

両親媒性ペプチドを活用した 脂質ナノディスクの調製と物性

(東理大院理工¹、産総研²) ○出井 陽平¹・井村 知弘²・油井 研一¹・酒井 秀樹¹・阿部 正彦¹・北本 大²

【緒言】体内でコレステロール逆輸送を担う HDL(High Density Lipoprotein) 粒子は、主にアポリポタンパク A-I(アポ A-I)とリン脂質から形成する粒径 7-13 nm 程度のディスク状のナノ粒子である。この粒子を人工的に再構成することで得られるナノディスク(Fig. 1)は、動脈硬化症等を予防する医薬品としてばかりでなく、近年では、食品・化粧品の基材としての応用も試みられている。しかし、現状のナノディスク製法の「界面活性剤透析法」では、多大なエネルギーや余計な添加物が必要となるなどの問題があった。そこで本研究では、アポ A-I を構成する両親媒性ヘリカルペプチドに着目し、その両親媒性を制御することにより、簡便かつ高効率でナノディスクを調製することを目的とした。さらに、調製されたナノディスクの物性(形状・分散安定性)についても評価した。

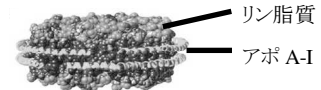


Fig. 1 nanodisc

【実験】まず、アポ A-I(全 243 残基)を構成する 10 個の α -ヘリックス構造のうち、ヘリックス 10 (220-241 番目の 22 残基)のアミノ酸配列をベースとしたペプチド-1 を固相合成法(SPPS:Fmoc 法)により合成した。次に、ペプチド-1 の界面活性や二次構造を、表面張力測定(ペンダントドロップ法)及び円偏光二色性(CD)スペクトルにより評価した。さらに、ペプチド-1 に、バンガム法で調製した DMPC リポソームを添加(ペプチド-1:DMPC = 1:10)し、混合(一晩攪拌)するのみで、ナノディスクの調製を行った。得られたナノディスクの物性は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)及びネガティブ染色法による透過型電子顕微鏡(TEM)観察により評価した。また、ナノディスクのゼータ電位の pH 依存性についても評価し、分散安定性の制御を試みた。

【結果と考察】まず、ヘリックス 10 のアミノ酸配列をベースに、 α -ヘリックスの片方の面に親水性アミノ酸が、もう一方の面に疎水性アミノ酸が局在化した両親媒性構造を有するペプチドを設計・合成した。その結果、MALDI-TOF MS 及び逆相 HPLC より、目的のペプチド(ペプチド-1)が高純度で得られることが確認された。続いて、ペプチド-1 の表面張力低下能を検討したところ、ペプチド-1 は、通常の界面活性剤のような親水基・疎水基を持たないにもかかわらず、濃度に依存して表面張力は低下し、臨界会合体形成濃度(CAC: 2.40×10^{-5} M)になると一定となった。また、CD スペクトル測定より、ペプチド-1 は水中で α -ヘリックスを形成することが確認された。次に、ペプチド-1 と DMPC リポソームを混合するのみで、ナノディスクの調製を試みた。SEC 分析の結果から、会合体を形成しない CAC 以下の濃度では、ペプチド単独と同等の位置にのみピークが確認された。一方、会合体を形成する CAC 以上の濃度では、ナノディスクと考えられるストークス径 11.8 nm の位置にピークが確認された。実際に TEM 観察を行ったところ、ディスク状のナノ粒子が多数観測された。このことから、両親媒性ペプチドの会合体形成が、ナノディスク形成に重要であることが明らかになった。また、両性電解質であるペプチドの性質に着目し、得られたナノディスクの分散安定性の制御を試みた。その結果、pH に依存してナノディスクのゼータ電位は+21 mV(pH 3.4)から-30 mV(pH 10.6)へと変化し、酸性条件下ではナノディスクの分散安定性は良好であったのに対して、ペプチド-1 の等電点(PI 6.6)付近では凝集することも明らかになった。

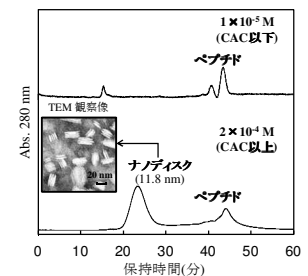


Fig. 2 SEC analysis and TEM observation of nanodisc prepared with Peptide-1

Preparation of lipid nanodiscs using designed amphiphilic peptides and their colloidal properties

Y.TSUKUI¹, T.IMURA², K.ABURAI¹, H.SAKAI¹, M.ABE¹, D.KITAMOTO² (Tokyo University of Science¹, AIST², t-imura@aist.go.jp)

High density lipoproteins (HDLs) whose size is ranging from 7 to 13 nm are mainly composed of apolipoproteins and lipids, and they are known to play an important role in reverse cholesterol transport in the body. Nanodiscs which are artificially reconstituted HDLs have recently attracted attention as potentially useful assemblies applicable not only to pharmaceutical but also to food and cosmetic industries. In this study, we succeeded in preparing nanodiscs by just mixing DMPC vesicles with chemically synthesized α -helical amphiphilic peptides. The physicochemical properties of obtained nanodiscs were then investigated by size-exclusion chromatography (SEC) and negative-stain TEM. We also found that the dispersion stability of the nanodiscs in aqueous solution was controllable and drastically improved under acidic conditions.