

令和 4 年 8 月 29 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21494

研究課題名（和文）中分子の膜透過を評価し膜透過活性を付与する創薬基盤技術の構築

研究課題名（英文）Development of basic strategy to structurally evaluate the membrane permeation activity of middle-size molecules

研究代表者

竹内 恒（Takeuchi, Koh）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授

研究者番号：20581284

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、中分子が水中あるいは膜環境において、どのような構造を有するのかを溶液NMR法により明らかにすることで、中分子の立体構造と膜透過性の有無を関連付けて議論する新たな技術の開発を行った。その結果、環状ペプチドの細胞内移行性が、環境に応じた柔軟な構造変化により実現されることが明らかとなった。また、細胞内の標的に対して結合する速度をin-cell NMR法により生きた細胞で直接評価する技術の確立を目指す研究を行い、定量性には改善の余地があるものの中分子膜の透過に伴う中分子複合体の細胞内における増減を生きた細胞で直接評価する技術の確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体に作用する新たなモダリティの開拓は、生物学的研究に用いることのできるツールの幅を広げ、新たな知を創造するだけでなく、例えば創薬分野において、これまで治療できなかった病気を治す医薬の開発につながるなど、社会に対しても大きなインパクトを与える。本研究は特に注目を集める新規モダリティである中分子について、モダリティとしての確立においてネックになっている中分子に膜透過性を付与する技術また、中分子の膜透過性を評価する技術の確立を目指したものである。本研究における成果は、中分子をモダリティとして確立するのに不可欠な情報を与えるため、その学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a new technique to analyze the relationship between the 3D structures of medium-sized molecules and their membrane permeability by clarifying the conformation of the medium-sized molecules in water and in membrane-mimicking environments using solution NMR. As a result, we found that the intracellular translocation of cyclic medium-sized peptides, cyclorastins, is realized by conformational changes in response to the membrane-mimicking environment. We have also developed a novel technique to evaluate the intracellular binding kinetics of cyclic peptides directly in living cells by the in-cell NMR technique. Although there is room for improvement in quantification, we established a technique to directly evaluate the increase or decrease of medium-sized molecule-target protein complexes in living cells by the in-cell NMR technique.

研究分野：構造生物学

キーワード：中分子 膜透過 創薬 モダリティ

1. 研究開始当初の背景

生体に作用する新たなモダリティの開拓は、生物学的研究に用いることのできるツールの幅を広げ、新たな知を創造するだけでなく、例えば創薬分野において、これまで治療できなかった病気を治す医薬の開発につながるなど、社会に対しても大きなインパクトを与える。よって、新規モダリティの開拓は、生物学のみならず創薬をはじめとする応用分野においてもその貢献が期待される。

一方で、新規モダリティの開拓は、その物性に起因する新たな課題も生み出している。特に注目を集める新規モダリティである中分子は、低分子あるいはバイオ医薬などの既存モダリティではカバーしきれない細胞内標的、特にタンパク質間相互作用に対し、特異的な阻害活性を発揮できるとの期待がある。しかし、その期待とは裏腹に、任意の中分子に対して膜透過性を付与する技術は確立されていない。その原因の一つは、水中あるいは膜環境における中分子の立体構造と膜透過性の有無を関連付けて議論する技術が確立されていない点にある。

また、膜透過を評価する方法としては大きく分けて、3つの方法が存在する(図 1A-C)。一つはCaco-2などの培養細胞を用いる方法であるが(図 1A)、これは、薬剤が細胞層を通りぬける「細胞透過」を評価しており、分子が膜を透過して細胞内に到達する「膜透過」を評価していない。一方、人工膜を用いたPAMPA(図 1B)は、フィルターに脂質を染み込ませた人工脂質膜を用いるが、膜厚は100 μm程度となり、厚さ5 nmの脂質二重膜とはかけ離れている。特に中分子は膜透過速度が遅いと考えられ、膜の厚みの違いは評価に重大な影響を与える。また細胞内への取り込みを、蛍光標識を施して観察する方法もあるが(図 1C)、標識に伴う物性の変化は否定できない。したがって、現存する方法にはそれぞれ、問題があり、中分子の膜透過評価手法としては不完全である。

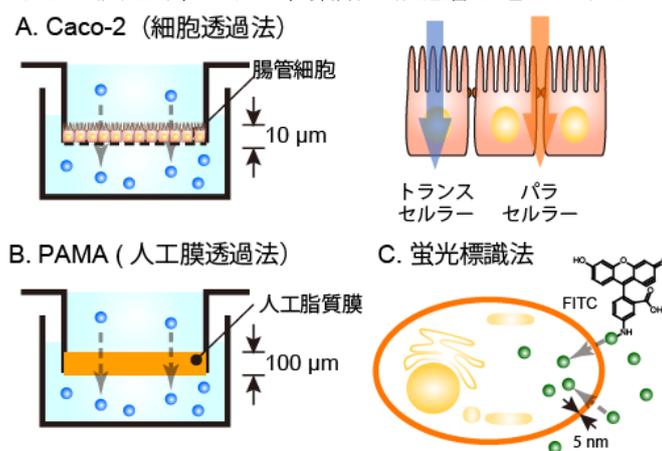


図 1 既存の膜透過評価手法

2. 研究の目的

本研究では、①中分子が水中あるいは膜環境においてどのような構造を有するのかを明らかにすることで、**中分子の立体構造と膜透過性の有無を関連付けて議論する新たな技術の開発**を行うとともに、②**細胞内の標的に対して結合する速度を in-cell NMR 法により生きた細胞で直接評価する技術**を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

①**中分子の立体構造と細胞膜透過性の有無を関連付けて議論する新たな技術の開発**については、Ras タンパク質と Raf タンパク質の PPI に対する阻害活性を有し、抗がん活性を示すことが知られている環状ペプチド群 Cyclorasin に着目した。中でも、Cyclorasin 9A5、9A54 はともに 11 残基の環状ペプチドで、細胞内移行性に寄与する細胞透過ペプチド (CPP) モチーフやその他の芳香族性残基、塩基性残基を共有しているにもかかわらず、9A5 のみが細胞内移行性を示すことが知られている(図 2)。9A5 と 9A54 の間には、3つのアミノ酸置換があるが、9A5 の Thr-2, dAla-3, Fpa-9 が、9A54 ではさらに疎水的な Tle-2, dVal-3, F₂pa-9 となっていることから、一次配列からは、むしろ 9A54 の方が、高い細胞内移行性を示すと期待される (dAla, dVal, Fpa, F₂pa, Tle はそれぞれ d-アラニン、d-バリン、1-4-フルオロフェニルアラニン、1-3,4-ジフルオロフェニルアラニン、ターシャリーロイシン)。しかし実際には前述したとおり、9A54 の細胞内移行性は 9A5 に比べて極めて低く、Cyclorasin の膜透過を左右する要因は全く明らかでなかった。

そこで、9A5 と 9A54 を水中と膜模倣環境である DMSO 中で、立体構造決定し、細胞内移行性を規定する立体構造的特徴を、溶液 NMR 法を用いて明らかにすることで試みた。

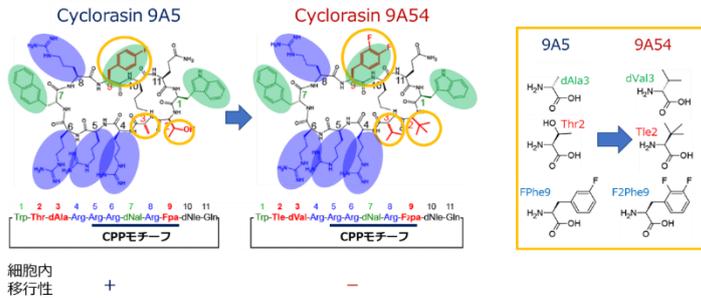


図2 解析に用いた細胞内移行性の異なる Cyclorasin ペプチド
両ペプチドは、黄色で囲んだ3残基以外、芳香族性残基(緑)、塩基性残基(青)を共有している。

②細胞内の標的に対して結合する速度を **in-cell NMR** 法により生きた細胞で直接評価する技術については、免疫抑制効果を示す中分子FK506とその細胞内標的であるシャペロンタンパク質FKBP12の相互作用を用いて、中分子が細胞膜を通過し、細胞内の標的に対して結合する速度および解離する速度を **in-cell NMR** 法により生きた細胞で直接評価する技術の確立を目指した(図3)。なお、FKBP12はFK506を最終標的であるカルシニューリンに結合しやすい構造に固定することで、FK506の活性を補助するタンパク質である。

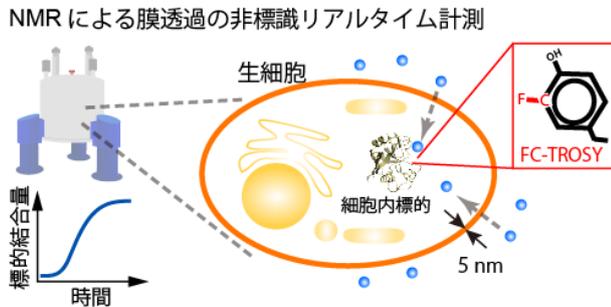


図3 in cell NMRによる膜透過評価法

4. 研究成果

①中分子の立体構造と細胞膜透過性の有無を関連付けて議論する新たな技術の開発

細胞内移行性を示す9A5と、移行性を示さない9A54を水中と膜模倣環境であるDMSO中で、NMR法を用いて立体構造決定した。その結果、両者の立体構造中における、疎水性残基(図4: 緑)と塩基性残基(青)の分布は水中では大きく変わらないものの(図4左)、細胞膜の表面を模倣するようなジメチルスルホキシド(DMSO)中の低極性環境では、9A5のみ、その構造が大きく変化することが明らかになった(図4右)。9A5のDMSO中の構造は、片側に芳香族残基が集まり、芳香族残基の周囲に複数の塩基性残基が配置される両親媒性構造となっており、このような構造は、疎水性残基が膜の中に嵌入し正の曲率を作り出す一方、塩基性残基が周辺リン酸基を捉えることで負の曲率を生み出すことから、そのような構造を膜透過の過程で必要とするエンドサイトーシスを介する細胞内移行性に有利であると考えられた。一方、9A54(図4下段)は膜表面類似溶媒であるDMSO中でも構造変化を十分に起こせず、9A5(図4上段)に見られるような、疎水性残基が中央に集まり、その周辺に塩基性残基が配置される両親媒性構造をとることが出来なかった。

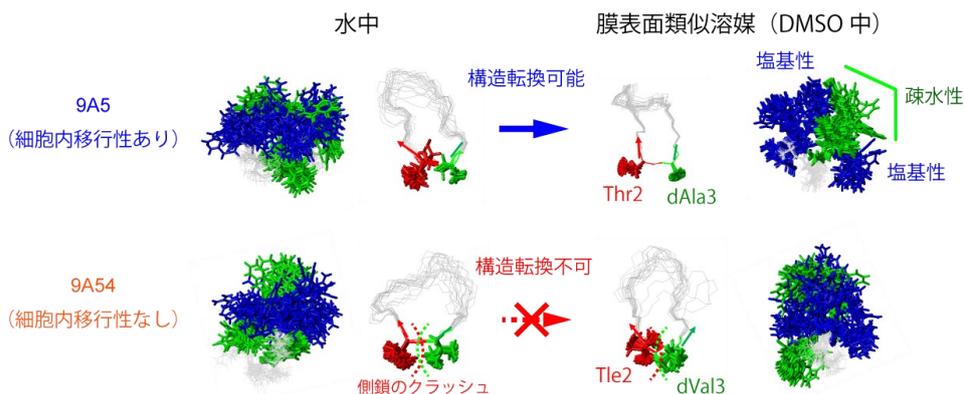
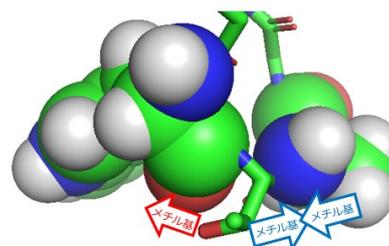


図4 細胞内移行性を決定する環状ペプチドの構造転換

9A5 と 9A54 の DMSO 中での構造を配列の異なる部位を中心として比較すると、9A5 は残基番号 2, 3 を頂点としたよりタイトなターン構造を形成していることがわかった (図 4A 右、図 5)。9A5 はこのことにより、コンパクトな両親媒構造を形成することができたと考えられた。その際、9A5 にみられるターン構造では、Thr-2 が Trp-1 と dAla-3 に挟まれる様になっていた。

一方、当該部位は、9A54 ではより側鎖がかさ高い、Tle2 と dVal3 となっている。そのため、9A5 と同様の構造を 9A54 が形成しようとする時、側鎖同士の立体障害を起こしてしまい、同様の構造は取りえないことがわかった (図 5 矢印)。



9A5 Trp-1 Thr-2 dAla-3
9A54 Trp-1 Tle-2 dVal-3

図 5 9A5 の DMSO 中でのターン構造

さらに、既に報告のある cyclorasin 群について、残基番号 2,3 の側鎖のかさ高さと細胞内移行性の関係を検討したところ、両者が逆相関を示すことが明らかとなった (図 6)。

また、一部のペプチドについて、追加の立体構造解析を行うことで、9A5 と同等の細胞内移行性を示す 9A12 が構造転換できるのに対して、細胞内移行性のない 9A44d は構造転換を起こせないことも確認できた。以上の結果は、連続したアミノ酸残基の側鎖の立体障害により、細胞内移行性を示す構造への転換が妨げられることが、一部の cyclorasin ペプチドが細胞内移行性を示せない理由であること。また、NMR により明らかとなった溶媒環境に応じた柔軟な構造変化が、環状ペプチドの細胞内移行性を左右する重要な要素であることを示している。

本研究により、環状ペプチドの細胞内移行性が、環境に応じた柔軟な構造変化により実現されることが明らかとなった。このことは、環状ペプチドの細胞内移行性の予測に、細胞膜表面を模倣するような環境を含め、多様な環境における立体構造決定を行うことが重要であることを示している。多様な環境において原子レベルの立体構造解析が行える溶液 NMR 法は、その目的の達成に重要な役割を果たすと考えられる。今回の結果は、より簡単な側鎖の置換だけで、環状ペプチドに細胞透過活性を付与できる可能性も示しており、高い細胞移行性と薬理的活性を示す中分子のデザインに貢献する。本成果は *Angewandte Chemie International Edition* に発表した (Takeuchi et al, (2021), 60(12):6567-6572.10.1002/anie.202016647)。

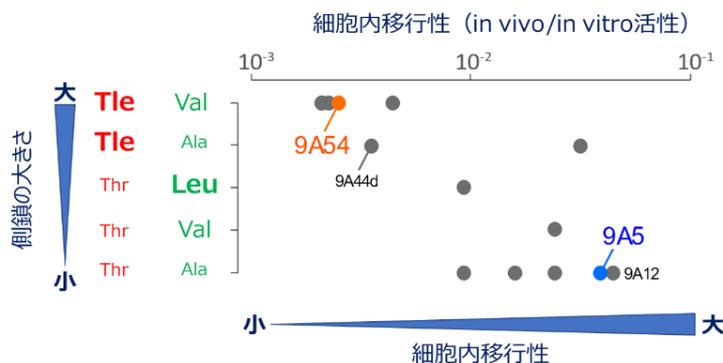


図 6 側鎖の大きさが決める構造的な柔軟性と細胞内移行性

②細胞内の標的に対して結合する速度を in-cell NMR 法により生きた細胞で直接評価する技術

本研究では、薬剤が細胞膜を通過し、細胞内の標的に対して結合・解離の様子を、in cell NMR 法によりリアルタイムで直接評価する技術を確認することを目指した。その際、連続的に新鮮な培地を NMR 試料管に供給するバイオリアクター装置を活用し、一定濃度の薬剤を細胞外から培地交換により供給することとした (図 7)。中分子である FK506 を細胞外から供給する一方で、細胞内には安定同位体標識した標的タンパク質 FKBP12 を導入し、FKBP12 の FK506 結合に伴うスペクトル変化から、膜透過速度の

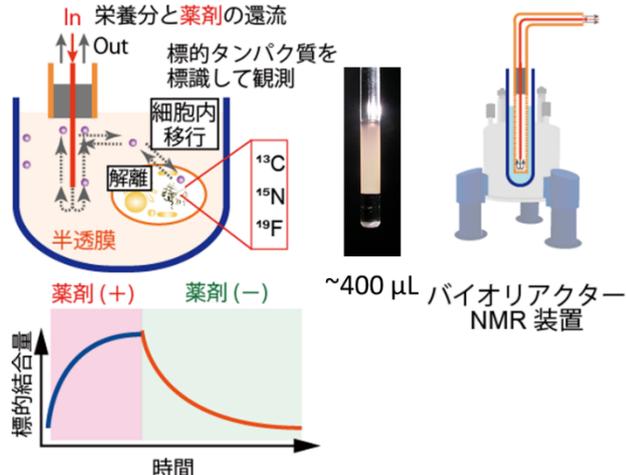


図 7 中分子膜透過速度を明らかにする in cell NMR 実験

評価を行った。
その結果、経時的な細胞内へのFK506の取り込みに伴うFKBP12結合シグナルの増強、また還流溶液をFK506を含まない溶液とすることによる複合体シグナルの減弱が観測され、中分子膜の透過に伴う複合体の細胞内における増減をin-cell NMR法により生きた細胞で直接評価する技術が確立することができた(図8)。現在はより定量性の高い評価方法を確立すべく引き続き研究を推進している。

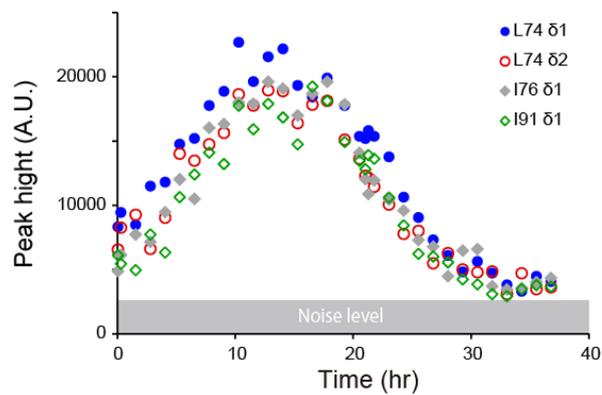


図8 in cell NMR 実験による膜透過評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeuchi Koh, Misaki Imai, Tokunaga Yuji, Fujisaki Miwa, Kamoshida Hajime, Takizawa Takeshi, Hanzawa Hiroyuki, Shimada Ichio	4. 巻 60
2. 論文標題 Conformational Plasticity of Cyclic Ras Inhibitor Peptides Defines Cell Permeabilization Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 6567 ~ 6572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202016647	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Moritsugu Kei, Takeuchi Koh, Kamiya Narutoshi, Higo Junichi, Yasumatsu Isao, Fukunishi Yoshifumi, Fukuda Ikuo	4. 巻 61
2. 論文標題 Flexibility and Cell Permeability of Cyclic Ras-Inhibitor Peptides Revealed by the Coupled Nos??Hoover Equation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Information and Modeling	6. 最初と最後の頁 1921 ~ 1930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jcim.0c01427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi Koh, Kofuku Yutaka, Imai Shunsuke, Ueda Takumi, Tokunaga Yuji, Toyama Yuki, Shiraishi Yutaro, Shimada Ichio	4. 巻 11
2. 論文標題 Function-Related Dynamics in Multi-Spanning Helical Membrane Proteins Revealed by Solution NMR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 604 ~ 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11080604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yokomine Marin, Morimoto Jumpei, Fukuda Yasuhiro, Shiratori Yota, Kuroda Daisuke, Ueda Takumi, Takeuchi Koh, Tsumoto Kouhei, Sando Shinsuke	4. 巻 61
2. 論文標題 Oligo(N methylalanine) as a Peptide Based Molecular Scaffold with a Minimal Structure and High Density of Functionalizable Sites	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202200119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内 恒, 今井美咲, 徳永裕二, 藤崎美和, 鴨志田一, 滝沢 剛, 半沢宏之, 嶋田一夫
2. 発表標題 細胞透過性を決めるRas阻害環状ペプチドの構造的柔軟性
3. 学会等名 第59回 NMR 討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内 恒
2. 発表標題 NMRを用いた動的な生命現象の理解と創薬への応用
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内 恒
2. 発表標題 動的な生命現象のNMRを用いた理解と創薬への応用
3. 学会等名 日本薬学会東海支部（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹内 恒
2. 発表標題 Ras阻害環状ペプチドの構造的柔軟性が決める細胞内移行性
3. 学会等名 59回生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	徳永 裕二 (Tokunaga Yuji) (80713354)	国立大学法人 東京大学・大学院薬学系研究科・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------