

## グルタチオン応答性膜透過ペプチドの設計および特性評価

日大生産工(院) ○深谷 亮介 日大生産工 柏田 歩

## 1 緒言

近年, 目的の細胞や組織に対し, 選択的に薬物を送達し, 薬効を発揮させることで薬物の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, がん治療などへと応用されている。DDSの達成には, リポソームに代表される薬物を封入させるための担体が必要となる。

リポソームはリン脂質由来の脂質二重膜による閉鎖小胞構造からなり, 内水相に水溶性薬物を安定に担持できる。しかし, リポソーム自体には薬物放出能がないことから, 効果的なDDS構築を目的として, 外部刺激に応答してリポソームからの薬物放出が可能となる系の構築に関して様々な研究が行われている。そこで, われわれはリポソーム内封薬物の放出手段として膜透過ペプチドの利用を考えた。

代表的な膜透過ペプチドとして, HIV-1のTatタンパク質由来の塩基性ペプチド(TAT : GRKKRRQRRRPPQ)やオクタアルギニン(R8 : RRRRRRRR)などのオリゴアルギニンがあげられる。これらのオリゴアルギニンにおいて, アルギニン残基中のグアニジノ基が膜透過の本質を担っていることが知られている<sup>1)</sup>。

アルギニンに富む膜透過ペプチドは, タンパク質をはじめとする種々の細胞膜不透過性の生理活性分子と架橋体あるいは複合体形成することにより, 細胞内に送達できることが知られている。このような知見から, タンパク質, ペプチド, リポソーム, ナノ粒子などさまざまな薬物や物質が細胞内に導入され, 細胞内で所望の活性を発揮したことが報告されている。しかし, 全身投与における膜透過ペプチド修飾薬物担体の利用は, その非選択性のため, 非標的組織への副作用などが懸念される。そのため, 標的組織でのみ選択的に作用する系の構築が

求められている。そこで, われわれは腫瘍細胞内に比較的高濃度(1-10 mM)で存在するグルタチオンによって切断されるジスルフィド結合の利用を考えた。

本研究ではグルタチオンに応答して膜透過活性を示す系の構築を目的とする。そこで初段階として基本材料であるR8の合成を行った。さらにリポソーム膜に対して, 合成したR8の膜透過活性を評価した。さらに, 構造中にジスルフィド結合を有するアルギニンペプチドの合成を行った。

## 2 実験操作

## 2-1 ペプチドの合成

R8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。構造中にジスルフィド結合を持つアルギニンペプチドはBoc-Gly-PAM Resinを使用したBoc固相合成法でBoc-Cystamine-Suc-OHを導入した後, Fmoc固相合成法により合成した。

## 2-2 NBD標識リポソームの調製

L- $\alpha$ -phosphatidylcholine(Egg, Chicken)(EggPC)とEggPCに対して1 mol%に相当する1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)(NBD)を混合した薄膜を0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH 7.0)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単層リポソームを調製した。さらにエクストルージョン法よりサイズを100 nmに均一化した。

## 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

合成したペプチドの膜透過活性を評価するためにリポソーム膜内外におけるNBDの還元剤による消光挙動を蛍光測定により観察した。

## Design and Characterization of Glutathione-Responsive Cell-Penetrating Peptides

Ryosuke FUKAYA and Ayumi KASHIWADA

リポソーム溶液に対して還元剤である亜ジチオン酸ナトリウムを加えることで外層に存在するNBDを消光させた後、ペプチド溶液を適量添加した際のNBD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。NBDの消光率はTriton X-100を添加した際の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。

## 2-4 動的光散乱(DLS)によるリポソーム粒径変化測定

ペプチドによる膜透過が起こった際にリポソーム膜が崩壊していないことを確認するためにDLSによるリポソーム粒径変化測定を行った。

## 3 結果および考察

NBD標識EggPCリポソームに対して亜ジチオン酸ナトリウム添加後に、さらにR8を添加した際のNBDの蛍光測定を行った結果をFig. 1に示す。

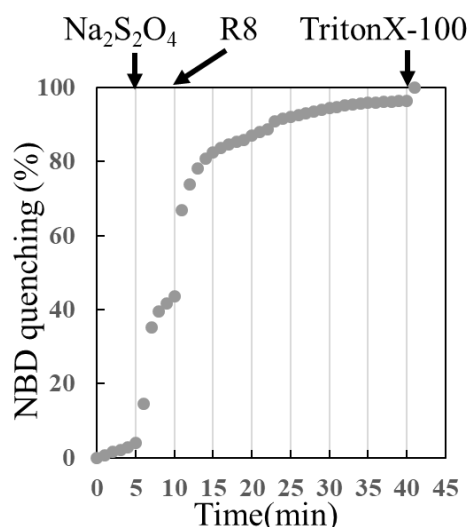


Fig. 1 Quenching behavior of NBD labeled EggPC liposomes after addition of 20  $\mu$ M of R8 (R8:lipid = 1:100).

Fig. 1に示した通り、リポソーム溶液に亜ジチオン酸ナトリウムを加えたところ、NBD由来の蛍光が大きく消光した。これはリポソーム脂質二重層の外層に存在しているNBDが亜ジチオン酸ナトリウムによって還元されたためである。その後、R8を添加したところ、NBD由来の蛍光がさらに消光した。これはR8がリポソーム膜と相互作用することにより脂質二重

層が揺らぎ、外水相に存在している亜ジチオン酸ナトリウムがリポソームの内水相へと侵入し、リポソーム脂質二重層の内側に存在しているNBDも還元されたためであると考えられる。

次にR8を添加し、リポソーム膜内外における物質透過が起こっている際にリポソームが崩壊していないことを確認するためにDLSによるリポソーム粒径変化測定を行った。その測定結果をFig. 2に示す。

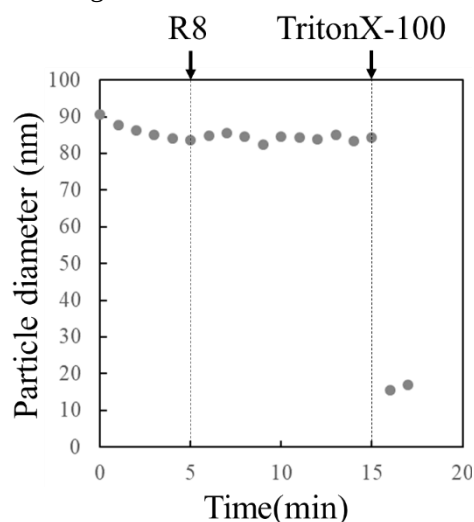


Fig. 2 Change in particle size of EggPC liposome after addition of 20  $\mu$ M of R8 (R8:lipid = 1:100).

Fig. 2の結果から、R8添加後にリポソームの粒径のばらつきが一時的に認められた。これは、R8がリポソームと相互作用した際に、脂質の揺らぎが起きたためであると考えられる。また、R8添加後15分間の測定においてリポソームの崩壊は認められなかった。

## 4 まとめ

本研究では、人工的に合成した膜透過ペプチドR8のリポソーム膜透過活性を確認することができた。また、R8の膜透過の際にリポソームの崩壊が起きていないことも確認できた。

今後、構造中にジスルフィド結合を持つアルギニンペプチドを用いてグルタチオン存在下および不在化の条件で同様の測定をすることでグルタチオン応答性を検討する。

## 5 参考文献

- 1) E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas, P. A. Wender, *Acc. Chem. Res.* **2013**, 46, 2944-2954.