

弱酸性 pH に応答するカチオン性膜透過ペプチドの設計および活性評価

日大生産工 (院) ○中山 柊人 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

がんなどの疾病の治療において、薬物療法が広く用いられている。しかし、従来の薬物療法は薬効を示すまでの投与回数や使用量、患部以外への薬物の作用による副作用など、患者への身体的、経済的および精神的負担が懸念される。そこで、患部に対する、薬物による選択的かつ効果的な治療を目的とした、薬物送達系 (DDS: Drug Delivery System) が注目されている。

DDS に利用される薬物担体 (キャリア) として、リポソームが知られている。リポソームはリン脂質二重層で覆われた小胞であり、その内水相に薬物を封入することが可能である。また、刺激応答性を付与することにより、特定の細胞や組織へ到達した後、内封薬物を放出させることが可能となる。そこで、脂質二重層との親和性が高い、膜透過ペプチドをリポソーム内封薬物の放出に用いることを考えた。さらに、血中における pH 条件とエンドソーム内における弱酸性の pH 条件との違いを利用し、エンドソーム環境において機能するリポソーム内封薬物放出系の構築を目的とした。そこで、エンドソーム環境において膜透過能を発揮するための人工膜透過ペプチドとして、ミツバチ毒の主成分であるメリチンをモデルとしたペプチドを設計した。メリチンは、C 末端側の塩基性アミノ酸側鎖が静電的相互作用により細胞膜に接近し、N 末端側の疎水性領域が α -ヘリックス構造を形成して細胞膜へ侵入する。その結果、膜に細孔が形成され、物質透過が引き起こされる¹⁾。

2 実験操作

2-1 ペプチドの合成

本研究で使用したすべてのペプチドは、Fmoc-NH-SAL-MBHA Resin を用いた Fmoc 固相合成法で合成した。

2-2 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定

0.1 M CH₃COOH / CH₃COONa 緩衝液 (pH 5.0) または 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用いて 100 nm に均一化したリポソームを調製し、リポソーム存在下におけるペプチドの二次構造を CD スペクトル測定によって評価した。

2-3 カルセイン封入リポソームの調整

ホスファチジルコリン (EggPC) により形成した薄膜を 25 mM カルセイン溶液 (pH 5.0 および 7.4) 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によってリポソームの粒径を 100 nm に均一化した。

2-4 蛍光強度変化によるリポソーム内封物漏出挙動測定

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評価した。リポソームからカルセインが自発的に漏出していないことを確認し、所定濃度のペプチド溶液を添加後、カルセインの蛍光強度を経時的に測定した。最後に Triton X-100 を添加してリポソームを破壊した。カルセインの漏出率は Triton X-100 を添加した際の蛍光強度を最大値とし、最大値に対する各時間の蛍光強度を百分率で算出した。

Design and Characterization of Cationic Membrane-Lytic Peptides Responsive to Weakly Acidic pH

Shuto NAKAYAMA and Ayumi KASHIWADA

3 結果および考察

本研究において設計および合成された膜透過ペプチドのうち、基本となる LP は、メリチンの疎水性領域を Leu-Ala (L-A) の繰返し配列によって単純化したものである (Fig. 1)。この設計は疎水性ヘリックス形成能に重点を置いたもので、LP はメリチンと同様の機構で膜透過活性を示すことが示唆された²⁾。

LPE3-1 は、LP の疎水性領域に含まれる Leu (L) のうち 3 残基分を Glu (E) に置換したものである (Fig. 1)。に置換したものである。Glu 側鎖のカルボキシ基は pK_a が 4.3 付近であることから、酸性条件下では解離せず、疎水性 α -ヘリックス構造形成能を維持させると考えられた。一方、LPH4 は、LP のカチオン性領域に存在する Lys (K) および Arg (R) をすべて His (H) に置換したものである (Fig. 1)。その結果、His 側鎖がもつイミダゾール基の pK_a が 6.0 付近であるため、酸性条件下で選択的に正電荷を有することが予想され、ペプチドの pH 選択的な細胞膜への接近が期待された。LPE3-1 および LPH4 は弱酸性条件下でリポソーム膜に対する透過性を上昇させることが報告されており²⁾、LPE3-1 が LPH4 よりも高い膜透過活性を示した。

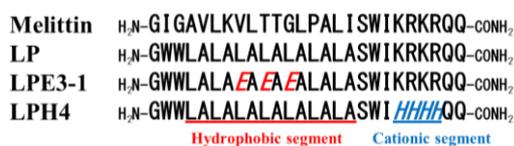


Fig. 1 Amino acid sequences of membrane-lytic peptides in this study.

さらに、我々はペプチドとリポソームとの相互作用に寄与するカチオン性領域に重点を置いてペプチドを設計した。His-Arg (H-R) 配列がリポソームの平坦な表面と相互作用する傾向が強いと示唆されている³⁾ ことから、LP とリポソームとの静電的相互作用を強め、膜透過活性を向上させることを目標とした (Fig. 2)。



Fig. 2 Amino acid sequences of C-terminal cationic segment modified membrane-lytic peptides in this study.

ペプチド (iii) に関して、合成が完了し、リポソーム非存在下における円偏光二色性 (CD) スペクトルの評価を行った (Fig. 3)。その結果、脂質膜との相互作用により顕著に観測されると推測される、 α -ヘリックス由来のシグナルは認められなかった。

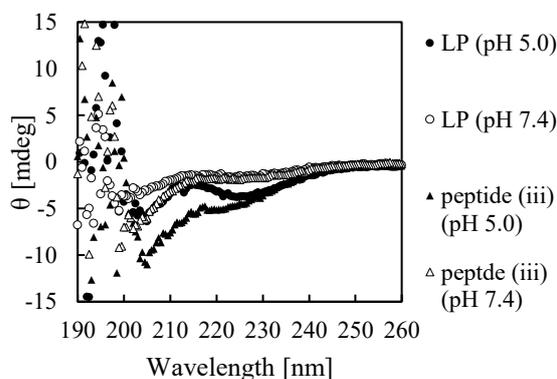


Fig. 3 Circular dichroism spectra of LP and peptide (iii) in the absence of EggPC liposomes.

今後、リポソーム存在下における測定結果と比較し、膜透過に必要な構造形成の程度を確認する。

その他の活性評価およびペプチド (i)、(ii) の合成は逐次進めていく予定である。

4 参考文献

- 1) D. Sengupta, H. Leontiadou, A. E. Mark, S. J. Marrink, *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, 1778, 2308-2317.
- 2) A. Kashiwada, M. Mizuno, J. Hashimoto, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, 14, 6281-6288.
- 3) M. H. Khatami, M. Bromberek, I. Saika-Voivod, V. Booth, *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, 1838, 2778-2787.