

令和元年6月3日現在

機関番号：34413

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07269

研究課題名(和文)ジ置換アミノ酸の特徴を活かした膜透過性ペプチドの創製とDDSキャリアとしての応用

研究課題名(英文)Development of cell penetrating peptide utilizing the characteristic of disubstituted amino acid

研究代表者

加藤 巧馬 (Kato, Takuma)

大阪薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20805296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：非天然型アミノ酸の一種である、 $\beta$ -ジ置換アミノ酸を利用して、既存の細胞膜透過性ペプチドとは異なる性質を有する膜透過性ペプチドの開発を目的に研究を行なった。ジ置換アミノ酸をペプチドに導入することで、天然のアミノ酸のみからなるペプチドに比べて安定なヘリックス構造を形成できることが明らかになった。また、 $\beta$ -ジ置換アミノ酸を含有するペプチドは、特に長時間の培養で既存の膜透過性ペプチドよりも高い膜透過性を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

$\beta$ -ジ置換アミノ酸は、含有ペプチドの二次構造の安定性を向上させる、生体内の加水分解酵素に対するの安定性を増加させる、などの天然のアミノ酸にはない特徴を有している。ペプチド創薬においてはこれらの安定性が重要であり、今回長時間の培養で高い膜透過性を示すペプチドを作成できたことは、これからの膜透過性ペプチドの創薬研究において重要な知見として利用できるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We developed cell-penetrating peptides (CPPs) having properties different from the well-known CPPs with  $\alpha$ ,  $\alpha$ -disubstituted  $\alpha$ -amino acids (dAAs), which are one of the unnatural amino acids. Introduction of dAAs into the peptides stabilized their helical structures compared to the peptides composed of natural amino acids. The dAAs-containing peptides showed high cell-penetrating ability compared to conventional CPPs especially in the longer incubation time.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：非天然型アミノ酸 ペプチド 二次構造解析 膜透過性ペプチド ヘリックス構造

## 1. 研究開始当初の背景

天然の $\alpha$ -アミノ酸から構成されるオリゴペプチドは、アミノ酸自由度の高さのために安定な二次構造をとることが難しく、創薬研究や生体機能解明のためのツールとして必ずしも良好な結果が得られていなかった。これらの問題を解決するシステムとして、非天然型アミノ酸の利用が近年注目を集めており、 $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸もその一つである。

(1)  $\alpha,\alpha$ -ジ置換アミノ酸: ジ置換アミノ酸は天然の $\alpha$ -アミノ酸の $\alpha$ 位の水素をアルキル基で置換したアミノ酸であり、図1に示すような特性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。また、 $\alpha$ -メチル化ならびに環状ジ置換アミノをペプチドに導入すると、比較的短鎖のペプチドでも二次構造制御が可能となり、通常 $\alpha$ -ヘリックスと比べてより密な螺旋構造である $3_{10}$ -ヘリックス構造をとることが知られている。

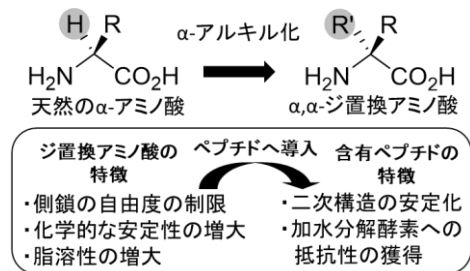


図1. ジ置換アミノ酸の特徴

(2) 膜透過性ペプチド: HIV-1 Tat タンパク質(*Cell* **1988**, 1189)などに由来するペプチド配列や、アルギニンのみから成るオリゴペプチド(*J. Biol. Chem.* **2001**, 5836)を用いることで、通常は細胞膜を透過できないタンパク質や薬物などを細胞内に導入することができる。この物質輸送能から膜透過性ペプチドはDDSキャリアとしての応用も期待されるが、既存の膜透過性ペプチドの大半は10量体以上であり、比較的長鎖のオリゴマーは毒性や取り扱いにくさが問題となっている。

申請者は、ジ置換アミノ酸を含む非天然型アミノ酸を利用した膜透過性ペプチドの研究を行ってきた。ペプチド二次構造に着目した膜透過性ペプチドの開発(*Bioconjugate. Chem.* **2014**, 1761)、非天然型のカチオン構造を有する $\alpha$ -アミノ酸の開発(*Sci Rep.* **2016**, 19913)、遺伝子デリバリーへの応用(*Bioorg. Med. Chem.* **2016**, 2681)の結果から、非天然型アミノ酸を用いることで、高効率かつ持続的な膜透過性機能を有するペプチドの開発に成功している。しかしながら、アキラルなジ置換アミノ酸の使用によるペプチド二次構造の制御は完全ではなく、また良好な膜透過性を示すという事実が得られている一方、その根拠についてはまだ考察が不足している。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者がこれまでに従事してきた「非天然型アミノ酸を含有する膜透過性ペプチドの開発」と「膜透過性ペプチドのDDSキャリアへの応用」より得られた知見を基に、新規ジ置換アミノ酸の設計とその含有ペプチドの合成、ペプチド二次構造解析、膜透過性機能の評価とDDSキャリアとしての応用、の3項目により「ジ置換アミノ酸の特徴を活かした膜透過性ペプチドの創製とDDSキャリアとしての応用」を進めることを目的とする。

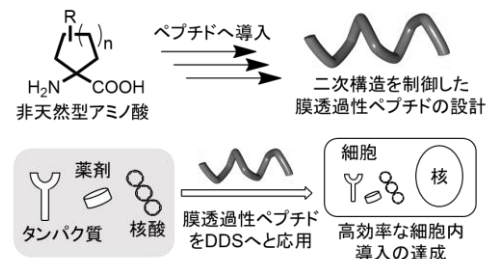


図2. 本研究の目的

## 3. 研究の方法

本研究は、(1) 新規ジ置換アミノ酸の設計とその含有ペプチドの合成、(2) ペプチド二次構造解析、(3) 膜透過性機能の評価とDDSキャリアとしての応用、の3段階により遂行した。以下に項目に分けて記述する。

### (1) 新規ジ置換アミノ酸の設計とその含有ペプチドの合成

膜透過性にはカチオン性基が重要であるといわれているため(*Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, 598)、カチオン性基を有するジ置換アミノ酸を合成することで高い膜透過性を有するペプチドの開発につなげる。ペプチド二次構造制御の観点から、ヘリカル構造を安定化する環状ジ置換アミノ酸を始めとするカチオン性基の種類・含有数や環構造の異なるアミノ酸を数種類合成する。また、合成したアミノ酸を含有するオリゴペプチド(3-10量体)を液相法あるいは固相法により合成する。膜透過性機能ならびにDDSキャリアとしての応用を評価するために蛍光物質を導入する。

### (2) ペプチド二次構造解析

溶液・結晶状態におけるペプチド二次構造解析を行う。またペプチドの末端にイメージング用の蛍光物質を導入し、膜透過性ペプチドとしての機能評価を行う。二次構造解析により得られた情報と膜透過性機能の評価の結果からその相関を考察し、新たなジ置換アミノ酸へ

プチドの設計へとフィードバックする。

### (3) 膜透過性機能の評価と DDS キャリアとしての応用

合成したペプチドについて、ヒト子宮頸がん由来細胞株の HeLa 細胞並びにヒト胎児腎由来細胞株の HEK293 細胞を用いて細胞膜透過性評価と細胞毒性評価などを行う。膜透過性を有するペプチドについては、タンパク質および遺伝子を運ぶ DDS キャリアとしての応用についても検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 新規ジ置換アミノ酸の設計とその含有ペプチドの合成

新規ジ置換アミノ酸として、五員環状の側鎖に 2 つアミノ基を導入したジ置換アミノ酸  $Ac_5C^{dNH_2}$ 、五員環状の側鎖に 2 つグアニジノ基を導入したジ置換アミノ酸  $Ac_5C^{dGu}$ 、六員環状の側鎖に 1 つのアミノ基を導入したジ置換アミノ酸  $Ac_6C^{NH_2}$  の 3 種類を合成し、これらのアミノ酸をアルギニンと組み合わせることで、高い膜透過性が期待できる新規膜透過性ペプチドを合成した(図 3)。これらのペプチドは、細胞膜透過性を評価するためにフルオレセインを直接結合することにより蛍光標識導入している。

また、pH などの周辺環境により蛍光強度に影響を受けやすいフルオレセインに代わる新たな蛍光標識として BODIPY 色素の合成と構造解析も行った(*Acta Cryst.* 2017, 585)。

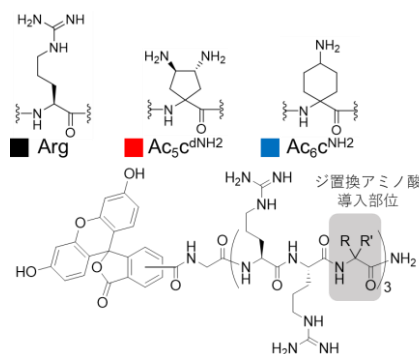


図 3. 本研究で作成したジ置換アミノ酸とペプチドの構造

### (2) ペプチド二次構造解析

溶液中でのペプチド二次構造を CD スペクトルの測定により評価したところ、ジ置換アミノ酸を含有するペプチドは、10 残基という短い鎖長でも安定したヘリカル構造を取ることが明らかになった。これは天然のアミノ酸であるアルギニンのみからなるペプチドがヘリカル構造を取りづらいうことと対比して、ジ置換アミノ酸にヘリカル構造を安定化させる働きがあることを証明する結果である。

また、溶液状態の二次構造は CD スペクトルの測定により推定することができるが、固体状態の二次構造を X 線結晶構造解析により確認することで、その二次構造についてより正確に論じることができる。ペプチドの X 線構造解析研究の一環として、ジ置換アミノ酸と同じく非天然型のアミノ酸である側鎖修飾したアスパラギン酸を導入したペプチドを種々合成して、ペプチドの X 線解析用の結晶化条件の検討と構造解析を行った(*Acta Cryst.* 2019, 1974)。

### (3) 膜透過性機能の評価と DDS キャリアとしての応用

各ペプチドの細胞内取り込み量の定量的結果、アルギニンのみからなるペプチドは、短時間の細胞との接触では大量に細胞内に取り込まれる反面、接触時間が延長すると著しくその取り込み量が減少していた。それに対して、ジ置換アミノ酸を導入したペプチドは、短時間の細胞との接触では取り込み量が少ないものの、接触時間が長くなるにつれて細胞内への取り込み量が増加することが明らかになった。ジ置換アミノ酸を含有することで、ペプチドの加水分解酵素などへの抵抗性が向上し、長時間の細胞との接触において継続的に細胞内に取り込まれたのではないかと考えている。

共焦点顕微鏡で細胞内でのペプチドの局在場所について確認したところ、リソソームやエンドソームと共局在しており、取り込み経路はエンドサイトーシスによるものであると推察された。詳細については取り込み阻害剤などを用いて検討中である。

細胞毒性については、ジ置換アミノ酸を含有するペプチドは、細胞膜透過性評価や共焦点顕微鏡観察を行った範囲では、細胞増殖の抑制や細胞障害性は認められなかった。

以上の結果から、長時間の細胞との接触の際に特に有用である細胞膜透過性ペプチドが開発できた。今後この特徴を活かして DDS キャリアとしての応用について検討を進める。

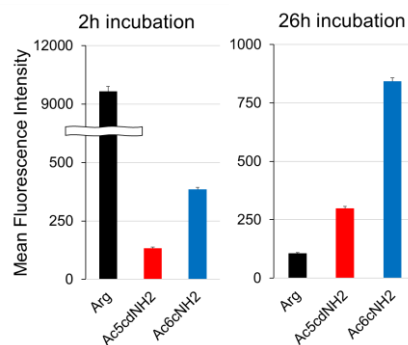


図 4. 細胞内取り込み量評価

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kato Takuma, Kishimoto Saki, Asano Akiko, Doi Mitsunobu, Crystal structure of *N*-{*N*-[*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*L*- $\alpha$ -aspartyl]-*L*- $\alpha$ -aspartyl]-*L*- $\alpha$ -aspartic acid 1<sup>4</sup>,2<sup>4</sup>,3<sup>4</sup>-trimethyl ester 3<sup>1</sup>-2-oxo-2-phenylethyl ester [Boc-[Asp(OMe)]<sub>3</sub>-OPac}, *Acta Cryst.* 査読有, E75, 2019, 585–588

DOI: 10.1107/S2056989019004596

- ② Kato Takum, Doi Mitsunobu, Crystal structure of 3-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-yl)propanoic acid, *Acta Cryst.* 査読有, E73, 2019, 1974–1976

DOI: 10.1107/S2056989017016942

[学会発表] (計 3 件)

- ① Takuma Kato, Akiko Asano, Makoto Oba, Masakazu Tanaka, Mitsunobu Doi, Design and Synthesis of Cyclic Disubstituted Amino Acids for Development of Cell Penetrating Peptide, 10th International Peptide Symposium (国際学会), 2018
- ② 加藤巧馬、大庭 誠、田中正一、土井光暢、膜透過性ペプチドへの応用のための環状ジ置換アミノ酸の合成、日本薬学会第 138 年会、2018
- ③ 加藤巧馬、大庭 誠、田中正一、Development and evaluation of cell-penetrating peptides having cyclic disubstituted amino acids、第 54 回ペプチド討論会、2017

[その他]

ホームページ等

<https://www.oups.ac.jp/kenkyu/kenkyuushitu/bunshik.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：田中 正一

ローマ字氏名：Masakazu Tanaka

研究者番号：00227175

研究協力者氏名：大庭 誠

ローマ字氏名：Makoto Oba

研究者番号：20396716

研究協力者氏名：土井 光暢

ローマ字氏名：Mitsunobu Doi

研究者番号：10183500

※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。