

報告番号	甲 第 13126 号
------	-------------

## 主論文の要旨

論文題目 細胞内で機能するペプチドの探索法に関する研究  
(Study on the screening system of intracellular functionable peptides)

氏名 小崎 一功

## 論文内容の要旨

数分子から数十分子のアミノ酸で構成されるペプチドは生体内のタンパク質などと相互作用し、生体機能の制御を担う生体分子である。これまでに、様々な機能性をもつペプチドが発見されており、がんや代謝関連疾患、心血管関連疾患などの治療薬として利用されている。また、ペプチド医薬品は低コストで生産可能であるという低分子医薬品と、標的タンパク質との親和性が高く、副作用が少なく薬効が高いという抗体医薬品の利点を併せ持つ医薬品候補として注目されている。

現在販売されているペプチド医薬品の多くは細胞外で機能するものである。一方で、多くのタンパク質は細胞内に存在しているため、細胞内のタンパク質を標的とするような新薬開発が注目されている。近年、細胞内で機能を発揮し、細胞の機能を制御できるペプチドの研究が進められている。それらペプチドを利用した医薬品が開発されている。例として、活性酸素種や炎症性サイトカインの産生を抑制するペプチドが急性心筋梗塞の治療薬として臨床試験に進んでいることが挙げられる。このような細胞内で機能するペプチドは、これまでの治療薬と異なる分子を標的とする医薬品候補分子として注目されている。

現在、細胞外で機能するペプチドを探索するために、ファージディスプレイ法をはじめとするペプチドライブラリー作成によるペプチドの探索やタンパク質配列を元にした機能性断片の探索が行われている。しかしながら、細胞内で機能するペプチドを探索するためには、細胞内での機能性評価が不可欠である点やペプチド配列の最適化を行う実験が非効率的である点が課題として挙げられている。そのため、従来の探索法の課題を解決し、細胞内で機能するペプチドを効率よく探索できる新規の探索手法の構築が求められている。

細胞内で機能するペプチド探索において最も大きな課題は、細胞膜のバリア機能に阻まれ、ペプチドが細胞内に入らず、機能評価が難しいという点である。そのため、細胞内にペプチドを送達するために、細胞透過性ペプチド(Cell Penetrating Peptide; CPP)という特殊ペプチドが利用されている。細胞内に導入したい物質に CPP を化学的に修飾することでそれら物質を細胞内に送達することができる。これまでに、CPP を用いたペプチドや核酸誘導体、薬剤内包シリカゲルなどの細胞内送達による疾患治療への応用研究が行われている。このように CPP は様々な物質を細胞内に導入できる強力なツールである。しかしながら、塩基性や両親媒性という特徴をもつ CPP を付加することで機能性ペプチドの活性が変化してしまうことが報告されている。このような課題を解決するために、細胞内で分解される分子機構を組み込むことが研究されている。

我々の研究室では、細胞内で機能するペプチドの探索を目指したシステムの開発を行ってきた。多種類のペプチドをセルロースメンブレン上に合成するペプチドアレイ技術を基盤とし、CPP、光切断リンカーを組み合わせて、一度に多種類の CPP-ペプチド複合体を合成し、それぞれのペプチドを細胞内に送達するシステムを構築に成功している。本技術を用いて、CPP の一種であるオクタアルギニンに短鎖ペプチドを付加した際のペプチドの細胞内取り込み量の変化を評価し、付加するペプチドの特徴から細胞内に送達しやすいペプチド配列か否かを予測可能なことを明らかにした。このように、構築したペプチドの細胞内送達系はペプチドの細胞内機能評価に応用できる可能性が示唆されている。

本論文では、新薬のリード化合物になりうる細胞内で機能するペプチドを効率よく探索する技術の開発を目指した。これまで、当研究室で構築したペプチドの細胞内送達系を基盤とする、新たなペプチド探索手法の構築を試みた。背景を記述した第 1 章に引き続き、第 2 章では、多種類の CPP-ペプチド複合体を合成し、上述したペプチド細胞内送達系を用いて、実際にペプチドの細胞内機能評価を行い、一残基置換ペプチドライブラリーにおける活性の違いを明らかにした。第 3 章では、CPP がペプチドの機能性を変化させてしまう課題を解決するため、CPP と機能性ペプチドが細胞内で解離するシステムを組み込んだ評価系を開発した。それを用いて、細胞内で機能性ペプチドのみの活性を評価できることを明らかにした。最後に第 4 章では総括を行った。以下に各章の具体的な内容を述べる。

第 2 章では、我々の構築したペプチドの細胞内送達系を用いて、実際にペプチドの細胞内機能評価が可能か、ペプチド配列の最適化に応用可能かを検証した。既報の細胞死誘導ペプチド (LNLISKLF) を用いた細胞死活性評価により、CPP-機能性ペプチド複合体が高い細胞死活性を示すことを確認し、ペプチドの細胞内機能の評価できることを確認した。また、モデルとしたペプチドをアラニンスキャンによるアミノ酸置換部位の絞り込みと絞り込んだ部位の網羅的なアミノ酸置換を行い、元の配列と比較して細胞死活性が 2 倍から 4 倍高いペプチドの取得に成功した。本結果は、ペプチドの細胞内送達系を用いることで、ペプチド配列の最適化が可能であることを示している。また、ペプチド活性の向上したアミノ酸置換に注目すると、親水性の高いアミノ酸である S から疎水性の高いアミノ酸(F, V)や芳香環

をもつアミノ酸(F, W, Y)への置換が活性向上をもたらすという特徴が確認できた。疎水性アミノ酸や芳香環をもつアミノ酸は疎水性相互作用やπスタッキング相互作用といったタンパク質間相互作用に関わるアミノ酸であるため、それら相互作用が標的タンパク質との親和性及びペプチド活性に重要なことが示唆された。最後に、ペプチドの細胞死メカニズムを検証した。取得した高活性ペプチドは元のペプチドと同様の作用機序で細胞死を引き起こすことが示唆された。以上の結果より、我々の構築したペプチドの細胞内送達系は多種類のペプチドの細胞内機能評価を簡便に行うことが可能であり、ペプチドの最適化に有用な技術であることが示された。

第3章では、CPPの影響を排除した細胞内で機能するペプチドの探索系の構築を試みた。ペプチドアレイ技術を用いて、CPPと機能性ペプチドをジスルフィドで架橋する新規合成法を考案し、目的のヘテロ二量体ペプチドを合成可能か、本合成手法を組み込んだ系を用いてペプチド探索が可能か検証した。分岐鎖ペプチド合成技術を用いることで、CPPと機能性ペプチドを一つの分子内に合成することで、ジスルフィド架橋が分子内反応となるように設計した。質量分析によって、目的のヘテロ二量体ペプチドが選択的に合成されることが確認できた。また、還元剤を用いた処理及び細胞内のGSH濃度を模倣した還元環境でCPPが解離し、細胞内でペプチド本来の機能が評価できることが示唆された。また、細胞死を引き起こすペプチド(WELVVLGKL)をモデルとし、実際に活性を評価可能か、ペプチドの探索が可能か検証した。合成したヘテロ二量体ペプチドの細胞内機能評価に成功した。また、細胞死誘導ペプチドの1残基置換を行い、合計162種類のペプチドの細胞死活性を評価した。元ペプチドと比較して統計的に有意に活性の高いペプチドを6種同定することに成功した。以上の結果より、ペプチドの細胞内送達系をベースにジスルフィド架橋による細胞内切断システムを組み込んだ本系は、CPPの影響なくペプチド本来の機能を評価できる探索系であり、細胞内を標的とするペプチド医薬品開発に貢献できる技術である。

以上のように、本論文ではペプチド医薬品開発につながる細胞内で機能するペプチドを探索するための方法に関して述べた。我々が構築したペプチドの細胞内送達系を用いて、ペプチドの細胞内評価とペプチド配列の最適化が可能か検証(第2章)し、CPP付加の課題を解決するような系の改良(第3章)を行い、細胞内で機能するペプチドを効率よく探索できる新規手法の構築を行った。本研究により構築した探索系は、従来の細胞内で機能するペプチド探索において課題となっていた「ペプチド配列の最適化が困難なこと」及び「CPP付加によるペプチド活性への影響」を解決できる探索方法である。本探索方法を用いることで、細胞内で機能するペプチドの機能評価ならびに高活性な機能性ペプチドの同定、重要なアミノ酸残基の同定や活性をもたらすペプチドの特徴を評価することが可能である。そのため、本技術は医薬品開発のためのリード化合物探索ならびに細胞内分子の相互作用理解につながる技術であると考えている。ペプチドを元にする医薬品開発研究や細胞内分子を標的とする医薬品の開発は現在成長途上の分野であり、本技術が細胞内で機能するペプチド研究を推進し、ペプチドを元にした新薬開発に貢献できることを期待する。