

DDS 構築を目的とした 金属イオン応答性膜透過ペプチドの設計及び特性評価

日大生産工 (院) ○橋本 純一

日大生産工 (専任教員) 柏田 歩・松田 清美

1. 緒言

タンパク質の二次構造のひとつである α -ヘリックスは単純な構造ながら種々の機能性タンパク質中に見出されている。そのため、その構造形成の制御は生体内反応における機能の解明に重要な役割を担っており、種々のモデルペプチドが設計されている^{1) 2)}。

α -ヘリックス構造が単独で機能する例として、西洋ミツバチ毒由来の **Mellitin** が知られている。**Mellitin** は細胞膜と親和性を示し、細胞膜透過性 α -ヘリックスを形成する事により、細胞内容物を漏出させる³⁾。また、**Mellitin** モデルとして設計された人工ペプチド **WALP** においても疎水性 α -ヘリックス構造の形成が細胞膜の局所的な不安定化に大きく寄与し、内容物の漏出に影響している事が示されている⁴⁾。

そこで本研究では、細胞膜透過性ペプチドと薬物担体として広く利用されている人工脂質二分子膜小胞であるリポソームを組み合わせる事で新規 DDS の構築を目的とする。まず、**WALP** のアミノ酸配列を参考に疎水性 α -ヘリックス領域を簡略化した **Lytic Polypeptide (LP)** の設計及び合成を行い、リポソーム膜に対する親和性を評価した。更に LP の疎水性 α -ヘリックス形成ならびにリポソーム親和性に金属イオン応答性を付与するために、LP の配列中における疎水性 α -ヘリックス領域中の 2 箇所、金属配位能を有するイミノ酢酸 (**Ida**) 基⁵⁾を置換した LP (**Ida**) を 3 種設計した (Table 1)。

Table 1 Amino acid sequences of membrane lytic polypeptides

LP	H ₂ N—GWWLALALAL ¹⁰ ALALALASW ²⁰ IKRKRRQ—CONH ₂
LP(Ida)	a H ₂ N—GWWLALXLAL ¹⁰ XLALALASW ²⁰ IKRKRRQ—CONH ₂
	b H ₂ N—GWWLALXLAL ¹⁰ ALALALASW ²⁰ IKRKRRQ—CONH ₂
	c H ₂ N—GWWLALXLAL ¹⁰ ALAXALASW ²⁰ IKRKRRQ—CONH ₂
Hydrophobic α -helical segment X=Lys(Ida)	

LP (**Ida**) における 2 つの **Ida** 基は Fe^{3+} と安定なキレート構造を形成するが、還元される事で配位能を失う事が知られており⁵⁾、これをスイッチとして利用する事で鉄イオンの酸化還元による疎水性 α -ヘリックス形成とリポソーム親和性の制御を試みる (Fig. 1)。

本報告では、カルセイン封入リポソームからのカルセイン溶出挙動を蛍光スペクトルにより追跡する事によってペプチドのリポソーム親和性評価を行った。更にペプチドと金属イオンとの配位挙動を定性的に評価するため、水溶液中において UV スペクトル測定を行った。

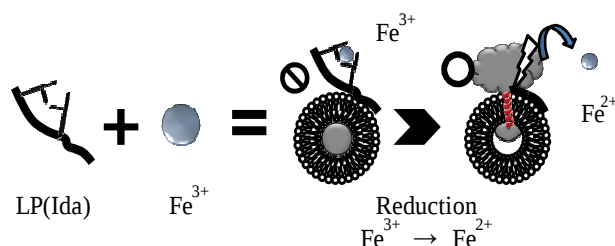


Fig. 1 Schematic illustration of the membrane lytic system by the use of designed polypeptides.

2. 実験操作

2-1 膜透過ペプチドの合成

固相合成用樹脂として **Fmoc-NH-SAL-MBHA resin** を用い、**Fmoc** 固相合成法によって行った。なお、ペプチド結合の形成を促進するため **HOBt**・**HBTU** 活性化法を用いた。

2-2 リポソームの合成

卵黄 phosphatidylcholine (**Egg PC**) を、60 mM のカルセイン溶液 (0.1 M **Tris-HCl** 緩衝液 (pH 7.4)) に溶解し、バンガム法により多重層リポソームを形成した後、凍結融解法により単層リポソームを得た。さらに、エクストルーダーを用いてリポソームサイズを 100 nm に均一化し、ゲルろ過クロマトグラフィーによってカルセイン封入リポソームを分画した。

Design and characterization of metal ion-responsive transmembrane peptide for constructing DDS.

Junichi HASHIMOTO, Ayumi KASHIWADA, and Kiyomi MATSUDA

2-3 カルセイン漏出実験

HITACHI F-2500 分光蛍光光度計を用いた蛍光スペクトル測定により、カルセイン漏出実験を行った。分画したカルセイン封入リポソーム溶液と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶解した 20 μ M のペプチドを混合し、30 秒ごとに励起波長 490 nm におけるカルセインの蛍光波長 520 nm の蛍光強度変化を 30 分間追跡した。

3. 結果と考察

Fig. 2 は、カルセイン漏出実験の結果を示している。ペプチド添加前にカルセイン漏出による蛍光強度の変化がないことを確認し、LP を添加後、蛍光強度の変化を追跡した。さらに 20 分後、界面活性剤である Triton X-100 を用いてリポソームを完全に破壊し、漏出しカルセインの最大蛍光強度を測定することで相対蛍光強度比を算出した。LP を添加した際には約 60% 程度の漏出が観測され、LPa を添加した際にも約 55% 程度の漏出が観測された。また、Triton X-100 を加えた事により、最大蛍光強度を示した事から、LP 及び LPa はリポソームを破壊するのではなく、細孔を形成している事が示唆された。したがって、LP と LPa は同等の膜透過能を有している事が分かる。一方で、 FeCl_3 を等量添加した LPa- Fe^{3+} の漏出挙動に着目すると、20% 程度と顕著に漏出率が低下している事が確認出来た。その理由として、設計通りに Ida 基が Fe^{3+} に配位する事で疎水性 α -ヘリックス構造形成が阻害され、リポソーム膜との親和性に基づく膜透過性が阻害されている事が示唆された。

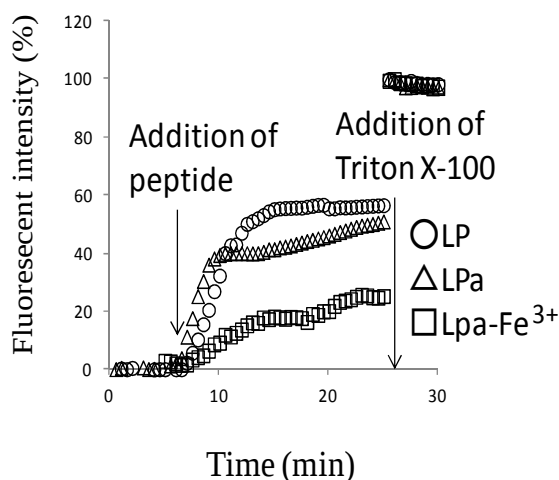


Fig. 2 Kinetics of peptide induced calcein leakage.

またペプチドに対する Fe^{3+} イオンの配位挙動を調べるため、 Fe^{3+} の存在有無による LPa の UV スペクトルを測定した。その結果を Fig. 3 に示す。LPa に対し FeCl_3 を添加した LPa- Fe^{3+} では 260 nm 付近に顕著な吸収が観測された。このことは LPa 中の 2 箇所の Ida 基が Fe^{3+} イオンと配位している事を示している⁵⁾。この事から LPa を用いた際のリポソームからのカルセイン漏出挙動は、LPa に対する Fe^{3+} 配位と関連していることが明らかになった。

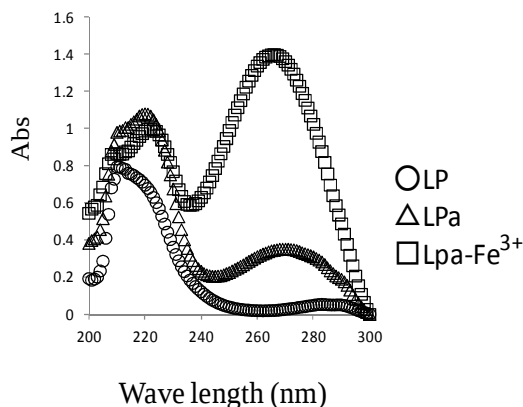


Fig. 3 UV spectra of LP and LPa (in the absence and presence of FeCl_3) in 0.1 M Tris-HCl buffer solution (pH 7.4).

4. 結言

今回設計した LPa は LP と同様のリポソーム膜との親和性に基づく膜透過能を有しており、 Fe^{3+} イオンが配位する事で膜透過を阻害する事が確認された。今後はチオ硫酸ナトリウムを還元剤として用いて、 Fe^{3+} イオンを Fe^{2+} イオンに還元した系においても同様の実験を行い膜透過制御の評価を行う。また、LPb・LPc についても評価し、LPa と比較検討する。

5. 参考文献

- 1) C. J. Daniel ; T. Colin ; S. P. Joel *J. Am. Chem. Soc.* **2003** , 125 , 2923-2929.
- 2) A. Ojida ; M. Inoue ; Y. Mito-oka ; I. Hamachi *J. Am. Chem. Soc.* **2003** , 125 , 10184-10185.
- 3) D. K. Hinch ; J. H. Crowe *Biochim. Biophys. Acta* **1996** , 1284 , 162-170.
- 4) J. A. Killian ; I. Salemink ; M. R. G. dePlanque ; Lindblom ; R. E. Koeppe II ; D. V. Greathous *Biochemistry* **1996** , 35 , 1037-1045.
- 5) S. Futaki ; T. Kiwada ; Y. Sugiura *J. Am. Chem. Soc.* **2004** , 126 , 15762-15769.