

## 酸性 pH 応答性膜透過ペプチドの創製と特性評価

日大生産工 (院) ○大場 正博 日大生産工 柏田 歩

## 1 緒言

投薬の際の薬物による副作用低減に向け、薬物送達システム(DDS)技術が期待され、盛んに研究が行われている。しかし、DDSにおける代表的な担体であるリポソームは、自発的に薬物を放出することが困難であるため、リポソームからの薬物放出を促す手段として、膜透過ペプチドを用いる研究がこれまで行われてきた。

われわれは、がん治療における DDS に着目し、酸性環境である腫瘍細胞付近において、リポソームからの薬物放出を促す膜透過ペプチドの創製を行っている。本研究では酸性条件下で膜透過活性を示すことが知られている **GALA** のアミノ酸配列とリポソーム中での構造を参考にし、酸性条件下において膜透過活性を示すペプチドを新規に設計した。そして、ペプチドの膜透過活性の評価は、円偏光二色性測定および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

本研究において用いるすべてのペプチドは、Fmoc 固相合成法により合成した。合成の際に用いる樹脂として、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。

## 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  $\mu$ M ペプチド溶液を調製した。その後、20  $^{\circ}$ C 条件下、波長 200-240 nm の範囲での CD スペクトル測定を積算回数 10 回で行った。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 における CD スペクトル測定も行った。

## 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、外水相のカルセインを除去するためにゲルろ過を行い、リポソーム分画を得た。そして、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 490 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した。そして、ペプチド溶液を添加後、30 秒ごと 20 分間蛍光測定を行った後、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 膜透過ペプチドの設計

**GALA** は、酸性条件下のみグルタミン酸側鎖のカルボキシ基のプロトン解離が抑えられてヘリックス構造を形成し、膜透過活性を示すことが知られている人工 pH 応答性膜透過ペプチドである。 **GALA** が膜透過活性を示す際はグルタミン酸による親水面を内側にして会合体を形成する。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透過活性が変化すると仮定し、2 種類のペプチド **TN002** と **TN003** を設計した。さらに、**TN002** および **TN003** のヘリックス安定性を高めるため、**TN002** と **TN003** のグルタミン酸のうち 2 残基をグルタミンに置換した **TN005** と **TN006** を設計した (Chart 1, Fig. 1)。

---

Design and Characterization of Acidic pH-responsive Membrane Lytic peptides

Masahiro OBA and Ayumi KASHIWADA

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

Peptides	Amino acid sequences
TN002	H <sub>2</sub> N- G W E L Q E E L A E A L L E Q L E L A A E A A A G -COOH
TN003	H <sub>2</sub> N- G W A E Q E E L A E A L A E A L A E A L E L A A G -COOH
TN005	H <sub>2</sub> N- G W E L Q E E L A E A L L Q Q L Q L A A E A A A G -COOH
TN006	H <sub>2</sub> N- G W A E Q E E L A Q A L A E A L A Q A L E L A A G -COOH

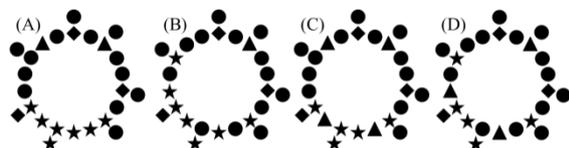


Fig. 1 Helical wheel of (A) TN002, (B) TN003, (C) TN005, and (D) TN006. Star(★): glutamic acid, circle(●): hydrophobic amino acid, triangle(▲): glutamine, rhombus(◆): neutral amino acid.

### 3-2 CD 測定結果

水溶液中における各ペプチドの CD 測定結果を Fig. 2 に示す。得られた測定結果において、ヘリックス特有の 222 nm の負の極大に着目すると、TN002 および TN005 では pH 変化および脂質の存在による優位な変化が認められなかったが (Fig. 2 (A),(C)), TN003 では pH 低下に伴うピーク強度の増加とともに、脂質存在下における顕著な強度の増加が認められた (Fig. 2 (B))。

一方、TN006 は酸性条件かつ脂質存在下でヘリックス性が増加したが、TN006 は pH 低下によるヘリックス性の増加は認められなかった (Fig 2 (D))。

### 3-3 蛍光測定結果

Fig. 3 はカルセイン封入りリポソームに対し、各ペプチドを添加した際のカルセイン漏出挙動を示す。TN002 および TN003 とともに、酸性条件下においてカルセインの漏出が確認できたが、TN003 の方が、漏出量が多いことが分かった。

一方、TN005 および TN006 の添加においては、いずれの pH においてもカルセインの漏出が認められなかった。このことから、TN005 と TN006 の膜透過活性は無いと言える。

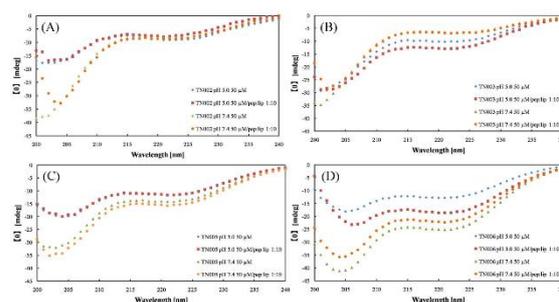


Fig. 2 CD spectra of (A) TN002, (B) TN003, (C) TN005, and (D) TN006 at pH 7.4 and pH 5.0 (20 °C).

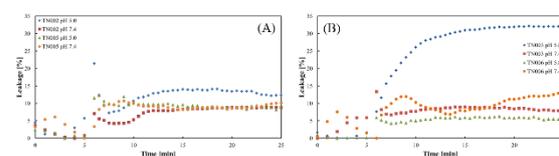


Fig. 3 Percentage of calcein leakage from liposome by addition of (A) TN002 and TN005, and (B) TN003 and TN006 at pH 7.4 and pH 5.0 (30 °C).

## 4 まとめ

本研究で合成したペプチド TN002 および TN003 のみ酸性条件で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、ヘリックス性およびカルセイン漏出挙動が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制御することで、リポソームに内封された薬物の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。加えて、グルタミン酸と同様の親水性を示すグルタミンを用いた TN005 および TN006 と TN002 および TN003 の膜透過活性の比較から、疎水性の高さが膜透過活性に必ずしも重要ではないことが明らかとなった。

### [参考文献]

- 1) Subbarao N. R., Parente R. A., Szoka F. C., Nadasdi L., Pongracz K. *Biochemistry*, **1987**, *26*, 2964-2972.