

整理番号	2020-J-067	報告者氏名	稲田 飛鳥
------	------------	-------	-------

研究課題名 ペプチドを配位子とした金属有機構造体による抗がん剤の水溶性改善

<代表研究者> 機関名：国立大学法人宮崎大学 職名：助教 氏名：稲田 飛鳥

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：
 機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

本研究では、薬物投与後に体内の薬物分布を適切にコントロールする薬物送達システム (Drug Delivery System; DDS) を実現するために、抗がん剤を分子レベルで包接可能、DDS に最適な安全性の高い生体分子であるペプチドを有機配位子とした金属有機構造体 (BioMOF) の新規開発を検討した。金属イオンと配位能の高いヒスチジンを中心に持つトリペプチド (X-His-X) を合成し、金属イオンと反応させ、貧溶媒添加法により、BioMOF の合成を試みた。

その結果、配位子として Gly-His-Gly, Val-His-Val と銅イオンとの組み合わせにおいて、XRD パターンで結晶由来のピークが確認され、BioMOF の創製に成功した。その他のペプチド (Thr-His-Thr, Glu-His-Glu, Tyr-His-Tyr) については、貧溶媒の添加により、沈殿固体は生成するが、非晶質なパターンが得られたため、規則正しい結晶構造を取っていない可能性が高いと考えられる。Val-His-Val を配位子とした BioMOF はこれまで世界的に報告例がなく、現時点において新材料であると考えられる。配位子がペプチドという柔軟な材料を用いているため、結晶構造は非常にとりにくいが、調整条件を最適化できれば、これらのペプチド以外でも結晶構造を取ることが十分に考えられ、極めて価値の高い成果が得られたと考える。

さらに、今回合成した BioMOF は減圧乾燥により、結晶中の溶媒が抜ける際に構造がアモルファスとなり、再び水の蒸気に暴露すると、結晶状態が再生するという非常に興味深い性質があることを発見した。水分子がアモルファスから結晶構造への相転移の因子であることが示唆された。

また、ペプチド分析における一般的な逆相クロマトグラフィーではなく、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いることで、合成したトリペプチドの純度を正確に測定する分析手法を確立した。

<研究発表（口頭，ポスター，誌上別）>

ポスター，第31回九州地区若手ケミカルエンジニア討論会/第7回九州地区大学—高専若手研究者セミナー合同大会，（2021年11月27日，オンライン）

<研究の目的，経過，結果，考察（5000字程度，中間報告は2000字程度）>

本研究では，薬物投与後に体内の薬物分布を適切にコントロールする薬物送達システム（Drug Delivery System; DDS）を実現するために，難水溶性薬物を分子レベルで包接可能，DDSに最適な安全性の高い生体分子であるペプチドを有機配位子とした金属有機構造体（BioMOF）の新規開発を検討した。以下，詳細を記述する。

1. 実験

1.1. 配位子ペプチドの固相合成

まず初めに，配位子となるトリペプチドを Fmoc 固相合成法により合成した。金属イオンと配位する性質を持つという報告例のある，Gly-His-Gly（GHG）を基軸に，X-His-X を配列の候補とした。また，GHG は試薬を購入して実験に使用した。

1.1.1. 樹脂の膨潤

各樹脂を所定のスケール測り取り，dichloromethane（DCM）で樹脂が浸る程度加え，2-3 h 静置し，樹脂を膨潤させた。用いた樹脂および合成スケールを表 1 に示す。

表 1 使用した樹脂と合成スケール

Peptide	Resin	Synthesis scale [mmol]	Substitution at filling [mmol/g]	Amount of resin [mg]
THT	Fmoc-Thr(tBu)-Wang resin	0.9	0.65	1384.61
EHE	Fmoc-Glu(OtBu)-Wang resin	0.9	0.66	1363.64
YHY	Fmoc-Tyr(tBu)-Wang resin	0.9	0.66	1363.64
VHV	Fmoc-Val-Wang resin	0.9	0.72	1250.00

1.1.2. Fmoc 保護基の脱保護

Piperidine（PPD）20 mL とジメチルホルムアミド（DMF）80 mL を混合し 20 % PPD/DMF を 100 mL 調製した。この混合液を 4 mL 樹脂に加え 1 min Voltex ミキサーで攪拌し溶液を取り除き，再度 4 mL を加え，室温で 10 min 振とうした。その後，4 mL の DMF で 5 回洗浄した。

1.1.3. カップリング反応

縮合剤 COMU 9.3 g と DMF 54 mL を混合させ，0.40 M 縮合剤カクテルの調製を行った。次に，2,4,6-trimethylpyridine（TMP）4.65 mL と N-methylpyrrolidone（NMP）54 mL を混合させ，0.60 M TMP の調製を行った。（当初は縮合剤に HBTU/HOBt を，塩基に DIEA を用いていたが，合成されたペプチドの純度が低く，縮合剤類を変更した。）

反応点に対して 3 等量（1.5 mmol）の Fmoc 保護アミノ酸を秤りとり，そこで 1) で調製した 0.40 M 縮合剤カクテルと 0.60 M TMP を 3.5 mL ずつ測り取ってそれぞれ混合し Vortex で完全に溶解するまで攪拌した。溶解後，樹脂に全量ゆっくり加え，(株)ハイペップ研究所製 PetiSyzer II を用いて

60 °Cで50–130 rpm で攪拌し、30 min 静置した。終了後、4 mL の DMF で5 回洗浄した。

1.1.4. Kaiser テストによる未反応アミノ基の有無の確認

ニンヒドリン反応を利用し、未反応のアミノ基の有無を確認した。Ninhydrin/Ethanol, phenol/Ethanol, potassium cyanide/Pyridine を各々20 μ L 測り取り、デイスポーザブル試験管で混合し調製した Kaiser 試薬に、反応後の樹脂を微量加え、沸騰水中で1 min 加熱した後、樹脂及び溶液の色を観察した。陽性の場合には青紫色に呈色し、陰性の場合には黄色に呈色する。陽性の場合には未反応のアミノ基が存在しているので、実験 1.1.4 に戻り、再度カップリングを行った。陰性の場合には、次の行程に進んだ。

1.1.5. 樹脂の膨潤

4 mL の DCM 及び DMF で3 回洗浄した。その後、実験 1.1.2 から実験 1.1.5 までの操作手順を同様に繰り返し、各アミノ酸を順次結合させた。

1.1.6. ペプチド鎖の伸長の終了

実験 1.1.3 と同様の操作を行った後、4 mL の DMF, DCM, MeOH の順に5 回洗浄後、2-3 h 減圧乾燥させた。

1.1.7. 脱保護・脱樹脂

Trifluoroacetic acid(TFA)/水/triisopropylsilane(TIS)を 95/2.5/2.5 となるように、それぞれ 23750/625/625 μ L 混合させ、脱保護カクテルを調製した。

あらかじめ調製して冷蔵しておいた脱保護カクテルを樹脂が浸る程度加え、攪拌し 90 min 静置した(30 min 毎に攪拌)。その後、ろ液を遠沈管に回収した。また、TFA による洗浄を2 回行い、そのろ液も遠沈管に回収した。

1.1.8. 沈殿精製

ろ液を含め 45 mL となるように冷ジエチルエーテル (Et_2O) を加え、超音波で攪拌した。その後、遠心分離(4 °C, 6000 rpm, 10 min)を行い、上澄み液を除去する操作を3 回繰り返した。その後、ドラフト内で Et_2O を除去後に減圧乾燥することで目的のペプチドを得た。

1.1.9. トリフルオロ酢酸 (TFA) イオンの除去

Agilent VariPure IPE (陰イオン交換樹脂) を用いてペプチドの対イオンとして含まれる TFA を除去した。充填剤の2-3 倍量のメタノールを流した後、試料と同組成の溶媒(水 : ACN = 50 : 50) 充填剤の2-3 倍流した。次に、ペプチドに溶媒を加え溶解させた後、Agilent VariPure IPE に流し、溶出する溶液を回収した。その後、メタノールを充填剤の等流量流し、溶出する溶液を回収した。得られた溶液をエバポレーターで減圧濃縮し、凍結乾燥を行った。

1.2. 合成ペプチドの分子量測定および純度測定

合成したペプチドと GHG の構造を下記の図 1～図 5 に示す。

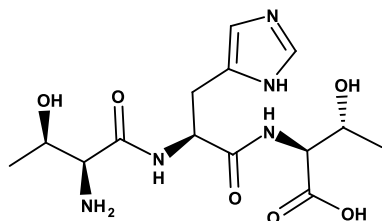


図 1. Thr-His-Thr (THT) の構造。

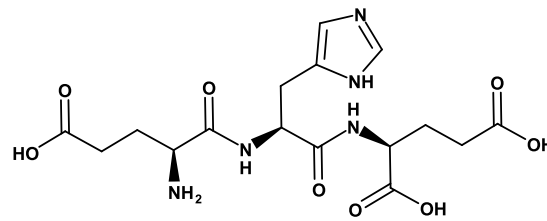


図 2. Glu-His-Glu (EHE) の構造。

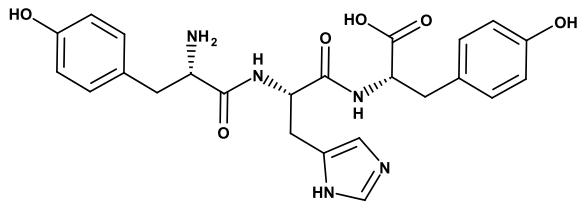


図3. Tyr-His-Tyr (YHY) の構造.

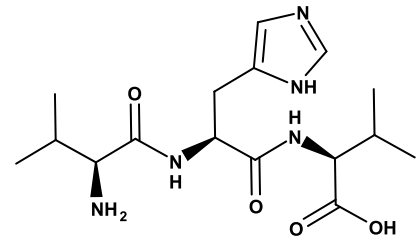


図4. Val-His-Val (VHV) の構造.

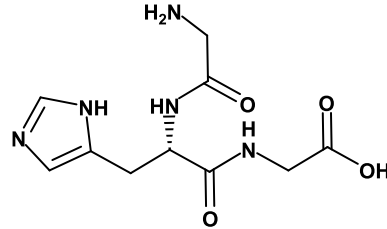


図5. Gly-His-Gly (GHG) の構造.

1.2.1 ESI-MS による合成ペプチドの分子量測定

合成したペプチド(THT, EHE, YHY, VHV)の少量を蒸留水で溶解させペプチド溶液を調製し、精密質量分析装置(Q-Exactive)を用いて測定した。その結果を図6～図9に示す。

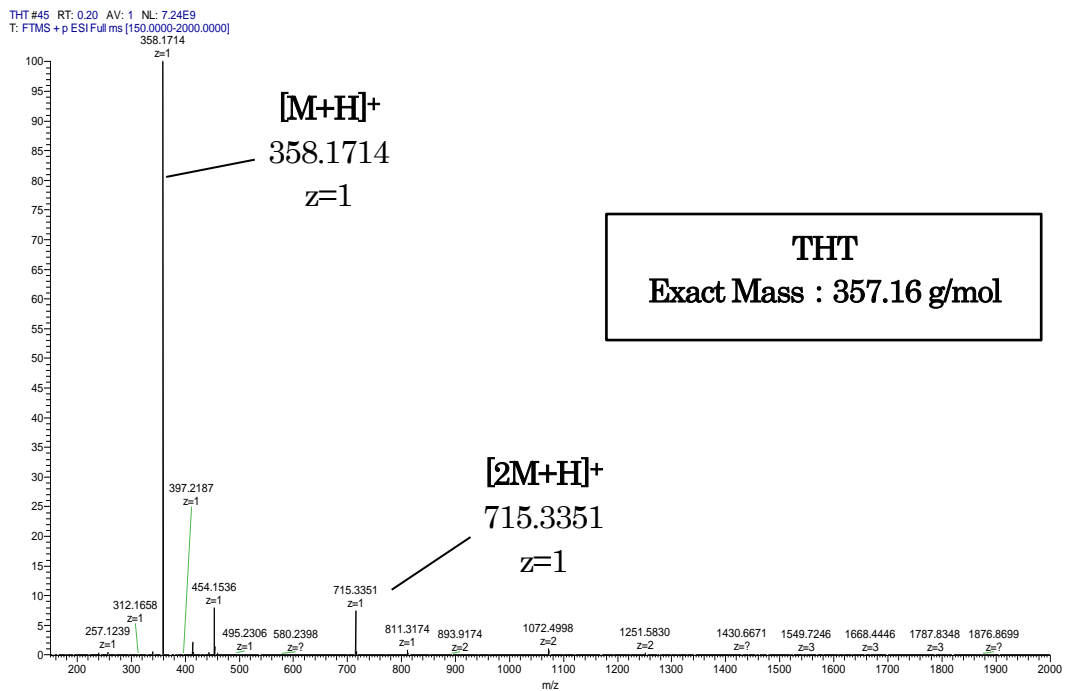


図6. THT の ESI-MS スペクトル.

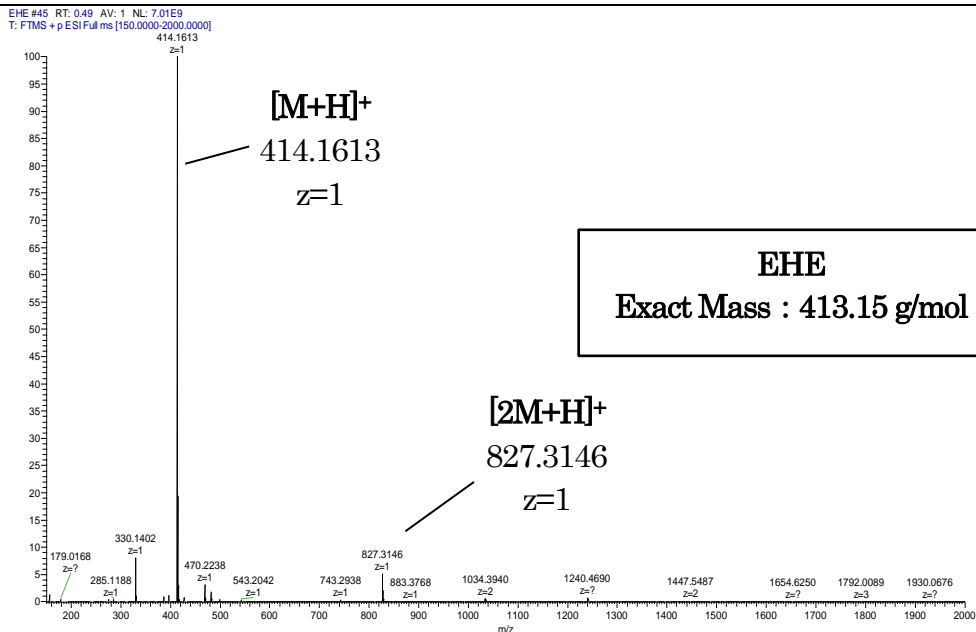


図7. EHE の ESI-MS スペクトル.

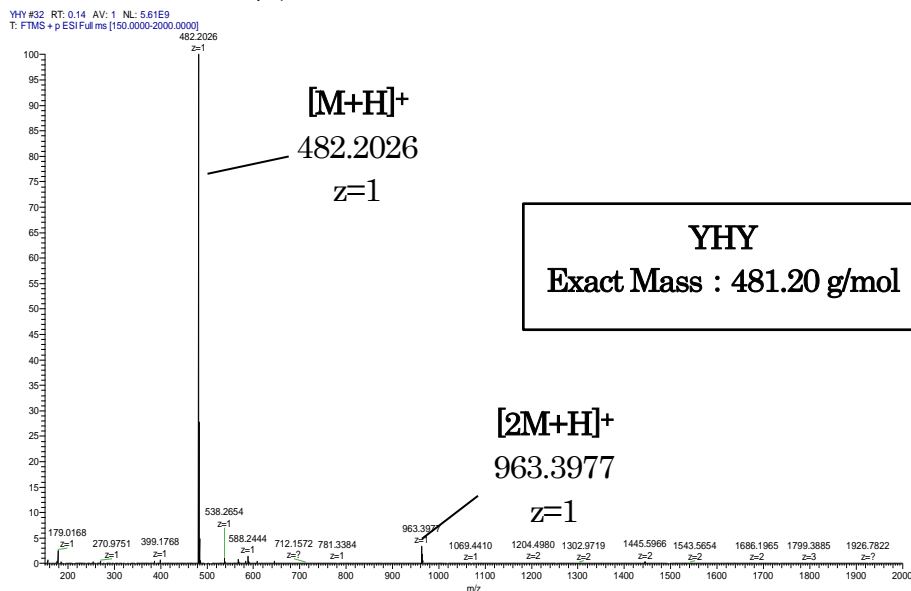


図8. YHY の ESI-MS スペクトル.

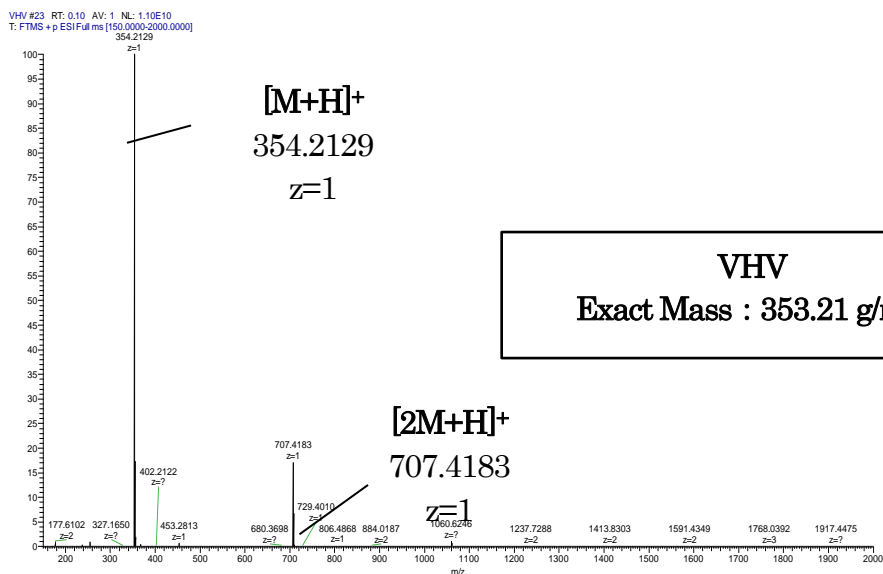


図9. VHV の ESI-MS スペクトル.

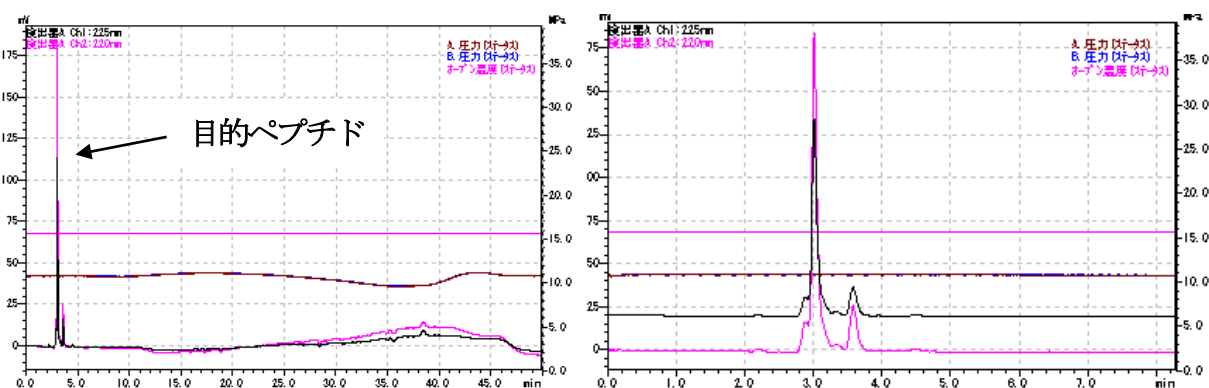
図6のマススペクトルより、358.1714 m/zのピークが大きく見られた。合成したペプチドTHTの精密分子量は357.16 g/molであるので、目的ペプチドのピークであると考えられる。したがって、THTの合成は成功したと考えられる。また、ペプチドの収量は319.81 mgであった。理論収量は、343.32 mgであるため、収率は99.4%であった。図7～図9も同様にして、EHE：収率64.6%，YHY：収率56.4%，VHV：収率87.5%となった。

1.2.2 合成ペプチドの純度測定

少量の合成ペプチド(THT, EHE, YHY, VHV)をグラジエントの初期濃度と同様の溶媒に溶解させた。その溶液をバイアルに200 μL 注入し、測定試料とした。測定条件は以下に示す。

—測定条件—				
カラム：TSKgel Amide-80 HR 5 μm(4.6 mm x 250 mm)				
移動相：A：0.1% TFA in water				
B：0.1% TFA in ACN				
カラムオープン温度：40℃				
検出波長：220 nm				
流速：1.0 mL/min				
時間(min)：	0→60	60→80	80→80	80→130
B%	： 97→20	20→20	20→97	97→97

純度測定方法の確立に時間を要した。筆者は以前よりペプチドの純度測定はルーチンとして行っていたが、本研究で合成したペプチドの鎖長は非常に短いため、通常ペプチドを分析する際の逆相クロマトグラフィーで用いるC18カラムでは保持時間が4分以内となり、グラジエントの勾配を変更しても、複数のピークが重なって検出され、分離することができなかった(図S1)。



図S1. C18カラムによるトリペプチド分析時のクロマトグラム。

そのため、今回は親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) という手法で、新たに専用のカラムを用いて分析を試みた。その結果、目的ペプチドと不純物を個別に認識することができ、純度を算出することができた。以下、図10～図13に純度測定のコロマトグラムと、表2に各ペプチドの収量と収率を示す。

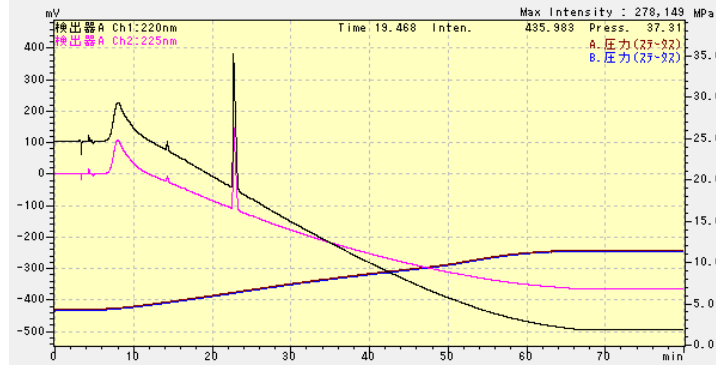


図10. THT のクロマトグラム.

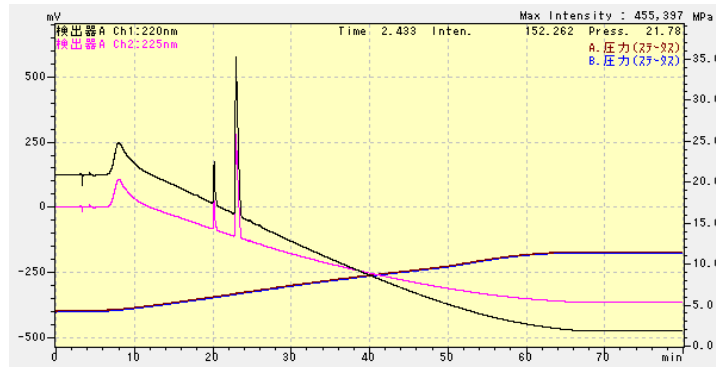


図11. EHE のクロマトグラム.



図12. YHY のクロマトグラム.



図13. VHV のクロマトグラム.

表2 合成した各ペプチドの収量と収率.

Peptide	Yield [mg]	Purity [%]
THT	319.81	80.0
EHE	240.29	86.9
YHY	227.87	98.8
VHV	318.08	87.5

1.3 BioMOF の合成

合成したトリペプチド (THT, EHE, YHY, VHV, GHG) を用いた BioMOF の合成を試みた。一般的な MOF に使用されている配位子は剛直な構造を持つが、ペプチドは構造が柔軟であるため、BioMOF の合成には、貧溶媒添加法を用いた。また、金属イオンは主に、ヒスチジンの側鎖のイミダゾール基と安定した結合を形成するという報告のある、銅イオン (Cu(II)) を主に用いた。

1.3.1 BioMOF の合成と評価

4 mL ガラスバイアル中に合成したトリペプチドを 45 μmol 秤りとり、0.3 M Cu(OAc)₂ 水溶液を 150 μL (45 μmol) 加え、Vortex ミキサーで攪拌した。この溶液を Pep-金属溶液とする。その後、Pep-金属溶液を 0.45 μm メンブレンフィルターでろ過し、各貧溶媒 (エタノール, アセトニトリル, 2-プロパノール) を順次加え、室温で 48 時間静置した。得られた沈殿物を遠沈管に移し、それぞれ用いた溶媒により洗浄を 2 回行った後、室温で乾燥させた。合成した BioMOF の合成条件と生成物の形態を表 3 に示す。

表 3 BioMOF の合成条件と生成物の形態

BioMOF	金属塩	配位子	貧溶媒	体積比 (水溶液 : 貧溶媒)	生成物の 形態
Cu-THT (EtOH)	Cu(OAc) ₂	THT	EtOH	3 : 40	沈殿せず
Cu-EHE (EtOH)	Cu(OAc) ₂	EHE	EtOH	3 : 40	結晶状
Cu-EHE (MeCN)	Cu(OAc) ₂	EHE	MeCN	3 : 40	結晶状
Cu-EHE (2-pro))	Cu(OAc) ₂	EHE	2-propanol	3 : 40	結晶状
Cu-YHY (EtOH)	Cu(OAc) ₂	YHY	EtOH	3 : 40	ゲル
Cu-YHY (MeCN)	Cu(OAc) ₂	YHY	MeCN	3 : 40	結晶状
Cu-YHY (2-pro))	Cu(OAc) ₂	YHY	2-propanol	3 : 40	ゲル
Cu-VHV (EtOH)	Cu(OAc) ₂	VHV	EtOH	3 : 40	沈殿せず
Cu-VHV (MeCN)	Cu(OAc) ₂	VHV	MeCN	3 : 40	沈殿せず
Cu-VHV (2-pro))	Cu(OAc) ₂	VHV	2-propanol	3 : 40	沈殿せず
Cu-VHV (MeCN)	Cu(OAc) ₂	VHV	MeCN	3 : 20	結晶状
Cu-GHG (EtOH)	Cu(OAc) ₂	GHG	EtOH	3 : 40	結晶状
Cu-GHG (MeCN)	Cu(OAc) ₂	GHG	MeCN	3 : 40	結晶状
Cu-GHG (2-pro))	Cu(OAc) ₂	GHG	2-propanol	3 : 40	沈殿せず
Ni-GHG (EtOH)	Ni(OAc) ₂	GHG	EtOH	3 : 40	粉末状
Zn-GHG (EtOH)	Zn(OAc) ₂	GHG	EtOH	3 : 40	粉末状

表3より、配位子ペプチドの種類、貧溶媒の種類・体積比で結晶・粉末上の生成物が得られた。Cu-YHYについては、ゲル化した。これはおそらく、チロシン残基の疎水性が高く、分子間で水素結合を形成したためだと考えられる。

各サンプルの結晶状の固体について、粉末XRDによる測定を実施した。その結果を図14～図17に示す。

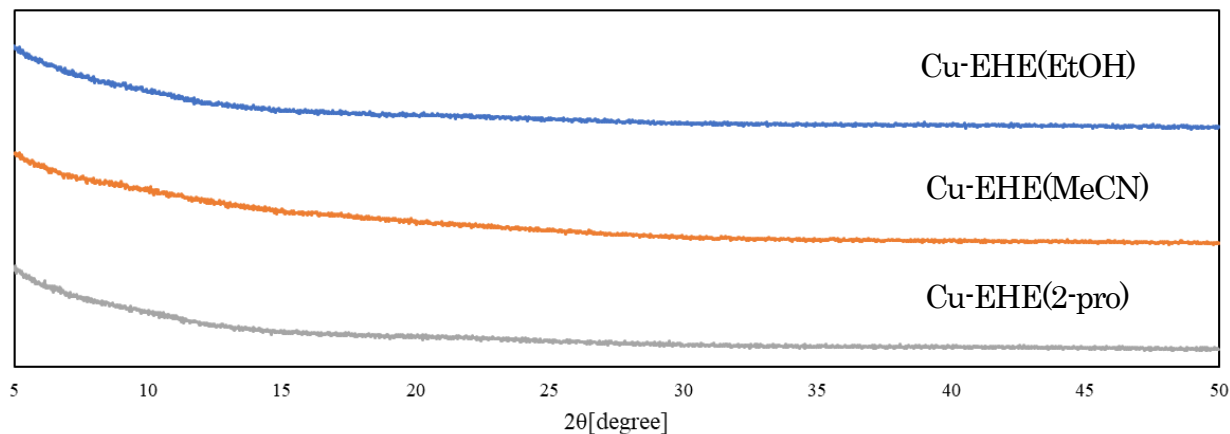


図14. Cu-EHE の XRD パターン.

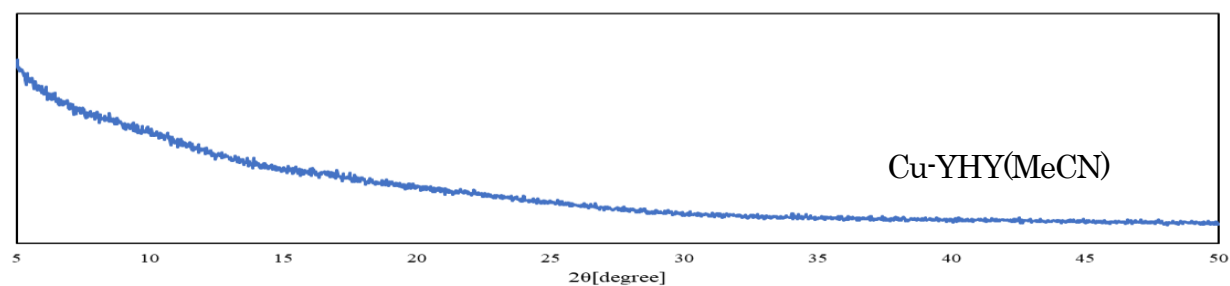


図15. Cu-YHY の XRD パターン.

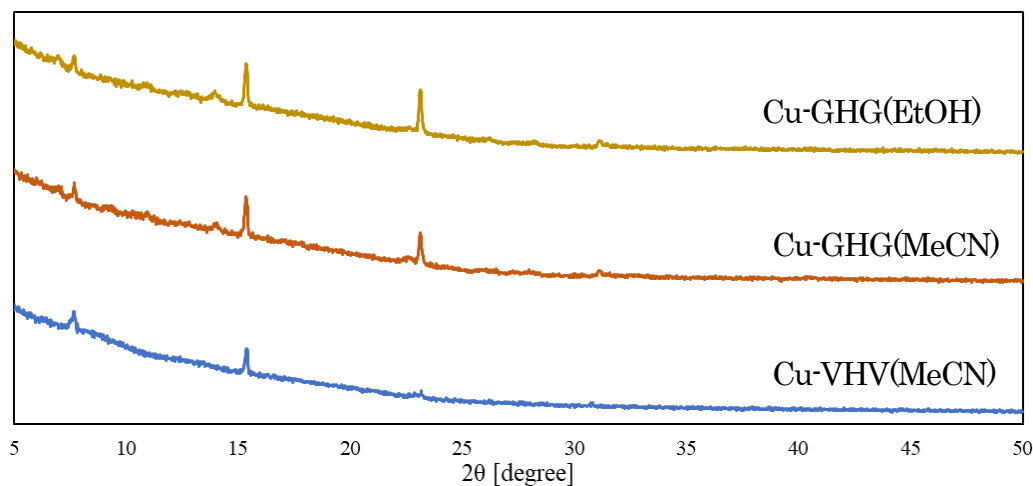


図16. Cu-GHG およびCu-VHV の XRD パターン.

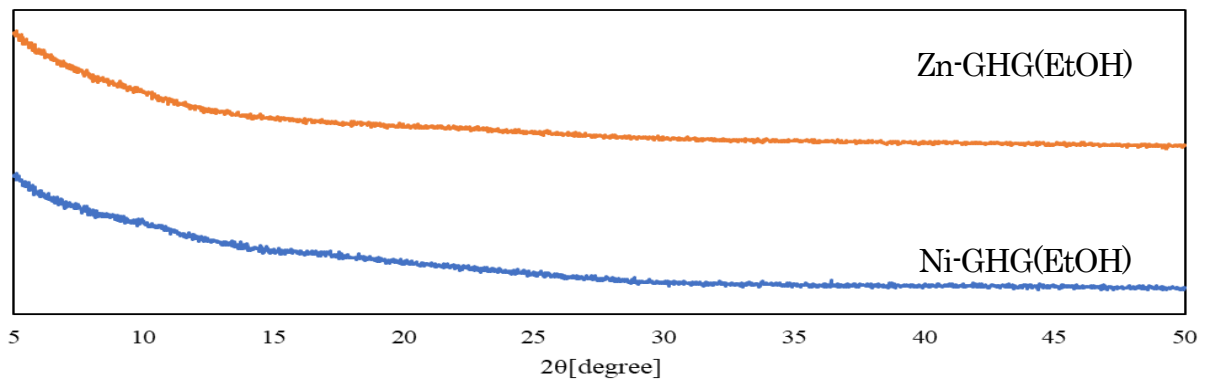


図17. Zn-GHG, Ni-GHG の XRD パターン.

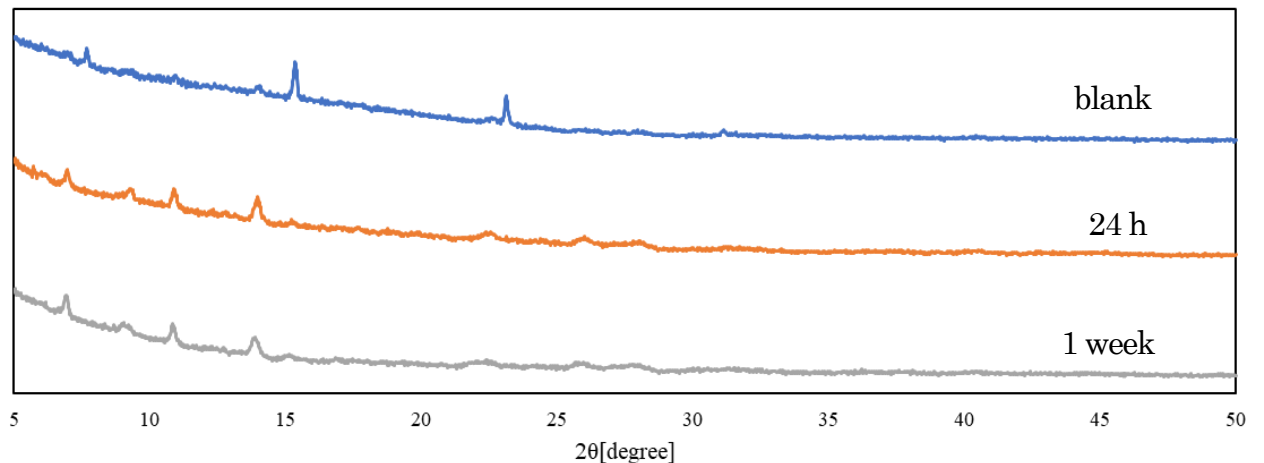


図18. Cu-GHG の XRD パターンの水の暴露による変化.

図14, 15においては, すべての固体の XRD パターンがアモルファスであることが確認された。このことにより, これらの沈殿固体が非晶質であることが示唆された。

図16においては, Cu-GHG は貧溶媒にエタノールやアセトニトリルでも同じ結晶パターンが得られた。このことから, Cu-GHG の結晶中には貧溶媒が取り込まれていないことが示唆された。また, Cu-VHV はアセトニトリルでこれまでの貧溶媒と金属溶液の体積比とは異なる比率でのみ, 結晶が析出した。これは配位子であるペプチドの疎水性が GHG とは異なるためであると考えられる。

図17においては, 異なる金属である Ni(II)および Zn(II)を用いて GHG との錯体形成を試みたが, こちらも沈殿粉末が生成したものの, XRD パターンはアモルファスを示した。これは, おそらく, ヒスチジン残基の側鎖のイミダゾール基との配位結合の強さに由来しており, Cu(II)が最も高いため, Cu-GHG のみ結晶構造をしめしたと考えられる。

図18では, Cu-GHG が減圧乾燥後にアモルファスな XRD パターンとなったが, 水に24時間以上暴露することにより, これまでとは異なる結晶ピークが得られ, さらに結晶性が高くなることが示唆された。このことから, 水がアモルファスから結晶へと相転移する因子であることが示唆された。