二種蛍光色素で標識したペプチドヘテロダイマーの合成と物性評価

○田中かれん・富﨑欣也（龍谷大先端理工）

Synthesis and physical properties evaluation of a peptide heterodimer labeled with different fluorescent dyes (Graduate School of Science and Engineering, Ryukoku University[1]) TANAKA, Karen ; TOMIZAKI, Kin-ya

生体にとって異物である薬物は、体内で分解･排出されやすく、また様々な副作用を引き起こす。そこで近年では、薬物を理想的な体内動態に制御する技術であるドラックデリバリーシステム (DDS) が注目されている。しかし、薬物がエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれる場合、エンドソームに内包されることで、薬物の分解や排出等の様々な問題が生じる。したがって、エンドソーム膜を乱すことで薬物の細胞質への放出を促進させ、効率的な薬物送達が可能になると期待される。先行研究においては、薬物キャリアペプチド (Cap-p : Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH_2) [1] の N 末端に、pH 応答性膜融合ペプチドとして知られる GALA ペプチド[2] の部分配列およびカチオン性の細胞膜透過性の核移行シグナルペプチド (NLS) を有する二種類のキャリアペプチドを設計した。さらに、細胞内での薬物放出を指向し、それらをジスルフィド結合を介して二量化したヘテロダイマーキャリアペプチド (GALA-NLS) を設計･合成し、GALA-NLS がエンドソーム膜を乱し、小分子を細胞質へ放出させる能力があることが示された。本研究では、 GALA-NLS を二種類の蛍光色素で標識したペプチド (HC-GALA-NLS-FAM) を合成し (Fig. 1.)、細胞内を模倣した還元環境下に おいてジスルフィド結合が解離することを、FRET を利用して確認した。

HC-GALA-NLS-FAM :

HC-G-G- $(EALA)_3$-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-C-NH_2
S
S
FAM-G-G-P-K-K-K-R-K-V-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-C-NH_2

Fig.1. ペプチドのアミノ酸配列 (2Naf = L-2-Naphtylalanine)

Cap-p をベースに、蛍光色素のカルボキシフルオレセイン (FAM) で標識した FAM-NLS-p-C 及び蛍光色素のヒドロキシクマリン (HC) で標識した HC-GALA-p-C (S-py) を固相合成法によって合成し、それらを二量化し HC-GALA-NLS-FAM を合成した (Fig. 1.)。このペプチド溶液に還元剤であるジチオトレイトール (DTT) を添加し、DTT との反応によるジスルフィド結合の解離評価を行った。またペプチド終濃度 10 μM となるようにペプチド溶液を調整し、蛍光スペクトル測定による FRET 発生の様子を観察した。

ペプチド溶液に DTT を添加したところ、HPLC においてヘテロダイマーのピークが消失し、代わって FAM-NLS-p-C および HC-GALA-p-C のピークが出現した。これらにより DTT による還元環境でのジスルフィド結合の解離が確認できた。また蛍光スペクトル測定では、FRET による HC (416 nm) の消光および FAM (507 nm) の発光が確認された (Fig. 3.)。一方 DTT 処理後では、ジスルフィド結合の解離により FRET が一部解消され、HC の発光および FAM の消光が確認された。このことから、FRET を利用することで、ヘテロダイマーのモノマーへの解離を追跡できることがわかった。

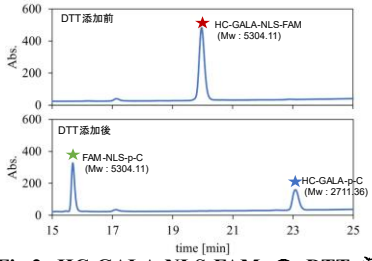

Fig.2. HC-GALA-NLS-FAM の DTT 添加前後の HPLC および MALDI-TOF-MS 分析

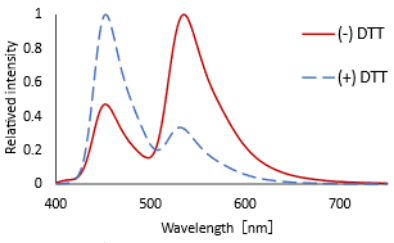

Fig.3. 正規化した HC-GALA-NLS-FAM の蛍光スペクトル

[1] Tomizaki, K.-Y. et al. *Molecules* **2017**, 22, 1916.
[2] Nanda K.Subbarao, et al. *Biochemistry* **1987**, 26, 2964-2972.