

アミノ酸改変による膜透過性アルギニンペプチドへの pH 応答性の付与

日大生産工(院) ○新倉 瑞樹 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

必要な薬物を目的の細胞や組織に対して選択的に送達し、副作用の軽減を目指すための方法論として薬物送達系 (Drug Delivery System : DDS) が注目されている。DDSにおける代表的な担体であるリポソームは、内水相に担持した薬物を放出する能力を有さない。そこで、外部刺激に応答して薬物放出が可能となる系の構築が期待される。本研究で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: GRKKRRQRRRPQ)やオクタアルギニン(R8: RRRRRRRR)などのアルギニンに富むペプチドが知られている。そして、これらの膜透過ペプチド中のアルギニン残基に含まれるグアニジノ基が膜透過において重要な役割を担っている。

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への導入を可能とし、細胞内で所望の活性を発揮できる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、選択性の低さのため、非標的組織への副作用などが懸念される。そこで、標的組織において選択的に作用する系の構築が求められている。標的として注目される腫瘍細胞は正常細胞に比べ酸性化していることが知られている。そのためアルギニンペプチドのアミノ酸改変を行うことで、腫瘍細胞に匹敵する弱酸性条件選択的な膜透過が実現できると考えた。本研究ではアルギニンペプチドに弱酸性pH応答性を付与するために初段階としてオクタアルギニン(R8)を合成した。そしてリポソーム膜に対して、R8の膜透過活性を評価した。さらに酸性条件においてプ

ロトン化する弱塩基アミノ酸であるヒスチジン(H)を導入したpH応答性膜透過ペプチドを設計した。

2 実験操作

2-1 ペプチドの合成

本研究で用いた全てのペプチドは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 カルセイン内封リポソームの調製

L- α -phosphatidylcholine(EggPC)の薄膜を蛍光消光濃度以上のカルセイン水溶液(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水溶液を内封した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カルセインの漏出挙動測定

リポソーム内封カルセインの漏出挙動を蛍光強度の変化により評価した。すなわち、リポソーム溶液に所定濃度のペプチド溶液を添加した際のカルセイン蛍光強度変化を測定し、一定時間経過後、Triton X-100を加えリポソームを破壊した。カルセインの蛍光強度率は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を百分率で算出した。

3 結果および考察

3-1 アルギニンペプチドR8の膜透過活性

生理条件であるpH 7.4と腫瘍細胞環境を想定したpH 5.0において、カルセイン内封リポソームに対してR8を添加した際のカルセインの漏出挙動をFig. 1に示す。

Addition of pH-responsiveness to arginine-rich membrane-permeable peptides
by amino acid mutation

Mizuki NIKURA and Ayumi KASHIWADA

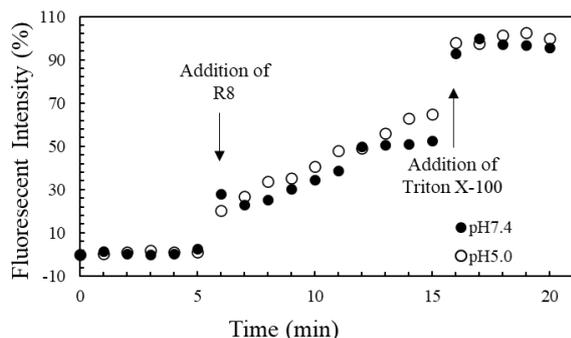


Fig. 1 Calcein leakage from 2 mM EggPC liposomes after addition of 20 μ M of R8 (peptides : lipid = 1 : 100 (mole ratio)) at pH 7.4 and pH 5.0 (25°C).

いずれのpHにおいてもR8添加によるカルセイン由来の経時的な蛍光強度の増大が認められた。この結果はR8がリポソーム膜と相互作用し、そして膜内へ侵入することにより脂質二重層が揺らぎ、内水相に封入されたカルセインが外水相へと漏出したことを示している。

3-2 R8を基本としたpH応答性膜透過ペプチドの設計

R8を基本として、N末端側の2残基のアルギニン(R)をヒスチジン(H)に置換し、さらにN末端に2残基のヒスチジン(H)を導入したペプチド(H4R6:HHHRRRRRR)がpH選択的な細胞膜透過能を有することが報告されている²⁾。そこで、H4R6ペプチドを参考にアルギニン(R)、ヒスチジン(H)および蛍光プローブとしてトリプトファン(W)から構成されるペプチド(H2R6H2W:HHRRRRRRHHW)を新規に設計した。

H2R6H2Wは、H4R6ペプチドに基づきN末端側の2残基のヒスチジンをC末端側に配置した配列を有している。アルギニンペプチドは6残基以上で効果的な膜透過能を発揮し、侵入の方向に関わらず膜透過能を有する^{1, 3)}。そのためアルギニンを6残基含み、ヒスチジンを両端に配置することで、中性条件下ではアルギニンペプチドの膜透過能を抑制し、酸性条件下では膜接近能の向上および膜透過能を発揮することを期待した。

3-3 pH応答性膜透過活性評価

pH 7.4 およびpH 5.0におけるカルセイン内封リポソームに対して、H2R6H2Wを添加した際のカルセインの漏出挙動をFig. 2に示す。ま

た、比較のためH4R6ペプチドにトリプトファンを結合させたH4R6Wについても同様の評価を行った。

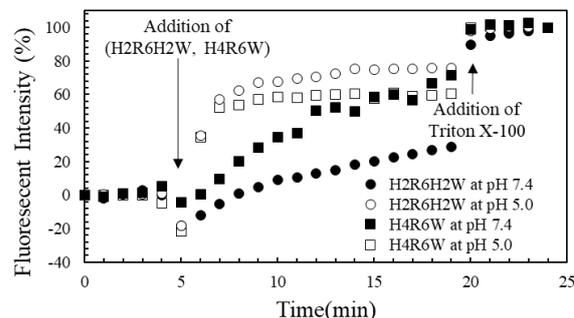


Fig. 2 Calcein leakage from 2 mM EggPC liposomes after addition of 20 μ M peptides (peptide : Lipid = 1:100 (mole ratio)) at pH 7.4 and pH 5.0 (25°C).

カルセイン内封リポソーム溶液にH2R6H2Wを添加したところ、pH条件に関わらず、カルセインの漏出が確認された。本結果は予想したpH応答性を示しておらず、ヒスチジン残基の導入および配列変更したペプチドの設計では、アルギニンペプチドの膜透過能を制御することができなかったと考えられる。

4 まとめ

本研究では、膜透過性アルギニンペプチドに弱酸性pH応答性の付与することを目的としていたが、設計したどちらのペプチドにおいてもpH変化における膜透過活性の制御を確認することができなかった。そのため今後は、アルギニン残基の電荷および細胞膜透過機構の観点からアミノ酸改変を行い、pH応答性膜透過アルギニンペプチドの設計を目指す。

参考文献

- 1) Stanzl, E. G.; Trantow, B. M.; Vargas, J. R.; Wender, P. A., *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2944-2954.
- 2) Jiang, T.; Zhang, Z.; Zhang, Y.; Lv, H.; Zhou, J.; Li, C.; Hou, L.; Zhang, Q. *Biomaterials* **2012**, *33*, 9246-9258.
- 3) Futaki, S.; Nakase, I. *Biophysics* **2010**, *50*, 137-140.