

サケプロタミンからの塩基性ペプチド VSRRRRRRRGRRRR の簡便な調製¹⁾

安保 明博, 山田 寿乃, 橘 伸至, 鈴木 崇司, 久保田佳代, 佐々木有亮

A Facile Method for Preparing an Arginine-rich Peptide from Salmon Protamine

Akihiro AMBO, Hisano YAMADA, Shinji TACHIBANA, Takashi SUZUKI, Kayo KUBOTA, and Yusuke SASAKI

(Received November 21, 2007)

It has recently been shown that oligoarginine or arginine-rich peptides can penetrate into the cells. In this study, we investigated a facile method for preparing an arginine-rich peptide from salmon protamine sulfate. A 14-amino acid peptide (VSRRRRRRRGRRRR) was obtained by thermolysin digestion in alkaline pyroborate buffer at pH 8.74 and pH 8.93 in a satisfactory yield while the peptide did not obtained in a neutral Tris-HCl buffer at pH 7.40. The 14-amino acid peptide was converted to its N-terminal mercaptopropionyl derivative. The modification serves as a tether by forming disulfide bond with Cys residue for delivery of high molecular weight proteins into the cells.

Key words — arginine-rich peptide; cell penetrating peptide; protamine

細胞内で相互作用する物質を細胞外部から内部へ導入にすることにより, 細胞の営みをコントロールすることが可能である. すなわち, 生理的に活性なタンパク質の欠損による細胞内の情報伝達異常が原因となるような病気では, そのタンパク質を細胞外から直接導入することによって治療できる可能性がある. しかし, 細胞膜は脂質に富む疎水性のバリアであるため, 一般にタンパク質などの親水性の高い分子を通過させることは容易ではない. 最近, 細胞膜透過性のウイルスタンパク質由来の HIV-1 Tat (48-60) や転写因子由来 pAntp(43-58) などを結合させることにより, 種々のタンパク質を細胞内に導入させることが可能となっている.²⁾ Futaki らは, ポリアルギニンペプチドの細胞内移行性の検討から, 連続した Arg 残基 8 個程度のペプチドが良好な細胞内移行性を有し, Lys 残基 8 個よりも細胞内移行性が高いことを報告している.³⁻⁵⁾ また, Yang らはサケプロタミンフラグメントのヘパリン解毒作用⁶⁻¹⁴⁾ の研究を発端に, 最近, サケプロタミンフラグメントの 1 つである Val-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg (VSRRRRRRRGRRRR)

が細胞内移行性キャリアとして有用であることを報告している.^{13,14)}

Arg 残基に富むペプチドを化学合成により得ることは, 1) 連続する Arg 残基の縮合反応では, 一般に縮合効率が良くない, 2) Arg 残基に富むペプチドはガラスへの吸着性が高い, 3) 親水性が高いため逆相系カラムでは保持が低く, 精製が困難になる場合があるなどの理由により容易ではない. 従って, 合成効率や経済的観点より, プロタミンなどの天然物から調製する方法が, 有利であると考えられる. これまでにプロタミンフラグメントの調製の詳細については報告されていない. そこで我々は本研究において Arg 残基に富むペプチドとして VSRRRRRRRGRRRR をサケプロタミンから簡便に調製する方法を検討した. また, 実際にキャリアとして用いる場合の結合手とするために, プロタミンフラグメントへのメルカプト基の導入についても検討した. HIV-1 Tat(48-60), pAntp(43-58) およびサケプロタミンのアミノ酸一次配列を Fig. 1 に示す. なお, サケプロタミンは Fig. 1 に示すように 4 種 (I ~ IV) の混合物である.

HIV-1 Tat (48-60)

H-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-OH

pAntp (43-58)

H-Arg-Gln-Ile-Lys-Ile-Trp-Phe-Gln-Asn-Arg-Arg-Met-Lys-Trp-Lys-Lys-OH

Salmon protamine

I : H-Pro¹-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Pro-Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Pro-Arg¹⁷-II : H-Pro¹-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Pro-Val-Arg-Arg-Arg-Arg-Pro-Arg¹⁷-III : H-Pro¹-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Arg-Pro-Val-Arg-Arg-Arg-Arg-Pro-Arg¹⁷-IV : H-Pro¹-Arg-Arg-Arg-Arg-Ala-Ser-Arg-Arg-Ile-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Pro-Arg¹⁷-I : -Arg¹⁸-Ala-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg³²-OHII : -Arg¹⁸-Val-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg³²-OHIII : -Arg¹⁸-Val-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg³²-OHIV : -Val¹⁸-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg³⁰-OH

Fig. 1. Amino Acid Sequences of HIV-1 Tat (48-60), pAntp (43-58), and Salmon Protamines (I-IV)

実験材料および方法

1. 試薬

サーモリシン (3 × cryst, 7000 PU/mg) および 3,3'-dithiodipropionic acid はナカライテスク社製を用いた。硫酸プロタミン (サケ由来) は大和化成株式会社からの供与品を用いた。

2. サーモリシンによる加水分解

硫酸プロタミン (250 mg) とサーモリシン (1.3 mg) を緩衝液中 36.5°C で 30 ~ 40 分間加熱した。硫酸プロタミンを 1 g 使用した場合はサーモリシンを 4.0 mg 用いた。緩衝液は 1 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.40) または NaB₄O₇-HCl 緩衝液 (pH 8.74 あるいは pH 8.93) を用いた。反応停止は、100°C, 5 分間加熱により行った。

3. HPLC 分析および中圧 HPLC によるペプチドの単離

溶出液には 0.06% TFA 溶液 (A 液) と 80% アセトニトリル/0.06% TFA 溶液 (B 液) を用いた。分析 HPLC ではカラムに YMC-Pack ODS AM (4.6 mm × 150 mm) を用い、B 液が 30 min で 1% から 30% となる直線的濃度勾配で溶出を行った。また、流速は 1.0 mL/分、溶出液のモニターは 220 nm で行った。中圧 HPLC はカ

ラムに Develosil ODS Lop カラム (30 mm × 280 mm) を用い、B 液が 220 分で 1% から 30% となる直線的濃度勾配で溶出を行った。また、流速は 3.0 mL/分、溶出液のモニターは 220 nm で行い、6 mL ごとに分画した。

4. イオン交換クロマトグラフィー

Sulphoxyethyl cellulose SE-53 [H⁺] (Whatman 社製) を充填したカラム (20 mm × 80 mm) を用いた。溶出には純水, 1M NaCl, 1.5M NaCl, 2M NaCl を用い、溶出液を 2 mL ごとに分画した。

5. ゲルろ過クロマトグラフィー

Sephadex G-25 (30 mm × 500 mm) カラムを用い、4 mL/分の流速で 5% 酢酸により溶出を行った。溶出液は 8 mL ごとに分画した。

6. 質量分析およびアミノ酸分析

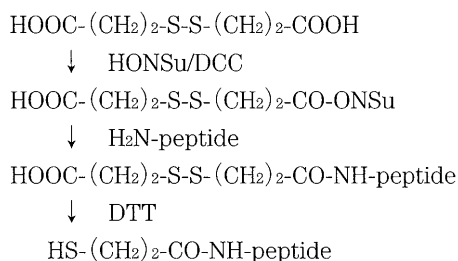
得られたペプチドの質量分析は TQS QUANTUM Discovery (Thermo 社製) あるいは Auto-Flex II (Bruker 社製) を用いた。いずれも標準的な測定プロトコルに従った。なお MALDI TOF-MS ではマトリックスとして α-cyano-4-hydroxy cinnamic acid (ナカライテスク社製) を用いた。またアミノ酸分析はペプチドを 6N HCl 中 110°C で 24 時間加熱後、アミノ酸自動分析装置 (Hitachi, L-8500 型) により行った。

7. 3,3'-Dithiodipropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester の合成

3,3'-Dithiodipropionic acid (1.049 g) および *N*-hydroxy succinimide (574.9 mg, 1 当量) を氷冷下 DMF 溶媒中に加え、攪拌した。そこに、*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (995.4 mg) を少量ずつ加えながら攪拌し、引き続き一晩攪拌した。吸引ろ過後、ろ液を濃縮し、2-propanol から再結晶を行い、3,3'-dithiodipropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (930 mg) を得た。

8. プロタミン消化断片の mercaptopropionyl 化

アミノ基への mercaptopropionyl 修飾による SH 基の導入は Scheme 1 に従った。すなわち、



Scheme 1. Synthesis of Mercaptopropionylpeptide

VSRRRRRRGRRRR (33.4 mg) に 3,3'-dithiodipropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (18 mg), triethylamine 8 μL (3 当量) を加え、DMF 溶媒中で 4 時間攪拌した。その後 DTT (15 mg) を加え、2 時間攪拌し、さらに DTT (15 mg) を加えて一晩攪拌をした。DTT (50 mg) をさらに加えて 1 時間後反応物を減圧下濃縮し、Develosil ODS Lop カラムにより精製を行った。

結 果

1. Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 中におけるサケプロタミンのサーモリシンによる加水分解

硫酸プロタミン (250 mg) をサーモリシン (1.3 mg) により、1mM CaCl₂ を含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4) 30 mL 中 36.5°C で 40 分間処理を行った。硫酸プロタミンは、Fig. 1 に示すようにヘテロ混合物であるため、HPLC 上では、14.8 ~ 15.6 分に 4 つのピークが確認される。処理後はそれらのピークは消失し、8.8 ~ 11.9 分に消化物と見られる 6 本以上のピークが確認された (Fig. 2)。

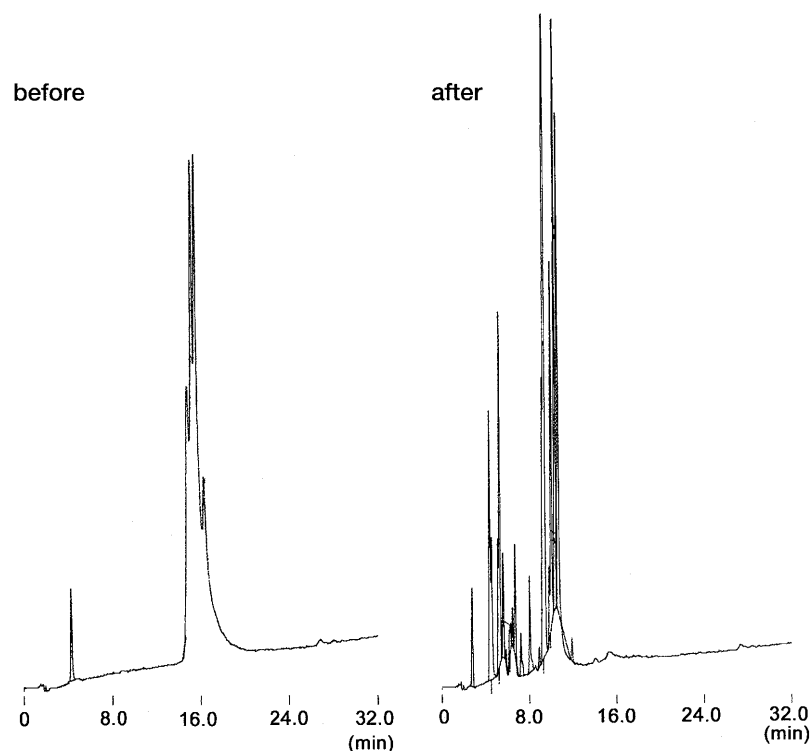


Fig. 2. HPLC Profiles of Protamine Sulfate before and after Thermolysin-digestion

Column: YMC-Pack ODS AM-302 (4.6 mm \times 150 mm) column. Elution: A linear gradient from 1%B to 30%B over 30 min (A: 0.06% TFA, B: 80% acetonitrile in 0.06% TFA). Flow rate: 1.0 mL/min. See experimental section for other conditions.

それらを Develosil ODS Lop カラムにより分画したところ, 3つの主要な画分 (**1a** ~ **1c**) を得た (Table 1). **1a** は MS 分析とアミノ酸分析の結果より, II (19 - 26)/III (19 - 26): VSRRRRRR と同定した. また, **1b** は II (11 - 18): VRRRRPRR, **1c** は I (11 - 18)/IV (10 - 17): IRRRRRPR と同定した. なお, これら画

分の凍結乾燥後の重量はそれぞれ 55.1 mg, 42.0 mg および 31.0 mg であり, 原料に用いたプロタミンに対する重量比はそれぞれ 22.0%, 16.8% および 12.4% であった.

溶出したその他の画分については質量分析により I (6 - 10)/II (6 - 10): SSSRP ($m/z = 533.55$: $[M+H]^+$), IV (18 - 24): VSRRRRRR

Table 1. Protamine Hydolysates by Thermolysin in Tris-HCl Buffer (pH 7.4)

Fr. No.	R_t ^{a)} (min)	Yield ^{b)} (mg)	ESI-MS (m/z)	Amino acid ratio ^{c)}					Identified sequence	
				Val	Ile	Ser	Arg	Pro		
1a	40-42	12.3	55.1	1142.12: $[M+H]^+$, 571.70: $[M+2H]^{2+}$	1.00	—	0.90	6.58	—	II (19-26)/ III (19-26): VSRRRRRR
1b	47-49	13.6	42.0	1152.14: $[M+H]^+$, 576.74: $[M+2H]^{2+}$	0.99	—	—	6.10	0.99	II (11-18): VRRRRPRR
1c	51-54	15.5	31.0	1166.11: $[M+H]^+$, 583.75: $[M+2H]^{2+}$	—	0.94	—	6.37	1.00	I (11-18)/ IV (10-17): IRRRRPR

a) Retention time on a column of YMC-Pack ODS AM-302 using a linear gradient from 1-30%B over 30 min at a flow rate of 1.0 mL/min. b) Starting from 100 mg of protamine sulfate. c) Amino acids were determined by amino acid analyzer after hydrolysis with 6N HCl at 110°C for 24 h.

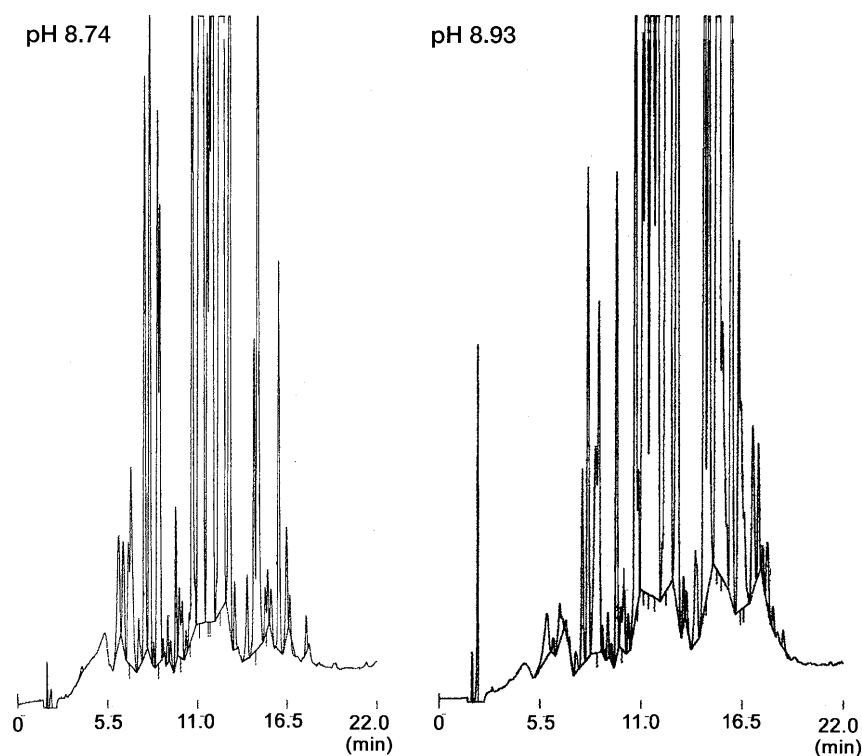


Fig. 3. HPLC Profiles of Protamine Sulfate after Thermolysin-digestion under Different pH-conditions. Column: YMC-Pack ODS AM-302 (4.6 mm × 150 mm) column. Elution: A linear gradient from 1%B to 20%B over 20 min (A: 0.06% TFA, B: 80% acetonitrile in 0.06% TFA). Flow rate: 1.0 mL/min. See experimental section for other conditions.

Table 2. Some Protamine Hydrolsates by Thermolysin in Tris-HCl Buffer (pH 8.74)

Fr. No.	$R_t^{a)}$ (min)	Yield ^{b)} (mg)	ESI-MS (m/z)	Amino acid ratio ^{c)}					Identified sequence	
				Val	Ser	Arg	Pro	Gly		
2a	47	13.2	12.8	1152.1: $[M+H]^+$, 576.8: $[M+2H]^{2+}$	0.62	0.90	7.03	1.31	—	II (11-18): VRRRRPRR
2b	51-57	15.1	95.2	1168.8: $[M+H]^+$, 583.7: $[M+2H]^{2+}$	0.95	0.93	12.2	—	1.82	I (11-18)/IV (10-17): IRRRRPR
				941.1: $[M+2H]^{2+}$, 628.0: $[M+3H]^{3+}$						II (19-32)/III (19-32): VSRRRRRRGGRRRR
2c	60-61	17.7	15.1	1194.9: $[M+2H]^{2+}$, 797.1: $[M+3H]^{3+}$	1.01	2.70	11.8	2.96	—	II (1-18): PRRRSSSRPVRRRRRPR
2d	63	18.0	5.9	1229.4: $[M+2H]^{2+}$, 820.0: $[M+3H]^{3+}$	1.03	1.88	12.6	2.93	—	III (1-18): PRRRSSSRPVRRRRRPR
2e	66-67	19.0	12.2	948.8: $[M+2H]^{2+}$, 712.0: $[M+3H]^{3+}$						unknown

a) Retention time on a column of YMC-Pack ODS AM-302 using a linear gradient from 1-30%B over 30 min at a flow rate of 1.0 mL/min. b) Starting from 100 mg of protamine sulfate. c) Amino acids were determined by amino acid analyzer after hydrolysis with 6N HCl at 110°C for 24 h.

($m/z = 985.91: [M+H]^+$, $493.72: [M+2H]^{2+}$) などに一致する擬分子イオンピークが確認されたが、目的とする II (19 - 32)/III (19 - 32): VSRRRRRRGGRRRR に由来する $m/z = 941.0: [M+2H]^{2+}$ は痕跡程度であった。

2. NaB₄O₇-HCl 緩衝液 (pH 8.74 あるいは pH 8.93) 中におけるサケプロタミンのサーモリシンによる加水分解

硫酸プロタミン (250 mg) をサーモリシン (1.3 mg) により, 1mM CaCl₂ を含む NaB₄O₇-HCl 緩衝液 (pH 8.74 あるいは pH 8.93) 30 mL 中で 36.5°C で 30 分間処理を行ったところ, pH 8.74 においては pH 7.40 の場合と同様に 15 分付近の原料のプロタミンと思われるピークはほぼ消失したのに対し, pH 8.93 では 15 分付近に未消化プロタミンとみられる多くのピークが観察された (Fig. 3).

pH 8.74 における消化物を Develosil カラムで分画した結果, 5 種の画分を得た (Table 2). pH 8.74 では pH 7.40 と同様に **2a** として II (11 - 18) が得られたのに加え, I (11 - 18)/IV (10 - 17) ($R_t = 15.1$ 分) が得られたが, 本研究で目的とする II (19 - 32)/III (19 - 32): VSRRRRRRGGRRRR ($R_t = 15.7$ 分, $m/z = 941.1:$

$[M+2H]^{2+}$) とは HPLC で保持時間が極めて接近して溶出するため **2b** とした。また, サケプロタミン II と III のアミノ末端部の 18 残基がそれぞれ **2c**, **2d** に得られた。**2e** は ESI-MS により, 1/4TFA や 1/3TFA の付加イオンピークが観察されることから分子量がおよそ 2843 の分子が含まれていると推定されるが, 配列の同定には至らなかった。

3. VSRRRRRRGGRRRR の単離 (1)

硫酸プロタミン (1 g) をサーモリシン (4 mg) により, 1mM CaCl₂ を含む NaB₄O₇-HCl 緩衝液 (pH 8.74 あるいは pH 8.93) 30 mL 中で 36.5°C, 30 分間処理を行った。反応混液のうち 3 mL (プロタミン 100 mg 相当) を Develosil カラムに付し, 分画を行った。さらに MALDI TOF-MS と HPLC 分析により分子量 1880 を含む画分を広く回収し, pH 8.74 から **3a**, pH 8.93 から **3b** を得た。次に, これらを Sulphoxyethyl cellulose SE-53 カラムに付し, 純水 20 mL, 1M NaCl 30 mL, 1.5M NaCl 30 mL および 2M NaCl 30 mL で溶出を行った。目的の分子量 1880 を含む画分は, 2M NaCl 溶出 20 mL 前後に得られた。これら画分を濃縮したものに, 脱塩のため純水 500 μ L と酢酸 5 mL を加えて攪拌した後, 10 分間放置し, 溶液を吸

引ろ過した。ろ液を減圧濃縮し、ゲルろ過クロマトグラフィーに付し、VSRRRRRRGRRRRを得た。各 pH により得られた VSRRRRRRGRRRR の凍結乾燥重量を Table 3 に示す。イオン交換クロマトグラフィーにおけるサブ画分 (2.0M NaCl 溶出 Fr. No. 8) からの精製を含め、pH 8.74 および pH 8.93 からそれぞれ 10.8 mg および 11.5 mg の VSRRRRRRGRRRR が得られた。

4. VSRRRRRRGRRRR の単離 (2)

先の VSRRRRRRGRRRR の単離 (1) において pH 8.74 で得られたプロタミン水解物を同様に 3 mL (プロタミン 100 mg 相当) を直接 Sulphoxyethyl cellulose SE-53 カラムに付し、純

水 20 mL, 1M NaCl 30 mL, 1.5M NaCl 30 mL および 2M NaCl 30 mL で溶出を行った。MALDI TOF-MS および HPLC 分析により分子量 1880 を含む画分 (2.0 M NaCl Fr. No. 7-11) を得た。減圧濃縮後さらに酢酸抽出し、Develosil カラムによって分離精製し、4 を得た。収量は 12.5 mg であった。Fig. 4 と Fig. 5 にそれぞれ 4 の HPLC プロフィールと MALDI TOF-MS の結果を示す。

5. プロタミン消化断片 VSRRRRRRGRRRR への SH 基導入

VSRRRRRRGRRRR (33.4 mg) に 3,3'-dithiodipropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (18 mg), triethylamine 8 μ L (3 当量) を

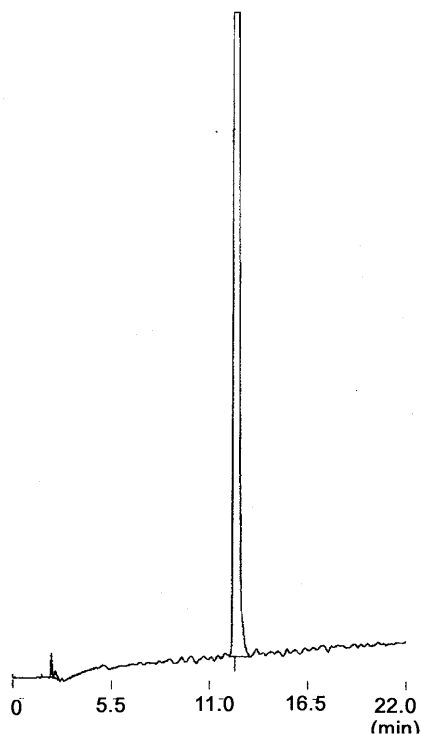


Fig. 4. HPLC Profile of Isolated VSRRRRRRGRRRR (4). Column: YMC-Pack ODS AM-302 (4.6 mm \times 150 mm) column. Elution: A linear gradient from 1%B to 20%B over 20 min (A: 0.06% TFA, B: 80% acetonitrile in 0.06% TFA). Flow rate: 1.0 mL/min. See experimental section for other conditions.

Table 3. Isolation of VSRRRRRRGRRRR by Combined Liquid Chromatography

pH	Step 1. Develosil Fr. No.	Step 2 Ion exchange Fr. No.	Step 3. Gel filtration Fr. No.	Yield ^{a)} (mg)
8.74	51-55 (3a)	2.0M elution: 8 ^{b)}	10-13	3.2 Total:
		2.0M elution: 9-12	11-16	7.6 10.8
8.93	53-61 (3b)	2.0M elution: 8 ^{b)}	14-19	2.7 Total:
		2.0M elution: 9-11	13-18	8.8 11.5

^{a)} Starting from 100 mg of protamine sulfate. ^{b)} This fraction contained desired peptide with lower purity (<90%).

Table 4. Isolation of VSRRRRRRGRRRR by Combined Liquid Chromatography

pH	Step 1. Ion exchange Fr. No.	Step 2 Develosil Fr. No.	Yield ^{a)} (mg)
8.74	2.0M elution: 7-11	53-56 (4)	12.5 mg

^{a)} Starting from 100 mg of protamine sulfate.

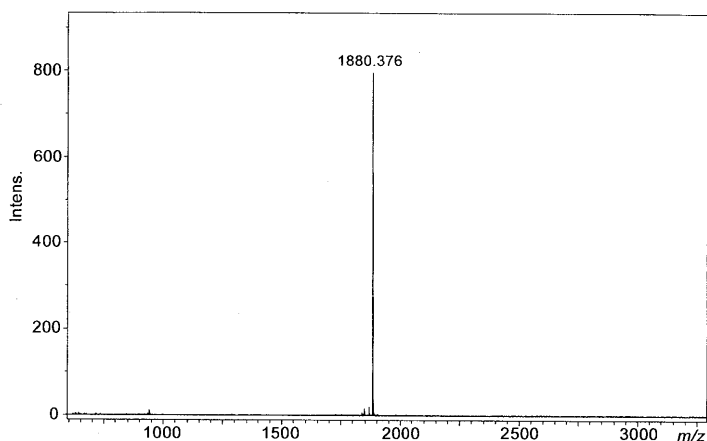


Fig. 5. MALDI TOF-MS Spectrum of Isolated VSRRRRRRGRRRR (4).

加え、DMF 溶媒中で 4 時間攪拌した。その後 DTT 還元した。反応物を Develosil カラムに付し、分取して得た **5** を濃縮し、凍結乾燥し目的とするメルカプトペプチド誘導体 ($R_t = 16.5$ 分, $m/z = 1969.042$ ($[M+H]^+$), 10.6 mg, 収率 30.3%) を得た (Fig. 6)。得られたペプチドに

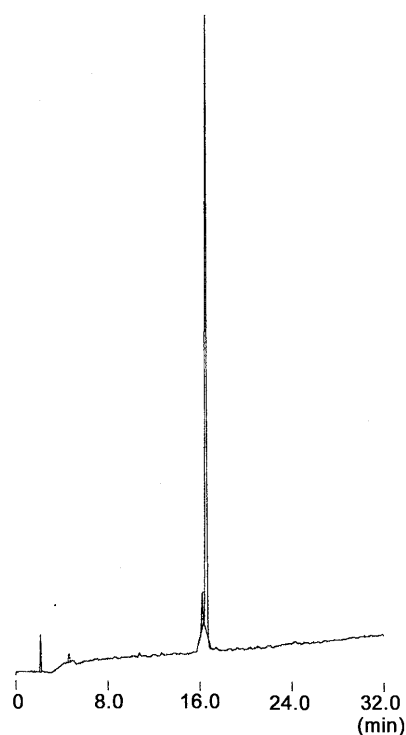


Fig. 6. HPLC Profile of Purified Mercaptopropionyl Peptide **5**.

Column: YMC-Pack ODS AM-302 (4.6 mm × 150 mm) column. Elution: A linear gradient from 1%B to 30%B over 30 min (A: 0.06% TFA, B: 80% acetonitrile in 0.06% TFA). Flow rate: 1.0 mL/min. See experimental section for other conditions.

SH 基が導入されたことを確認するため、H-Cys (Npys)-OH を水溶液中で反応させたところ、14.4 分に disulfide に由来する新しいピークが観察された。Develosil カラムによる精製では遅い溶出位置 (Fr. No. 82-85) にマイナーピークが見られたため回収した (6.6 mg)。この画分は MALDI TOF-MS で主な擬分子イオンピークとして $m/z = 2056.049$ が観察され、mercaptopropionyl 基が 2 つ導入された分子量と一致した。

考 察

Yang らの報告によれば VSRRRRRRGGRRRR は、ヘパリンの中和作用のほか、¹¹⁻¹⁴ 細胞内移行性が認められ、細胞毒性も極めて低い。^{6,10-14} さらには細胞膜透過性の低い、細胞障害性タンパク質の gelonin¹⁵ を VSRRRRRRGGRRRR と結合させると、結腸腺癌細胞 (CT-26) に対して殺細胞効果や腫瘍形成抑制などの効果が著しく高まる。¹⁴ このように VSRRRRRRGGRRRR は細胞内移行性キャリアとして有用であると考えられる。本研究では VSRRRRRRGGRRRR を安価に、しかも容易に得る方法としてサケプロタミンからの調製を検討した。Yang らの報告⁷ によると、20 mM CaCl₂ 含有 PBS を緩衝液として用い、室温で 30 分間のサーモリシン処理することによってサケプロタミンの加水分解を行い、ヘパリンカラムにより単離を行っているが詳細は不明である。本研究ではまず、サーモリシン消化の標準的な条件と考えられる 1 mM CaCl₂ を含む 50 mM Tris-



Fig. 7. Major Cleavage Sites of Salmon Protamine Sulfate by Thermolysin.

All arrows represent cleavage site at pH 7.40. Thick arrow represents cleavage site at high pH (8.74 or 8.93).

HCl 緩衝液 (pH 7.40) 中 36.5°C で処理を行った。本条件では 3 つの主要な画分 (**1a** - **1c**) を得たものの、目的とする VSRRRRRRGRRRR に由来する分子イオンピーク $m/z = 941.0$: $[M+2H]^{2+}$ は痕跡程度しか認められなかった。また、その他の観察された擬分子イオンピークの解析から、サケプロタミンのサーモリシンによる切断部位は Fig. 7 に示すように予想される。すなわち、Pro-Ile 間, Pro-Val 間, Arg-Val 間, Arg-Ile 間, Arg-Gly 間あるいは Arg-Ser 間などが主な切断部位である。サーモリシンは一般に Leu や Val などの疎水性の高いアミノ酸残基に特異性があると言われているが、Ser 残基や Gly 残基などのアミノ基側でも切断されることが明らかとなった。Moriyama らはサーモリシンが Leu 残基や Val 残基などと比較すると、活性は低いものの Ser 残基や Gly 残基付近でも加水分解できることを報告しており、¹⁶⁾ 本条件では Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.40) がサーモリシンの至適 pH の範囲にあり、酵素活性が高いために Ser 残基や Gly 残基付近でも加水分解されたと考えられる。

以上のように中性付近の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.40) を用いた場合、目的とする VSRRRRRRGRRRR が得られなかったことから、サーモリシンの至適 pH 範囲 (pH 6.5 ~ 8.5) より高い pH である $\text{NaB}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 緩衝液 (pH 8.74/8.93) 中での消化を検討した。

pH 8.93 では未消化のプロタミンが認められ、pH 8.74 では 36.5°C, 30 分で未消化物は認められなかった。得られた消化断片から、 $\text{NaB}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 緩衝液において予想される切断位置を Fig. 7 に示した。前述の様に中性の Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.40) では疎水性の低い Ser や Gly 残基での切断が見られたが、 $\text{NaB}_4\text{O}_7\text{-HCl}$ 緩衝液では Ile あるいは Val 残基部のみで切断が見られた。硫酸プロタミン 250 mg から出発してプロタミンの N 末端部の 18 残基 (Arg 残基数 11 あるいは 12) に相当する画分 **2c** と **2d** をそれぞれ 15.1 mg, 5.9 mg 得た。**2b** は IRRRRRPR ($R_t = 15.1$ 分, $m/z = 1168.8$ ($[M+H]^+$), 583.7 ($[M+2H]^{2+}$) と VSRRRRRRGRRRR ($R_t = 15.7$ 分, $m/z = 941.1$ ($[M+2H]^{2+}$) の混合物として

得られた。これらのペプチドは HPLC において極めて接近した保持時間有しており、Develosil カラムではこれらを分離することは困難であった。さらに **2b** から Sulphoxyethyl cellulose SE-53 樹脂を用いたイオン交換クロマトグラフィーによりそれぞれのペプチドの分離を試みた。2M NaCl 溶出の比較的塩濃度の高い条件で目的とする VSRRRRRRGRRRR が溶出した。酢酸抽出により大半の塩を除き、さらにゲルろ過クロマトグラフィーにより精製を行った。以上の精製手順により、硫酸プロタミン 100 mg から 10% 程度の収率で VSRRRRRRGRRRR を得ることができた。

以上の方法で目的とする VSRRRRRRGRRRR は得られたものの、精製行程が長く、決してその方法は簡便とはいえない。精製を容易にするため、イオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーの順に組み合わせる方法を検討した。反応混液 3 mL (プロタミン 100 mg 相当) を直接 Sulphoxyethyl cellulose SE-53 カラムに付し、前述と同様の操作で溶出を行ったが、前述の通りペプチドの溶出が NaCl 濃度の高い範囲にあるため特に夾雑物の影響はなく、MALDI TOF-MS および HPLC 分析により分子量 1880 を含む 2.0 M NaCl 溶出画分 (Fr. No. 7-11) を得た。減圧濃縮後さらに酢酸抽出し、Develosil カラム (1-30%B/220 分) によって分離精製を行い、およそ 12 mg の VSRRRRRRGRRRR を得た。これらの結果から、精製にはイオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーの順で組み合わせの方が優れていることが判明し、操作の簡便化を図ることができた。

次に VSRRRRRRGRRRR をキャリアとして利用するために必要な結合手の導入を行った。結合手として利用できる官能基は $-\text{NH}_2$ 基, $-\text{COOH}$ 基, $-\text{SH}$ 基, Ser や Thr を含む場合は $-\text{OH}$ 基など考えられるが、本研究では mercaptopropionylation による N 末端アミノ基への SH 基の導入を試みた。VSRRRRRRGRRRR に DMF 中で 3,3'-dithiodipropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester を反応させ、次いで還元して、目的とするメルカプトペプチド誘導体を収率 30.3% で得た。3,3'-dithiodipropionic acid *N*-hydroxysuccinimide ester

が反応し, mercaptopropionyl 基が2つ導入されたものも MALDI TOF-MS 分析により確認された。

以上, サケプロタミンのサーモリシン消化混合物から目的とする VSRRRRRRGRRRR (II 19-32/III 19-32) をイオン交換クロマトグラフィーと逆相クロマトグラフィーの順に組み合わせることで簡便に精製し, 10% 程度ではあるが化学合成する場合に予想される収率と比べ満足しうる収率で得ることができた。また, VSRRRRRRGRRRR のアミノ基へのメルカプトプロピオン酸の導入を試み, 収率良くモノチオプロピオニル誘導体を得ることができた。本化合物は細胞内への導入のためのキャリアとしての有用性が期待される。また, プロタミンの中性緩衝液中での消化で得られる3種のオクタペプチド (**1a**, **1b** および **1c**) あるいは塩基性緩衝液中で得られるオクタデカペプチド (**2c** および **2d**) の細胞膜透過性にも興味を持たれる。

謝辞

硫酸プロタミンを快くご提供していただきました大和化成 釜石工場 正木征史氏に厚く感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Amino acid are L-configuration unless otherwise noted and were showed one or 3 letters. Other abbreviations used are: DMF: *N,N*-dimethylformamide, DTT: dithiothreitol, TFA: trifluoroacetic acid, MS: mass spectrometry, HPLC: high performance liquid chromatography, MALDI: matrix-assisted laser desorption/ionization, TOF-MS: time-of-flight mass spectrometry. Fraction number: Fr. No.
- 2) Futaki S., Goto S., Sugiura Y., *J. Mol. Recognit.*, **16**, 260-264 (2003).
- 3) Maiolo J. R., Ferrer M., Ottinger E. A., *Biochem. Biophys. Acta*, **1712**, 161-172 (2005).
- 4) Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 2437-2443 (2002).
- 5) Futaki S., *Gendai Kagaku*, **401**, 32-36 (2004).
- 6) Byun Y., Sing V. K., Yang V. C., *Thromb. Res.*, **94**, 53-61 (1999).
- 7) Chang L. C., Lee H. F., Yang Z. Q., Yang V. C., *AAPS PharmSci.*, **3**, E17 (2001).
- 8) Chang L. C., Liang J. F., Lee L. M., Yang V. C., *AAPS PharmSci.*, **3**, E18 (2001).
- 9) Lee L. M., Chang L. C., Wroblewski S., Wakefield T. W., Yang V. C., *AAPS Pharm. Sci.*, **3**, E19 (2001).
- 10) Tsui B., Singh V. J., Liang J. F., Yang V. C., *Thromb. Res.*, **101**, 417-420 (2001).
- 11) Liang J. F., Zhen L., Chang L. C., Yang V. C., *Biochem (Mosc.)*, **68**, 116-120 (2003).
- 12) Park Y. J., Liang J. F., Ko K. S., Kim S. W., Yang V. C., *Gene Med.*, **5**, 700-711 (2003).
- 13) Park Y. J., Chang L. -L., Liang J. F., Moon, C., Chung C. -P., Yang, V. C., *FASEB J.*, **19**, 1555-1557 (2005).
- 14) Liang J. F., Yang V. C., Vaynshteyn Y., *Biochim. Biophys. Acta*, **336**, 653-659 (2005).
- 15) Stirpe F, Olsnes S, Pihl A., *J. Biol. Chem.*, **255**, 6947-6953 (1980).
- 16) Morihara K., Tsuzuki H., *Eur. J. Biochem.*, **15**, 374-380 (1970).