンタルピー (2.7 kJ/mol) と $\varphi = 1600$ をもつ、非常に協同性の高い転移であることが明らかになった。さらに温度を上げると、光学異方性が残存した繊維会合体 (Figure 7(b)) が、63 °C から 65 °C の狭い温度範囲で急に消失の様子がみられた (Figure 7(c) および (d))。こ

の温度は、CD 測定の熱転移曲線の解析から得られた $T_m^{II \rightarrow III}$ と一致し、DSC サーマグラムで非常に鋭いピークが観察された温度とも一致している。そして、光学顕微鏡や AFM では繊維会合体はもはや観測されないが、CD 測定で示されたように、最終的に分子のヘリックス構造は約 80 °C で完全に失われる。以上の観察に基づいて、HDM3CB の 4 つの相を次のように特徴付けることができる：[phase I：ヘリックス分子がバンドル化し、安定した状態で配向している] → [phase II：ヘリックスバンドル間の相互作用が弱まりながらも、いくらか配向が残存している] → [phase III：ヘリックス構造、バンドル構造および配向がさらに喪失される] → [phase IV：構造が完全に喪失される] (Figure 8)。100 °C 以下で転移を示す別の CB ペプチドである α 3CB の偏光顕微鏡観察においても、 $T_m^{III \rightarrow IV}$ に相当する温度で繊維会合体が配向を失う様子がみられた（データは示さない）。したがって、DSC サーマグラムで非常に鋭い吸熱ピークが現れる温度において、繊維会合体が配向を失うことが示唆された。この、高温で非常に鋭い DSC ピークが現れることを特徴とする液晶のような転移 (Figure 5) は、すべての CB ペプチドに共通であり、これは C 末端のアミド化によって普遍的に引き起こされるものと考えられる。一方、室温 (25 °C) 付近で観察される giga-bundle burst に対応する転移は、HDM3CB に特有であり、知限りではそのような現象の報告はない。したがって、これはペプチドの配列やヘリカルファイバーの形成条件など、種々の条件が揃ったときに発生する特別な現象であると考えられる。また対照的に、CF ペプチドである HDM3CF では、温度に関係なく光学的な異方性は観察されなかった（データは示さない）。

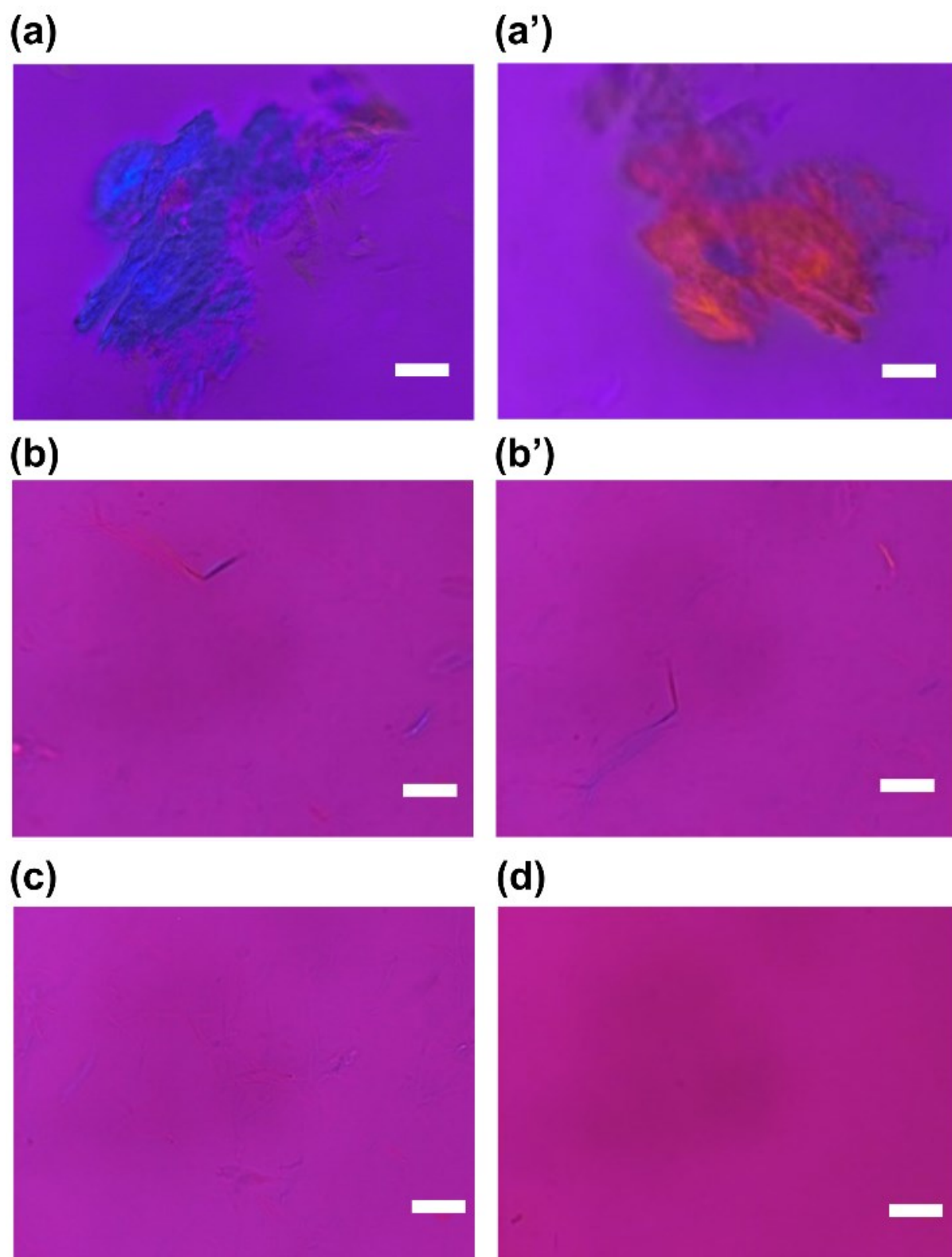


Figure 7. HDM3CB の偏光顕微鏡観察の結果. (a) 10 °C、(a') 10 °C-試料台を 90 ° 回転、(b) 60 °C、(b') 60 °C-試料台を 90 ° 回転、(c) 63 °C、(d) 65 °C. (Scale bar is 100 μ m.)

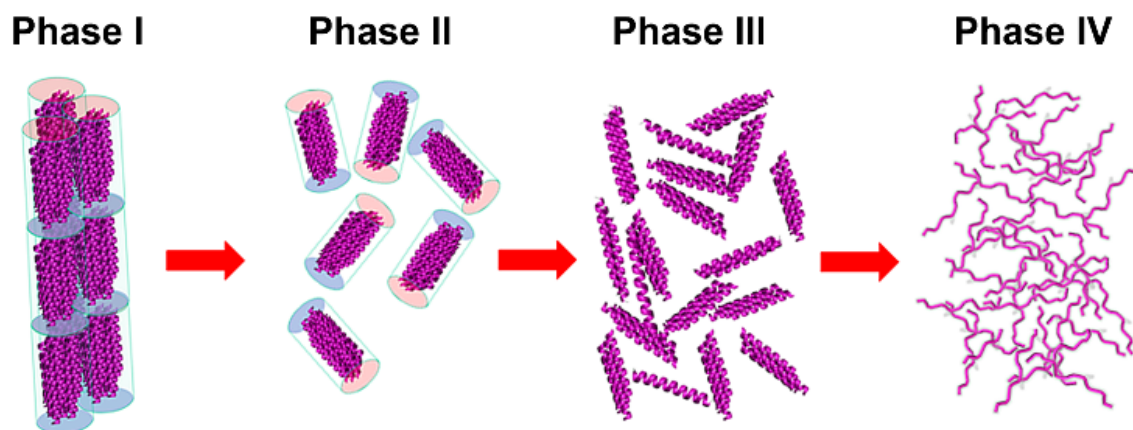


Figure 8. HDM3CB 繊維会合体の融解スキーム. Phase I から phase II : gigabundle burst、phase II から phase III : 協同的な液晶様転移、phase III から phase IV : ヘリックス構造の崩壊.

3.5 DSC サーモグラムにおけるアミロイド線維との比較

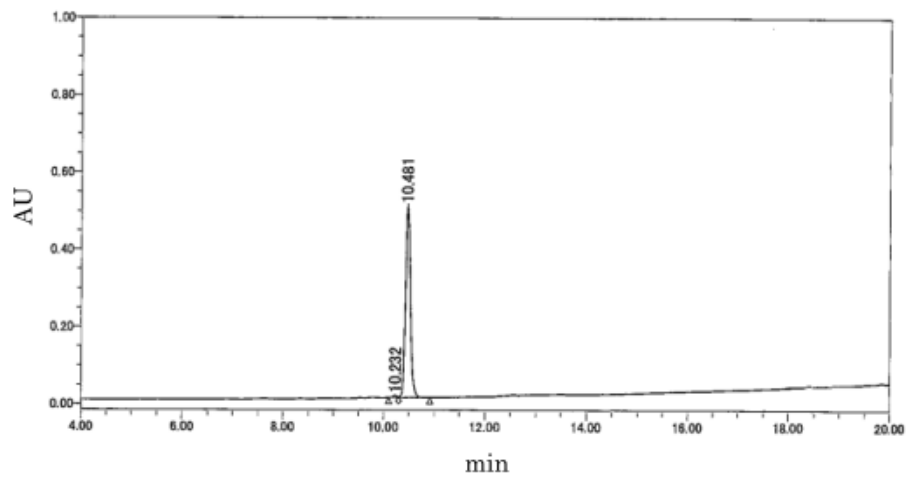
Figure 5 に示す DSC サーモグラムは、通常の球状タンパク質では観察されない大きな負の勾配を示した。Sasahara らは、 $\beta 2$ -ミクログロブリン ($\beta 2m$) の DSC サーモグラムにおいても負の勾配が観察され (昇温速度 60°C/hr 、傾き約 $-8.6 \times 10^{-5} \text{ J/K}^2$) [66]、DSC サーモグラムが負の勾配を示す温度領域で凝集反応、すなわちアミロイド線維化が起こることを報告している。一方、本研究においては、CD を用いた加熱実験において追跡した coiled-coil indicator の温度変化 (Figure S6)、AFM (Figure 6, Figure S10)、偏光顕微鏡 (Figure 7) を用いた実験結果のいずれにおいても、DSC の負の傾きを示す温度範囲で、温度が上昇するにつれて会合体の解離反応が起こることが示唆された。したがって、DSC サーモグラムにおける負の傾

きは、繊維状タンパク質の種類にかかわらず、温度上昇速度に追いつかない速度で起こる繊維集合体の「解離または会合」を示す普遍的なシグナルであると考えられる。実際、本研究の測定において見られた負の傾きの大きさは、アミロイド線維の DSC サーモグラムから得られた負の傾きとよく一致している[66]。本研究において、おもに 2 次構造を反映する CD を用いた加熱実験では、昇温速度を変化させても速度依存性は認められなかったが (Figure S11)、主に 3 次元相互作用を反映する DSC サーモグラムの熱容量では、スキャン速度に応じて負の傾きが観察された (Figure 5)。以上の結果と、一般に C_p の変化は疎水基の水和を反映することから[67]、負の傾きを持つ温度領域では、“昇温速度に追いつかない速度で起こる分子間疎水相互作用が関与する繊維集合体の解離反応”が進行していると推定される。

3.6 C 末端アミド化による耐熱性向上と結晶性獲得の分子論的考察

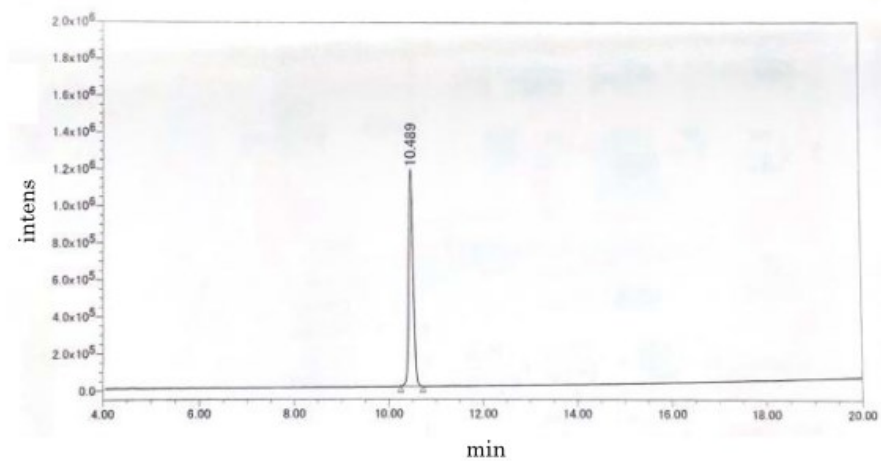
ヘリックス分子の C 末端をアミド化することで、これらの分子によって形成される繊維集合体の耐熱性が著しく向上し、同時に液晶性も獲得するということが明らかになった。この巨視的現象の分子論的理由を探るため、まず分子の疎水性と双極子モーメント (helix dipole) を調べた。CF ペプチドと CB ペプチドのアミノ酸配列は同一であるため、分子全体の疎水性は同じであると予想される。実際に、ペプチドを精製する際の HPLC での溶出時間は、 α 3CF が 10.481 分、 α 3CB が 10.489 分であり (Figure 9)、アミド化にかかわらず疎水性はほとんど同じであることが示された。

(a) α 3CF



retention time /min	area / μ Vsec	%area	height / μ V
10.481	3418274	99.14	497895

(b) α 3CB



retention time /min	area / μ Vsec	%area	height / μ V
10.489	7790969015780	100	1177885399971

Figure 9. (a) α 3CF、(b) α 3CB について HPLC を行ったクロマトグラム.

また、分子がヘリックス構造をもつと仮定した場合の、各ペプチドにおける helix dipole の値についても、対応する CF ペプチドと CB ペプチドで有意な差はなかった (Table 4) 。この結果は、helix dipole に基づく” magnetic interaction” [33] では、r3CF が α 3CF よりも安定である理由を説明できないことを示唆している。

Table 4. 全ペプチドについて得られた helix dipole moment の値.

helix dipole (Debyes)			helix dipole (Debyes)		
(a)	α 3CF	93	(e)	α 3CB	89
(b)	r3CF	520	(f)	r3CB	453
(c)	HDM3CF	154	(g)	HDM3CB	151
(d)	rHDM3CF	499	(h)	rHDM3CB	496

疎水性と親水性の指標に違いが見られなかったので、親水性残基と疎水性残基の分子内配置を反映できる指標である両親媒性を調べることにした。3 次元疎水モーメントベクトル[51]を用いて、分子がヘリックス構造をもつと仮定し、各ペプチドの両親媒性を定量化した。これらの計算結果を、x、y、z の 3 次元成分に分けて Table 5 に示す。また、この計算の際に用いた 3 次元座標を Figure S12 に示す。赤が x 軸（繊維軸の方向で、ページの後ろから前に向かって正）、緑が y 軸、青が z 軸（いずれも矢印の方向に正）である。

Table 5. 全ペプチドについての疎水モーメントの x、y、z 方向成分.

	hydrophobic moment (kTÅ/e)	x	y	z		hydrophobic moment (kTÅ/e)	x	y	z
(a)	α 3CF	-0.343	8.071	0.260	(e)	α 3CB	-5.937	7.510	1.372
(b)	r3CF	-1.698	7.552	3.800	(f)	r3CB	-9.602	5.675	5.750
(c)	HDM3CF	1.091	7.623	0.841	(g)	HDM3CB	-5.409	6.696	1.917
(d)	rHDM3CF	0.316	7.535	2.394	(h)	rHDM3CB	-7.346	5.838	4.470

Table 5 より、CB ペプチドにおいて、対応する CF ペプチドよりも x の値が有意に負に大きくなっていることが読み取れる。従って、ヘリックス軸に沿った C 末端方向の両親媒性が高くなっていることが、CB ペプチドの液晶性と耐熱性の原因となっている可能性が高い。実際、x の負の値が最も大きい r3CB は、130 °C 近い最も高い熱変性温度を示し (Figure 4(f) および Figure 5(f))、この仮説を裏付けるものとなっている。さらに、疎水モーメントの x 成分の大きさは r3CB で最も大きく、次いで rHDM3CB > α 3CB > HDM3CB の順であり、DSC サーモグラムで鋭い吸熱ピークが観察される温度もこの順である。したがって、CB ペプチドの両親媒性と熱安定性には完全な相関がある。一方、CF ペプチドでは、DSC サーモグラムに鋭い吸熱ピークが観察されなかったため、相関を評価することは困難であった。

4. まとめ

α ヘリックス構造を有する自己集合性ペプチドが形成するファイバー集合体は、多段階的な熱転移挙動を明らかにした。この過程を、熱力学的解析などの様々な手法を用いて捉え、0-95 °C の温度範囲で最大 4 つの相を同定した。特に、カルボキシ

ル末端をアミド基で修飾した CB ペプチドは、分子間会合が促進されて、非常に協同性の高い液晶様の熱転移を示すことが明らかになった。ペプチドが示す物性としては極めて珍しいこの現象は、新しい材料開発への道を切り拓くものとなるだろう。さらに CB ペプチドにおいては、結晶性の向上に加えて耐熱性も大幅に向上した。例えば r3CB ペプチドは、pH 7.4 の生理的条件下で、130 °C 近い変性温度を持つ α ヘリカルファイバーを形成し、生体高分子としては異例の高耐熱性を示した。そして、これら CB ペプチドの耐熱性化と液晶性の獲得は、ヘリックス分子の軸に沿った方向に両親媒性が高くなっていることに起因するものと考えられた。

参考文献

- (1) Chilakamarthy, C. R.; Mahmood, S.; Saffe, S.; Arifin, M. A. B.; Gupta, A.; Sikkandar, M. Y.; Begum, S. S.; Narasaiah, B. Extraction and application of keratin from natural resources: a review. *3 Biotech* **2021**, *11*, 220.
- (2) Carvalho, J. P.; Silva, C.; Martins, M.; Cavaco-Paulo, A. Insights on the Hair Keratin Structure Under Different Drying Conditions. *Journal of Natural Fibers* **2023**, *20*, 2250556.
- (3) Yazawa, K.; Ishida, K.; Masunaga, H.; Hikima, T.; Numata, K. Influence of Water Content on the β -Sheet Formation, Thermal Stability, Water Removal, and Mechanical Properties of Silk Materials. *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 1057–1066.
- (4) Gray, W. R.; Sandberg, L. B.; Foster, J. A. Molecular model for elastin structure and function. *Nature* **1973**, *246*, 461–466.
- (5) Thomson, A. R.; Wood, C. W.; Burton, A. J.; Bartlett, G. J.; Sessions, R. B.; Brady, R. L.; Woolfson, D. N. Computational design of water-soluble α -helical barrels. *Science* **2014**, *346*, 485–488.
- (6) Miki, T.; Nakai, T.; Hashimoto, M.; Kajiwara, K.; Tsutsumi, H.; Mihara, H. Intracellular artificial supramolecules based on de novo designed Y15 peptides. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3412.
- (7) Kobayashi, N.; Yanase, K.; Sato, T.; Unzai, S.; Hecht, M. H.; Arai,

- R. Self-Assembling Nano-Architectures Created from a Protein Nano-Building Block Using an Intermolecularly Folded Dimeric de Novo Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11285-11293.
- (8) Yang, C.; Sesterhenn, F.; Bonet, J.; van Aalen, E. A.; Scheller, L.; Abriata, L. A.; Cramer, J. T.; Wen, X.; Rosset, S.; Georgeon, S.; et al. Bottom-up de novo design of functional proteins with complex structural features. *Nat. Chem. Biol.* **2021**, *17*, 492-500.
- (9) Sesterhenn, F.; Yang, C.; Bonet, J.; Cramer, J. T.; Wen, X.; Wang, Y.; Chiang, C. I.; Abriata, L. A.; Kucharska, I.; Castoro, G.; et al. De novo protein design enables the precise induction of RSV-neutralizing antibodies. *Science* **2020**, *368*, eaay5051.
- (10) Lechner, H.; Ferruz, N.; Höcker, B. Strategies for designing non-natural enzymes and binders. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2018**, *47*, 67-76.
- (11) Tavares, T. D.; Antunes, J. C.; Ferreira, F.; Felgueiras, H. P. Biofunctionalization of Natural Fiber-Reinforced Biocomposites for Biomedical Applications. *Biomolecules* **2020**, *10*, 148.
- (12) Gatto, E.; Lettieri, R.; Vesce, L.; Venanzi, M. Peptide Materials in Dye Sensitized Solar Cells. *Energies* **2022**, *15*, 5632.
- (13) Sumiyoshi, S.; Suyama, K.; Tanaka, N.; Andoh, T.; Nagata, A.; Tomohara, K.; Taniguchi, S.; Maeda, I.; Nose, T. Development of truncated elastin-like peptide analogues with improved temperature-

- response and self-assembling properties. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 19414.
- (14) Briggs, B. D.; Knecht, M. R. Nanotechnology Meets Biology: Peptide-based Methods for the Fabrication of Functional Materials. *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 405-418.
 - (15) Seker, U. O.; Demir, H. V. Material binding peptides for nanotechnology. *Molecules* **2011**, *16*, 1426-1451.
 - (16) Ulijn, R. V.; Smith, A. M. Designing peptide based nanomaterials. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 664-675.
 - (17) Li, T.; Lu, X. M.; Zhang, M. R.; Hu, K.; Li, Z. Peptide-based nanomaterials: Self-assembly, properties and applications. *Bioact. Mater.* **2022**, *11*, 268-282.
 - (18) Bakota, E. L.; Sensoy, O.; Ozgur, B.; Sayar, M.; Hartgerink, J. D. Self-assembling multidomain peptide fibers with aromatic cores. *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1370-1378.
 - (19) Chu, B.; He, J. M.; Liu, L. L.; Wu, C. X.; You, L. L.; Li, X. L.; Wang, S.; Chen, C. S.; Tu, M. Proangiogenic Peptide Nanofiber Hydrogels for Wound Healing. *ACS Biomater. Sci.* **2021**, *7*, 1100-1110.
 - (20) Booth, R.; Insua, I.; Ahmed, S.; Rioboo, A.; Montenegro, J. Supramolecular fibrillation of peptide amphiphiles induces environmental responses in aqueous droplets. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6421.
 - (21) Tian, Y.; Polzer, F. B.; Zhang, H. V.; Kiick, K. L.; Saven, J. G.;

- Pochan, D. J. Nanotubes, Plates, and Needles: Pathway-Dependent Self-Assembly of Computationally Designed Peptides. *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 4286-4298.
- (22) Rho, J. Y.; Cox, H.; Mansfield, E. D. H.; Ellacott, S. H.; Peltier, R.; Brendel, J. C.; Hartlieb, M.; Waigh, T. A.; Perrier, S. Dual self-assembly of supramolecular peptide nanotubes to provide stabilisation in water. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4708.
- (23) Zhang, S.; Holmes, T.; Lockshin, C.; Rich, A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*, 3334-3338.
- (24) Zhang, S.; Holmes, T. C.; DiPersio, C. M.; Hynes, R. O.; Su, X.; Rich, A. Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials* **1995**, *16*, 1385-1393.
- (25) Holmes, T. C.; de Lacalle, S.; Su, X.; Liu, G.; Rich, A.; Zhang, S. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2000**, *97*, 6728-6733.
- (26) Moore, A. N.; Hartgerink, J. D. Self-Assembling Multidomain Peptide Nanofibers for Delivery of Bioactive Molecules and Tissue Regeneration. *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 714-722.
- (27) Li, J.; Zhao, Y.; Zhou, P.; Hu, X.; Wang, D.; King, S. M.; Rogers, S. E.; Wang, J.; Lu, J. R.; Xu, H. Ordered Nanofibers Fabricated

- from Hierarchical Self-Assembling Processes of Designed α -Helical Peptides. *Small* **2020**, *16*, 2003945.
- (28) Burgess, N. C.; Sharp, T. H.; Thomas, F.; Wood, C. W.; Thomson, A. R.; Zaccai, N. R.; Brady, R. L.; Serpell, L. C.; Woolfson, D. N. Modular Design of Self-Assembling Peptide-Based Nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* **2015**, *137*, 10554-10562.
- (29) Wang, F.; Gnewou, O.; Modlin, C.; Beltran, L. C.; Xu, C.; Su, Z.; Juneja, P.; Grigoryan, G.; Egelman, E. H.; Conticello, V. P. Structural analysis of cross α -helical nanotubes provides insight into the designability of filamentous peptide nanomaterials. *Nature Communications* **2021**, *12*, 407.
- (30) Wu, Y.; Norberg, P. K.; Reap, E. A.; Congdon, K. L.; Fries, C. N.; Kelly, S. H.; Sampson, J. H.; Conticello, V. P.; Collier, J. H. A Supramolecular Vaccine Platform Based on α -Helical Peptide Nanofibers. *ACS Biomater Sci Eng* **2017**, *3*, 3128-3132.
- (31) Kojima, S.; Kuriki, Y.; Sato, Y.; Arisaka, F.; Kumagai, I.; Takahashi, S.; Miura, K. Synthesis of α -helix-forming peptides by gene engineering methods and their characterization by circular dichroism spectra measurements. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1294*, 129-137.
- (32) Kojima, S.; Kuriki, Y.; Yoshida, T.; Yazaki, K.; Miura, K. Fibril Formation by an Amphipathic α -Helix-Forming Polypeptide Produced by

Gene Engineering. *Proc. Japan. Acad., Ser. B* **1997**, *73*, 7-11.

- (33) Kojima, S.; Kuriki, Y.; Yazaki, K.; Miura, K. Stabilization of the fibrous structure of an α -helix-forming peptide by sequence reversal. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *331*, 577-582.
- (34) Hol, W. G.; van Duijnen, P. T.; Berendsen, H. J. The α -helix dipole and the properties of proteins. *Nature* **1978**, *273*, 443-446.
- (35) Hol, W. G. Effects of the α -helix dipole upon the functioning and structure of proteins and peptides. *Adv. Biophys.* **1985**, *19*, 133-165.
- (36) Shoemaker, K. R.; Kim, P. S.; York, E. J.; Stewart, J. M.; Baldwin, R. L. Tests of the helix dipole model for stabilization of alpha-helices. *Nature* **1987**, *326*, 563-567.
- (37) Facchiano, A. M.; Colonna, G.; Ragone, R. Helix stabilizing factors and stabilization of thermophilic proteins: an X-ray based study. *Protein Eng.* **1998**, *11*, 753-760.
- (38) Soleymani-Goloujeh, M.; Nokhodchi, A.; Niazi, M.; Najafi-Hajivar, S.; Shahbazi-Mojarrad, J.; Zarghami, N.; Zakeri-Milani, P.; Mohammadi, A.; Karimi, M.; Valizadeh, H. Effects of N-terminal and C-terminal modification on cytotoxicity and cellular uptake of amphiphilic cell penetrating peptides. *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 91-103.
- (39) Chen, Y. H.; Yang, J. T. A new approach to the calculation of secondary structures of globular proteins by optical rotatory

- dispersion and circular dichroism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1971**, *44*, 1285-1291.
- (40) Yu, Y.; Monera, O. D.; Hodges, R. S.; Privalov, P. L. Investigation of electrostatic interactions in two-stranded coiled-coils through residue shuffling. *Biophys. Chem.* **1996**, *59*, 299-314.
- (41) Zhou, N. E.; Kay, C. M.; Hodges, R. S. Synthetic model proteins. Positional effects of interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2664-2670.
- (42) Kwok, S. C.; Hodges, R. S. Stabilizing and destabilizing clusters in the hydrophobic core of long two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 21576-21588.
- (43) Shiratori, T.; Goto, S.; Sakaguchi, T.; Kasai, T.; Otsuka, Y.; Higashi, K.; Makino, K.; Takahashi, H.; Komatsu, K. Singular value decomposition analysis of the secondary structure features contributing to the circular dichroism spectra of model proteins. *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *28*, 101153.
- (44) Luzio, A.; Criante, L.; D'Innocenzo, V.; Caironi, M. Control of charge transport in a semiconducting copolymer by solvent-induced long-range order. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 3425.
- (45) Yang, B.; Lee, P. Y.; Hua, Y.; Brazile, B.; Waxman, S.; Ji, F.; Zhu, Z.; Sigal, I. A. Instant polarized light microscopy for imaging

- collagen microarchitecture and dynamics. *J. Biophotonics* **2021**, *14*, e202000326.
- (46) Felder, C. E.; Prilusky, J.; Silman, I.; Sussman, J. L. A server and database for dipole moments of proteins. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, W512-521.
- (47) Fernández-Vidal, M.; Jayasinghe, S.; Ladokhin, A. S.; White, S. H. Folding amphipathic helices into membranes: amphiphilicity trumps hydrophobicity. *J. Mol. Biol.* **2007**, *370*, 459-470.
- (48) Eisenberg, D.; Weiss, R. M.; Terwilliger, T. C. The helical hydrophobic moment: a measure of the amphiphilicity of a helix. *Nature* **1982**, *299*, 371-374.
- (49) Gautier, R.; Douguet, D.; Antonny, B.; Drin, G. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. *Bioinformatics* **2008**, *24*, 2101-2102.
- (50) Maleš, M.; Zoranić, L. Simulation Study of the Effect of Antimicrobial Peptide Associations on the Mechanism of Action with Bacterial and Eukaryotic Membranes. *Membranes* **2022**, *12*, 891.
- (51) Reißer, S.; Strandberg, E.; Steinbrecher, T.; Ulrich, A. S. 3D hydrophobic moment vectors as a tool to characterize the surface polarity of amphiphilic peptides. *Biophys. J.* **2014**, *106*, 2385-2394.
- (52) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33-38.

- (53) Fasman, D. G. Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules; Springer, New York, **1996**, 49.
- (54) Curreli, F.; Victor, S. M. B.; Ahmed, S.; Drelich, A.; Tong, X.; Tseng, C. K.; Hillyer, C. D.; Debnath, A. K. Stapled Peptides Based on Human Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Potently Inhibit SARS-CoV-2 Infection *In Vitro*. *mBio* **2020**, *11*, e02451-20.
- (55) Ahmad, A.; Millett, I. S.; Doniach, S.; Uversky, V. N.; Fink, A. L. Partially folded intermediates in insulin fibrillation. *Biochemistry* **2003**, *42*, 11404-11416.
- (56) Mazurenko, S.; Kunka, A.; Beerens, K.; Johnson, C. M.; Damborsky, J.; Prokop, Z. Exploration of Protein Unfolding by Modelling Calorimetry Data from Reheating. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16321.
- (57) Boyko, K. M.; Rakitina, T. V.; Korzhenevskiy, D. A.; Vlaskina, A. V.; Agapova, Y. K.; Kamashev, D. E.; Kleymentov, S. Y.; Popov, V. O. Structural basis of the high thermal stability of the histone-like HU protein from the mollicute *Spiroplasma melliferum* KC3. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36366.
- (58) Catanzano, F.; Gambuti, A.; Graziano, G.; Barone, G. Interaction with D-glucose and thermal denaturation of yeast hexokinase B: A DSC study. *J. Biochem.* **1997**, *121*, 568-577.
- (59) Tamura, A.; Sturtevant, J. M. A thermodynamic study of mutant forms of *Streptomyces subtilisin* inhibitor. I. Hydrophobic replacements at

- the position of Met103. *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 625-635.
- (60) Tamura, A.; Kojima, S.; Miura, K.; Sturtevant, J. M. A thermodynamic study of mutant forms of Streptomyces subtilisin inhibitor. II. Replacements at the interface of dimer formation, Val13. *J. Mol. Biol.* **1995**, *249*, 636-645.
- (61) Lim, A. R.; Cho, J. Growth, structure, phase transition, thermal properties, and structural dynamics of organic-inorganic hybrid $[\text{NH}_3(\text{CH}_2)_5\text{NH}_3]\text{ZnCl}_4$ crystal. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 16901.
- (62) Lemmerer, A. Thermochromic Phase Transitions of Long Odd-Chained Inorganic-Organic Layered Perovskite-Type Hybrids $[(\text{C}_n\text{H}_{2n+1}\text{NH}_3)_2\text{PbI}_4]$, $n = 11, 13$, and 15 . *Inorg. Chem.* **2022**, *61*, 6353-6366.
- (63) Zhang, Y. P.; Lewis, R. N.; Hodges, R. S.; McElhaney, R. N. Interaction of a peptide model of a hydrophobic transmembrane α -helical segment of a membrane protein with phosphatidylethanolamine bilayers: differential scanning calorimetric and Fourier transform infrared spectroscopic studies. *Biophys. J.* **1995**, *68*, 847-857.
- (64) Wu, F. G.; Jia, Q.; Wu, R. G.; Yu, Z. W. Regional cooperativity in the phase transitions of dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: the lipid tail triggers the isothermal crystallization process. *J. Phys. Chem. B* **2011**, *115*, 8559-8568.
- (65) Han, J. H.; Kim, J. S.; Park, J. K.; Lee, K. W.; Jin, J. I.; Choi, E. H.; Lee, C. E. Nuclear magnetic resonance study of the smectic-

- cholesteric phase transition in a dimesogenic liquid crystal. *Curr. Appl. Phys.* **2014**, *14*, 1356-1359.
- (66) Sasahara, K.; Naiki, H.; Goto, Y. Kinetically controlled thermal response of beta2-microglobulin amyloid fibrils. *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 700-711.
- (67) Makhatadze, G.I.; Privalov, P.L. Energetics of protein structure. *Adv Protein Chem.* **1995**, *47*, 307-425.

補足資料

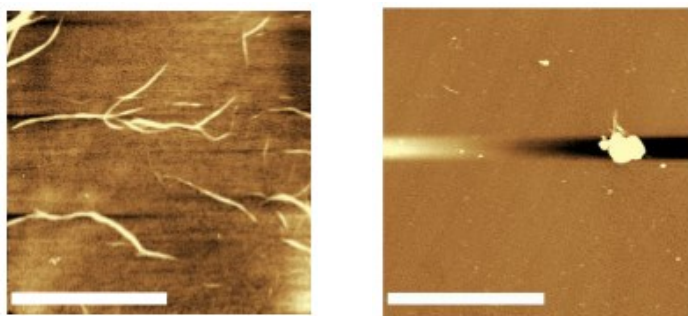


Figure S1. (a) α 3CF と (b)HDM3CF の pH 6 における AFM 観察画像. (Scale bar = 5.0 μ m)

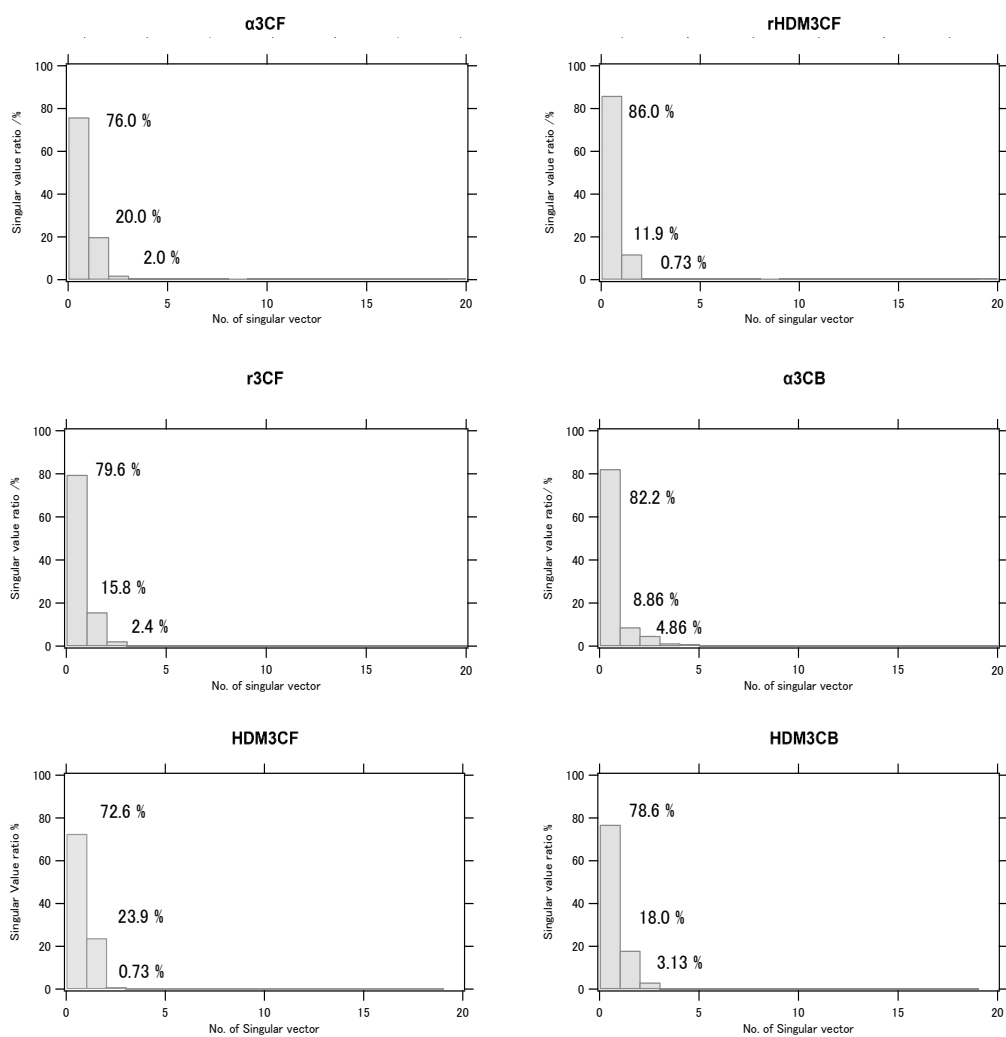


Figure S2. CD を用いた 0℃から 95℃までの昇温実験から得られたスペクトルを SVD 分析して得られた特異行列の対角成分の累積寄与率の推移を示したグラフ。

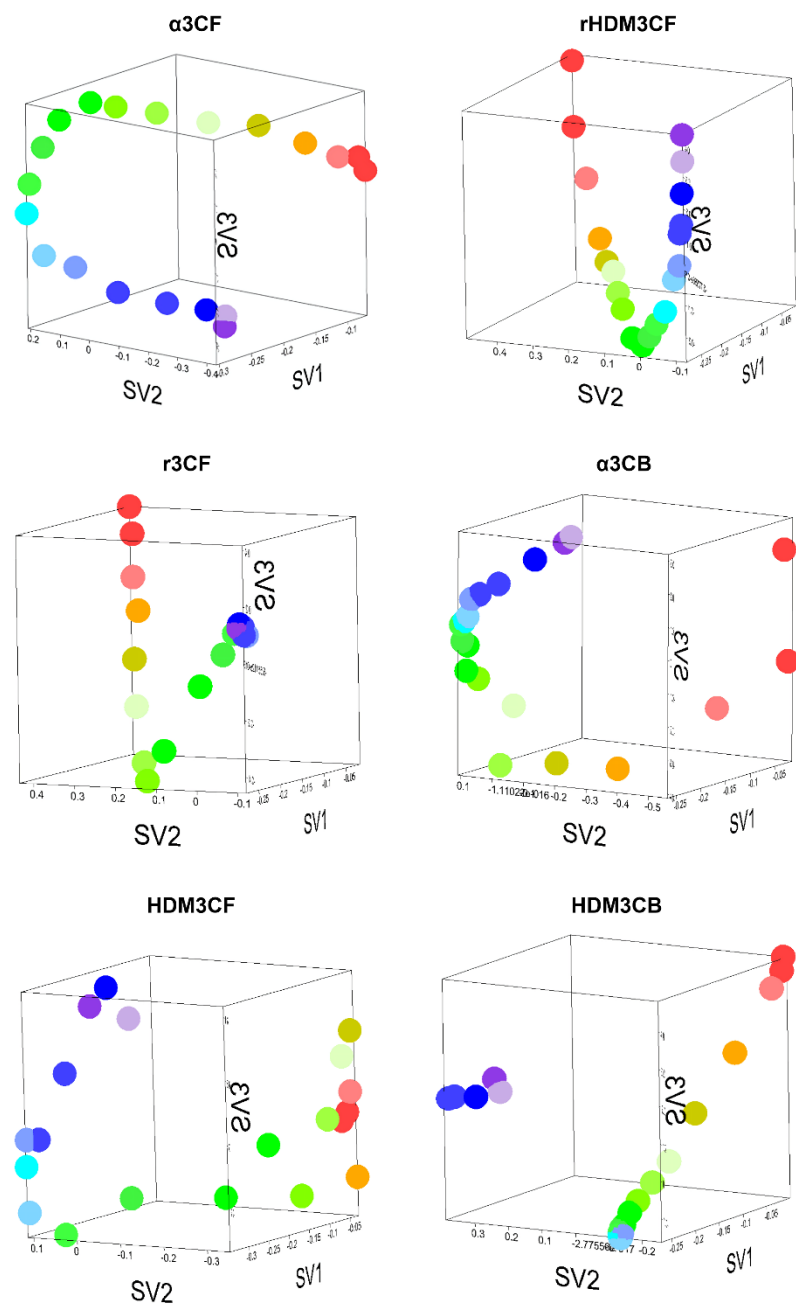


Figure S3. CD を用いた 0 °C から 95 °C までの昇温実験から得られた 20 セットのスペクトルに対する 3 次元 SVD プロット. 右特異行列の 1 列目 (SV1)、2 列目 (SV2)、3 列目 (SV3) を示す (紫から赤へと温度が上昇 : 0 から 95 °C) .

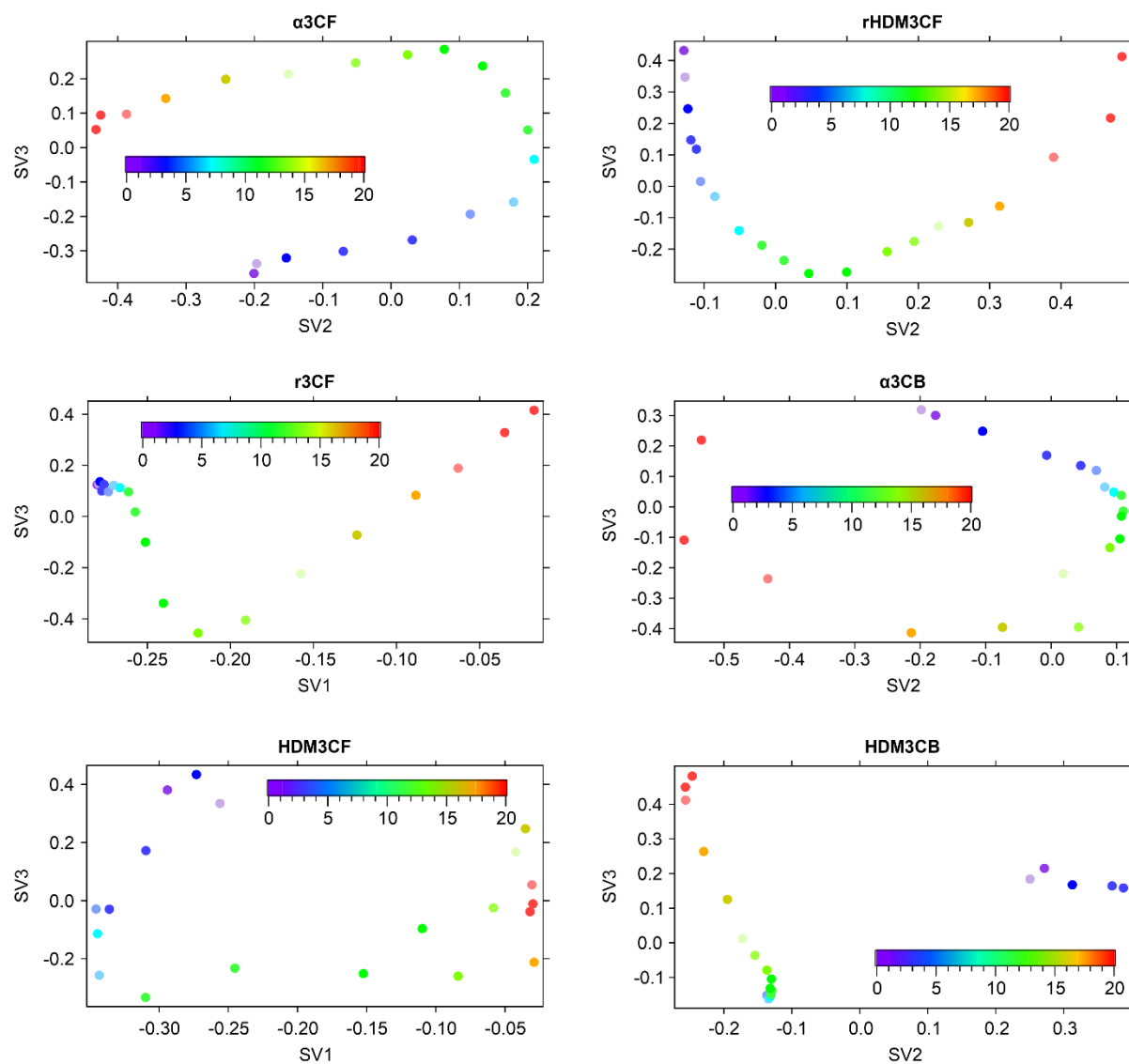


Figure S4. 0 °C から 95 °C までの CD スペクトルの温度変化測定の結果を対象に SVD 解析を行って得た SV1、SV2、SV3 の値をプロットした図. 温度変化が最も顕著な切断面を使用.

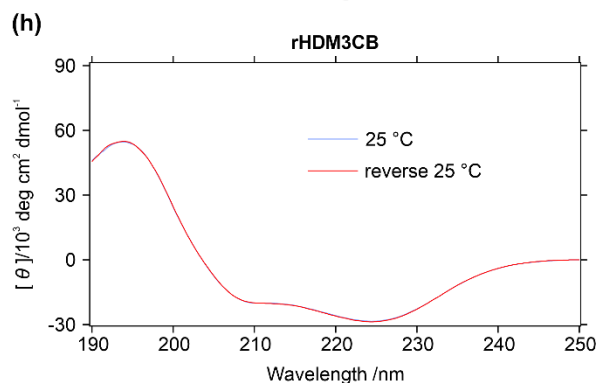
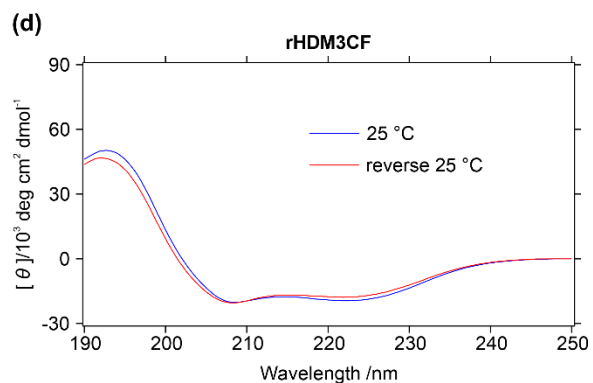
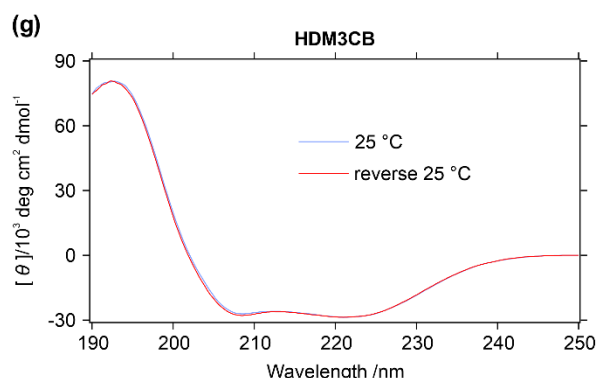
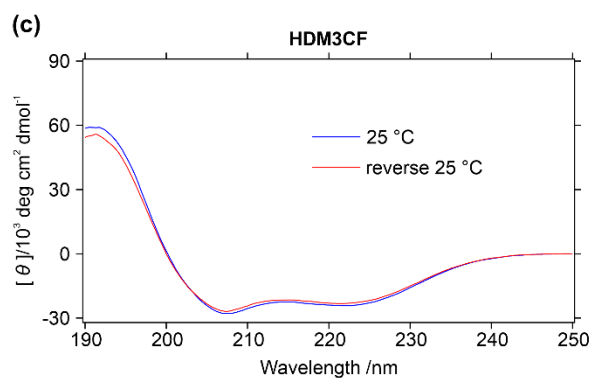
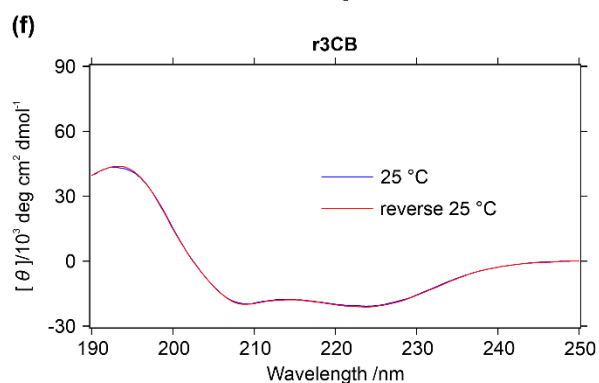
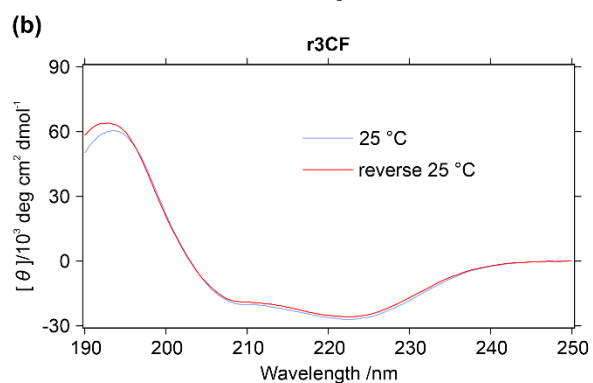
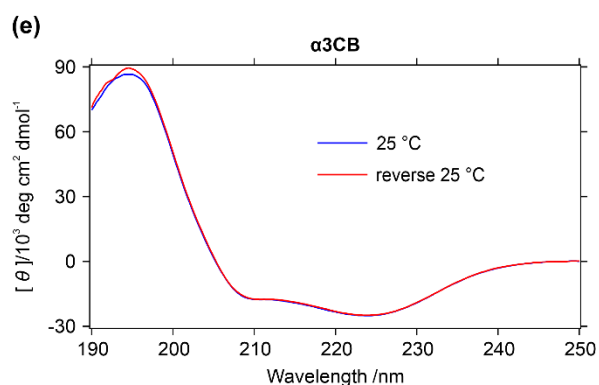
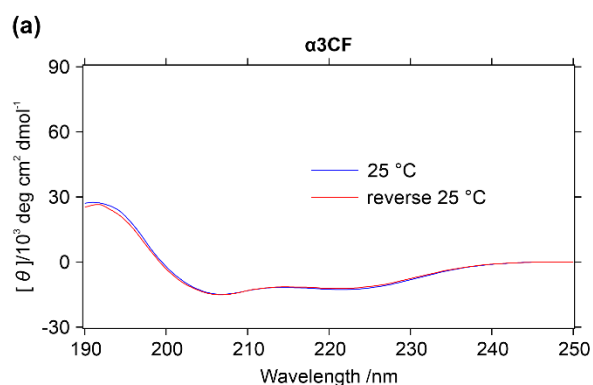


Figure S5. CD スペクトルの可逆性（青：昇温前 25℃、赤：昇温後 25℃）. (a) α 3CF, (b) r3CF, (c) HDM3CF, (d) rHDM3CF, (e) α 3CB, (f) r3CB, (g) HDM3CB, (h) rHDM3CB.

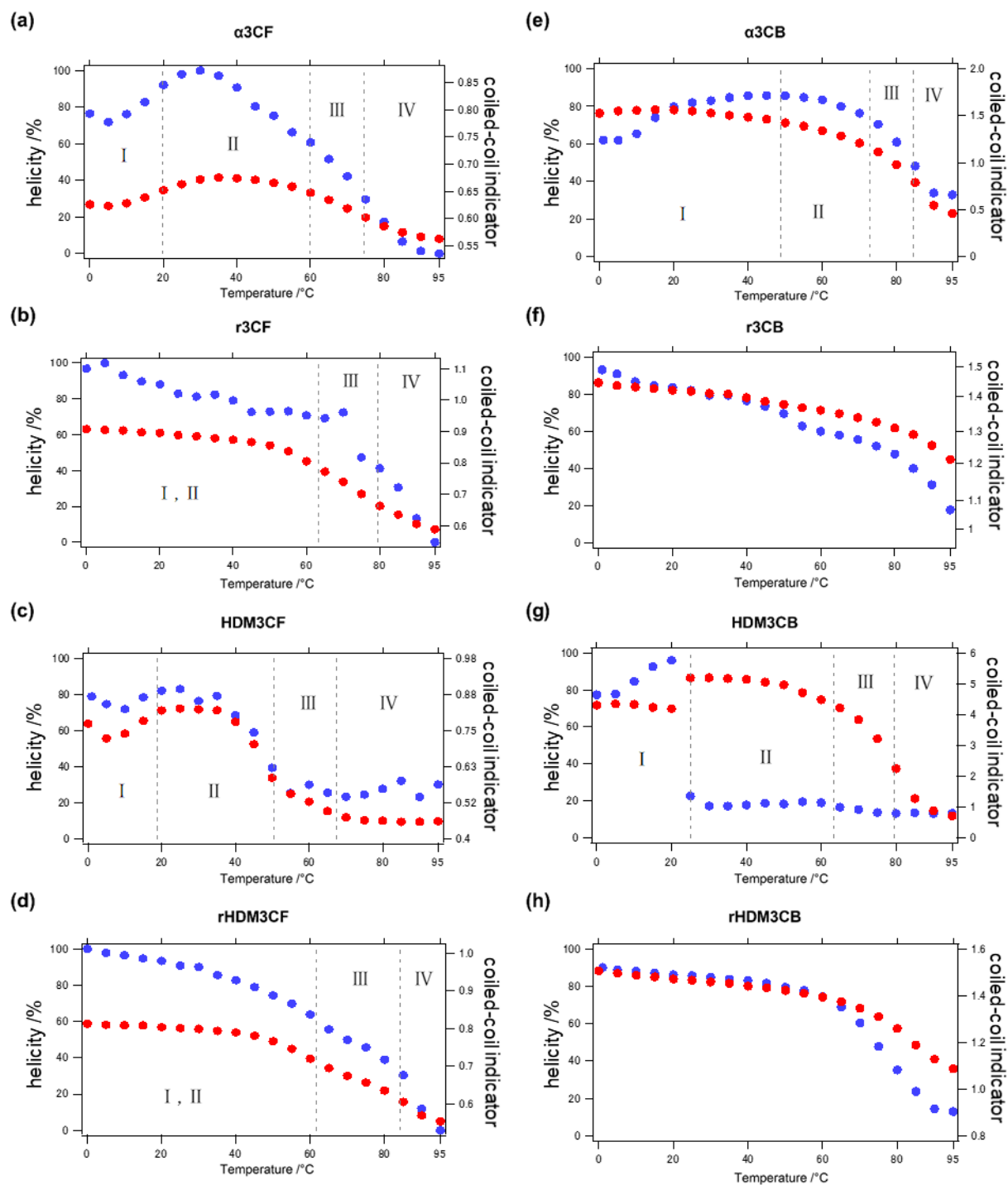


Figure S6. CD を 0℃から 95℃まで昇温させた実験から得られた、helicity と coiled-coil indicator の温度変化. 赤（左縦軸）：helicity、青（右縦軸）：coiled-coil indicator. 破線は Table 3 で定義した相間の転移温度を示す. (a) α 3CF, (b) r3CF, (c) HDM3CF, (d) rHDM3CF, (e) α 3CB, (f) r3CB, (g) HDM3CB, (h) rHDM3CB.

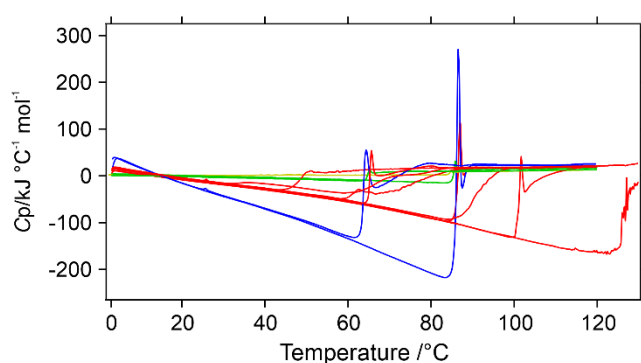


Figure S7. 全 8 種のペプチドの DSC サーモグラムを重ねたグラフ. 昇温速度で色分けしている（青：90℃/hr、赤：60℃/hr、緑：30℃/hr、黄：15℃/hr）.

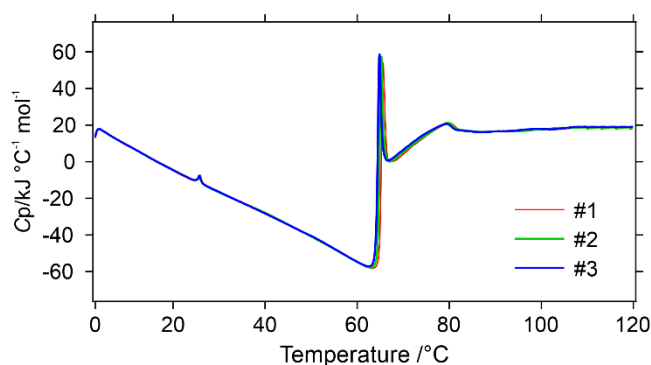


Figure S8. HDM3CB を用いた DSC 測定における可逆性の確認（昇温速度 60 °C/hr）. スキャンは#1 から#3 までの 3 回繰り返した.

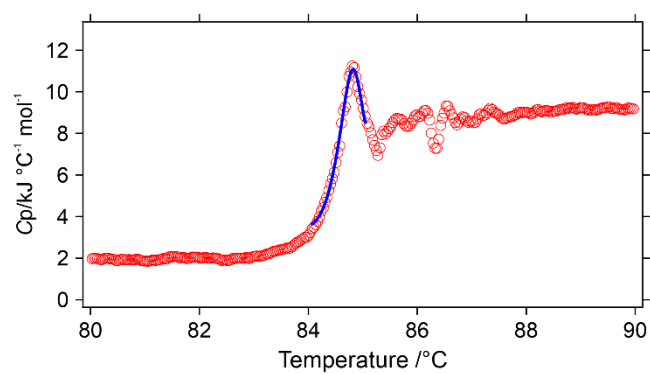


Figure S9. 昇温速度 15 °C/h における α 3CB の DSC サーモグラム（赤点）と理論曲線へのフィッティング（青線）。

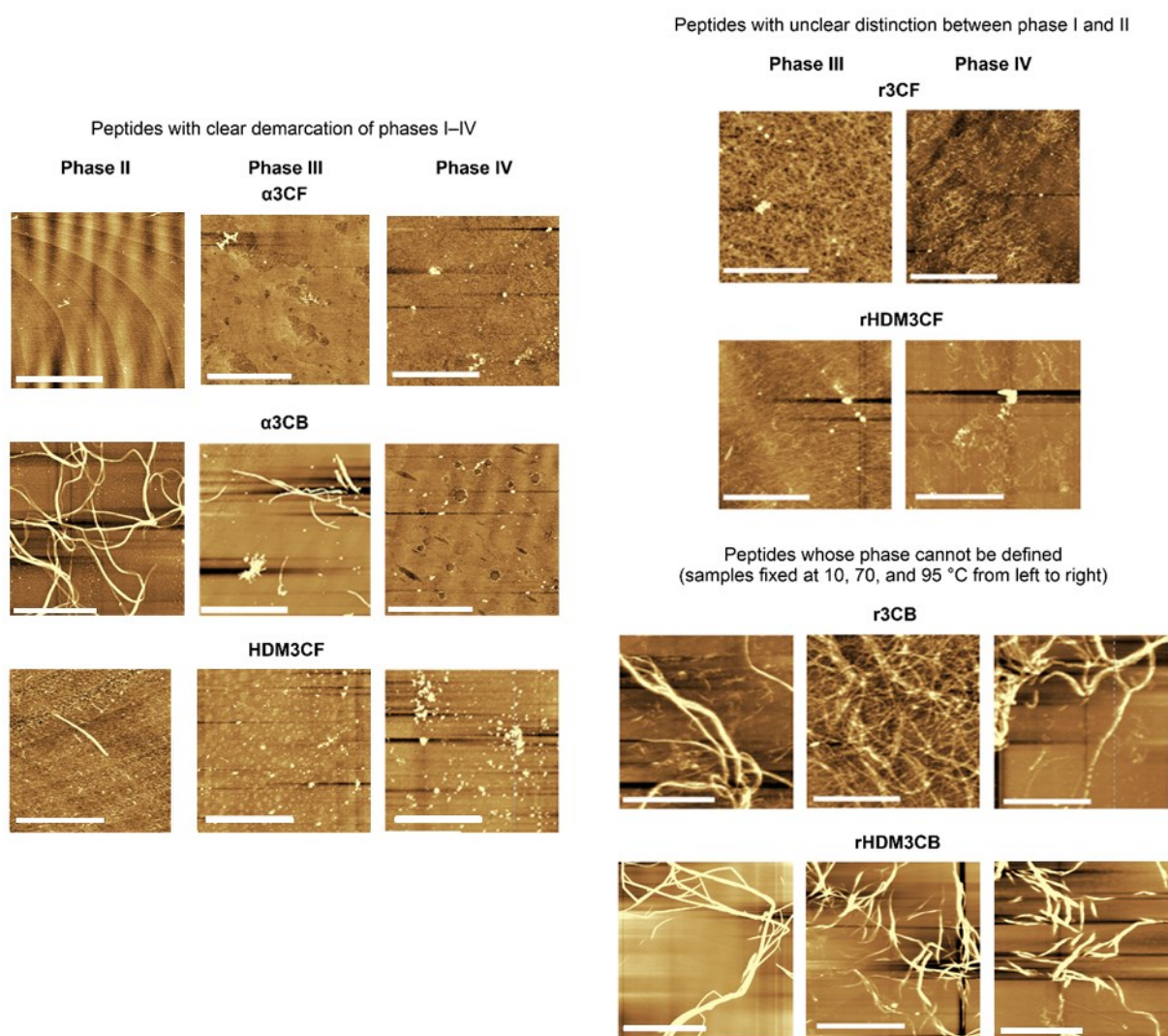


Figure S10. 各ペプチドの各相について、異なる温度で固定したサンプルの AFM 観察の結果. 温度が高くなるにつれて会合体の形態が小さくなるか、細かくなることが明らかになった. (Scale bar = 5.0 μm)

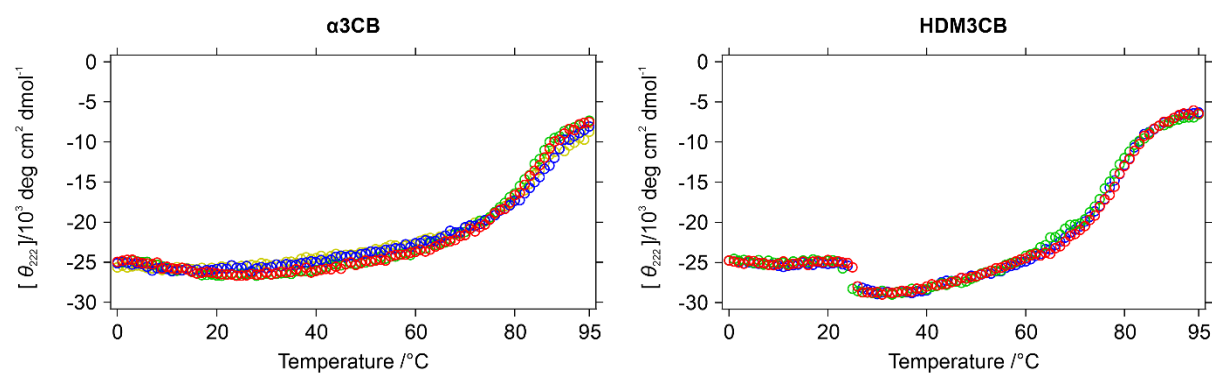


Figure S11. 異なる昇温速度で測定した波長 222nm におけるモル平均楕円率の温度変化. (青 : 90 $^{\circ}\text{C/hr}$ 、赤 : 60 $^{\circ}\text{C/hr}$ 、緑 : 30 $^{\circ}\text{C/hr}$ 、黄 : 15 $^{\circ}\text{C/hr}$)

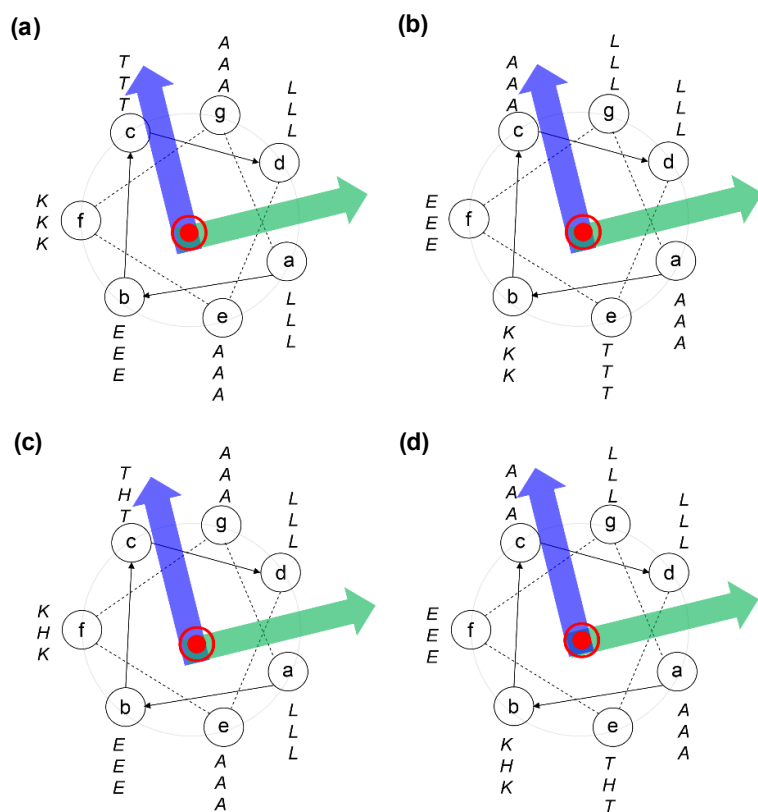


Figure S12. 3次元疎水モーメントの計算に使用した3次元座標. (a) α 3CF と α 3CB, (b) r3CF と r3CB, (c) HDM3CF と HDM3CB, (d) rHDM3CF と rHDM3CB.