

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25289292

研究課題名(和文)細胞アレイ評価法を用いた細胞内機能性ペプチド探索技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of screening method on intracellular functional peptides by cell array technology

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜透過性ペプチド(CPP)を連結したペプチドライブラリーを作製し、ミトコンドリア標的細胞死ペプチドを、ヒト乳がんMCF-7細胞を使って探索した。5残基目のSをWに置換した配列置換体、LNLIWKLFでは元ペプチドと比較して細胞死活性が約4倍向上し、F、V、Yなど疎水性アミノ酸に置換した置換体でも高活性を示した。細胞周期停止で細胞死を誘導するペプチドについても活性の高い配列置換ペプチドの探索に成功した。また、アミノ酸を4グループに群分けし、4残基ライブラリーで機能性ペプチド探索する手法を開発した。得られた高活性ルールを用いて8残基ペプチドの探索が可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Cell death inducing peptide was explored from CPP(cell penetrating peptide) conjugated peptide library and effective cell death of MCF-7 was observed for newly designed octamer peptide, LNLIWKLF, in which fifth amino acid, serine, of the original peptide was substituting to tryptophan and it's activity was approximately 4 times higher compared with that of the original peptide. When serine residue was replaced to hydrophobic amino acid, F, V, and Y, cell death activity was also further increased. In the case of cell-cycle targeting peptide, newly designed peptide with higher activity was also successfully designed. In addition, minimized peptide library for screening was studied based on 4 amino acid groups categorized from 20 amino acids. Using 2 sets of 256 tetramer peptides, IL-2 binding peptide was assigned and high binding role was identified by principal component analysis. It was found that acquired role could be utilized for screening of octamer functional peptides.

研究分野：生物機能工学

キーワード：ペプチド ライブラリー 細胞アレイ 探索

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。マルチチャンネルデバイスを開発し、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。500 ペプチド程度が同時に評価できる細胞/スフェロイドアレイ評価法を開発し、各種の細胞にペプチドを投与し、細胞の形態や蛍光強度などの色調変化を通して機能変化を画像解析評価することで、少細胞で、かつ in situ で創薬候補化合物を評価探索できる基盤技術を構築する。細胞内のターゲットタンパク質への結合は、別途開発したペプチド蛍光プローブを活用する。

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 β -アラニン (Fmoc- β -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)。

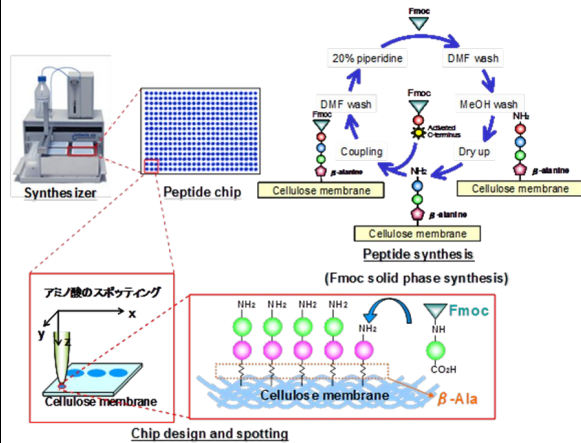


図 1 ペプチドアレイ作製法

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 DIPCI、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を用いた。活性化アミノ酸を peptide synthesizer (ASP222、IntavisAG、Köln, 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 μ L \times 3 回スポッティング。ただし、1 残基目のみ 0.8 μ L \times 3 回) 1 残基目にはリンカーとして Fmoc-Photo-Linker (分子量 520.26、sc-294977A、SANTA CRUZ、USA) 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ペプチドアレイの作製を行った。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 μ L と酢酸 (017-00256、和光純薬株式会社) 100 μ L を加え、NH₂ 基を染色することにより行った。

上記操作を繰り返し、ペプチド鎖伸長反応を行うことでセルロースメンブレン上に任意のペプチド鎖を合成した。ペプチド伸長反応終了後、20% piperidine / DMF を 1 h 反応させ、Fmoc 基を完全に脱保護した。さらに、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×3 回洗浄し、さらに、メタノールで 5 min×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い、実験に用いた。

3.2 ペプチドのメンブレンからの遊離とペプチド含有培地の作製

上記の操作によって合成したペプチドアレイは、Fmoc 脱保護、側鎖脱保護ののち、メタノールで洗浄後、自然乾燥させ、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、96well 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無血清 Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (08458-16、ナカライテスク、京都)を 150 μ L/well ずつ加え、37 $^{\circ}$ C、1 h ペプチドを溶出した。

3.3 細胞培養

HeLa 細胞及びヒト乳がん細胞 MCF-7 は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、95% Air 下の CO₂ 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 DMEM 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 2.0×10⁵ cells/flask となるように再播種した。

3.4 細胞内 Ca²⁺染色試薬の調製と細胞内蛍光観察

細胞内の Ca²⁺濃度の測定には Fluo-4 DirectTM Calcium Assay Kit (F10471、invitrogen、USA)を用いた。Fluo-4 Direct

は蛍光性カルシウムインジケータであり、細胞内の Ca²⁺の濃度に応じて蛍光を発する。試薬は 2×Fluo-4 Direct カルシウム試薬ローディング溶液を調製した。まず、Fluo-4 Direct の細胞外流出を防ぐ水溶性プロベネシド 77 mg にカルシウムアッセイバッファ 1 mL を加え、溶解させた。次に、カルシウムアッセイ試薬のボトルにカルシウムアッセイバッファ 10 mL、調製したプロベネシド 200 μ L を加え、ボルテックスにより試薬を完全に溶解させた。

培養した MCF-7 細胞を 5.0×10⁴ cells/dish となるように、ガラスベースディッシュ(3910-035、IWAKI、東京)に播種し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 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、2×Fluo-4 Direct カルシウム試薬ローディング溶液と無血清 DMEM を 1 : 1 で混合して加え、30 min 染色を行った。染色後染色溶液を除去し、Ca²⁺フリーの Krebs-ringer modified buffer (KRB : 125 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM Na₃PO₄, 1 mM MgSO₄, 5.5 mM glucose, pH 7.4)で洗浄した。洗浄後 KRB を 1.9 mL 加えた状態で蛍光顕微鏡(IX81、オリンパス、東京)にセットし、ペプチド含有培地 0.1 mL 添加と同時にタイムラプス観察(10 s おき 5 min)を行った。本実験による蛍光画像は、Spinning Disk Confocal system (CREST OPTICS, X-Light V1, Rome, Italy)を用いて 488 nm のレーザーで励起して取得した。細胞内の蛍光値は蛍光画像を Image J を用いて数値化した。

4. 研究成果

4.1 細胞死誘導ペプチドの機能検証

モデルペプチドとして、既報の細胞死誘導ペプチド(KLLNLSKLF, LNLISKLF)を使用した (Seo et al., Cancer Research, 69, 8356-8365 (2009))。本ペプチドは、p53 関連タンパク質である Noxa のミトコンドリア標的ドメイン由来のペプチドであり、ミトコンドリアに存在する mPT 孔複合体に作用して孔を開き、細胞死を引き起こすペプチドである。まず、我々の系においても本ペプチドによって細胞死が誘導されるか検証した。本実験では、細胞死誘導ドメイン 2 種(KLLNLSKLF, LNLISKLF)と CPP (オクタアルギニン : R8)を組み合わせたペプチドを使用した。その結果、HeLa 細胞では、細胞死誘導ドメインと CPP を組み合わせたペプチド (KLLNLSKLF-R8, LNLISKLF-R8) は高い細胞死活性を示した (KLLNLSKLF-R8 の cell viability = 3.3% ± 1.7%, LNLISKLF-R8 の cell viability = 1.4% ± 0.7%)。MCF-7 細胞でも、細胞死誘導ドメインと CPP を組み合わせたペプチドは高い細胞死活性を示した (KLLNLSKLF-R8 の cell viability = 20.3% ± 4.2 %, LNLISKLF-R8 の cell viability = 4.5% ± 0.4%)。一方、細胞死ドメインのみ(KLLNLSKLF)や R8 のみではほとんど細胞死活性が見られなかった (KLLNLSKLF の cell viability = 91.9% ±

5.5%, R8 の cell viability = 95.0% ± 8.1%)。これらの結果から、我々の探索系を用いて細胞内機能性ペプチドの探索が可能であることが検証できた。

4.2 候補部位のアミノ酸置換による高活性ペプチドの探索

次に、本探索系を用いて、より高活性なペプチドを取得するため、細胞死誘導ペプチドのアミノ酸配列を 1 アミノ酸ずつアラニン (A) に置換 (アラニンスキャン) し、細胞死活性を評価した。その結果、N 末端から 2 残基目のアスパラギン (N)、5 残基目のセリン (S) をアラニンに置換したペプチドで処理した場合高い細胞死活性を示した。その他のアミノ酸をアラニンに置換したペプチドでは、元ペプチドと同等、もしくは細胞死活性の低下が観察された。

さらに、N 末端から 2 残基目の N、5 残基目の S を他の 19 種類のアミノ酸置換し、活性の高いペプチドが取得できるか検証した。LXLISKLF, LNLIXKLF (X=アミノ酸全 20 種類) を合成し、1 スポットを無血清培地 150 μL で溶出して作製したペプチド含有培地を 4 倍希釈し、MCF-7 細胞に加えて 3h 処理した。N 末端から 2 残基目の N を置換したペプチドの結果を図 2A に、N 末端から 5 残基目の S を置換したペプチドの結果を図 2B に示す。

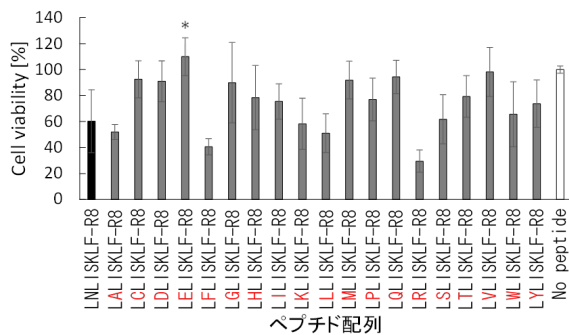


図 2A 2 残基目の置換効果

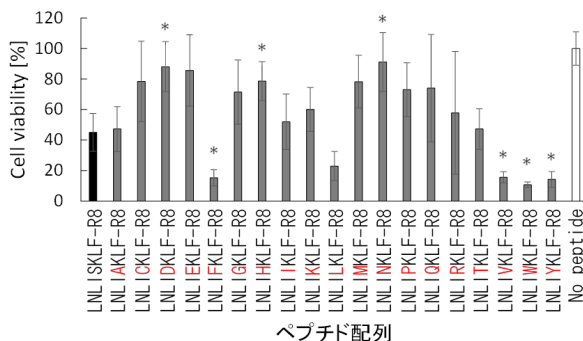


図 2B 5 残基目の置換効果

この結果から、N 末端から 5 残基目の S を F, V, W, Y に置換することにより、ペプチドの細胞死活性が向上したことが示された。これらの結果から、本探索系を用いてペプチドのアミノ酸配列置換を行うことで、ペプチド

の活性を向上させることが可能であることが示唆された。

4 種類の高活性ペプチド (LNLIFKLF, LNLIVKLF, LNLIWKLF, LNLIIYKLF) を純度 95% 以上のグレードで購入し、これを用いて、高活性ペプチドの濃度依存性を調べた。その結果、LNLIWKLF が最も高い活性を示し、10.1 μmol/L で 50% 細胞死を示した。これは、元ペプチド (44.9 μmol/L で 50% 細胞死) と比較しておよそ 4 倍高い活性であった。

4.3 取得した高活性ペプチドの機能メカニズム評価

今回モデルとして使用した細胞死誘導ペプチドは、mPT 孔複合体に作用して、孔を開き、それに伴いミトコンドリア内の Ca²⁺ を細胞質に流出させる。高活性ペプチドにおいても、同様の現象が引き起こされるか検証した。Ca²⁺ を染色する蛍光試薬を取り込ませた MCF-7 細胞に各ペプチドを添加し、細胞の蛍光画像を経時的に取得した。Image J を用いて取得画像から蛍光値を算出し、ペプチド処理前後での細胞内の蛍光値変化 (以後 F/F₀ と表記する) を算出した。

元ペプチドでは、ペプチド添加後 60 s から 90 s にかけて細胞質中の Ca²⁺ の増加が観察された (図 3A)。取得した高活性ペプチドでは、ペプチド添加後 50 s から 60 s にかけて細胞質中の Ca²⁺ の増加が見られた (図 3B)。この結果から、高活性ペプチドは細胞質中の Ca²⁺ を増加させるという点において、元ペプチドと同様の機能性を有することが示された。

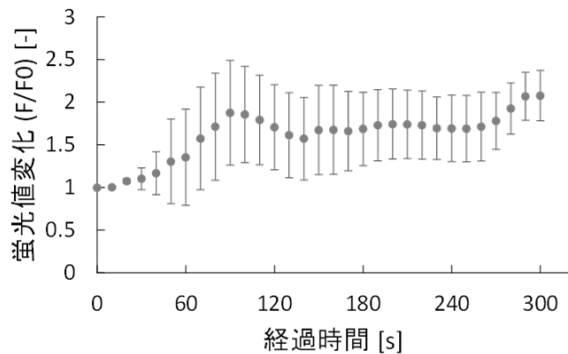


図 3A LNLISKLF (44.9 μM) による Ca 蛍光変化

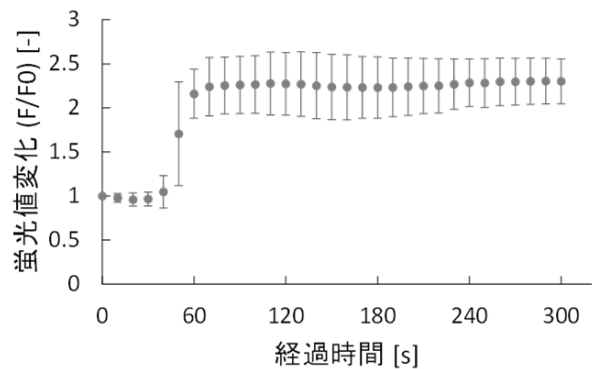


図 3B LNLIWKLF (10.1 μM) による Ca 蛍光変化

ペプチドの活性向上をもたらしたアミノ酸(F, V, W, Y)のうち、FとVは疎水性の高いアミノ酸であり、F, W, Yは側鎖に芳香環をもつアミノ酸であるという特徴が見られた。疎水性アミノ酸は疎水性相互作用に寄与しており、芳香環をもつアミノ酸はスタッキング相互作用に寄与している。これら相互作用はタンパク質間相互作用に大きく関与することが知られている。そのため、疎水性アミノ酸であるF, V、芳香環をもつアミノ酸であるF, W, Yへの置換によって、ペプチドが標的タンパク質であるmPT孔複合体と疎水性相互作用やスタッキング相互作用しやすくなったことにより、ペプチドの活性が向上したと予想される。

これらの結果から、取得した高活性ペプチドは細胞質中のCa²⁺の濃度を増加させる機能をもち、元ペプチドと同じような機能を有していることが示唆された。また、ペプチドごとに細胞質中の蛍光値の上昇の仕方が異なる要因は、ペプチドとmPT孔複合体の相互作用のしやすさの違いによるものであると考えられる。

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 6件)

Ikko Kozaki, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda; Effective modification of cell death-inducing intracellular peptides by means of a photo-cleavable peptide array-based screening system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press, 2017 (査読あり)

Akiko Kume, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Yasuko Yoshida, and Hiroyuki Honda; Development of a tactical screening method to investigate the characteristics of functional peptides, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21: 119-127 (2016) (査読あり)

Mina Okochi, Tomoya Sugita, Masayoshi Tanaka, Hiroyuki Honda; A molecular peptide beacon for IgG detection, *RSC Advances*, 5, 91988-91992 (2015) (査読あり)

Ryo Matsumoto, Mina Okochi, Kazunori Shimizu, Kei Kanie, Ryuji Kato, Hiroyuki Honda; Effects of the properties of short peptides conjugated with cell-penetrating peptides on their internalization into cells, *Scientific Reports*, 5, 12884 (2015) (査読あり)

Shuhei Yamamoto, Michael Masakuni Hotta, Mina Okochi, Hiroyuki Honda; Effect of Vascular Formed Endothelial Cell Network on the Invasive Capacity of Melanoma Using the In Vitro 3D Co-Culture Patterning

Model, *PLOS ONE*, 9(7), e103502 (2014) (査読あり)

Tomoya Sugita, Mina Okochi, and Hiroyuki Honda; Design of Quenching Peptide Probes Incorporating Tryptophan for Rapid IgG Detection, *Chemistry Letters*, 43(4), 550-552 (2014) (査読あり)

〔学会発表〕(計 6件)

松本凌、清水一憲、大河内美奈、本多裕之：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 - : 第31回 DDS 学術集会(東京) 2015.7.2-3

松本凌、大河内美奈、本多裕之：ペプチド探索のためのCPP結合ペプチドライブラリーの作成：第66回日本生物工学会大会(札幌) 2014.9.9-11

松本凌、大河内美奈、本多裕之：細胞内機能性ペプチド探索のためのCPP結合ペプチドライブラリーの作成：生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー(神戸)、2014.7.12-13

山本修平、大河内美奈、本多裕之：磁気細胞パターンニング法を用いた血管内皮細胞近傍でのがん細胞の浸潤能および遺伝子発現解析：化学工学会第79年会(岐阜) 2014.3.18-20

山本修平、大河内美奈、本多裕之：磁気細胞パターンニング法を用いた抗がん剤に対するがん細胞の応答評価：第51回日本生体医工学会(東京大学生産技術研究所) 2013.11.25

山本修平、大河内美奈、本多裕之：磁気細胞パターンニング法を用いたがん細胞の薬剤応答評価法の構築：化学工学会第45回秋季大会(岡山) 2013.9.16-18

〔図書〕(計 5件)

本多裕之：短鎖ペプチドの新機能発現に関する研究(2016年度生物工学会功績賞受賞)、生物工学会誌、95(2)、64-70 (2017)

本多裕之：短鎖機能性ペプチドの探索、生化学、89(1): 15-20 (2017)

小崎一功、本多裕之：機能性ペプチドの探索技術、月刊ファインケミカル、4589)、16-24 (2016)

本多裕之(共著)：「機能性ペプチドの開発最前線技術」シーエムシー出版、2015年、pp41 - 49

本多裕之：ペプチドアレイによる短鎖機能性ペプチドのスクリーニング、化学と生物、53(8)、503-509 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

大河内 美奈 (OKOCHI MINA)
名古屋大学・工学研究科・准教授
研究者番号：70313301
加藤 竜司 (KATO RYUJI)
名古屋大学・創薬科学研究科・准教授
研究者番号：50377884

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし