

膜透過性ペプチドのアミノ酸配列改変による pH 応答性の評価

日大生産工(院) ○水野 仁貴 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

近年, 目的の細胞や組織に対し, 選択的に薬剤を送り込み, 薬効を発揮させることで薬剤使用量や副作用の軽減を目指すための方法論としての薬物送達系(Drug Delivery System: DDS)が注目され, 癌治療などへと応用されている。DDS 構築に必要なナノキャリアーとしてリポソームは細胞膜の主成分であるリン脂質による二分子膜構造からなる小胞であり, 内水相に水溶性の薬剤を封入することが可能である。しかし, リポソーム自体には薬剤放出能がないことから, さらに効果的な DDS 構築を目的として, 外部刺激によってリポソームから薬剤放出を可能とする系の構築に関して様々な研究が行われている。そこで, 我々はリポソーム内封薬剤の放出手段として膜透過性ペプチドの利用を考えた。

膜透過性ペプチドは細胞膜表層との相互作用を引き金に細胞膜内に侵入し, 膜構造を不安定化させるペプチドである。本研究では西洋ミツバチ毒の主成分であるメリチンをモデルとして人工ペプチドの設計を行った。

メリチンによる膜透過は C 末端側に存在する塩基性アミノ酸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, 疎水性の α -ヘリックス形成を伴うにより膜内への侵入により達成される¹⁾。通常ペプチドの膜透過に関して疎水性相互作用が重要な要因であるが, メリチンはそれに加え, 標的細胞に対する静電的引力が作用するので, 他の膜透過ペプチドと比較してより高い膜透過活性を示す人工ペプチドのモチーフとして期待できる。

本研究では, 目的患部のみでの薬剤作用および薬剤の徐放性の観点から血液中環境(中性 pH)と細胞内におけるエンドソーム環境(弱酸性 pH)の違いに注目し, エンドソーム環境のみで膜透過活性によるリポソームからの内封物漏出が可能な系の構築を目的とする。そこで初段階としてメリチンのアミノ酸配列をもとにペプチド LP の合成を行った。そして, 次段階として LP のアミノ酸配列をもとに pH 応答性を付与した LPH および LPE3 なら

びに LPE4, LPE5 を合成し, リポソーム膜透過活性の評価を行った。

2 実験操作

2-1 ペプチドの合成

本研究で設計, 合成したすべてのペプチドは Fmoc-NH-SAL-MBHA Resin を使用した Fmoc 固相合成法によって合成した。

2-2 カルセイン封入リポソームの調製

ホスファチジルコリン(Egg-PC)の薄膜を 25 mM カルセイン水溶液(pH 7.4 および pH 5.0)で水和させ, 多層リポソームを形成させた後, 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。さらにエクストルージョン法によりサイズを 100 nm に均一化した後に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。分画後, リン脂質 C-テストワコー[®]を用いてゲル濾過後のリン脂質の濃度決定を行った。

2-3 蛍光強度変化によるリポソーム内封物漏出挙動測定

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。リポソーム内水相からのカルセインの自発的漏出が観測されていないことを確認した後, ペプチド溶液を適量添加した際のカルセイン蛍光強度変化を測定し, 最後に Triton X-100 を加えリポソームを破壊した。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算出した。

3 結果および考察

3-1 ペプチドの設計

メリチンおよび合成したペプチドのアミノ酸配列を Table 1 に示す。LP はメリチンの 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疎水性が高く α -ヘリックス構造を形成しやすいロイシン(L)とアラニン(A)の交互配列

Characterization of pH-responsivity of designed membrane lytic peptides
by modification of amino acid sequences

Mizuno MASAKI and Ayumi KASHIWADA

にすることで単純かつ膜侵入能に特化した配列とした。LP の配列をもとに pH 応答性を付与した LPH および LPE3, LPE5, LPE4 の設計を行った。

LPH は LP のリシンとアルギニンを全てヒスチジン(H)に置換した配列となっている。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、中性付近では正電荷を有さない。一方、酸性条件下では正電荷を有するため、pH 変化によって膜接近能の変化を期待した設計となっている。

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(E)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のカルボキシル基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。一方、酸性条件下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な設計となっている。LPE4 は 4 箇所のロイシン残基を LPE3 および LPE5 と同様にグルタミン酸に置換したペプチドであるが、ヘリックス構造を形成した際にグルタミン酸がある片面に集中するよう設計した。膜透過には α -ヘリックス構造の形成が大きく関係していることから中性付近ではグルタミン酸の電荷の反発を利用し、 α -ヘリックス構造形成を抑制させ、酸性条件下のみで膜透過を期待した配列となっている。

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

メリチン	H ₂ N-G I G A V L K V L T T G L P A L I S W I K R K R Q Q -CONH ₂
LP	H ₂ N-G W W L A L A L A L A L A L A L A S W I K R K R Q Q -CONH ₂
LPH	H ₂ N-G W W L A L A L A L A L A L A L A S W I H H H H Q Q -CONH ₂
LPE3	H ₂ N-G W W L A L A E A E A E A L A L A S W I K R K R Q Q -CONH ₂
LPE4	H ₂ N-G W W E A L A E A L A E A L A E A S W I K R K R Q Q -CONH ₂
LPE5	H ₂ N-G W W L A E A E A E A E A L A S W I K R K R Q Q -CONH ₂

3-2 蛍光測定によるリポソーム内封物漏出挙動の検討

カルセイン内封リポソームに LP を添加した際のカルセインの漏出挙動を Figure 1 に示す。pH 7.4 および pH 5.0 いずれの条件においても LP の添加とともに蛍光強度の増加が認められた。すなわち LP はリポソーム膜との相互作用によって膜内に侵入し、内封されたカルセインを漏出可能なことを示す結果が得られた。他のペプチドについても同様の評価を行い、Triton X-100 を添加する直前における漏出率を Figure 2 に示す。LPH に関して LP と同程度の最大漏出率が得られた。これは膜侵入部位である疎水性領域の配列が LP と同様の配列であるため pH 7.4 においても膜透過性を維持したと考えられる。

また、LPE3 および LPE4, LPE5 について期待した pH 7.4 における膜透過活性の制御が認められなかった。しかし、LPE3 および LPE4 に関して LP および LPH より高い漏出率を示した。これは配列中にグルタミン酸を含むために脂質膜対し LP, LPH より傾斜して膜内に侵入していくことが予想されるため、膜構造をより不安定化し高い漏出率を示したと考えられる。

一方、LPE5 の添加においてはほとんど膜透過活性が認められなかった。これは配列中により多くのグルタミン酸が存在するためにペプチド自身の疎水性が低下してしまったことが考えられる。

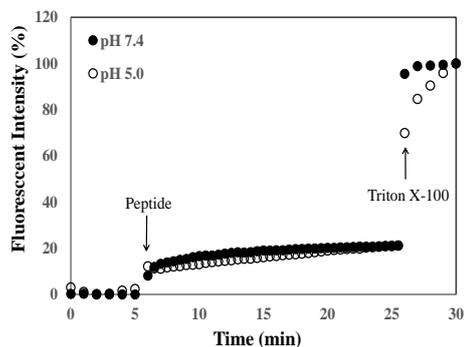


Figure 1. Kinetics of calcein leakage from liposomes after addition of 20 μ M of LP (LP:lipid = 1:100) at pH 7.4 and pH 5.0 (30 $^{\circ}$ C).

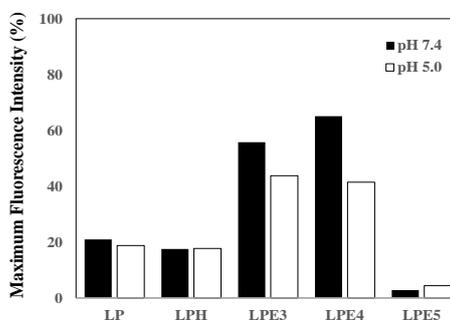


Figure 2. Percentage (%) of calcein leakage from liposomes after addition of 20 μ M of lytic peptides (peptide:lipid = 1:100) at pH 7.4 and pH 5.0 (30 $^{\circ}$ C).

4 結言

本研究における結果からリポソームの内封物をより漏出するにはグルタミン酸の残基数や位置が大きく関与していることがわかった。展望として、より低 pH 条件での測定を行うことでリポソーム膜との相互作用の影響の変化を検討する。

[参考文献]

- 1) S. H. White, W. C. Wimley, *Biochimica et Biophysica Acta* **1998**,1376, 339-352.