

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06146

研究課題名(和文)膜内外コミュニケーションを可能にする膜貫通型アンカーペプチドの創製

研究課題名(英文)Creation of transmembrane-anchored peptoid enabling communication between the inside and the outside of a membrane

研究代表者

最上 譲二(MOGAMI, George)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：70713022

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、細胞を分子論的に議論する際に必要となる細胞膜の可視化に関するものであり、長時間の細胞膜標識の実現を目指す研究である。従来の蛍光修飾した脂質分子などを用いた膜の標識より安定に膜と相互作用する膜貫通タンパク質のペプチド骨格を模倣したプローブ分子を作製し、膜との相互作用特性を評価した。具体的には、疎水性のヘリックスを中心に、両末端に水溶性のカチオン性残基を有するペプチドを合成した。カチオン性残基には、膜透過性ペプチドとして知られるアルギニンを用い、その個数依存性を調べた。合成したペプチドを用いてHeLa細胞への標識を行い、共焦点レーザー顕微鏡により表紙機能を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の細胞膜標識では、種類が限定されていること、標識・観測時間が限られること、細胞機能に影響を及ぼす可能性があることといった問題がある。本研究では、分子シミュレーションも含めた定量的な膜との相互作用を考え、上述の問題解決に資する、一つの指標を提供するものである。このように、実験と計算の両面から膜とヘリックスペプチドとの相互作用の学理を究明したところに学術的意義がある。また、細胞動態の観察や様々な膜タンパク質の制御などに応用する事で新規の診断・治療法の可能性が考えられるため、社会的意義も認められる。

研究成果の概要(英文): This study is concerned with the visualization of cell membranes, which is necessary for the molecular discussion of cells, and aims to realize long-term cell membrane labeling. We prepared probe molecules that mimic the peptide backbone of transmembrane proteins, which interact with the membrane more stably than conventional membrane labeling using fluorescently modified lipid molecules, and evaluated their interaction properties with the membrane. Specifically, peptides were synthesized with a hydrophobic  $\alpha$ -helix at the center and water-soluble cationic residues at both ends. Arginine, a known membrane-permeable peptide, was used as the cationic residue, and its number dependence was examined. The synthesized peptides were used to label HeLa cells and cover function was evaluated by confocal laser microscopy.

研究分野：生物物理学関連

キーワード：膜貫通ペプチド ペプチド リン脂質二重膜 MDシミュレーション アルギニン 固相ペプチド合成  
ファージディスプレイ

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

膜貫通タンパク質や糖脂質には細胞の働きを調節する各種受容体が多く存在することから、タンパク質と細胞膜(脂質二重膜)の相互作用機序を解明し思い通りに制御する事が、様々な細胞レベルでの病気の治療法や診断法につながると期待されている。膜の可視化は主に脂質や糖脂質に蛍光や抗体を修飾する事で行われてきたがこの手法には次の 2 つの問題がある。プローブ脂質が膜から脱離するため、観測時間には限りがある事と、膜の片面にのみ相互作用しているため、膜の組成の違いや非対称性に左右される事である。そのため、膜特性の学理を究明するためのより有用な新規膜プローブの開発が求められている。この問題を解決するためにより安定に膜と相互作用して脱離せず、膜の内外に左右されにくい構造が必要であるとの考えから、多くの膜貫通タンパク質の膜ドメインに共通しているヘリックスをモチーフにした膜貫通型ペプチド(6K、WALPx など)が研究されている(Y.-C. Tang, C. M. Deber, Biopolymers, 2004; J. A. Killian, FEBS Lett., 2003)。ところが、膜貫通ペプチドはヘリックスの両末端に親水性残基が存在し、安定な膜貫通型をとるようにデザインされているため、ジャイアントリポソーム(LUV: Large Unilamellar Vesicle)に膜貫通型ペプチドを作用しても自発的に膜貫通型に移行しない問題がある。それは図 1 に示すような IP 状態から TM 状態への平衡を考え、中間状態(tilted)への遷移障壁が存在するためである(A. Christopher, B. Burkhard, 2011)。そこで、(1)ヘリックス骨格に柔軟性を、(2)親水性タグに膜透過性を付与できれば、tilted 中間状態のエネルギー障壁を緩和し、この問題を解決できると考え、以下に示す本研究の着想を得た。

(1)ヘリックス骨格への柔軟性付与 ペプチドは炭素に官能基を有したアミノ酸がアミド結合したオリゴマーであるが、官能基をアミンの窒素に有するグリシン様 N-substituted アミノ酸がアミド結合したオリゴマーをペプチドと呼ぶ(図 2)。ペプチドと比べてペプチドはその主鎖の骨格の違いからより柔軟性が高い事が知られており(A. M. Rosales et al., Soft Matter, 2012)細胞取り込み能(R. Goel et al., New J. Chem., 2017)やグラム陰性大腸菌の成長抑制能(B. Mojsoska et al., Scientific Reports, 2017)等の特徴がある事が報告されている。そこで、ヘリックスを構成するペプチドの一部をペプチドに置き換える事で柔軟性を担保できる。

(2)親水性タグへの膜透過性付与 膜との相互作用に関して、膜透過性ペプチド(CPP: Cell-Penetrating Peptide)を用いた細胞内送達システムの研究が最近注目されている。例えば、よく知られている CPP としてカチオン性のアルギニンに富んだペプチド(R8)がある。一般的にカチオン性の分子は脂質二重膜を破壊し細胞毒性を示すが R8 では比較的毒性が小さい。数千 Da 程度の分子にこの R8 を修飾すると細胞内に導入する事ができ、取り込み経路がエンドサイトーシスではなく、直接膜透過により送達される事が報告されている(M. Kosuge et al., Bioconjug. Chem., 2008)。また、同じくカチオン性のヒスチジン 16 残基からなるペプチド(H16)を用いるとさらに細胞取り込み能が増大する(T. Iwasaki et al., J. Controlled. Release, 2015)。これらカチオン性ペプチドを両末端の親水性タグに採用する事で膜透過性を向上させる事ができる。

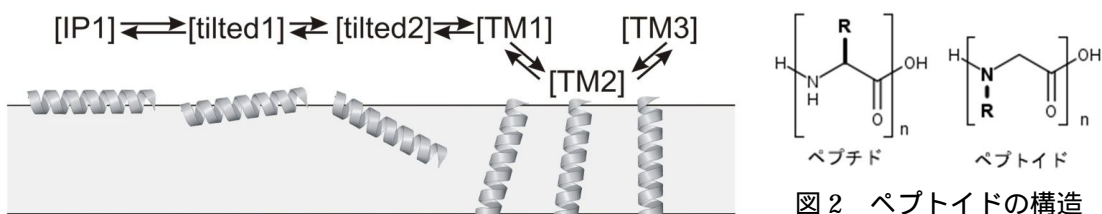


図 1 ヘリックスペプチドと膜の相互作用

図 2 ペプチドの構造

## 2. 研究の目的

本研究では、疎水部に ヘリックスペプチド、両末端親水部に R8 等のカチオン性残基を組み合わせた膜貫通型アンカーペプチドを作製し、そのキャラクタリゼーションを通して、新規の膜制御ツールの基盤を提供する事を当初の目的とした。また、作成した膜貫通型アンカーペプチドを用いて LUV 中に内包した基質の定量を試みた。安定な膜貫通型アンカーペプチドの鍵は、疎水性と親水性および柔軟性と剛直性のバランスにあるので、これらのバランスを変化させるペプチド/ペプチド配列に関して、実験と計算の両面からその熱安定性を定量的に評価した。本研究のアウトラインを図 3 に示す。

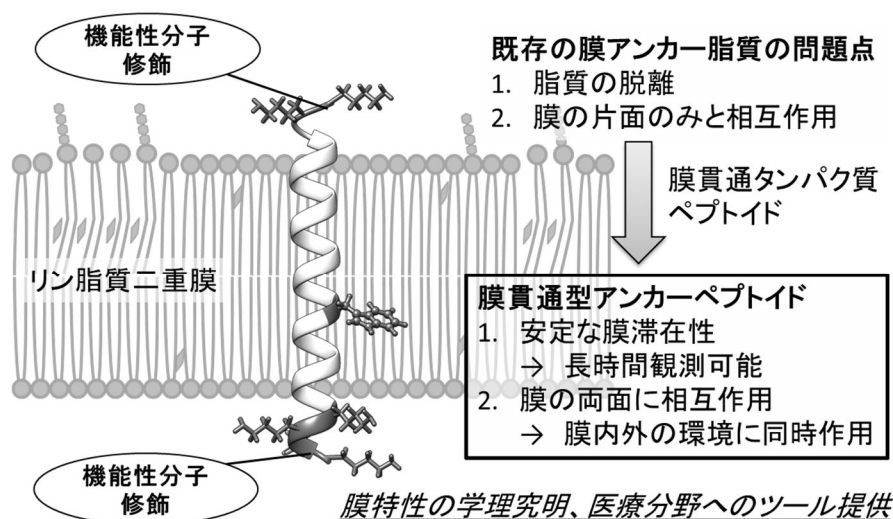


図 3 本研究のアウトライン

## 3. 研究の方法

### (1) 膜貫通型アンカーペプチドの合成・評価

ベース骨格として比較的多く研究されている 6K (KKAAALAAAAALAAWAALAAAKKKK-NH<sub>2</sub>) ペプチドを採用した。当初はこのペプチド配列のペプチドを合成することにより、柔軟な骨格を実現でき、結果的に膜にささりやすい分子を作製できると考えた。結論としては、本研究においてペプチドは合成しなかった。その理由として大きく 2 点ある。1 つは感触を確かめるために行ったペプチド合成によって膜への標識がある程度できたことにより、ペプチド合成を行うメリットが薄くなったことである。もう 1 つは、その後検討したペプチドの金属表面修飾を確立することで、本研究で合成した膜貫通型アンカーペプチドに金ナノ粒子を修飾するなどして、実際の応用に近づけることができると考えたからである。

Fmoc 保護基を用いた典型的な固相ペプチド合成法により 6K ペプチドを合成した。また、膜透過性の向上を期待して 6K ペプチドの N 末端の 2 つのリシン残基をアルギニン残基に置換した 2R4K, 4R4K, 6R4K ペプチドを合成した (nR4K の n はアルギニン残基数)。得られたペプチドはマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析法 (MALDI-TOF-MS) を用いて質量を確認した。ペプチドの二次構造は円偏光二色性 (CD) スペクトル測定により定量評価した。熱力学特性を検討するために、等温滴定型熱量測定 (ITC) を用いて、ペプチドと DOPC (ジオレオイルホスファチジルコリン) からなるリポソームとの相互作用による熱量変化を調べた。細胞標識評価として、蛍光色素 (5(6)-FAM) を N 末端に修飾した蛍光標識ペプチドを、HeLa 細胞培養液に加え 2 時間インキュベーション後、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて観察した。

### (2) 膜貫通型アンカーペプチドの各膜位置による自由エネルギー計算

分子動力学 (MD) 計算パッケージ NAMD を用いて全原子 MD シミュレーションを行った。計算はほぼ既報の方法に即して行った (G. Mogami et al., *J. Phys. Chem. B*, 120, pp1813-1821, 2016)。計算時間と計算ボックスサイズの初期値は 10ns、8×8×7nm 直方体セルで計算した。その後溶媒和自由エネルギーを ERmod 法 (S. Sakuraba, N. Matubayasi, 2014) を用いて計算し、実験で得

られた結果と比較する事で、各状態の熱安定性がどこに起因するかを探るとともに、熱測定で得られた結果と比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定によるヘリックス構造の検出

MALDI-TOF-MS 測定により、目的のペプチドの合成が確認できた(データ省略)。得られたペプチドの CD スペクトル測定により、6K ペプチドがヘリックスを形成していること、および、細胞膜環境を模擬したドデシル硫酸ナトリウム(SDS)添加によりヘリックス形成が促進されることを明らかにした(図4)。

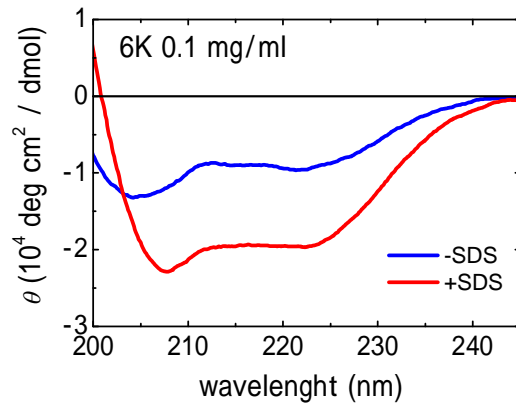


図4 6K ペプチドの CD スペクトル測定

##### (2) 6K ペプチドとリン脂質二重膜の相互作用

6K ペプチドとリン脂質二重膜との結合熱を、ITC を用いて測定した結果-1.3 kcal/mol の発熱であることが分かった。また、MD シミュレーションを用いたエネルギー計算においても、ペプチドの膜への挿入により安定化することを明らかにした。したがって、これらの合成したペプチドを用いて HeLa 細胞への標識を試みた。

##### (3) 細胞毒性試験

まず、細胞毒性の出ない濃度を決定するため、ペプチドの濃度を変えて CCK8 アッセイによる細胞毒性試験を行った(終濃度 0, 0.3, 1, 3, 10, 30 μM)。96 ウェルプレートに  $5 \times 10^4$  cells/mL の HeLa 細胞懸濁液を 100 μL ずつ播種し、DMEM, 10% FBS 中で 24 時間前培養した (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)。PBS に溶解したペプチド溶液を各終濃度となるように 10 μL ずつ添加し、24 時間インキュベートした。WST-8 溶液を 10 μL ずつ添加し、4 時間インキュベートすることで呈色反応を行った。マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm における吸光度を測定し、0 mg/mL のときの吸光度を 100%として相対細胞生存率を算出した。

C 末端に蛍光修飾したペプチドは 10 μM までは顕著な細胞毒性を示さなかったが、30 μM において顕著な細胞毒性を示した(図5)。

カチオン性の分子は一般に、強い細胞膜傷害性に由来する、細胞毒性を示すことが知られているため、サンプルのアルギニン残基数の増加に伴って細胞毒性が上がるのが予想された。ところが今回の結果からは、そのような傾向はみられなかった。

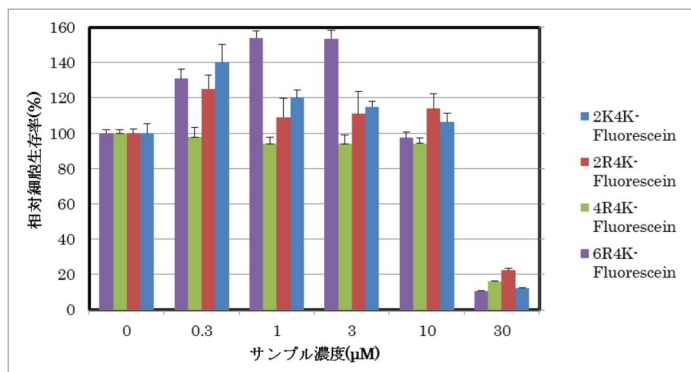


図5 蛍光修飾した各ペプチドの細胞毒性試験

以上の結果より、細胞標識観察は毒性を示さない 3 μM で行った。

#### (4) ペプチドを用いた細胞標識観察

35 mm ガラスベースディッシュに  $5 \times 10^4$  cells/mL の HeLa 細胞懸濁液を 300  $\mu$ L ずつ播種し、DMEM, 10% FBS 中で 24 時間前培養した (37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>)。次に、LysotrackerDR を終濃度 500 nM となるように添加後、Hoechst33342 を終濃度 1  $\mu$ g/mL となるように添加し、十分に攪拌した後、30 分間インキュベートした。その後、ガラスベースディッシュを冷 PBS で 2 回洗浄したのち、再度 DMEM, 10% FBS 300  $\mu$ L を加えた。

サンプルと LysotrackerDR, Hoechst33342 との相互作用を考慮し、サンプルの添加と、LysoTrackerDR, Hoechst33342 の添加は、別々に行った。PBS に溶解したサンプルを終濃度 3  $\mu$ M となるように添加し、1 時間インキュベートした。その後、冷 PBS で HeLa 細胞を 2 回洗浄し、再度 DMEM, 10% FBS をガラスディッシュに 300  $\mu$ L 加え、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った。結果を図 6 に示す。Lysotracker は膜への集積が知られており、赤い発色を示している。ペプチドの修飾した 5(6)-FAM は緑色の蛍光を示している。Merge 画像を見て分かるように緑と赤が共局在して黄色になっている。すなわち、ペプチドは中に存在していることがわかる。ペプチド末端のアルギニン数による違いを見てみると、6K および 6R4K ではドット状の緑色蛍光が観測された。一方 2R4K および 4R4K では、ほとんどドット状の蛍光は見られなかった。ドット状の蛍光は、ペプチドがエンドサイトーシスにより取り込まれた、あるいは、意図しない相互作用により蛍光修飾ペプチドが凝集したのではないかと推察される。いずれにしても、アルギニン残基の長さが本観察結果に影響していると考えられる。

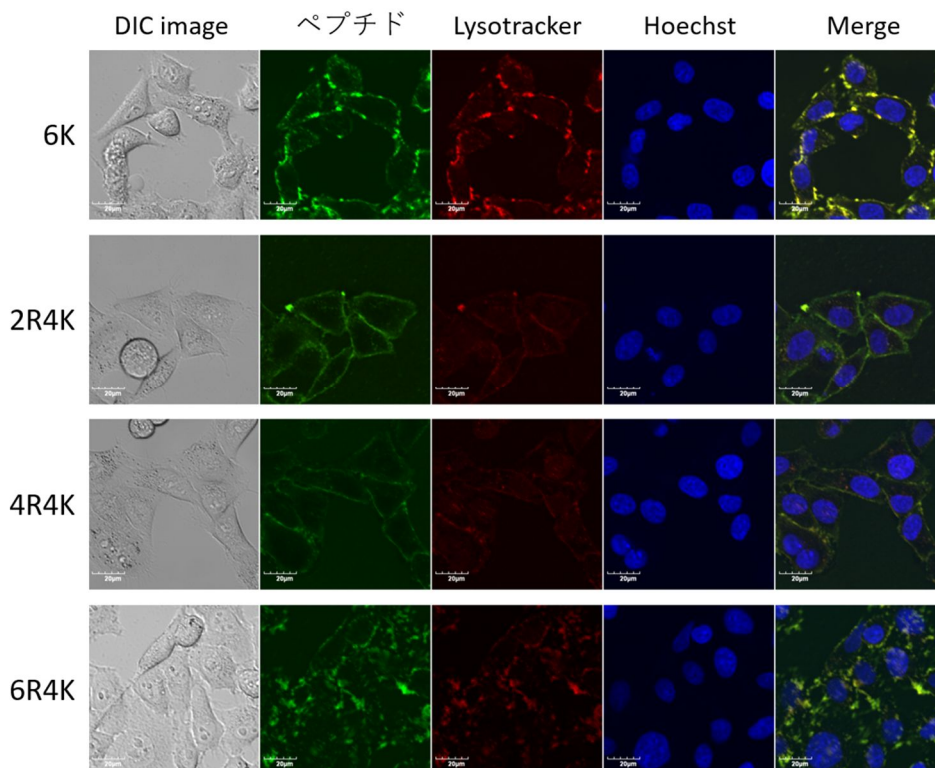


図 6 共焦点レーザー顕微鏡観察像 (37  $^{\circ}$ C)

本研究では、6K ペプチドをベースとして細胞膜にアンカーする  $\alpha$ -ヘリックスを基本骨格としたペプチドの合成を行った。そのペプチドを用いた細胞膜標識を試み 2R4K および 4R4K ペプチドにおいて均一な膜標識を行うことができた。また、上述の膜アンカーペプチドの利用範囲を広げるべく、ファージディスプレイ法を用いて、金属と特異的に結合するペプチド配列を決定することを試みた。今後さらに研究を重ねることで、細胞膜を介した観察手法の深化につながることを期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大場倭利、最上譲二、平野義明、山本雅哉
2. 発表標題 細胞標識のための蛍光修飾細胞膜アンカー型ペプチドの合成
3. 学会等名 第48回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上譲二、大場倭利、平野義明、山本雅哉
2. 発表標題 細胞膜アンカーを目指したアルギニン修飾ペプチドの合成
3. 学会等名 日本金属学会2019年（第165回）秋期講演大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上譲二、大場倭利、平野義明、山本雅哉
2. 発表標題 細胞膜アンカーを目指した $\alpha$ -ヘリックス型ペプチドの合成
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 G. Mogami, W. Oba, Y. Hirano, M. Yamamoto
2. 発表標題 Design of Cell Membrane Anchoring Materials for Cell Labeling
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 最上譲二、大場倭利、山本雅哉
2. 発表標題 細胞膜アンカーを目指した ヘリックス型ペプチドの合成
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大場倭利、最上譲二、森本展行、山本雅哉、平野義明
2. 発表標題 細胞標識を目指した蛍光標識細胞膜アンカー型ペプチドの合成
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018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

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