

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2015～2017

課題番号：15KK0312

研究課題名（和文）膜透過性ペプチドの開発とDDSキャリアとしての応用（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Development of cell-penetrating peptides and their application to DDS carriers
(Fostering Joint International Research)

研究代表者

大庭 誠 (OBA, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（薬学系）・准教授

研究者番号：20396716

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：アミノ酸とキノリン誘導体から構成される8種類のハイブリッドフォルダマーを設計・合成した。合成したハイブリッドフォルダマーは、アミノ酸側鎖やキノリン誘導体の置換基に依存せず右巻きのヘリックス構造をとっていた。アニオン性アミノ酸を含有するカチオン性フォルダマーは会合体を形成しており、既存の膜透過性ペプチドと比べて高い膜透過機能を有していることが明らかになった。これらの知見は、DDSキャリアとして機能するフォルダマーを新規設計する上で非常に有用である。

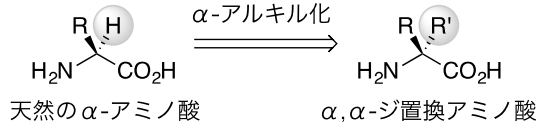
研究成果の概要（英文）：We designed and synthesized 8 hybrid foldamers composed of amino acids and quinoline derivatives. All hybrid foldamers adopted a right-handed helical structure independently of their structures of amino acids and quinoline derivatives. Cationic foldamers containing anionic amino acids formed aggregates and showed strong cell-penetrating ability compared to typical cell-penetrating peptide, Tat peptide. These findings will be helpful for design of de novo foldamers functioning as DDS carriers.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：フォルダマー 細胞膜透過性 ヘリックス構造 ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

天然の α -アミノ酸から構成されるオリゴペプチドは、アミノ酸の自由度が大きいために安定な二次構造をとることが難しい。この問題点を解決するシステムとして、一定のペプチド二次構造をとることができる非天然型アミノ酸に注目が集まっている。 α -アミノ酸の α -位水素をアルキル基で置換した、 α,α -ジ置換アミノ酸（以下、ジ置換アミノ酸）もそのような非天然型アミノ酸の一つである。ジ置換アミノ酸は天然の α -アミノ酸と比べて、(1)化学的安定性が向上していること、(2)親・疎水性のコントロールが可能であること、(3)側鎖コンフォメーションの自由度が制限されること、などの性質をもつ。またその含有ペプチドは、(4)二次構造が固定化されること、(5)生体内での加水分解酵素への抵抗性を獲得すること、などの特徴を有していることから創薬ツールとして期待されている（図1）。



- 1) 化学的安定性の向上
- 2) 親・疎水性のコントロール
- 3) 側鎖コンフォメーション自由度の制限
- 4) 含有ペプチドの二次構造の固定化
- 5) 生体内での加水分解酵素への抵抗性の獲得

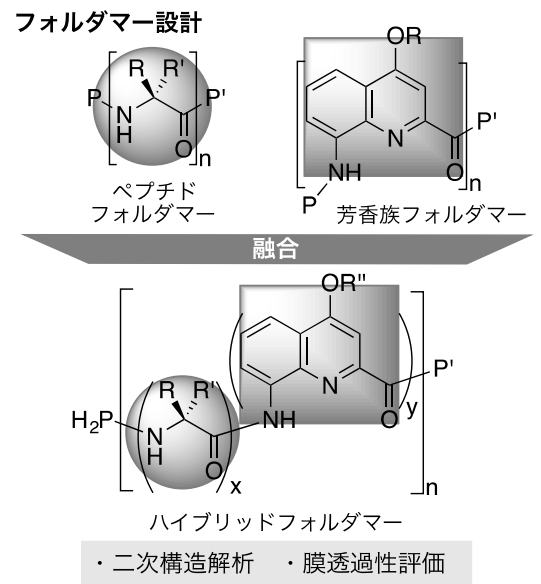
図1. α,α -ジ置換アミノ酸とそのペプチドの特性

研究代表者はこれまでに、非天然型アミノ酸を基盤とした膜透過性ペプチドを開発し、ドラッグデリバリーシステム（DDS）のキャリアとしての応用研究を行ってきた。特に、ジ置換アミノ酸を利用してペプチド二次構造を固定化し、膜透過性を向上させることに成功している。また、ペプチドの二次構造と膜透過機能との相関関係についても明らかにしてきた。しかしながら、革新的な DDS キャリアの開発のためには、現状に甘んじること無く常にシステムを進化させていく必要がある。

本研究の基盤となった科研費若手研究 A の研究では、これまでにあまり利用されてこなかったジ置換アミノ酸を利用し、DDS キャリアとしての応用研究を行い、一定の効果を示してきた。また、新規ジ置換アミノ酸の設計や、これまでに得られた結果を集積させたペプチド二次構造の精密制御を通して、さらなる進化をさせるべく研究を推進している。一方において、機能の向上・新機能の付与を達成するためには、新しい材料を取り入れるのも近道の一つである。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまでに研究を推進してきたペプチドフォルダマー（フォルダマーとは、低分子を並べてオリゴマーにすると一定の二次構造をとる分子のこと）と、研究協力者である Huc 博士が推進してきた芳香族フォルダマーの融合を図る。Huc 博士は、キノリン、ピリジン、ナフチリジン誘導体などを基盤とした芳香族フォルダマー研究の第一人者である。本研究では、アミノ酸とキノリン誘導体から構成されるハイブリッドフォルダマーを用いる。新規ハイブリッドフォルダマーを設計・合成してそのコンフォメーション特性を明らかにするとともに、フォルダマーの膜透過機能について評価し、革新的な DDS キャリアとしての応用を目的とする（図2）。



DDSキャリア（核酸デリバリー）

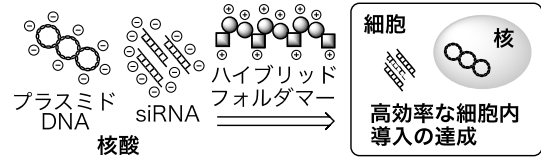


図2. 本研究の目的

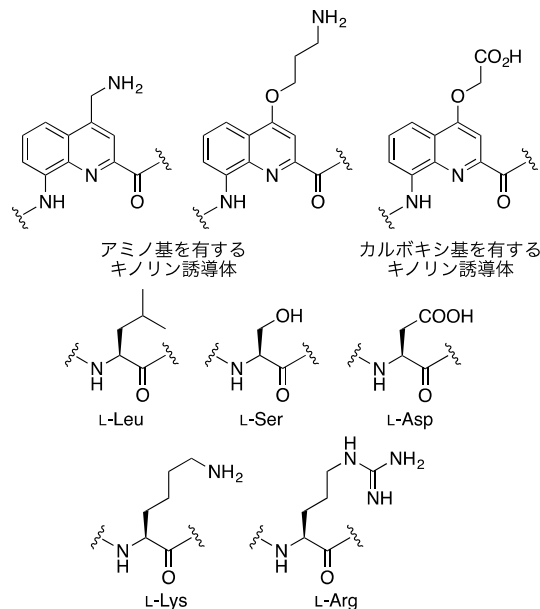
3. 研究の方法

本研究は、(1)フォルダマーの設計と合成、(2)フォルダマーの構造解析、(3)膜透過性および DDS キャリアとしての機能評価、の3項目により研究を推進させた。以下に項目に分けて記述する。

(1)フォルダマーの設計と合成

アミノ酸とキノリン誘導体（図3）から構成される新規ハイブリッドフォルダマーを設計・合成する。種々の側鎖構造をもつアミノ酸を用いるとともに、カチオン性ならびに

アニオン性官能基を導入したキノリン誘導体を用いる。カチオン性官能基を全体に有するカチオン性フォルダマー、カチオン性官能基と疎水性基がそれぞれ片側に配置された両親媒性フォルダマー、アニオン性官能基を全体に有するアニオン性フォルダマー、カチオン性官能基・アニオン性官能基・疎水性基を適切に配置したバンドル状の会合体を形成することを期待したバンドルフォルダマーを合成する。また、膜透過機能を評価するために、フォルダマーには蛍光物質を導入す



る。

図3. 本研究で用いたアミノ酸とキノリン誘導体

(2)フォルダマーの構造解析

合成したハイブリッドフォルダマーのコンフォメーション特性を明らかにするために、溶液中での二次構造解析を行う。フォルダマーを溶解させる溶媒を変え、紫外可視吸収スペクトル(UV-Vis スペクトル)や円偏光二色性スペクトル(CD スペクトル)測定により構造解析を行う。また、フォルダマーが会合体を形成しているか否かを明らかにするために動的光散乱法(DLS)により評価を行う。会合体を形成している場合は、粒径・表面電位について評価する。

(3)膜透過性および DDS キャリアとしての機能評価

蛍光標識したハイブリッドフォルダマーを用いて、培養細胞に対して膜透過機能の評価を行う。具体的には、フローサイトメトリーを用いたフォルダマーの取り込みの定量評価、共焦点顕微鏡観察による細胞内の局在場所評価を、フォルダマーと細胞の接触時間を変えて行う。また、フォルダマーの細胞毒性についても評価する。膜透過機能を有することが示唆されたフォルダマーについて、プラスミド DNA や siRNA などの核酸の細胞内デリバリーが可能であるかを評価する。

4. 研究成果

(1)フォルダマーの設計と合成

アミノ酸としてL-ロイシン(L-Leu)、L-セリン(L-Ser)、L-リジン(L-Lys)、L-アルギニン(L-Arg)、L-アスパラギン酸(L-Asp)を使用した。また、アミノ基もしくはカルボキシ基を有するカチオン性ならびにアニオン性のキノリン誘導体を使用した(図3)。ハイブリッドフォルダマーの合成は、マイクロウエーブを利用した Fmoc 固相合成法により達成した。アミノ酸とキノリン誘導体をうまく組み合わせることで、カチオン性フォルダマー、両親媒性フォルダマー、アニオン性フォルダマー、バンドルフォルダマーを設計し、8種類のハイブリッドフォルダマーを合成することに成功した。

(2)フォルダマーの構造解析

ジメチルスルフォキシドならびにバッファ中、UV-Vis スペクトル測定によりフォルダマーの濃度調整を行った。それぞれの溶液の CD スペクトル測定によりコンフォメーション解析を行ったところ、合成したすべてのハイブリッドフォルダマーが右巻きのヘリックス構造を形成していた。アミノ酸の側鎖構造ならびにキノリン誘導体の置換基、溶媒に依存せず、フォルダマーの骨格が安定なヘリックス構造形成に大きく寄与していることがわかった。また、L-アミノ酸の位の不斉環境がヘリックスの巻き方を右巻きに制御することが明らかになった。

フォルダマーのバッファ溶液を用いて DLS 測定を行ったところ、アニオン性アミノ酸 L-Asp を含有するカチオン性フォルダマーと両親媒性フォルダマーは会合体を形成していた。前者の会合体が約 70 nm の粒径でプラスの電荷を帯びているのに対して、後者の会合体は約 250 nm の粒径でマイナスの電荷を帯びていた。また期待に反して、バンドルフォルダマーは会合体を形成していなかった。

(3)膜透過性および DDS キャリアとしての機能評価

フローサイトメトリーを用いて各フォルダマーの細胞膜透過機能について評価した。その結果、カチオン性フォルダマーが必ずしも高い膜透過機能を有しているわけではないことが明らかになった。一般的に膜透過性ペプチドはカチオン性のものほど高い膜透過機能を示すことが知られており、予想外の結果であった。プラスの電荷を帯びた会合体を形成していたカチオン性フォルダマーの膜透過機能が最も高く、代表的な膜透過性ペプチドである Tat ペプチドよりも良好な結果を示した。また、Tat ペプチドの取り込みが培養時間の経過とともに低下していくのに対して、フォルダマーの取り込みは 24 時間

後まで上昇していた。

共焦点顕微鏡を用いてフォルダマーの細胞内局在場所を観察したところ、会合体を形成していたカチオン性フォルダマーのみが異なる挙動を示していた。すなわち、細胞膜上に多くのフォルダマーが分布していることが観察された。会合体の形成が細胞膜透過機能に何らかの影響を与えていることが示唆された。それ以外のフォルダマーについては、Tat ペプチドに類似した取り込まれかたをしていた。一方、すべてのフォルダマーの取り込みは、エネルギー依存的なメカニズムであることが示唆された。

細胞毒性については、カチオン性官能基が多いフォルダマーほど高い毒性を示していた。

現在、フォルダマーとプラスミド DNA や siRNA との会合体形成、またそれぞれの細胞内デリバリーについて評価を行なっている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://research.jimu.nagasaki-u.ac.jp/IST?ISTActId=FINJPDetail&ISTKidoKbn=&ISTErrorChkKbn=&ISTFormSetKbn=&ISTTokenChkKbn=&userId=100000568>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

大庭 誠 (OBA, Makoto)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・
准教授

研究者番号 : 20396716

(2)研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

Ivan Huc

European Institute for Chemistry and
Biology, Bordeaux・Group Leader

Institute of Chemistry and Biology of
Membranes and Nano-objects・Co-director