

令和元年9月3日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04575

研究課題名(和文)細胞内分子確認ペプチドのデザインと細胞機能改変

研究課題名(英文)The design of the cell internal division child confirmation peptide and cell function alteration

研究代表者

本多 裕之 (HONDA, HIROYUKI)

名古屋大学・予防早期医療創成センター・教授

研究者番号：70209328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：ペプチドは豊富なバリエーションからの創薬につながる化合物が報告されている。また小分子ペプチドは細胞内で機能する新しい医薬化合物として期待されている。そこで、1)非天然アミノ酸も含めたランダムペプチドライブラリーを作製し、2)細胞膜透過性ペプチド(CPP)を連結して膜透過性を付与することで、細胞内で機能する新規ペプチドの探索を試みた。また、3)CPPの影響を排除するために、CPPと機能性ペプチドが細胞内で解離するシステムの構築を検討した。ペプチドアレイ上でのジスルフィド結合を形成する方法を確立し、ジスルフィド形成を分子内反応とすることで、ヘテロ二量体ペプチドを選択的に合成する手法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内に導入し内部に侵入した直後に切断できる仕組みは細胞内機能性ペプチドの探索において必要不可欠な技術である。また環状化ペプチドライブラリーによる探索も高機能ペプチドの探索において重要な手法であり、細胞内機能性ペプチド医薬の開発につながる技術である。

研究成果の概要(英文)：Peptides that have biological activities are called functional peptides. Many types of functional peptides have been found to date and has been designed for development of peptide drug. In the present study, following 3 topics were investigated, 1) fabrication of peptide library including unnatural amino acid, 2) screening of intracellular functional peptide conjugated with cell penetrating peptide (CPP), 3) development of the smart machinery for removal of CPP in intracellular space. Related to the last topic, we have established the methodology for disulfide bond formation of all peptides on peptide array. In addition, we have been developed a novel synthesis method of hetero-dimerized peptide using intramolecular disulfide bonding between main- and sub-chain of lysin.

研究分野：生物機能工学

キーワード：ペプチド アレイ 探索 細胞 機能評価

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者本多は、これまでに、F-moc 固相合成法でペプチドアレイを作成し、降圧ペプチド、細胞死誘導ペプチド、アミラーゼ阻害ペプチド、アミロイド 凝集促進ペプチド、乳酸菌凝集ペプチドなど、10 残基程度の短鎖機能性ペプチドを精力的に研究してきた。また、1000 個程度のランダムペプチドライブラリーを使って得られたデータから、配列機能相関を解析し、ペプチドの効率的探索が可能であることを証明してきた。このような情報解析を含めたペプチド探索は例がなく、全網羅探索する必要がないため国内外から高い評価を受けている。一方、1 細胞の機能評価のためナノ磁性微粒子で磁気ラベルし、剣山状デバイスを使って、細胞アレイを作製する技術も確立している。細胞シート上に異種細胞をアレイ配置することもできるので、細胞間相互作用の解析も可能である。マルチチャンバーデバイスを開発し、液滴操作で 1 細胞の遺伝子発現解析が可能であることも実証した。これらの細胞ハンドリング技術を使うと、細胞の生死や増殖だけでなく、サイトカイン分泌や表面マーカー発現などの細胞の高次機能解析も可能になるため、高次機能をもつペプチドの探索につながると着想した。申請者らは、光解裂作用を示すフォトリンカーを組み合わせて可溶化可能な 1000 種類を超えるランダムペプチドライブラリーを作製することができる。このライブラリーは創薬リード化合物スクリーニングのプラットフォームとして価値が高く、優れた競争力を持つ。

### 2. 研究の目的

ペプチドは豊富なバリエーションから創薬リード化合物の宝庫として注目されている。ペプチド構造を基とした医薬品開発が盛んに進んでおり、リュープリンやラジレスなどペプチド創薬は第 2 世代に突入している。ペプチドは小分子であるため細胞内で機能する新しい医薬化合物として期待されている。そこで、非天然アミノ酸も含めたランダムペプチドライブラリーを作製し、細胞膜透過性ペプチド(CPP)を連結して膜透過性を付与することで、細胞内で機能する新規ペプチドの探索を目指す。CPP の影響を排除するために、CPP と機能性ペプチドが細胞内で解離するシステムの構築を目指す。これらを組み合わせ、新規の細胞内機能性ペプチド探索技術の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

#### 3.1 ペプチドアレイの作製

ペプチドアレイの作製には、セルロースろ紙(1542-185、Whatman、England) FILTER PAPER 542 HARDENED ASHLESS 24.0 cm (以下メンブレン) の OH 基と -アラニン(Fmoc- $\beta$ -Ala-OH;K00410、渡辺化学工業株式会社、広島)の COOH 基がエステル結合した活性化メンブレンを使用した。実際の合成では、活性化メンブレン上で、ペプチド合成において最も頻繁に用いられる Fmoc 固相合成反応を用いた(図 1)。

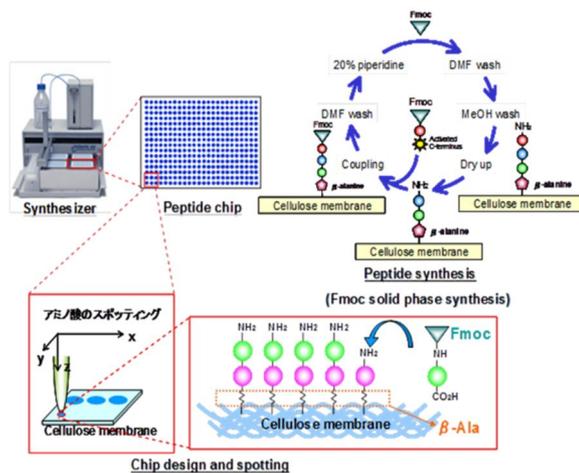


図 1 ペプチドアレイ作製法

材料となるアミノ酸は 0.5 M Fmoc-アミノ酸(全て渡辺化学工業株式会社)溶液(in NMP (N-メチル-2-ピロリドン) (133-15115、和光純薬株式会社))に DIPC1、1-hydroxybenzotriazole (HOBt Anhydrous) (A00015、渡辺化学工業株式会社)を混合し、終濃度がそれぞれ 1: 2 : 2 となるように混合したものを用いた。活性化アミノ酸を peptide synthesizer (ASP222、IntavisAG、Koln、Germany)を用いて活性化メンブレン上にスポッティングした。(1 spot = 1.1  $\mu$ L  $\times$  3 回スポッティング。ただし、1 残基目のみ 0.8  $\mu$ L  $\times$  3 回) 1 残基目にはヘテロ分岐鎖ペプチドを合成するために Fmoc-Lys(ivDde)-OH を合成した。1 残基目合成後は、メンブレンを DMF (5 min  $\times$  3 回)で洗浄することで未反応の活性化アミノ酸を取り除いた。さらに、未反応アミノ基をブロッキングするために、5%無水酢酸

(011-00276、和光純薬株式会社)溶液(in DMF) 50 mL を 15 min  $\times$  2 回反応させ、活性化メンブレン上の未反応アミノ基をアセチル化した。その後、メンブレンを DMF で洗浄(5 min  $\times$  3 回)し、続いて 20% piperidine / DMF (A00177、渡辺化学工業株式会社)に 1 h 浸すことでメンブレン表面上の Fmoc 基を脱保護した。以上の操作を繰り返して Lys 主鎖にペプチドの合成を行った。続いて、Lys 側鎖の保護基 ivDde を 2% ヒドラジン/DMF で 10 min  $\times$  3 回処理し、脱保護した。上記と同様の操作を行い、Lys 側鎖にも同様にペプチドを合成した。それぞれの鎖には C 末端側から Fmoc-Photo-Linker (sc-294977A、SANTA CRUZ、USA)、Cys、ペプチドという順番に合成した。また、合成反応の確認は 1% BPB in DMF (プロモフェノールブルー) (021-02911、和光純薬株式会社)溶液を用い、メタノール溶液中に 1% BPB in DMF 溶液 100  $\mu$ L と酢酸(017-00256、和光純薬

株式会社) 100  $\mu\text{L}$  を加え、 $\text{NH}_2$  基を染色することにより行った。

ペプチド伸長反応終了後、各アミノ酸側鎖に結合している保護基を除去するため、脱保護試薬 (trifluoroacetic acid (TFA)) (A00025、渡辺化学工業株式会社) : m-クレゾール (034-04646、和光純薬株式会社) : 1,2-Ethanedithiol (EDT) (A00057、渡辺化学工業株式会社) : チオアニソール (T0191、東京化成工業株式会社、東京) = 40 : 1 : 3 : 6 を 50 mL 作製し、メンブレンを 2.5 h 浸した。脱保護後、残存試薬を取り除くためにジエチルエーテル (051-01157、和光純薬株式会社) で 5 min  $\times$  3 回洗浄し、さらに、メタノールで 5 min  $\times$  3 回洗浄した。その後、メタノールで 1 h 洗浄を 5 回繰り返した後、一晚メタノール洗浄を行った。

### 3.2 ジスルフィドによるヘテロ二量体形成

上記操作で脱保護試薬を除去した後に、20% DMSO/PBS 溶液 (pH=7.4) で 2 日間酸化処理し、主鎖、側鎖の Cys 間でジスルフィドを形成させた。処理後、PBS で 5 min  $\times$  3 回洗浄した。その後、メタノールで 5 min  $\times$  3 回洗浄した。

### 3.3 ペプチドのメンブレンからの遊離とペプチド溶液の作製

ペプチドアレイ上のペプチドを遊離させるため、トランスイルミネーター (DT-20LCP、Atto、東京) を用いて 365nm の UV を 3 h 照射した。UV 照射後、96 well 用ろ過フィルター (MSRLN0410、MultiScreen HTS Vacuum Manifold、Merck Millipore、German) にペプチドアレイ上の各スポットを 1 スポットずつパンチアウトした。ペプチドを溶解させるために PBS を 150  $\mu\text{L}$ /well ずつ加え、37  $^{\circ}\text{C}$ 、1 h ペプチドを溶出した。

### 3.4 細胞培養

HeLa 細胞は 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、95% Air 下の  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で、細胞培養用 T75 フラスコ (658170、greiner bio-one、Frickenhausen、Germany) で培養した。培地は 10% FBS (biosera、NUAILLE、France) および 1% Penicillin-Streptomycin (PS) (15140122、和光純薬工業) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (08458-16、ナカライテスク、京都) を用いた。継代操作はサブコンフルエント状態 (80~90%) になった細胞の培地を除き、PBS で 2 度洗い流した後、トリプシン処理により細胞培養ディッシュから剥がして再播種した。細胞数の測定は血球計算板を用いて行い、初期細胞数が  $2.0 \times 10^5$  cells/flask となるように再播種した。

### 3.5 細胞生存率測定

HeLa 細胞を初期細胞数  $5.0 \times 10^3$  cells/well となるように 96 well plate に播種し、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で 24 h インキュベートした。24 h 後、培地を除去し、3.2 で調整したペプチド溶液を 100  $\mu\text{L}$  ずつ各 well に加え、37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で 15 min インキュベートした。15 min 後、ペプチド溶液を除去し、10% FBS、1% PS 含有 DMEM と cell counting Kit-8 (347-07621、Dojindo、熊本) を 10 : 1 の割合で混ぜた溶液を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加えて 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  インキュベータ内で 1.5 h インキュベートした。その後、450 nm の吸光度を測定し、各 well の細胞生存率を算出した。

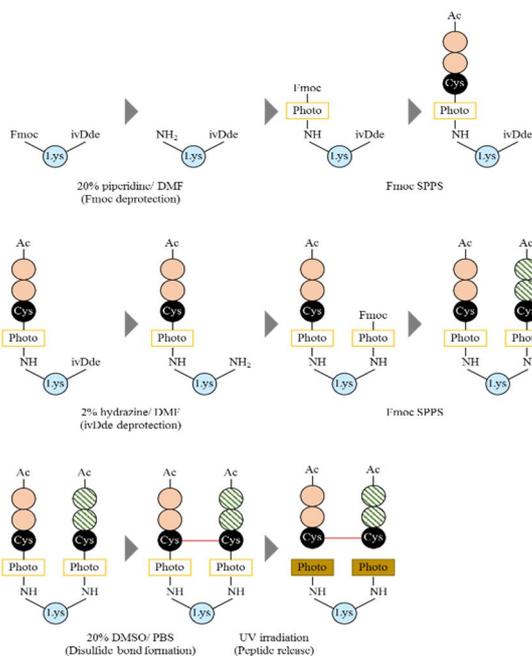


図 2 CPP-機能性ペプチド間のジスルフィド形成反応スキーム

## 4. 研究成果

### 4.1 ペプチド間の選択的なジスルフィド架橋法の開発細胞透過性ペプチド (CPP) の影響を排除するために、CPP と機能性ペプチド間を細胞内の還元環境で分解されるジスルフィド結合で架橋することを目指した。目的となるヘテロ二量体ペプチドを選択的に合成するために、ヘテロ分岐鎖ペプチドの合成手法を利用した、ペプチド合成手法を考案した (図 2)。本手法は、Lys 主鎖に CPP-Cys-光切断リンカー、側鎖に機能性ペプチド-Cys-光切断リンカーを合成し、1 分子内に 2 種のペプチドを合成して、ジスルフィド形成を分子内反応とすることで、ヘテロ二量体ペプチドを選択的に合成する手法である。

まず、構築した合成手法で目的のヘテロ二量体ペプチドの選択的な合成ができているか検証した。MALDI TOF MS を用いた質量分析によって合成を評価した。酸化処理によりジスルフィドを形成させたところ、目的のヘテロ二量体ペプチドが選択的に合成されているこ

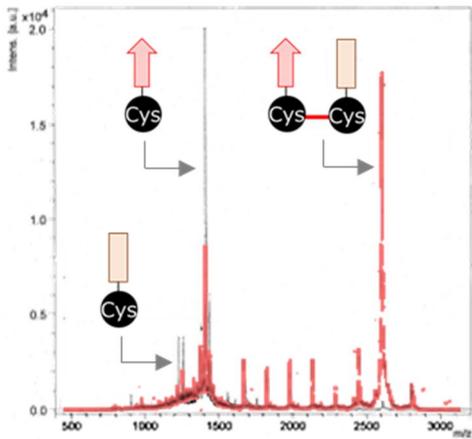


図3 質量分析によるペプチドの合成確認

とを確認した(図3 赤線)。また、還元剤で処理することにより、ヘテロ二量体のピークは減少し、ジスルフィドが分解されていることが確認できた(図3 黒線)。これらの結果より、構築した合成系を用いて、目的ヘテロ二量体の選択的な合成と、還元環境での解離という目的のシステムの構築に成功した。

#### 4.2 細胞死誘導ペプチドの機能検証

次に、構築した合成系を用いて合成したペプチドによって、実際にモデルペプチドの細胞死活性が評価可能か検証した。モデルペプチドとして、既報の細胞死誘導ペプチド(WELVVLGKL)を使用した(Araujo, C. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 289, 24 (2014).)。本ペプチドはG1/S 特異的 Cyclin D2 由来のペプチドであり、細胞透過性ペプチド(CPP)を付加し、細胞内に送り込むことで細胞死を引き起こすペプチドである。

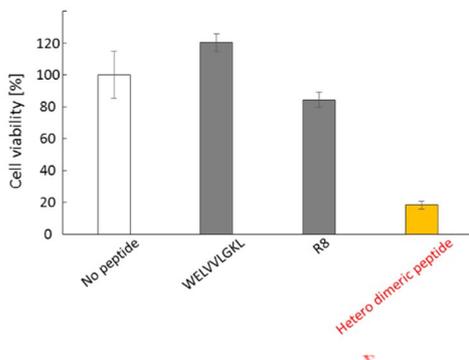


図4 各種ペプチドの細胞死活性評価

細胞死誘導ペプチド(WELVVLGKL)と CPP(オクタアルギニン: R8) をジスルフィドで架橋したペプチドの機能評価を行った。その結果、細胞死誘導ペプチドと CPP を架橋したペプチドは高い細胞死活性を示した(Cell viability = 18.3% ± 2.5%)。一方で、機能性ペプチドのみ、CPP のみではほとんど細胞死活性が見られなかった(WELVVLGKL の cell viability = 120.0 ± 5.5%, R8 の Cell viability = 84.2% ± 4.7%) (図4)。この結果から、我々の構築した合成系を用いて細胞内機能性ペプチドの活性評価が可能であることが検証できた。

#### 4.3 ペプチドのアミノ酸置換実験

モデルペプチドのペプチドを1アミノ酸置換し、合計162種のペプチドを合成し、機能評価をした。1アミノ酸置換に伴い、ペプチドの細胞死活性に変化が見られた(図5)。162種のペプチドの中でモデルペプチドと比較して有意に高い活性を示したペプチドを6種取得できた。一方で、81種のペプチドは有意に活性が低下した。この結果から、構築した合成系を用いて、ペプチドの細胞死活性の変化を評価することができた。

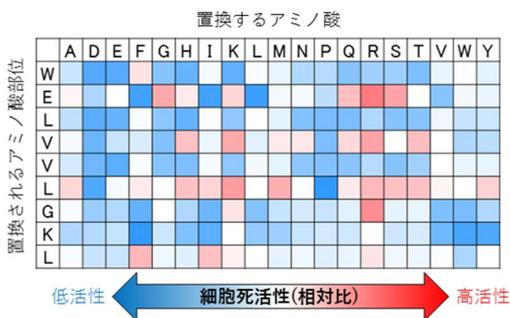


図5 アミノ酸置換による細胞死活性変化

置換するアミノ酸の位置や性質に注目すると、活性変化に関わるルールが確認できた。N末端から2, 4残基目を正電荷及び無電荷の親水性アミノ酸に置換することで細胞死活性が向上する傾向が見られた。一方で、N末端から3, 5残基目を疎水性アミノ酸以外のアミノ酸に置換すると細胞死活性が低下する傾向が見られた。このように、アミノ酸の位置や性質を元に解析を行うことで、高活性及び低活性ペプチドの特徴を理解し、ペプチドの活性予測を行うことが可能となる。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Kento Imai, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda; Predictive selection and evaluation of appropriate functional peptides for intestinal delivery with a porous silica gel. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press, (2019) 10.1016/j.jbiosc.2019.01.001 (査読あり)

Kento Imai, Aya Ikeda, Kazunori Shimizu, and Hiroyuki Honda, Yasuko Yoshida, and

Hiroyuki Honda: Selective Elimination of Bitter Peptides by Adsorption to Heat-treated Porous Silica Gel, *Food Science and Technology Research*, 25: 179-186 (2019)10.3136/fstr.25.179 (査読あり)

Masako Ito, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda; Searching for high-binding peptides to bile acid for inhibition of intestinal cholesterol absorption using principal component analysis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127, 336-371 (2019) 10.1016/j.jbiosc.2018.08.006 (査読あり)

Kento Imai, Kazunori Shimizu, Mitsuhiro Kamimura, Hiroyuki Honda: Interaction between porous silica gel microcarriers and peptides for oral administration of functional peptides, *Scientific Reports*, 8, 10971 (2018) 10.1038/s41598-018-29345-2 (査読あり)

Kozaki Ikko, Shimizu Kazunori, Honda Hiroyuki: Effective modification of cell death-inducing intracellular peptides by means of a photocleavable peptide array-based screening system, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 124, 209-214 (2017) 10.1016/j.jbiosc.2017.03.013 (査読あり)

[学会発表](計 17件)

Ikko Kozaki, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Development and evaluation of a heterodimeric peptide array system utilizing disulfide bond 新規細胞内機能性ペプチド探索系の開発 - CPP - ペプチド複合体の細胞内導入効率に対するペプチド配列の影響 - : 2019 Sakura-Bio Meeting (名古屋) 2019.3.30-31

Kento Imai, Kazunori Shimizu, Mitsuhiro Kamimura, Mitsutesu Ogawa, Hiroyuki Honda: Intestinal Delivery of Functional Peptides with Silica-gel for Application to Food Materials: 第55回ペプチド討論会(京都) 2019.3.3-7

Masako Ito, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Design of Bile Acid Binding Peptides for Inhibition of Intestinal Cholesterol Absorption Using Principal Component Analysis: 第55回ペプチド討論会(京都) 2019.3.3-7

今井健人, 清水一憲, 上村光浩, 小川光輝, 本多裕之: 多孔性シリカゲルを用いた機能性ペプチドの腸デリバリーに適したペプチドの in silico 設計と評価: 第70回日本生物工学会大会(吹田) 2018.9.5-7

池田彩, 今井健人, 清水一憲, 上村光浩, 小川光輝, 本多裕之: 焼成多孔性シリカゲルを用いた苦味ペプチドの選択的除去手法の開発: 第70回日本生物工学会大会(吹田) 2018.9.5-7

池田彩, 今井健人, 清水一憲, 上村光浩, 小川光輝, 本多裕之: 焼成多孔性シリカゲルを用いたタンパク質加水分解物中苦味ペプチドの選択的除去: 日本食品科学工学会第65回大会(吹田) 2018.8.22-24

今井健人, 清水一憲, 上村光浩, 小川光輝, 本多裕之: 多孔性シリカゲルを用いたペプチド腸輸送と本法に適したペプチドの in silico 選抜と評価: 日本食品科学工学会第65回大会(吹田) 2018.8.22-24

本多裕之, 小崎一功, 清水一憲: 細胞内透過性を付与した直鎖機能性ペプチドの探索と高活性化: 化学工学会第49回秋季大会(名古屋) 2017.9.20-22

今井健人, 清水一憲, 上村光浩, 小川光輝, 本多裕之: 多孔性担体を用いた機能性ペプチド腸輸送技術の開発: 第69回日本生物工学会大会(東京) 2017.9.11-14

小崎一功, 清水一憲, 本多裕之: ペプチドアレイを用いた配列改変による細胞内機能性ペプチドの高活性化: 第69回日本生物工学会大会(東京) 2017.9.11-14

小崎一功, 清水一憲, 松本凌, 田邊智哉, 本多裕之: 細胞内解離機構を組み込んだ改良型細胞内機能性ペプチド探索系の構築: 2017年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー(広島) 2017.6.16-22

Kozaki, K. Shimizu, and H. Honda: Improvement of the activity of intracellular functional peptides using peptide array-based screening system: APS2017 (Canada) 2017.9.20-22

Hiroyuki Honda: Development of Magnetic Force-Based Cell patterning: KSBB 春季大会(Korea) 2017.4.6-7

Ikko Kozaki, Kazunori Shimizu, Ryo Matsumoto, M. Okochi, K. Kanie, R. Kato, and Hiroyuki Honda: IN VITRO 3D CANCER MODELS USING MAGNETIC FORCE BASED CO-CULTURE: QUANTITATIVE SEMI-AUTOMATED ANALYSIS OF CANCER CELL INVASION: YABEC2016 (宮崎) 2016.10.27-29

小崎一功, 清水一憲, 松本凌, 田邊智哉, 本多裕之: 切断リンカーを医用した「細胞内機能性ペプチド探索系の確立: 第68回日本生物工学会大会(富山) 2016.9.28-30

小崎一功, 清水一憲, 本多裕之: 細胞内透過性を付与した直鎖機能性ペプチドの探索と高活性化: 化学工学会第48回秋季大会(徳島) 2016.9.6-8

小崎一功, 清水一憲, 本多裕之: 細胞内透過性を付与した直鎖機能性ペプチドの探索と高活性化: 生物工学会若手研究者の集い(府中) 2016.7.16-17

〔図書〕(計 1件)

小崎一功、本多裕之：ファインケミカル、シー・エム・シー出版、, 9(2017)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：加藤 竜司

ローマ字氏名：(KATO,ryuji)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：創薬科学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50377884

研究分担者氏名：清水一憲

ローマ字氏名：(SHIMIZU,kazunori)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：工学研究科

職名：准教授

研究者番号(8桁)：70402500

### (2)研究協力者

なし