

令和 5 年 5 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05714

研究課題名（和文）ペプチド核酸ジッパー法による機能性ペプチドの細胞内運搬およびその活性保持

研究課題名（英文）Intracellular delivery of functional peptides and maintain of the activity by "peptide nucleic acid zipper" method

研究代表者

北松 瑞生 (KITAMATSU, Mizuki)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：60379716

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、活性を損なうことなく機能性ペプチドを細胞内へ運搬することを目的としている。そのためにペプチド核酸（PNA）を介して機能性ペプチドと細胞内運搬ペプチド（CPP）を連結および分離させる方法（PNAジッパー法）を開発した。本法によって運搬された機能性ペプチドの細胞内での活性を評価した。

その結果、PNAジッパーは期待した通り、機能性ペプチドを細胞内へ運搬することができ、さらに細胞内で直接連結体よりも強い機能性ペプチドによる生理活性を示すことが明らかになった。また、PNAジッパー法に用いるPNAの鎖長の最適化を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ペプチドを用いた医薬開発は、その多様性や副作用の低減を期待できます。しかし、現在のペプチド医薬の多くは、細胞表面の物質を標的にしています。細胞内部には病気と関係するより多くの物質が存在するため、ペプチド医薬を細胞内に安全に輸送する技術があれば、現行よりもさらに多くの病気をペプチド医薬によって治療することができます。本法は、この細胞内へのペプチド医薬の運搬と細胞内の物質を標的としたペプチド医薬の能力向上に役立ちます。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to deliver functional peptides into cells without impairing their bioactivity. For this purpose, we developed a method (PNA zipper method) to connect and separate functional peptides and cell-penetrating peptides (CPP) via peptide nucleic acid (PNA). The intracellular activity of functional peptides delivered by this method was assessed. As a result, we found that the PNA zipper can transport the functional peptide into the cell as expected, and that the functional peptide exhibits a stronger bioactivity in the cell than the direct conjugate. In addition, we optimized the chain length of PNA used for the PNA zipper method.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ペプチド ペプチド核酸 細胞内運搬ペプチド オートファジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの機能性ペプチド(またはタンパク質)がどのように生体システム(細胞)のメカニズム・機能に関わっているかが理解されてきた。そして、このメカニズム・機能の理解をそのまま利用してペプチドを医薬として用いれば、新しい医薬を迅速に得ることができる。しかし現在、ペプチドを医薬として用いる場合、細胞表面上の受容体を標的にすることが多く、細胞内部の遺伝子、タンパク質、小器官を標的にすることはほとんどない。それは細胞内にまで機能性ペプチドをうまく運搬し、細胞内でその機能を発現・維持することが難しいためである。もし細胞内部のこれらをペプチド医薬の標的にできれば、標的の種類が格段に増え、これまで不可能だった病気の治療も可能になるだろう。このことから機能性ペプチドのドラッグデリバリーシステム(以下 DDS)のさらなる開発は必要である。

機能性ペプチドの細胞内 DDS において細胞内運搬ペプチド(以下 CPP)を用いる方法は、シンプルかつユニークである。従来法として機能性ペプチドと CPP とを直接連結させたもの(機能性ペプチド-CPP 直接連結体)がある。しかし一般的に CPP の配列は、正電荷を多く含み、その連結体が細胞内に運搬されても、CPP のせいで細胞内部にある RNA や DNA など負電荷を有する生体高分子と非特異的吸着を生じ、機能性ペプチドの機能(活性)が阻害されてしまう。そのため細胞内部で機能性ペプチドと CPP とを分離する方法が求められ、いくつかの研究グループにより検討されている。例えば、ペプチドと CPP とをジスルフィド結合を介して連結させたものやペプチドと CPP とにリガンドを修飾し、金属イオンを介して連結させたものなどがある。しかしこれらは、合成・精製の難しさによる収率の低下を含んでいたり、毒性が心配される金属イオンを用いたり、といった問題がある。

2. 研究の目的

我々は上記の背景を踏まえて、活性を損なうことなく(活性を保持して)機能性ペプチドを細胞内へ運搬することを目的とした。そのためにペプチド核酸(以下 PNA)を介して機能性ペプチドと細胞内運搬ペプチド(以下 CPP)を連結-分離させる方法(PNA ジッパー法; 図1)を開発する。本法は細胞表面上ではなく細胞内の物質を標的にすることができ、その成果は革新的な医薬開発につながる。

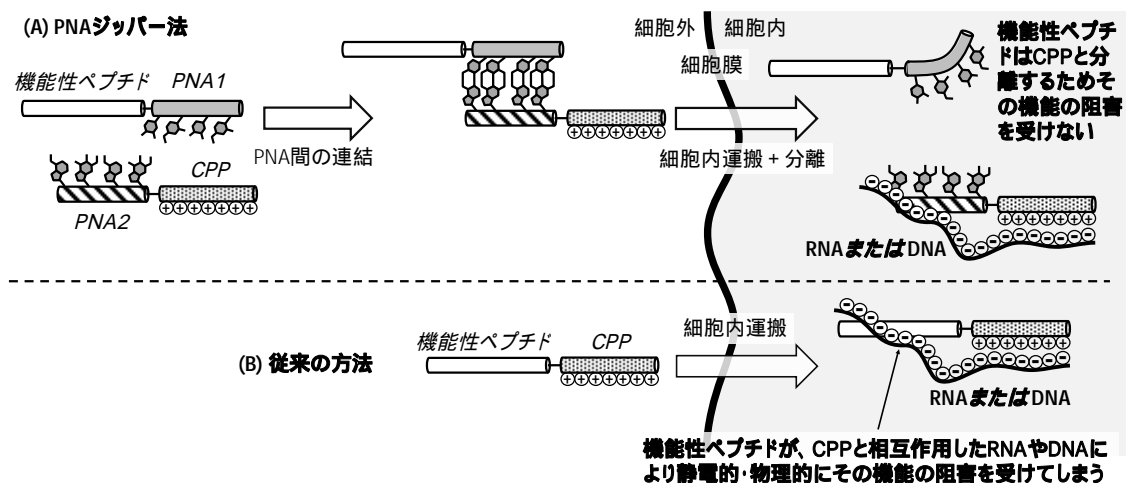


図1 PNA ジッパー法の概要。PNA ジッパー法は、PNA による連結-分離を介した CPP による機能性ペプチドの細胞内運搬法である(図1A)。PNA (PNA1) を修飾した機能性ペプチドおよび PNA1 に相補的な PNA (PNA2) を修飾した CPP を混合すると、細胞外では PNA1/PNA2 間でハイブリッドが形成される。その結果、機能性ペプチドと CPP は連結する。この連結体は CPP によって細胞内運搬される。運搬後の細胞内では、PNA の濃度が希薄になるため、PNA1/PNA2 間のハイブリッドが解消される。その結果、機能性ペプチドと CPP は分離する。従来法(図1B)では、機能性ペプチドは、CPP と共有結合で連結しているため分離されず、CPP と静電相互作用により非特異的に吸着した細胞内の RNA や DNA により静電的・物理的な妨害を受け、その活性が失われてしまう。一方で、PNA ジッパー法では、機能性ペプチドは CPP から分離するので、CPP の悪影響を受けずに本来の活性を十分に発揮できる。

3. 研究の方法

(1) PNA ペプチドの合成; PNA ペプチドとペプチド(下記の図2と図5)は、Fmoc ペプチド固相合成法で合成した。脱保護とカップリングは、室温で実行した。回収したペプチドの粗生成物をエーテルで沈殿させ、中性 pH になるまでさらにエーテルで洗浄した。次いで、ペプチドは、C18 分取カラム(Cadenza 5CD-C18; Imtakt)による逆相高圧液体クロマトグラフ(HPLC)で精製した。最終生成物の同定は、C18 分析カラム(Cadenza CD-C18; Imtakt)およびマトリックス支援レーザー

一脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF)質量分析装置(AXIMA Confidence;島津製作所)で行った。(2) 融解曲線;PNA ペプチドの等モル混合物のUV測定は、TMSPC-8 Tm分析システム(島津製作所)で行った。ペプチド濃度はそれぞれ5.0 μM、石英セル長は1 cmとした。ペプチドのモル濃度は、核酸塩基のモル吸光係数を用いて紫外可視分光計(V-560;JASCO)で測定した260 nmの吸光度から算出した。溶液を0.5 /0.5分で冷却し、260 nmでの吸光度を測定しながら、UV融解曲線を記録した。

(3) 蛍光滴定曲線;PNA ペプチドをそれぞれFamもしくはTmrで標識し、PNA ペプチド混合物の蛍光強度を蛍光分光計(FP-8200;JASCO)で測定した。石英セル長は1 cmとした。一方のPNA ペプチドの濃度は500 nMに維持し、もう一方のPNA ペプチドの濃度を変化させて、Fam/Tmr比を変化させた。蛍光強度は、励起波長495 nm、25 で測定した。蛍光滴定曲線は、525 nmの蛍光強度に基づいて記録した。

(4) 細胞運搬のためのPNA/PNAハイブリッドの調製;HeLa細胞は、FBS(Life technology)を添加したDMEM培地(Life technology)で、5%CO₂インキュベーター内、37 で培養した。各PNA ペプチドをそれぞれ500 μMでPBS(pH7.4;Life technology)に溶解した。等量の2種類のPNA ペプチドを氷上の0.2 mLチューブ中で混合した。次いで混合物を80 で10分間加熱処理し、その後iCycle(Bio-Rad)で1分間かけて4 に冷却した。ハイブリッドを、Opti-MEM(Life technology)を用いて各図の凡例に示す濃度に希釈し、細胞に添加するまで氷上で保存した。

(5) 細胞へのPNA/PNAハイブリッド送達の評価;PNA/PNAハイブリッドで処理する1日前に、HeLa細胞を1×10⁵細胞/ウェルの濃度でガラス底ディッシュ(マツナミガラス)に播種した。細胞をPBSで洗浄し、5%CO₂インキュベーター内で5 μMまたは1 μMのハイブリッドで2時間処理した。PBSで洗浄後、細胞を2%パラホルムアルデヒドで室温15分間固定し、PBSで洗浄した。細胞からの蛍光は、共焦点レーザー顕微鏡(CLMS;C2si Ready、ニコン)で観察した。データは、NIS-Elements Advanced studyソフトウェア(ニコン)で分析した。

(6) 細胞のオートファジー活性の解析;HeLa細胞を0.3×10⁵細胞/ウェルの濃度で24ウェルプレートのウェルに播種した。1日後、細胞をPBSで洗浄し、CO₂インキュベーター内で500 μL容量の5 μM PNA/PNAハイブリッドで3時間処理した。p62検出は、ペプチドハイブリッドで3時間処理後、500 μLの完全培地を細胞に添加した。次に細胞をインキュベーター内で20時間インキュベートした。その後、細胞溶解物をSDS-PAGE用に調製した。SDS-PAGEで分離した細胞タンパク質をPVDF膜(Merck Millipore)に転写した。次いで、膜に一次抗体を室温2時間標識し、次にHRPと結合した二次抗体で1時間処理した。Luminata Forte Western HRP基質(Merck Millipore)を膜に添加し、ImageQuant LAS 4010システム(GEヘルスケア)でシグナル検出した。

(7) 細胞毒性アッセイ;PNA/PNAハイブリッドで処理する1日前に、HeLa細胞(0.1×10⁵細胞/ウェル)を96ウェルプレートに播種した。細胞をPBSで洗浄し、5%CO₂インキュベーター内で10 μMのペプチドハイブリッドを3時間処理した。プレート内の細胞を1,200×gで5分間遠心分離して細胞破片を沈殿させ、上清を細胞毒性の定量に使用した。細胞毒性は、乳酸デヒドロゲナーゼの検出に基づく、CytoTox96非放射性細胞毒性アッセイ(Promega)で測定した。

4. 研究成果

我々ははじめにPNAペプチドをペプチド固相合成法によって調整した。図2は、合成したPNAペプチドであり、PNA1-CPPとPNA2-AIPは相補的なPNA/PNAハイブリッドが期待でき、PNA1-CPPとPNA3-AIPは、そのハイブリッドが期待されない。CPP-AIPは、CPPとAIPの直接連結体であり、ハイブリッドとの比較のため合成した。

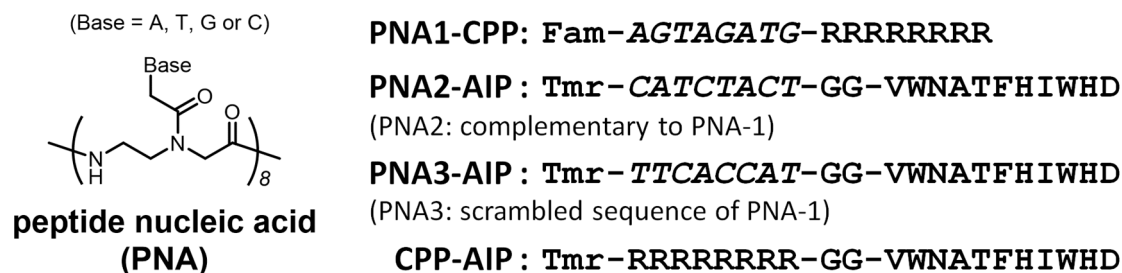


図2 PNAペプチドとペプチド。PNAの化学構造を左に示した。蛍光標識PNAペプチド(PNA1-CPP、PNA2-AIPとPNA3-AIP)および蛍光標識ペプチド(CPP-AIP)の配列を右に示した。斜体文字はPNA配列を示す。オートファジー誘導ペプチド(AIP)は、オートファジーを誘導することが以前に示されたものを用いた。オクタアルギニンを細胞透過ペプチド(CPP)として使用した。FamとTmrは蛍光色素である。

PNA1-CPPは、PNA2-AIPとハイブリッドを形成し、PNA3-AIPとハイブリッドを形成しないことは、UV融解曲線と蛍光スペクトルから確認した。我々はこの結果を踏まえ、PNAペプチドの混合物をHeLa細胞で処理して、細胞内にデリバリーできるか確認した(図3)。その結果、ハイブリッドを形成したときにだけAIPはCPPによって細胞内にデリバリーできることがわかった。ま

た、これら PNA1-CPP と PNA2-AIP は細胞内で分離して存在することを示唆する結果が得られた。

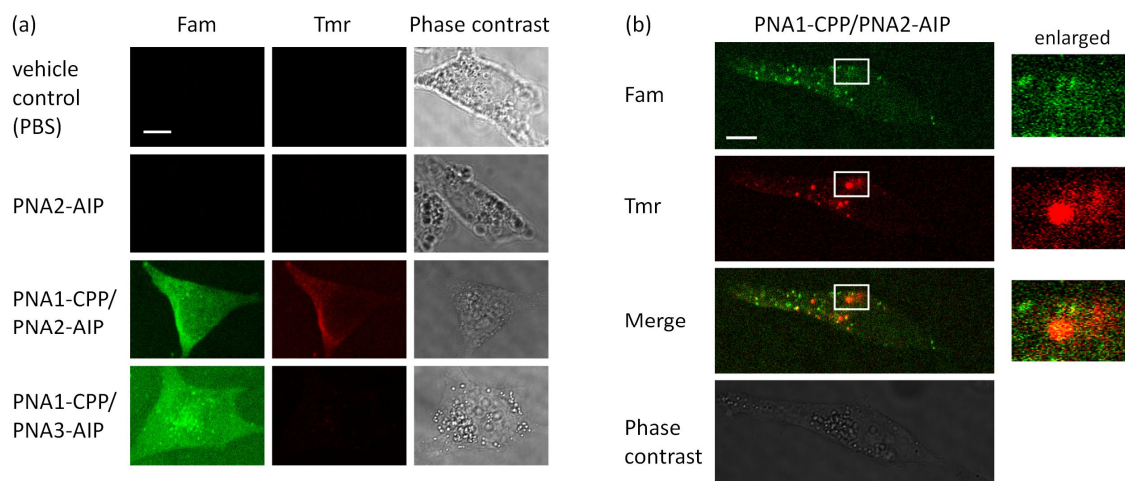


図 3 (a) 5 μM の PNA2-AIP、PNA1-CPP/PNA2-AIP ハイブリッド、または PNA1-CPP/PNA3-AIP 混合物で処理した HeLa 細胞の典型的な CLSM 画像。右パネルは位相画像であり、Fam 標識 PNA1-CPP および Tmr 標識 PNA2-AIP または PNA3-AIP は、それぞれ緑色および赤色の蛍光シグナルとして示されている。スケールバーは 10 μm である。(b) 1 μM 濃度で実施した結果。それ以外は(a)と同じ条件である。スケールバーは 10 μm である。右のパネルは、左のパネルの白い四角の拡大画像を示している。

続いて我々は、PNA1-CPP とのハイブリッド形成によって細胞内にデリバリーされた PNA2-AIP がオートファジーを誘導するか p62 の検出を行なった (図 4)。その結果、PNA2-AIP はうまく p62 タンパク質を減少させていることがわかり、オートファジーを誘導していることがわかった。この誘導について、我々は LC3 タンパク質の検出によっても確認できた。さらに我々は、このハイブリッドが直接連結体である CPP-AIP よりもさらに強いオートファジー誘導を示すことも明らかにした。

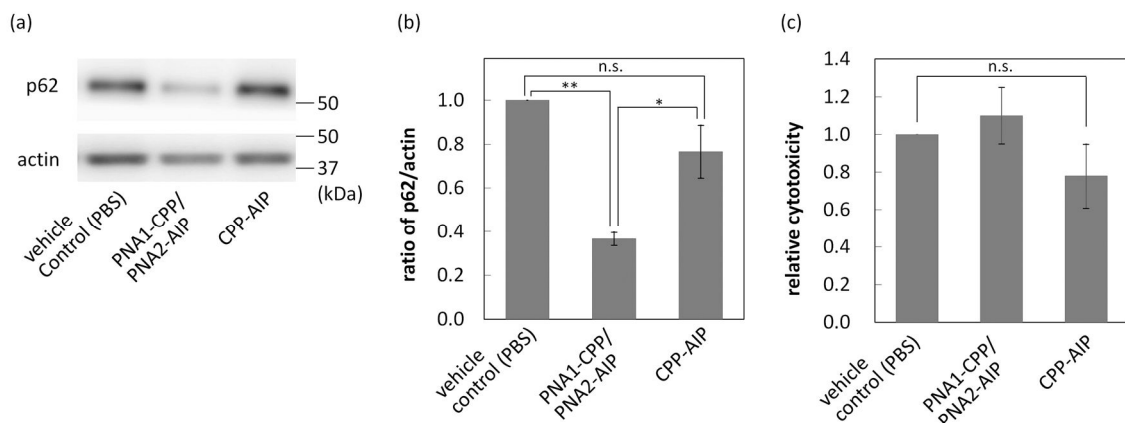


図 4 PNA1-CPP/PNA2-AIP ハイブリッドと CPP-AIP 直接結合体の比較。(a) 細胞を 7.5 μM PNA1-CPP/PNA2-AIP ハイブリッドまたは CPP-AIP とともに 3 時間インキュベートした。その後、培地を添加して、細胞をさらに 20 時間インキュベートした。p62 とアクチンのレベルをイムノブロットングによって解析した。p62 のバンド強度はアクチンのバンド強度に対して規格化した。分子量はメンブレンの右側に表示した。(b) コントロール (PBS) の p62/アクチン値を 1 に設定した比較。グラフは、3 つの独立した実験からの平均と標準誤差を表した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ である。(c) PNA1-CPP/PNA2-AIP ハイブリッドおよび CPP-AIP の細胞毒性。細胞を 10 μM の PNA1-CPP/PNA2-AIP ハイブリッドまたは CPP-AIP とともに 3 時間インキュベートした。細胞毒性を決定するために、上清中の乳酸デヒドロゲナーゼの量を評価した。コントロール (PBS) の細胞毒性を設定した。これらの結果、有意差は示されなかった。

次に我々は、この PNA ジッパー法を PNA の鎖長の点から最適化を行なうため、鎖長の異なる PNA ジッパーである An と Cm をペプチド固相合成法により調製した (図 5)。上述の PNA ペプチドと同様に An にはオートファジー誘導ペプチドを、Cm には CPP を連結させ、さらに PNA ハイブリッドの形成ならびに細胞内デリバリーを確認するためにそれぞれ Tmr 基および Fam 基を修飾している。

An		Cm	
A4:	Tmr-CATC-	VWNATFHIWHD	C4: Fam- GATG-RRRRRRRR
A6:	Tmr-CATCTA-	VWNATFHIWHD	C6: Fam- TAGATG-RRRRRRRR
A8:	Tmr-CATCTACT-	VWNATFHIWHD	C8: Fam- AGTAGATG-RRRRRRRR
A10:	Tmr-CATCTACTCA-	VWNATFHIWHD	C10: Fam- TGAGTAGATG-RRRRRRRR
A12:	Tmr-CATCTACTCACG-	VWNATFHIWHD	C12: Fam- CGTGAGTAGATG-RRRRRRRR

図5 鎖長の異なるPNAペプチドの配列。蛍光標識PNAペプチドであるTmr-PNAn-AIP (An; n = 4, 6, 8, 10, 12)およびFam-PNA_m-CPP (C_m; m = 4, 6, 8, 10, 12)の配列を示した。

我々はこれらのPNAペプチドのうちA12を用いて鎖長の異なるC_mとの混合物のUV融解曲線を測定した(図6)。その結果、C_mのmの値が増加(PNA鎖長が長くなる)につれて、明確なシグモイド状の曲線が確認でき、さらにT_m値が上昇することがわかった、このことは、PNA鎖長が長くなるにつれ、安定なPNAハイブリッドが形成されていることを示している。

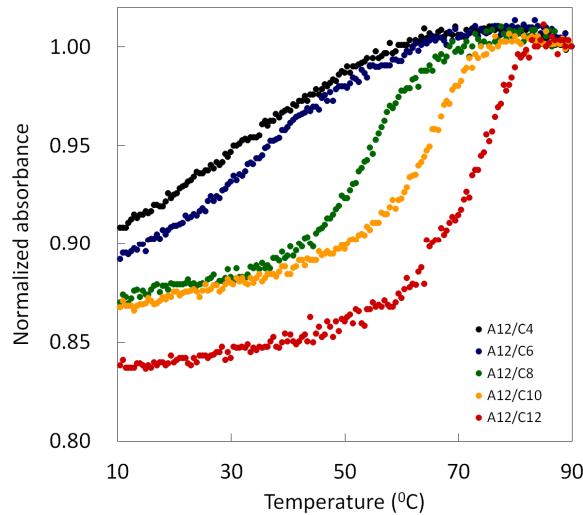


図6 A12とC_m (m = 4, 6, 8, 10, 12)のUV融解曲線(それぞれ黒、青、緑、黄、赤の黒丸)。観察された吸光度は90で規格化した。

図6の結果は、以下の図7による蛍光スペクトルによるPNAジッパーを形成の確認でもサポートすることができた。すなわち、PNA鎖長が増加するに従い、FRETによる明確なFam基由来の蛍光強度の減少が確認できた。我々は、これらのPNAジッパーで形成された連結体が細胞内にうまく運搬できること、さらには、鎖長に依存したオートファジー誘導も確認することができた。

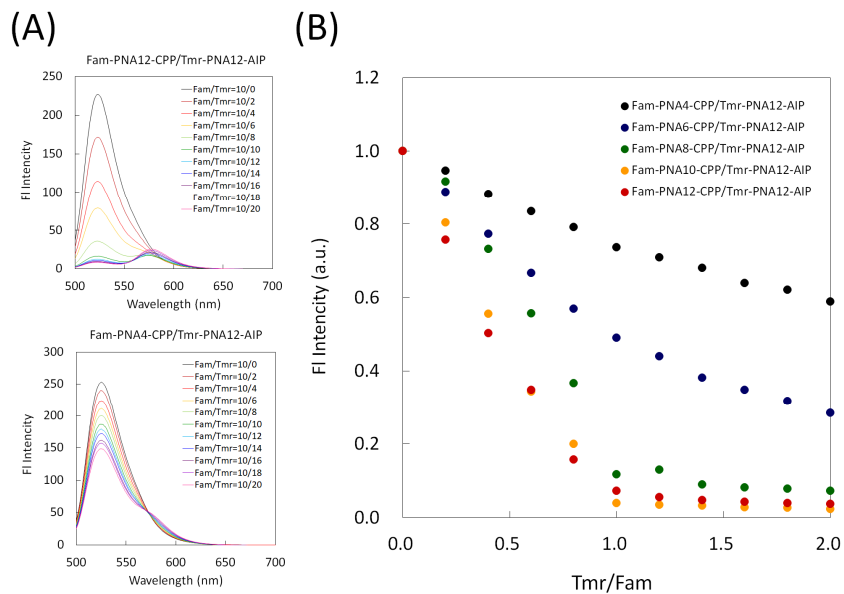


図7 (A)PBS(pH 7.0)中の様々な濃度のA12を含む500 nM C12(上パネル) およびC4(下パネル)の蛍光スペクトル。(B)A12/C_m (m = 4, 6, 8, 10, 12)のFam基の525 nmでの蛍光強度の滴定曲線(それぞれ黒、青、緑、黄、赤の黒丸)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshiyuki Hakata, Suzuka Ishikawa, Takashi Ohtsuki, Masaaki Miyazawa, Mizuki Kitamatsu	4. 巻 18
2. 論文標題 Intracellular Delivery of a Peptide Nucleic Acid-based Hybrid of an Autophagy-inducing Peptide with a Cell-penetrating Peptide	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic and Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 1978-1986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9OB02559F	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mizuki Kitamatsu, Hiroki Yuasa, Takashi Ohtsuki, Hiroyuki Michiue	4. 巻 33
2. 論文標題 Complementary Leucine Zippering System for Effective Intracellular Delivery of Proteins by Cell-Penetrating Peptides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116036-116041
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2021.116036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshiyuki Hakata, Kazuma Yamashita, Sonoko Hashimoto, Takashi Ohtsuki, Masaaki Miyazawa, Mizuki Kitamatsu	4. 巻 15
2. 論文標題 Adjusting Heterodimeric Coiled-coils (K/E zipper) to Connect Autophagy-inducing Peptide with Cell-penetrating Peptide	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 1048-1059
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics15041048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村高広, 博多義之, 宮澤正顯, 北松瑞生
2. 発表標題 ナフチル基修飾ロイシンジッパーによる機能性ペプチドハイブリッド形成およびその細胞内運搬
3. 学会等名 第37回関西地区ペプチドセミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村高広, 井上健, 藤本翔夢, 北松瑞生, 宮澤正顯, 博多義之
2. 発表標題 非天然アミノ酸を含むヘテロ二量体化ロイシンジッパーを用いた機能性ペプチドの細胞内運搬
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井康稀, 北松瑞生, 宮澤正顯, 博多義之
2. 発表標題 ペプチドジッパーによるオートファジー誘導ペプチドと細胞内運搬ペプチドの合成および評価
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第15回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村高広, 井上健, 藤本翔夢, 北松瑞生, 宮澤正顯, 博多義之
2. 発表標題 非天然アミノ酸を含むヘテロ二量体化ロイシンジッパーを用いた機能性ペプチドの細胞内運搬
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井康稀, 北松瑞生, 星野愛可里, 山口祐史, 宮澤正顯, 博多義之
2. 発表標題 ペプチド核酸ファスナーによる機能性ペプチドと細胞膜透過ペプチドの連結および細胞内活性評価
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井上健, 北松瑞生, 山下和真, 宮澤正顯, 博多義之
2. 発表標題 ペプチドファスナーによる機能性ペプチドと細胞膜透過ペプチドの連結および細胞内活性評価
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 北松瑞生, 石井康稀, 博多義之, 宮澤正顯, 道上宏之, 大槻高史	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 580
3. 書名 新規モダリティ医薬品のための新しいDDS技術と製剤化 第7章5	

〔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