

pH 応答型膜透過ペプチドの設計とキャラクターゼーション

日大生産工(院) ○水野 仁貴 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

細胞膜表層との相互作用を引き金に膜構造を不安定化させる天然ペプチドとして西洋ミツバチ毒の成分である **Melittin** が知られている。**Melittin** のアミノ酸配列は大きく分けて 1)N 末端側 1~6 残基目の疎水性領域, 2)疎水性および親水性を有した領域, 3)C 末端側 21~26 残基目の親水性領域の 3 つの領域に分けられる両親媒性ペプチドである (Table 1)¹⁾。**Melittin** の膜透過機構は C 末端側に位置する塩基性アミノ酸(リシンとアルギニン)の側鎖と細胞膜表層との間の静電相互作用を駆動力として細胞膜に接近した後, 疎水性領域の α ヘリックス形成を伴う膜内への侵入により達成される²⁾。このような膜透過の活性は細胞膜と同様に脂質二重層を有しているリポソームにも適応可能であると考えられ, **Melittin** のような膜透過ペプチドを用いた薬物送達技術への応用が期待できる。

本研究では, 薬物送達系において血液中と細胞内におけるエンドソーム環境の pH の違いに注目し, エンドソーム環境において膜透過活性によるリポソームから内封物漏出が可能な系の構築を目的とする。そこで **Melittin** のアミノ酸配列のうち, C 末端側の塩基性アミノ酸を含む配列を保存し, 膜透過に寄与する部位をロイシンとアラニンの交互配列に単純化したペプチド LP の設計および合成を行い, リポソーム内封物漏出活性についてを検討した。

Table 1 Amino Acid Sequences of Melittin and Artificial Membrane Lytic Peptides

Melittin	: H ₂ N - GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ - CONH ₂
LP	: H ₂ N - GWWLALALALALALASWIKRKRQQ - CONH ₂
LPH	: H ₂ N - GWWLALALALALALASWIIHHHQQ - CONH ₂
LPE 3	: H ₂ N - GWWLALAEAEAEALALASWIKRKRQQ - CONH ₂
LPE 5	: H ₂ N - GWWLAEAEAEAEALASWIKRKRQQ - CONH ₂

2 実験操作

2-1 ペプチドの合成

目的のペプチドは **Fmoc** 固相合成法によって合成した。なおペプチド合成のための樹脂は **Fmoc-NH-SAL-MBHA Resin** を使用し, 反応活性剤として **HBTU**, **HOBt**, 求核剤として **DIEA** を用いた。

2-2 カルセイン封入リポソームの調製

ペプチドの標的として用いるリポソームは以下のように調製した。はじめにホスファチジルコリン(**Egg-PC**) に対し, 40 mM カルセイン水溶液(pH 7.4 および pH 5.0)を所定量添加した。その後, 単純水和法で多層のリポソームを形成させ, 凍結融解法によってカルセイン溶液を内封した単層リポソームの調製を行った。さらにサイズを 100 nm に均一にするためにエクストルージョンを行い, ゲル濾過クロマトグラフィーによってカルセイン溶液内封リポソームの分画を得た。

2-3 カルセイン蛍光測定

ペプチドとリポソームとの親和性を評価するためにリポソームに内封したカルセインの漏出挙動を蛍光測定により観察した。測定開始 6 min 後にペプチド濃度を 20 μ M になるように添加し, 25 min まで 30 sec ごとに測定し, その後, 界面活性剤の **Triton X-100** を加えリポソームを破壊し 30 min まで測定を行った。内封物漏出率は **Triton X-100** を添加した際の最大蛍光強度に対する各時間の蛍光強度の百分率で表示した。

2-3 円偏光二色性(CD)スペクトル測定

0.1 M **Tris-HCl** 緩衝液(pH 7.4 および pH 5.0)中でリポソームを調製し, リポソーム存在下におけるペプチドの二次構造を調べた。なお,

Synthesis and characterization of pH-responsive membrane lytic peptides

Mizuno MASAKI and Ayumi KASHIWADA

ペプチド濃度は蛍光測定と同様に 20 μM とし、測定波長 200 nm ~ 240 nm, 積算回数 10 回で測定を行った。

3 結果および考察

3-1 ペプチドの設計および合成

LPは緒言に記した通り Melittin のC末端側の塩基性アミノ酸を含む配列を保存し、膜透過に寄与する部位をロイシンとアラニンの交互配列に単純化した。しかし、pHによる膜透過活性の制御が期待できないため、LPの配列を基本としてエンドソーム環境におけるpH応答性を考慮したLPH, LPE3, LPE5の設計および合成も行った。

LPHはLPの塩基性アミノ酸であるリシンとアルギニンを全てヒスチジンに置換したものである。ヒスチジン側鎖のイミダゾール基の酸解離定数は6.0付近であり、中性付近(pH 7.4)では正電荷を有さないため、リポソーム表層と静電相互作用を示さないことが予想される。一方、エンドソームpH(= 5.0)ではイミダゾール基はプロトン化により正電荷を有することが予想され、リポソーム表層と静電相互作用し膜界面に接近し、膜透過の引き金となることができ設計とした。

また、LPE3 および LPE5 は膜透過に寄与する疎水性部位を形成する 3 および 5 箇所のロイシン残基をそれぞれグルタミン酸に置換したペプチドである。グルタミン酸は中性付近では側鎖が解離して負電荷を有するためペプチドの疎水性領域が親水的になり膜透過が達成できないことが予想されるが、エンドソーム pH ではグルタミン酸側鎖の解離が抑えられるため、疎水性を保持できることから膜透過が達成できるよう設計した。

3-2 蛍光測定による内封物漏出挙動の確認

カルセイン内封リポソームに LP を添加した際の漏出挙動を Figure 1 に示す。pH 7.4 および pH 5.0 いずれの系においてもペプチド LP の添加とともに蛍光強度の増加がみられた。すなわちカルセインの漏出が確認できた。この結果から LP はリポソーム表層との静電相互作用によって接近して疎水性部位が膜内に侵入し、内封物を漏出させることができる孔を形成することが確認された。

3-3 CD スペクトル測定による二次構造の確認

CD スペクトル測定の結果より LP はいずれ

の pH 条件下においても 208 nm と 222 nm 付近に負の極大が観測された。このシグナルは α ヘリックス構造の形成を示すものであり、LP が膜内に侵入する際に α ヘリックス構造を形成していることがわかった(Figure 2)。

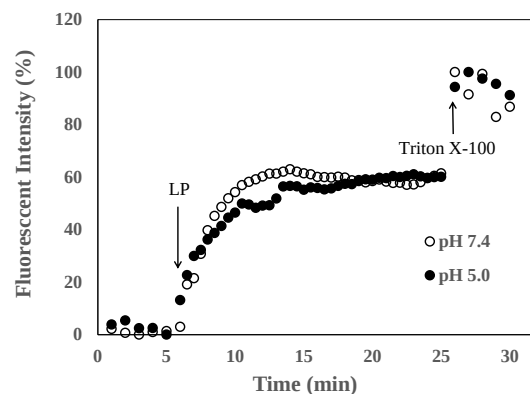


Figure 1 Kinetics of calcein leakage from liposomes at pH 7.4 and pH 5.0 when 20 μM of the lytic peptide (LP) were added to the system at 30 $^{\circ}\text{C}$.

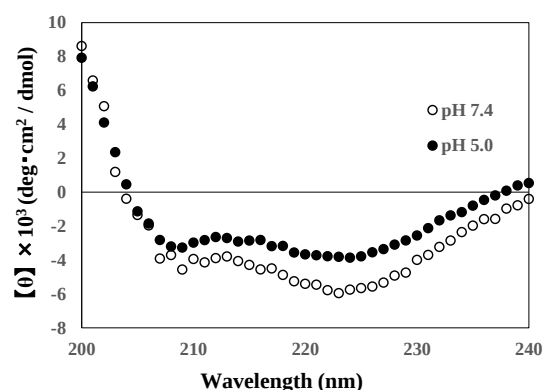


Figure 2 CD spectra of 20 μM of the lytic peptide (LP) were added in the presence of liposomes at pH 7.4 and pH 5.0.

4 結言

実験結果より Melittin のロイシンとアラニンの繰り返し配列による疎水領域改変は有効であることが確認された。また LPH と LPE3, LPE5 に関しても LP と同様の測定を行いリポソームに対する親和性を評価した。これらの詳細な結果については更なる検討中であり本講演にて発表を行う。

[参考文献]

- 1) T. C. Terwilliger, D. Eisenberg, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257:6016-6022.
- 2) H. Vogel, F. Jahnig *Biophys. J.* **1986**, 50: 573-582.