

2021 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080003

參展科別 生物化學

作品名稱 香豆素(Coumarin)及其衍生物對人類胰島類澱粉蛋白(IAPP)聚集之影響

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 江慧玉、杜玲嫻

作者姓名 李昀臻、孫筠筑

關鍵詞 香豆素、胰島類澱粉蛋白、螢光強度

作者簡介



大家好，我們是北一女中數理資優班的李昀臻和孫筠筑。對於蛋白質與有機分子間的交互作用充滿好奇的我們，在這一年的實驗室生活裡，雖然遇到了許多困難，但每一次困難都讓我們不斷地成長蛻變，也使我們更加投入於研究主題中。

在研究過程中，感謝大學端教授不吝提供資源與建議，還有先後陪伴我們進行實驗、講解許多實驗技術與知識的學長姊，最後是在這一年內不間斷支持我們的專研老師。因為有了他們的協助，我們才有機會站上國際科展的舞台！

摘要

目前已有研究指出：胰島類澱粉蛋白(islet amyloid polypeptide；簡稱 IAPP)的不正常堆疊與聚集，與罹患第二型糖尿病有很大的關聯。本研究使用一系列有機物香豆素(coumarin)分子，觀測其對胰島類澱粉蛋白聚集之影響；我們成功地自行合成出高純度的 IAPP 分子，將其與經光學性質篩選過的香豆素有機物，進行硫磺素-T 動力學試驗，並輔以電子顯微鏡、圓偏光二色光譜進一步瞭解有機小分子對於 IAPP 結構之影響。實驗結果得知：具較高極性基團或取代基之香豆素系列分子，可抑制 IAPP 聚集成纖維；且具特定官能基結構者可有效改變 IAPP 之纖維型態。期待透過本研究探討有機分子與蛋白質作用之機制，進一步為糖尿病病症提供治療方法與途徑。

Abstract

Recently, studies have pointed out that stacking and aggregation of islet amyloid polypeptide (IAPP) are considered related to Type 2 diabetes. In this study, IAPP is synthesized and purified successfully. Later on, a series of coumarin compounds are conducted on optical features and then be reacted with IAPP by Thioflavin-T kinetic test. We observed the structure of organic samples and IAPP by transmission electron microscope and circular dichroism spectrum. Finally, we confirmed that coumarin compounds with more polar substituents could inhibit IAPP aggregation. At the same time, coumarin molecules with the specific functional group could change the appearance of the fibers of IAPP. It is hoped that through this research, exploring the reaction mechanism between organic molecules and proteins could further provide programs and approaches for the treatment of Type 2 diabetes.

壹、前言

一、研究動機

世界衛生組織統計，全球約有4.22億人口為糖尿病患者¹，其中多數為第二型糖尿病。由胰島β-細胞所分泌的胰島類澱粉蛋白(IAPP)，當其不正常聚集時會影響胰島素分泌，因此被認為與罹患第二型糖尿病有極高的關聯性²。從文獻得知：香豆素系列分子對於阿茲海默症相關的β澱粉樣蛋白(amyloid beta, Aβ)具有抑制其聚集的效果³⁻⁴，Aβ與IAPP同屬類澱粉蛋白，因此我們想探討具有不同官能基之香豆素系列分子，對於IAPP纖維積聚之影響。

二、研究原理

(一) 類澱粉蛋白纖維生成機制

目前科學界對於類澱粉蛋白纖維形成機制尚無定論，但其中以成核依賴性聚集(Nucleation-dependent polymerization)最廣為科學家認同。蛋白質藉由單體(monomer)自組裝為寡聚物(oligomers)，進一步形成核種再形成中間體(intermediates)，最終形成纖維(fibrils)。

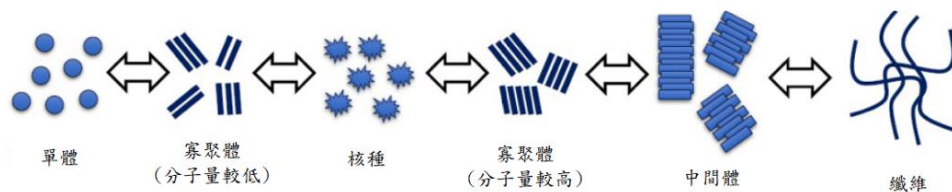


圖1-1 類澱粉蛋白聚集過程⁵

(二) 有機分子對類澱粉蛋白纖維的影響

文獻中多有探討有機分子對於類澱粉蛋白造成抑制或加速聚集之作用。在圖1-2中，路徑(a)是藉由抑制劑穩定單體使IAPP無法自組裝，或使單體形成不具毒性之摺疊物(路徑(b))；或者將纖維降解為寡聚體或單體(路徑(d)、(e))，或者路徑(f)經結合以防止纖維增長等⁷。

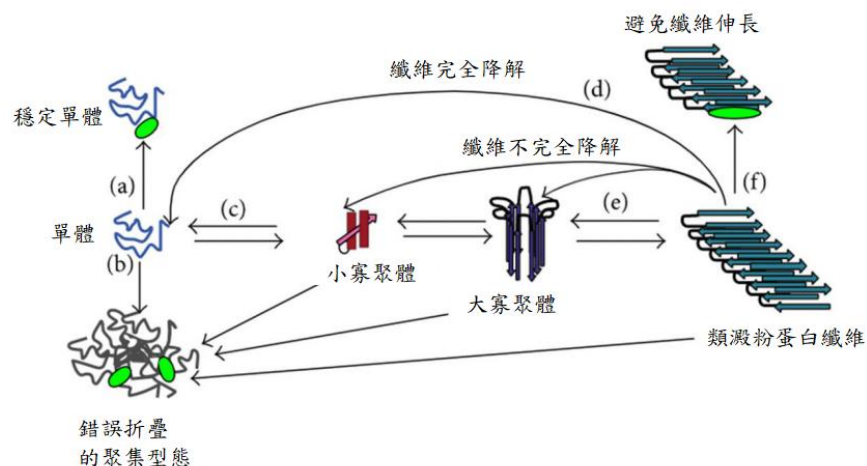


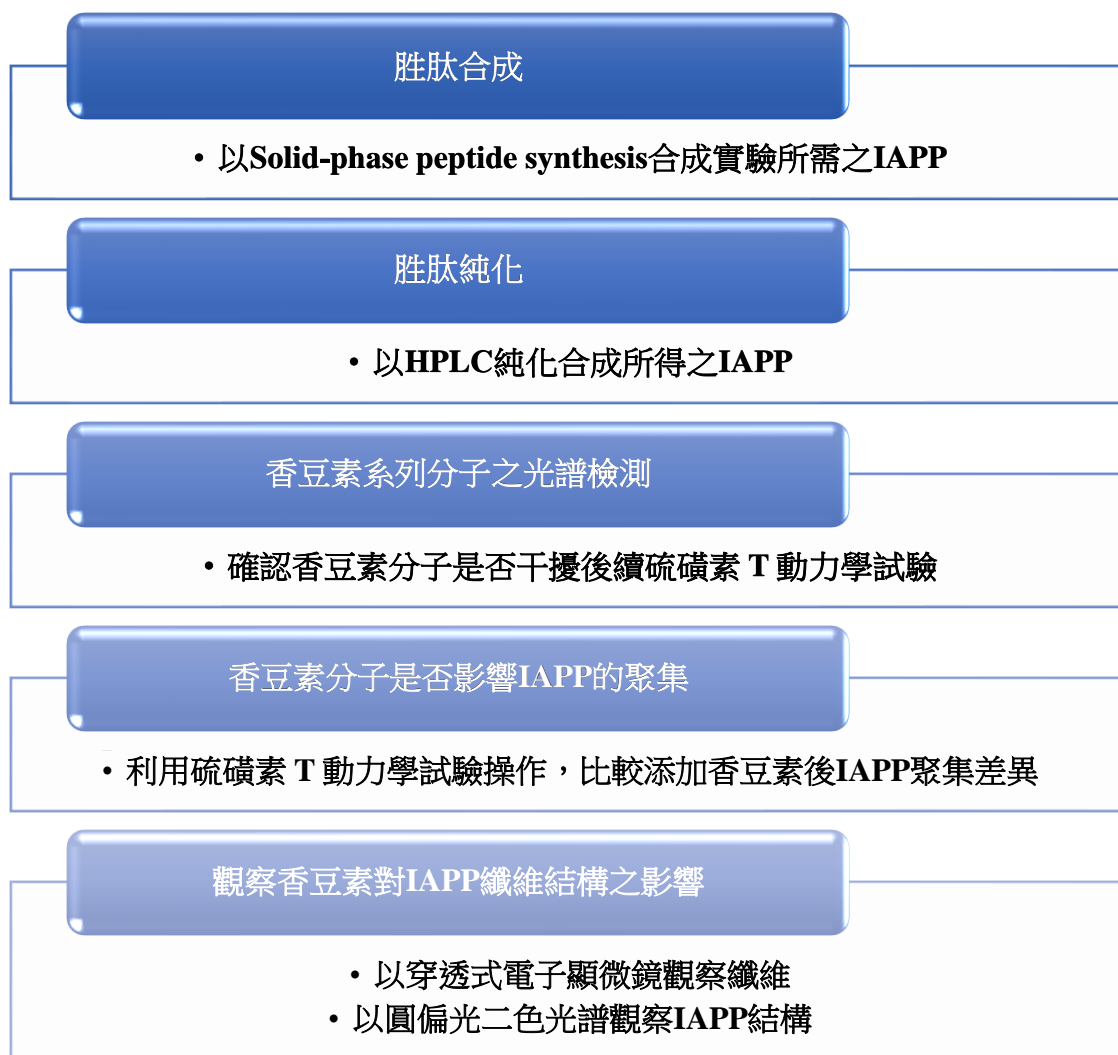
圖1-2 有機分子對類澱粉蛋白纖維的影響機制⁶

三、 研究目的及研究問題

- (一) 香豆素及其衍生物對於 IAPP 抑制效果之檢測
- (二) 探討且歸納香豆素系列分子中能抑制 IAPP 聚集之特徵

貳、 研究方法或過程

一、 研究架構



二、 研究設備與器材

- (一) 全自動微波輔助固相胜肽合成儀(CEM Liberty Lite)
- (二) 逆相高效液相層析儀(JASCO PU-4180-(LPG))
- (三) 超音波震盪器(Delta DC150)
- (四) 凍乾機(UNISS FDM-2)
- (五) 桌上型高速離心機(Hitachi CT15RE)

- (六) 全波長偵測儀(Molecular Devices SpectraMax M2)
- (七) 冷螢光盤式讀取儀(Hidex Sense Microplate Reader)
- (八) 多功能程控溫培養儀(Eppendorf ThermoMixer C)
- (九) 基質輔助雷射脫附離子化-飛行時間質譜(Bruker New ultrafleXtreme TM)
- (十) 穿透式電子顯微鏡(Hitachi H-7100)
- (十一) 圓偏光二色性光譜儀(JASCO J-715)
- (十二) 紅外光譜儀(Bruker INVENIO)

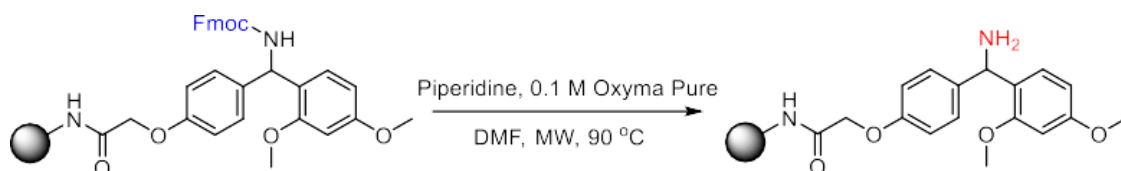
三、研究過程

(一) 胜肽合成

※步驟

1. 秤取 0.278 g 合成用樹脂置於試管中，加入 15 mL 二甲基醯胺 (Dimethylformamide, DMF)，浸泡 30 分鐘使樹脂膨鬆後再置入合成儀的瓶內。接著依序配製下列溶液；配製完成再將溶液置入合成儀內開始反應。

(1) 去除 Fmoc 保護基：將 0.1 M 2-脲基乙酸酯 (Ethyl isonitrosocyanoacetate, Oxyma) 溶於 10%(w/v) 哌啶 (Piperidine) 及含 10%無水乙醇的 N-甲基吡咯烷酮 (N-Methyl-2-pyrrolidone, NMP)中。



(2) Activator：組成為 0.25 M N,N'-二異丙基碳亞醯胺 (N,N'-Diisopropylcarbodiimide, DIC) 溶於 DMF。

(3) Activator base：組成為 0.5 M Oxyma 溶於 DMF。

(4) 合成所使用之反應物如表(一)所示，且皆溶於 DMF 中。

表(一) 合成所使用的胺基酸種類

Reagent	Volume (mL)	Mass (g)	Reagent	Volume (mL)	Mass (g)
Alanine	8	0.50	Histidine	3	0.38
Arginine	4	0.52	Isoleucine	4	0.29
Asparagine	15	1.80	Leucine	5	0.36
Leucine & Serine	4	0.38	Alanine & Threonine	4	0.36

Cysteine	5	0.59	Phenylalanine	4	0.31
Glutamine	2	0.25	Lysine	4	0.38
Glycine	4	0.24	Serine	8	0.62
Threonine	13	1.04	Tyrosine	4	0.37
Valine	7	0.48			

- 配製裂解試劑(組成為 92.5%三氟乙酸(Trifluoroacetic acid, TFA)、2.5% 3,6-二氧 -1,8-辛烷二硫醇(3,6-Dioxa-1,8-octanedithiol, DODT)、2.5%三異丙基矽烷 (Triisopropylsilane, TIS) 及 DDI water 2.5% 5 mL); 將胜肽泡於裂解試劑 3 小時後, 過濾、再使用氮氣吹乾 TFA, 接著添加乙醚使固體析出、過濾後即可得到固體的胜肽初產物。

※原理

以 piperidine 將去除樹脂 Fmoc 保護基, 而後將已利用 DIC 活化的胺基酸的羧酸基與去保護的樹脂之胺基進行偶合反應, 再使用 piperidine 去除前一個胺基酸 N 端 Fmoc 保護基, 再接上下一個活化過的胺基酸羧酸基, 並重複此循環。由於合成後的胜肽 C 端仍接在樹脂上且胺基酸側鏈仍有保護基, 因而需利用裂解反應, 將側鏈保護基以裂解試劑和清除劑固定, 以免再次與胜肽反應或修飾, 以得到所需之胜肽。

(二) 胜肽純化

※步驟

- 將合成所得之 IAPP 初產物以 9 mL、50 % (v/v) 醋酸溶解。使用 1.1 倍當量的碘 (I_2 / 0.0667 M MeOH) 逐滴加入, 攪拌 15 分鐘。再以 50 μ L、1 M 維生素 C 終止氧化反應。將上述溶液離心, 取上澄液再經過濾後補足去離子水, 此為待純化試樣。
- 利用 HPLC 分離合成的胜肽, 以確保實驗胜肽樣品的純度。HPLC 分析條件如下表(二), 進行一次分離純化的步驟。

表(二) HPLC 純化胜肽之分析條件

項目	說明或規格
管柱	10 μ m 的 PROTO C18 半製備柱(10 mm x 250 mm)
移動相	A 溶液: 1 L DDI water 及 900 μ L 6N HCl
溶液	B 溶液: 1 L 80% ACN(in DDI water)及 900 μ L 6N HCl
注入試樣	待純化試樣

- 將一次純化後的 IAPP 定重, 以 5 mg/ 1 mL 1,1,1,3,3,3-六氟代-2-丙醇 (HFIP) 處理過夜並凍乾。將凍乾粉末以 A 溶液回溶。離心取其上澄液, 再過濾後補足去離子水, 將其

注入 HPLC 進行二次純化。

(三) 香豆素系列分子的光譜檢測

1. 香豆素樣品共 29 件，將樣品編號為【1~29】。以二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO) 為溶劑，分別將其配製為 8 mM 溶液；若有溶解度較差的樣品則淘汰。
2. 使用 10 mM 三羥甲基胺烷 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)，將步驟 1 的溶液稀釋為 80 μ M，再將溶解不全的樣品淘汰。
3. 取上述溶液進行吸收光譜（波長範圍：250 nm~750 nm）及放射光譜（以 435 nm 激發，偵測波長範圍：450~650 nm）的測定。

(四) 檢驗香豆素分子是否影響 IAPP 的聚集

※步驟

1. 將已凍乾之 IAPP 加入 Tris Buffer 溶解，並利用蛋白質濃度分析法(BCA protein assay kit) 測得配置的 IAPP 濃度。
2. 依序以 15 μ M 硫磺素-T(Thioflavin T, ThT)、80 μ M 香豆素系列分子以及 25 μ M IAPP 配置溶液。將上述溶液每孔 50 μ L 注入 384 微量孔盤並放入冷螢光盤式讀取儀進行硫磺素-T 動力學試驗。

※原理

在圖 2-1 中可見當 ThT 引入類澱粉蛋白纖維的交錯 β -sheet 結構時，透過 435 nm 激發，會在 470~490 nm 有很強的螢光訊號。

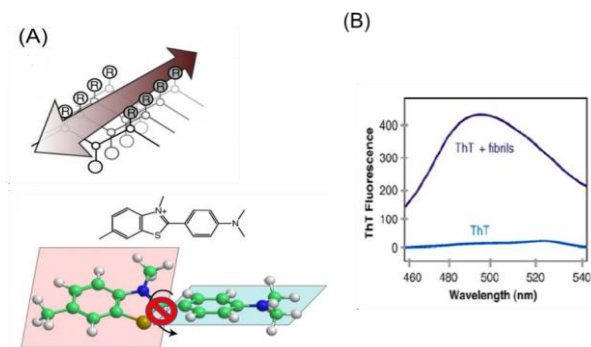


圖2-1 ThT 偵測機制⁸

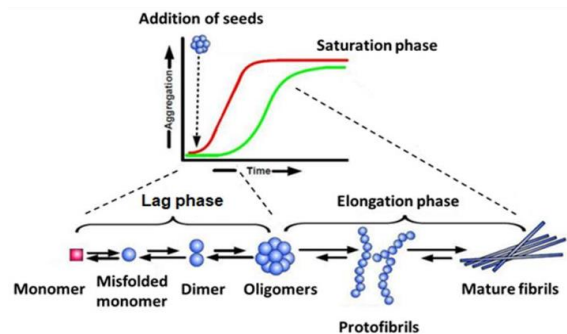


圖2-2 ThT 試驗中類澱粉蛋白纖維之形成⁹

蛋白質纖維形成過程中，ThT 的螢光訊號隨時間變化呈 S 曲線，見圖 2-2。在曲線前段訊號尚未增強的階段，代表纖維正從單體自組裝，其中訊號開始增強的時間點我們將稱之為延遲時間(lag time)，其後當纖維與單體之間的數量達到動態平衡後，螢光訊號達到平衡，我們稱之為最終強度(final intensity)。

(五) 使用電子顯微鏡瞭解分子間的交互作用

※步驟

先以 10 μL 乙醇(Ethanol)清洗銅網表面並使用濾紙去除液體，取 10 μL 實驗樣品置於銅網上靜置 1 分鐘，使樣品附著在銅網上後，除去多餘液體。最後使用 10 μL 、2%乙酸鈾鹽(Uranium acetate, UA) 進行負染 1 分鐘，吸取多餘液體便可進行 TEM 觀察。

※原理

由於穿透式電子顯微鏡的電子束對蛋白質樣品的穿透度相當高，若直接觀察易使影像對比度過低而無法明確觀察纖維型態，因此為增強影像對比度，我們將樣品以重金屬染劑負染，使重金屬染劑沉積於樣品周圍，達到增強影像對比度的效果。

(六) 使用圓偏光二色(CD)光譜了解分子對蛋白質纖維二級結構影響

※步驟

1. 將已凍乾之 IAPP 加入 Tris Buffer 溶解，並利用蛋白質濃度分析法(BCA protein assay kit) 測得配置的 IAPP 濃度。
2. 以 Tris Buffer 配製含 80 μM 香豆素系列分子及 25 μM IAPP 之溶液。
3. 將上述溶液 300 μL 注入路徑長為 1 mm 的石英比色皿，並進行 CD 光譜測試。

※原理

蛋白質的二級結構可透過偵測特定波長下的 $\Delta\epsilon$ (莫耳圓二色性，molar circular dichroism) 來判斷。以 $\Delta\epsilon$ 為 Y 軸，波長為 X 軸下作圖所得到的圖譜在 190-200 nm 間有一最低點訊號時代表蛋白質為不定型型態(Random coil)；當圖譜在 208 nm 和 222 nm 處各有一低點訊號時代表蛋白質為 α -螺旋(α -helix)；當蛋白質為 β -摺板(β -sheet)時在圖譜中約 218 nm 處會有一低點訊號。

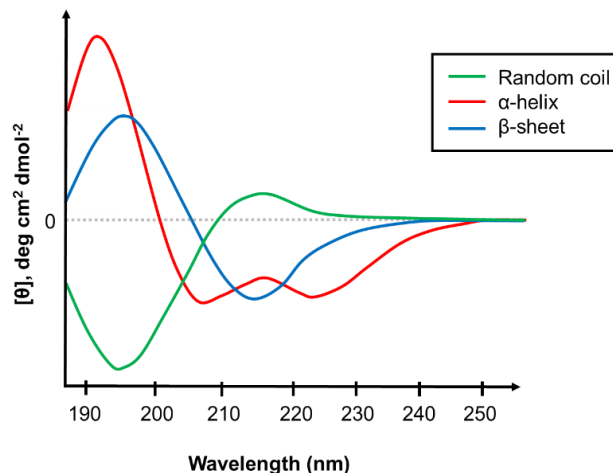


圖2-3 CD 光譜二級結構示意圖

參、 研究結果與討論

一、 胜肽合成及純化

※結果

(一) 成功合成出 167 mg IAPP 初產物，可供後續探討香豆素系列分子與 IAPP 作用之實驗。



圖3-1 合成所得之 IAPP 經凍乾後呈白色粉狀

IAPP 序列：

KCNTATCATQ LRANFLVHSS

NNFGAILSST NVGSNTY

(二) IAPP 初產物的純化及質譜鑑定：

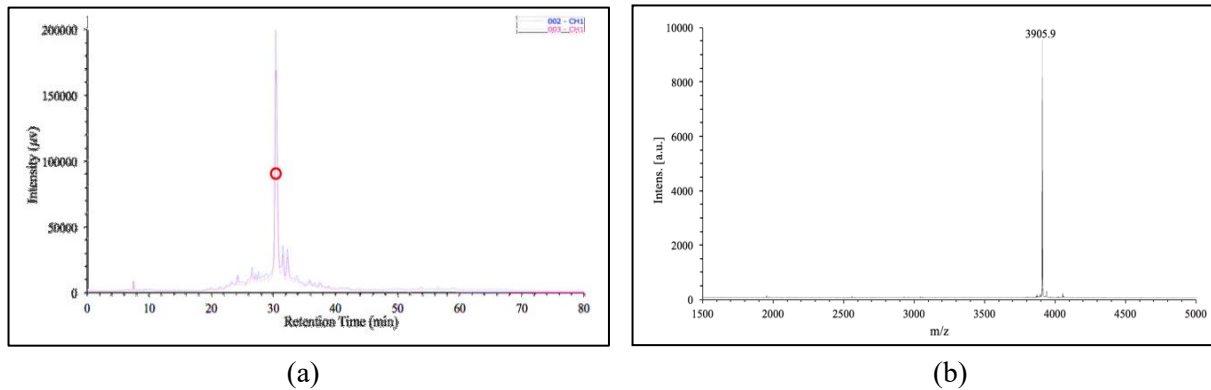


圖3-2 分離且確認 IAPP 初產物 (a) HPLC 圖譜；(b)MS 圖譜

在圖 3-2 的 HPLC 分析，我們採用同一 IAPP 樣品兩次注入的方式，分別得到兩次分析疊加(紅色與藍色)之圖譜。其中標記紅色的訊號峰為合成所得之 IAPP；我們進一步使用質譜進行鑑定，由分析結果可得知分子量為 3905.9，與理論值相近，證明我們成功地合成出所需的 IAPP。

(三) 氧化 IAPP 的純化及質譜鑑定：

合成 IAPP 時，初產物的 IAPP 序列第2號及7號的半胱胺酸並未以-S-S-鍵連接，但在人體內的 IAPP 序列第2號及7號的半胱胺酸是以-S-S-鍵連接。因此在純化初產物後，我們藉由氧化處理，使 IAPP 的中第2號及7號序列能夠以-S-S-鍵連接，如下示意。

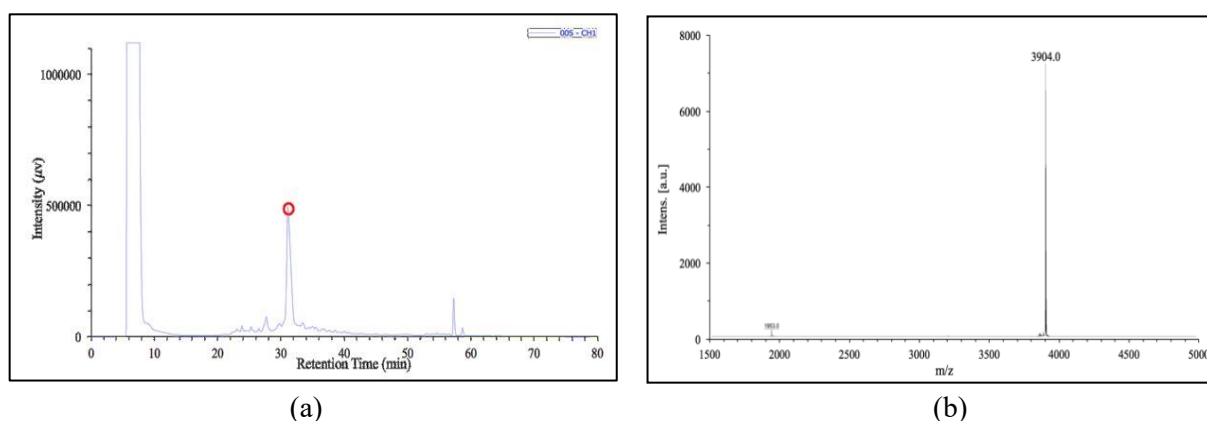
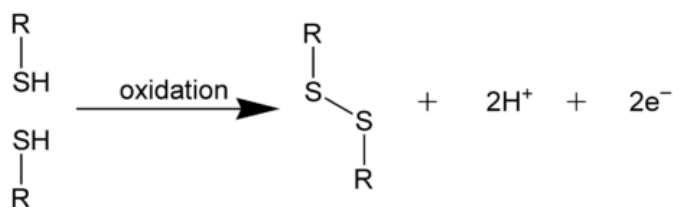


圖3-3 分離且確認氧化型 IAPP (a) HPLC 圖譜 ; (b)MS 圖譜

氧化處理後的 IAPP 再次以 HPLC 及質譜鑑定，如圖3-3。圖譜峰值與初產物結果比對，並確認氧化 IAPP 之分子量(3904.0)與理論值3903.27相近，驗證成功合成取得氧化型 IAPP。

※討論

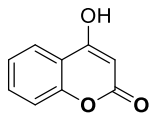
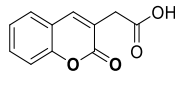
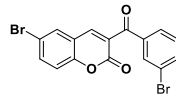
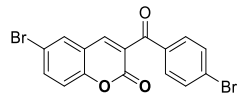
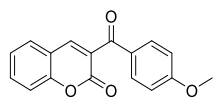
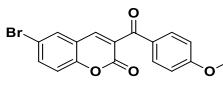
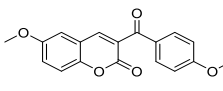
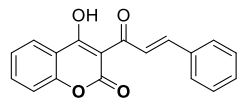
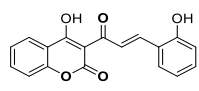
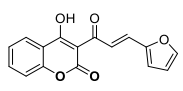
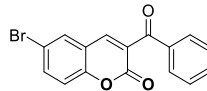
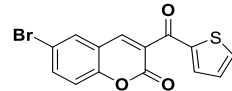
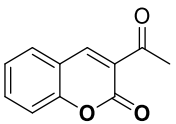
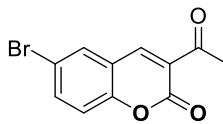
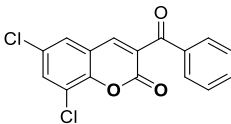
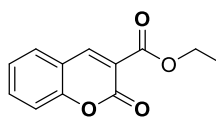
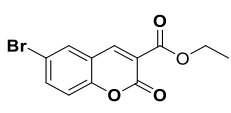
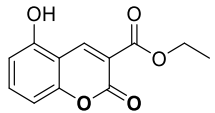
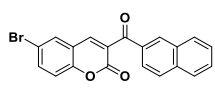
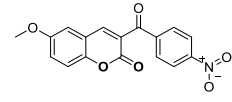
由 IAPP 胺基酸序列：KCNTATCATQ LRANFLVHSS NNFGAILSST NVGSNTY 可得知其分子式為 $\text{C}_{164}\text{H}_{262}\text{N}_{49}\text{O}_{55}\text{S}_2$ ，因此經由計算，可得知我們所合成的 IAPP 其分子量應為 3905.27，氧化態則為3903.27。

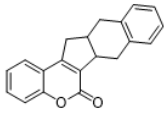
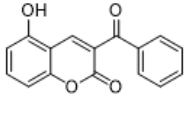
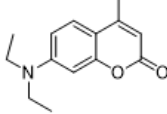
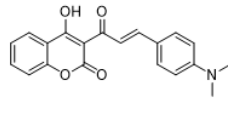
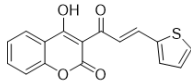
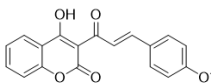
二、 香豆素系列分子之光譜檢測：

我們經由文獻得知：硫磺素 T 動力學試驗 IAPP 時，使用 435 nm 激發後，會在 470~490 nm 得到強烈的螢光訊號，事先檢測香豆素系列分子的光譜性質，避免香豆素系列分子自身光學性質影響後續實驗。

※結果

表(三) 香豆素系列分子之光譜檢測結果 (光譜圖譜詳見附錄一)

編號	S1	S2	S3	S4
結構				
吸收波長(nm)	284	274	無明顯吸收	無明顯吸收
以435nm 激發後 放射波長(nm)	509	無明顯放射峰	509.6	無明顯放射峰
編號	S5	S6	S7	S8
結構				
吸收波長(nm)	293	311	301	271
以435nm 激發後 放射波長(nm)	無明顯放射峰	無明顯放射峰	無明顯放射峰	509
編號	S9	S10	S11	S12
結構				
吸收波長(nm)	無明顯吸收	無明顯吸收	286	無明顯吸收
以435nm 激發後 放射波長(nm)	508.2	509	511.2	508
編號	S13	S14	S15	S16
結構				
吸收波長(nm)	283	286	292	280
以435nm 激發後 放射波長(nm)	無明顯放射峰	無明顯放射峰	508.6	無明顯放射峰
編號	S18	S19	S20	S23
結構				
吸收波長(nm)	284	268	無明顯吸收	無明顯吸收

以435nm 激發後 放射波長(nm)	498.8	494	無明顯放射峰	510.4
編號	S24	S25	S26	S27
結構				
吸收波長(nm)	320	440	430	430
以435nm 激發後 放射波長(nm)	無明顯放射峰	無明顯放射峰	470	580
編號	S28	S29		
結構				
吸收波長(nm)	350	340		
以435nm 激發後 放射波長(nm)	560	無明顯放射峰		

※討論

(一) 樣品的篩選：

在樣品篩選的部分，我們將其分為多個階段：

1. 第一階段：使用 DMSO 配置 8 mM 的有機分子溶液。我們將溶解不完全、具懸浮物的 S17、S22 兩樣品淘汰。
2. 第二階段：以 Tris buffer 稀釋第一階段的溶液，將溶解不全的 S21 樣品淘汰。

(二) 光譜結果分析：

經由光譜檢測，香豆素系列分子之光學性質整理如下表所示：

表(四) 有機分子光學性質與 ThT 試驗之整理

有機分子光學性質 影響 ThT 試驗 (與 ThT 試驗重疊)	吸收波長	S25、S27
	放射波長	-
	吸收波長、放射波長	S26
有機分子光學性質不顯著 (無明顯吸收或放射峰)		S2、S3、S4、S5、S6、S7、S9、 S10、S12、S13、S14、S16、S20、 S23、S24、S25、S29
有機分子光學性質不影響 ThT 試驗		S1、S8、S11、S15、S18、S19、S28

三、香豆素分子與 IAPP 之關係

(一) 硫磺素-T 動力學實驗

在硫磺素-T 動力學實驗中，我們利用 ThT 與 IAPP 纖維結合後的螢光訊號變化及螢光訊號增強的延遲時間(lag time)，初步判斷加入香豆素系列分子後的 IAPP 纖維形成狀況。

※結果

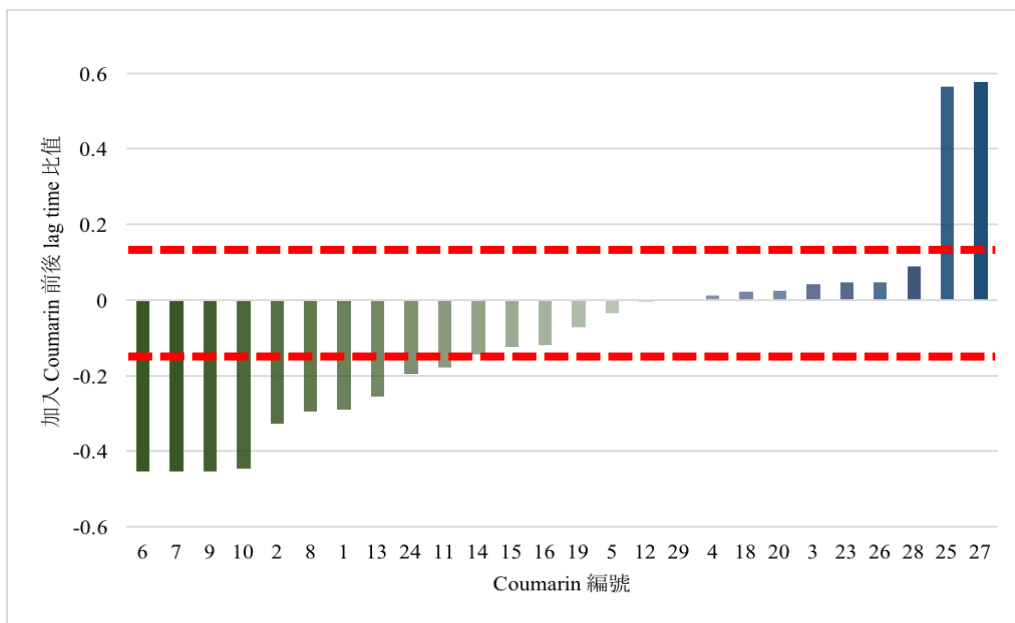


圖3-4(a) 各樣品延遲時間之 $\frac{t_s - t_{IAPP}}{t_{IAPP}}$ 比較

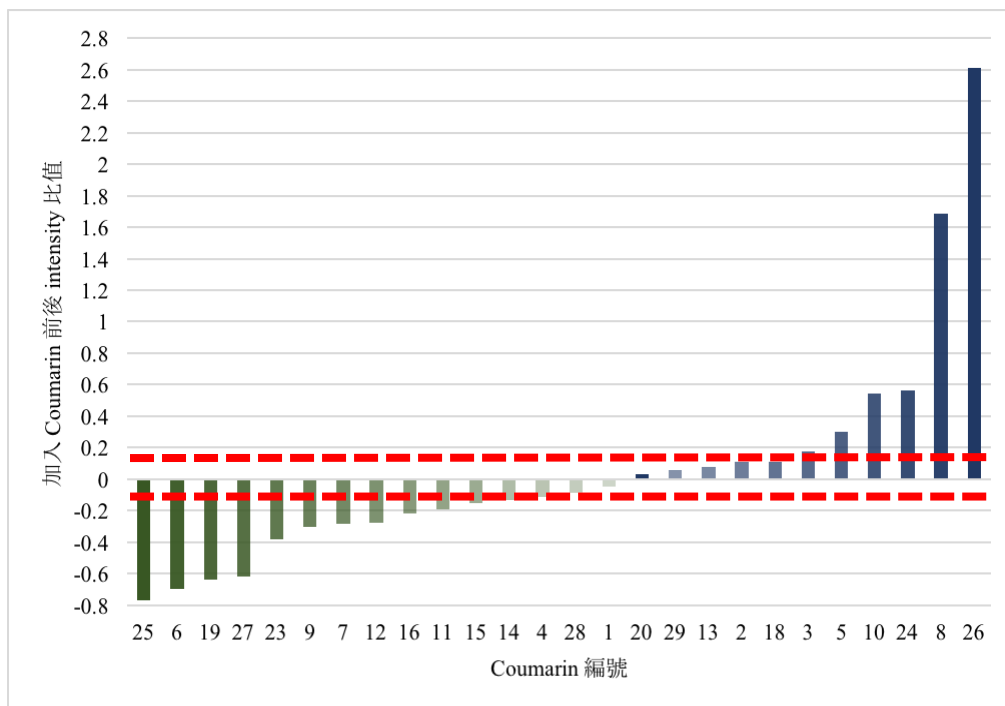


圖3-4(b) 各樣品螢光強度之 $\frac{I_s - I_{IAPP}}{I_{IAPP}}$ 比較

※討論

我們將實驗過程中前後一小時的螢光訊號值進行相對比值計算，當比值 $< 8\%$ 表示 IAPP 單體尚未形成寡聚體。將每小時上升的螢光訊號進行比值運算，當訊號增加比值 $> 8\%$ 時，以此時間點作為 IAPP 的延遲時間(Lag time)。此外，我們擷取系統達平衡時，IAPP 聚集成最大量纖維的螢光強度(Intensity)；當螢光訊號強度較純 IAPP(IAPP only)為低時，表示此有機分子可抑制 IAPP 聚集，使 ThT 分子不易結合放出螢光。

1. 延遲時間 (以 t 表之)與螢光強度(以 I 表之)：

(1) 在圖 3-4(a)中計算公式為 $t = \frac{t_s - t_{IAPP}}{t_{IAPP}}$ ；比值大於 0 者，表示該有機分子會延緩 IAPP 纖維的形成；反之，比值小於 0 則表示有機分子會加速 IAPP 纖維的生長，使 ThT 更容易接上 IAPP 聚集結構，提早放出螢光。

(2) 添加有機分子比較螢光強度的變化，如圖 3-4(b)。計算式為： $I = \frac{I_s - I_{IAPP}}{I_{IAPP}}$ ，當其比值大於 0，顯示螢光強度增強，即該有機分子可促進 IAPP 聚集成為纖維。

2. 添加香豆素系列分子於 IAPP 中，與當次 IAPP only 之延遲時間(t)、螢光強度(I)相互比較，其比值在 ± 0.15 區間內(如圖3-4中的紅色虛線標示)我們將其視為沒有變化，當螢光比值 I 小於 -0.15 表示為螢光訊號降低，比值 I 大於 0.15 視為螢光訊號上升；當時間比值 t 小於 -0.15 表示 IAPP 加速聚集，大於 0.15 則表示 IAPP 抑制聚集。

表(五) 有機分子影響 IAPP 聚集之分析比較

ThT 動力學試驗		螢光強度(I)		
		上升 ($I > 0.15$)	下降 ($I < -0.15$)	沒有影響 (± 0.15 區間內)
延遲時間(t)	加速($t < -0.15$)	S8、S10、S24	S6、S7、S9、S11	S1、S2、S13
	延緩($t > 0.15$)	-	S25、S27	-
	沒有影響 (± 0.15 區間內)	S5、S26	S12、S15、S16、 S19、S23	S3、S4、S14、 S18、S20、28、S29

3. 實驗結果差異探討：

(1) 在之前的光譜測試中，我們發現 S26 吸收波長為 430 nm，且在 470~490 nm 處也有放射，因此 S26 與 IAPP 之實驗組的螢光強度明顯較其他樣品高出許多。

(2) 綜合表(四)與表(五)的實驗結果,我們挑選再現性較佳的樣品如下:加速 IAPP 聚集的 S8、大幅降低螢光強度的 S19, 以及大幅增加延遲時間的 S27 等代表樣品。針對上述三種樣品與 IAPP 之作用機制分述如下:

① S8 與 IAPP :

如圖 3-5a, 加入 S8 有機分子後, IAPP 放出螢光訊號的 Lag time 明顯提前, 顯示其可加速 IAPP 之聚集。由於 S8 分子具有較低極性之支鏈取代基, 推測可與 IAPP 單體之疏水性殘基相互吸引, 拉近單體間的距離, 進而加速形成纖維。

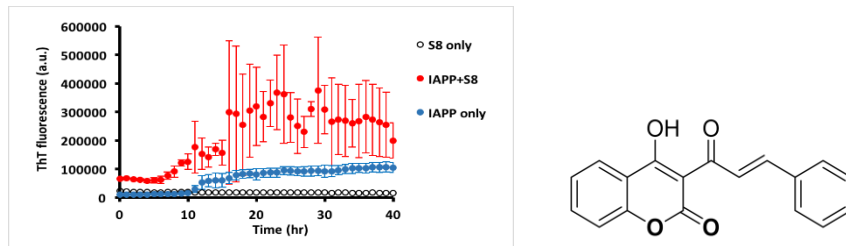


圖3-5(a) 有機分子 S8之硫磺素-T動力學實驗結果

② S19 與 IAPP :

加入 S19 有機分子後, IAPP 的螢光強度明顯降低。我們在 IAPP only 培養 48 小時達平衡後加入 S19, 發現其螢光強度瞬間下降(圖 3-5(b)右), 可以推測 IAPP 與 S19 間的親和力較與 ThT 強, 使得 ThT 不易與 IAPP 結合, 因而強度降低。

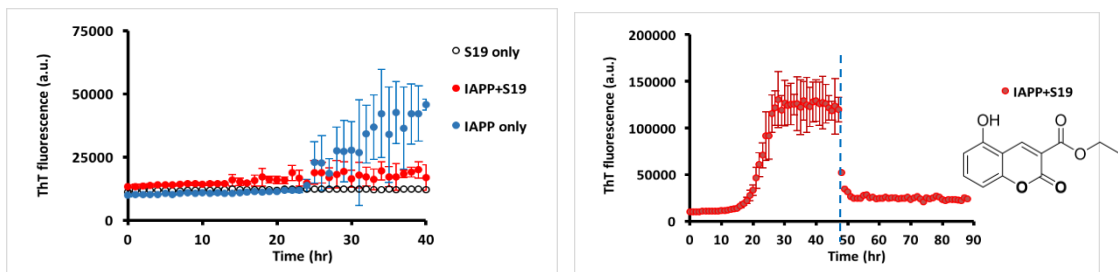


圖3-5(b) 有機分子 S19之硫磺素-T動力學實驗結果

③ S27 與 IAPP :

由於加入 S27 之 IAPP 延遲時間增加, 推測因其分子結構中具有共軛雙鍵的極性基團, 可與 IAPP 纖維末端極性基團形成氫鍵, 使 IAPP 纖維不易增長, 以致延遲時間延後。

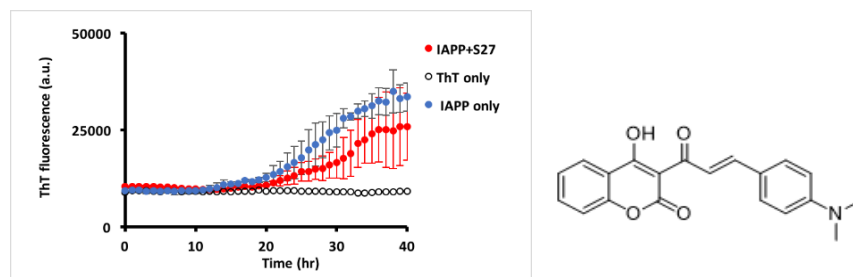


圖3-5(c) 有機分子 S27之硫磺素-T動力學實驗結果

綜合上述，S8、S19 及 S27 樣品對於 IAPP 之影響各有不同。從分子結構觀察，發現此三分子在結構 3 號位置皆具有取代基團，除羰基外，S8 具有低極性烴基、S19 左端具極性羥基(-OH)且右端有較低極性之酯基(-COO-)、S27 則延伸出可共振之極性團。此三者結構上的差異使其對於 IAPP 的作用效果迥異，顯示有機分子對於 IAPP 的作用機制主要還是取決於分子與分子間的作用力。

4. 由硫磺素 T 動力學試驗結果發現：S19 與 S27 皆可降低 IAPP 與 ThT 的螢光強度，為了解有機分子濃度與螢光強度之關係，因此我們選擇改變 S19 的添加比例以進行硫磺素 T 動力學試驗，如圖3-6所示。隨著 S19 濃度增加，螢光強度漸減，顯示此試驗具有濃度依賴性。

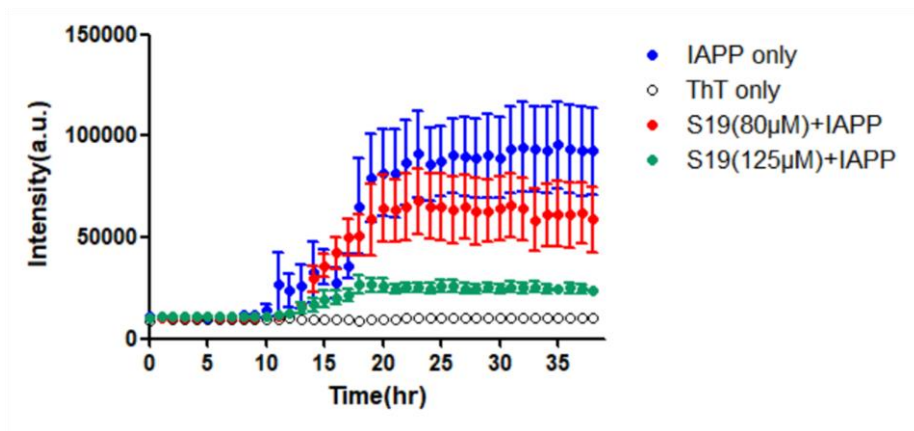


圖 3-6 有機分子濃度對螢光強度之影響

(二) 電子顯微鏡(TEM)觀察聚集現象

我們採用電子顯微鏡更直觀地觀察香豆素系列分子對於 IAPP 纖維結構之影響。

※結果

1. S8 與 IAPP：有機分子 S8 使得動力學實驗中螢光強度增強；比較將 IAPP 培養 5 小時檢測之 TEM，可見 S8 分子使 IAPP 更快加速聚集形成纖維，如下圖。

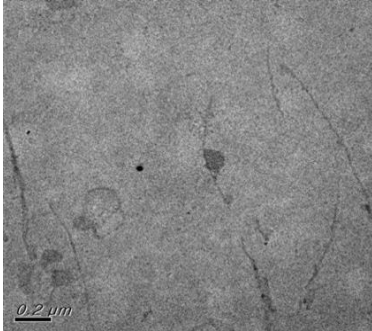


圖3-7(a) 純 IAPP 之 TEM

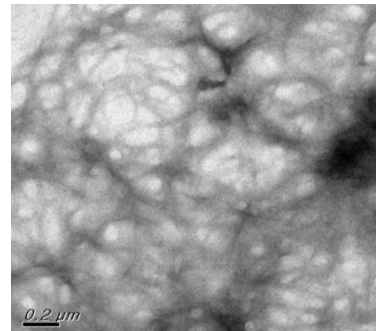


圖3-7(a') 添加 S8之 IAPP 之 TEM

2. S19 與 IAPP：有機分子 S19 使得動力學實驗中螢光強度降低；比較將 IAPP 培養 48 小時檢測的 TEM，在 S19 存在下 IAPP 分子仍可持續生長聚集成纖維。

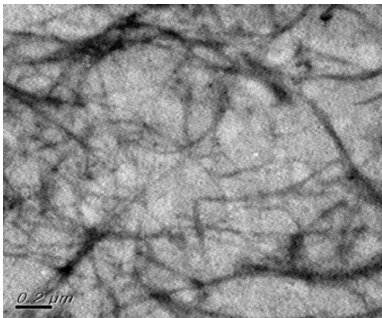


圖3-7(b) 純 IAPP 之 TEM

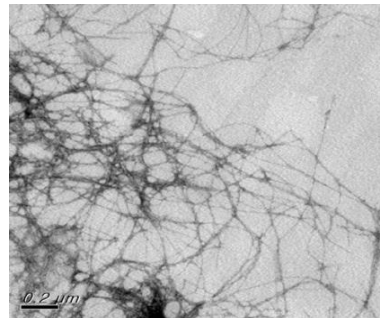


圖3-7(b')添加 S19之 IAPP 之 TEM

3. S27 與 IAPP：有機物 S27 使螢光強度降低；比較將 IAPP 培養 10 小時檢測的 TEM，可看出 S27 使得 IAPP 纖維較不易形成長纖維，而多以短纖維形式存在。

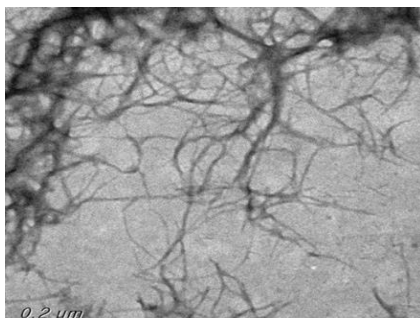


圖3-7(c) 純 IAPP 之 TEM

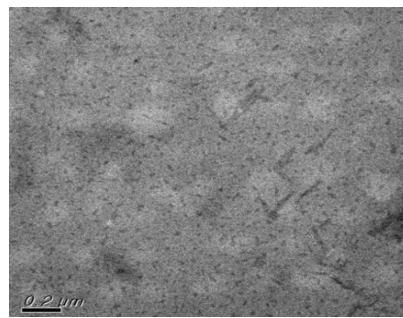


圖3-7(c')添加 S27之 IAPP 之 TEM

※討論

1. 從硫磺素-T 動力學試驗中，可觀察到 S8 可使螢光放射較純 IAPP 更早發生，而藉由電子顯微鏡觀察，發現在純 IAPP 纖維尚未形成時(圖 3-7(a))，加入 S8 的 IAPP 早已形成完整的纖維(圖 3-7(a'))。「由於 S8 分子具有較低極性之支鏈取代基，可與 IAPP 單體之疏水性殘基相互吸引，拉近單體間的距離，加速形成纖維」，此推論與 TEM 結果相符。
2. 有機 S19 樣品使螢光強度下降。藉由電子顯微鏡觀察發現：不論有無加入 S19 (圖 3-7(b) 與(b'))，IAPP 的纖維仍生長相當完整。我們認為 S19 分子兩端各有不同極性之取代基，使其與 IAPP 間的親和力較 IAPP 與 ThT 分子之間為強，這使得 ThT 不易與 IAPP 結合，因而螢光強度降低。
3. 從硫磺素-T 試驗中得知 S27 可使螢光強度下降；藉由電子顯微鏡觀察，當加入 S27 後的 IAPP 纖維，多呈短纖維型態 (圖 3-7(c'))。參考文獻，我們認為 S27 分子可經由圖 3-8 所示意之路徑，以其結構中的共軛雙鍵基團與 IAPP 纖維之極性基團間形成氫鍵，使其不易形成長纖維。

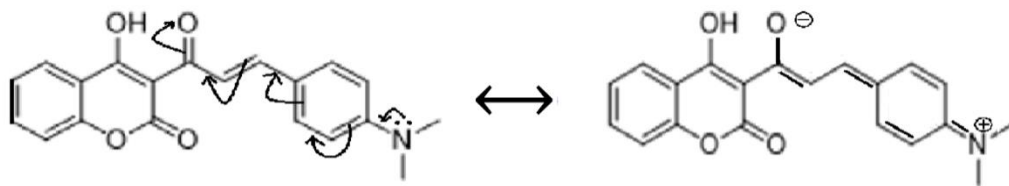


圖3-8 有機分子 S27之電子共振示意

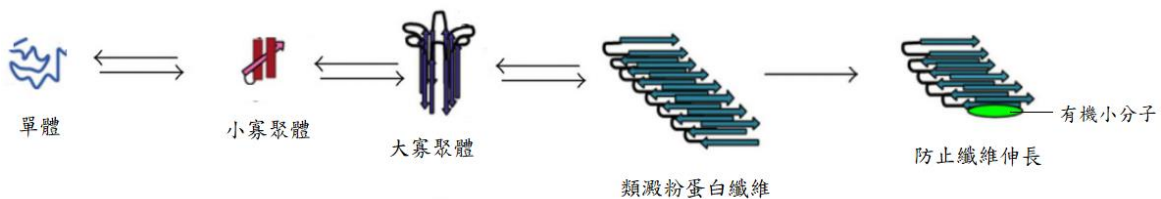


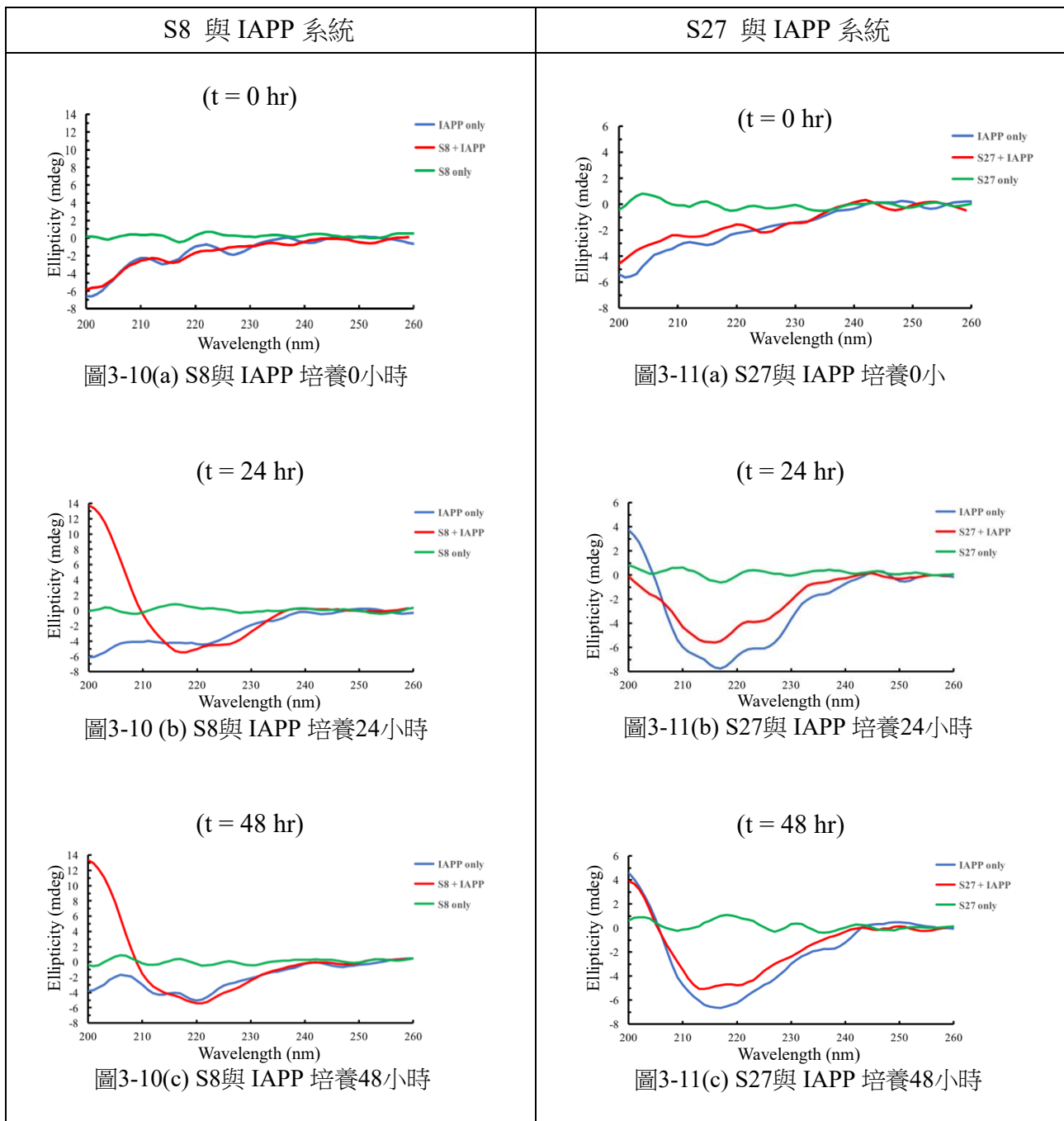
圖3-9 有機分子 S27抑制 IAPP 生長之路徑

(三) 圓偏光二色(CD)光譜觀察蛋白質纖維的結構

由於硫磺素-T 動力學主要是依據 IAPP 之 β -sheet 纖維結構，來判斷 IAPP 是加速或延緩聚集，因此我們進一步採用 CD 光譜來探討 S8、S27 與 IAPP 結構間之關係。

1. 蛋白質為不定型態(Random coil)：CD 圖譜在 190-200 nm 有最低點訊號
2. 蛋白質為 α -螺旋(α -helix)：在 208 nm 和 222 nm 各有一低點訊號。
3. 蛋白質為 β -摺板(β -sheet)：在 218 nm 處會有低點訊號。

※結果



※討論

將實驗所得之 CD 圖譜數據利用 Bestsel 網站進行數據分析，分述如下：

1. S8 與 IAPP：

表(六) S8 與 IAPP 系統中，IAPP 形成 β -sheet 所占之比例(%)

項目	t = 0 hr	t = 24 hr	t = 48 hr
IAPP only(%)	26	28	34.6
S8+IAPP(%)	17.8	94.5	94.5

(1)綜合 CD 圖譜與表(六)可知：S8+IAPP 之 β -sheet 比例於 24 小時便大量提升，且明顯高於 IAPP only，證明有機 S8 分子的確可加速 IAPP 纖維的聚集。

(2)藉由 IR 光譜檢測得知：S8+IAPP 與 IAPP only 之光譜幾乎相同，顯示有機分子 S8 可加速 IAPP 聚集，但不影響 IAPP 纖維結構。

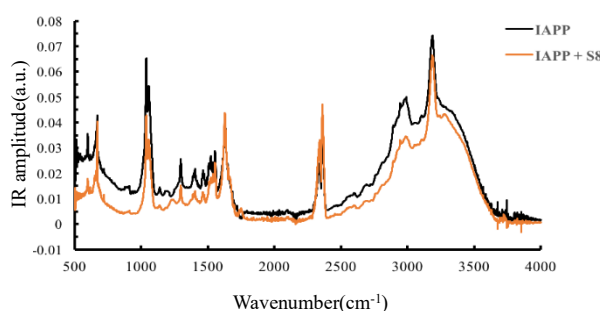


圖3-12 S8與 IAPP 培養48小時之 IR 圖譜

2. S27 與 IAPP：

表(七) S27 與 IAPP 系統中，IAPP 形成 β -sheet 所占之比例(%)

項目	t = 0 hr	t = 24 hr	t = 48 hr
IAPP only(%)	21.8	51.3	44.8
S27+IAPP(%)	27.8	55.1	55.3

由表(七)可知，S27+IAPP 系統之 β -sheet 比例與 IAPP only 相近。與 S8 相較，顯示 S27 與 IAPP 間的相互吸引，無法使 IAPP 大量集結生長，與先前的電子顯微鏡觀察到生成較短纖維之現象相呼應。

肆、 結論與應用

本實驗藉由自行合成、純化所得之 IAPP，探討多種具不同官能基之香豆素系列分子與 IAPP 之間的相互作用，並運用硫磺素-T 動力學實驗輔以電子顯微鏡觀測，成功地歸納且探討有機香豆素系列分子對 IAPP 之作用與影響。歸納實驗結果：香豆素系列分子中具有較低極性取代基的 S8，具有加速 IAPP 形成纖維之效能；兩端擁有不同極性之取代基的 S19，其與 IAPP 之親和力較強；而具有共軛雙鍵使電子共振之取代基的 S27，則會抑制 IAPP 聚集成為纖維。

本實驗探討出有機分子結構與 IAPP 間之作用機制，具有低極性取代基團的有機分子，與 IAPP 纖維聚集核心的疏水區域交互作用，拉近已成核之 IAPP，促進其聚集堆積。具有較高極性基團之有機分子，其與 IAPP 分子間的氫鍵作用，可抑制纖維生長或伸展。本實驗研究結果可應用於藥物開發與設計，例如在香豆素系列分子的結構骨架上進行取代基修飾，可應用於藥物治療或分子探針，對於與類澱粉蛋白相關之疾病研究提供治療解決之方向。

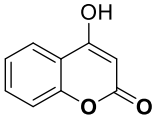
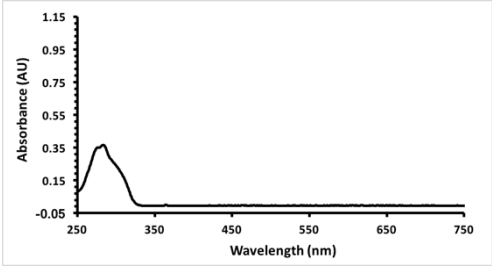
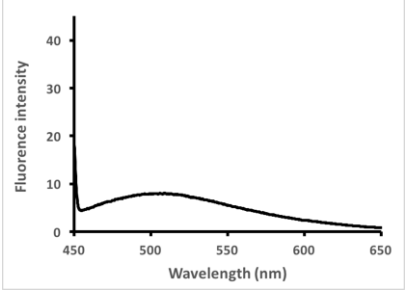
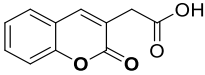
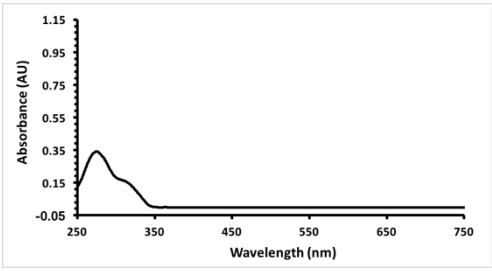
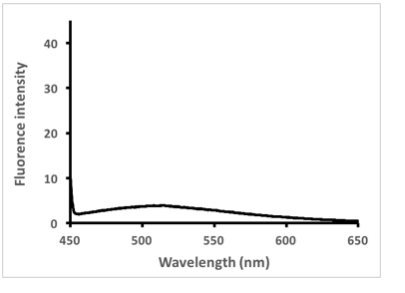
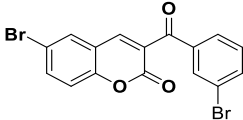
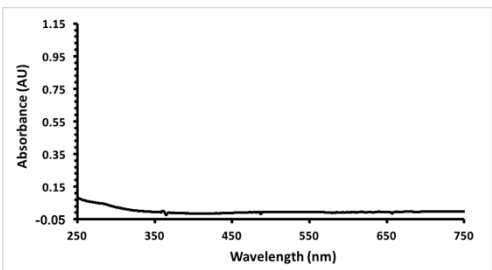
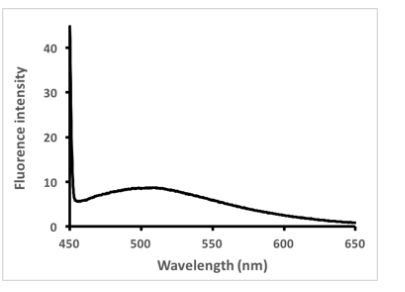
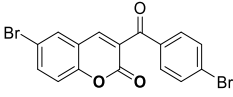
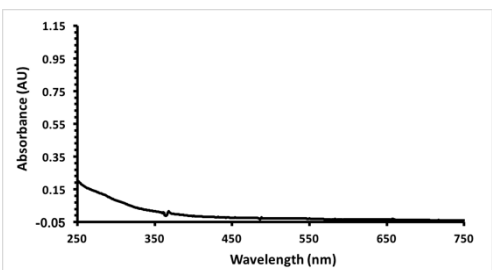
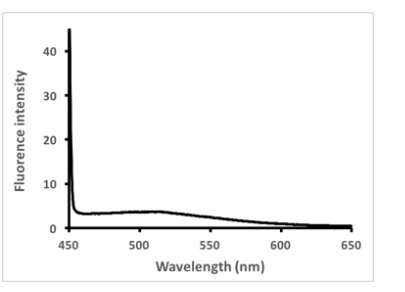
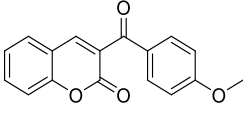
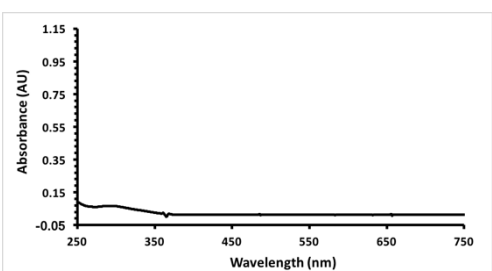
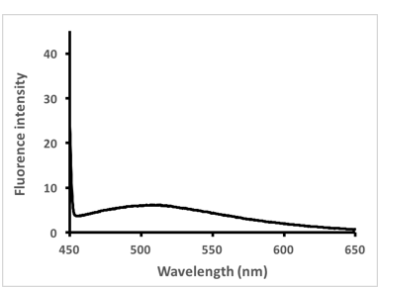
伍、 參考資料及其他

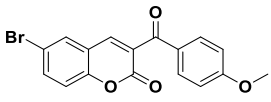
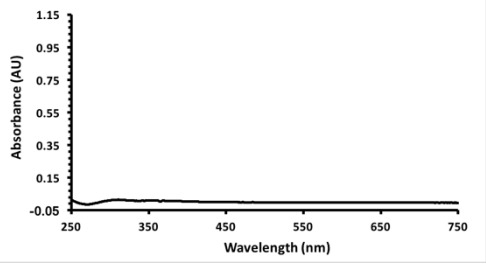
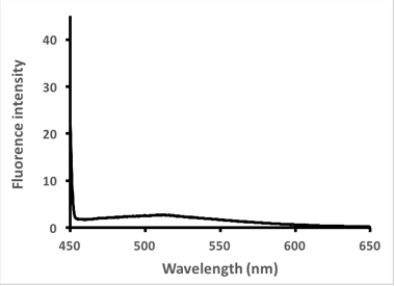
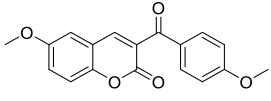
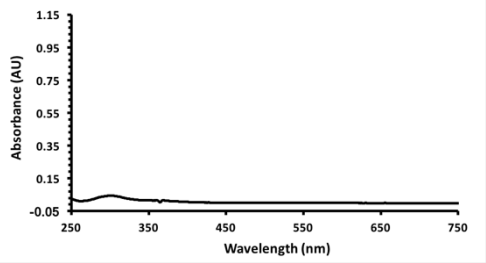
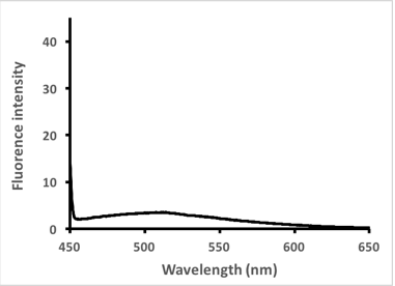
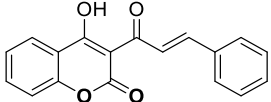
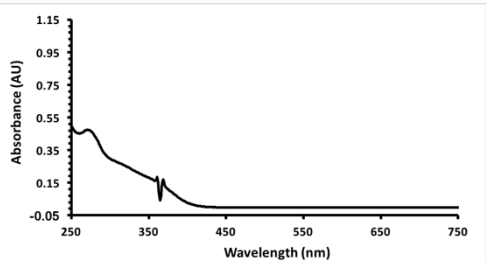
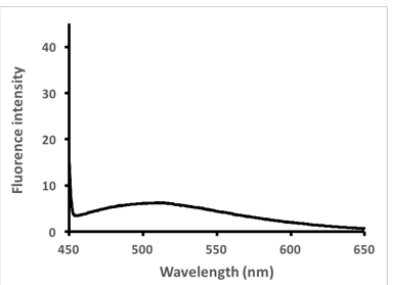
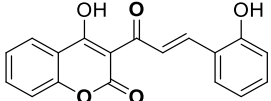
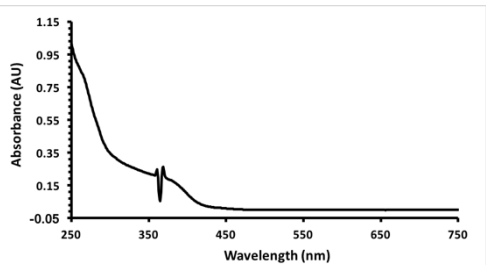
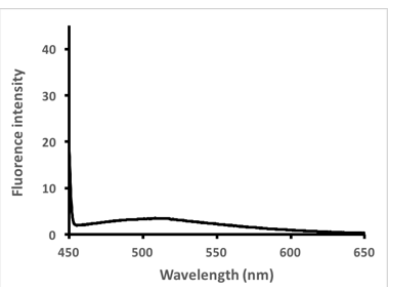
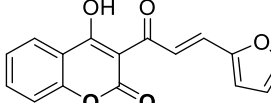
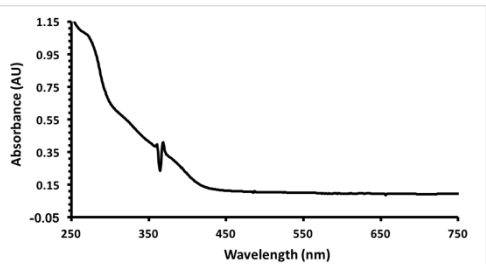
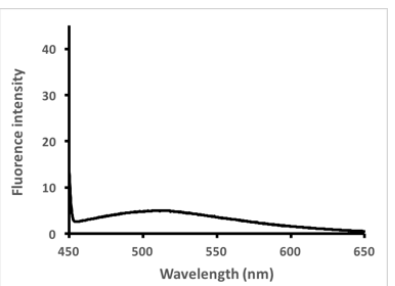
- 一、 World Health Organization(n.d.). Diabetes. 2020/03/04, retrieved from: <https://www.who.int/health-topics/diabetes>.
- 二、 Azuma Kanatsuka, Shigetake Kou, and Hideichi Makino(2018). IAPP/amylin and β -cell failure: implication of the risk factors of type 2 diabetes. *Diabetol Int.* 2018 Jul; 9(3): 143–157.
- 三、 D.S. Ranade, A.M. Bapat, S.N. Ramteke, B.N. Joshi, P. Roussel, A. Tomas,P. Deschamps, P.P. Kulkarni(2015). Thiosemicarbazone modification of 3-acetyl coumarin inhibits A β peptide aggregation and protect against A β -induced cytotoxicity. *Eur J Med Chem.* 2016 Oct 4; 121: 803-809.
- 四、 Shin-Ying Lee, Ya-Jen Chiu, Shu-Mei Yang, Chiung-Mei Chen, Chin-Chang Huang, Guey-Jen Lee-Chen, Wenwei Lin & Kuo-Hsuan Chang. (2018). Novel synthetic chalcone-coumarin hybrid for A β aggregation reduction, antioxidation, and neuroprotection. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 24(12), 1286-1298.
- 五、 Pryor, N. E.; Moss, M. A.; Hestekin, C. N., Unraveling the early events of amyloid-beta protein (Abeta) aggregation: techniques for the determination of Abeta aggregate size. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13 (3), 3038-3072.
- 六、 Haataja, L., Gurlo, T., Huang, C. J., & Butler, P. C. (2008). Islet amyloid in type 2 diabetes, and the toxic

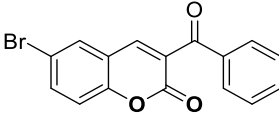
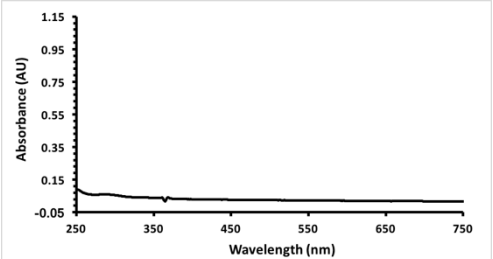
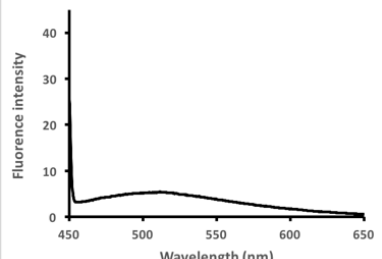
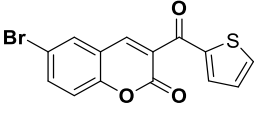
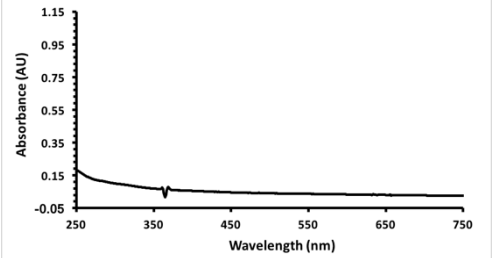
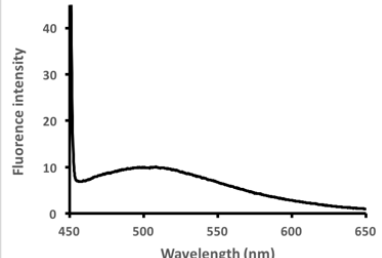
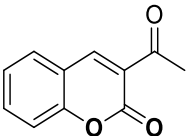
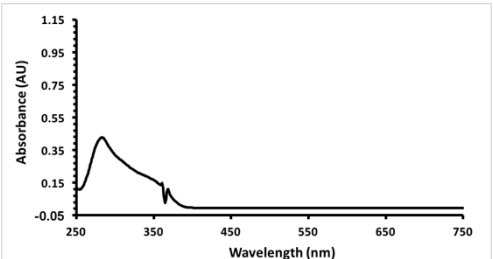
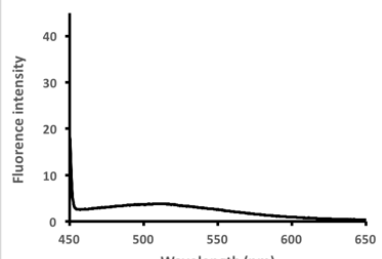
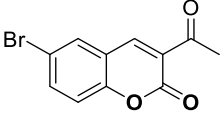
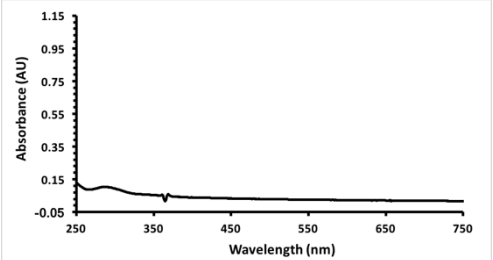
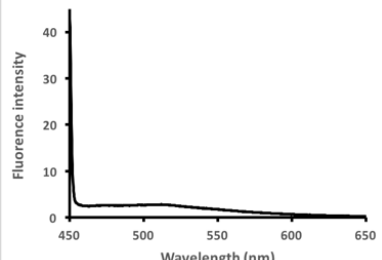
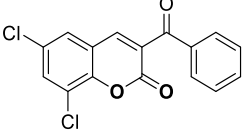
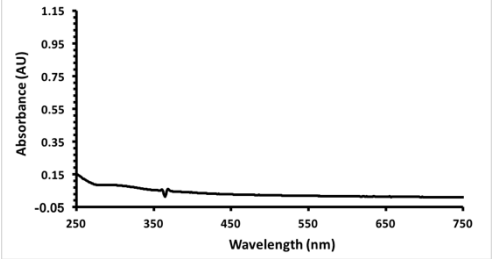
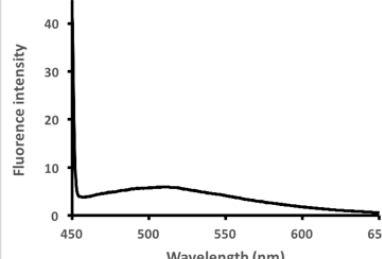
oligomer hypothesis. *Endocrine reviews*, 29(3), 303-316.

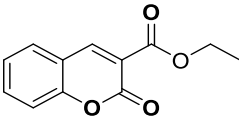
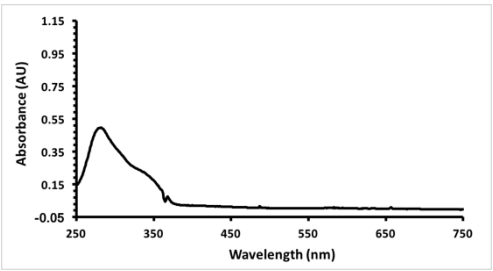
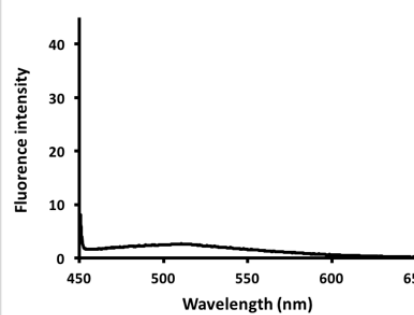
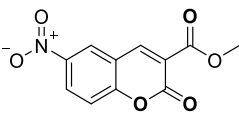
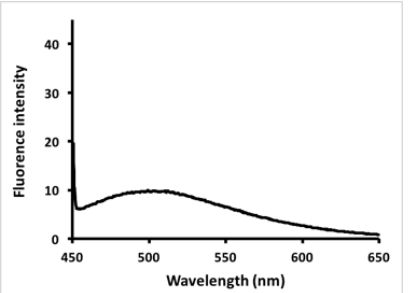
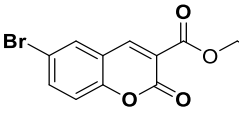
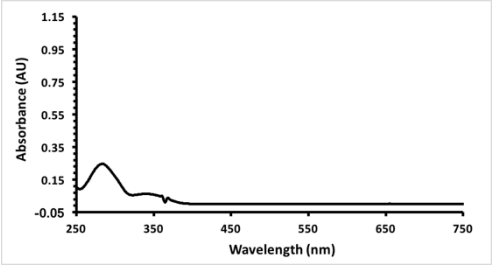
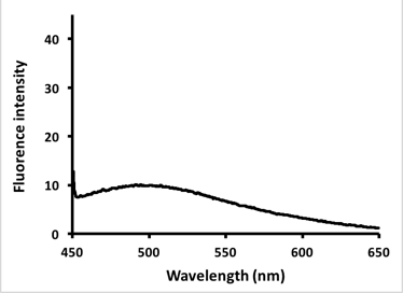
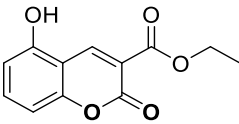
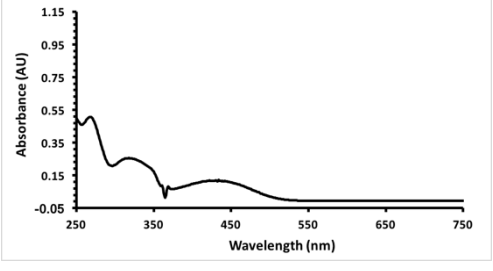
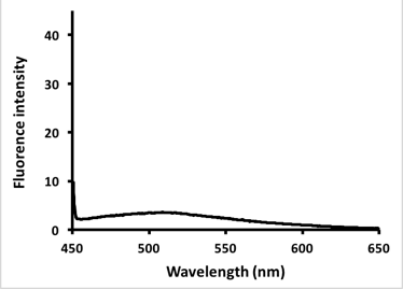
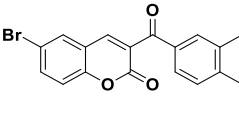
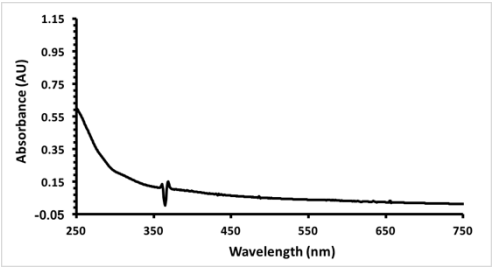
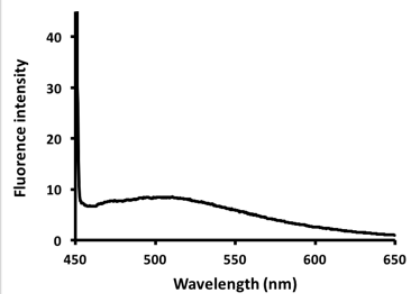
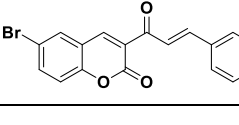
- 七、 Pithadia, A., Brende r, J. R., Fierke, C. A., & Ramamoorthy, A. (2016). Inhibition of IAPP aggregation and toxicity by natural products and derivatives. *Journal of diabetes research*, 2016.
- 八、 Biancalana, M.; Koide, S., Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1804 (7), 1405-1412.
- 九、 Kumar, S.; Walter, J., Phosphorylation of amyloid beta (Abeta) peptides-a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* 2011, 3 (8), 803-812.
- 十、 Maskevich AA, Stsiapura VI, Kuzmitsky VA, Kuznetsova IM, Povarova OI, Uversky VN, Turoverov KK(2007). Spectral properties of thioflavin T in solvents with different dielectric properties and in a fibril-incorporated form. *J Proteome Res.* 2007 Apr;6(4):1392-401.
- 十一、 Rafie H. Abu-Eittah, Bahgat Ali H. El-Tawil(2011). The electronic absorption spectra of some coumarins. A molecular orbital treatment. *Canadian Journal of Chemistry*, 63(6):1173-1179.

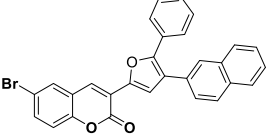
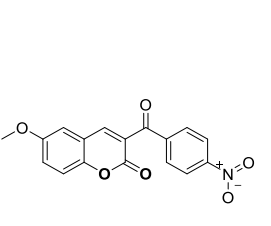
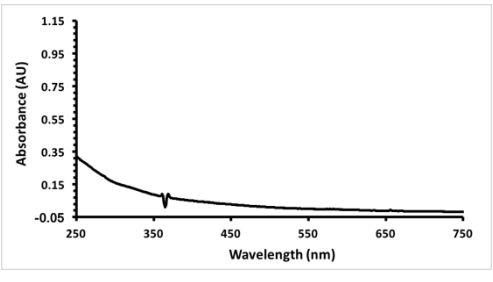
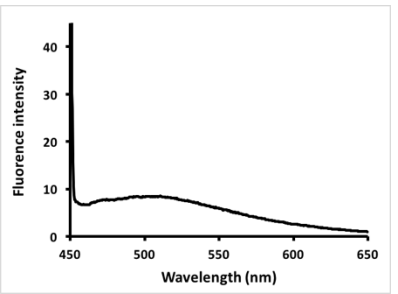
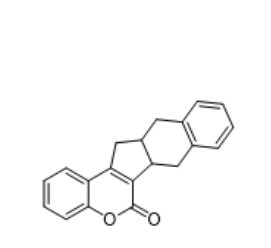
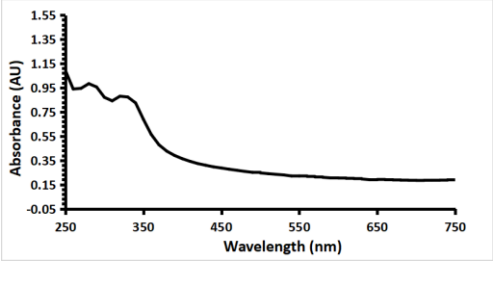
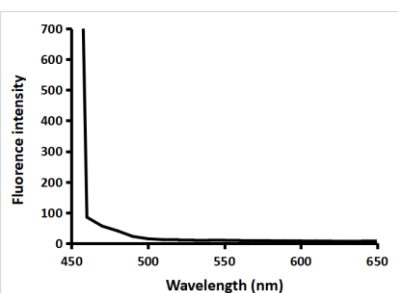
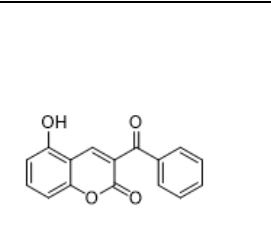
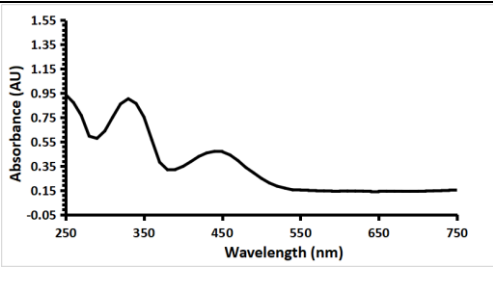
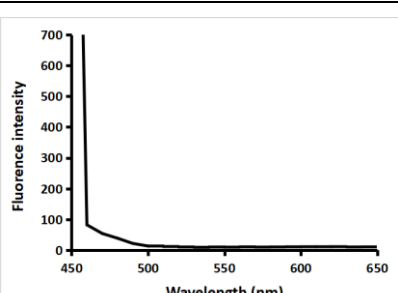
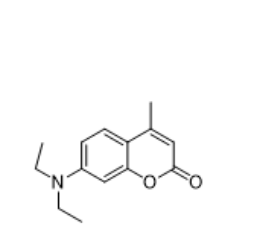
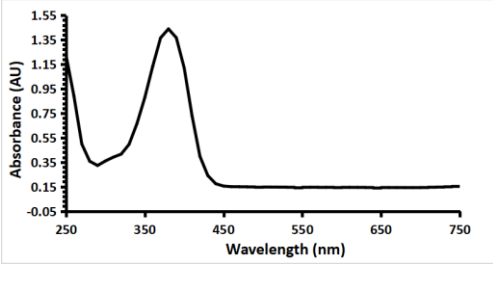
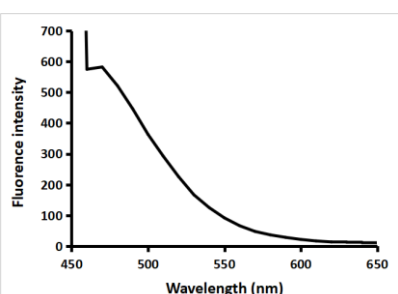
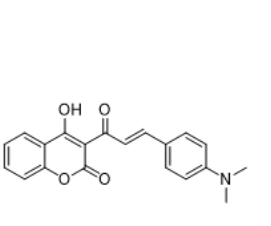
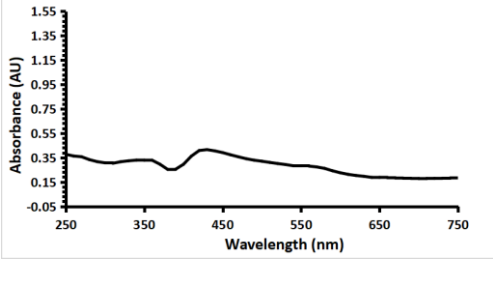
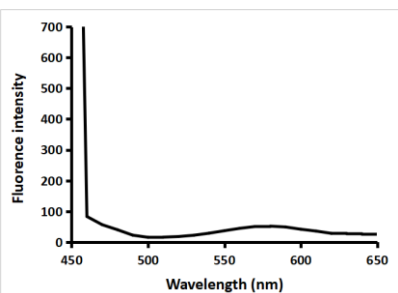
陸、 附錄一

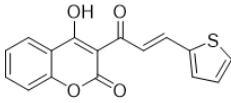
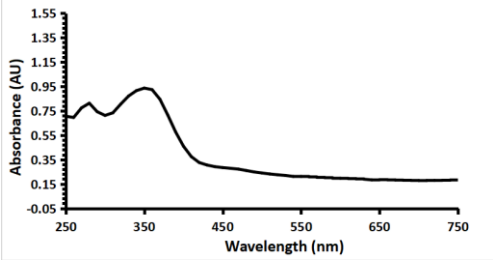
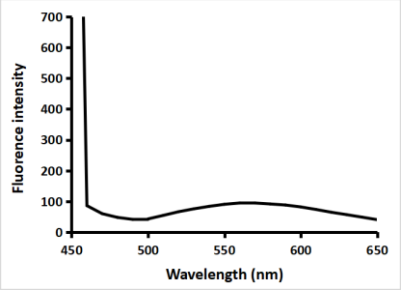
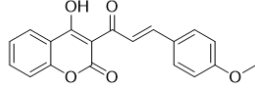
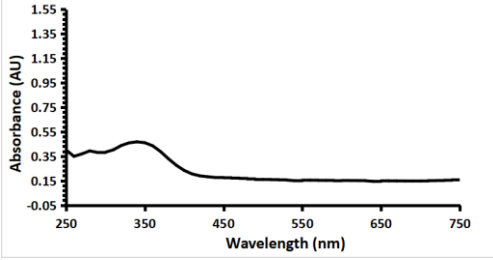
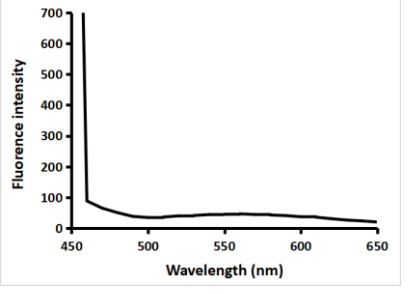
編號	結構	吸收光譜 波長範圍：250-750nm	以435nm 激發所得放射光譜 波長範圍：450-650nm
1			
2			
3			
4			
5			

6			
7			
8			
9			
10			

11			
12			
13			
14			
15			

16			
17		<p>溶解度過低</p>	
18			
19			
20			
21		<p>溶解度過低</p>	<p>溶解度過低</p>

22		溶解度過低	溶解度過低
23			
24			
25			
26			
27			

28			
29			

【評語】 080003

胰島類澱粉蛋白(islet amyloid polypeptide, IAPP)的不正常堆積，經常出現在第二型糖尿病患者胰島細胞的周圍，這與疾病的發生有很大的關聯。本研究使用有機物香豆素(coumarin)分子，觀測其對胰島類澱粉蛋白聚集之影響。研究中成功以人工合成得到 IAPP，經純化後，與經過檢測光學性質之香豆素分子進行硫磺素-T 動力學試驗並輔以電子顯微鏡觀測；利用有機分子與 IAPP 進行交互作用，目前已確知香豆素系列分子中，具特定官能基結構者可有效改變 IAPP 的纖維型態。實驗結果發現香豆素 S8 分子中具有較低極性之取代基會加速胰島類澱粉蛋白纖維化、S19 分子中具有短而電性高之取代基易與胰島類澱粉蛋白結合、S27 分子中具有胺基與長鏈之取代基會抑制胰島類澱粉蛋白纖維化。期待透過本研究對於有機分子與蛋白質作用機制的探討，可進一步為糖尿病病症的治療提供想法與途徑。

優點：類澱粉蛋白(islet amyloid polypeptide, IAPP)的不正常堆積，發生的原因及如何避免是很重要的研究課題，本研究實驗完整，足以顯示利用香豆素之特定官能基結構來有效改變 IAPP 的纖維型態。研究主題明確，研究步驟合乎邏輯且研究方

法適切，並且有效地控制變因，遇到實驗瓶頸與困難作者可尋求突破以提升實驗再現性。

缺點及問題：有諸多問題要克服。如果要應用於發展抗第二型糖尿病的藥，需考慮香豆素系列分子如何運送到胰島類澱粉蛋白與之結合？不會被消化破壞掉嗎？什麼劑量才能有效？吃多會不會有副作用，香豆素的毒性要考慮。也許可用 AI 篩選結構與香豆素類似的成藥來測試。單純以研究的觀點說要做成探針，但加上螢光基團後卻可能影響和 IAPP 的結合。又提到編號 19 香豆素系列分子可明顯使 lag time 延長 8 hr 及螢光訊號降低。但 Table 4,5 說 19 的 lag time 是 11 hr? Table 4 及 5 部分重複？另說期待未來可在編號 19 香豆素的結構骨架上進行改良，成為偵測澱粉樣蛋白的螢光探針。19 香豆素和 IAPP 結合有螢光變化嗎？如果比不上硫磺素 T 和 IAPP 結合的螢光變化，如何做為螢光探針？