

酸性条件下で膜透過活性を示す新規ペプチドの合成と特性評価

日大生産工(院) ○大場 正博 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

がん治療における抗がん剤の副作用低減に向けて、薬剤を標的へ直接送達するための薬剤送達システム(DDS)技術が期待されている。悪性腫瘍細胞付近は、嫌気性解糖経路の副生成物である乳酸が蓄積し、酸性環境であることが知られている。そこで、われわれは悪性腫瘍細胞への DDS 構築の足掛かりとして、担体として用いられているリポソームに内封された薬剤を酸性条件下で放出させるためのツールとなりうる材料の開発を目的とした。本研究では酸性条件下でのみ膜透過活性を示すペプチドである GALA の構造¹⁾を参考にし、酸性条件下で膜透過活性を示すペプチドを新規に設計した。そして、膜透過活性の評価は円偏光二色性測定、蛍光測定により行った。

2 実験操作

2-1 Fmoc 固相合成法によるペプチド合成

Fmoc 固相合成法によりアミノ酸を縮合し、ペプチドを合成した。合成の際、樹脂に Fmoc-Gly-Wang resin, 活性剤として DIEA, 反応促進剤として HOBt および HBTU を用いた。合成後、トリフルオロ酢酸/純水/フェノール/トリイソプロピルシラン混合溶液により脱樹脂を行い、分画分子量 1000 のセルロース膜を用いた透析処理によりペプチド試料を得た。

2-2 円偏光二色性(CD)測定

pH 7.4 および pH 5.0 に調整した 0.1 M Tris-HCl 緩衝液を用い、50 μ M ペプチド溶液を調製した。その後、20 $^{\circ}$ C で波長 200-240 nm の範囲でスペクトル測定を積算回数 10 回の条件で行った。さらに、リポソーム構成脂質存在下におけるペプチドの二

次構造を調べるためにペプチド:脂質比が 1:10 となり、かつペプチド濃度が 50 μ M となるように脂質溶液を添加して CD スペクトル測定を行った。

2-3 カルセイン蛍光測定

卵黄ホスファチジルコリン(Egg PC)を 25 mM カルセイン溶液で水和した後、凍結融解、エクストルージョンにより粒径 100 nm のカルセイン封入単層リポソームを得た。その後、ゲルろ過を行い、リポソーム分画を得た。その後、得られたリポソーム溶液に、ペプチド:脂質比が 1:100 となるようにペプチド溶液を添加して蛍光測定を行った。なお、測定温度は 30 $^{\circ}$ C、励起波長は 488 nm であり、測定波長は 500-600 nm の範囲とした。測定開始後 5 分間はリポソームからのカルセインの自発的漏出がないことを確認後、ペプチド溶液を添加し、30 秒ごと 20 分間蛍光測定を行った。その後、界面活性剤である Triton X-100 を添加した。

3 結果および考察

3-1 新規ペプチドの設計

GALA はヘリックス形成時にグルタミン酸が面を形成する設計に基づき合成された人工 pH 応答性膜透過ペプチドである。中性条件ではグルタミン酸の側鎖のカルボキシル基が解離して起こる静電反発によりランダムコイルとなり膜透過活性を示さないが、酸性条件ではカルボキシル基の解離が抑えられてヘリックス構造を形成し、膜透過活性を示す¹⁾。ペプチドがヘリックス構造をとり、会合体を形成してリポソーム膜内に存在する際、グルタミン酸による親水性の面を内側にする。したがって、グルタミン酸が形成する面の広がりにより膜内のペプチドの会合状態が変化してリポソ

Synthesis and Characterization of Novel Acidic pH-selective Membrane Lytic Peptides

Masahiro OBA and Ayumi KASHIWADA

ーム内封物の漏出量が変化すると考え、2種類のペプチド(TN002, TN003)を合成し、その膜透過活性に関する評価を行った(Chart 1, Fig. 1)。

Chart 1 Amino acid sequences of membrane lytic peptides designed in this study.

GALA	H ₂ N-	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA	-COOH
TN002	H ₂ N-	GWELQEELAEALLEQLELAEEAAAG	-COOH
TN003	H ₂ N-	GWAEQEELAEALAEALAELELAAG	-COOH

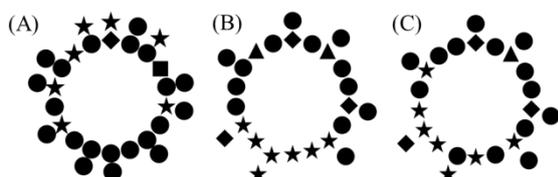


Fig. 1 Helical wheel of (A) GALA, (B) TN002, and (C) TN003. Star (★): glutamic acid, circle(●): hydrophobic amino acid, triangle(▲): glutamine, rhombus(◆): neutral amino acid, square(■): histidine.

3-2 CD 測定結果

水溶液中における TN002 および TN003 の CD 測定結果を Fig. 2 に示す。得られた CD において、ヘリックス構造特有の 222 nm の負の極大に着目すると、TN002 では pH 変化および脂質の存在による変化が認められなかったが(Fig. 2 (A)), TN003 では pH 低下に伴いピーク強度が大きくなり、脂質存在下ではさらに大きくなることが分かった(Fig. 2 (B))。さらに、pH 7.4 では TN002 と TN003 の CD 強度はほぼ同じであるが(Fig. 2 (C)), pH 5.0 においては、TN003 の方が TN002 より大きな強度が観測された(Fig. 2 (D))。以上の結果から TN003 の方が酸性条件におけるヘリックス構造形成傾向が強いといえる。

3-3 蛍光測定結果

Fig. 3 はカルセイン封入りポソームに対し、TN002 および TN003 を添加した際のカルセイン漏出挙動を示す。TN002 および TN003 ともに酸性条件ではカルセインの漏出挙動が顕著に認められたが、TN003 の方が pH 変化による漏出挙動の差

が大きいことが明らかとなった。

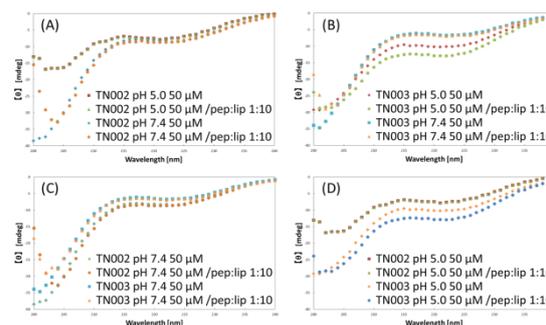


Fig. 2 CD spectra of (A) TN002, (B) TN003, (C) TN002 and TN003 at pH 7.4, and (D) TN002 and TN003 at pH 5.0 (20 °C).

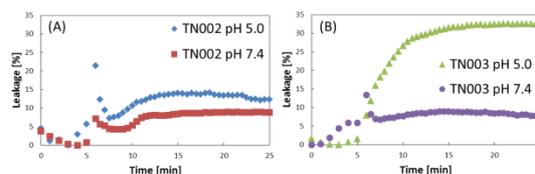


Fig. 3 Percentage of calcein leakage from liposome by addition of (A) TN002 and (B) TN003 at pH 7.4 and pH 5.0 (30 °C).

4 まとめ

本研究で合成したペプチド TN002 および TN003 は酸性条件でのみ膜透過活性を示したが、グルタミン酸が形成する面がより広い TN003 の方が酸性条件において、ヘリックス性およびカルセイン漏出挙動ともに顕著に認められたことから、グルタミン酸が形成する面の広がりを制御することで、リポソームに内封された薬剤の経時的放出量を制御することができるということが示唆された。

[参考文献]

- 1) Subbarao N. R., Parente R. A., Szoka F. C., Nadasdi L., Pongracz K. *Biochemistry* **1987**, *26*, 2964-2912.