

原 著

オリゴアルギニンペプチドの細胞内移行における Trp 残基導入の影響

小野寺智美, 佐藤 寛之, 安保 明博

Effect of substituting tryptophan for arginine on the cellular uptake of oligo-arginine peptides

Satomi ONODERA, Hiroyuki SATO, and Akihiro AMBO

(Received November 20, 2014)

Oligo-arginine peptides are short cationic peptides capable of traversing the plasma membranes of cells. In order to explore the effective substitutes Trp for Arg on the cellular uptake of oligo-arginine peptides, we designed and synthesized a series of Trp-containing analogues. All synthetic peptides did not show cytotoxicity on Jurkat cells at final concentration of 10  $\mu$ M. [Trp<sup>5</sup>]- and [Trp<sup>6</sup>] analogues exhibited moderate cellular uptake (about 75% of octaarginine, R8C), and [Trp<sup>68</sup>] analogue exhibited similar or even slightly increased cellular uptake as compared to R8C. The other synthetic peptides were showed poor cellular uptake (less than 50%). A clear relationship was not observed between hydrophobicity and cellular uptake of the synthetic peptides. These results indicated that oligo-arginine peptide was relatively tolerant to Trp insertion in the middle position but not in the N-terminal position.

**Key words** — oligo-arginine peptide; cell penetrating peptide; antimicrobial peptide; tryptophan

緒 論

近年, DNA や RNA あるいはタンパク質などを細胞内に送達するためのベクターが種々開発されている.<sup>1)</sup> その中でも非ウイルス性ベクターとして, 細胞膜透過性ペプチド (CPP) が注目されている. 一般に CPP は細胞に対する毒性が比較的 low, <sup>2)</sup> 細胞内への移行効率が高いことから, ドラッグデリバリーシステム応用への期待が高い.<sup>3,4)</sup> CPP の配

列は相同性に乏しいが, Table 1 に示す Tat ペプチドや penetratin のように 6~11 個の塩基性アミノ酸 (Arg, Lys) 残基を含む. また, Arg 残基のみからなる R8 などの細胞内移行性から, CPP の効率的な細胞内移行性に Arg 残基の寄与が大きいと示唆されている.<sup>5,9)</sup> さらに, 塩基性アミノ酸残基だけでなく疎水性アミノ酸残基も細胞膜の脂質二重層との相互作用に重要な役割を果たし, 細胞内移行性を高めるうえで重要であると考えられている.<sup>10)</sup> 特に,

Table 1. Amino acid sequences of cell penetrating peptides (CPP) and Trp-containing cationic antimicrobial peptides (CAP)

Peptide	Origin	Sequence	R/K	W
CPPs				
Tat peptide	HIV-1 Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	8	0
Penetratin	Antenapedia (43-58)	RQIKIWFQNRRMKWKK	7	2
Octaarginine	Synthetic peptide	RRRRRRRR	8	0
CAPs				
Pep-1-K	HIV-reverse transcriptase/SV40 antigen	KKTWKTKWTKWSQPKKKRKV	9	5
Iztli peptide 1	derived from alpha-pheromone ( <i>S. cerevisiae</i> )	KFLNRFHWLQLKPGQPMY	3	2
(WR)4-NH2	Synthetic peptide	WRWRWRWR	4	4
I4WL5W	L-K6 analogue derived from temporin-1CEb ( <i>R. chensinensis</i> )	IKKWWSKIKLLK	6	2

Table 2. Sequences of synthetic peptides in the present study

No.	Trp Position	Sequence
1	1	FITC - Gab - <b>W</b> RRRRRRRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
2	2	FITC - Gab - R <b>W</b> RRRRRRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
3	3	FITC - Gab - RR <b>W</b> RRRRRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
4	4	FITC - Gab - RRR <b>W</b> RRRRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
5	5	FITC - Gab - RRRR <b>W</b> RRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
6	6	FITC - Gab - RRRRR <b>W</b> RRR - Cys - NH <sub>2</sub>
7	7	FITC - Gab - RRRRRR <b>W</b> RR - Cys - NH <sub>2</sub>
8	8	FITC - Gab - RRRRRRRR <b>W</b> R - Cys - NH <sub>2</sub>
9	9	FITC - Gab - RRRRRRRRR <b>W</b> - Cys - NH <sub>2</sub>
10	1,5	FITC - Gab - <b>W</b> RRRWRRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
11	1,8	FITC - Gab - <b>W</b> RRRRRRWR - Cys - NH <sub>2</sub>
12	2,6	FITC - Gab - R <b>W</b> RRRWRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
13	2,9	FITC - Gab - R <b>W</b> RRRRRRW - Cys - NH <sub>2</sub>
14	5,8	FITC - Gab - RRRR <b>W</b> RRWR - Cys - NH <sub>2</sub>
15	6,9	FITC - Gab - RRRRR <b>W</b> RRW - Cys - NH <sub>2</sub>
16	1,5,8	FITC - Gab - <b>W</b> RRRWRRRR - Cys - NH <sub>2</sub>
17	2,6,9	FITC - Gab - R <b>W</b> RRRWRRW - Cys - NH <sub>2</sub>

芳香族アミノ酸である Trp によって CPP の細胞内移行性が変化すると報告がある。例えば, RRWRRWR (R6W3) は RRRRRRRR (R9) よりも細胞膜への結合が弱いにも関わらず, 同等の細胞内移行性を有している。<sup>11-14)</sup> RRRRRR (R7) の C 末端に Trp 残基を 1 つ付加した RRRRRRW (R7W) では, 細胞内移行性が向上するだけでなく, 4°C において ATP 非依存的な細胞内移行性も向上する。<sup>15)</sup> その他のポリアルギニンペプチドにおいても Trp 残基数を増加させるとリン脂質との相互作用に影響を与えず, 細胞膜移行性が向上することなどが報告されている。<sup>16)</sup> このように Trp 残基が CPP の細胞内移行におけるドライビングフォースとして関与することが示唆されている。

一方, Table 1 に示す Pepl-K,<sup>17)</sup> lztil peptide,<sup>18)</sup> (RW)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub><sup>19)</sup> および L-K6 誘導体<sup>20)</sup> などのように塩基性アミノ酸や Trp 残基を含み CPP と構造上類似している抗菌ペプチド (CAP) が種々報告されている。これらのペプチドは, “barrel-stave” 機構, “carpet” 機構あるいは “toroidal-pore” 機構により<sup>21)</sup> 細胞膜破壊を起こし, 抗菌活性を示すと考えられている。特に Trp 残基は, 細胞膜破壊のメカニズムにおいてペプチドを活性発現に適した構造に保持し, 疎水性クラスターの形成を促すなど重要な役割を果たしていると考えられる。<sup>22)</sup>

以上のように Trp 残基導入は CPP の細胞内移行

性に有利に働くと考えられるが, その反面 Rydberg らの報告にあるように単に導入しただけでは細胞傷害性が高まったり,<sup>16)</sup> 抗菌ペプチドのように細胞膜破壊を引き起こしたりする。したがって, Trp を含有する CPP をデザインするうえで, CPP と CAP の境界を見極めることは重要と考えられる。そこで本研究では, CPP において細胞内移行性を向上させるため効果的な Trp 残基の導入位置および個数を探る目的で, Table 2 に示す 17 種の Trp 含有オリゴアルギニンペプチドを合成し, その細胞内移行性を検討した。なお, 配列中にはカーゴ連結が可能となるように Cys 残基を結合手として導入した。

## 実験材料および方法

### 1. 保護ペプチド固相樹脂の構築

保護ペプチドの樹脂は, 多種品目自動ペプチド合成装置 (PSSM8, Shimadzu) を用い, 一般的な Fmoc 固相合成法により合成した。Fmoc-NH SAL Resin (0.65 mmol/g, 渡辺化学) を出発樹脂として, ペプチド伸長反応を行った<sup>23)</sup>。なお, 脱 Fmoc 化は piperidine/DBU/DMF (2/2/96) を用い, 縮合反応は樹脂に対して 4 当量の Fmoc-アミノ酸を HBTU/HOBt および 8 等量の DIPEA 共存下 30 分間攪拌して行った。保護アミノ酸には, Fmoc-Cys (Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-

OH および Fmoc-Gab-OH を用いた。

## 2. ペプチド N 末端部の蛍光標識化

fluorescein isothiocyanate (FITC) 化は、FITC を固相樹脂 ( $\text{NH}_2$ -) に対して 2 当量、DIPEA (2 当量) 存在下 DMF 中で 1 時間反応させた。

## 3. 保護ペプチド樹脂からのペプチド脱離と精製

ペプチド樹脂からの切断と側鎖の脱保護の操作として、ペプチド 1-9 においては保護ペプチド樹脂 (約 160 mg) を 5% phenol, 5% 1,2-ethanedithiol 含有 TFA 溶液 (5 ml) 中、室温 40 分間攪拌した。ペプチド 10-17 では保護ペプチド樹脂 (約 160 mg) を 5% phenol, 5% Triisopropylsilane 含有 TFA 溶液 (5 ml) 中、室温 40 分間攪拌した。攪拌後反応混液をろ過し、樹脂を TFA にて洗浄した。ろ液と TFA 洗浄液を合わせ減圧濃縮したのち、エーテルを加え生じた沈殿を乾燥させ、粗ペプチドを得た。

ペプチドは Develosil Lop ODS 24S カラム (24×360 mm, 野村化学) を用い、A 液 (0.6% TFA) および B 液 (0.06% TFA 含有 80% アセトニトリル) を移動相として、流速 3 mL/min, 220 分間で 15% B 液から 45% B 液となる直線的な濃度勾配により溶出させた。

分析 HPLC により目的とするペプチドが純度 95% 以上含む画分をまとめ、減圧濃縮後、凍結乾燥し、精製ペプチドを得た。また、精製度が低いペプチドは適宜 Cosmosil 5C18AR-II カラム (10×250 mm, Nacalai Tesque) を用いて 20% B 液から 40% B 液になるような条件で再度精製を行った。

## 4. 合成ペプチドの分析

HPLC の保持時間は Cosmosil 5C18AR-II カラム (2.0×150 mm, Nacalai Tesque) を用い、流速 0.4 mL/min, 40 分間で直線的に 10% B 液から 50% B 液となる条件で溶出し、220 nm でモニターした。MALDI TOF-MS は Autoflex II (Bruker Daltonics) により、マトリックスに  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸を用いて標準的プロトコルに従って測定した。

## 5. 細胞培養

ヒト T 細胞性白血病細胞株 Jurkat 細胞は、東北大学加齢医学研究所細胞資源センターより供給されたものを用いた。細胞は、10% 非働化牛胎児血清 (FBS) を含む RPMI-1640 (日水製薬) 中で 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  条件下で培養した。

## 6. 細胞生存率の測定

Jurkat 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を 96 ウェルプレート中、ペプチド 10  $\mu\text{M}$  存在下、10% FBS を含む

RPMI-1640 で 24 時間培養後、trypan blue 排除試験により細胞の生存率を求めた。

## 7. 細胞内移行性の測定

Jurkat 細胞 ( $1 \times 10^5$  個) を 24 ウェルプレート中の 10% FBS を含む RPMI-1640 で 30 分以上プレインキュベートした後、ペプチドを最終濃度 5  $\mu\text{M}$  になるように加え、60 分間 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  で培養した。培養後、細胞を回収し、PBS (-) で 2 回洗浄した。次いで、5% トリプシンにより 37°C, 10 分間処理し、PBS (-) で 2 回洗浄した。細胞を FACS チューブ中で懸濁させ、水中に保存し、FACScalibur (Becton Dickinson) で測定した。細胞 1 個あたりの平均蛍光強度は Cell Quest Pro (Becton Dickinson) を用いて算出した。なお、細胞内移行性の指標は、陽性コントロールである R8C の相対蛍光強度を 100% とし、その他ペプチドにおける蛍光強度% で表した。

## 8. ペプチドの疎水性度およびヘリカルホイール表示

ペプチドの疎水性度の指標として以下の理論値を計算した。Grand Average hydropathy value (GRAVY) は Kyte と Doolittle のアミノ酸疎水性インデックスから計算し、<sup>24)</sup> Wimley-White whole-residue hydrophobicity scale である Interface Scale  $\Delta G_{\text{wif}}$  (kcal/mol) は、個々のアミノ酸と  $\text{H}_2\text{O}/\text{POCP}$  との自由エネルギーの実験値の総和から算出した。<sup>25,26)</sup> また、アミノ酸配列部分がヘリックス構造をとると仮定した場合のヘリカルホイールを “Helical Wheel Projections”<sup>27)</sup> により作図し、同時に疎水性モーメントを算出した。

## 結 果

### 1. Trp 含有オリゴアルギニン誘導体の合成

自動合成装置によりオリゴアルギニンペプチドを樹脂上に構築し、その N 末端に FITC を導入した。ペプチド樹脂を 5% phenol/TFA (EDT あるいは TIS を含む) で処理し、ペプチドの精製を行い、純度 95% 以上のペプチドを得た。HPLC の保持時間、質量分析値、収率を Table 3 に示した。すべてのペプチドは、TOF-MS において理論値  $[\text{M}+\text{H}]^+$  とよく一致する  $m/z$  に擬分子イオンピークを認めた。Trp を 1 残基のみ含むペプチドは比較的良好な収率で得ることができたが、Trp 残基を 2, 3 個含むペプチドでは低収率であった。これ

Table 3. Physicochemical data and theoretical hydrophobicity of synthetic Trp-containing oligo-arginine

No.	Trp Position	HPLC tR(min) <sup>a</sup>	Yield (%) <sup>b</sup>	MALDI-TOF MS, m/z		Hydrophobicity <sup>d</sup>		Helical HM <sup>d</sup>	
				Found.	Calcd. <sup>c</sup>	GRAVY	$\Delta$ Gwif(kcal/mol)	value	angle(°)
1	1	31.05	37.1	2029.985	2030.384	-3.44	4.39	1.75	337.1
2	2	27.72	38.0	2030.002					
3	3	26.09	44.6	2030.102					
4	4	24.87	10.6	2030.006					
5	5	25.27	14.5	2030.074					
6	6	26.06	34.2	2030.186					
7	7	24.31	8.0	2030.972					
8	8	25.84	9.0	2030.952					
9	9	26.96	36.1	2031.155					
10	1,5	30.72	4.7	2059.769	2059.393	-3.08	1.73	3.79	15.8
11	1,8	30.97	4.7	2060.284					
12	2,6	29.08	8.5	2060.972					
13	2,9	28.99	6.3	2060.951					
14	5,8	29.00	7.5	2060.190					
15	6,9	29.08	8.9	2059.989					
16	1,5,8	34.11	1.2	2089.850	2089.419	-2.72	-0.93	6.15	1.1
17	2,6,9	32.71	2.5	2090.026				6.99	116.2

a) Retention time on a column of Cosmosil 5C18AR-II using a linear gradient from 10-50%B over 40 min at a flow rate of 0.4 mL/min. b) Yields are calculated on the basis of starting resin. c) for  $[M+H]^+$  d) Hydrophobicity scales and helical hydrophobic moments of peptide segment. See experimental section for detail.

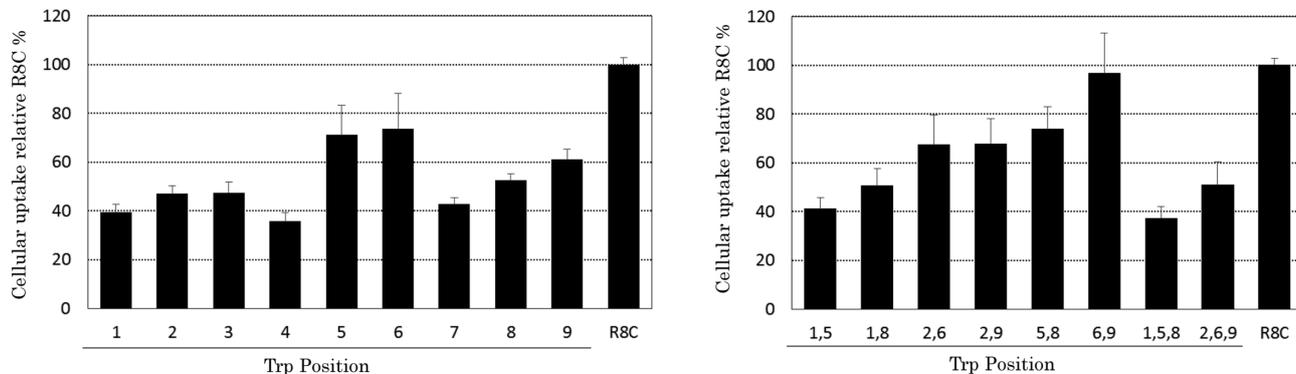


Fig. 1. Cellular uptake of Trp-containing oligo-arginine and octaarginine (R8C) in Jurkat cells.

Jurkat cells were incubated with 5  $\mu$ M peptides at 37°C for 1 h. The cells were washed twice with 500  $\mu$ l PBS, trypsinized at 37°C for 10 min, suspended in 500  $\mu$ l PBS, and then subjected to flow cytometry. The result is expressed as means  $\pm$  S.E. (n>6).

は TFA による樹脂からの脱離条件において Trp の分解が起こることによると考えられる。

## 2. Trp 含有オリゴアルギニンの細胞傷害性

Jurkat 細胞に合成ペプチド (終濃度 10  $\mu$ M) を添加し, 24 時間培養したのちの細胞生存率を trypan blue 排除試験によって評価した. 未処理の細胞が 95.4%であったのに対して, 合成ペプチド 1-17 では 94.0%~95.7%の生存率を示した. また, 顕微鏡下, 細胞の形状などに異常は認められなかった.

## 3. Trp 含有オリゴアルギニンの細胞内移行性

Jurkat 細胞に合成したペプチド (終濃度 5  $\mu$ M) を添加し, 60 分間培養した. 細胞表面に結合し, 細胞内に取り込まれていないペプチドをトリプシンにより消化し, 洗浄除去したのちフローサイトメーターにより細胞内に残存する蛍光強度を測定した. 合成ペプチドの基となるオクタアルギニンペプチド (RRRRRRRRC, R8C) の相対蛍光強度を 100%とし, 合成ペプチドの蛍光強度%を求め, 細

胞内移行能とした (Fig. 1). オクタアルギニン配列中に Trp を導入したペプチド (1-9) において, 導入位置が 1 位から 4 位および 7 位では R8C に対して 40% と細胞内移行性が顕著に低下した. しかし, 5 位と 6 位への導入ではおよそ 75% 程度と比較的細胞内移行性を保持していた. さらに, 2 つの Trp 残基を導入しアルギニンが 7 個となったペプチドでは, 6, 9 位導入体 (15) が R8C に匹敵する, 今回合成したペプチド中最も高い細胞内移行性を示した. また, 2, 6 位, 2, 9 位, 5, 8 位への導入体では 70% 程度であった. その他の 2 残基導入体 (10, 11) および 3 残基導入ヘキサアルギニンペプチド

(16, 17) はいずれも 50% 以下まで細胞内移行性が著しく低下した.

### 考 察

Tat ペプチドをはじめとし, 様々な CPP が報告されている. 塩基性アミノ酸を多く含む点で共通性を持ち, 細胞内へはマクロピノサイトーシスに代表されるエンドサイトーシスや直接的細胞膜透過のような非エンドサイトーシス機構によって移行すると考えられている.<sup>28)</sup> また, DNA やタンパク質などの巨大分子や細胞膜を通過しにくいような

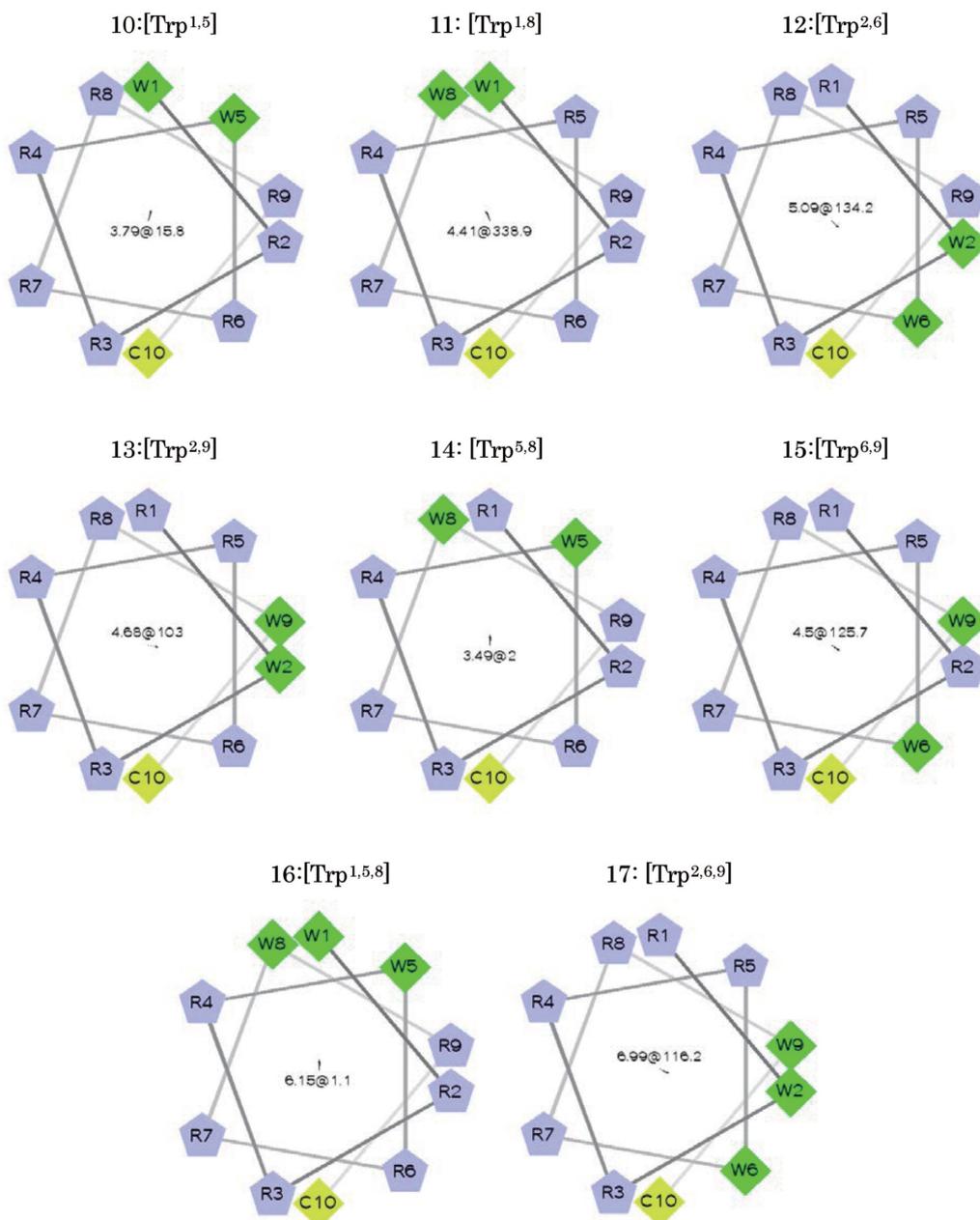


Fig. 2. Proposed helical wheel projection of synthetic peptides.

Arg : pentagon, Trp : green diamond, and Cys : yellow diamond. The helical hydrophobic moment showed in the center of wheel.

親水性分子を結合させると細胞内に送達できることから、ドラッグデリバリーシステム応用への期待が高い。CPP キャリアとして望ましい性質は細胞内移行効率がよく、細胞傷害性が低いこと、さらには細胞あるいは組織への標的性を持つことである。本研究では CPP に Trp 残基を導入すると細胞内移行性が向上するとの報告<sup>11-16)</sup>を基に、Table 2 にまとめた 17 種のペプチドをデザイン、合成し、その細胞傷害性や細胞内移行性を検討した。

オクタアルギニンペプチド (R8C) の 8 個の Arg 残基間に Trp 残基を 1 つ導入したペプチド 1-9 は予想に反していずれも細胞内移行性が低下した。しかし、5 位および 6 位への導入体では低下の度合いがおおよそ 25% 程度と小さく、Trp 導入位置としてはこれらの残基位置が最も適しており、その他部位では不適であることが判明した。Maiolo らは、ヘプタアルギニン RRRRRR (R7) 配列の C 末端側に Trp を導入した RRRRRRW 配列が R7 よりも優れた細胞内移行性を示すと報告しているが、同様な配列をもつペプチド 9 では細胞内移行性が R8C の 60% に低下した。このことはアルギニン残基数の違いや、ペプチド 9 の C 末端部に Cys 残基を配置してあること、あるいは細胞内移行性の検討に用いられる細胞などの実験条件の相違などに起因すると思われる。

オリゴアルギニンは一般に中性溶液中では特定の二次構造をとらないと考えられている。しかし、リン脂質の人工膜との相互作用によって  $\alpha$ -ヘリックス構造をとることが示唆されている。また、RRWWRRWR 配列を持つペプチドでは中性溶液中において  $\alpha$ -ヘリックス構造をとることが示唆されており、この性質が細胞内移行性に関与するとみられている。<sup>11)</sup> そこで、両親媒性ヘリックスを想定して、Fig. 2 に示すヘリカルホイールを参考にヘプタアルギニンペプチド (R7) 中の任意の 2 カ所に空間的に隣接するように Trp を導入した配列をもつペプチド 10-15 をデザインした。

1 位に Trp を導入したペプチド 10, 11 ではペプチド 1 と同様に細胞内移行性が顕著に低下した。さらにペプチド 12-14 でも細胞内移行性は R8C の 70% 程度であった。一般にオリゴアルギニンペプチドでは Arg 残基数と細胞内移行性に相関性があり、Arg 残基数が多いほど高い細胞内移行性を示す。<sup>29)</sup> すなわち R7 の細胞内移行性は R8 よりも低下するのは妥当であり、ペプチド 10-14 での導入位

置では Trp 残基がそれを補うことができなかったものとみられる。一方、ペプチド 15 では R8C に匹敵する細胞内移行性を示したことから、Arg 残基数減少による細胞膜透過性低下を 2 つの Trp 残基が補完した。ペプチド 6 で明らかになったように Trp 残基導入に対して 6 位は寛容であり、さらに 9 位の Trp 導入によって協調的に働いていた結果であると予想される。ペプチド 16, 17 は 3 残基の Trp を含むヘキサアルギニンであるが、今回合成した構造では R8C の 50% 以下の細胞内移行性を示すのみであった。

ポリアルギニンペプチドに Trp を導入することによって細胞内移行性が変化することが明らかとなったが、これらの変化と Table 2 に示す疎水性インデックスである GRAVY やペプチドのリン脂質膜に結合する指標となる理論的自由エネルギー  $\Delta G_{wif}$  との数値の間になんら相関性は認められない。また、ペプチド配列部がヘリックス構造をとると仮定した場合の疎水モーメントとの相関性もあるとは思われなかった。CPP が細胞内に移行する場合、細胞膜との相互作用 (酸性糖鎖と塩基性アミノ酸残基、脂質と疎水性アミノ酸残基) が重要となるが、単純に Arg の塩基性・親水性や Trp の疎水性・芳香性だけでは説明がつかないようである。さらに、Trp 側鎖は Arg のような塩基性基と cation- $\pi$  結合を形成する可能性もある。<sup>30)</sup> 場合によっては分子内で cation- $\pi$  結合を形成し、特定の二次構造をとるかもしれない。今後、CD スペクトルや NMR などの二次構造に関する情報と細胞内移行性について比較検討を行う必要がある。

本研究の合成ペプチドはいずれも高濃度の 10  $\mu$ M でも Jurkat 細胞の生存率に影響を与えなかった。近年、CPP と構造の類似した Trp 残基を含有するカチオニックな抗菌ペプチドが見いだされているが、今回合成したペプチドは細胞膜傷害性の可能性は低く、抗菌ペプチド様の作用はないと思われる。

以上のとおり本研究では、Trp 残基導入による顕著な細胞内移行性の向上は認められなかったものの、細胞内移行性に影響を与えずに 2 残基の Trp を導入できる位置などが明らかとなり、今後さらに低細胞障害性かつ優れた細胞内移行性を有する Trp 含有ポリアルギニンペプチドを探索するうえで参考となる知見が得られた。

## REFERENCES

- 1) Lufino M. M., Edser P. A., Wade-Martins R., *Mol. Ther.*, **16**, 1525–1538 (2008).
- 2) Saar K., Lindgren M., Hansen M., Eiríksdóttir E., Jiang Y., Rosenthal-Aizman K., Sassian M., Langel Ü., *Anal. Biochem.*, **345**, 55–65 (2005).
- 3) Cardozo A., Buchillier V., Mathieu M., Chen J., Ortis F., Ladrière L., Allaman-Pillet N., Poirot O., Kellenberger S., Beckmann J., Eizirik D., Bonny C., Maurer F., *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 2222–2234 (2007).
- 4) Fonseca S., Pereira M., Kelley S., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 953–964 (2009).
- 5) Futaki S., Nakase I., Tadokoro A., Takeuchi T., Jones A. T., *Biochem. Soc. Trans.*, **35**, 784–787 (2007).
- 6) Futaki S., Suzuki T., Ohashi W., Yagami T., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836–5840 (2001).
- 7) Wadia J. S., Dowdy S. F., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 579–596 (2005).
- 8) Wender P. A., Mitchell D. J., Pattabiraman K., Pelkey E. T., Steinman L., Rothbard J. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 13003–13008 (2000).
- 9) Goun E. A., Pillow T. H., Jones L. R., Rothbard J. B., Wender P. A., *ChemBiochem*, **7**, 1497–1515 (2006).
- 10) Elmquist A., Hansen M., Langel U., *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 721–729 (2006).
- 11) Walrant A., Vogel A., Correia I., Lequin O., Olausson B. E., Desbat B., Sagan S., Alves I. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 1755–1763 (2012).
- 12) Walrant A., Correia I., Jiao C.-Y. Y., Lequin O., Bent E. H., Goasdoué N., Lacombe C., Chassaing G., Sagan S., Alves I. D., *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 382–393 (2011).
- 13) Bechara C., Pallerla M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I. D., Lequin O., Sagan S., *FASEB j.*, **27**, 738–749 (2013).
- 14) Lécorché P., Walrant A., Burlina F., Dutot L., Sagan S., Mallet J.-M. M., Desbat B., Chassaing G., Alves I. D., Lavielle S., *Biochim. Biophys. Acta*, **1818**, 448–457 (2012).
- 15) Maiolo J. R., Ferrer M., Ottinger E. A., *Biochim. Biophys. Acta*, **1712**, 161–172 (2005).
- 16) Rydberg H. A., Matson M., Amand H. L., Esbjörner E. K., Nordén B., *Biochemistry*, **51**, 5531–5539 (2012).
- 17) Bobone S., Piazzon A., Orioni B., Pedersen J. Z., Nan Y. H., Hahm K. S., Shin S. Y., Stella L., *Peptide Sci.*, **17**, 335–341 (2011).
- 18) Rodriguez Plaza J. G., Morales-Nava R., Diener C., Schreiber G., Gonzalez Z. D., Lara Ortiz M. T., Ortega Blake I., Pantoja O., Volkmer R., Klipp E., Herrmann A., Del Rio G., *J. Biol. Chem.*, **289**, 14448–14457 (2014).
- 19) Chen X., Zhang M., Zhou C., Kallenbach N. R., Ren D., *Appl Environ Microbiol.*, **77**, 4878–4885 (2011).
- 20) Bi X., Wang C., Dong W., Zhu W., Shang D., *J Antibiot.*, **67**, 361–368 (2014).
- 21) Guilhelmelli F., Vilela N., Albuquerque P., Derengowski Lda S., Silva-Pereira I., Kyaw C. M., *Front Microbiol.*, **353**, 1–12 (2013).
- 22) Wessolowski A., Bienert M., Dathe M., *J. Pept. Res.*, **64**, 159–169 (2004).
- 23) Ambo A., Niizuma H., Sasaki A., Kohara H., Sasaki Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1269–1272 (2003).
- 24) Kyte J., Doolittle R. F., *J. Mol. Biol.*, **157**, 105–132 (1982).
- 25) Wimley W. C., Creamer T. P., White S. H., *Biochemistry*, **35**, 5109–5124 (1996).
- 26) White S. H., Wimley W. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **1376**, 339–352 (1998).
- 27) <http://rzlab.ucr.edu/scripts/wheel/> (2014.12), D Armstrong and R. Zidovetzki. Version: Id: wheel.pl
- 28) Bechara C., Sagan S., *FEBS Lett.*, **587**, 1693–1702 (2013).
- 29) Suzuki T., Futaki S., Niwa M., Tanaka S., Ueda K., Sugiura Y., *J. Biol. Chem.*, **277**, 2437–2443 (2002).
- 30) Gallivan J. P., Dougherty D. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 9459–9464 (1999).