

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號	030008
參展科別	化學
作品名稱	探討有機分子官能基對胰島類澱粉蛋白(IAPP) 之影響
得獎獎項	四等獎

就讀學校 臺北市立第一女子高級中學

指導教師 杜玲嫻、江慧玉

作者姓名 李昀臻

關鍵詞 香豆素、胰島類澱粉蛋白、第二型糖尿病

作者簡介



大家好，我是北一女中數理資優班的李昀臻。由於對於蛋白質與有機分子間的交互作用充滿好奇，在二年多的實驗室生活裡，雖然有許多瓶頸，但仍堅定地走了過來。

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，最後是在這二年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

過去許多文獻報導胰島類澱粉蛋白(islet amyloid polypeptide ; IAPP)在體內的不正常聚集的現象，會造成分泌此賀爾蒙的 β -細胞凋亡，間接導致胰島素分泌的下降，因此被認為與第二型糖尿病有高度的相關性。本研究利用不同官能基之香豆素(Coumarin)衍生物，測試其對胰島類澱粉蛋白之作用；實驗中成功合成高純度 IAPP 胜肽，再與香豆素衍生物(其光學特性已被檢測)進行混合，爾後進行硫磺素-T 動力學試驗及穿透式電子顯微鏡觀察，我們發現某幾個香豆素衍生物確實會影響 IAPP 的聚集，再藉由圓偏光二色性光譜進一步瞭解有機分子對於 IAPP 聚集結構之影響，也利用分子模擬的方法來探討其如何與 IAPP 作用。

本實驗首創以香豆素作為基本骨架，探討官能基結構與 IAPP 間之交互作用，期待此研究成果可提供第二型糖尿病病症治療之契機與方法。

Abstract

The unnormal aggregation of IAPP has been considered related to type II diabetes. Therefore, inhibiting the aggregation process of IAPP is one of the promising means in therapy. On top of that, coumarins have been found to have a variety of biochemical activities. However, so far, studies have not been conducted to investigate their effects on IAPP.

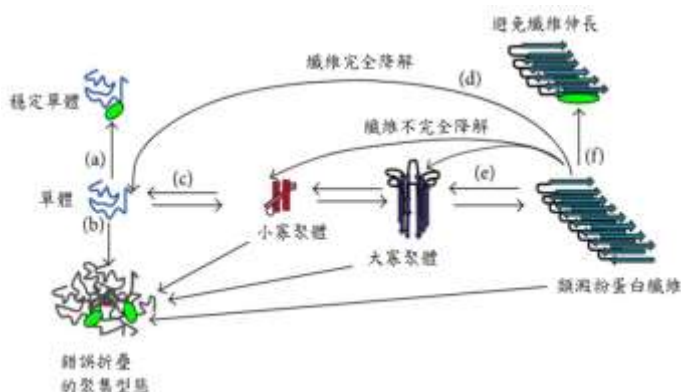
In this research project, I used a series of coumarin compounds to explore their effects on IAPP aggregation. First of all, IAPP was synthesized and purified successfully. Later, a series of coumarin based-compounds with confirmed optical features were mixed with IAPP and aggregation of IAPP in the presence of these molecules were monitored by thioflavin-T kinetic assay. The final ThT intensity and the lag time were analyzed and compared. Finally, I chose three potential compounds to perform the following experiments. Transmission electron microscope was used to check fibril morphology and circular dichroism spectra were recorded to see how these molecules modulate IAPP aggregation. In additions, the theoretical calculations and analysis were performed to understand the possible ways that compounds react with IAPP. In conclusion, the organic compounds with low polar functional groups, S8 , can accelerate the process of IAPP aggregation; one with high polar functional groups and high electric density, S19 , can have strong affinity to IAPP; one with high polar functional groups and resonance structures,S27 , can slow down the process or even degrade the fibers of IAPP. I hope these study results can be used in the therapy of type II diabetes.

壹、研究動機

根據世界衛生組織統計，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。當由胰島β-細胞所分泌的胰島類澱粉蛋白(IAPP)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與阿茲海默症相關的β澱粉樣蛋白(amyloid beta, Aβ)具有抑制其聚集的效果³⁻³，Aβ與IAPP同屬類澱粉蛋白，因此不同官能基之香豆素系列分子或許對於IAPP纖維之積聚可能造成影響。

貳、研究目的及研究問題

由於類澱粉蛋白的形成機制尚未有定論，多數科學家認為應是成核依賴性的聚集。為探討香豆素分子與類澱粉蛋白間的作用，進行文獻探討分類如下：路徑(a)，有機分子穩定單體使其無法自組裝形成寡聚體；路徑(b)中，有機分子使單體形成錯誤折疊態，因而無法成為纖維；路徑(d)及(e)顯示有機分子將纖維降解為寡聚體或單體，路徑(f)則為有機分子使纖維結合因而無法增長⁷。



本實驗想要探討不同官能基之有機系列分子對於IAPP積聚之影響，並且進一步歸納香豆素系列分子影響IAPP聚集之特徵與特性。

參、研究設備及器材

一、研究藥品

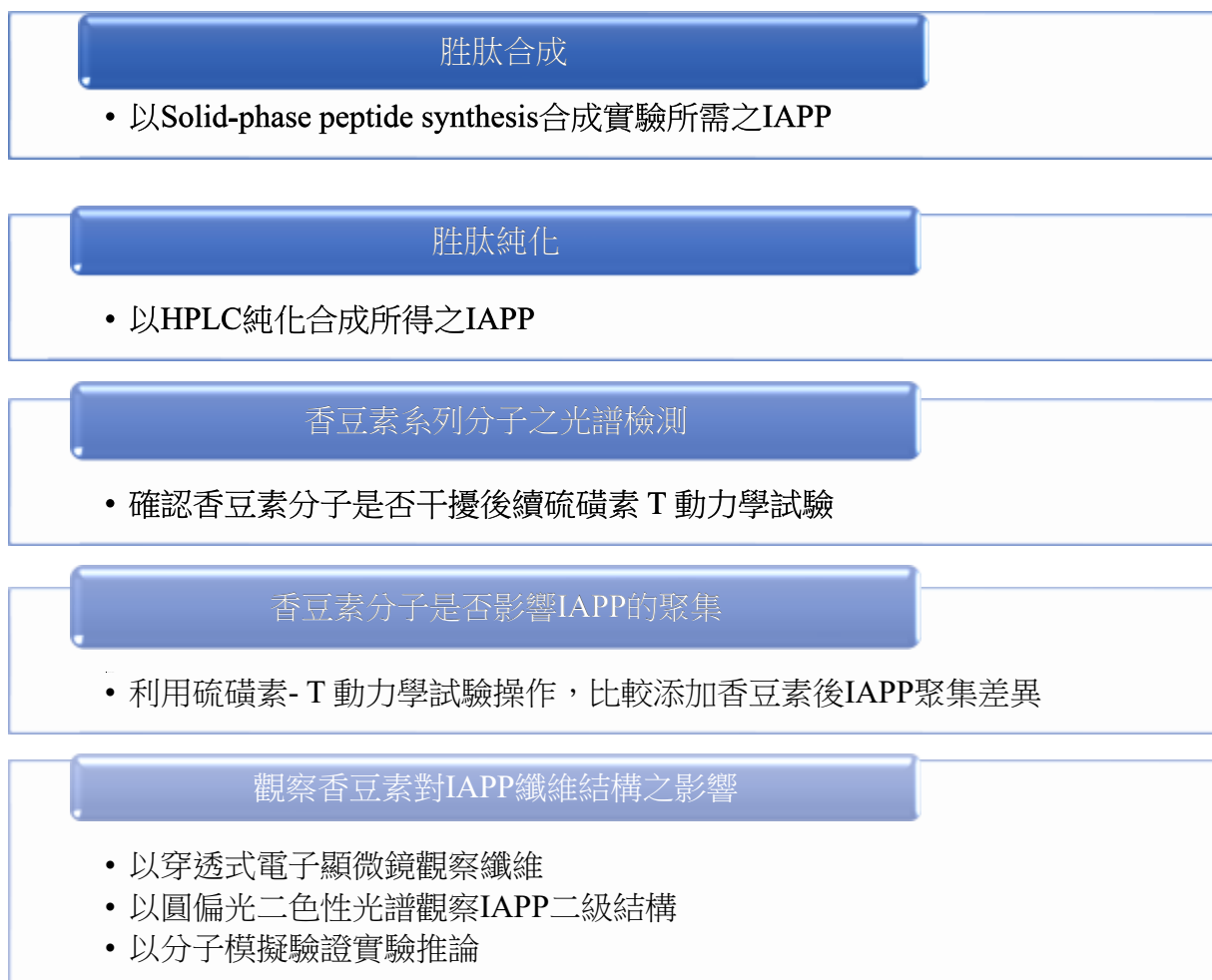
N-Methyl-2-pyrrolidone, NMP	Dimethylformamide, DMF	Acetonitrile, ACN
2,2'-(Ethylenedioxy)diethanethiol, DODT	Triisopropylsilane, TIS	Dimethyl sulfoxide, DMSO
Ethyl isonitrosocanoacetate, Oxyma	Hexafluoro-2-propanol, HFIP	Thioflavin T, ThT
N,N'-Diisopropylcarbodiimide, DIC	Fmoc-protected amino acids	L-ascorbic acid
2,2,2-Trifluoroacetic acid, TFA	Piperazine	Hydrochloric acid
合成用樹脂(Rink amide ProTide)		

二、研究器材與儀器

超音波震盪器 (Delta DC150)	逆相高效液相層析儀 (JASCO PU-4180-(LPG))	全自動微波輔助固相胜肽合成儀(CEM Liberty Lite)
凍乾機 (UNISS FDM-2)	桌上型高速離心機 (Hitachi CT15RE)	全波長偵測儀 (Molecular Devices SpectraMax M2)
紅外光譜儀 (Bruker INVENIO)	多功能程控溫培養儀 (Eppendorf ThermoMixer C)	輔助雷射脫附離子化-飛行時間質譜 (Bruker New ultrafleXtreme TM)
穿透式電子顯微鏡 (Hitachi H-7100)	圓偏光二色性光譜儀 (JASCO J-715)	冷螢光盤式讀取儀 (Hidex Sense Microplate Reader)

肆、研究方法或過程及進行步驟

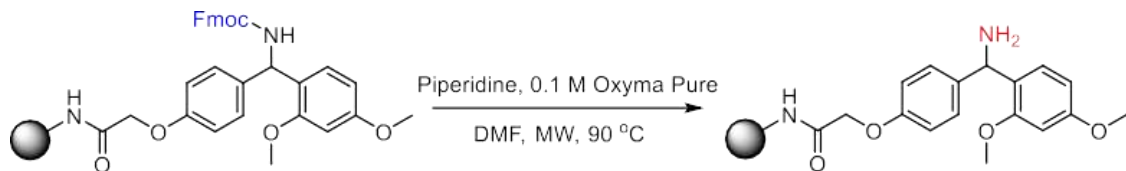
一、研究過程



(一) 胜肽合成

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-肱氧乙醯酸酯 (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) 配製 Activator solution：使用 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			

2. 使用 92.5% TFA (Trifluoroacetic acid)、2.5% DODT (3,6-Dioxa-1,8-octanedithiol)、2.5% TIS (Triisopropylsilan,)及 2.5%、5 mL DDI water 配置裂解試劑。將胜肽泡於上述試劑中 3 小時後，過濾、再使用氫氣除去 TFA；再添加乙醚使固體析出、過濾後即可得到固體的胜肽初產物。

(二) 胜肽純化

1. 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。

2. 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 μm 的 PROTO C18 半製備柱(10 mm x 250 mm)
移動相	A 溶液： 1 L DDI water 及900 μL 6N HCl
溶液	B 溶液： 1 L 80% ACN(in DDI water)及900 μL 6N HCl
注入試樣	待純化試樣

3. 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. 香豆素衍生物樣品共 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, pH 7.4 三羥甲基胺烷 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)，將步驟 1 的溶液稀釋為 80 μM ，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) 硫磺素-T 動力學試驗

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. 配置 15 μM 硫磺素-T(Thioflavin T, ThT)、80 μM 香豆素系列分子以及 25 μM IAPP 之溶液。將上述溶液每孔 50 μL 注入 384 微量孔盤進行三至五重複實驗，且將孔盤密封防止液體揮發，並放入冷螢光盤式讀取儀以 435 nm 激發，偵測 ThT 於 485 nm 的放射光大小，每小時讀取一次數據。實驗數據為當次實驗個時間點各孔平均值，並計算各孔間之標準差，以螢光強度為 Y 軸，時間為 X 軸作圖。

(五) 電子顯微鏡檢測纖維

1. 先以 10 μL C₂H₅OH 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。
2. 最後使用 10 μL 、2%乙酸鈾醃(Uranium acetate, UA) 進行負染 1 分鐘，吸取多餘液體便可進行 TEM 觀察。

(六) 圓偏光二色(CD)光譜

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. 培養條件：
S8、S19：25°C下，每小時以 500 rpm 搖五分鐘，每隔 24 小時觀察一次，共四次。
S27：25°C下，每小時以 500 rpm 搖三分鐘，每隔 24 小時觀察一次，共四次。
4. 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。

(七) 分子模擬

1. 透過 Protein Data Bank 及 PubChem 分別下載 IAPP 和有機分子之 pdb 檔。
2. 以 Autodock Vina 計算 IAPP 與有機分子間系統穩定後所放出的能量(affinity，單位: kcal/mol)，並選取最穩定的互動模式進行下一步驟。
3. 以 PyMOL¹¹ 顯示 IAPP 與有機分子互動的三維結構圖。

伍、研究結果與討論

一、胜肽合成及純化

- (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1-1 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：

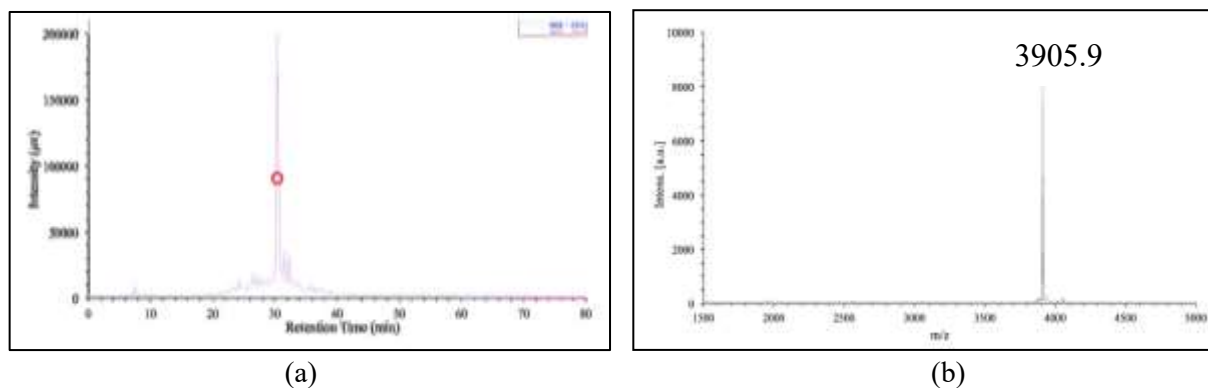


圖1-2 分離且確認 IAPP 初產物 (a) HPLC 圖譜；(b) MS 圖譜

在圖 1-2 的 HPLC 分析，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；由 IAPP 胺基酸序列：KCNTATCATQ LRANFLVHSS NNF GAILSST NVGSNTY 可得知其分子式為 $C_{164}H_{262}N_{49}O_{55}S_2$ ，因此經由計算，可得知所合成的 IAPP 其分子量應為 3905.27，氧化態則為 3903.27。在進一步使用質譜進行鑑定後，可分析結果得知產物分子量為 3905.9，與理論值相近，證明成功合成出所需的 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，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。

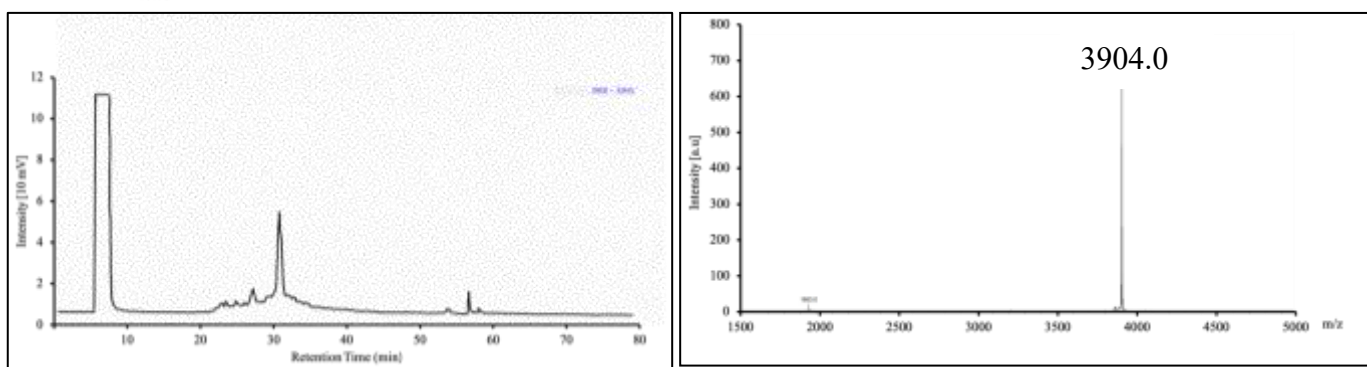
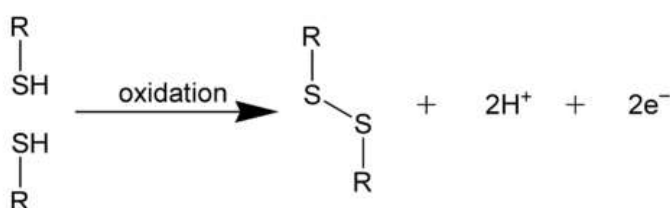


圖1-3 分離且確認氧化型 IAPP (a) HPLC 圖譜；(b)MS 圖譜

氧化處理後的 IAPP 再次以 HPLC 及質譜鑑定，如圖 1-3。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。

二、分子篩選

(一) 香豆素衍生物毒性探討

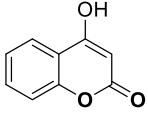
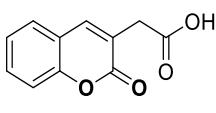
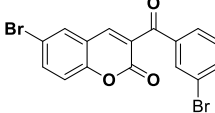
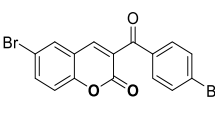
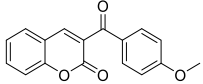
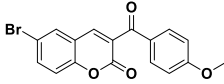
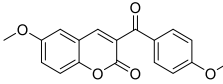
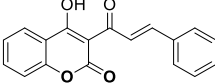
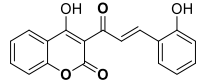
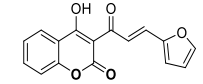
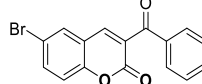
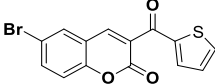
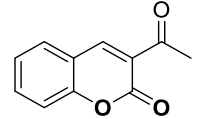
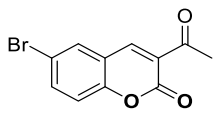
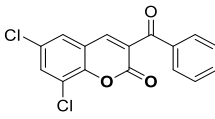
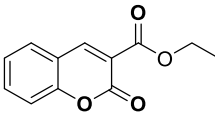
香豆素廣泛存在於自然植物中，諸如肉桂、草莓、櫻桃等，也常應用於化妝品、食品添加劑及藥物中，人類平均日常曝露量約為0.06 mg/kg/天，且並無明確證據表明香豆素對於人體有所危害⁸。雖然有研究指出香豆素及部分衍生物對於小鼠細胞具有肝毒性，但亦有研究指出人類細胞與小鼠細胞在代謝香豆素的路徑不同，因此並不宜用小鼠細胞作為探討香豆素毒性的模型⁹。

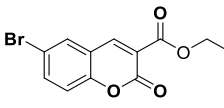
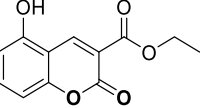
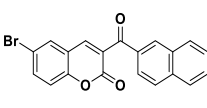
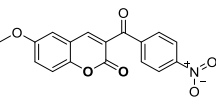
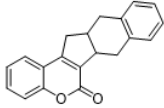
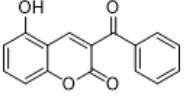
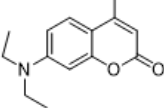
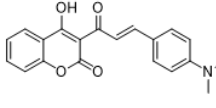
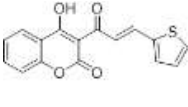
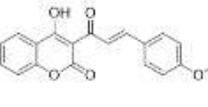
近年來，由於許多研究指出以香豆素作為基本骨架的衍生物具有抗癌、抗菌、抗氧化等特性，香豆素衍生物目前廣泛應用於藥物開發中¹⁰。綜上所述，本實驗中所使用的香豆素衍生物雖有待更進一步的細胞毒性探討，但其大致上對於人體並無立即嚴重的危害。

(二) 香豆素系列分子之光譜檢測：

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。

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	<250	<250
以435nm 激發後放射波長(nm)	509	<450	509.6	<450
編號	S5	S6	S7	S8
結構				
吸收波長(nm)	<250	<250	<250	<250
以435nm 激發後放射波長(nm)	<450	<450	<450	509
編號	S9	S10	S11	S12
結構				
吸收波長(nm)	<250	<250	<250	<250
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	<250	<250	280

以435nm 激發後放射 波長(nm)	<450	<450	508.6	<450
編號	S18	S19	S20	S23
結構				
吸收波長(nm)	284	268	<250	<250
以435nm 激發後放射 波長(nm)	498.8	494	<450	510.4
編號	S24	S25	S26	S27
結構				
吸收波長(nm)	320	330	430	<250
以435nm 激發後放射 波長(nm)	<450	<450	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	<450		

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

在檢測波長範圍內，沒有明顯吸收或放射	S2、S3、S4、S5、S6、S7、S8、S9、 S10、S11、S12、S13、S14、S15、 S16、S20、S23、S24、S25、S27、S29
光學性質會影響 ThT 試驗的有機分子	S26
光學性質不會影響 ThT 試驗的有機分子	S1、S18、S19、S28

(三) 硫磺素-T動力學實驗

1. 實驗原理

硫磺素-T (thioflavin T, ThT) 為目前實驗室中廣泛應用於檢測類澱粉蛋白纖維聚集之小分子螢光探針。目前對於 ThT 與類澱粉蛋白間的作用機制尚不明確，但較廣為接受的理論為：類澱粉蛋白聚集形成纖維時，其 β -sheet 結構具有平行延伸或堆疊的骨架，其間的凹槽可供 ThT 嵌合於其中，使 ThT 結構無法自由旋轉，進而提高結構剛性，使電子可在分子內轉移，於 470 ~ 490 nm 放出強烈的螢光訊號⁷。

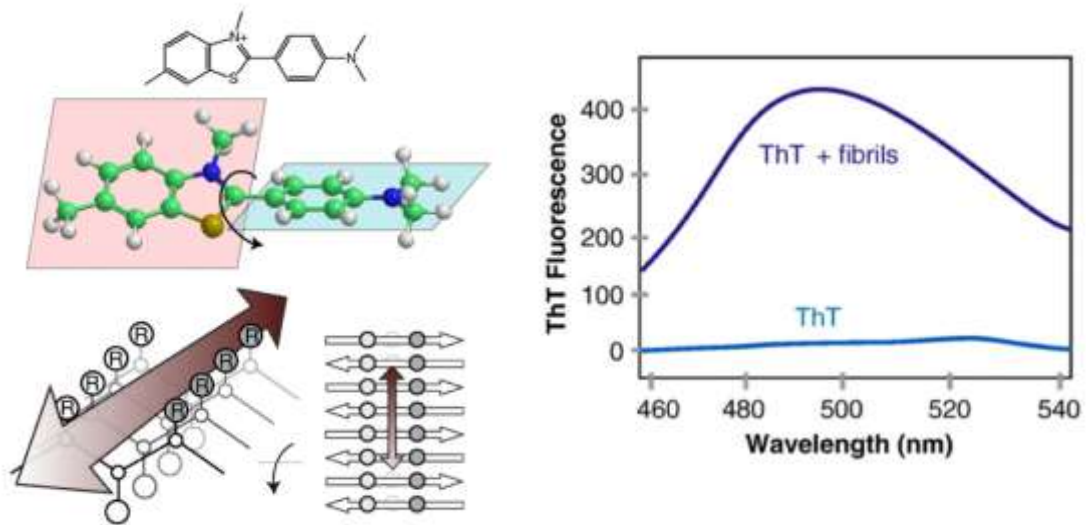


圖 2-1 左：ThT 結構嵌入 β -sheet 結構可提高結構剛性；
右：ThT 嵌入纖維後於 470~490 nm 放出螢光⁷

2. 延遲時間與螢光強度

在硫磺素-T 動力學實驗中，由於當 IAPP 由單體自組裝形成纖維時，於 485 nm 處放出的螢光訊號(以下簡稱 i)會迅速上升。在本實驗中，IAPP 的延遲時間(以下以 t 表示)是將實驗中各時間點的螢光強度(i_n)與前一小時(i_{n-1})之螢光強度進行比較，如下式：

$\frac{i_n - i_{n-1}}{i_{n-1}} \times 100\%$ ，當此比值 > 8% 時，作為 IAPP 的延遲時間。此外，當 ThT 與 IAPP 達成平衡

時，形成最大量纖維之螢光強度(I)作為後續進行判斷各樣品對 IAPP 影響之標準。

- (1) 在圖 2-2 中， t_s 為加入有機樣品於 IAPP 中的延遲時間， t_{IAPP} 為 IAPP only 的延遲時間，而 $t = \frac{t_s - t_{IAPP}}{t_{IAPP}}$ ，當 $t > 0$ 表示有機分子可延緩 IAPP 形成纖維； $t < 0$ 則表示可加速 IAPP 纖維生長，使 ThT 更易接上 IAPP 聚集結構，提早放出螢光。

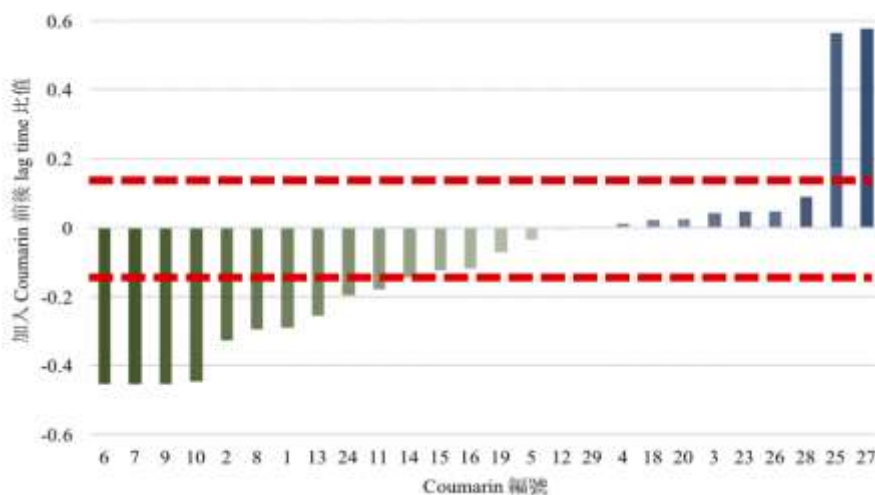


圖2-2 各樣品延遲時間之 $\frac{t_s - t_{IAPP}}{t_{IAPP}}$ 比較

- (2) 圖 2-3 為實驗組螢光強度之比較， I_s 為加入有機樣品的 IAPP 在系統達平衡時的最大螢光強度， I_{IAPP} 為 IAPP only 的最大螢光強度；由 $I = \frac{I_s - I_{IAPP}}{I_{IAPP}}$ ，當 $I > 0$ ，顯示螢光強度增強，即該有機分子可促進 IAPP 聚集成為纖維。

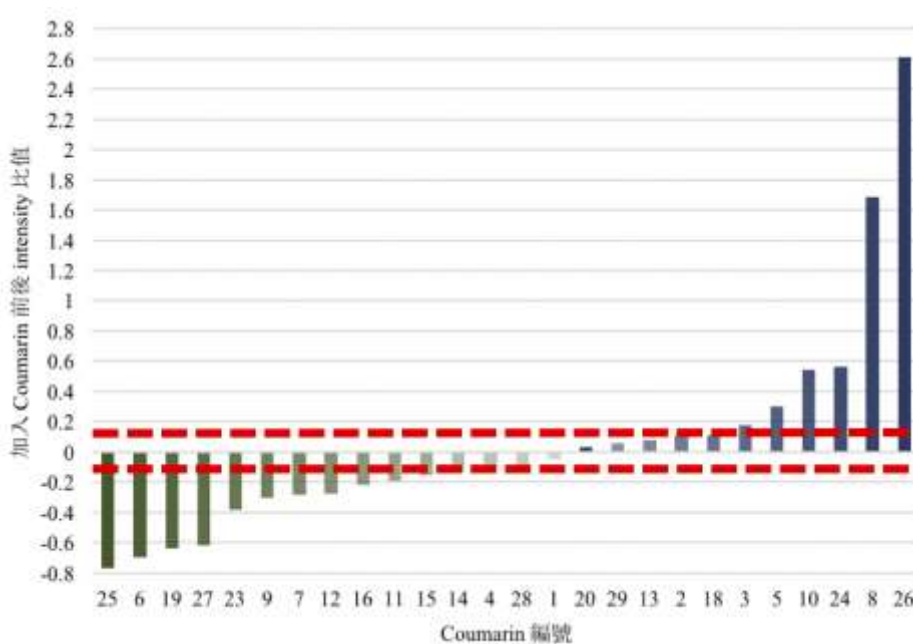


圖2-3 各樣品螢光強度之 $\frac{I_s - I_{IAPP}}{I_{IAPP}}$ 比較

3. 添加有機分子的實驗組，與當次 IAPP only 相互比較，當比值在 ± 0.15 區間內(如圖2-2、圖2-3中的紅色虛線)視為沒有變化。若螢光比值 $I < -0.15$ 表示螢光訊號降低，比值 $I > 0.15$ 為訊號上升；當時間比值 $t < -0.15$ 表示 IAPP 加速聚集， $t > 0.15$ 則表示抑制聚集。

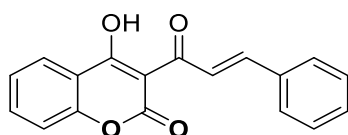
表(五) 有機分子影響 IAPP 聚集之分析比較

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

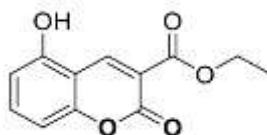
4. 實驗組分析討論

經過 ThT 動力學試驗後，為節省實驗及時間成本，從能加速延遲時間並使螢光強度上升的、能延緩延遲時間並使螢光強度下降的香豆素中，選取了 S8 及 S27，並再選取能使螢光強度大幅下降的 S19，作為進行後續實驗探討的有機分子。

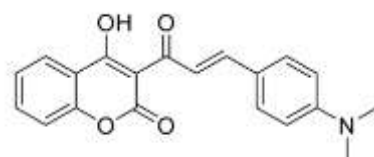
S8、S19 以及 S27 此三分子，從結構來觀察，可發現 3 號位置皆具有取代基團，而環上的羥基(-OH)僅 S19 位於不同位置；由此可知，結構中取代基團的性質差異使其對於 IAPP 的作用有所不同，推測有機分子對於 IAPP 之作用機制應是取決於分子間作用力。



S8



S19



S27

三、 香豆素系列分子與 IAPP 間之交互作用

(一) S8 與 IAPP 間之關係

1. ThT 動力學試驗-比較 I 與 t :

如圖3-1(a)左，加入 S8分子後使螢光訊號提前產生，顯示 S8可加速 IAPP 聚集。此外，在培養 IAPP 經48小時後加入 S8，發現螢光強度瞬間提升，如圖3-1(a)右，可知 S8對於已形成纖維之 IAPP 同樣可促進其纖維量的增加。

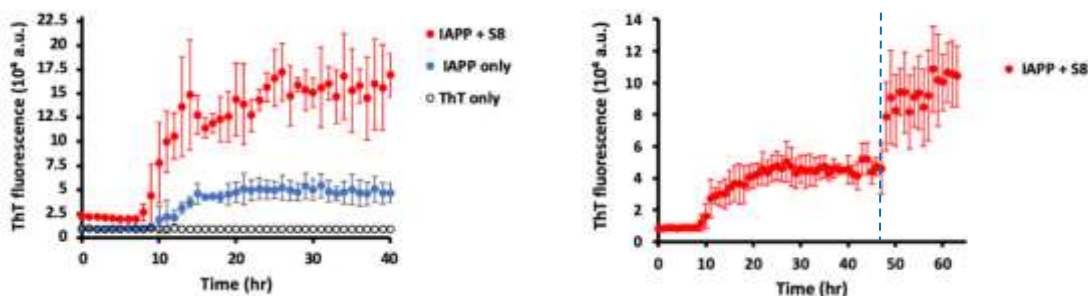


圖3-1(a) 有機分子 S8之硫磺素-T動力學實驗結果

2. ThT 動力學試驗-濃度探討

藉由改變 S8添加濃度，並進行硫磺素 T 動力學試驗，如圖3-1(b)，可發現 S8濃度在80 μM 以上時，螢光強度便不再因濃度增加而增強，可推得 S8的有效濃度應為80 μM 。

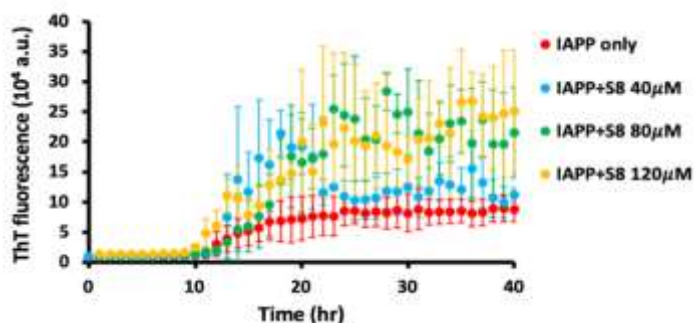


圖 3-1 (b) S8 濃度對螢光強度之影響

3. 穿透式電子顯微鏡(TEM)

檢測同樣培養 5 小時之後所檢測的 TEM，IAPP only 尚未聚集，但添加 S8 之 IAPP 已聚集形成纖維。表示 S8 分子可促進 IAPP 分子相互靠近，加速纖維形成。

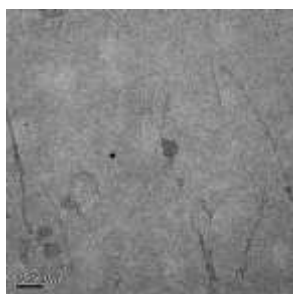


圖3-1(c) 純 IAPP 之 TEM

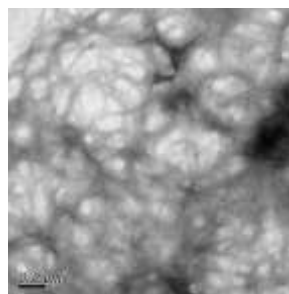


圖3-1(c') 添加 S8之 IAPP 之 TEM

4. 圓偏光二色(CD)光譜

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

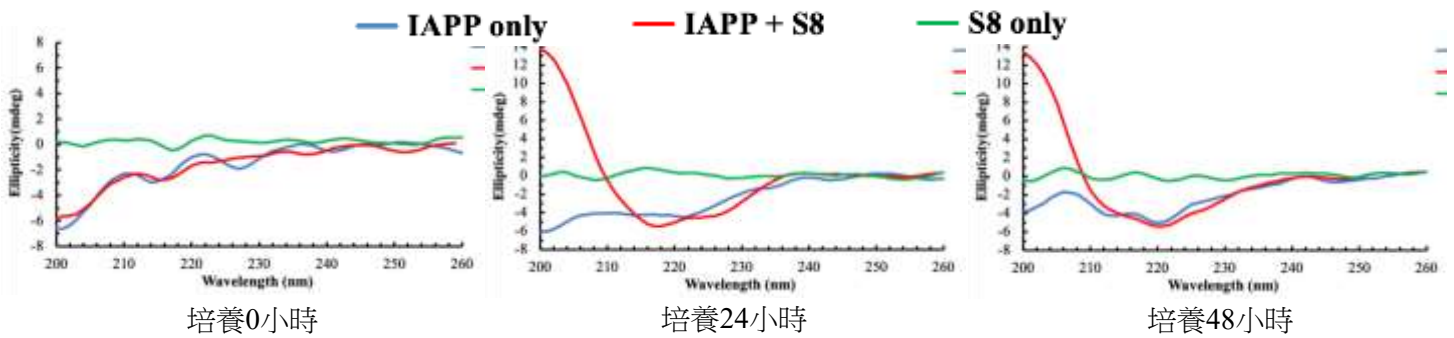


圖3-1(d) S8與 IAPP 之 CD 圖譜

表(六) IAPP 形成 β -sheets 所占之比例(%)

項目	t = 0 hr	t = 24 hr	t = 48 hr
IAPP only(%)	26.0	28.0	34.6
S8+IAPP(%)	17.8	94.5	94.5

由於 S8 分子結構中同時具有陰電性高的 O 原子，以及較低極性的取代基團，推測此分子會有氫鍵作用力以及與 IAPP 單體之疏水(hydrophobic)區段的相互作用，因此拉近單體間的距離、加速形成纖維。

(二) S19 與 IAPP 間之關係

1. ThT 動力學試驗-比較 I 與 t :

加入 S19 之 IAPP 的 ThT 螢光強度明顯較 IAPP only 低(圖 3-2(a)左)。在培養 IAPP 經 48 小時後加入 S19，可發現螢光強度瞬間下降(圖 3-2(a)右)。由此可推測 S19 分子的存在，可能佔據 ThT 分子原本嵌入 IAPP 所形成 β -sheets 纖維上的位置，使得螢光瞬間急劇下降

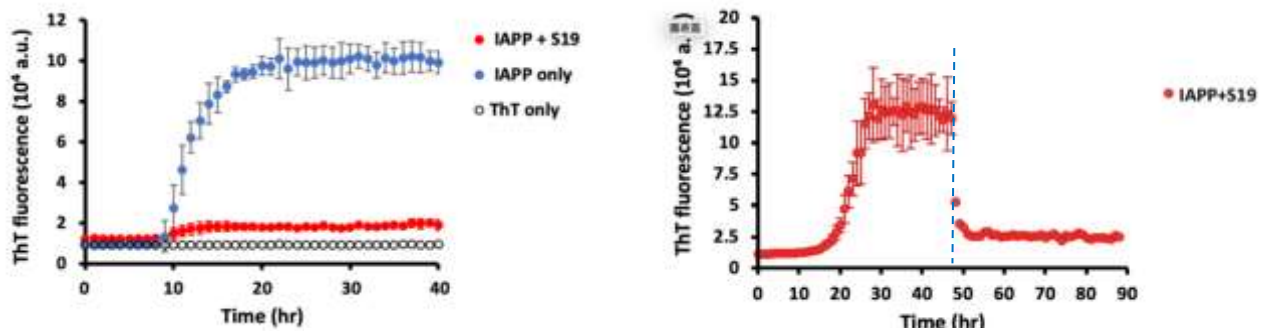


圖3-2 (a) 有機分子 S19之硫磺素-T動力學實驗結果

2. ThT 動力學試驗-濃度探討

如圖 3-2(b)所示，S19 明顯降低 ThT 的螢光強度，但螢光強度並未在測試濃度範圍內有明顯變化。顯示 S19 在 40 μ M 時，便已達到其有效濃度。

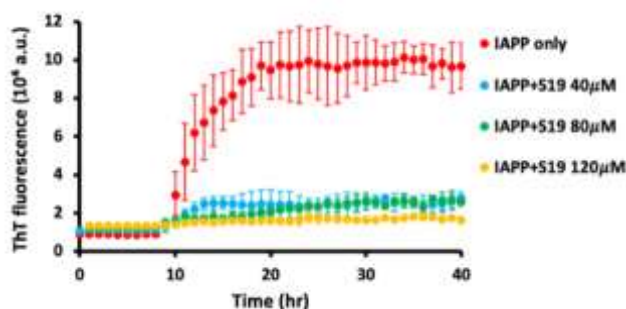


圖 3-2 (b) S19 濃度對螢光強度之影響

3. 穿透式電子顯微鏡(TEM)

比較培養 48 小時後檢測的 TEM，在有 S19 存在下 IAPP 仍有生長聚集成纖維。綜合 ThT 動力學實驗結果與 TEM 觀察，顯示 S19 與 IAPP 間的親和力較 IAPP 與 ThT 分子間強，才因而使得 ThT 動力學實驗中螢光強度降低。

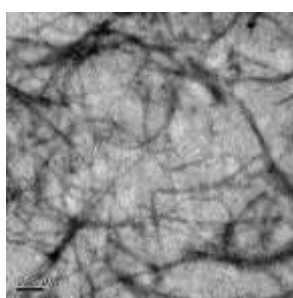


圖3-2(c) 純 IAPP 之 TEM

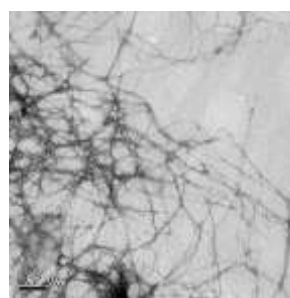


圖3-2(c')添加 S19之 IAPP 之 TEM

4. 圓偏光二色(CD)光譜

綜合 CD 圖譜與表(七)可知：S19+IAPP 之 β -sheets 比例於 24 小時內與 IAPP only 差不多。然而經過 48 小時，S19+IAPP 之 β -sheets 比例便有所提升，且高於 IAPP only，顯示表示 S19 與 IAPP 間的確具有作用力，可使 β -sheets 比例提升。

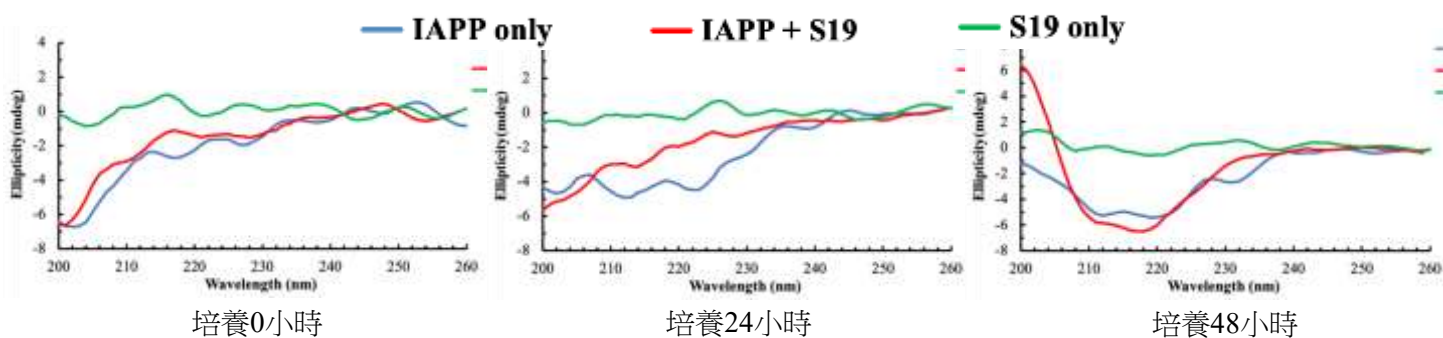


圖3-2(d) S19與 IAPP 之 CD 圖譜

表(七) IAPP 形成 β -sheets 所占之比例(%)

項目	t = 0 hr	t = 24 hr	t = 48 hr
IAPP only(%)	15.1	30.1	33.0
S19+IAPP(%)	15.6	28.9	70.1

(三) S27 與 IAPP 間之關係

1. ThT 動力學試驗-比較 I 與 t :

加入 S27 的 IAPP 延遲時間增加且螢光強度降低(圖 3-3 (a)左)；在第 44 小時添加 S27 後，螢光強度逐漸降低，由此可推測 S27 可降解 IAPP 纖維(圖 3-3 (a)右)。

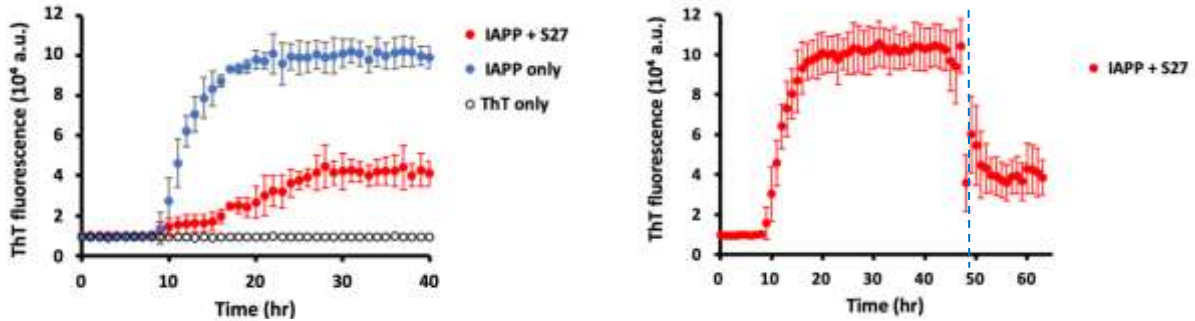


圖3-3 (a) 有機分子 S27之硫磺素-T動力學實驗結果

2. ThT 動力學試驗-濃度探討

如圖 3-3(b)所示，S27 明顯降低 ThT 的螢光強度，但螢光強度並未因濃度而有明顯變化。因此 S27 在 40 μM 時，便已達到其有效濃度。

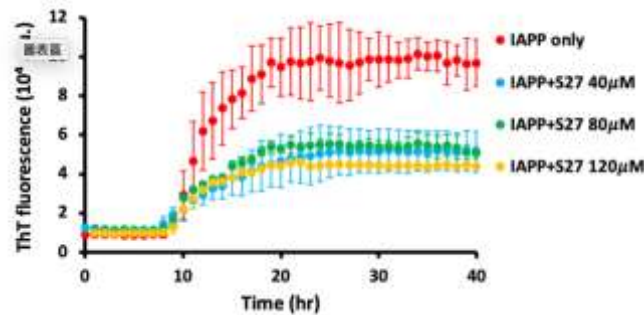


圖 3-3(b) S27 濃度對螢光強度之影響

3. 穿透式電子顯微鏡(TEM)

比較培養 10 小時檢測的 TEM，可看出 S27 使得 IAPP 纖維較不易形成長纖維，顯示 S27 可使 IAPP 較難聚集，難以形成長纖維，而多以短纖維存在。

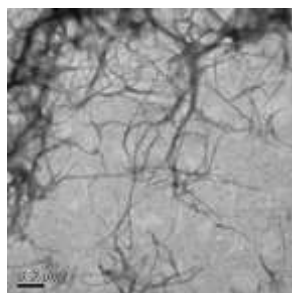


圖3-3(c) 10 hr 純 IAPP 之 TEM

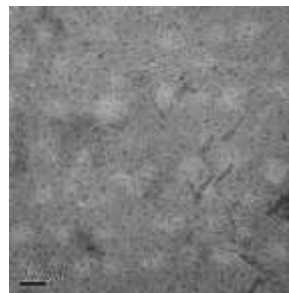


圖3-3(c') 10 hr 添加 S27之 IAPP 之 TEM

為驗證先前在 ThT 動力學試驗時對 S27 可降解纖維的猜測，先將 IAPP only 培養 44 小時後，再將 S27 加入；且於第 50 小時檢測當下的 TEM。由圖 3-3(d)、圖 3-3(d')可發現，加入 S27 後，環境內幾乎沒有長纖維存在，證明 S27 的確可降解 IAPP 纖維。

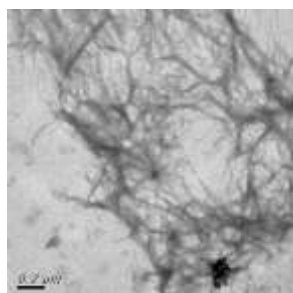


圖3-3(d) 44 hr 純 IAPP

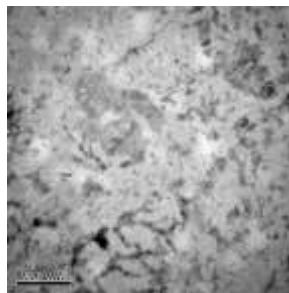


圖3-3(d') 50 hr 添加 S27之 IAPP

4. 圓偏光二色(CD)光譜

由表(八)可知，S27+IAPP 系統之 β -sheets 比例與 IAPP only 相近，顯示 S27 與 IAPP 間的相互吸引，雖可使 IAPP 在形成纖維初期形成結構較不完整之短纖維，但對於整體 β -sheets 比例並無太大影響。

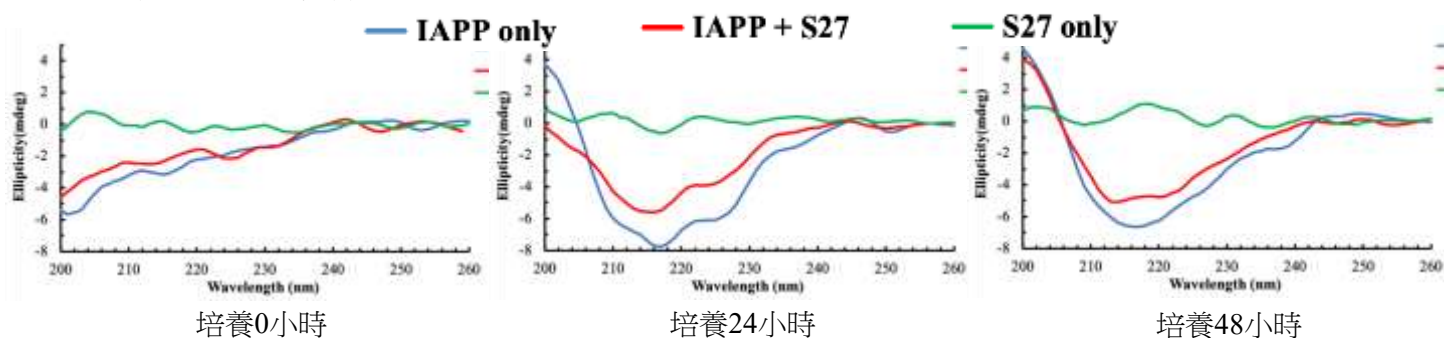


圖3-3(e) S27與 IAPP 之 CD 圖譜

表(八) IAPP 形成 β -sheets 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

四、討論

根據文獻¹²，IAPP 單體在聚集形成纖維時，可透過第 19~24 號胺基酸構成 loop 結構，使單體形成 β -strands，進而形成 β -sheets 構成纖維結構。

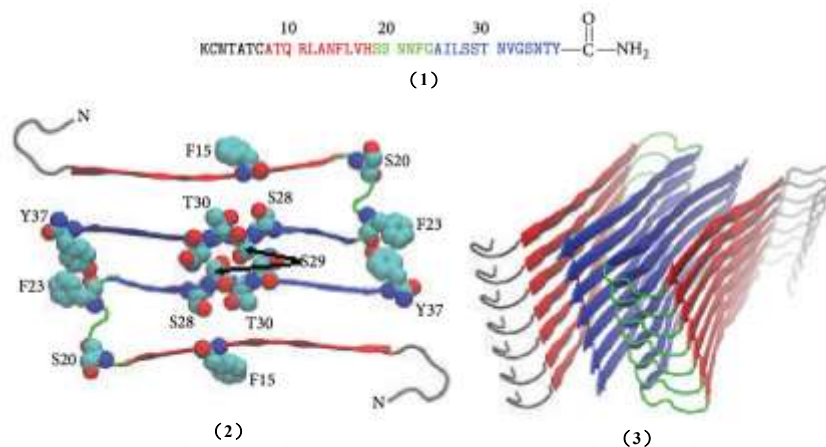


圖4¹² (1) IAPP 序列，紅色與藍色部分為二段可構成 β -strands 之序列，綠色部分則構成連接二段的 loop 結構；(2) β -strands 結構俯視圖；(3) β -strands 結構側視圖

由於本研究重點為探討香豆素系列有機分子是否影響 IAPP 堆積聚集，因此分子間的相互作用為其中關鍵。然而實驗數據多只能作為分子間互動模式推論的間接證據，因此我採用電腦理論模擬分子間的互動模式，進一步瞭解有機分子與 IAPP 結構序列間的作用力及能量關係。

在分子模擬中，我由 Protein Data Bank 獲取 IAPP 單體在水相中的單體構型，並利用 autodock vina 進行分子對接計算，找到小分子與 IAPP 單體互動後能量最為穩定的分子互動方式。

(一) S8 結果討論與分子模擬

1. 綜合 ThT 動力學試驗、TEM、CD 光譜觀測結果，可確知 S8 分子可使 IAPP 單體加速聚集；此外，由 CD 光譜及統計，也可得知 S8 能使 IAPP 的 β -sheets 比例提升。

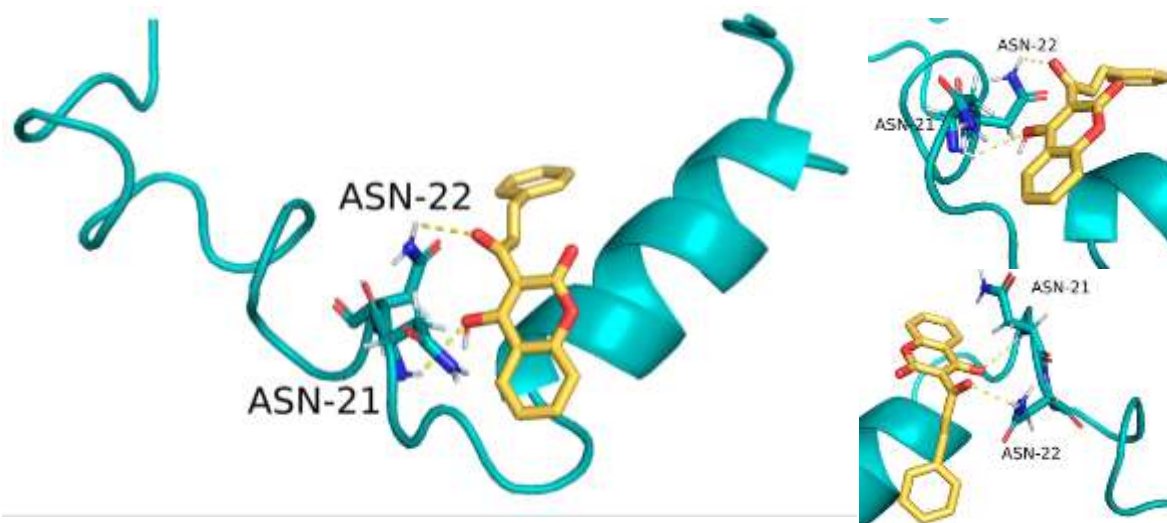


圖4-1 S8與 IAPP 分子模擬結果(黃色虛線為氫鍵作用力)

2. 透過電腦分子模擬的結果可觀察得知：S8 以 氫 鍵 與 IAPP 的 Asn21 和 Asn22 相互吸引。如圖 4-1，此時系統能量最為穩定，約放出 6.9 kcal/mol。由於 IAPP 的 Asn21 和 Asn22 位於圖 4 中的 loop 結構，推測藉由 S8 吸引穩定 loop 結構，可使 IAPP 單體更易形成 β -strands，呼應實驗得 到加速聚集的現象。

(二) S19 結果討論與分子模擬

1. 由 ThT 動力學試驗、TEM、CD 光譜結果可觀察到 S19 與 IAPP 具有強親和力，而可以使 ThT 這類分子探針不易嵌合於 β -sheets 中，但會促進 IAPP 聚集成 β -sheets 結構。
2. 透過電腦分子模擬結果可觀察到：S19 利用結構中 3 號取代基上的 C=O 之 O 原子與 IAPP 的 Asn21 以氫鍵相互吸引(圖 4-2(a))，此時系統能量最為穩定，約放出 5.3 kcal/mol。

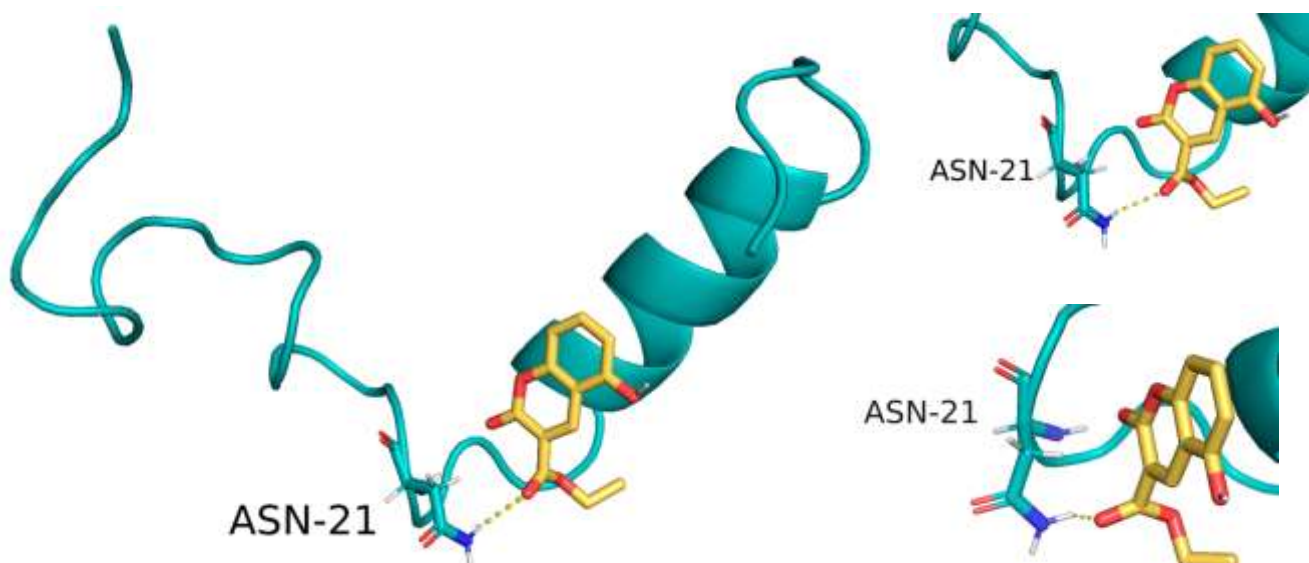


圖4-2(a) S19與 IAPP 分子模擬結果(黃色虛線為氫鍵作用力)

3. 進一步由 S19 結構探討(圖 4-2(b))，其結構中的共軛雙鍵結構能使取代基 C=O 上的 O 原子陰電性更高(使其較為 δ^-)，同時 C 原子被三個電負度大的 O 原子所包圍，其正電荷密度極高(δ^+)，推測此位置因此較易與 IAPP 之極性基團相互吸引，形成強作用力的氫鍵。此外，由實驗結果及分子理論模擬，推測 S19 沒有真正介入 loop 構型中，這可能是其無法影響 IAPP 聚集的原因，且實驗結果說明 S19 跟纖維的親和力強使 ThT 不易嵌合而發光。

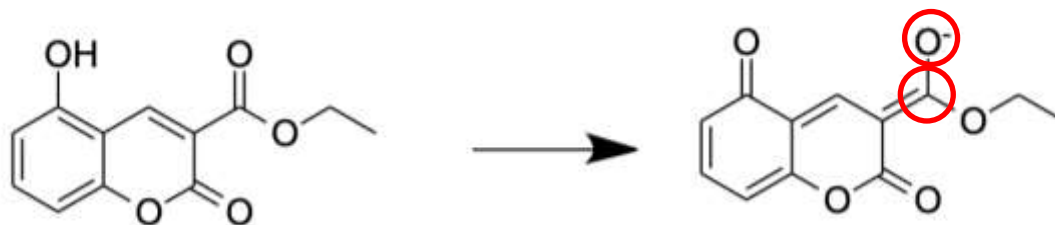


圖4-2(b) S19共振結構示意圖

(三) S27 結果討論與分子模擬

1. 由 ThT 動力學試驗及 TEM 圖，可發現 S27 具有延緩 IAPP 形成纖維與降解纖維的功效，而藉由 CD 光譜可得知 S27 對於 IAPP 的 β -sheets 比例並無太大影響，推測 S27 並不會影響 β -strands 區段。
2. 透過模擬結果，可發現 S27 利用其結構上 2 號 O 原子及 3 號取代基上的 C=O 之 O 原子與 IAPP 的 Asn21 及較遠的 Ser19 相互吸引形成氫鍵，如圖 4-3(a)。此時系統能量最為穩定，約放出 7.1 kcal/mol。推測 S27 藉由共振結構吸引 IAPP，並卡於 loop 結構中，使 IAPP 單體不易形成 β -strands，呼應先前實驗延緩聚集的現象。

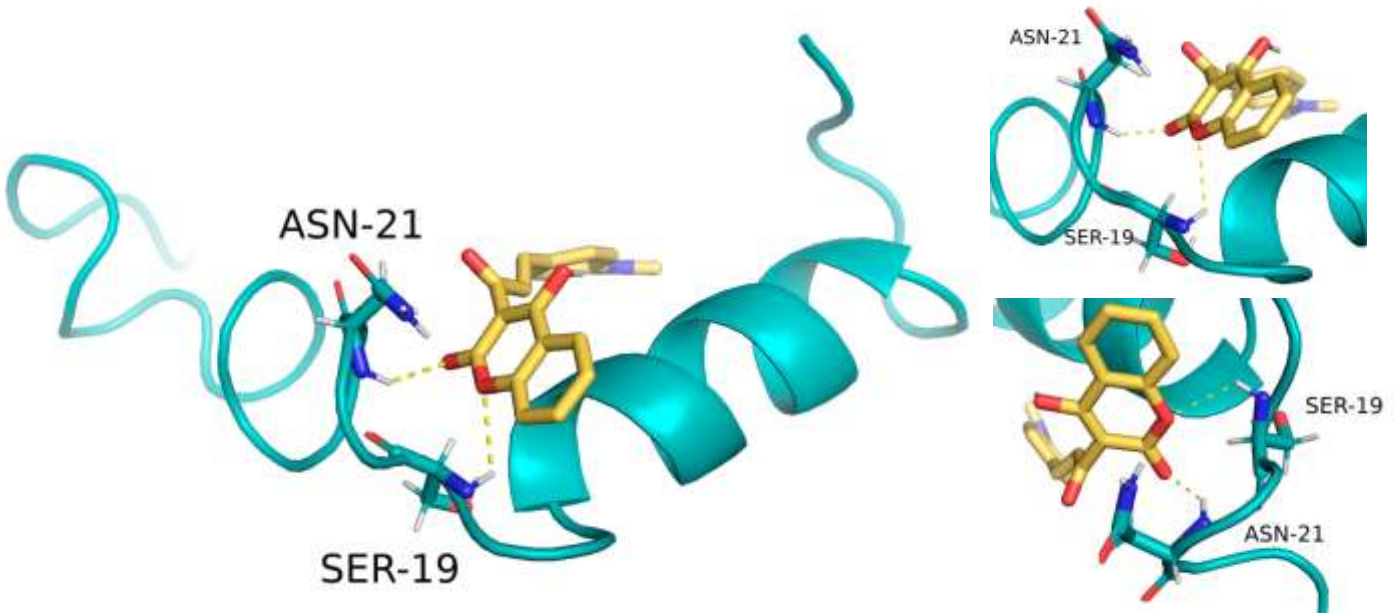


圖4-3(a) S27與 IAPP 分子模擬結果(黃色虛線為氫鍵作用力)

3. 進一步以 S27 分子結構進行探討，推測 S27 可藉由共振結構，提升 O 原子的電荷密度，進而容易與 IAPP 在此位置形成氫鍵。

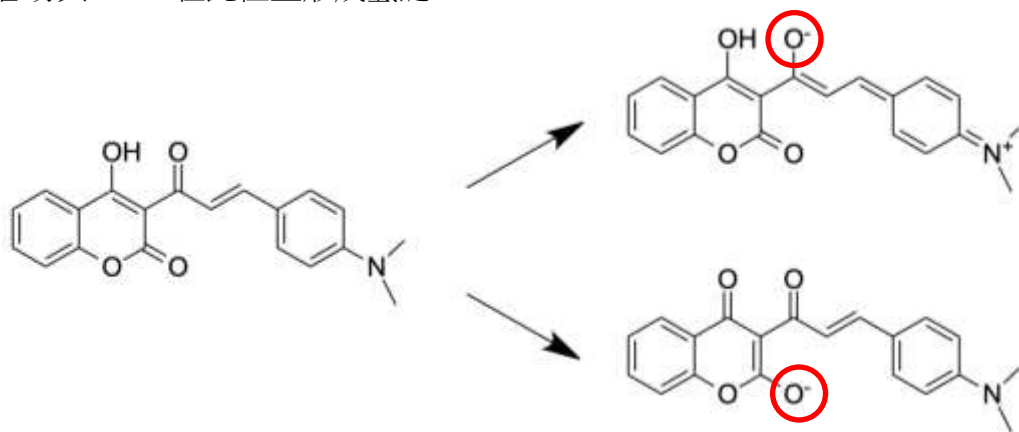


圖4-3(b) S27共振結構示意圖

陸、 結論與應用

一、 結論

本研究中，首創以香豆素衍生物探討與 IAPP 的互動機制，並發現以香豆素為骨幹加上各類不同官能基，可以有效對 IAPP 產生多種不同影響。

- (一) 利用固相胜肽合成法成功合成實驗所需之 IAPP 粗產物，並透過 HPLC 純化及 MS 質譜確認產物分子量，確定實驗所使用之蛋白質為高純度 IAPP。
- (二) 在 29 種香豆素樣品中，以吸收、放射光譜及溶解度淘汰可能會影響後續實驗的有機分子，並透過 ThT 動力學實驗篩選對於 IAPP 影響效果顯著之樣品，進一步進行後續實驗，有效節省實驗時間與資源。
- (三) 透過 ThT 動力學實驗、穿透式電子顯微鏡、圓偏光二色性光譜發現：S8 可加速 IAPP 聚集，並使其 β -sheets 比例提升；S19 可以與 IAPP 間有強親和力；S27 可以使 IAPP 延緩聚集，並可降解纖維。
- (四) 進一步以分子模擬觀察分子間互動，可發現：具低極性長支鏈的 S8 可藉由支鏈上的氧原子與四號位置 OH 基與 IAPP 單體形成氫鍵，推測可藉由使 IAPP 更容易形成 loop 結構，使 IAPP 加速聚集形成纖維；支鏈中具多電負度大的原子的 S19，可藉此與 IAPP 形成氫鍵，而與 IAPP 有強親和力，且推測其並未介入 loop 結構當中，而不影響纖維結構；具共振結構與高極性支鏈的 S27，可與 IAPP 形成氫鍵，推測可使 IAPP 在聚集過程不易伸展，進而延緩纖維形成。

二、 未來展望

由於本實驗中所使用之分子模擬為靜態的呈現方式，未來希望可進一步使用動態分子模擬，觀察有機分子與 IAPP 的互動過程，而對有機分子間的互動模式有更深入的了解。此外，本實驗著重於生物體外香豆素衍生物與 IAPP 的互動探討，未來也期待能進一步模擬生物體環境，探討在生物體內外對於互動模式的影響。

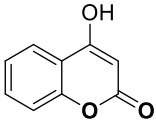
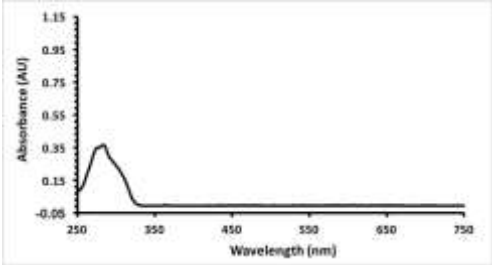
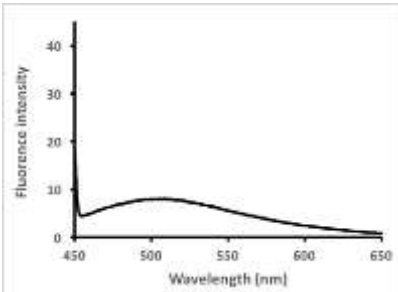
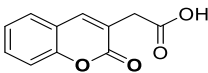
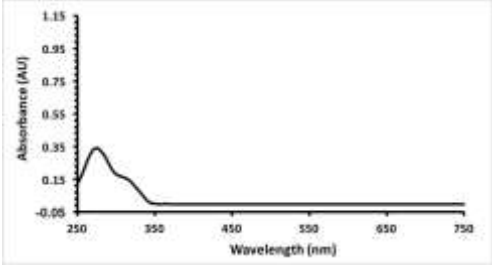
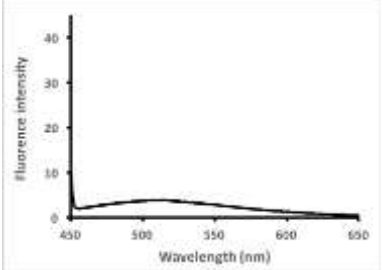
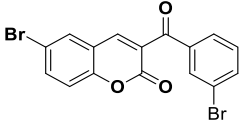
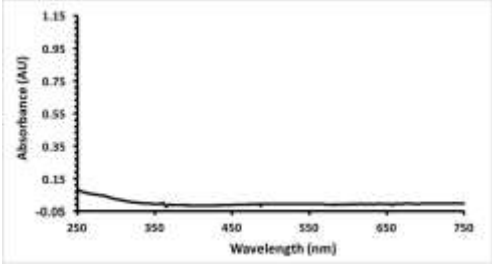
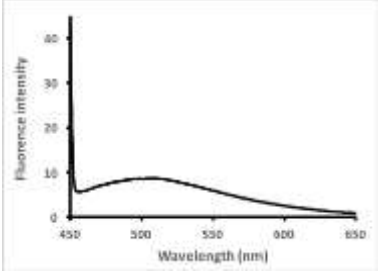
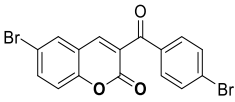
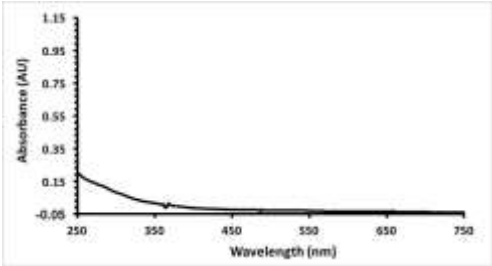
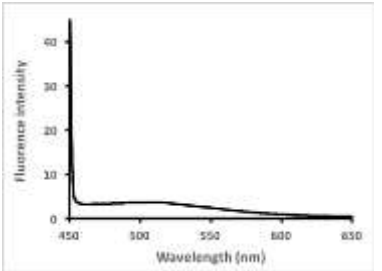
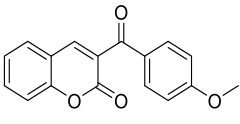
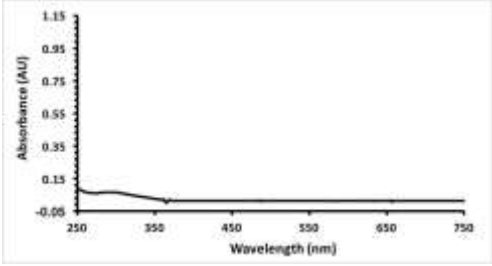
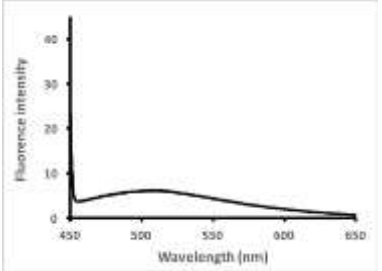
三、 應用

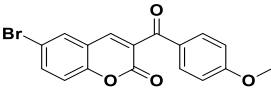
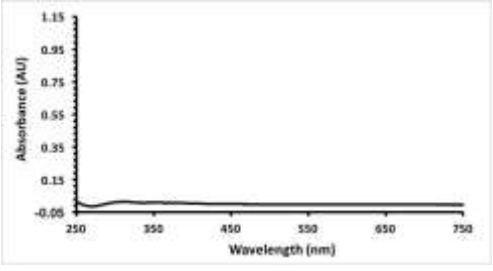
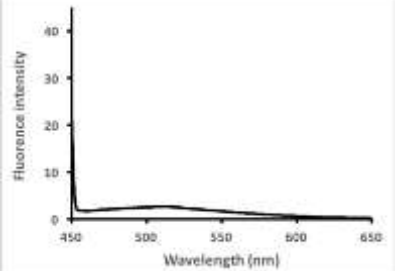
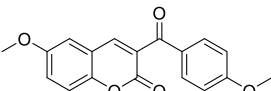
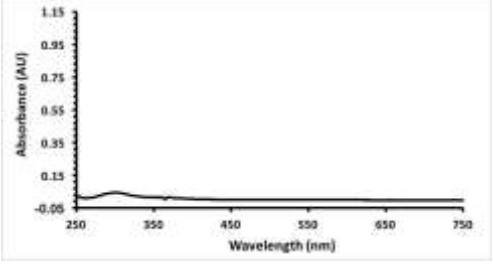
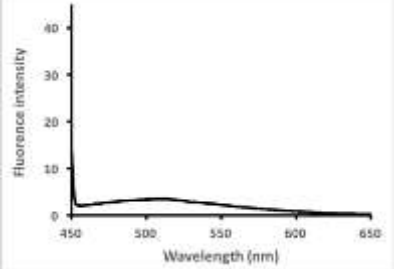
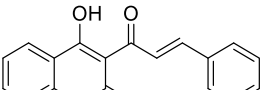
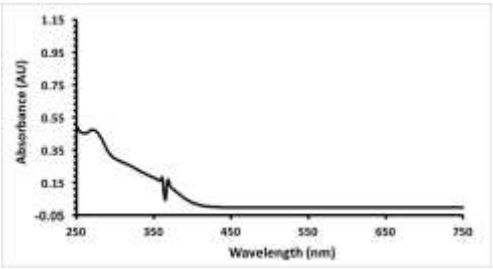
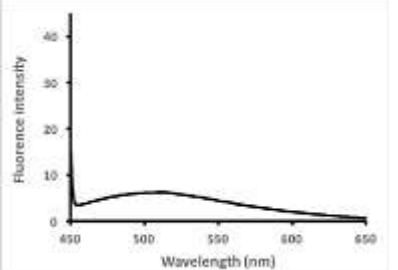
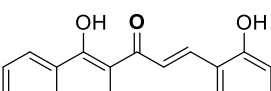
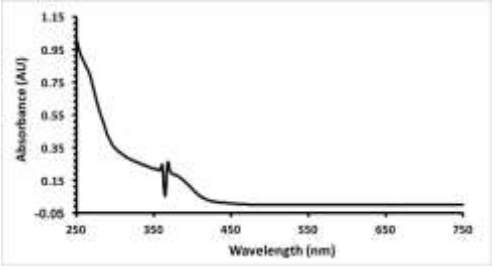
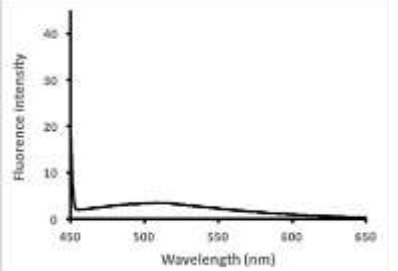
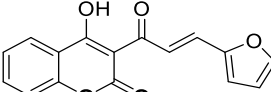
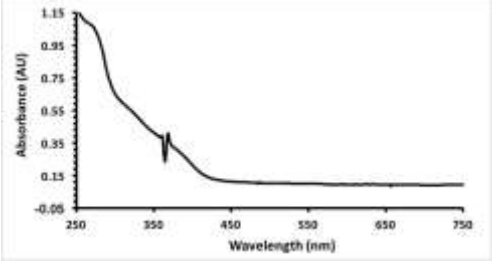
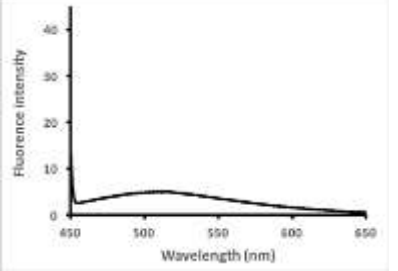
本研究中，具加速 IAPP 聚集效果的 S8，可應用於降低 IAPP 寡聚體對於細胞的毒性影響；與 IAPP 間具有強親和力的 S19，若能進一步開發，使其在嵌合在 IAPP 上時產生螢光變化，則可應用於分子探針開發；能延緩 IAPP 聚集並降解纖維的 S27，則有潛力應用於藥物開發，降低由於 IAPP 錯誤折疊對細胞造成的毒性影響。

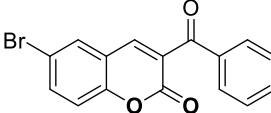
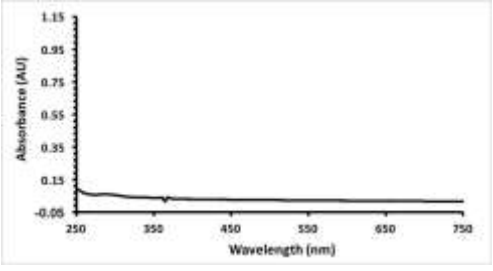
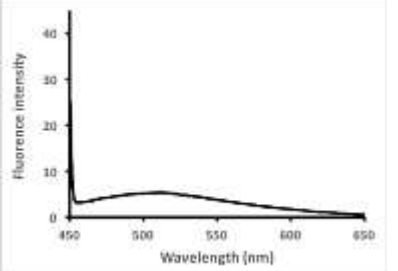
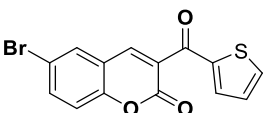
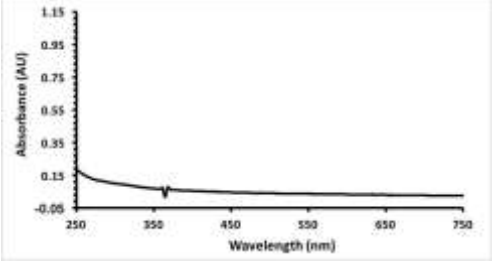
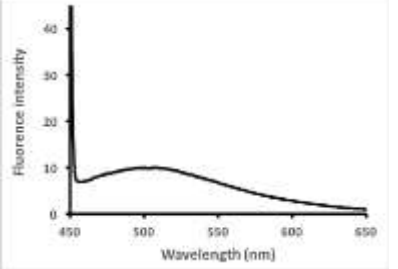
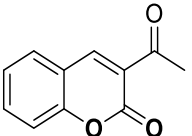
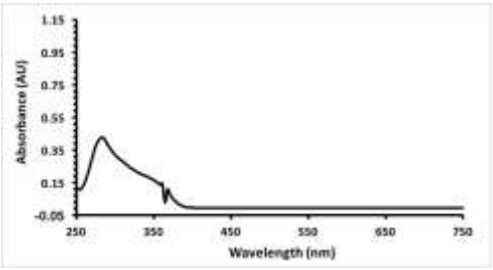
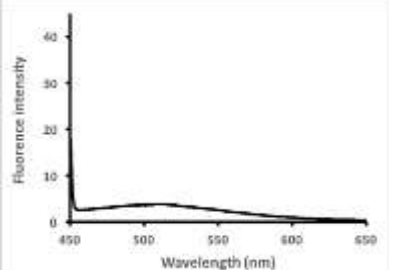
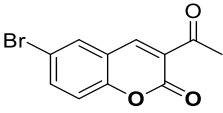
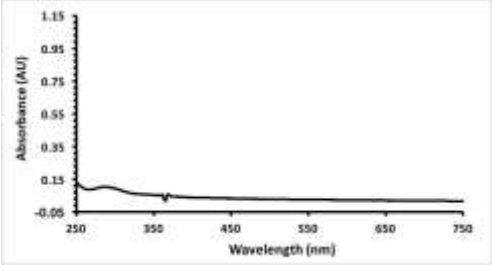
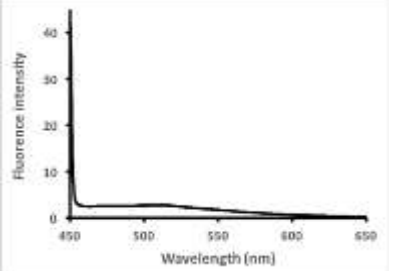
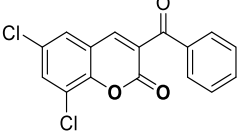
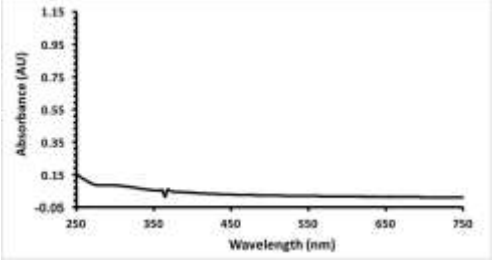
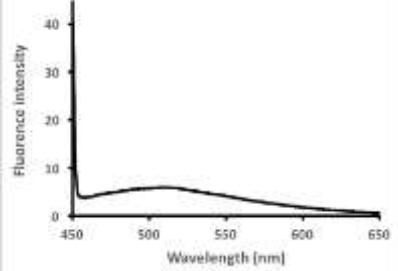
柒、參考資料及其他

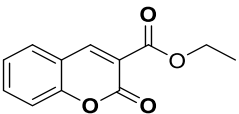
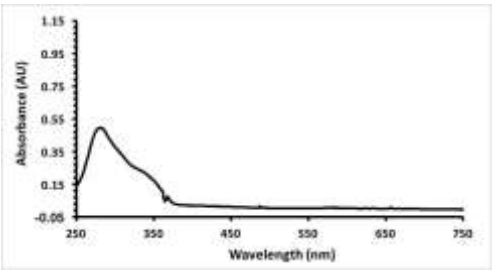
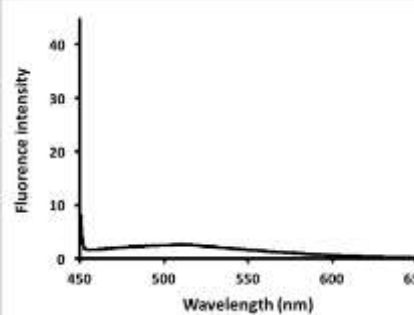
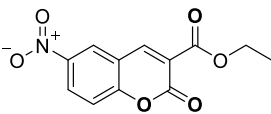
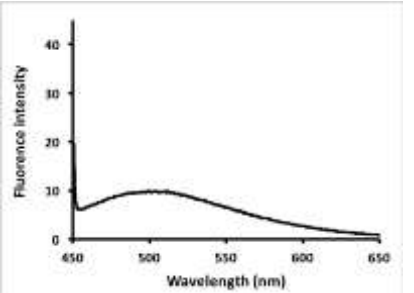
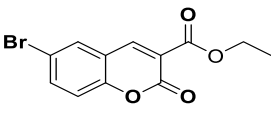
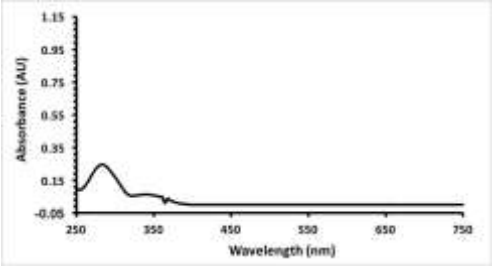
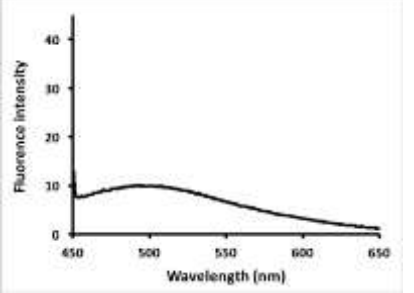
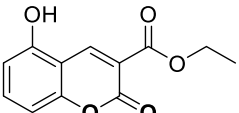
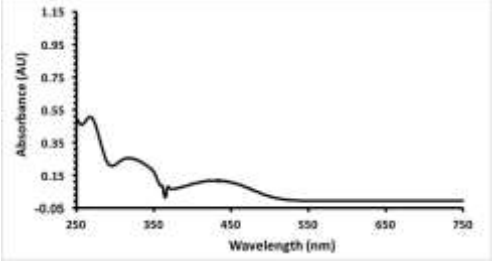
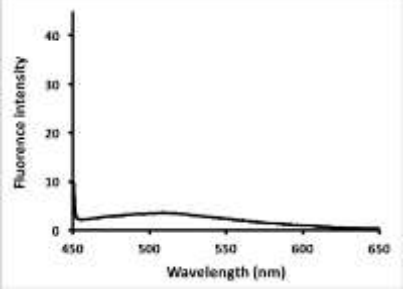
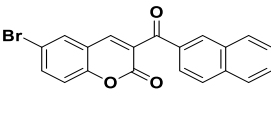
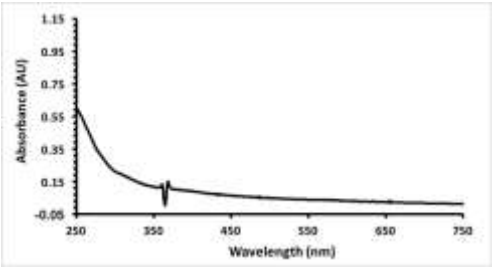
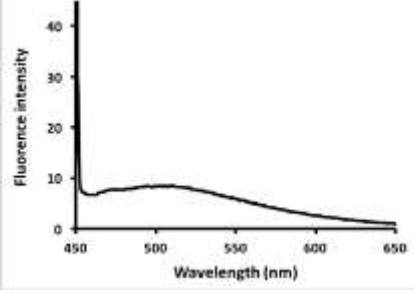
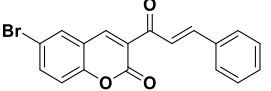
- 一、 Azuma Kanatsuka, Shigetake Kou, and Hideichi Makino(2018). IAPP/amylin and β -cell failure: implication of the risk factors of type 2 diabetes. *Diabetol Int.* 2018 Jul; 9(3): 143–157.
- 二、 D.S. Ranade, A.M. Bapat, S.N. Ramteke, B.N. Joshi, P. Roussel, A. Tomas,P. Deschamps, P.P. Kulkarni(2015). 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.
- 三、 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.
- 四、 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.
- 五、 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), 303-216.
- 六、 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.
- 七、 Biancalana, M.; Koide, S., Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils. *Biochim. Biophys. Acta* 2010, 1804 (7), 1405-1412.
- 八、 Lake BG. Coumarin metabolism, toxicity and carcinogenicity: relevance for human risk assessment. *Food Chem Toxicol.* 1999 Apr;37(4):423-53.
- 九、 Ratanasavanh D, Lamiable D, Biour M, Guédès Y, Gersberg M, Leutenegger E, Riché C. Metabolism and toxicity of coumarin on cultured human, rat, mouse and rabbit hepatocytes. *Fundam Clin Pharmacol.* 1996;10(6):504-10.
- 十、 Carneiro, A., Matos, M. J., Uriarte, E., & Santana, L. (2021). Trending Topics on Coumarin and Its Derivatives in 2020. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(2), 501.
- 十一、 DeLano, W.L. *The PyMOL Molecular Graphics System* (2002) DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA
- 十二、 Akter, R., Cao, P., Noor, H., Ridgway, Z., Tu, L. H., Wang, H., Wong, A. G., Zhang, X., Abedini, A., Schmidt, A. M., & Raleigh, D. P. (2016). Islet Amyloid Polypeptide: Structure, Function, and Pathophysiology. *Journal of diabetes research*, 2016, 2798269.

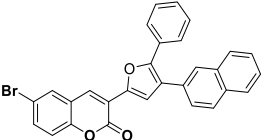
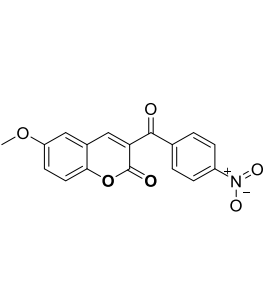
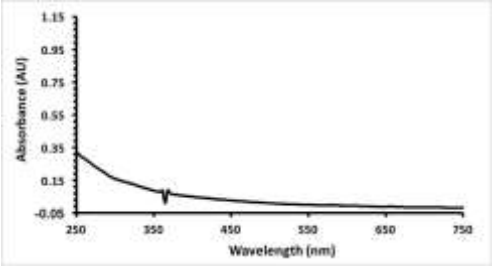
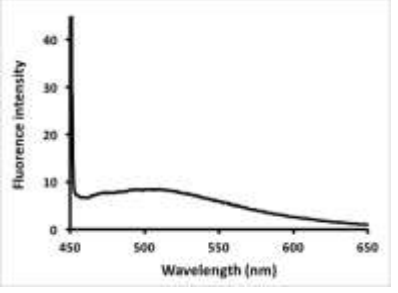
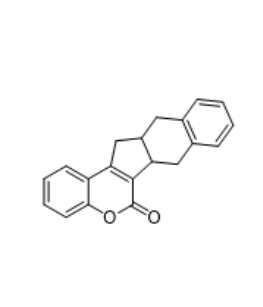
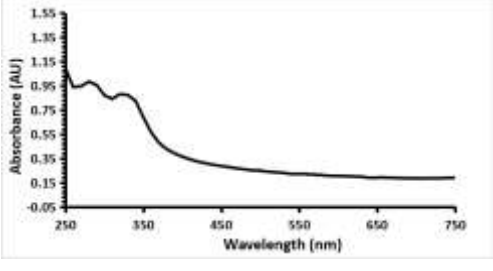
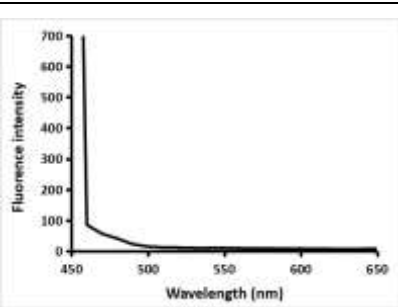
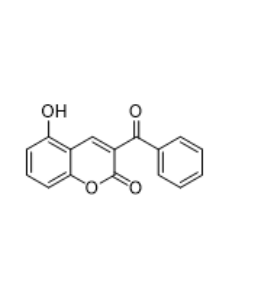
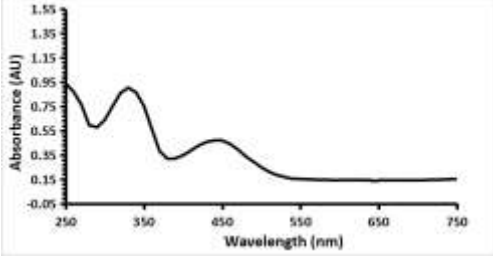
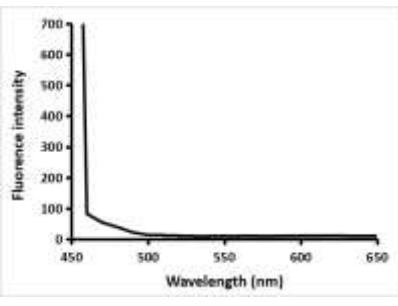
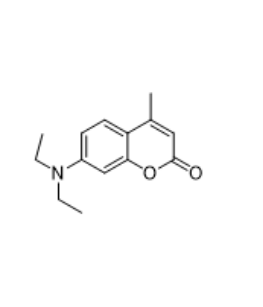
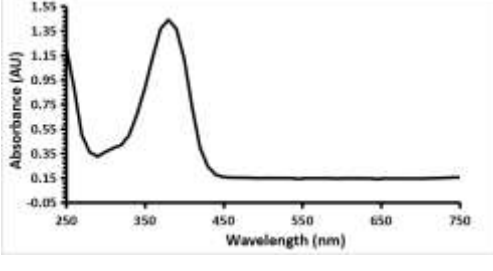
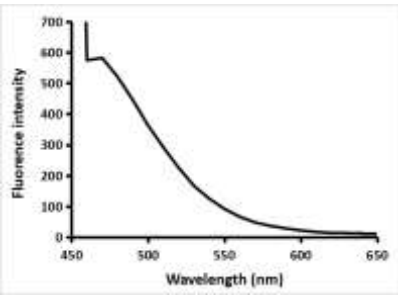
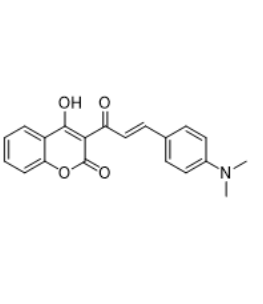
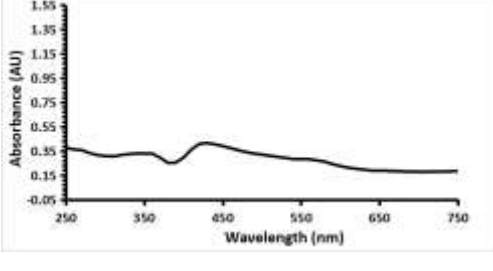
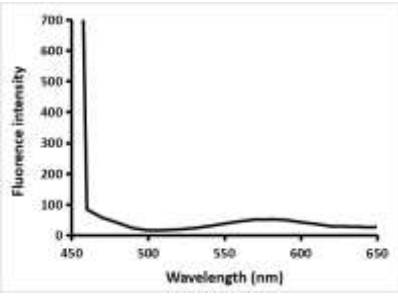
捌、附錄一

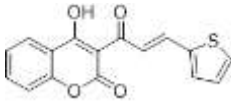
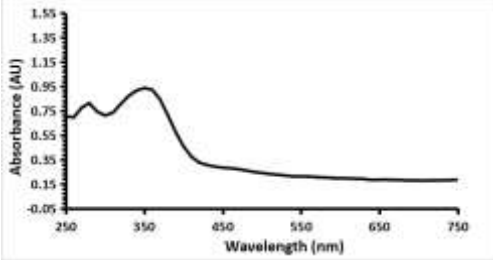
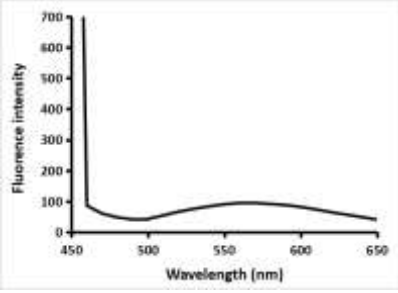
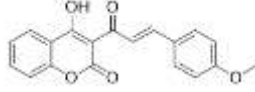
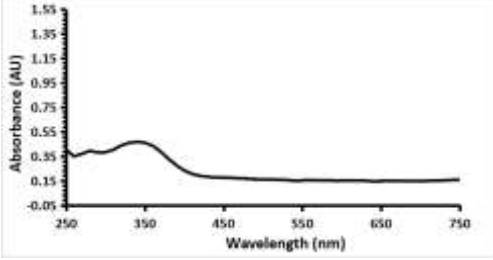
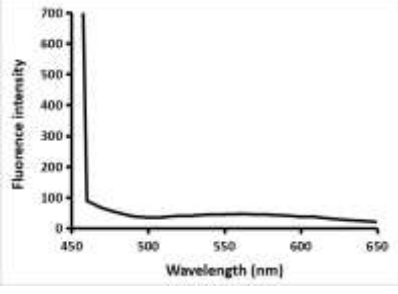
編號	結構	吸收光譜 波長範圍：250-750nm	以435nm 激發所得放射光譜 波長範圍：450-650nm
1			
2			
3			
4			
5			

6			
7			
8			
9			
10			

11	 <chem>O=C1C(=O)c2cc(Br)ccc2O1C(=O)c3ccccc3</chem>		
12	 <chem>O=C1C(=O)c2cc(Br)ccc2O1C(=O)c3ccsc3</chem>		
13	 <chem>CC(=O)c1ccccc1C(=O)c2cc3ccccc3oc2=O</chem>		
14	 <chem>CC(=O)c1cc(Br)ccc1C(=O)c2cc3ccccc3oc2=O</chem>		
15	 <chem>O=C1C(=O)c2cc(Cl)c(Cl)cc2O1C(=O)c3ccccc3</chem>		

16			
17		溶解度過低	
18			
19			
20			
21		溶解度過低	溶解度過低

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

28			
29			

【評語】 030008

本研究利用不同官能基之香豆素衍生物，測試其對胰島類澱粉蛋白之作用。實驗很完整，方法也非常有效。有下列幾項建議：

1. ThT 動力學試驗為主要實驗依據，應將反應機制說明清楚。
2. 大多香豆素衍生物在實驗設計之最低濃度，即已看出明顯變化，應降低濃度測試最低有效濃度。
3. 雖然更細的實驗只用三種香豆素衍生物，但原數據似乎也可得到很多重要歸納，可再加強討論未來好的分子設計藍圖。
4. 這些香豆素衍生物是否做過生物安全測試？