

令和元年6月13日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K05401

研究課題名(和文) In-Cell NMRによる生きた細胞への薬物輸送のリアルタイム定量解析

研究課題名(英文) Real-Time Quantitative Analysis of Drug Deliveries by In-Cell NMR

研究代表者

岡村 恵美子 (OKAMURA, Emiko)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：00160705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：溶液NMRを細胞系に拡張し、水溶液中で「生きた」細胞への薬物輸送をNMRでリアルタイム計測可能であることを見出した。バイオ医薬品を効率的に導入する機能性ペプチド・オクタアルギニンのヒト生細胞への輸送過程をリアルタイムで計測し、正電荷に富むアルギニンペプチドが(i)負に帯電した細胞表面糖鎖に結合後、(ii)熱揺らぎにより細胞膜を透過し、(iii)細胞質内に輸送される新たな輸送プロセスを明らかにした。

また、ペプチド中のアミノ酸の異性化、ペプチド結合の切断反応をNMRでリアルタイム計測し、速度論解析から、加齢に伴う異常型アミノ酸の蓄積の原因を分子レベルで解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生きた細胞への物質輸送のNMRリアルタイム定量計測はこれまで類例がなく、薬物の輸送機構を解明する新しいアプローチとして、薬の作用や毒性予測、新薬の探索やデザインに向けて、研究のもつ意義は大きい。

また、白内障やアルツハイマー病関連ペプチドを対象としたペプチド中のアミノ酸の異性化、ペプチド結合切断のNMRリアルタイム計測は、今後、加齢に伴う疾患のメカニズム解明とその制御、予防や創薬に向けて、物理化学に基づく新たな視点からのアプローチとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Real time in-cell NMR spectroscopy was applied to quantify kinetics of non-endocytic membrane permeation of octaarginine (R8) into living cells. The non-endocytic membrane translocation of <sup>19</sup>F-labeled R8 into a human myeloid leukemia cell line was observed at 4 °C with a time resolution of minute-order. The <sup>19</sup>F NMR detected the real time translocation of cationic R8: the binding to anionic glycosaminoglycan at the cell surface, followed by the penetration into the cell membrane, and the entry into cytosol across the membrane. Our in-cell NMR results provide the physicochemical rationale for spontaneous penetration of membrane-permeable peptides like R8 in cell membranes.

The methods were also applied to analyze spontaneous peptide bond cleavage at natural L-Asp and abnormal D-Asp isomers in eye lens  $\gamma$ -crystallin fragments in real time. Kinetic analysis showed how tough the uncommon D-Asp residue was to allow abnormal accumulation.

研究分野：生物物理化学

キーワード：超精密計測 生物物理 リアルタイム解析 In-Cell NMR 薬物輸送

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 薬物の輸送過程をリアルタイムで観測し、“定量化”することは、薬の効果や毒性の評価など創薬の基礎となる情報を得るために重要である。細胞で起こる現象を NMR で“生きたまま”観測する In-cell NMR は、細胞に対する薬物の作用を原子レベルで捉える点で優れており、細胞への負荷を最小限に抑える理想的な計測手段となりうる。しかしながら、薬物輸送の“定量化”は、「生きた細胞」では非常に難しく、これまで成功していなかった。

(2) 一方、研究代表者の岡村は、高分解能溶液 NMR を細胞系に拡張して、「生きた」細胞と薬物の相互作用の計測を開始し、蛍光標識によって細胞への輸送が変化することを、NMR で初めて明らかにした (Chem. Lett. 34, 1064 (2005))。薬物の細胞内輸送をそのままの状態を観測する方法論の確立が必要であると考え、in-cell NMR による「生きた」細胞への薬物の分配・輸送の非侵襲計測に着手した。すでに予備的検討を行い、低分子薬物や膜透過性ペプチドの輸送過程を NMR で計測可能であることを見出した。

また、これまでに科学研究費基盤研究(C)(2)「リン脂質二分子膜中の内分泌攪乱物質の輸送解析」(平成 14-15 年度)、萌芽研究「熱揺らぎに基づくリン脂質二分子膜中のイオンの輸送機構」(平成 16 年度)、基盤研究(C)「高感度高分解能 NMR による脂質ラフトの動態解析」(平成 17-18 年度)、基盤研究(C)「膜の熱揺らぎとドラッグデリバリーに関する動的多核 NMR 解析」(平成 20-22 年度)、新学術領域研究「揺らぎが機能を定める生命分子の科学」(公募研究)「生体膜の揺らぎによる薬物の輸送機構の動的多核 NMR 解析」(平成 21-22 年度)、基盤研究(C)「生体膜の揺らぎによるポリペプチドの拡散と膜透過の動的多核 NMR 解析」(平成 24-27 年度)の交付を受け、モデル細胞としてリン脂質リポソームを用いて、膜の中の遅い運動を NMR で検出し (Phys. Rev. Lett. 93, 248101 (2004))、薬物の結合量、結合・解離速度、膜中の拡散速度を自然のままの状態で定量化してきた (J. Chem. Phys. 129, 215102 (2008); Chem. Phys. Lett. 474, 357 (2009); J. Phys. Chem. B. 115, 11074 (2011))。本研究課題は、これらの成果に基づき、立案されたものである。

## 2. 研究の目的

本研究では、高分解能溶液 NMR 法を展開して、「生きた」細胞への薬物の分配・輸送を自然のまま定量化する方法論を確立することを目的とした。時間分解 NMR 計測を行い、薬物の輸送過程をリアルタイムで捉える。そのうえで、薬物の「結合と解離の速度論的解析」、「拡散過程の解析」、「透過速度の算出」を行う。薬物として、低分子からポリペプチドまでを対象とした薬物輸送のライブラリーを構築する。薬の作用や毒性予測、新薬の探索やデザインに向けて、蛍光標識に代わる新しい定量化法を確立し、NMR とモンテカルロ計算による細胞への新たな「薬物輸送の予測」を行うことを最終目標とした。

## 3. 研究の方法

### (1) In-cell NMR による“生きた細胞”への薬物の輸送解析

N 末端を 4-フルオロフェニルアラニン(4f-Phe) でフッ素標識したオクタアルギニン 4f-Phe-(Arg)<sub>8</sub> を固相合成した。リン酸 buffer 中に浮遊させたヒト白血病細胞株 HL60 (1 × 10<sup>7</sup> cells/ml) にペプチドを添加後、ただちに、ペプチドのフッ素原子核をモニターした <sup>19</sup>F NMR スペクトルの変化を分単位の時間分解でリアルタイム計測した。温度は、エンドサイトーシスが起らない 4 °C で実施した。シグナルの化学シフト、強度の時間変化から、それぞれ、膜透過経路を予測し、各々の過程におけるペプチド濃度の推移を定量化した。細胞の生存率はトリパンブルー染色を用いて確認した。また、平衡後のオクタアルギニンの細胞内分布は、可溶化・遠心分離操作により得られた各々の細胞画分について、<sup>19</sup>F NMR で定量化した。

### (2) ペプチド中のペプチド結合の切断、アミノ酸の異性化の NMR リアルタイム定量化解析

ペプチド中のアスパラギン酸残基 (Asp) で選択的にみられるペプチド結合の自発的な切断反応は、Lα-Asp または Dβ-Asp を含む αA クリスタリン 51-58 断片および αB クリスタリン 61-67 断片をそれぞれ酢酸バッファー (pH 3.6) に溶解したものを試料として用いた。70 °C に昇温後、ただちに <sup>1</sup>H-NMR を用いて、切断前の反応物の減少とペプチド結合の切断によって生じる C 末端 Asp と N 末端アミノ酸の増加をリアルタイムで同時計測した。それぞれのシグナル強度から、反応物と生成物の濃度変化を定量化し、これを一次反応速度式

$$C_{ter} = C_{non0} (1 - e^{-kt})$$

(ただし、 $C_{ter}$  は切断によって生じたペプチド断片の濃度、 $C_{non0}$  は切断前のペプチドの初濃度、 $t$  は時間、 $k$  は速度定数) にフィッティングすることにより反応の速度定数を算出した。

ペプチド中の Asp で選択的にみられる異性化反応の観測には、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 断片を用いた。Asp1, Asp7, Asp23 をそれぞれ含む  $A\beta$ 1-9, 2-9, 4-9, 2-12, 2-16, 21-25 断片を PBS バッファー (pH7.6) に溶解して 70 °C に昇温後、ただちに  $^1H$ -NMR を用いて、異性化前の  $L\alpha$ -Asp と異性化後の生成物  $L\beta$ -Asp (isoAsp) をリアルタイムで同時計測した。シグナルの強度変化から複数の Asp と isoAsp の増減を同時に定量した。速度論解析からそれぞれの残基における異性化反応の速度定数を算出し、異性化の大小とその要因を比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) In-Cell NMR による生きた細胞への薬物輸送のリアルタイム計測

溶液 NMR を細胞系に拡張し、水溶液中で「生きた」細胞への薬物輸送をリアルタイムで計測可能であることを見出した。本研究では、タンパク質や遺伝子などを細胞内へ効率的に導入する働きのある膜透過ペプチド・オクタアルギニンのヒト白血病細胞株 HL60 への輸送過程を分単位でリアルタイム計測し、特に、膜輸送タンパク質が関与しない“物理的な”膜透過経路について検討した(図1)。N 末端を 4-フルオロフェニルアラニンで修飾したペプチドの  $^{19}F$ -NMR シグナルの時間変化を追跡した結果、図2に示すように、正電荷を有するアルギニンペプチドが (i) 負に帯電した細胞表面糖鎖・グリコサミノグリカン (GAG) にトラップされた後、(ii) 熱揺らぎにより疎水性の細胞膜を透過し、(iii) 細胞質内に輸送されるという新しいタイプの輸送プロセスを明らかにした。エンドサイトーシスによらない物理的な膜透過の過程を、生きたままリアルタイムでとらえた点が評価され、成果は、Pharmaceuticals 誌電子版 (2017 年 4 月 15 日発行) に論文として掲載された。本研究は、細胞に負荷を与え、デリバリーへの直接的、間接的影響が懸念される蛍光標識を用いることなく、in-cell NMR 分光法でしか得られない情報を取得する研究と位置付けられる。今後、様々な種類のドラッグデリバリーの分子機構を細胞を用いて解明していきたいと考えている。

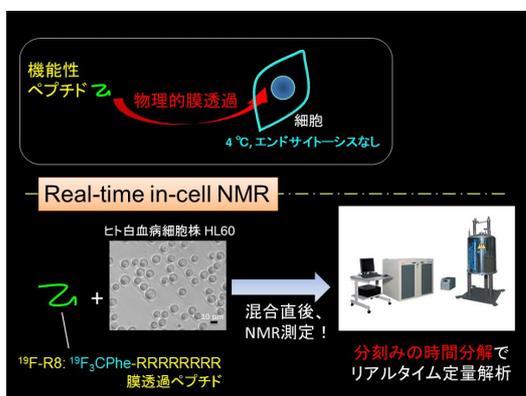


図 1.  $^{19}F$ -NMR による膜透過ペプチドの物理的膜透過の実時間その場計測

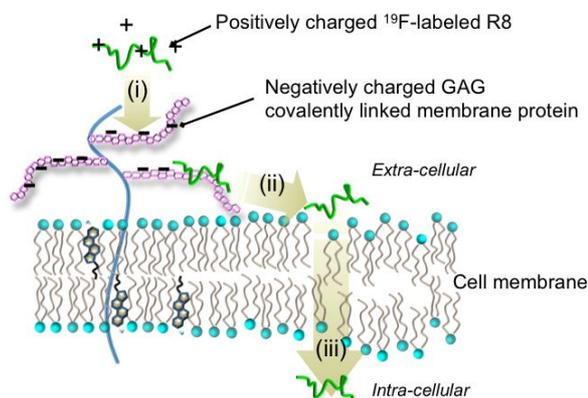


図 2. 膜タンパク質が関与しないアルギニンペプチドの物理的膜透過経路 (Pharmaceuticals, 2017 より)

##### (2) ペプチド中のペプチド結合の切断、アミノ酸の異性化の NMR リアルタイム定量解析

ポリペプチドの輸送解析を行うにあたり、ペプチドの特定の部位でアミノ酸が異性化すること、特定のペプチド結合が自発的に切断されること、これらの反応を NMR で計測可能であることを見出した。そこで、上記(1)の方法論を応用して、ペプチド中のペプチド結合の切断反応、アミノ酸の異性化反応を NMR でリアルタイム計測し、定量的な速度論解析へ展開した。白内障、アルツハイマー病関連ペプチドを対象として、加齢に伴う疾患の進行とその制御に関する動的なメカニズムの解明を目指すこととした。

目の水晶体タンパク質  $\alpha A$  クリスタリンおよび  $\alpha B$  クリスタリンの模擬ペプチドでは、ともに、アスパラギン酸の C 側で選択的にペプチド結合が加水分解され、切断される。このようなペプチド結合の分解切断は、酵素によることなく自発的に起こる反応であるが、研究対象とした  $\alpha A$ 51-58、 $\alpha B$  61-67 断片では、ともに、D $\beta$ -Asp を含む配列でペプチド結合の切断が  $L\alpha$ -Asp よりも起こりにくいことが、速度定数の解析から明らかとなった。本研究によって、D $\beta$ -Asp の反応性の低さが、結果的に異常な D $\beta$ -Asp の蓄積につながる可能性が示され、なぜ D $\beta$ -Asp の反応性が  $L\alpha$ -Asp よりも低いのか、その要因についても構造的に明らかにすることができた。クリスタリン中では、通常型の  $L\alpha$ -Asp が加齢とともに徐々に異性化し、最終的に異常な D $\beta$ -Asp が蓄積することがすでに見出されている。タンパク質中の特定のアミノ酸の異性化が、白内障など加齢による疾患を引き起こす可能性も指摘されているが、今回の結果は、異性化によって生じた D $\beta$ -Asp を含む配列においてペプチド結合の切断が抑えられることで、異常な D $\beta$ -Asp の蓄積を促進することを示唆する点で重要であると考えられる。以上の成果は、2016 年 2 月 15 日発行の Scientific Reports 電子版に論文として掲載された。

アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) 内のアミノ酸の異性化反応を、NMR を用いてリアルタイムで計測した。異性化が起こりやすいとされるアスパラギン酸 (Asp) 側鎖の構造が類似したグルタミン酸 (Glu) 残基における自発的な異性化反応を、それぞれ同時に計測可能であることを明らかにした(図3)。さらに、速度論解析の結果、(i)  $A\beta$  中に含まれる 3 つのアスパラギン酸 (Asp1, Asp7, Asp23) で異性化の速さが異なること、(ii) Glu の異性化は、通常は Asp よりも起こりにくいこと、(iii) Asp の異性化は、それぞれ特定のヒスチジン残基によって抑えられていることが明らかとなった。(iii)は、アミロイドーシス(線維化)を加速する可能性が示唆される Asp の異性化に対して、これを制御するヒスチジン残基の役割を明らかにしたものであり、アルツハイマー病など疾患のメカニズム解明と予防に向けた新たな知見として注目される。成果は学会で発表するとともに、論文として取りまとめ、国際誌に投稿した。

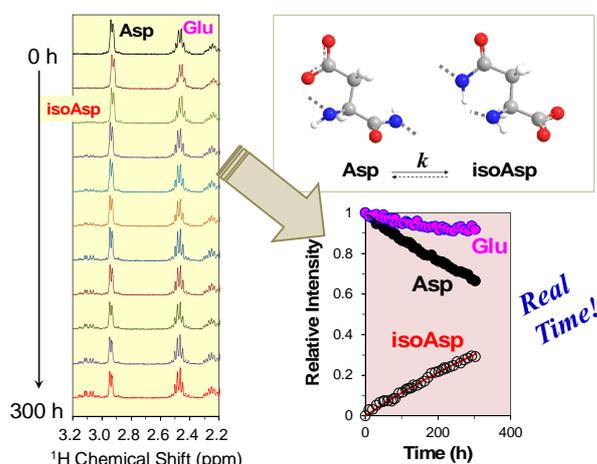


図3. アミロイド  $\beta$  配列におけるアミノ酸の異性化のリアルタイム NMR 計測と速度論解析

以上、本研究報告に示す通り、本課題は所期の目的に沿って成果を収めるとともに、将来に向けて当該領域の発展に寄与するための展望をもつことができた。本研究の推進にあたり、科学研究費補助金の交付に対して厚く御礼申し上げる。また、本研究で用いた NMR リアルタイム定量計測による速度論解析は、ペプチドの様々な反応の時間分解計測に今後展開可能であることが明らかとなった。現在、アルツハイマー病関連の  $A\beta$  ペプチドを用いて、凝集状態の変化をリアルタイムで解析している。 $A\beta$  配列の野生型と線維化傾向の異なる 2 種の変異体の NMR 計測を行い、化学シフト、強度の時間変化から、ペプチドの凝集・線維化のメカニズム、特に、線維化を引き起こす引き金となる初期の凝集過程の相違に焦点を当てたメカニズム研究へと発展させる。2019 年度から、新たに、科学研究費助成事業(学術研究基金助成金)(基盤研究 C)「リアルタイム NMR 法によるポリペプチドの動態と制御:細胞内輸送とアミロイド形成(課題番号 19K05394, 2019~2021 年度)」の交付を受け、引き続き研究を推進する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Emiko Okamura “Solution NMR to Quantify Mobility in Membranes: Diffusion, Protrusion, and Drug Transport Processes” *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **67** (2019) 308-315. DOI: 10.1248/cpb.c18-00946

Y. Takechi-Haraya, K. Aki, Y. Tohyama, Y. Harano, T. Kawakami, H. Saito, and E. Okamura “Glycosaminoglycan Binding and Non-endocytic Membrane Translocation of Cell-permeable Octaarginine Monitored by Real Time In-cell NMR Spectroscopy” *Pharmaceuticals* **10** (2017) 42. DOI: 10.3390/ph10020042

Kenzo Aki and Emiko Okamura “Kinetics of the competitive reactions of isomerization and peptide bond cleavage at L- $\alpha$ - and D- $\beta$ -aspartyl residues in an  $\alpha$ A-crystallin fragment” *Journal of Peptide Science* **23** (2017) 28-37. DOI: 10.1002/psc.2945

Emiko Okamura “Kinetics of Membrane Binding and Mobility of Drugs by Multinuclear Dynamic NMR in Situ” *Journal of the Society of Japanese Women Scientists* **16** (2016) 7-14. DOI: 10.5939/sjws.16002

Kenzo Aki and Emiko Okamura “D- $\beta$ -aspartyl residue exhibiting uncommon high resistance to spontaneous peptide bond cleavage” *Scientific Reports* **6** (2016) 21594. DOI: 10.1038/srep21594

〔学会発表〕(計 29 件)

安岐健三、岡村恵美子 “アスパラギン酸の異性化及び切断反応における複数残基同時観測と速度論解析～リアルタイム NMR を用いて～” 第 10 回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会(招待講演) 2018 年

岡村恵美子、安岐健三 “高分解能溶液 NMR によるペプチド中の異性化、ペプチド鎖切断、凝集過程のリアルタイム計測： $\alpha$ クリスタリンとアミロイド $\beta$ ペプチド” 第10回タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会（招待講演）2018年

伊藤琴音、西口友佳子、安岐健三、岡村恵美子 “温度・表面曲率・脂質組成が与える膜の動態と薬物輸送：多核 NMR による相関解析” 膜シンポジウム 2018 2018年

宇地原結、巨勢紀羽、西田哲郎、安岐健三、岡村恵美子 “リアルタイム NMR によるアミロイド $\beta$ 変異体の凝集初期過程の比較研究～CDスペクトルとNMRスペクトル観測～” 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018年

安岐健三、岡村恵美子 “リアルタイム NMR を用いたアスパラギン酸およびグルタミン酸の異性化の同時計測—アミロイド $\beta$ フラグメントペプチドを例に—” 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会 2018年

岡村恵美子 “リン脂質2重層リポソーム：その構造・ダイナミクスから機能まで” 食品ハイドロコロイドセミナー2018（招待講演）2018年

岡村恵美子 “溶液 NMR による膜の動的構造と膜を場とした生体反応解析” 科学研究費助成事業 新学術領域「生命分子システムにおける動的秩序形成と高次機能発現」第2回秩序化分子システムワークショップ（招待講演）2017年

武知（原矢）佑樹、安岐健三、通山由美、原野雄一、川上徹、斎藤博幸、岡村恵美子 “リアルタイム in-cell NMR によるオクタアルギニンペプチドの細胞膜透過機構” 第40回溶液化学シンポジウム 2017年

Kenzo Aki, Emiko Okamura “Accumulation Mechanism of Uncommon D- $\beta$ -Aspartyl Residue in Lens $\alpha$ -crystallin by Kinetics of Spontaneous Peptide Bond Cleavage and Isomerization” 日本化学会第97春季年会 2017年

安岐健三、岡村恵美子 “水晶体タンパク質 $\alpha$ クリスタリンにおける異常型 D- $\beta$ -アスパラギン酸の蓄積メカニズム：リアルタイム NMR によるペプチド結合切断の速度論を通して” 第39回溶液化学シンポジウム 2016年

Kotone Ito, Yukako Nishiguchi, Kenzo Aki, Emiko Okamura “How Sevoflurane Uptake is Regulated: The Effect of Membrane Curvature, Cholesterol, Lipid Composition, and Ion Channel” The 4th International Kyushu Colloid Kolloquium（国際学会）2016年

Emiko Okamura, Kenzo Aki “Real-Time in-Situ NMR Observation of Non-Enzymatic Peptide Bond Cleavage and Isomerization of Aspartyl Residue in Crystallin and Amyloid- $\beta$  Fragments” XXVIIth International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems（国際学会）2016年

安岐健三、岡村恵美子 “膜表面におけるペプチドの反応の in situ リアルタイム計測を指向した NMR による速度論” 日本膜学会第38年会 2016年

Emiko Okamura “Mobility, location, and kinetics of membrane binding and delivery of drugs by solution-state  $^{19}\text{F}$  and  $^1\text{H}$  NMR” 6th Asian Conference on Colloid and Interface Science（招待講演）（国際学会）2015年

安岐健三、岡村恵美子 “L- $\alpha$ -および D- $\beta$ -アスパラギン酸含有ペプチドの分解と異性化反応の速度論：リアルタイム NMR と HPLC による解析” 第8回「タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会」（招待講演）2015年

岡村恵美子 “水晶体タンパク質模擬ペプチド中の Asp 異性化に関わる側鎖の立体配座の NMR 研究” 第15回日本蛋白質科学会年会ワークショップ「蛋白質とアミノ酸のキラリティ」(招待講演) 2015年

武知(原矢)佑樹、安岐健三、通山由美、原野雄一、川上徹、斎藤博幸、岡村恵美子 “キネティクスに基づく細胞へのオクタアルギニンの物理的膜透過メカニズム” 日本膜学会第37年会 2015年

〔図書〕(計 1 件)

Emiko Okamura “Encyclopedia of Biocolloid and Biointerface Science, Ed. by H. Ohshima, Volume 1” John Wiley & Sons, Inc. 2016 pp.391-402

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.himeji-du.ac.jp/faculty/f\\_lab/bpc/index.html](https://www.himeji-du.ac.jp/faculty/f_lab/bpc/index.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名： 安岐 健三

ローマ字氏名： Aki, Kenzo

所属研究機関名： 姫路獨協大学

部局名： 薬学部

職名： 助手

研究者番号(8桁): 50714945

### (2)研究協力者

研究協力者氏名： 通山 由美

ローマ字氏名： Tohyama, Yumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。