

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 分子構造化学研究室

職・氏名 講師・加藤 巧馬

研究テーマ：

両親媒性ヘリカルペプチドの脂質二重膜への作用にジ置換アミノ酸の導入が与える影響の評価

研究期間：

2024 年 4 月 1 日 ～ 2026 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 加藤 巧馬 (大阪医科薬科大学・薬学部・講師)

<共同研究機関>

研究代表者 大庭 誠 (京都府立医科大学・医学部・教授)

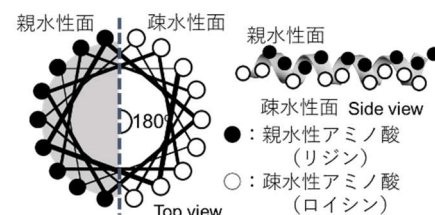
研究目的：

本研究では「両親媒性ヘリカルペプチド」を作成し、ジ置換アミノ酸のペプチド配列への導入によるペプチド二次構造への影響について明らかにすること、並びに、その二次構造が脂質二重膜との相互作用に与える影響について解明することを目的とする。この目的を達成するために、二次構造制御ならびに両親媒性のコントロールに優れたジ置換アミノ酸を用いて研究を行う。

「ヘリカルペプチド」をターゲットとしたのは、ヘリックス構造はタンパク質などの相互作用の基礎となる部分であり、ヘリカルペプチドの中でも「両親媒性」のものは、抗菌ペプチドや細胞膜透過性ペプチドなど、細胞膜と相互作用する働きがあることが知られているためである。「ジ置換アミノ酸」には含有ペプチドのヘリックス構造を安定化させる働きがあるほか、 α 位水素がアルキル化され疎水性が向上していることから、高い効率で細胞膜との相互作用を見込めるなど、ペプチド創薬の問題点の一つである膜透過性の改善も見込めるのではないかと考えた。

研究内容および研究成果：

本研究では、両親媒性ペプチドのモデルペプチドとして、ロイシン(Leu)とリジン(Lys)の 2 種類のみのアミノ酸からなる 18 残基のモデルペプチド(K9L9)を用いた。理想的なヘリックス構造を取った場合には親水性残基である Lys と疎水性残基である Leu の側鎖が、それぞれ一方に偏った配置となる設計であり、この配列中にジ置換アミノ酸を導入することでより機能的に優れたペプチドの開発を目指した。



モデルペプチド K9L9

Ac-¹LLK¹⁰KLK¹⁸KLK¹⁸KLK¹⁸KLK¹⁸-NH₂；18残基 $\theta = 180^\circ$

図1. モデルとなる両親媒性ペプチド Peptide 1 の設計

1. ジ置換アミノ酸の導入位置の検討 <学会発表 1, 2, 4>

疎水性のジ置換アミノ酸である α -アミノイソブタン酸(Aib)を、**K9L9** ペプチド配列中の様々な位置に導入したペプチドを計 7 種合成した (図 1)。

Peptide 1 (H-K9L9-NH ₂)	H-LLK KL KKLLK KL LLK KL LLK KL -NH ₂
Peptide 2 (H-K9L5U4-NH ₂)	H-L LU KK LU KK LU KK LU KK LU -NH ₂
Peptide 3 (H-K9L7U2-NH ₂)	H-LLK KL KK UL KK LU KK LU KK-NH ₂
Peptide 4 (H-K9L7U2-NH ₂)	H-L LU KK LU KK LU KK LU KK-NH ₂
Peptide 5 (H-K9L7U2-NH ₂)	H-LLK KL KK LU KK LU KK LU KK-NH ₂
Peptide 6 (H-K9L7U2-NH ₂)	H-LLK KL KK LU KK LU KK LU KK-NH ₂
Peptide 7 (H-K9L7U2-NH ₂)	H-LLK KL KK LU KK LU KK LU KK-NH ₂

図 1. K9L9 ペプチド配列に Aib (U)を導入したペプチドのデザイン

合成したペプチドの二次構造を評価したところ、ジ置換アミノ酸を導入したペプチドについては、水溶液中でも安定したヘリカル二次構造を示したが、ジ置換アミノ酸を含まない **K9L9** においては β -シート様の構造を取っていた (図 2)。また、ジ置換アミノ酸の含有数によって、脂質二重膜であるリポソームを崩壊させる能力が向上しているペプチドも存在した (図 3)。これは、ヘリックス構造の安定化が膜との相互作用を促進する一方、構造柔軟性の著しい低下は膜との相互作用を低下させる可能性を示唆している。

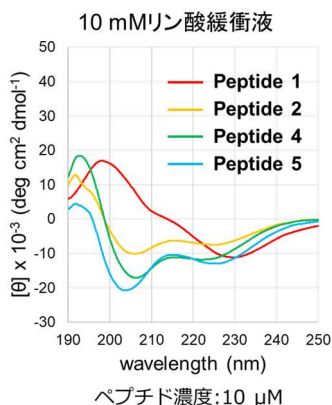


図 2. ペプチド二次構造評価

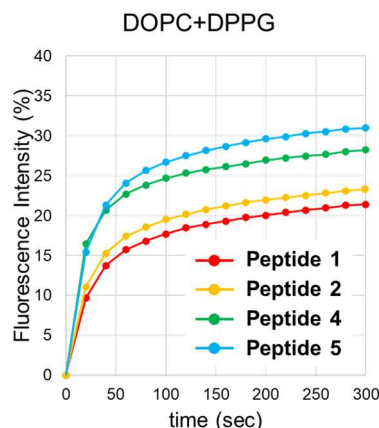


図 3. リポソーム崩壊能評価

ペプチドを用いた細胞内への物質輸送能を評価したところ、親水性化合物である FITC 標識したデキストラン(FITC-dextran, 分子量約 70,000)と 60 分程度混合した後に細胞に接触させることで、FITC-dextran を単体で細胞と接触させたときに比べて最大で 10 倍以上もの量を細胞内へ輸送することができることが明らかになった (図 4)。短時間の接触では天然のアミノ酸のみからなる K9L9 が高い輸送能を示したが、凝集などを生じる可能性もあり、二次構造を安定化させるジ置換アミノ酸の導入により、継続的に細胞内輸送が可能である可能性が示唆された。

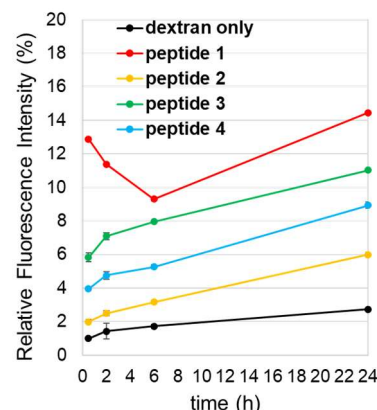


図 4. 細胞内への物質輸送能評価

また、Aib の他にも 1-アミノシクロプロパン 1-カルボン酸(Ac5c)や、 α -メチルリジン(α MeLys)といったジ置換アミノ酸を用いることで、上記の他にさらに 8 種類のペプチドを作成している。より高い物質輸送能を示すペプチドも得られていることから、今後は物理学的性質などに基づいたペプチドデザインの指標を提供できるよう、引き続き研究を進める。

2. ペプチド鎖長と疎水性面の角度の検討 <学会発表 3, 5>

モデルペプチド **K9L9** は、親水性アミノ酸：疎水性アミノ酸が 1:1 の割合となるようにデザインしたペプチドであり、その疎水性面の角度は 180° である。この角度の変化が膜透過性に与える影響について評価するため、疎水性面の角度を変更したペプチドを計 5 種類作成した。この際、ペプチドが有する電荷を等しくするために Lys の数は 9 残基で統一した。

また、Lys 残基の数を統一して疎水性面の角度を変更するためにはどうしてもペプチドの鎖長が異なってしまう。ペプチド鎖長の長さによる種々の影響を評価するために、疎水性面の角度を 180° に固定したうえで鎖長が異なるペプチドを計 7 種類合成した。

これらのペプチドの二次構造を評価したところ、ペプチドの鎖長が長く、疎水性面の角度が大きいほど安定したヘリックス構造を取りやすく、リボソームを破壊する能力が高いことが明らかになった。また、ペプチド鎖長が 22 残基の K9L13 や 25 残基の K9L16 を用いた際に細胞内へ高い物質輸送能を示すことが明らかになった (図 5)。

Peptide 21 (H-K9L4-NH ₂)	: H-LKKKLLKKLLKKLK-NH ₂ (13残基)
Peptide 22 (H-K9L7-NH ₂)	: H-LLKLLKLLKLLKLLKLLK-NH ₂ (16残基)
Peptide 23 (H-K9L9-NH ₂)	: H-LLKLLKLLKLLKLLKLLK-NH ₂ (18残基)
Peptide 24 (H-K9L13-NH ₂)	: H-LLKLLKLLKLLKLLKLLK-NH ₂ (22残基)
Peptide 25 (H-K9L16-NH ₂)	: H-LLKLLKLLKLLKLLKLLK-NH ₂ (25残基)

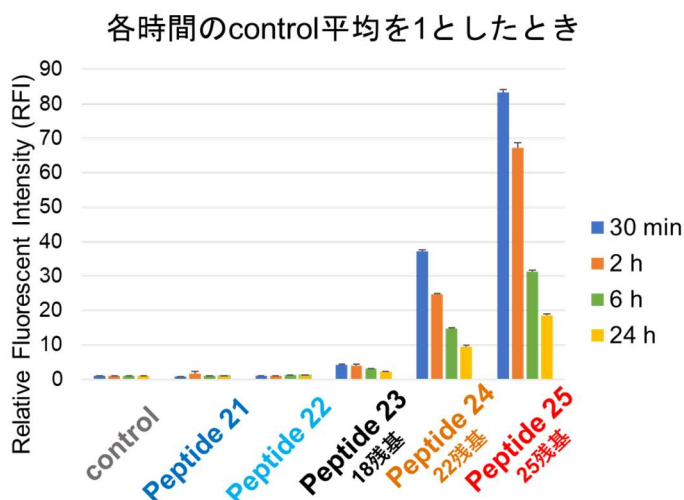


図 5. E ペプチド鎖長と疎水性面の角度を変更したペプチドの物質輸送能評価

今後は、これまで得られている結果の中でより良い条件を掛け合わせることで、現在のペプチド医薬の問題点を克服できるような医療材料としてのペプチドの開発も目指していきたい。

成果発表：

<学会発表>

1. 両親媒性ペプチドの親水性部位へのジ置換アミノ酸導入による細胞膜透過性への影響評価、井本 桜子、加藤 巧馬、浅野 晶子、土井 光暢、日本薬学会第 145 年会 (福岡)、2025 年 3 月
2. ジ置換アミノ酸を導入した両親媒性ヘリカルペプチド **K9L9** の脂質膜との相互作用評価、田中 千裕、加藤 巧馬、土井 光暢、浅野 晶子、第 75 回 日本薬学会関西支部総会・大会 (京都)、2025 年 10 月

3. 両親媒性ヘリカルペプチド K9L9 の鎖長を変更した場合の物質輸送能の評価、福井 智恵、加藤 巧馬、土井 光暢、浅野 晶子、第 75 回 日本薬学会関西支部総会・大会 (京都)、2025 年 10 月
4. Evaluation of the effect of the introduction position of disubstituted amino acids on the lipid membrane into amphipathic helical peptides, Takuma Kato, Hiina Danno, Mitsunobu Doi, Akiko Asano, 第 62 回ペプチド討論会 (福岡)、2025 年 10 月
5. 両親媒性ヘリカルペプチドの疎水性面の角度変化による脂質膜に与える影響の評価、植木 麻依、加藤 巧馬、土井 光暢、浅野 晶子、日本薬学会第 146 年会 (大阪)、2026 年 3 月