

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 助教・加藤 巧馬

研究テーマ：

ジ置換アミノ酸を利用した両親媒性ヘリックスペプチドの脂質二重膜への影響の解明

研究期間：

2021 年 4 月 1 日 ～ 2023 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・助教)

研究分担者 土井 光暢 (大阪医科薬科大学・薬学部・教授)

<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：

両親媒性ヘリックスは、抗菌ペプチドや膜貫通タンパク質などの研究に欠かせないキーワードとして広く用いられており、作用機序の解析から臨床応用まで多くの研究が行われている。両親媒性ヘリカル構造を膜透過性ペプチドに利用しようとする研究は、これまでも国内外で数多く行われているが、天然の L-アミノ酸を利用した研究が大半であり、非天然型アミノ酸を利用した例は少ない。本研究では、ペプチド二次構造を安定化させる働きを有するジ置換アミノ酸(dAA)を用いて、比較的短い残基数の両親媒性ヘリカルペプチドを種々作成し、脂質二重膜に対する影響をリポソームなどのモデル膜を利用して体系的に明らかにすることを目的として研究を行った。また、細胞膜への影響をコントロールすることで細胞膜透過性ペプチドとして応用するなどして、ジ置換アミノ酸の創薬における有用性についても検討した。

研究内容および研究成果：

① 両親媒性ペプチド pep-1 の配列中にジ置換アミノ酸を含有することによる影響評価 (Figure 1)

両親媒性の膜透過性ペプチド pep-1 は 2001 年に M. C. Morris によって初めて報告された第一世代の両親媒性ペプチドである。このペプチドは親水性ドメインと疎水性ドメインが連結した両親媒性ペプチドに分類されるが、疎水性ドメインは親水性 7 残基と疎水性 5 残基で構成されており、このドメインがらせん構造を形成していれば両親媒性ヘリックスペプチドであるともいえる。

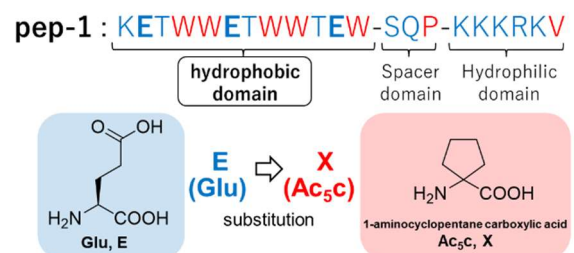


Figure 1. pep-1 配列中へジ置換アミノ酸を導入した研究の概要

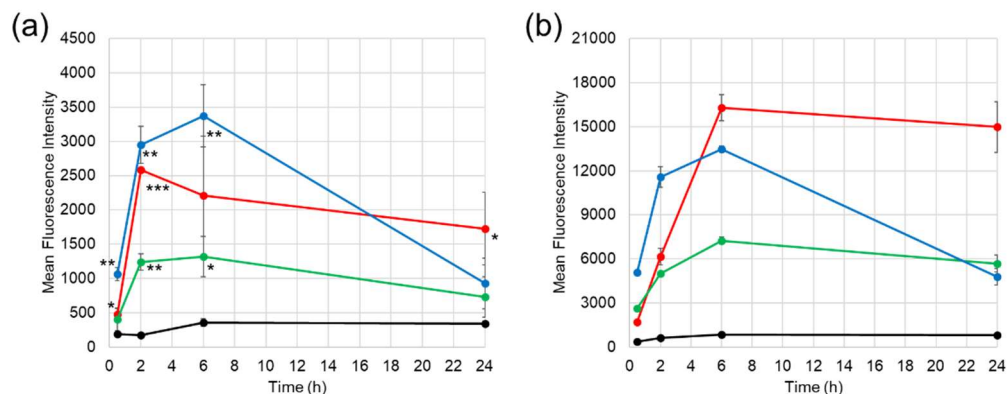
本研究では、このドメイン中の親水性アミノ酸であるグルタミン酸(Glu, E)を dAA (1-アミノシクロペンタンカルボン酸(Ac₅C, X)、2-アミノイソ酪酸(Aib, U))に置き換えた場合の細胞膜透過性への影響をより詳細に検討するため、4種類のペプチド類似体を合成・評価した(Table 1)。

Peptide	Sequence ^a	Retention Time ^b
1	5(6)-CF-GK <u>E</u> TWW <u>E</u> TWW <u>E</u> TWSQP <u>K</u> KKR <u>K</u> V-NH ₂	16.0 min
2	5(6)-CF-GK <u>X</u> TWW <u>X</u> TWW <u>X</u> WSQP <u>K</u> KKR <u>K</u> X-NH ₂	17.2 min
3	5(6)-CF-GK <u>U</u> TWW <u>U</u> TWW <u>U</u> WSQP <u>K</u> KKR <u>K</u> V-NH ₂	16.7 min
4	5(6)-CF-GK <u>A</u> TWW <u>A</u> TWW <u>A</u> WSQP <u>K</u> KKR <u>K</u> V-NH ₂	16.2 min

XとUの文字はそれぞれAc₅CとAibを示す。a) 太字の文字は置換されたアミノ酸である。C末端はアミド化している。
b) 保持時間は、COSMOSIL 5C18-AR-II カラム (4.6 mm I.D. × 250 mm) を用い、H₂O中0%から100%のCH₃CN (それぞれ0.1% TFAを含む) までのグラジエントを30分かけてRP-HPLC分析 (220nmで検出)。

Table 1. 本研究で合成・評価したペプチド

合成したペプチドを HeLa 細胞および HEK293 細胞と様々な時間インキュベートし、細胞内への取り込みを評価したところ、どちらの細胞種でも、peptide 2-4 は peptide 1 よりも常に大きな膜透過性を示した(Figure 2)。dAA を含む peptide 2, 3 の細胞内蛍光量は、0.5 時間後よりも 24 時間後の方が高く、これらのペプチドは細胞を長時間培養しても、膜透過性を高いレベルで維持する傾向があることが示された。



HeLa細胞 (a) およびHEK293細胞 (b) におけるpeptide 1-4の細胞内の蛍光強度の時間依存的変化。平均蛍光強度はフローサイトメトリーで評価した。数値はn=3の実験の平均値±SDである。*は peptide 1に対する有意差を示す (*: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001)。

Figure 2. 細胞膜透過性評価

本研究で最も高い細胞膜透過性を示した peptide 2 に関する結果についてのみ詳報する。加水分解酵素トリプシンを用いて、タンパク質分解酵素に対する抵抗性を評価したところ、peptide 2 はトリプシンとの 24 時間接触後も 60%残存していた(Figure 3-a)。また、CD スペクトル測定による二次構造評価の結果、peptide 2 はリン酸緩衝液中で 210, 206 nm に負の極大を示し、ランダムコイル構造よりもヘリカルな構造を取っていた(Figure 3-b)。

これらの結果から、pep-1 の疎水性ドメイン内の親水性 Glu 残基を疎水性アミノ酸、特に dAA で置換することにより、ペプチドの酵素分解に対する安定性が増し、またペプチド全体のらせん構造が安定化し、疎水性ドメインが "両親媒性ペプチド" として機能したため、ペプチドの膜透過性が向上したと考えられる。

(以上の成果は、原著論文 1、学会発表 1 で発表)

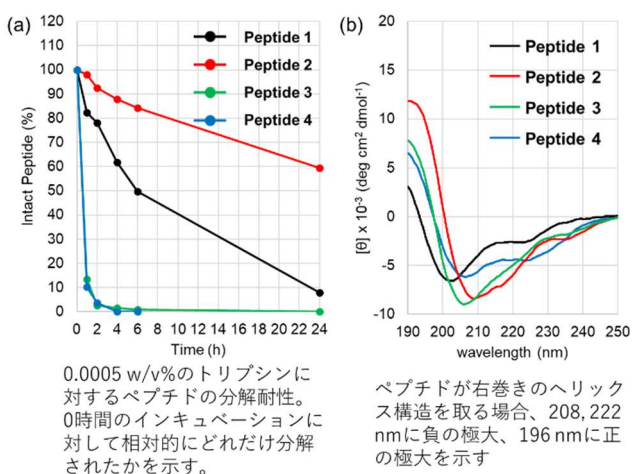


Figure 3. 酵素分解耐性と二次構造評価

0.0005 w/v%のトリプシンに対するペプチドの分解耐性。0時間のインキュベーションに対して相対的にどれだけ分解されたかを示す。

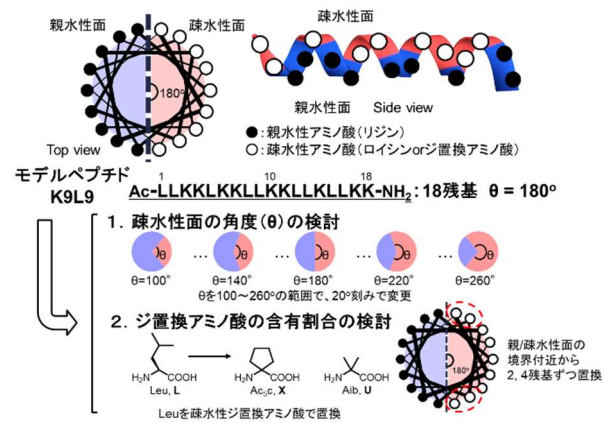
ペプチドが右巻きヘリックス構造を取る場合、208, 222 nmに負の極大、196 nmに正の極大を示す

② リジンとロイシンからなる両親媒性ヘリカルペプチド K9L9 の脂質二重膜への影響評価

①の研究成果より、両親媒性ヘリカル構造を有するペプチドと dAA の組み合わせによって高い膜透過性有するペプチドが作成できたことから、理論的に設計したペプチドを用いて脂質二重膜への影響を評価することを目的とした研究を進めることにした。

ペプチドは、A. Houghten らによる(biochemistry, 1992, 12688)、ロイシンとリジンを利用した 18 残基のモデルペプチド **K9L9** をベースとして、両親媒性ヘリックス構造の親/疎水性の割合を変化させたものや、ロイシンの代わりに dAA を導入したものなどを、系統的に 13 種合成している。(Figure 4)

これらのペプチドに対して、ペプチドの二次構造評価、リポソーム破壊評価、細胞毒性評価、細胞内への蛍光標識を標識したデキストラン(FITC-dextran)の輸送評価などを行ったところ、数種類のペプチドについて有望な実験結果が得られた。



まず、疎水性面の角度(θ)を変更したペプチドについては、 $180^\circ < \theta$ でペプチドの水中での二次構造が安定したヘリカル構造を取りやすくなり、リポソームを崩壊させる能力が高いことが明らかになった。細胞毒性を示さない濃度での FITC-dextran の輸送評価においては、ヒト胎児腎細胞由来株である HEK293 細胞に対しては細胞内輸送能を示さなかったことに対して、ヒト子宮頸がん細胞由来株である HeLa 細胞に対しては有意に高い細胞内輸送能を示した。(本成果は、学会発表 2, 4 で発表)

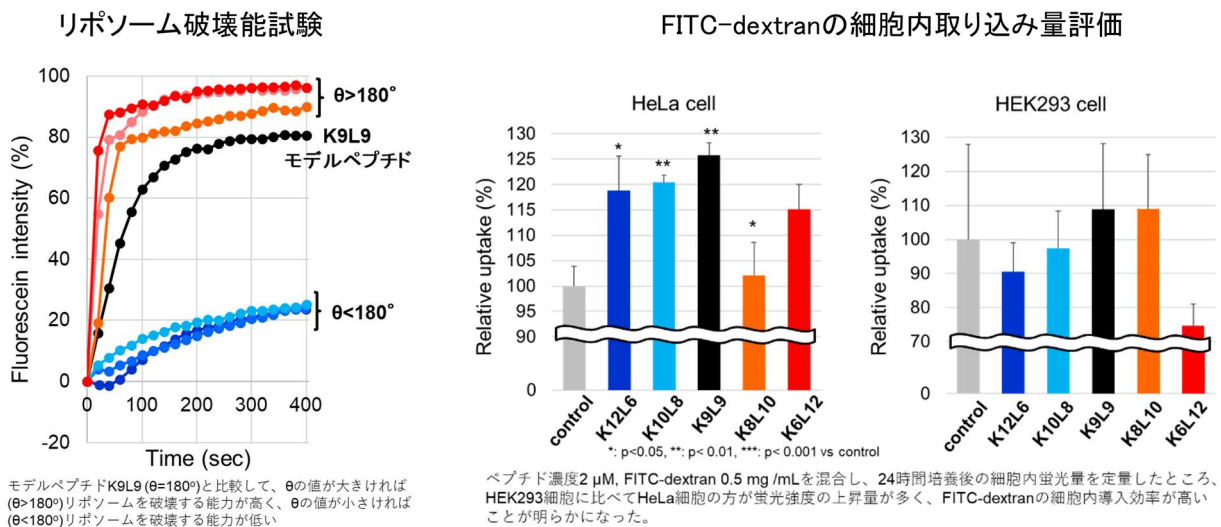


Figure 5. θ を変更したペプチドのリポソーム崩壊試験の結果と FITC-dextran の細胞内取り込み量評価

ジ置換アミノ酸を導入したペプチドについては、水が存在する環境中でも安定したヘリカル二次構造を示すとともに、ジ置換アミノ酸の含有数が多いほどリポソームを崩壊させる能力が高いことが明らかになった。細胞毒性を示さない濃度での FITC 標識 dextran の輸送評価においては、HEK293 細胞と HeLa 細胞のどちらにおいても Aib を 2 残基含有するペプチド **K9L7U2** が最も高い細胞内輸送能を示した。(本成果は、学会発表 3, 4 で発表)

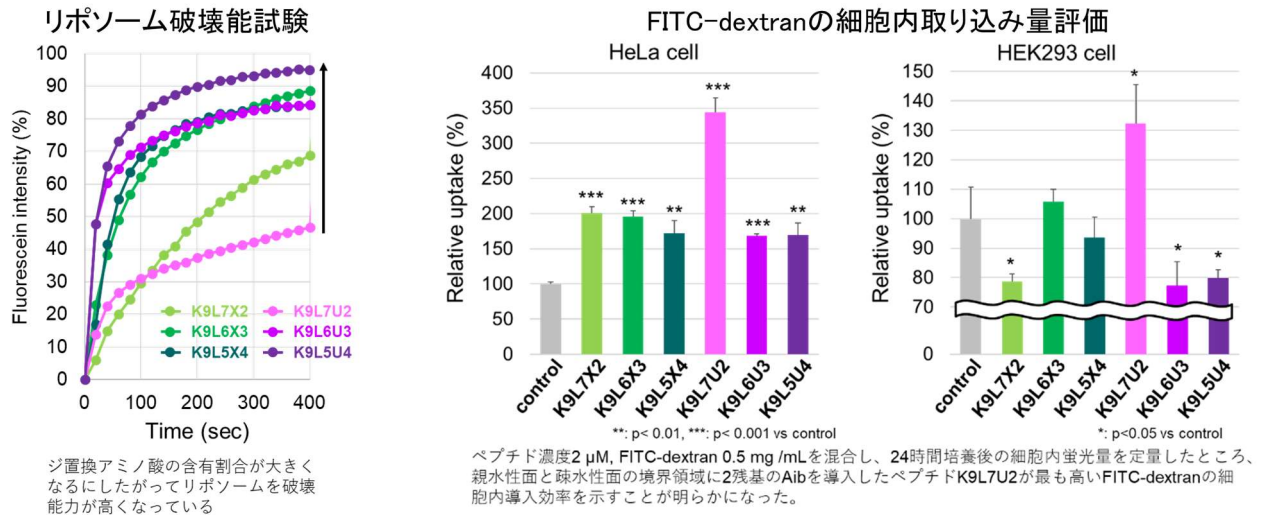


Figure 6. dAA を導入したペプチドのリポソーム崩壊試験の結果と FITC-dextran の細胞内取り込み量評価

これまで得られた結果においては、リポソームを用いたモデル実験と細胞を用いた実験の結果の相関関係について未だ不明な点も多いが、今後はリポソームの組成やペプチドの濃度を変更するなどして詳細なデータの蓄積を行い、これらのペプチドの脂質膜への影響について明らかにするための研究を引き続き行っていく予定である。

成果発表：

<原著論文>

1. Effects of Substituting Disubstituted Amino Acids into the Amphipathic Cell Penetrating Peptide Pep-1, T. Kato, H. Numa, M. Nakamachi, A. Asano, M. Doi, *Chem. Pharm. Bull.* 70, 812-817, 2022

<学会発表>

1. Effects of Replacing the Glu Residues of Pep-1 Peptide with Hydrophobic Amino Acids, T. Kato, H. Numa, M. Nakamachi, A. Asano, M. Doi, The 58th Japanese Peptide Symposium, 2021 年 10 月 (東京、オンライン開催)
2. 両親媒性ヘリックスペプチドの疎水性面の角度からみた脂質二重膜への影響の評価、山田 龍聖、松岡 明希、加藤 巧馬、浅野 晶子、土井 光暢、日本薬学会第 142 年会、2022 年 3 月(愛知、オンライン開催)
3. ジ置換アミノ酸を含有する両親媒性ヘリックスペプチドの脂質二重膜への影響の評価、松岡 明希、山田 龍聖、加藤 巧馬、浅野 晶子、土井 光暢、日本薬学会第 142 年会、2022 年 3 月(愛知、オンライン開催)
4. Evaluation of the Effect of Amphipathic Helical Peptides on Lipid Membranes, T. Kato, R. Yamada, A. Matsuoka, A. Asano, Mitsunobu Doi, The 59th Japanese Peptide Symposium, 2022 年 10 月 (宮城)