

ペプチド担持リポソーム表面における錯形成を駆動力とした膜融合系の設計

日大生産工(院) ○石塚 美宇 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

薬物を目的の細胞や組織に対し、選択的に送達するためのDrug Delivery System (DDS) に用いられる担体として、リポソームが知られている。リポソームは生体膜と同様のリン脂質により構成される脂質二重膜に覆われた小胞である(Fig. 1)。そのため、小胞内部に水溶性薬物の封入が可能であり、脂質の組成や脂質二重膜への機能性分子の導入により様々な特性を付与することができるため、細胞のモデルや生体親和性の高い分子キャリアとして用いられている。

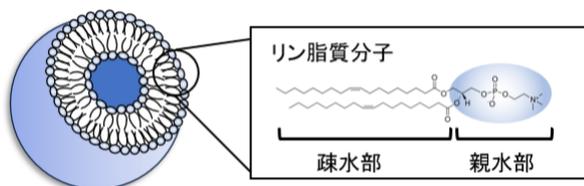


Fig. 1 Structural diagram of phospholipid and liposome.

例えば、リポソーム表面の荷電状態、粒子径、流動性の制御やリポソーム表面に抗原、抗体、糖などの特異的リガンドを導入することで特定の細胞や組織に対する選択的な薬物送達可以实现できる。その結果、局所的な治療を行うことができ、副作用を最小限に抑え薬物の効果を最大限に高めることが期待される。また、リポソームは表面を細胞膜との親和性が高まるように適切に修飾することにより、細胞膜との間で膜融合を引き起こすことが可能となる。このような膜融合の利用は、標的となる細胞への直接的な物質の送達や情報の伝達、交換などへの応用が期待できる。

抗がん剤などの薬物の中には、金属イオンとの親和性の高い多座配位子構造を有するものが多数あり、金属イオンとの錯形成に伴う薬物の吸収挙動や薬効の変化が知られている¹⁾。そこで、金属イオンと錯形成可能な特定のアミノ酸配列を有するペプチドを合成し、リポソーム表面に担持させることによって、金属認識能を有するリポソームの調製

が可能であると考えた。なかでも銅錯体は様々な酸化活性種を生成し、DNA切断や高い細胞毒性を発現することが見出されてきた²⁾。しかし、がん細胞に対し選択的に細胞毒性を示す銅錯体の報告例は少なく、現在でも多くの研究がなされている。がん細胞は正常細胞よりも銅イオン濃度が高く、健康な細胞よりも多くの銅イオンを必要としていることから、がん細胞への選択的な薬物送達を考慮し、銅イオンに親和性を有するペプチドをリポソーム表面に担持させ、リポソーム表面での錯形成を駆動力として膜融合を促進させる方法を検討した。

リポソーム表面に担持させるペプチドのアミノ酸配列は、プリオンタンパク質のN末端側領域を模倣した。このN末端領域には、グリシンに富む8アミノ酸の繰り返し配列(Pro-His-Gly-Gly-Gly-Trp-Gly-Gln)が存在し、ヒスチジン残基を中心に銅イオンと錯体を形成する³⁾。本研究では、ペプチド担持リポソームを標的と見立てた膜融合系の構築を目的とした。そして、*in vitro*系における錯形成を駆動力とした膜融合挙動の検討を行った。

2. 実験および測定方法

2-1. ペプチドの合成

本研究で用いたペプチドは、Fmoc-NH-SAL-MBHA Resinを用いたFmoc固相合成法によって合成した。

2-2. リポソームの調製

本研究で用いたリポソームは、DOPC(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine)を基本脂質とした。リポソーム調製のための緩衝液は、PBS緩衝溶液(pH 7.4)またはフタル酸水素カリウム緩衝溶液(pH 5.0)を用いた。混合脂質はそれぞれの緩衝液で水和させ、多重層リポソームを形成させた。その後、凍結融解により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り粒径100 nmの

サイズに調整した。一方のリポソームには膜融合の評価のために、0.25mol%相当の 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine *N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl(ammonium salt)) (以下NBD)と、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanol-amine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl (ammonium salt)) (以下Rh)で標識した。

2-3. リポソーム膜融合挙動の評価方法

FRETは2種の蛍光色素の距離が近接した際に起こるエネルギー移動現象であり、リポソーム中に導入した2種の蛍光色素の距離が離れるとエネルギー移動効率が変化することから、膜融合の評価に用いられる(Fig. 2)。

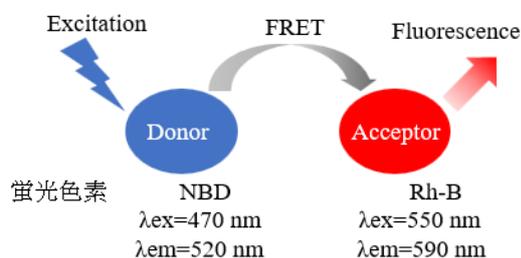


Fig. 2 Diagram of fluorescence resonance energy transfer (FRET) between donor and accepter fluorochromes.

本研究で調製したペプチド担持リポソームの膜融合挙動は、2種類の蛍光色素NBDとRh間の蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用したリポソーム間の脂質混合実験によって評価した。蛍光強度変化を測定し、一定時間経過後に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融合率を算出した。

また、リポソーム膜が崩壊せずに融合していることを確認するため、動的光散乱(DLS)測定を用いたリポソーム粒径の変化に基づき評価した。

3. 結果

リポソームの脂質間の融合挙動を評価するにあたり、pH 7.4においてFRETを利用した脂質混合実験の結果をFig. 3に示す。なお、Fig. 3は標的リポソーム側に導入した蛍光色素であるNBDの励起波長475 nmで励起時の蛍光スペクトルを示している。

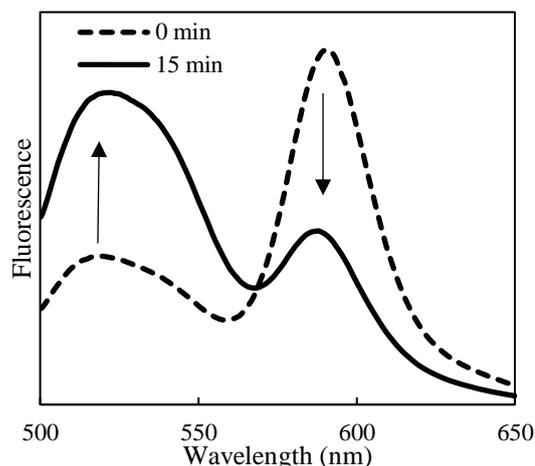


Fig. 3 Fluorescence spectra of an equal population mixture of anionic and cationic liposomes.

結果として、FRETの解消による520 nm付近のNBD蛍光強度の増大と590 nm付近でのRh蛍光強度の低下が見られた。これは、標的リポソーム表面でNBDからRhへのFRETが生じていることを示している。

今後、外膜や内膜を区別した膜融合挙動の段階的評価を行い、さらに銅イオン添加後にリポソームが融合していると仮定して系中の銅イオンを除去することで銅錯体形成に必要な構造を確認する。その他の活性評価やペプチド合成は逐次進めていく予定である。

参考文献

- 1) Maeda, M.; Uchida, A. N.; Sasaki, T. "Liposoluble platinum(II) complexes with antitumor activity" *Jpn. J. Cancer. Res.* (1986) 77, 6, pp.523-525.
- 2) Tabassum, S.; Zaki, M.; Afzal, M.; Arjmand, F. "Synthesis and characterization of Cu(II)based anticancer chemotherapeutic agent targeting topoisomerase Iα: *In vitro* DNA binding, pBR322 cleavage, molecular docking studies and cytotoxicity against human cancer cell lines" *Eur. J. Med. Chem.* (2014) 74, pp.509-523."
- 3) Millhauser, L. G. "Copper Binding in the Prion Protein" *Acc. Chem. Res.* (2004) 37, 2, pp.79-85.