

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**

小崎 一功

KOZAKI Ikko

名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of

Engineering, Nagoya University, Japan

目次

第1章 序章	1
1.1 ペプチドの医薬品応用.....	1
1.2 細胞内で機能するペプチド.....	3
1.3 細胞内で機能するペプチドの探索と課題.....	4
1.4 細胞透過性ペプチド(CPP)の利用.....	5
1.5 ペプチドアレイを用いたペプチドの細胞内送達系.....	7
1.6 本研究の目的と構成.....	9
第2章 細胞内送達系を利用した細胞内機能性ペプチドの探索	16
2.1 はじめに	16
2.2 実験方法	18
2.2-1 活性化メンブレンの作製.....	18
2.2-2 ペプチドアレイの作製.....	19
2.2-3 ペプチドのメンブレンからの遊離とペプチド含有培地の作製.....	21
2.2-4 樹脂合成ペプチド.....	21
2.2-5 細胞培養.....	22
2.2-6 細胞生存率の評価.....	23
2.2-7 細胞内 Ca ²⁺ 濃度測定.....	23
2.3 実験結果及び考察.....	28
2.3-1 細胞死誘導ペプチドの機能検証.....	28
2.3-2 アラニンスキャンによるアミノ酸置換の候補部位の推定.....	29
2.3-3 候補部位のアミノ酸置換による高活性ペプチドの探索.....	31
2.3-4 取得した高活性ペプチドの機能メカニズム評価.....	33
2.4 結言	43
第3章 細胞内でCPPが解離するシステムの構築と送達系への組み込み	45
3.1 はじめに	45
3.2 実験方法	46
3.2-1 活性化メンブレンの作製.....	47
3.2-2 ヘテロ分岐鎖ペプチドアレイの作製.....	47
3.2-3 Cys-Cys 間のジスルフィド架橋とペプチド溶液の調製.....	48
3.2-4 質量分析を用いたペプチドの合成、分解評価.....	48
3.2-5 細胞培養.....	49

3.2-6 細胞生存率の評価	49
3.3 実験結果と考察.....	50
3.3-1 CPP-機能性ペプチドの効率的なジスルフィド架橋法.....	50
3.3-2 目的ペプチドの合成評価と CPP 解離の検証.....	51
3.3-3 ペプチドの細胞内機能評価とペプチド探索への応用	53
3.4 結言	66
第 4 章 結論と今後の展望	68
参考文献.....	71
本博士論文に関する発表論文.....	78
書籍及び総説.....	78
学会発表.....	79
受賞	81
謝辞	82

第1章

序章

1.1 ペプチドの医薬品応用

ペプチドは数分子から数十分子のアミノ酸がペプチド結合でつながった分子であり、生体内のタンパク質や受容体と結合、相互作用して生体機能を制御している生体分子である。現在までに、様々な機能を有するペプチドが報告されている。最初に発見されたペプチドは血糖値を制御するインスリン[1]である。インスリンは1921年に発見されて依頼、糖尿病の治療薬として使用されている。その他にも、血圧の上昇作用をもたらすアンジオテンシン[2]や分娩時の子宮収縮を促すオキシトシン[3]など、様々な生理活性をもつペプチドが報告されている。これまでに機能性をもつペプチドを元にした医薬品開発が行われている。特に、がんや代謝関連疾患、心血管関連疾患の治療薬が多く開発されている[4]。それ以外にも腎疾患、消化管関連疾患、アレルギーなど幅広い領域の疾患に対する治

療薬開発が行われている。2015年には、医薬品全体の売り上げの5%をペプチド医薬品が占めており、今後成長が期待されている医薬品である[4]。

また、ペプチド医薬品は低分子医薬品と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。低分子医薬品は化学合成により、大量生産できるため、作製コストが安いという利点がある。一方で、低分子化合物は狭いポケット(300-1000 Å²) [5]に作用することは可能であるが、タンパク質間相互作用のように浅く、広い面(一般的に1500-3000 Å²) [5]と相互作用することは難しく、標的タンパク質親和性、特異性が低いという欠点がある[5]。抗体医薬品は高い標的タンパク質親和性、特異性をもち、薬効が高いことや副作用が少ないという利点がある[6]。一方で、抗体医薬品生産にはCHO細胞などの細胞を用いた生産が一般的であり、細胞の維持から抗体生産、精製が必要であり、生産コストが高いという欠点がある[6]。これらと比較して、化学合成で生産が可能であり、タンパク質と同じように相互作用をするペプチドは、低コストで高い薬効をもつ医薬品の候補分子の一つに挙げられている。

このように、ペプチドは医薬品の候補化合物として注目されており、新規の機能性ペプチドの発見を含めたペプチドの研究は、医薬品開発に貢献できる技術となりうる。

1.2 細胞内で機能するペプチド

現在販売されているペプチド医薬品のほとんどは細胞膜上に存在する受容体や細胞外タンパク質を標的としている。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間相互作用を標的とした新薬開発が注目されている[7]。

近年、細胞内で機能を発揮し、細胞の機能制御を行うことが可能なペプチドの研究が進められている。例えば、細胞内に入ることで細胞死を引き起こすペプチド[8-11]や、細胞分化を促進するペプチド[12]などが報告されている。特に細胞死を引き起こすペプチドは多数報告されている。例として、変異p53と結合してミスフォールディングを抑制し、変異p53の凝集を阻害することによって、p53の機能回復を促してがん細胞の細胞死をもたらすペプチドが報告されている[8]。このペプチドは抗がん剤のリード化合物として知られている。p53分解を阻害するペプチドの構造を模倣して開発された低分子化合物は、がん細胞に対して高い細胞死活性をもっている。本化合物は臨床試験に進んでおり[13]、新規の抗がん剤として使用される可能性がある(Fig. 1-1A)。

また、ペプチド自体を医薬品として使用する研究も進められている。虚血時に細胞内で活性酸素種や炎症性サイトカイン産生を促す δ -タンパク質キナーゼC

(PKC)を阻害するペプチド[14]が見つかり、本ペプチドは急性心筋梗塞の治療薬として臨床試験が行われている(Fig. 1-1B) [15]。

このように、細胞内分子を標的とするペプチド医薬品の開発が進められている。細胞内は新規の治療標的となりうるタンパク質が豊富であるため、細胞内で機能するペプチドは新薬の候補分子となりうる。したがって、細胞内で機能するペプチドの研究は今後発展していくことが期待される分野であり、有用な細胞内機能性ペプチドを発見することは、新規薬剤を創出することに貢献できると考えられる。

1.3 細胞内で機能するペプチドの探索と課題

1.2で述べたように、細胞内で機能するペプチドは創薬研究において注目されている分子であり、効率よく探索するための手法の開発が求められている。しかしながら、細胞内で機能するペプチドの探索には細胞膜のバリア機能という大きな障壁が存在する。一般的に親水性分子であるペプチドはそれ単体では脂質二分子膜で構成される細胞膜に阻まれ、細胞内に入らないという問題がある[16, 17]。そのため、ペプチドの細胞内機能評価は細胞外での機能評価に比較して困難である。

現在、細胞内で機能するペプチドを探索する方法は主に2つ挙げられる(Fig. 1-2) [18]。1つ目は、ディスプレイ法を用いて標的タンパク質と相互作用する候補ペプチドを絞り込んだ後に、細胞内に送達するツールを用いて細胞内に候補ペプチドを入れて機能評価を行う方法である。2つ目は、プラスミドを用いて断片化タンパク質を細胞内で発現させて、機能性ペプチド断片を同定するという方法である。これらの手法により多くのペプチドが発見されているが、探索における課題がある。ディスプレイ法を利用する方法では、親和性でペプチドを絞り込むため、細胞内評価の際にペプチドが目的の機能を発揮しない可能性がある[19]。断片化タンパク質を発現する方法では、プラスミド作製や細胞内導入操作が必要であり、評価できるペプチドライブラリーが小さいという課題がある。そして、両手法ともに、ペプチド配列を最適化するという実験を行うことが困難である[20, 21]。そのため、従来法の課題を解決し、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。

1.4 細胞透過性ペプチド(CPP)の利用

1.3で述べたように、細胞内で機能するペプチドを評価するためには、ペプチドの細胞内導入が必要となる。ペプチドなどの生体分子を細胞内送達するために「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[22]。CPPは細胞膜を透過する性質をもつため、CPPを合成したのち、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を細胞内に送達することができる[23]。これまでに、多くのCPPが発見、開発されている。例えば、リジンやアルギニンといった塩基性に富むCPP (HIV-1 Tatタンパク質由来のTatペプチド[24]やオクタアルギニン[25])や塩基性部分と疎水性部分を要する両親媒性CPP (*Drosophila*のAntennapediaタンパク質由来のPenetratin) [26]などが挙げられる。このようなCPPを用い、種々の生体関連物質(タンパク質、核酸など)や低分子機能性化合物などが種々の細胞内に導入され、医薬品としての応用が検討されている。ペプチドの細胞内導入による急性心筋梗塞の治療薬開発[14, 15]のみならず、CPPの核酸誘導体の細胞内導入によるディシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬の開発[27, 28]や抗がん剤内包シリカゲルをCPPで送達し、がん細胞内で薬剤を放出してがん細胞死を促すナノマテリアル開発 [29]などが行われている。このように、CPPは様々な分子を細胞内に導入でき、それら分子の基礎研究から応用研究、臨床研究など幅広い分野で使用されるツールの一つである[23]。

しかしながら、CPP付加が機能性ペプチドの活性に影響を与えてしまう可能性も指摘されている[30]。上述したように、CPPは高い塩基性や両親媒性といった特徴をもっている。そのため、CPPを付加した機能性ペプチドに対して、電荷や

疎水性を付与することとなり、ペプチドの物理化学的な特性に影響してしまうケースがある。実際に、BCL6という転写制御タンパク質を阻害する免疫細胞の分化調節ペプチドでは、細胞を使用しない評価では効果が見られたものの、CPPを結合し細胞内に導入するとペプチドの機能が見られないことが報告されている[31]。このように、CPP付加による機能性ペプチドの活性への影響をなくすために、細胞内環境で分解される結合でCPPと機能性ペプチドをつなぐ研究が行われている[32]。細胞内で分解される結合の例として、ジスルフィド結合やヒドラゾン、*cis*-アコニチルリンカーなどが開発されている。これらの結合機構をCPPと機能性ペプチドの連結に用いることで、細胞内でCPPが機能性ペプチドから解離し、機能性ペプチド本来の機能を発揮させることが可能になる[33, 34]。そのため、機能性ペプチド本来の細胞内活性を評価するためには、このような細胞内で分解される結合機構の利用が望ましい[32]。

1.5 ペプチドアレイを用いたペプチドの細胞内送達系

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[35]。多種類のペプチドをセルロースメンブレン上に合成し、ペプチドと標的分子の相互作用解析に用いられる「ペプチドアレイ」技術[36-39]と細胞内送達のための「CPP」、UV照射(365 nm)によって分解される「光切断リ

ンカー」[40]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した(Fig. 1-3)[35]。本系では、まず、セルロースメンブレン上にフォトリンカー、CPP、候補ペプチドの順番で固相合成を行う(Fig. 1-3A)。次に、UV照射によって光切断リンカーを分解し、セルロースメンブレン上からCPP-ペプチド複合体を遊離させ(Fig. 1-3B (i))、各ペプチドスポットをマルチウェル用ろ過フィルターにパンチアウトする(Fig. 1-3B (ii))。その後、細胞処理用の溶液をウェルに加えてスポットに合成されているペプチドを溶出し(Fig. 1-3B (iii))、不純物除去のためにペプチド含有培地をろ過する(Fig. 1-3B (iv))。この操作によって得られたペプチド溶液をあらかじめ細胞が播種してあるマルチウェルプレートに加えて、各ペプチドの機能を評価する(Fig. 1-3B (v))。本系では1スポットあたり10~20 nmol程度のペプチドが合成され、細胞評価に十分な量のペプチドを取得することが可能である。

本研究室では構築したペプチドの細胞内送達系を用いて、CPPの一種であるオクタアルギニン(R8)にランダムトリペプチド及びペンタペプチドを合成した際に、細胞内導入効率に変化が見られるか検証した[35]。ペプチドの付加により、R8の細胞内導入効率に変化が見られ、その変化の特徴を「付加したペプチドの疎水性と等電点」で性質分けすることができ、ペプチドの性質から細胞内に導入しやすい配列か否かが予測可能なことを明らかにした(Fig. 1-4)[35]。

このように、構築したペプチドの細胞内送達系は一度に多種類のペプチドを細胞内に導入することが可能であり、ペプチドの細胞内機能を評価することに貢献できる技術だと考えられる。

1.6 本研究の目的と構成

ペプチドは標的分子に対する特異性が高いことに加えて、低コストでの生産が可能であるため、医薬品の候補化合物として注目されており、今後の成長が期待されている。その中でも、細胞内分子を標的とするペプチドは既存の医薬品と異なる分子を標的とする新薬開発につながる可能性がある。

そこで本研究では、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、これまでに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行った。多種類の CPP-ペプチド複合体を合成、細胞内送達することが可能な本系を用いて、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(Fig. 1-5)。また、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(Fig. 1-5)。

本論文は第 1 章から第 4 章で構成される。

第 1 章では、細胞内で機能するペプチド探索における課題と課題解決に関わる技術に関して議論した。

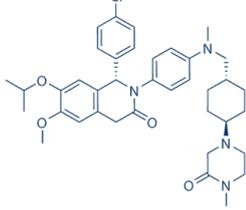
第 2 章では、ペプチドの細胞内送達系が細胞内で機能するペプチドの探索に有用か検証した。具体的には、細胞内に入ることで細胞死を引き起こすペプチドをモデルペプチドとして用いて、ペプチドの細胞内機能評価が可能か検証した。また、モデルペプチドのアミノ酸置換により細胞死活性の高いペプチドが取得可能か検証した。

第 3 章では、細胞内で解離するシステムをペプチドの細胞内送達系に組み込み、CPP の影響を排除したペプチドの探索を可能にできるか検証した。具体的には、細胞内の還元的環境で分解されるジスルフィド結合で CPP と機能性ペプチドを効率よく架橋できる新規合成方法を構築した。その後、合成した CPP と機能性ペプチドのジスルフィド架橋ペプチドが還元的環境で分解されて目的の CPP の解離が起こるか検証した。最後に、第 2 章と同様に細胞死を誘導するペプチドをモデルとしてペプチドライブラリーを作成し、ペプチド探索に応用可能か検証した。

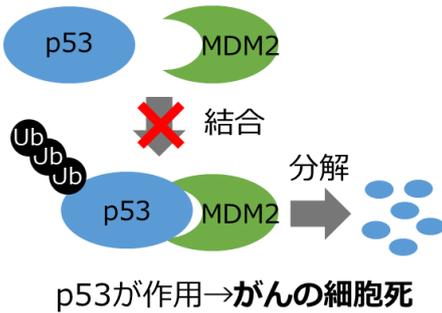
第 4 章では、これらの結果をまとめ、今後の展望に関して述べた。

(A) 抗がん剤 (NVP-CGM097)

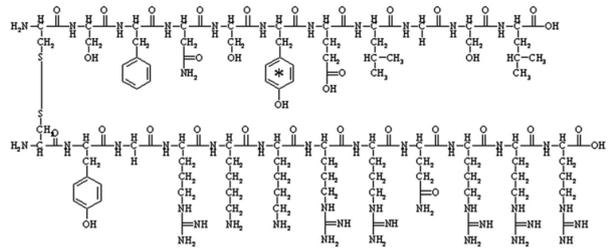
MPRFMDYWEGLNを模倣



MDM2によるがん抑制タンパク質 p53の分解を阻害



(B) 急性心筋梗塞治療薬(KAI-9803)



虚血時の δ PKC経路の活性酸素種(ROS)と炎症性サイトカイン産生を阻害

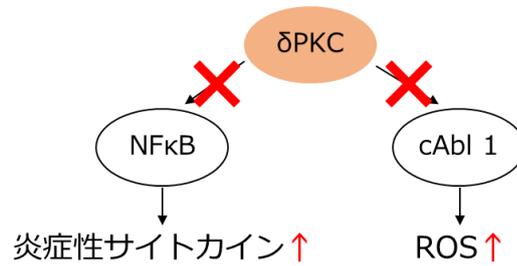


Fig. 1-1 ペプチドを元に開発された医薬品

- (A) ペプチド構造を元に設計された抗がん剤(NVP-CGM097)の構造と作用機序の概要
- (B) ペプチドを元にした急性心筋梗塞治療薬(KAI-9803)の構造と作用機序の概要

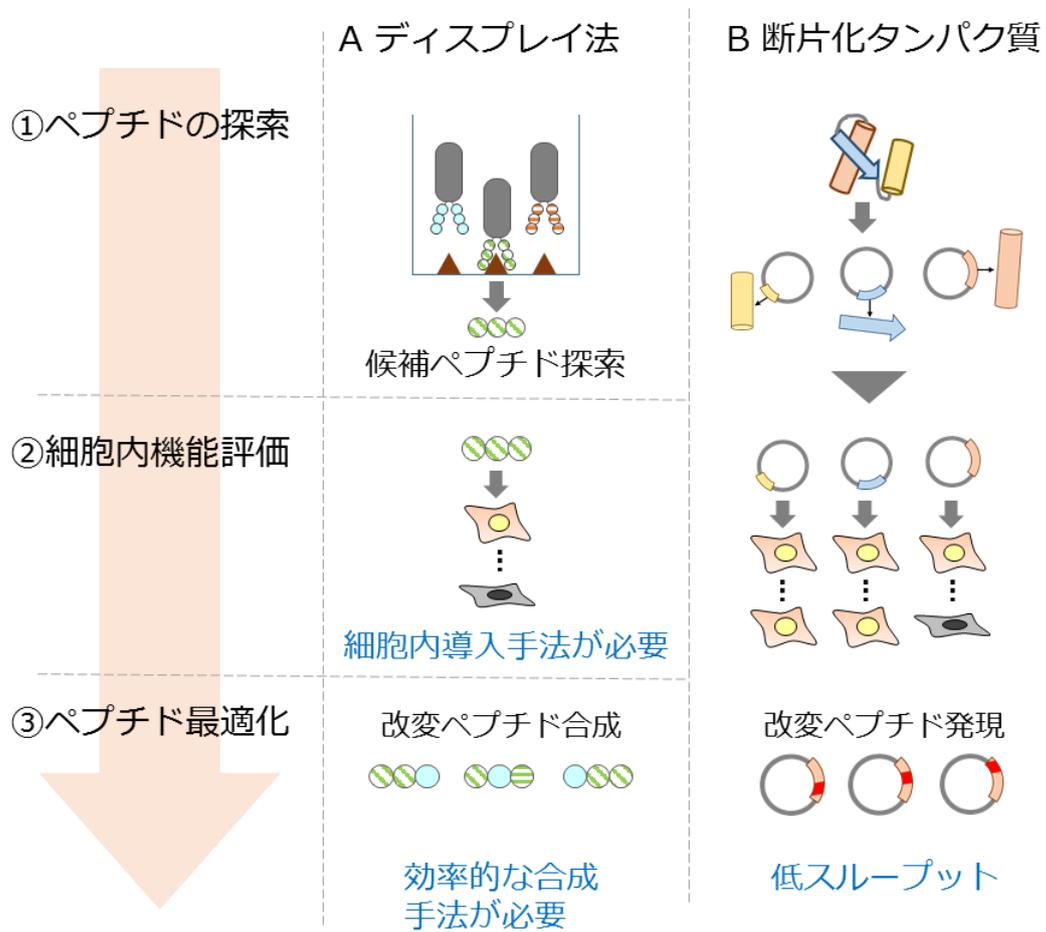


Fig. 1-2 一般的な細胞内で機能するペプチドの探索法

細胞内で機能するペプチドを探索する一般的な方法を示している。A はディスプレイ法を用いて候補ペプチドを同定し、細胞内機能を検証するという方法である。B はプラスミドを用いてタンパク質を断片化し、候補ペプチドドメインを同定する方法である。

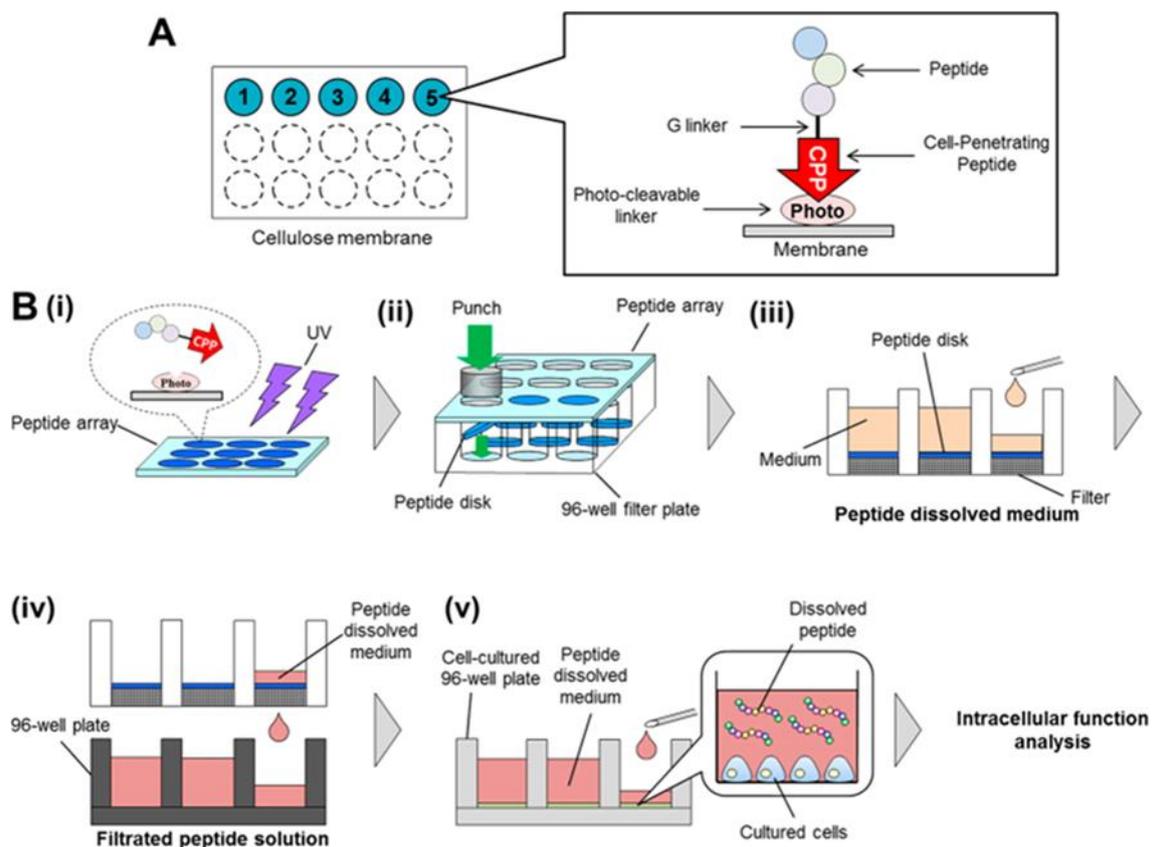


Fig. 1-3 ペプチドの細胞内送達系概要 (参考文献 35 より引用)

我々の研究室で開発されたペプチドの細胞内送達系の概要を示している。

(A) CPP-機能性ペプチド複合体の合成

(B) ペプチド溶液調製のスキーム

(i) UV 放射による光切断リンカーの分解、(ii) 各スポットを 96 well ろ過フィルターにパンチアウト、(iii) 細胞試験用の溶液でペプチドを溶出、(iv) 吸引ろ過により、ペプチド含有溶液を取得、(v) ペプチド溶液を細胞へ添加

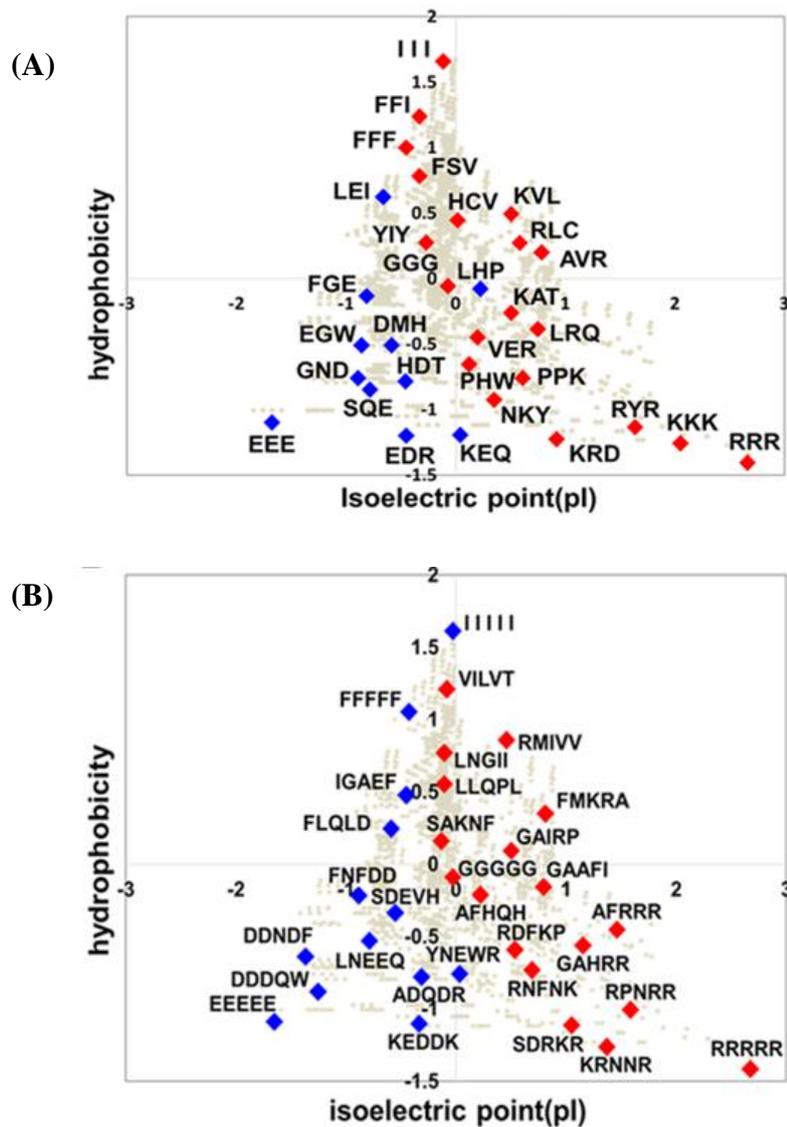


Fig. 1-4 ペプチドの細胞内導入効率の評価 (参考文献 35 より引用)

オクタアルギニン(R8)にペプチドを付加した際の細胞内導入量の変化を示している。R8より導入量が高いペプチドは赤、低いペプチドは青で示している。(A)トリペプチド、(B)ペンタペプチドの結果。疎水性が高いもしくは正電荷に富むペプチドは導入量が高く、負電荷のペプチドは導入量が低いという特徴が確認されている。

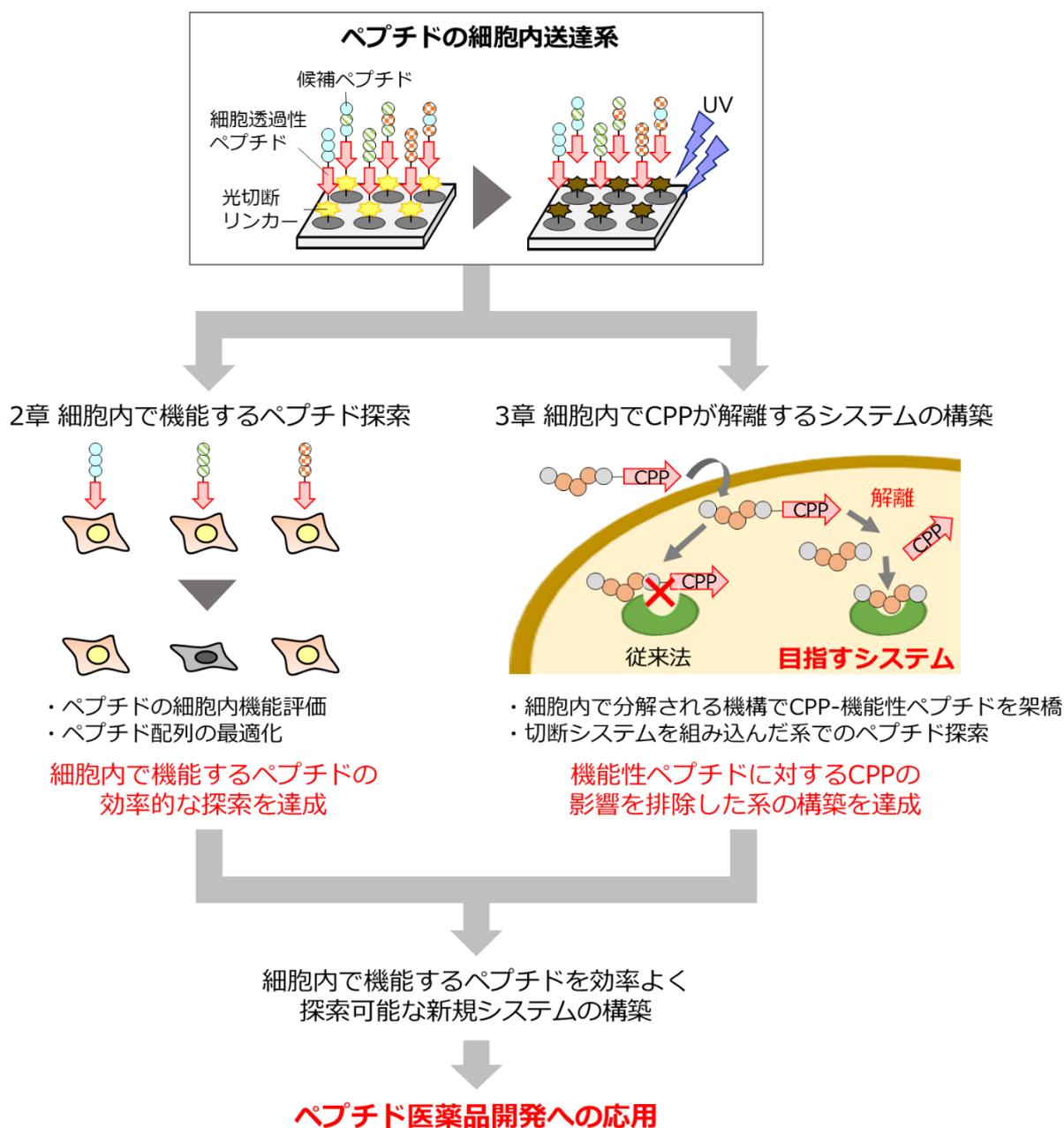


Fig. 1-5 本研究の概要

本研究の概要を示している。本研究は、ペプチド医薬品開発に貢献できる系の構築を目指し、ペプチドの細胞内送達系の利用・改良による細胞内で機能するペプチドを探索する手法の開発を行った。2章では、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を評価し、ペプチド配列の最適化が可能かを検証した。3章では、CPPと機能性ペプチドの架橋が細胞内で分解できるシステムを構築し、CPPの影響を排除できるペプチドの探索系構築を目指した。

第 2 章

細胞内送達系を利用した 細胞内機能性ペプチドの探索

2.1 はじめに

細胞内で機能するペプチドは既存の医薬品と異なる分子を標的とできる可能性があり、画期的な新薬の開発につながる候補化合物として注目されている。細胞の中で機能するペプチドの探索には、細胞内での機能評価が必要不可欠である。しかしながら、ペプチド自身の細胞膜透過性が低いため、細胞内にペプチドを入れるという操作が必要となる[16, 17]。また、細胞内で機能するペプチドを探索する従来の方法では、機能性ペプチド配列及びドメインを同定することが可能であるが、同定した配列やドメインを最適化するためには、多種類のペプチド合成及び評価が必要となる[18]。このように、細胞内で機能するペプチドの探

索において、「ペプチドの細胞内機能評価が困難である点」と「ペプチド配列の最適化が困難である点」という2つの課題が存在する。

上記の課題解決に向けて、我々の研究室ではペプチドを細胞内に送達する技術を開発してきた[35]。本系はペプチドアレイ技術と CPP、光切断リンカーを組み合わせたものであり、一度に多種類の CPP-機能性ペプチド複合体を合成できる系である。CPP の付加により、ペプチドの細胞内送達を達成できる。また、ペプチドアレイは任意のペプチドライブラリーを設計可能なため、ペプチド配列の最適化に適した技術である[41]。そのため、本系は細胞内でのペプチド機能を評価及びペプチド配列の最適化への応用が可能だと考えられる。

本章では、我々が構築したペプチドの細胞内送達系を用いて、「ペプチドの細胞内機能評価が可能か」、「機能性ペプチドの配列最適化が可能か」という2点を明らかにし、本系が細胞内で機能するペプチドの探索において有用であるかを調べた。実際には、既報の細胞死誘導ペプチドをモデルとして細胞試験を行い、機能評価が可能かを検証した。また、ペプチド配列の最適化に関しては、モデルペプチドのアミノ酸置換を行い、細胞死活性の高くなるようなペプチドの改変を試みた。これらの検証により、我々の開発したペプチドの細胞内送達系が細胞内で機能するペプチドの効率的な探索を達成できるかを検証した。

2.2 実験方法

2.2-1 活性化メンブレンの作製

セルロースろ紙として、FILTER PAPER 542 HARDENED ASHLESS 24.0 cm (1542-185、Whatman、England)を使用し、これを 10 cm × 14 cm の大きさに裁断したもの(以下メンブレン)を実験に使用した。メンブレンを、ポリプロピレン製のタッパーに入れ、DMF (N,N-dimethylformamide) (A00185、関東科学株式会社、東京) 150 mL で 1 日振とうさせた。次に、Fmoc-β-Ala-OH (K00410、渡辺化学工業株式会社、広島)、1-Methylimidazole, redistilled, 99+% (336092-100ML、SIGMA-ALDRICH、USA)、DIPCI (N,N'-Diisopropylcarbodiimide) (A00011、渡辺化学工業株式会社)を用い、β-アラニン溶液 (32 mL 0.5 M β-Ala, 1.6 mL 1-Methylimidazole, 2 mL DIPCI in DMF 100 mL) を作製した。この溶液に 20 枚のメンブレンを浸し、2 日間振とうさせることでセルロースメンブレンの OH 基と β-アラニンの COOH 基がエステル結合した活性化メンブレンを作製した。1-Methylimidazole と DIPCI は 1 日で活性が落ちてしまう恐れがあるため、振とう 1 日後に 1.6 mL 1-Methylimidazole, 2 mL DIPCI をさらに加えた。

その後、未反応 β-アラニンを除去するために DMF で活性化メンブレンの洗浄を 5 min×3 回、メタノール (139-01827、和光純薬株式会社、大阪)での洗浄を 5

min×3 回行った。そして、自然乾燥させ、真空パックに入れて 4 °Cにて保存した[42]。

2.2-2 ペプチドアレイの作製

ペプチドアレイの作製法は 2.2-1 の手法によって作製した活性化メンブレン上で、ペプチド合成において最も頻繁に用いられる Fmoc 固相合成反応を用いた (Fig. 2-1) [42]。材料となるアミノ酸は Fmoc-アミノ酸(使用したアミノ酸は Table 2-1 に示す。全て渡辺化学工業株式会社で購入)溶液 (in NMP (N-メチル-2-ピロリドン) (133-15115、和光純薬株式会社))に DIPCI、1-hydroxybenzotriazole (HOBT Anhydrous) (A00015、渡辺化学工業株式会社)を混合し、終濃度がそれぞれ 0.25: 0.5 : 0.5 [M]となるように混合したものをを用いた。まず、20% piperidine / DMF (A00177、渡辺化学工業株式会社)にメンブレンを 1 h 浸すことで Fmoc 基を脱保護した。DMF で洗浄(5 min×3 回)を行い、piperidine を完全に除去した後にメタノールで洗浄(1 min×3 回)を行い、1% BPB (ブロモフェノールブルー) (021-02911、和光純薬株式会社) 溶液(in DMF)を 100 μ L、と酢酸(017-00256、和光純薬株式会社) 100 μ L をメタノール溶液に加え、NH₂ 基を染色した。その後、活性化アミノ酸を peptide synthesizer (ASP222、IntavisAG、Köln, Germany)を用いてメンブレン上にスポットティングした。(1 残基目は 1 spot =0.8 μ L × 3 回、2 残基目以降は 1

spot = 1.1 μ L \times 3 回の条件でアミノ酸をスポットティング。) 1 残基目には光分解性リンカーである Fmoc-Photo-Linker (分子量 520.26、sc-294977A、SANTA CRUZ、USA) を合成した。1 残基目合成後は、メンブレンを DMF (5 min \times 3 回) で洗浄することで未反応の活性化アミノ酸を取り除いた。さらに、未反応アミノ基をブロッキングするために、5% 無水酢酸(011-00276、和光純薬株式会社) 溶液(in DMF) 50 mL を 15 min \times 2 回反応させ、活性化メンブレン上の未反応アミノ基をアセチル化した。以上の Fmoc 基の脱保護、アミノ酸のスポットティング、未反応アミノ基のブロッキング操作を繰り返し行い、ペプチドアレイの作製を行った。Fmoc-Photo-Linker は通常のペプチド合成で使用する標準的な試薬に安定である一方で、350 nm~400 nm の紫外線照射によって、セルロースメンブレン上からの分解反応が急速に進行することから、ペプチド伸長及び洗浄操作を遮光状態にて行った。

ペプチド伸長反応終了後、20% piperidine / DMF を 1 h 反応させ、Fmoc 基を完全に脱保護した。さらに、各アミノ酸側鎖に結合している保護基を除去するため、脱保護試薬(trifluoroacetic acid (TFA)) (A00025、渡辺化学工業株式会社) : m-クレゾール(034-04646、和光純薬株式会社) : 1,2-Ethanedithiol (EDT) (A00057、渡辺化学工業株式会社) : チオアニソール(T0191、東京化成工業株式会社、東京) = 40 : 1 : 3 : 6 を 50 mL 作製し、メンブレンを 2.5 h 浸した。脱保護後、残存試薬を取り

除くためにジエチルエーテル(051-01157、和光純薬株式会社)で 5 min×3 回洗浄し、さらに、メタノールで 5 min×3 回洗浄した。その後、メタノールで 1 h 洗浄を 5 回繰り返した後、一晩メタノール洗浄を行い、実験に用いた。

2.2-3 ペプチドのメンブレンからの遊離とペプチド含有培地の作製

まず、2.2-1~2.2-2 の操作によってペプチド配列を合成したペプチドアレイを Fmoc の脱保護、側鎖の脱保護をした。ペプチドアレイはメタノールで洗浄後、自然乾燥させた。乾燥後、ペプチドアレイ上のペプチドを遊離させるため、トランスイルミネーター(DT-20LCP、Atto, 東京)を用いて 365nm の UV を 3h 照射した [35]。UV 照射後、96 well 用ろ過フィルター(MSRLN0410、MultiScreen HTS Vacuum Manifold、Merck Millipore、German)にペプチドアレイ上の各スポットを 1 スポットずつパンチアウトした。ペプチドを溶解させるために無血清 Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM) (08458-16、ナカライテスク、京都)を 150 μ L/well ずつ加え、37 °C、1h ペプチドを溶出した。その後、各ペプチド溶液を減圧ろ過で 96 well plate (TR5003、日本ジェネティクス株式会社、東京)に回収した。

2.2-4 樹脂合成ペプチド

ペプチド濃度を統一した条件下で評価するために、樹脂合成によって得られたペプチドを実験に用いた。ペプチドは CS bio 社(China)で純度 95%以上のものを購入した。合成ペプチドはモデルペプチド(LNLISKLF-R8)とその改変ペプチド 4 種(LNLIFKLF-R8, LNLIVKLF-R8, LNLIWKLF-R8, LNLIYKLF-R8)を受託し、それぞれ 1 mM となるように無血清 DMEM に溶解した。作製したペプチド含有培地は滅菌フィルター(25CS020AS、ADVANTEC、東京)を用いてろ過滅菌した後、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保管した。

2.2-5 細胞培養

MCF-7 細胞は $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% Air 下の CO_2 インキュベータ内で、細胞培養用 T75 フラスコ(658170、greiner bio-one、Frickenhausen、Germany)で培養した。培地は 10% FBS (biosera、NUAILLE、France)および 1% Penicillin-Streptomycin (PS) (15140122、和光純薬工業)を含む DMEM を用いた。継代操作はサブコンフルエント状態(80~90%)になった細胞の培地を除き、PBS で 2 度洗い流した後、トリプシン処理により細胞培養ディッシュから剥がして再播種した。細胞数の測定は血球計算板を用いて行い、初期細胞数が 2.0×10^5 cells/flask となるように再播種した。

2.2-6 細胞生存率の評価

2.2-5 の手法で培養した MCF-7 細胞を初期細胞数 1.0×10^4 cells/well となるように 96 well plate に播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で 24 h インキュベートした。24 h 後、培地を除去し、2.2-3 で調製したペプチド含有培地、または 2.2-4 で調整したペプチド含有培地を、原液もしくは無血清 DMEM で希釈して 100 μL ずつ各 well に加え、37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で 3 h インキュベートした。3 h 後、ペプチド含有培地を除去し、10% FBS、1% PS 含有 DMEM と cell counting Kit-8 (347-07621、Dojindo、熊本) [43] を 10:1 の割合で混ぜた溶液を 100 μL ずつ加えて 37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で 1.5 h インキュベートした。その後、450 nm の吸光度を測定し、各 well の細胞生存率を算出した。細胞生存率の算出方法は以下の式に従った。

$$\text{Cell viability [\%]} = \frac{(\text{サンプルの吸光度}) - (\text{ブランクの吸光度})}{(\text{コントロールの吸光度}) - (\text{ブランクの吸光度})}$$

※コントロール：未処理のウェル(細胞有り)、ブランク：細胞無しのウェル

2.2-7 細胞内 Ca²⁺濃度測定

細胞内の Ca²⁺濃度の測定には Fluo-4 DirectTM Calcium Assay Kit (F10471、invitrogen、USA)を用いた。Fluo-4 Direct は蛍光性カルシウムインジケータで

あり、細胞内の Ca^{2+} の濃度に応じて蛍光を発する。試薬を説明書にしたがって調整し、実験に使用した。

細胞外からの Ca^{2+} の流入を防ぐために、 Ca^{2+} を含まない溶液を用いて実験を行った。本実験では Ca^{2+} フリーの Krebs-ringer modified buffer (KRB : 125 mM NaCl (191-01665、和光純薬工業), 5 mM KCl (163-03545、和光純薬工業), 1 mM Na_3PO_4 (191-02885、和光純薬工業), 1 mM MgSO_4 (131-00405、和光純薬工業), 5.5 mM glucose (049-31165、和光純薬工業), 20 mM HEPES (342-01375、和光純薬工業) pH 7.4)を用いた[44]。各試薬を純水に溶解、pH 調整を行い、メスアップした後に滅菌フィルターを用いてろ過滅菌した。

2.2-5 の手法で培養した MCF-7 細胞を 5.0×10^4 cells/dish となるように、ガラスベースディッシュ(3910-035、IWAKI、東京)に播種し、 37°C 、5% CO_2 インキュベータ内で 24 h インキュベートした。24 h 後、培地を除去し、調整した 2×Fluo-4 Direct カルシウム試薬ローディング溶液と無血清 DMEM を 1 : 1 で混合して加え、30 min 染色を行った。染色後染色溶液を除去し、調整した KRB で洗浄した。洗浄後 KRB を 1.9 mL 加えた状態で蛍光顕微鏡(IX81, オリンパス、東京)にセットし、ペプチド含有培地 0.1 mL 添加と同時にタイムラプス観察(10 s おき 5 min)を行った。本実験による蛍光画像は、Spinning Disk Confocal system (CREST

OPTICS, X-Light V1, Rome, Italy)を用いて 488 nm のレーザーで励起して取得した。細胞内の蛍光値は取得した蛍光画像を Image J を用いて数値化した。

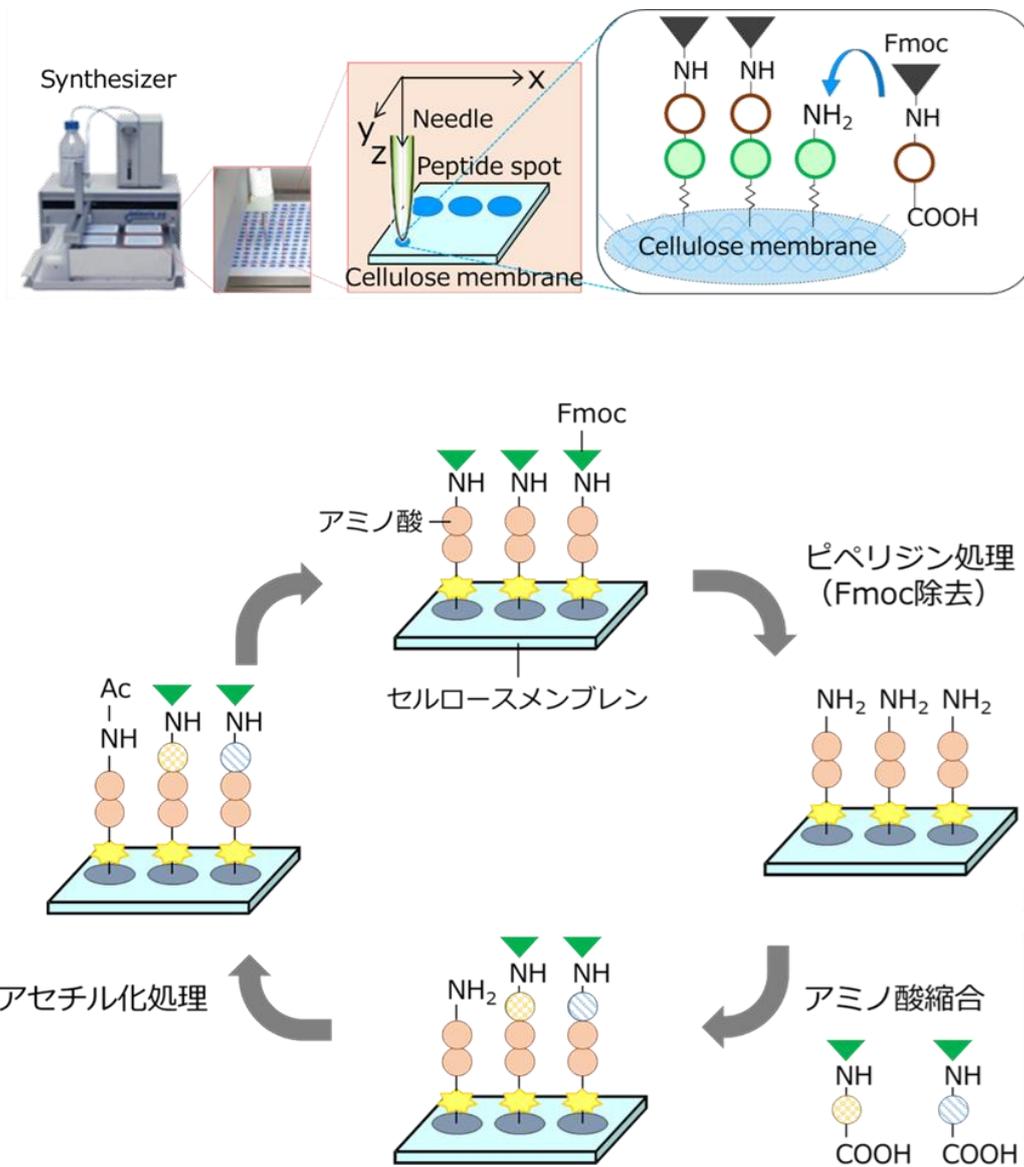


Fig. 2-1 ペプチド合成機の概要とペプチド合成の概要

ペプチド合成機を用いたペプチド合成の概要を示している。Fmoc の脱保護、アミノ酸の合成(スポットティング)、未反応アミノ基のアセチル化という3つの操作を繰り返して、セルロースメンブレン上にペプチドをスポット合成する。

Table 2-1 実験で使用したアミノ酸一覧

		Mw			Mw
A	Fmoc-Ala-OH · H ₂ O	329.34	C	Fmoc-Cys(Trt)-OH	585.72
V	Fmoc-Val-OH	339.39	Q	Fmoc-Glu(Trt)-OH	610.68
L	Fmoc-Leu-OH	353.42	H	Fmoc-His(Trt)-OH	619.73
P	Fmoc-Pro-OH · H ₂ O	355.4	I	Fmoc-Ile-OH	353.42
R	Fmoc-Arg(pbf)-OH · 0.5IPE	699.86	K	Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55
E	Fmoc-Glu(OtBu)-OH	443.5	M	Fmoc-Met-OH	371.45
N	Fmoc-Asn(Trt)-OH	596.69	F	Fmoc-Phe-OH	387.44
S	Fmoc-Ser(tBu)-OH	383.45	W	Fmoc-Trp(Boc)-OH	526.57
G	Fmoc-Gly-OH	297.31	Y	Fmoc-Tyr(tBu)-OH	459.55
D	Fmoc-Asp(OtBu)-OH	411.46	T	Fmoc-Thr(tBu)-OH	397.48

2.3 実験結果及び考察

2.3-1 細胞死誘導ペプチドの機能検証

本研究では既報の細胞死誘導ペプチドをモデルペプチドとして使用した[44, 45]。本ペプチドは、p53 関連タンパク質である Noxa のミトコンドリア標的ドメイン由来のペプチドであり、ミトコンドリアに存在する mPT 孔複合体に作用して孔を開き、細胞死を引き起こすペプチドである。過去の研究により、細胞死活性を有する短鎖ペプチド(KLLNLISKLF, LLNLISKLF, LNLISKLF)が同定されており、これらのペプチドと CPP を組み合わせ、細胞に添加することによって、細胞死が誘導されることが複数の細胞種において確認されている[42, 43]。

まず、我々の系においても本ペプチドの細胞死活性を評価できるか検証した。本実験では、細胞死誘導ドメイン 2 種(KLLNLISKLF, LNLISKLF)と CPP (オクタアルギニン：R8)を組み合わせたペプチドを使用した。ペプチドを合成し、1 spot を 150 μ L の無血清培地で溶出して作製したペプチド含有培地を細胞に加えて 3 h 処理した。細胞死誘導ドメインと CPP を組み合わせたペプチドは高い細胞死活性を示した(KLLNLISKLF-R8 の cell viability = 20.3% \pm 4.2 %, LNLISKLF-R8 の cell viability = 4.5% \pm 0.4%) (Fig. 2-2A)。一方、細胞死ドメインのみ(KLLNLISKLF) や R8 のみではほとんど細胞死活性が見られなかった(KLLNLISKLF の cell

viability = 91.9% ± 5.5%, R8 の cell viability = 95.0% ± 8.1%) (Fig. 2-2A)。また、ペプチド処理した細胞の形態を比較すると、CPP-細胞死誘導ドメインの複合体のみ大きく細胞形態に変化が見られ、細胞死が引き起こされていることを確認できた(Fig. 2-2B)。これらの結果から、我々の探索系を用いて合成した細胞死誘導ドメインと CPP を組み合わせたペプチドによって、MCF-7 細胞の細胞死誘導が確認できた。本結果は既報[44, 45]の知見と一致しているため、我々の探索系を用いて、本細胞死誘導ペプチドの機能評価が可能であることが示された。

2.3-2 アラニンスキャンによるアミノ酸置換の候補部位の推定

次に、ペプチドの細胞内送達系を用いて、既報の細胞死誘導ペプチド(LNLISKLF)のアミノ酸置換を行い、高活性なペプチドを取得できるかを検証した。まず、アミノ酸置換によって活性が向上する可能性のあるペプチド部位を同定するために、細胞死誘導ペプチドのアミノ酸配列を 1 アミノ酸ずつアラニン(A)に置換(アラニンスキャン)し、細胞死活性を評価した。

以前、本研究室では、TRAIL 由来の細胞死誘導ペプチド(RNSCWSKD)の各アミノ酸を全アミノ酸 20 種類でそれぞれ置換することで、高い細胞死活性のペプチドの同定に成功している[41]。アラニンで置換した結果に注目すると、アラニン置換により細胞死活性が低下した部位は、他のアミノ酸に置換しても活性の

低いペプチドしか得られなかった。一方で、アラニン置換により活性の向上もしくは活性の維持が見られる部位では、他のアミノ酸置換によって、高い活性のペプチドを取得することに成功している。本結果をふまえて、アラニンスクリーンによって活性が向上した部位、もしくは活性に変化が見られなかった部位は、アミノ酸置換によって活性の向上する可能性があるかと判断した。一方で、活性が低下した部位は機能を発揮するのに重要な部位であり、アミノ酸置換により活性が低下してしまう可能性が高い部位であると判断した。

既報の細胞死誘導ペプチドの各アミノ酸をアラニンに置換したペプチドを合成し、1スポットを無血清培地 150 μ L で溶出して作製したペプチド含有培地を4倍希釈し、MCF-7細胞に加えて3h処理した。アラニンスクリーンにより、ペプチドの細胞死活性に変化が見られた(Fig. 2-3)。N末端から2残基目のアスパラギン(N)、5残基目のセリン(S)をアラニンに置換したペプチドで処理した場合の cell viability はそれぞれ $53.6\% \pm 23.4\%$, $47.2\% \pm 16.0\%$ であり、元のペプチドの cell viability ($78.2\% \pm 32.3\%$) よりも低い値であり、これらの置換ペプチドが高い細胞死活性を示した。6残基目のリジン(K)をアラニンに置換したペプチドでは、cell viability が $74.8\% \pm 18.8\%$ であり、元ペプチドと同程度の活性を示した。その他のアミノ酸をアラニンに置換したペプチドでは、元ペプチドと比較して高い cell viability を示し、細胞死活性の低下が観察された。これらの結果から、アラニン

置換によって細胞死活性の向上した部位である N 末端から 2 残基目の N と 5 残基目の S をその他の 19 種アミノ酸に置換することで、高活性な細胞死誘導ペプチドを取得できる可能性が高いと判断した。

2.3-3 候補部位のアミノ酸置換による高活性ペプチドの探索

2.3-2 で推定した候補部位(N 末端から 2 残基目の N、5 残基目の S)をアミノ酸置換し、活性の高いペプチドが取得できるか検証した。LXLISKLF, LNLIXKLF (X=アミノ酸全 20 種類)を合成し、1 スポットを無血清培地 150 μ L で溶出して作製したペプチド含有培地を 4 倍希釈し、MCF-7 細胞に加えて 3 h 処理した。

N 末端から 2 残基目の N、5 残基目の S それぞれをアミノ酸置換した結果、ペプチドの細胞死活性に変化が見られた(Fig. 2-4)。2 残基目の N をアミノ酸置換した場合には、フェニルアラニン(F)やアルギニン(R)に置換したペプチドの cell viability はそれぞれ $40.6\% \pm 6.2\%$, $29.5\% \pm 8.6\%$ という値を示し、元ペプチドの cell viability ($60.3\% \pm 24.3\%$)と比較して低い値を示したが、統計的に有意な差は見られなかった(Fig. 2-4A)。5 残基目の S をアミノ酸置換した場合には、フェニルアラニン(F)、バリン(V)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)に置換したペプチドの cell viability はそれぞれ $15.3\% \pm 5.3\%$, $15.6\% \pm 3.6\%$, $10.7\% \pm 1.8\%$, $14.2\% \pm 5.1\%$ という値を示し、元ペプチドの cell viability ($45.0\% \pm 12.5\%$)と比較して有意

に低い値を示した(Fig. 2-4B)。このことから、N 末端から 5 残基目の S を F, V, W, Y に置換することにより、ペプチドの細胞死活性が向上したことが示された。これらの結果から、ペプチドの細胞内送達系を用いてペプチドのアミノ酸配列置換を行うことで、ペプチドの活性を向上させることが可能であることが示唆された。

取得した 4 種類の高活性ペプチドを購入したペプチドを用いて、同一濃度条件下で細胞死活性を比較した。元ペプチドを含めた 5 種類のペプチドを無血清培地に溶解し、希釈することにより複数濃度条件(0, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μ M)のペプチド含有培地を作製した。それぞれの濃度のペプチド含有培地を MCF-7 細胞に加え、3 h 処理した。

25 μ M から 75 μ M の条件では、4 種類の高活性ペプチドは元ペプチドと比較して、高い細胞死活性を有することが確認された(Fig. 2-5)。また、得られた実験データをもとに、Image J によるカーブフィッティングを行い、50%の cell viability を示すペプチド濃度を算出した。その結果、元ペプチドは 44.9 μ M で 50%の cell viability を示したのに対して、取得ペプチド(LNLIFKLF, LNLIVKLF, LNLIWKLF, LNLIYKLF)ではそれぞれ 14.4 μ M, 22.1 μ M, 10.1 μ M, 17.3 μ M という値であり、取得した高活性ペプチドはおよそ 2 倍から 4 倍薄い濃度で元ペプチドと同等の細胞死をもたらすことが示された。これらの結果から、ペプチドの細胞内送達系

を用いたペプチドのアミノ酸置換は、ペプチドの活性向上に有用であることが示され、細胞内で機能するペプチドの探索に有用であることが示された。

ペプチドの活性向上をもたらしたアミノ酸(F, V, W, Y)に注目すると、FとVは疎水性の高いアミノ酸であり、F, W, Yは側鎖に芳香環をもつアミノ酸であるという特徴が見られた。疎水性アミノ酸は疎水性相互作用に寄与しており、芳香環をもつアミノ酸は π スタッキング相互作用に寄与している。これら相互作用はタンパク質間相互作用に大きく関与することが知られている[46, 47]。そのため、疎水性アミノ酸であるF, V、芳香環をもつアミノ酸であるF, W, Yへの置換によって、ペプチドが標的タンパク質と疎水性相互作用や π スタッキング相互作用しやすくなったことにより、ペプチドの活性が向上したと予想される。

2.3-4 取得した高活性ペプチドの機能メカニズム評価

モデルとして使用した細胞死誘導ペプチドは、mPT孔複合体に作用して、孔を開き、ミトコンドリア内の Ca^{2+} を細胞質に流出させるという機能をもつ[44]。本取得した高活性ペプチドにおいても、同様の現象が引き起こされるか検証した。 Ca^{2+} を染色する蛍光試薬を取り込ませたMCF-7細胞に各ペプチドを添加し、細胞の蛍光画像を経時的に取得した。Image Jを用いて取得画像から蛍光値を算出し、各経時の蛍光値を初期蛍光値で除することで、ペプチド処理前後での細胞

内の蛍光値変化(以後 F/F0 と表記する)を算出した。本実験では元ペプチド(LNLISKLF)と最も細胞死活性の高かった取得ペプチド(LNLIWKLF)を使用し、それぞれ50%の cell viability を示す濃度条件で実験を行った(LNLISKLF=44.9 μ M, LNLIWKLF=10.1 μ M) (Fig. 2-6A, 6B, 6C)。

元ペプチドでは、ペプチド添加後 60 s から 90 s にかけて細胞質中の Ca²⁺の増加が観察された(Fig. 2-6A)。この結果は既報[44]と同様であり、元ペプチドの処理で Ca²⁺が細胞質に流出するというペプチドの機能を実際に確認することができた。取得した高活性ペプチドの場合、ペプチド添加後 50 s から 60 s にかけて細胞質中の Ca²⁺の増加が見られた(Fig. 2-6B)。ペプチドを添加しないサンプルではほとんど蛍光値の変化は見られなかった(Fig. 2-6C)。これら結果から、高活性ペプチドは細胞質中の Ca²⁺を増加させるという点において、元ペプチドと同様の機能性を有することが示された。

一方、細胞質中の蛍光値の上昇に関して、2種類のペプチド間で異なる挙動が観察された。各ペプチドで処理した際の F/F0 の値が 1 以下を白、2 以上を緑、1~2 の間を F/F0 の値に応じて白~緑のグラデーションで色分けし、10 個の細胞それぞれの蛍光値変化を表すヒートマップを作成した。元ペプチドの処理では、F/F0 が 2 を越える(色調が濃い緑を示す)タイミングが細胞ごとで異なることが確認された(Fig. 2-6D)。一方で、取得ペプチドで処理した場合は、F/F0 が 2 を越

えるタイミングがほとんどの細胞で揃っていることが確認された(Fig. 2-6E)。また、F/F0の上昇が2度見られる細胞(緑の色調が濃い→薄い→濃いとなる細胞)に注目すると、元ペプチドでは、7細胞(Cell number 1~7)が確認された(Fig. 2-6D)が、取得した高活性ペプチドでは2細胞(Cell number 1,2)のみしか確認されなかった(Fig. 2-6E)。このような現象が確認された原因は、標的である mPT 孔複合体との相互作用のしやすさが元ペプチドと取得ペプチドで異なることによると考えられる。

ミトコンドリアは1細胞中におよそ数100個存在することが報告されている[48]。ミトコンドリアは細胞質中のCa²⁺をミトコンドリアに取り込む機能を持ち、細胞質中のCa²⁺量を調節している[49,50]。元ペプチドで処理した場合は、mPT孔複合体との相互作用が高くないため、ミトコンドリアごとにペプチドと相互作用するタイミングが異なることや、ペプチドが作用していないミトコンドリアが存在することが考えられる。ペプチドがミトコンドリアに作用するタイミングが異なることで、細胞質中にCa²⁺が放出される時間が細胞ごとに変わることを考えられる。また、蛍光値の上下する要因は、ミトコンドリアがCa²⁺を取り込むため生じると考えられる。具体的には、ペプチドの作用を受けていないミトコンドリアが、ペプチド処理により放出されたCa²⁺を取り込むことで、細胞質の蛍光値が減少し、時間を置いて他のミトコンドリアがペプチドの影響を受け

て Ca^{2+} を放出することで、再び細胞質中の蛍光値が上昇するために起こる現象であると考えられる。一方で、取得した高活性ペプチドでは、mPT 孔複合体と強く相互作用し、細胞内の多数のミトコンドリアに作用して、細胞質中に Ca^{2+} を放出させるため、細胞ごとの蛍光値変化が同じタイミングで起きると考えられる。また、ペプチドが作用していないミトコンドリアの量が少なく、細胞質に放出された Ca^{2+} をミトコンドリア中に取り込めないため、細胞質中の蛍光値の上下が見られないと考えられる。

これらの結果から、取得した高活性ペプチドは細胞質中の Ca^{2+} の濃度を増加させる機能を持ち、元ペプチドと同じような機能を有していることが示唆された。また、ペプチドごとに細胞質中の蛍光値の上昇の仕方が異なる要因は、ペプチドと mPT 孔複合体の相互作用のしやすさの違いによるものであると考えられる。

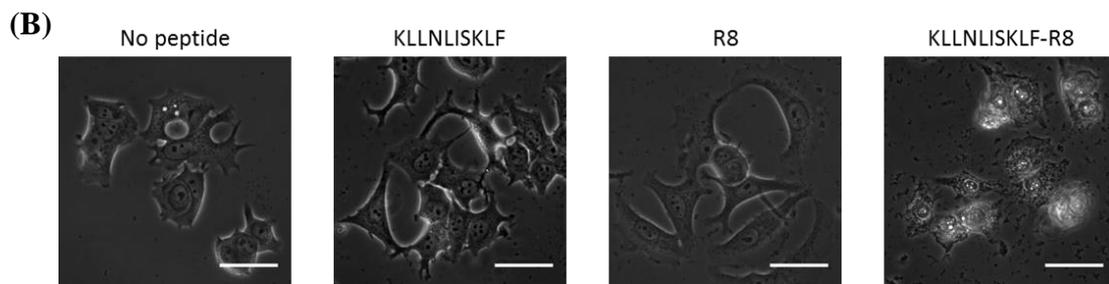
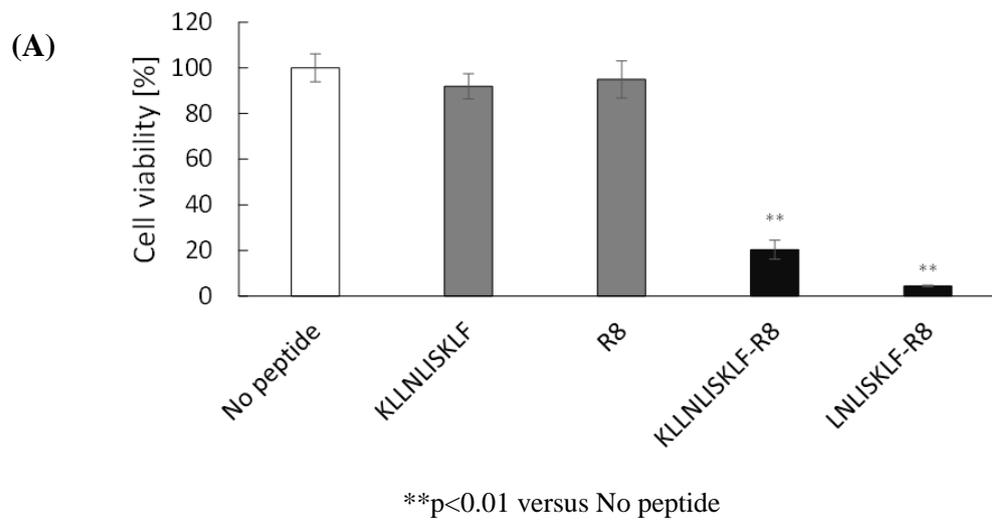


Fig. 2-2 既報の細胞死誘導ペプチドの機能評価

MCF-7細胞を各ペプチド溶液で3h処理した結果を示している。1スポットあたり150 μ Lで溶出したペプチドを使用して活性評価を行った。各条件それぞれ3well使用し(n=3)、3wellの平均値と標準偏差(SD)を算出した。2群間の比較はStudent t-testの両側検定によって有意差検定を行い、p値が0.05より低い場合、有意差が認められるとした。

(A) WST-8 assayにより算出した細胞生存率 (No peptideのcell viability=100%)

(B) 細胞の顕微鏡写真 (スケールバー = 50 μ m)

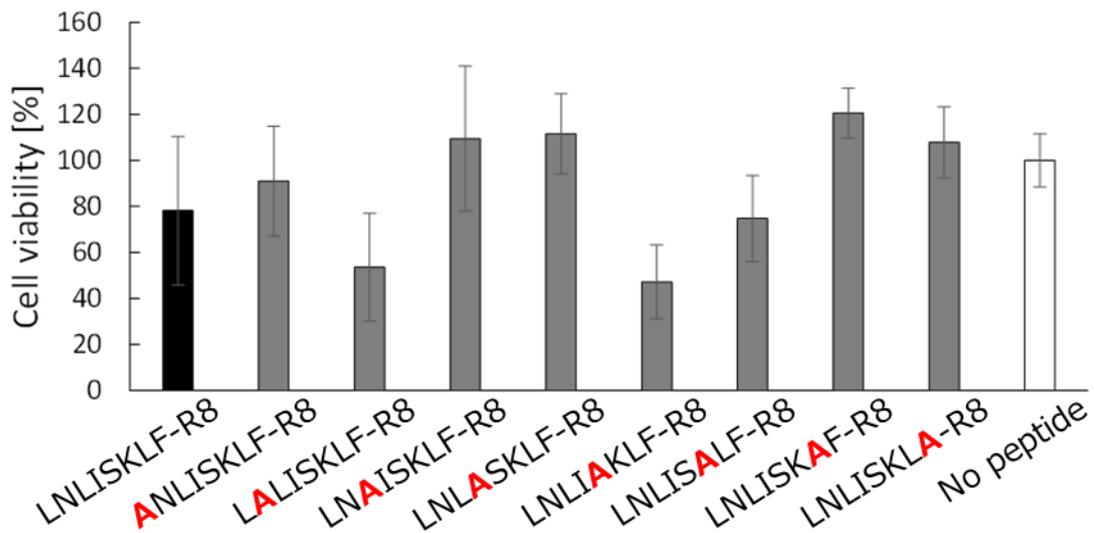


Fig. 2-3 細胞死誘導ペプチドのアラニンスキャン

ペプチド配列 LNLISKLF の各アミノ酸を1アミノ酸ずつアラニン(A)に置換した際の細胞死活性の変化を示している。1スポットあたり 150 μ L で溶出したペプチドを4倍希釈して使用して活性評価試験を行った。使用細胞は MCF-7 で3 h のペプチド処理を行った。各条件それぞれ3 well 使用し(n=3)、3 well の平均値と標準偏差(SD)を算出した。2群間の比較は Student t-test の両側検定によって有意差検定を行い、p 値が 0.05 より低い場合、有意差が認められるとした。アラニンへの置換により元配列 LNLISKLF より高い細胞死活性を示した、N 末端から 2, 5 残基目を高活性ペプチド取得のための候補置換部位とした。

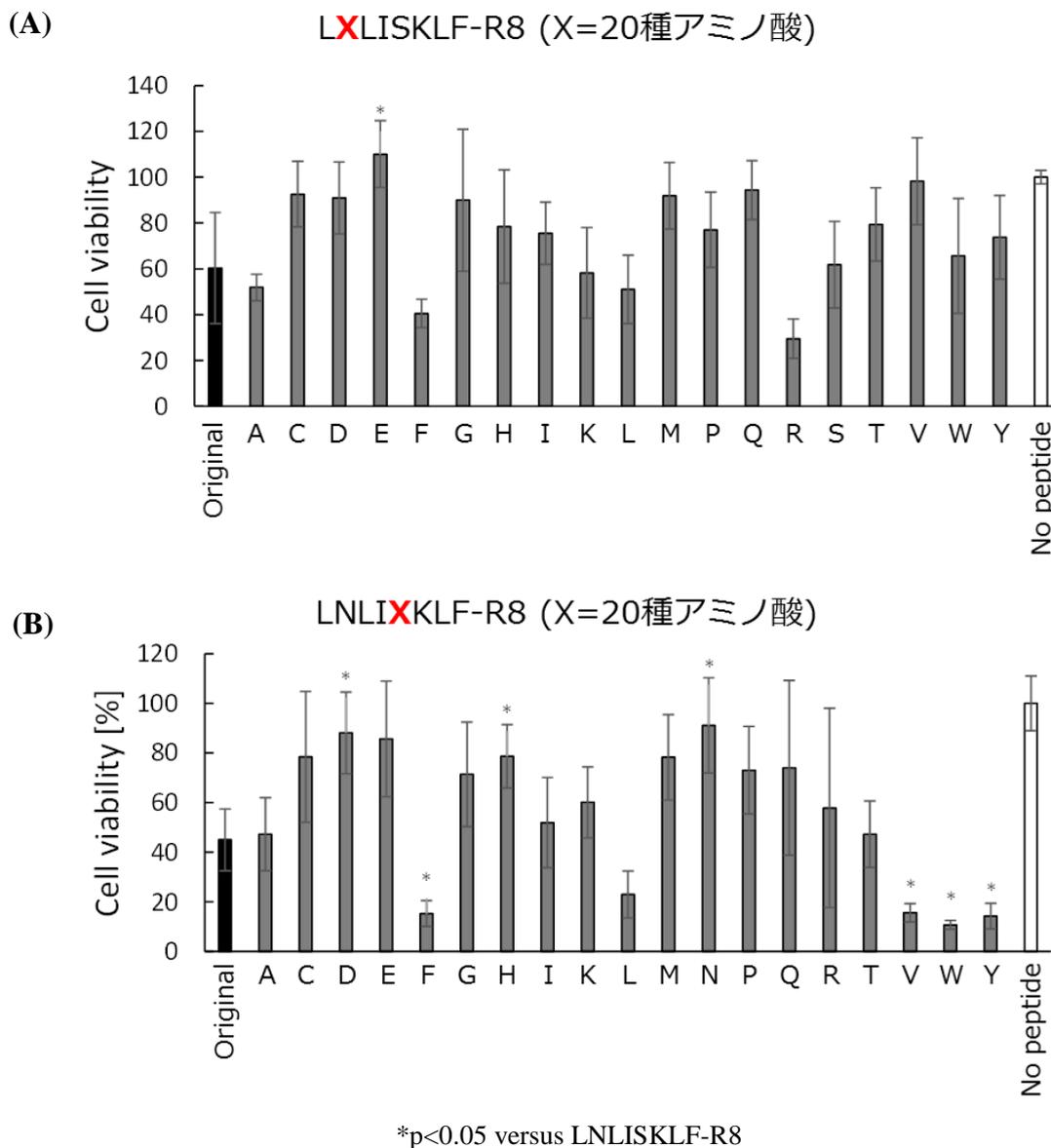


Fig. 2-4 アラニンスキャンで絞り込んだ部位のアミノ酸置換

アミノ酸置換を行ったペプチドの細胞死活性評価の結果を示している。1 スポットあたり 150 μ L で溶出したペプチドを 4 倍希釈して活性評価試験を行った。使用細胞は MCF-7 で 3 h のペプチド処理を行った。各条件それぞれ 3 well 使用し(n=3)、3 well の平均値と標準偏差 (SD)を算出した。2 群間の比較は Student t-test の両側検定によって有意差検定を行い、p 値が 0.05 より低い場合、有意差が認められるとした。

(A) N 末端から 2 残基目のアミノ酸置換、(B) N 末端から 5 残基目の置換したペプチドの結果を示している。

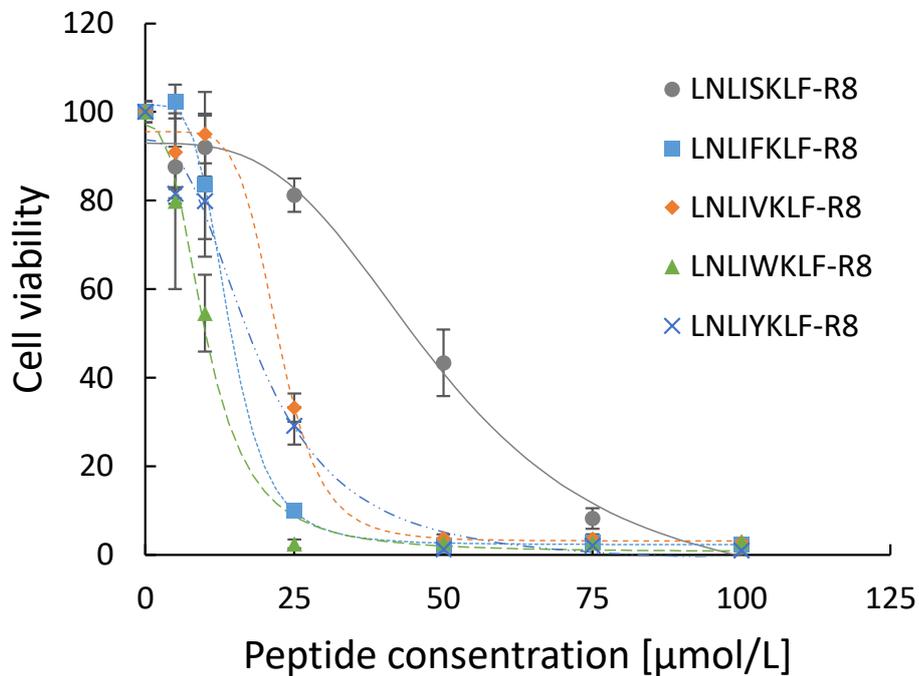
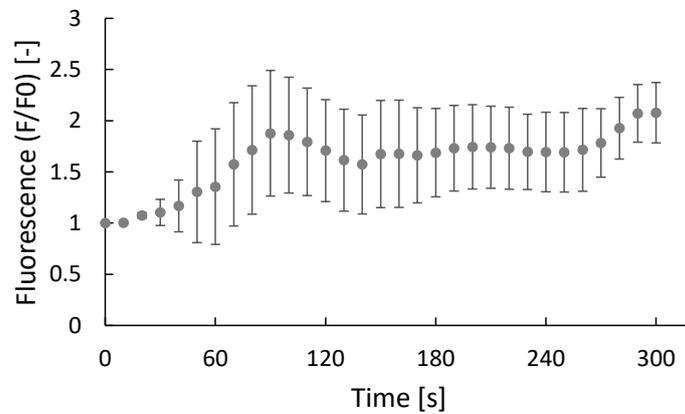


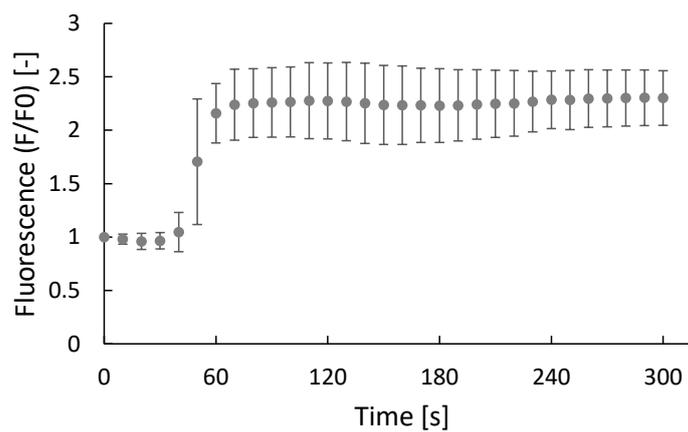
Fig. 2-5 取得した高活性ペプチドの活性比較

N末端から5残基目をフェニルアラニン(F)、バリン(V)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)に置換したペプチドの各濃度での細胞死活性評価の結果を示している。ペプチド濃度は0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 μMの8条件で評価を行った。使用細胞はMCF-7で3hのペプチド処理を行った。各条件それぞれ3 well使用し(n=3)、3 wellの平均値と標準偏差(SD)を算出した。2群間の比較はStudent t-testの両側検定によって有意差検定を行い、p値が0.05より低い場合、有意差が認められるとした。

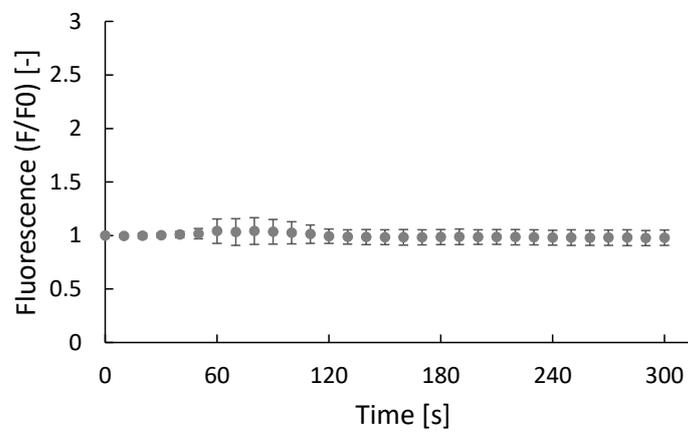
(A) LNLISKLF-R8



(B) LNLIWKLF-R8



(C) No peptide



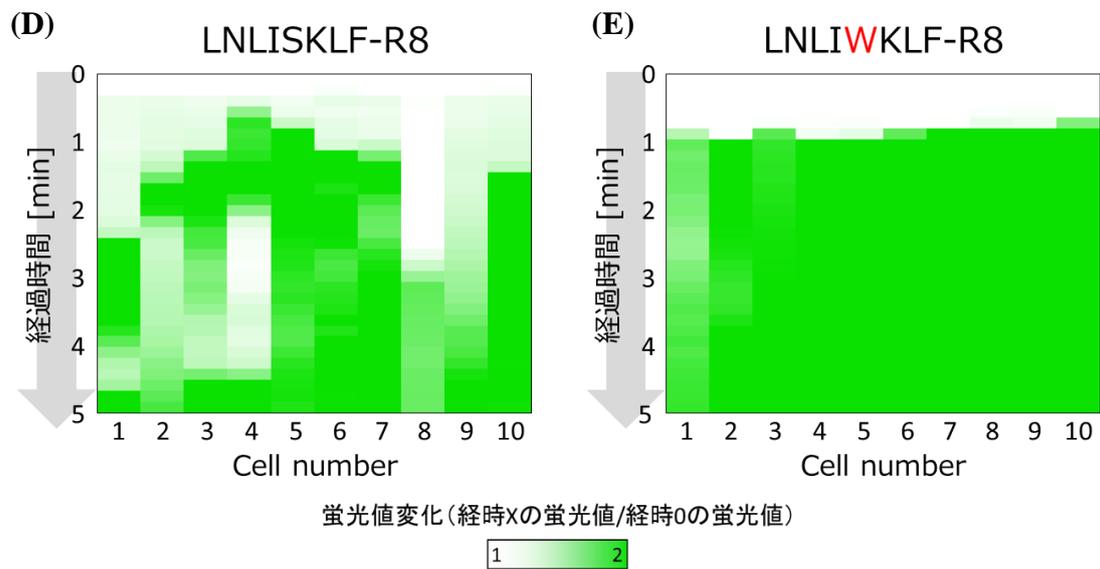


Fig. 2-6 取得した高活性ペプチドの作用機序の検証

蛍光カルシウムインジケータを取り込ませた MCF-7 細胞をペプチドで処理した際の蛍光値変化を示している。Time 0 がペプチドを添加した時間であり、その時の蛍光値を F_0 、各タイムポイントでの蛍光値を F とし、 F/F_0 の値をプロットした。10 個の細胞の F/F_0 を平均した値を示している(A-C)。

(A) 元配列 LNLISKLF-R8 (44.9 μM)、(B) 高活性ペプチド LNLIWKLF-R8 (10.1 μM)、(C) ペプチド処理していないサンプルの結果。

各細胞それぞれの蛍光値の変化をヒートマップにした(D, E)。Time 0 の蛍光値を 1 として白で、Time 0 の蛍光値の 2 倍の蛍光値を濃い緑で示している。

(D) 元配列 LNLISKLF-R8、(E) 高活性ペプチド LNLIWKLF-R8 の結果。

2.4 結言

本章では、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により、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。

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に細胞質中の Ca^{2+} の増加をもたらし、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。

ペプチドの細胞内送達系を用いることで、一度に多種類のペプチドの細胞内機能評価が可能であることが示された。また、ペプチド配列の最適化において、アミノ酸置換による最適化を簡便に行うことが可能であることが示された。ペプチドアレイの特性である、ポジティブデータのみならず、ネガティブデータを取得可能であることを活かし、情報解析技術と組み合わせることで高活性をもたらすペプチドのルール化、予測モデル作成などを行い、より効率的なペプチド探索が行うことが可能になると考えられる。

第3章

細胞内で CPP が解離するシステムの構築と 送達系への組み込み

3.1 はじめに

CPP は物質を細胞内に送達する強力なツールとして利用されている。ペプチドを細胞内送達する際には、評価したいペプチドに CPP を化学的に結合もしくはペプチド伸長反応で合成して細胞透過性を付与することが行われる[24]。このように、CPP は細胞内送達したいペプチドに対して簡便に細胞透過性を付与できる一方で、ペプチド活性に影響を与える可能性がある[30]。CPP は正電荷に富むものや両親媒性のといった物理学的特徴をもち、これらの性質が評価したい機能性ペプチドの活性に影響してしまう例が報告されている[31]。

このような、CPP の影響を排除するために、細胞内で分解されるリンカーの利用が推奨されている[32]。細胞内の環境によって分解される様々な細胞内切断リ

ンカーが開発、利用されている[33, 34]。その中でも、ジスルフィド結合は2箇所のチオールが酸化することにより形成し、還元反応によって分解される可逆的な共有結合である[51]。ペプチド間でのジスルフィド形成は、側鎖にチオール基をもつアミノ酸であるシステイン(Cys)をそれぞれのペプチドに合成し、酸化することで達成できる[52]。ジスルフィド結合は細胞外の環境では安定である一方で、還元物質 GSH と還元酵素 Glutaredoxin の働きによって還元的な環境を維持する細胞内では分解されることが報告されている[53]。

我々の構築したペプチドの細胞内送達系は CPP と機能性ペプチドがアミド結合で結合しているため、細胞内の環境で安定である。そのため、CPP の影響を除くことができず、CPP-機能性ペプチド複合体としての機能評価になっている。本章では、ペプチドの細胞内送達系に細胞内で切断される機構を組み合わせることで、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構築を試みた。細胞内で切断される機構としてジスルフィド結合を選択し、ペプチドアレイを用いて CPP と機能性ペプチドをジスルフィド結合で架橋したヘテロ二量体ペプチドを合成する手法を開発した。また、構築した系を用いて、実際に細胞内で機能するペプチドの機能評価及びペプチド探索に応用が可能か検証した。

3.2 実験方法

3.2-1 活性化メンブレンの作製

2.2-1 と同様の操作で活性化メンブレンを作製し、実験に使用した。

3.2-2 ヘテロ分岐鎖ペプチドアレイの作製

ヘテロ分岐鎖ペプチドアレイの合成には、ivDde と呼ばれる piperidine 分解耐性をもち、2%ヒドラジン処理で脱保護可能な保護基で側鎖のアミノ基を保護した Fmoc-Lys(ivDde)-OH (分子量 574.72) を使用した[54]。まず始めに、Fmoc-Lys(ivDde)-OH をメンブレンに合成し、piperidine により Fmoc を脱保護し(Fig. 3-1 (I))、主鎖側のペプチド合成を開始した。2.2-2 と同様の Fmoc 固相合成法を行い、Fmoc-Photo-Linker, Fmoc-Cys(trt)-OH, ペプチドを構成するアミノ酸の順に合成し、ペプチドを伸長させた(Fig. 3-1 (II))。主鎖側のペプチドの合成が完了したら、5%無水酢酸処理により、N 末端のアミノ基をアセチル化した。

側鎖の ivDde の脱保護は2%ヒドラジン(in DMF)処理(10 min×3 回)で行った(Fig. 3-1 (III))。処理後、DMF で洗浄(5 min×3 回)しヒドラジンを完全に除去した。その後、通常の Fmoc 固相合成を行い、Fmoc-Photo-Linker, Fmoc-Cys(trt)-OH, ペプチドを構成するアミノ酸の順に合成し、ペプチドを伸長させた(Fig. 3-1 (IV))。合成が完了したら主鎖側と同様に N 末端のアミノ基をアセチル化した。

ペプチドの側鎖の保護基は 2.2-2 と同様の脱保護条件により脱保護、及び洗浄操作を行った(Fig. 3-1 (V))。

3.2-3 Cys-Cys 間のジスルフィド架橋とペプチド溶液の調製

脱保護したメンブレンを 20% DMSO (in PBS)溶液(pH=7.2-7.4)で 2 日間つけ置きし、ジスルフィドを形成させた[55]。反応 1 日後に DMSO 溶液を交換した。処理後、PBS による洗浄(5 min×3 回)とメタノールでの洗浄を行い、メンブレンを自然乾燥させた(Fig. 3-1 (VI))。

2.2-3 と同様にトランスイルミネーターを用いて 365 nm の UV を 3h メンブレンに照射し、ペプチドをメンブレンから切り出した(Fig. 3-1 (VII))。その後、96 well 用ろ過フィルターに各スポットをパンチアウトし、PBS を 150 μ L/well ずつ加え、37°C、1h 漬け置きしてペプチドを溶出した。その後、各ペプチド溶液を減圧ろ過で 96 well plate に回収した。

3.2-4 質量分析を用いたペプチドの合成、分解評価

ペプチドの合成及びジスルフィド結合の分解は名古屋大学物質科学国際研究センターが所有している MALDI TOF/MS (ultraflexIII, MALDI-TOF/MS Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)による質量分析で行った。合成ペプチドはマト

リックス溶液(0.1% TFA, 33% CH₃CN, 飽和 α-シアノケイ皮酸塩溶液)に溶解し、sample プレートにスポットして室温(25 °C)で乾燥させた。ジスルフィドの分解は 10 mM ジチオトレイトール(042-29222、和光純薬工業)もしくは還元型グルタチオン(GSH)(3050、ペプチド研究所、大阪)を混合し、上記と同様にサンプル調製を行った。質量のスペクトルは 300-4000 m/z の範囲を linear mode, positive ion mode で測定した。質量ピークは flexAnalysis software (version 3.4; Bruker Daltonik GmbH)によって解析を行った。

3.2-5 細胞培養

HeLa 細胞は 37 °C、5% CO₂、95% Air 下の CO₂ インキュベータ内で、細胞培養用 T75 フラスコで培養した。培地は 10% FBS (biosera、NUAILLE、France)および 1% Penicillin-Streptomycin (PS)を含む DMEM を用いた。継代操作はサブコンフルエント状態(80~90%)になった細胞の培地を除き、PBS で2度洗い流した後、トリプシン処理により細胞培養ディッシュから剥がして再播種した。細胞数の測定は血球計算板を用いて行い、初期細胞数が 2.0×10⁵ cells/flask となるように再播種した。

3.2-6 細胞生存率の評価

3.2-5 の手法で培養した HeLa 細胞を初期細胞数 5.0×10^3 cells/well となるように 96 well plate に播種し、37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で 24 h インキュベートした。24 h 後、培地を除去し、3.2-3 で調製したペプチド溶液を 100 μL ずつ各 well に加え、37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で 30 min インキュベートした。30 min 後、ペプチド溶液を除去し、10% FBS、1% PS 含有 DMEM と cell counting Kit-8 (347-07621、Dojindo、熊本)を 10:1 の割合で混ぜた溶液を 100 μL ずつ加えて 37 °C、5% CO₂ インキュベータ内で 1.5 h インキュベートした。その後、2.2-6 と同様の方法で吸光度の値から細胞生存率を算出した。

3.3 実験結果と考察

3.3-1 CPP-機能性ペプチドの効率的なジスルフィド架橋法

2 種類のペプチド間でジスルフィドを形成させる一般的な方法は、溶液中で混合したペプチドを酸化する方法である。この方法の問題は、目的のヘテロ二量体ペプチドだけでなく 2 種類のホモ二量体が形成してしまうことである [56]。また、細胞試験を行う際に、酸化反応に使用した試薬や溶媒の除去が必要であるため、精製ステップが必要となり、多検体のペプチドを用意することは難しいという課題がある。問題点の解決のために、2 種類のペプチドを効率よくジスルフィド架橋できる合成法の開発とペプチドアレイ技術との組み合わせにより、一度に

多種類の CPP-機能性ペプチドのヘテロ二量体ペプチドを合成する系の構築を目指した。

我々の研究室では、ペプチドアレイ上でジスルフィド形成による環状ペプチドの合成に成功している[57]。ペプチドの環状化の際に分子間でジスルフィド結合を形成し、二量体を形成することが想定されるが、実験結果より分子内でのジスルフィド形成反応が優先的に起こり、環状ペプチドの方が二量体ペプチドよりも形成しやすいということを確認している。この結果より、ジスルフィド形成反応は分子間反応よりも分子内反応の方が進行しやすいと考えた。そこで、CPPと機能性ペプチドを1つの分子内に合成することで、選択的なジスルフィド架橋を達成できると考えた。ヘテロ分岐鎖ペプチドを合成可能な Fmoc-Lys(ivDde)-OH を使用して、主鎖側に CPP を側鎖側に機能性ペプチドを合成し、分子内でジスルフィド架橋が可能な合成系を考案した(Fig. 3-1)。本手法では、ジスルフィド形成に使用する試薬などはメンブレンの洗浄で取り除けるため、ペプチドの精製操作が必要ない点、ペプチドアレイを利用することにより多種類のペプチドを合成が可能である点から、一度に多検体のペプチドの細胞内評価に利用可能である。

3.3-2 目的ペプチドの合成評価と CPP 解離の検証

考案した合成法を用いて作製したペプチドの合成を質量分析により評価した。本研究では、CPPとしてオクタアルギニン(R8)を、機能性ペプチドとして細胞死誘導ペプチド(WELVVLGKL)を使用した。WELVVLGKLは細胞周期G1/S特異的に生じるcyclin D2由来のペプチドであり、細胞内に送達すると酸化ストレス経路による細胞死を引き起こすことが報告されている[58]。合成され、質量分析により観測される可能性があるピークの理論値をTable 3-1に示す。

酸化処理後のサンプルでは、目的のヘテロ二量体のピーク($[M+H^+]=2612.61$)とAc-R8-Cのピーク($[M+H^+]=1413.57$)が観測された(Fig. 3-2A)。また、2種類のホモ二量体はほとんど検出されなかった。この結果より、本合成手法で目的のヘテロ二量体ペプチドを選択的に合成できることが示された。続いて、還元処理を行うことで、ジスルフィドが分解され、目的のCPPと機能性ペプチドの解離が起きるか検証した。10 mM ジチオトレイトール処理により、ヘテロ二量体ペプチドのピークが消失し、2種類の単量体ペプチドAc-R8-CのピークとAc-WELVVLGKL-Cのピーク($[M+Na^+]=1224.35$)が検出された(Fig. 3-2B)。また、細胞内の還元環境[59]でヘテロ二量体ペプチドのジスルフィド結合が分解されるか検証した。細胞外のGSH濃度(10 μ M)処理では、ヘテロ二量体ペプチドのピークの減少はほとんど見られなかった(Fig. 3-2C)。一方で、細胞内のGSH濃度(1 mM)処理では、二量体のピークが大きく減少し、それぞれの単量体ペプチドにGSH

が付加した Ac-WELVVLGKL-C-GSH のピーク ($[M+H^+]=1505.18$) と Ac-R8-C-GSH のピーク ($[M+H^+]=1715.62$) が検出された (Fig. 3-2D)。これらの結果より、細胞内の GSH 濃度でヘテロ二量体ペプチドのジスルフィドは分解されることが示唆された。本来の細胞内では glutaredoxin によって GSH 付加体が還元されることで、完全に還元されたペプチドが生じると考えられる。

本実験結果は、CPP と機能性ペプチドをジスルフィド結合によって選択的に架橋したヘテロ二量体ペプチドの効率的な合成と細胞内環境で CPP と機能性ペプチドが解離するという目的の挙動を確認することに成功した。これら結果より、ペプチドの細胞内送達系に細胞内で解離するシステムを組み込むことに成功した。一方で、本結果は質量分析による定性的な評価であるため、実際に合成されたヘテロ二量体ペプチドの純度や合成量、還元処理による分解量などの定量的な評価はできていない。そのため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) などの分析技術を用いて、ペプチド量の定量的な評価をする必要があると考えている。

3.3-3 ペプチドの細胞内機能評価とペプチド探索への応用

まず、3.3-2 で合成を確認したヘテロ二量体ペプチドで実際に細胞死活性を評価できるか検証し、構築した系が細胞試験に利用できるか、ペプチド探索に利用できるか検証した。

まず、細胞試験に利用できるか検証した。HeLa 細胞を合成したヘテロ二量体ペプチド、Ac-R8, Ac-WELVVLGKL の 3 種類のペプチドそれぞれで 30 min 処理し、細胞死活性を評価した。ヘテロ二量体ペプチドは高い細胞死活性(cell viability = $18.3\% \pm 2.5\%$)を示した(Fig. 3-3)。一方、Ac-R8 と Ac-WELVVLGKL はほとんど細胞死活性を示さなかった(Ac-R8 の cell viability = $84.2 \pm 4.7\%$, Ac-WELVVLGKL の cell viability = $120.0 \pm 5.5\%$)。これらの結果は、ペプチド WELVVLGKL が細胞内に送達されることで細胞死が引き起こされるという過去の報告と一致している。また、ジスルフィド結合は細胞処理前に分解されることなく、目的の機能性ペプチドを細胞内に送達することを確認できた。したがって、構築したヘテロ二量体ペプチドの合成系を用いて合成した CPP-機能性ペプチドのヘテロ二量体で細胞内機能評価が可能であることが示された。

続いて、構築した合成系を用いて実際にペプチドの探索が可能か検証した。細胞死誘導ペプチド WELVVLGKL の各アミノ酸を他のアミノ酸 18 種(Cys を除く)に置換した 1 残基置換ライブラリー(合計 162 種のペプチド)を構築し、細胞死活性の変化を評価した。1 アミノ酸の置換により、ペプチドの細胞死活性に変化が

見られることが確認できた(Fig. 3-4)。全 162 種類のペプチド中で 6 種類のペプチドが元配列である WELVVLGKL と比較して統計的に有意に高い細胞死活性を示した(cell viability of E2G = 12.5% ± 1.8%, E2R = 9.2% ± 0.7%, E2S = 12.1% ± 2.9%, V4K = 11.8% ± 2.5%, V4R = 11.3% ± 1.5%, G7R = 11.4% ± 1.3%) (Fig. 3-4 (II), 3-4 (IV), 3-4 (VII))。一方で、81 種のペプチドは元配列と比較して統計的に有意に低い細胞死活性を示した(Fig. 3-4)。

元配列の細胞死活性を基準に、ヒートマップを作成してアミノ酸の位置と活性に与える影響を検証した(Fig. 3-5)。N 末端から 2 残基目のグルタミン酸(E)と 4 残基目のバリン(V)を無電荷もしくは正電荷の親水性アミノ酸に置換すると活性の向上が見られるというルールが確認された。一方で、N 末端から 2 残基目の E と 8 残基目のリジン(K)といった親水性の高いアミノ酸を疎水性の高いアミノ酸に置換すると著しく活性が低下した。また、N 末端から 1 残基目のトリプトファン(W)と 3 残基目のロイシン(L)、5 残基目の V を疎水性アミノ酸以外のアミノ酸に置換すると活性が低下するというルールが確認された。ペプチド配列全体に関わるルールとして、負電荷アミノ酸(D,E)とプロリン(P)での置換ではどの残基でも細胞死活性を低下させるということが確認された。これらのルールから、ペプチドの溶解性と疎水性が細胞死活性に影響していると考えられる。WELVVLGKL は疎水性の高いペプチドであり、水への溶解性はあまり高くない

ペプチドである。そのため、疎水性を向上させるようなアミノ酸置換を行うと細胞内で親水性の高い R8 と解離した際に、機能性ペプチドが析出もしくは凝集して、標的タンパク質と相互作用しなくなり、細胞死活性が低下している可能性がある。一方で、疎水性アミノ酸はタンパク質間相互作用をもたらす要素の 1 つである疎水性相互作用に寄与するものである[46]。今回の結果では、N 末端から 1, 3, 5 残基目は疎水性相互作用によって標的タンパク質と相互作用する重要な位置のアミノ酸であることが示唆された。このようなアミノ酸情報解析によるルール化はペプチドの配列-機能相関の理解の向上や高活性ペプチドの同定に有用だと考えられる。

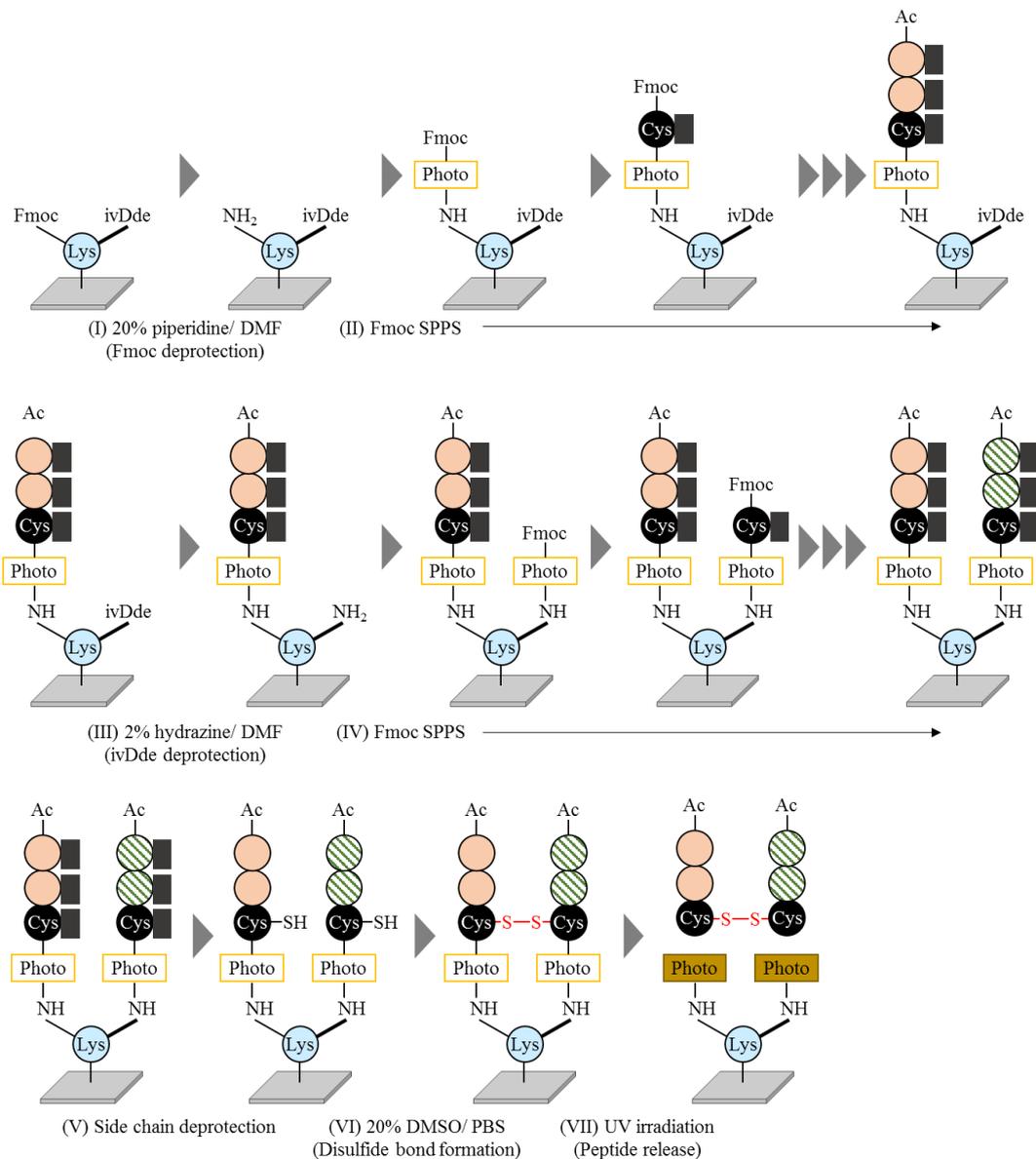


Fig. 3-1 取得した高活性ペプチドの活性比較

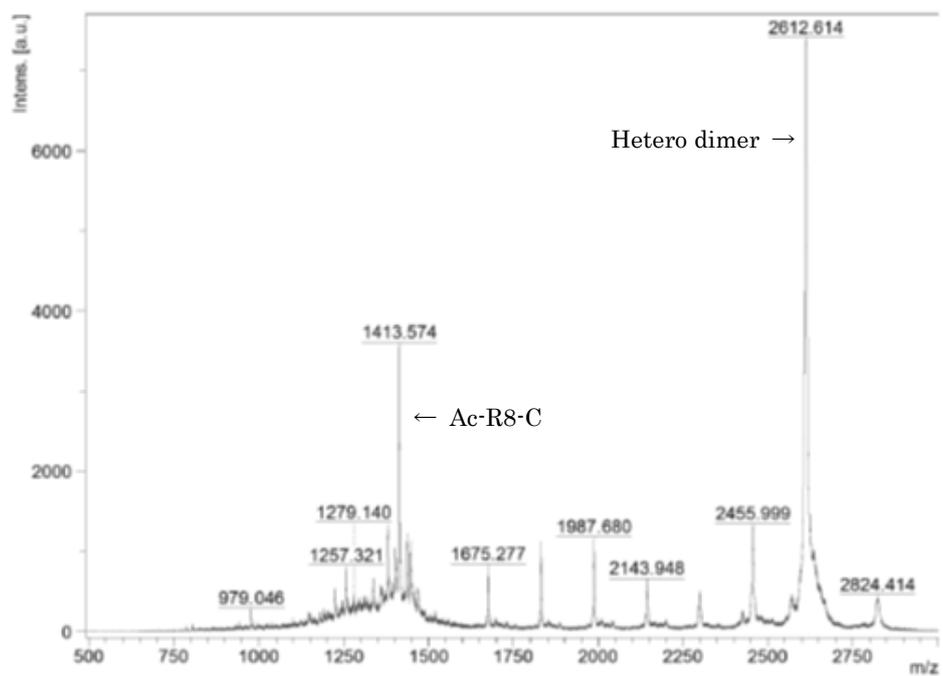
ヘテロ分岐鎖ペプチドアレイの合成スキームの概要図。丸はアミノ酸を丸に隣接する黒い四角はアミノ酸側鎖の保護基を示している。

まず、Fmoc-Lys(ivDde)-OH をメンブレンに合成し、主鎖側の合成を開始する(I, II)。主鎖のペプチド合成が完了したら、側鎖側の合成を開始する(III, IV)。ペプチド合成完了したらペプチド側鎖の脱保護(V)を行い、20% DMSO による酸化処理により、主鎖、側鎖の間にジスルフィドを形成させる(VI)。365 nm の UV 照射により光切断リンカーを分解し、各スポットのペプチドを PBS で溶出し、ペプチド含有 PBS を調製する。

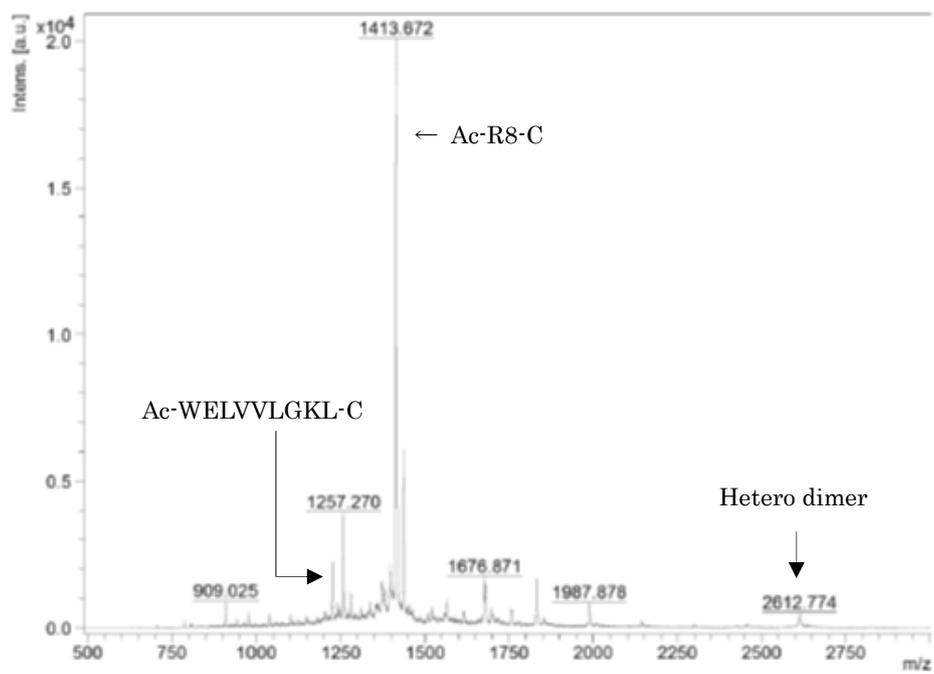
Table 3-1 観測される可能性があるペプチドの質量

Peptide form	Peptide sequence	Molecular weight ([M+H ⁺] calculated)
Hetero dimer	Ac-WELVVLGKLC with Ac-R8-C	2610.34
Homo dimer	[Ac-WELVVLGKLC] ₂	2399.11
	[Ac-R8-C] ₂	2821.58
Monomer	Ac-WELVVLGKLC	1200.55
	Ac-R8-C	1411.79
GSH adduct	Ac-WELVVLGKLC-GSH	1505.88
	Ac-R8-C-GSH	1717.12

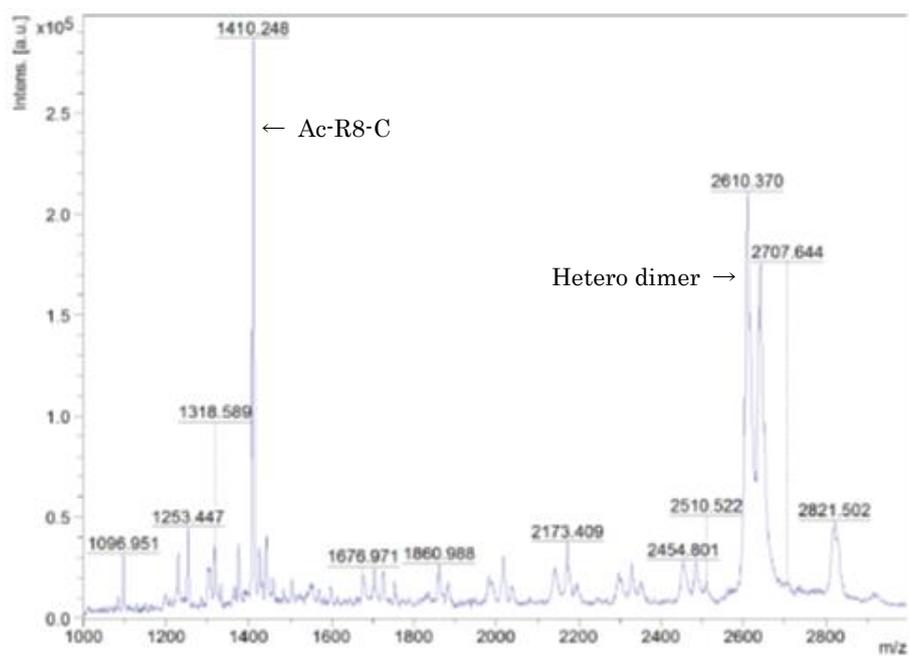
(A) 酸化処理のみ



(B) 還元処理 (10 mM DTT)



(C) 還元処理 (10 μ M GSH)



(D) 還元処理 (1 mM GSH)

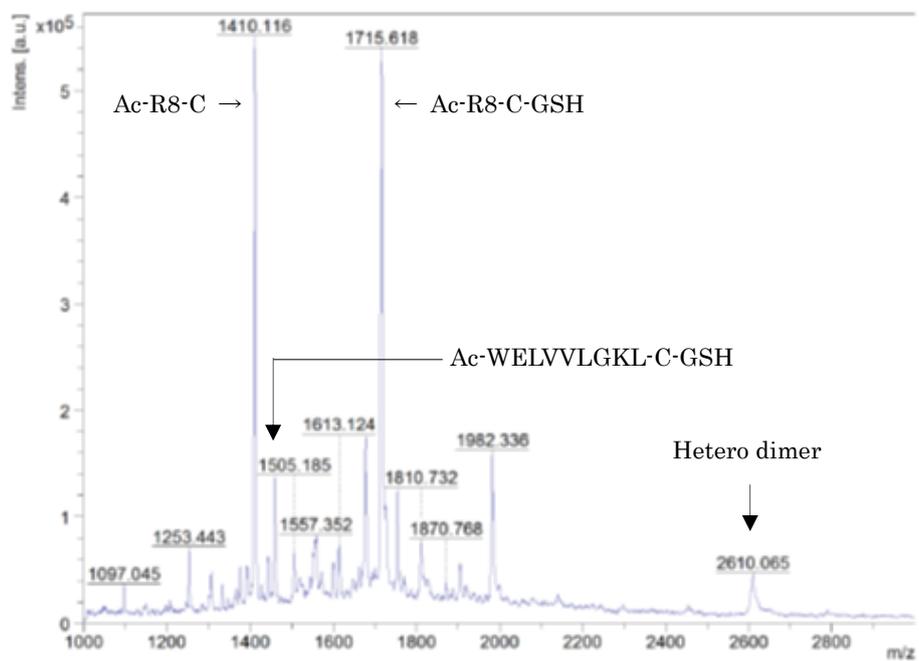
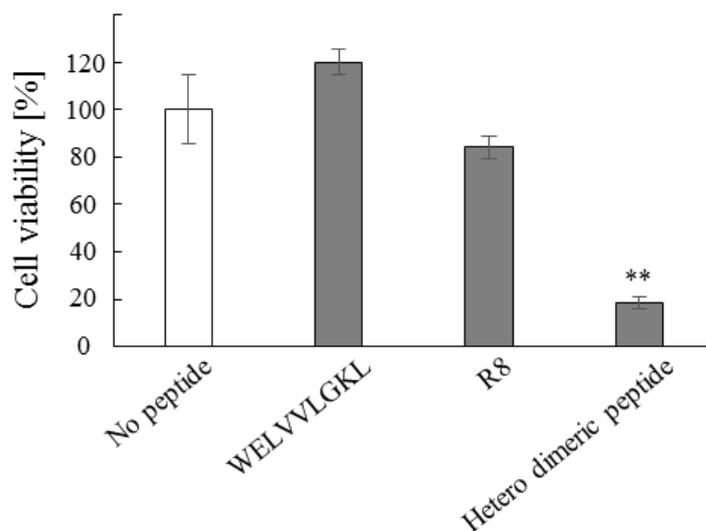


Fig. 3-2 質量分析によるペプチドの合成とジスルフィドの分解評価

MALDI TOF MS を用いて合成したペプチド及び還元剤を加えて、ジスルフィド結合を分解したペプチドの質量分析を行った結果を示している。使用したペプチドは Fig. 3-1 の系で主鎖に Ac-R8-C、側鎖に Ac-WELVVLGKL-C を合成したペプチドを使用した。

観測されると予想されるピークの[M+H⁺]の理論値は Table 3-1 に示している。

(A) 酸化処理によりジスルフィドを形成させたペプチド、(B) 酸化処理後に 10 mM ジチオトレイトールで 1 h 処理したペプチド、(C) 酸化処理後に細胞外の GSH 濃度(10 μM)で 12 h 処理したペプチド、(D) 酸化処理後に細胞内の GSH 濃度(1 mM)で 12 h 処理したペプチドの結果を示している。

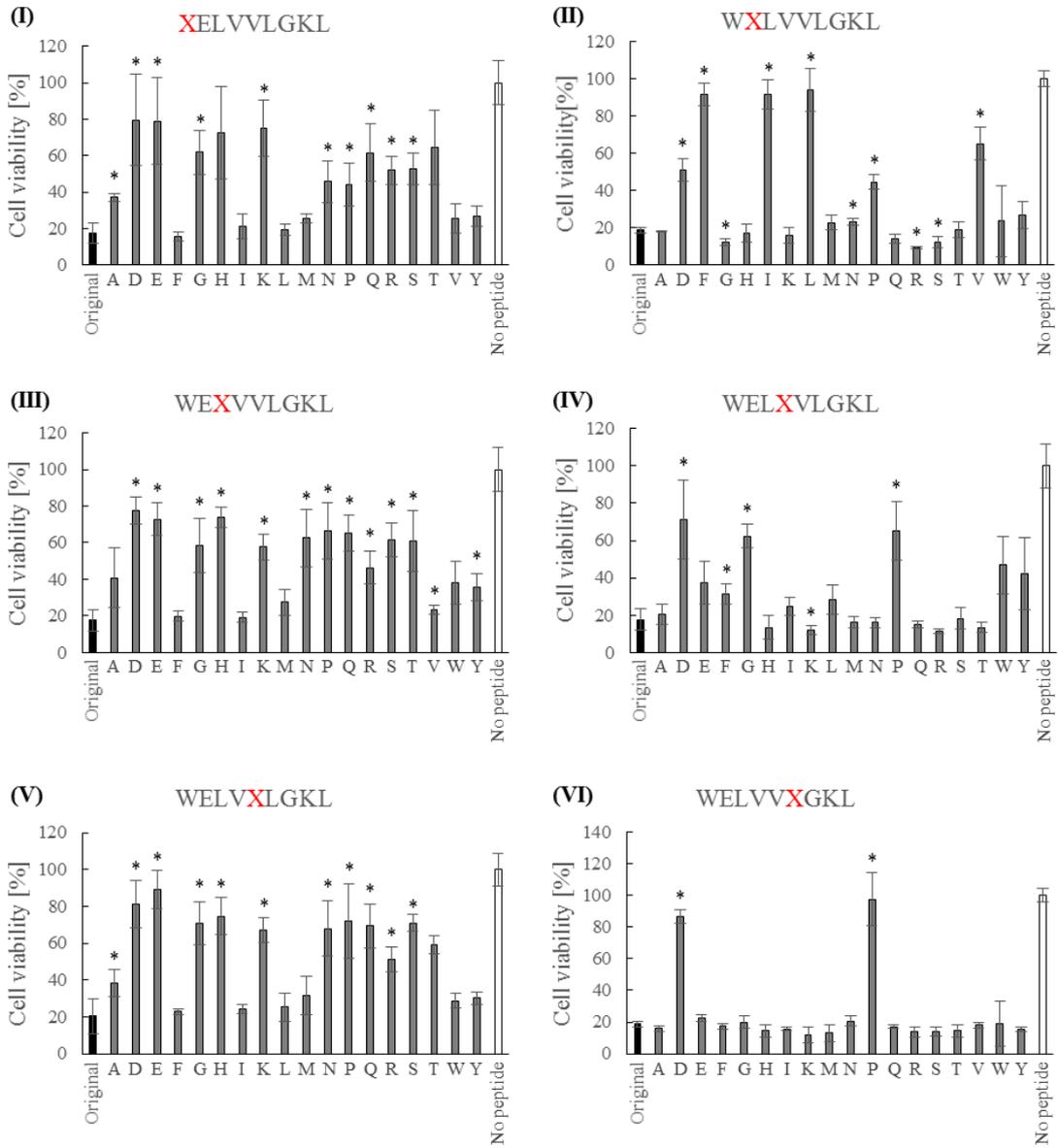


**p<0.01 versus No peptide

Fig. 3-3 ヘテロ二量体ペプチドの活性評価

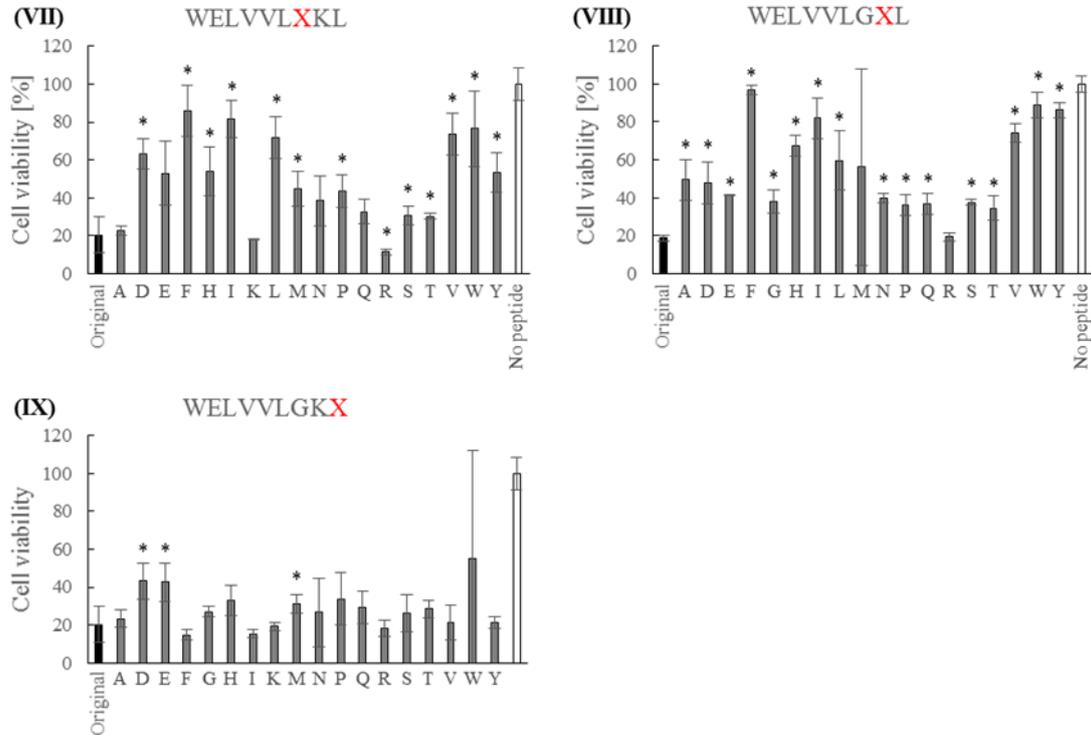
構築したヘテロ二量体ペプチドの合成法により合成したペプチド CPP-細胞死誘導ペプチドのヘテロ二量体の細胞死活性評価を行った結果を示している。1 スポットあたり 150 μ L の PBS でペプチドを溶出し、細胞試験に用いた。使用細胞は HeLa 細胞を使用し、30 min のペプチド処理を行った。各条件それぞれ 3 well 使用し (n=3)、3 well の平均値と標準偏差 (SD) を算出した。2 群間の比較は Student t-test の両側検定によって有意差検定を行い、p 値が 0.05 より低い場合、有意差が認められるとした。

X=19種アミノ酸 (Cを除く)



*p<0.05 versus Original peptide

X=19種アミノ酸 (Cを除く)



*p<0.05 versus Original peptide

Fig. 3-4 アミノ酸置換したペプチドの細胞死活性の比較

細胞死誘導ペプチド WELVVLGKL の各残基をシステイン(C)以外の 19 種アミノ酸に置換し、細胞死活性評価した結果を示している。1 スポットあたり 150 μ L の PBS でペプチドを溶出し、細胞試験に用いた。使用細胞は HeLa 細胞を使用し、30 min のペプチド処理を行った。各グラフの X の位置が置換したアミノ酸部位である。Original は元配列 WELVVLGKL を示している。各条件それぞれ 3 well 使用し(n=3)、3 well の平均値と標準偏差(SD)を算出した。2 群間の比較は Student t-test の両側検定によって有意差検定を行い、p 値が 0.05 より低い場合、有意差が認められるとした。

(I) 1 残基目、(II) 2 残基目、(III) 3 残基目、(IV) 4 残基目、(V) 5 残基目、(VI) 6 残基目、(VII) 7 残基目、(VIII) 8 残基目、(IX) 9 残基目のアミノ酸置換結果を示している。

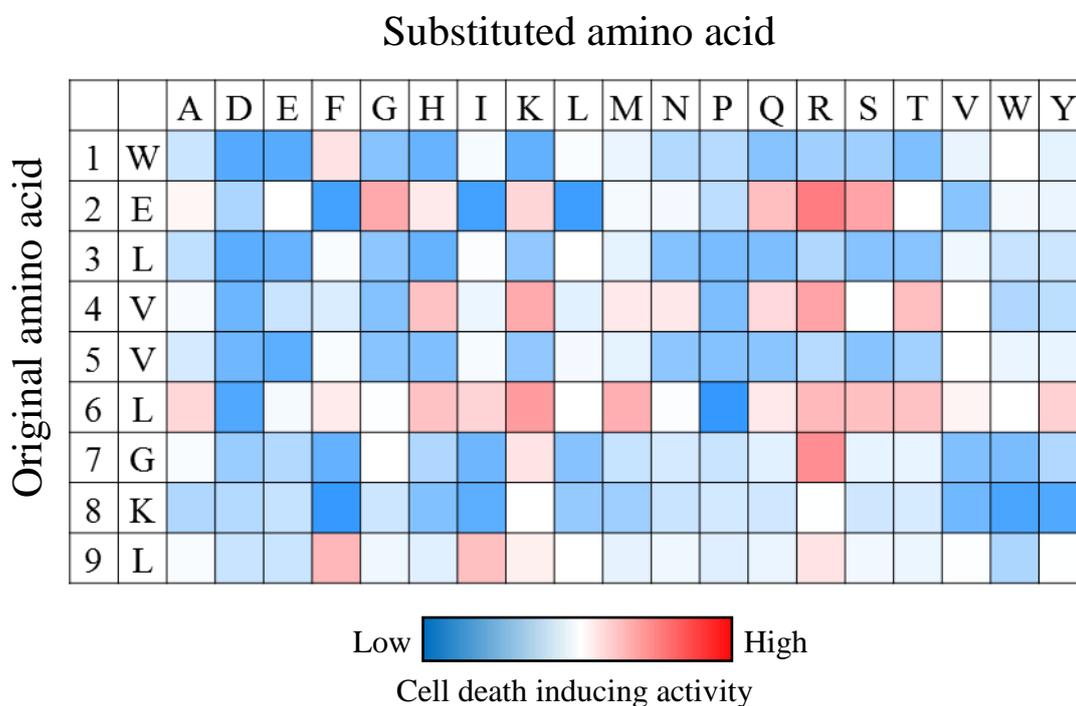


Fig. 3-5 アミノ酸置換したペプチドと元ペプチドの細胞死活性比

Fig. 3-4 の結果を元にしたヒートマップを示している。元ペプチド WELVVLGKL 処理した際の cell viability を 1 とし、それよりも cell viability が小さい(細胞死活性が高い)ものを赤、cell viability が大きい(細胞死活性が低い)ものを青で示している。縦軸には元ペプチドのどの位置を置換したか、横軸にはどのアミノ酸で置換を行ったか示している。

3.4 結言

本章では、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研究に関して論じた。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、実際に目的のヘテロ二量体ペプチドの合成が可能か、細胞内で CPP が解離するシステム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。本合成系でヘテロ二量体ペプチドが選択的に合成されるか検証した。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。その結果、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。

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る。本系を用いることで、細胞内で機能するペプチドの基礎研究につながり、細胞内を標的とするペプチド医薬品の開発に貢献できる系だと考えられる。

第 4 章

結論と今後の展望

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」を効率よく探索するための方法に関して述べた。具体的には、本研究室で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が可能か検証すること、CPP 付加の課題を解決するような系の改良を行い、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について述べた。

第 1 章の序論では、細胞内で機能するペプチドの探索における課題と本研究の目的を述べた。

第 2 章では、ペプチドの細胞内送達系を用いて、細胞内で機能するペプチドを探索可能か検証した。細胞内に入ることで細胞死を誘導する既報のペプチドをモデルペプチドとして利用し、ペプチドの細胞死活性を評価可能か、アミノ酸置換によりペプチド配列の最適化が可能か検証した。CPP-細胞死誘導ペプチド

の複合体は高い細胞死活性を示し、ペプチドの細胞内送達系を用いてペプチドの細胞内機能評価が可能なが示された。また、モデルペプチドのアラニンスキャンによるアミノ酸の候補部位の推定及びアミノ酸置換によるペプチド改変を行い、元のペプチドの2倍から4倍高い細胞死活性を有するペプチドの同定に成功した。本結果より、ペプチドの細胞内送達系は細胞内で機能するペプチドの機能評価及びペプチド配列の最適化に有用であることが示された。

第3章では、CPPの影響を排除するために、CPPと機能性ペプチドが細胞内で解離するシステムをペプチドの細胞内送達系に組み込んだ系の構築を行った。細胞内で分解されるジスルフィド結合に着目し、CPPと機能性ペプチドをジスルフィドで架橋する新規の合成法を考案した。CPPと機能性ペプチドをジスルフィド結合で架橋したヘテロ二量体ペプチドを効率よく合成するために、分岐鎖ペプチド合成技術を用いた。CPPと機能性ペプチドを一つの分子内に合成することで、ジスルフィド形成が分子内反応となり、ヘテロ二量体ペプチドを選択的に合成可能になると考え、合成系を用いて目的のペプチドを選択的に合成可能か、ペプチドの探索に応用可能か検証した。質量分析により、目的のヘテロ二量体ペプチドが選択的に合成されていることが確認できた。また、細胞内の還元環境でCPPと機能性ペプチドが解離していることを確認し、細胞内でCPPの影響なく機能性ペプチドの活性が評価されることが示唆された。続いて、既報の細

胞死誘導ペプチドを用いて、新規合成系で合成したペプチド及び作成したペプチドライブラリーの機能評価を行った。ペプチドの細胞内機能評価に成功し、高活性なペプチドの取得に成功した。これらの結果より、細胞内で解離するシステムを組み込んだ細胞内で機能するペプチドの探索系を構築に成功した。

本研究により構築した探索系は、「一度に多種類のペプチドの活性を評価可能」であり、「細胞内でペプチド本来の機能を評価可能」なため、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る。そのため、本技術が細胞内で機能するペプチド研究に貢献し、ペプチドの相互作用の理解やペプチド配列の最適化を通じて、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。

参考文献

1. Hayes, J. R., Callaghan, S., and Grant, A. P.: Effect of glibenclamide treatment on the insulin and glucagon-responses to oral glucose and galactose in maturity onset diabetics, *Diabetes & Metabolism*, **5**, 207-211 (1979).
2. Basso, N. and Terragno, N. A.: History about the discovery of the renin-angiotensin system, *Hypertension*, **38**, 1246-1249 (2001).
3. Lee, H. J., Macbeth, A. H., Pagani, J. H., and Young, W. S.: Oxytocin: The great facilitator of life, *Progress in Neurobiology*, **88**, 127-151 (2009).
4. Henninot, A., Collins, J. C., and Nuss, J. M.: The current state of peptide drug discovery: Back to the future?, *Journal of Medicinal Chemistry*, **61**, 1382-1414 (2018).
5. Petta, I., Lievens, S., Libert, C., Tavernier, J., and De Bosscher, K.: Modulation of protein-protein interactions for the development of novel therapeutics, *Molecular Therapy*, **24**, 707-718 (2016).
6. Chames, P., Van Regenmortel, M., Weiss, E., and Baty, D.: Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future, *British Journal of Pharmacology*, **157**, 220-233 (2009).
7. Uhlen, M., Fagerberg, L., Hallstrom, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, A., Kampf, C., Sjostedt, E., Asplund, A., and other authors: Tissue-based map of the human proteome, *Science*, **347** (2015).
8. Soragni, A., Janzen, D. M., Johnson, L. M., Lindgren, A. G., Nguyen, A. T. Q., Tiourin, E., Soriaga, A. B., Lu, J., Jiang, L., Faull, K. F., and other authors: A designed inhibitor of p53 aggregation rescues p53 tumor suppression in ovarian carcinomas, *Cancer Cell*, **29**, 90-103 (2016).

9. Fahraeus, R., Lain, S., Ball, K. L., and Lane, D. P.: Characterization of the cyclin-dependent kinase inhibitory domain of the INK4 family as a model for a synthetic tumour suppressor molecule, *Oncogene*, **16**, 587-596 (1998).
10. Snyder, E. L., Meade, B. R., Saenz, C. C., and Dowdy, S. F.: Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide, *Plos Biology*, **2**, 186-193 (2004).
11. Zhou, Y., Du, W., Koretsky, T., Bagby, G. C., and Pang, Q. S.: TAT-mediated intracellular delivery of NPM-derived peptide induces apoptosis in leukemic cells and suppresses leukemogenesis in mice, *Blood*, **112**, 2474-2483 (2008).
12. Kubo, A., Yoshida, T., Kobayashi, N., Yokoyama, T., Mimura, T., Nishiguchi, T., Higashida, T., Yamamoto, I., and Kanno, H.: Efficient generation of dopamine neuron-like cells from skin-derived precursors with a synthetic peptide derived from von Hippel-Lindau Protein, *Stem Cells and Development*, **18**, 1523-1531 (2009).
13. Holzer, P., Masuya, K., Furet, P., Kallen, J., Valat-Stachyra, T., Ferretti, S., Berghausen, J., Bouisset-Leonard, M., Buschmann, N., Pissot-Soldermann, C., and other authors: Discovery of a dihydroisoquinolinone derivative (NVP-CGM097): A highly potent and selective MDM2 inhibitor undergoing phase 1 clinical trials in p53wt tumors, *Journal of Medicinal Chemistry*, **58**, 6348-6358 (2015).
14. Chen, L., Hahn, H., Wu, G. Y., Chen, C. H., Liron, T., Schechtman, D., Cavallaro, G., Banci, L., Guo, Y. R., Bolli, R., Dorn, G. W., and Mochly-Rosen, D.: Opposing cardioprotective actions and parallel hypertrophic effects of delta PKC and epsilon PKC, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 11114-11119 (2001).
15. Roe, M. T., Hartmann, F., Lins, J., Batchelor, W., Ruzyllo, W., Kochman, J., Armstrong, B., Buszman, P., Leisch, F., Baran, K., and other authors: Intracoronary KAI-9803 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction, *Circulation*, **117**, 886-896 (2008).
16. Craik, D. J., Fairlie, D. P., Liras, S., and Price, D.: The future of peptide-based drugs, *Chemical Biology & Drug Design*, **81**, 136-147 (2013).

17. Derakhshankhah, H. and Jafari, S.: Cell penetrating peptides: A concise review with emphasis on biomedical applications, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **108**, 1090-1096 (2018).
18. Ellert-Miklaszewska, A., Poleszak, K., and Kaminska, B.: Short peptides interfering with signaling pathways as new therapeutic tools for cancer treatment, *Future Medicinal Chemistry*, **9**, 199-221 (2017).
19. B. Halford, How DNA-encoded libraries are revolutionizing drug discovery. *Chem. Eng. News* **95**, 28–33 (2017).
20. Rodi, D. J. and Makowski, L.: Phage-display technology - finding a needle in a vast molecular haystack, *Current Opinion in Biotechnology*, **10**, 87-93 (1999).
21. Zeng, F. L., Zhang, S. H., Hao, Z. M., Duan, S. X., Meng, Y. N., Li, P., Dong, J. G., and Lin, Y. B.: Efficient strategy for introducing large and multiple changes in plasmid DNA, *Scientific Reports*, **8**, 1714 (2018).
22. Bechara, C. and Sagan, S.: Cell-penetrating peptides: 20 years later, where do we stand?, *Febs Letters*, **587**, 1693-1702 (2013).
23. Guidotti, G., Brambilla, L., and Rossi, D.: Cell-penetrating peptides: From basic research to clinics, *Trends in Pharmacological Sciences*, **38**, 406-424 (2017).
24. Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B.: A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus, *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 16010-16017 (1997).
25. Futaki, S., Ohashi, W., Suzuki, T., Niwa, M., Tanaka, S., Ueda, K., Harashima, H., and Sugiura, Y.: Stearylated arginine-rich peptides: A new class of transfection systems, *Bioconjugate Chemistry*, **12**, 1005-1011 (2001).
26. Derossi, D., Chassaing, G., and Prochiantz, A.: Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery, *Trends in Cell Biology*, **8**, 84-87 (1998).

27. Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M. E., Bourke, J., Wells, D. J., and other authors: Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study, *Lancet*, **378**, 595-605 (2011).
28. Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., and other authors: Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study, *Lancet Neurology*, **8**, 918-928 (2009).
29. Li, J. M., Liu, F., Shao, Q., Min, Y. Z., Costa, M., Yeow, E. K. L., and Xing, B. G.: Enzyme-responsive cell-penetrating peptide conjugated mesoporous silica quantum dot nanocarriers for controlled release of nucleus-targeted drug molecules and real-time intracellular fluorescence imaging of tumor cells, *Advanced Healthcare Materials*, **3**, 1230-1239 (2014).
30. Singh, T., Murthy, A. S. N., Yang, H. J., and Im, J.: Versatility of cell-penetrating peptides for intracellular delivery of siRNA, *Drug Delivery*, **25**, 2005-2015 (2018).
31. Sakamoto, K., Sogabe, S., Kamada, Y., Sakai, N., Asano, K., Yoshimatsu, M., Ida, K., Imaeda, Y., and Sakamoto, J. I.: Discovery of high-affinity BCL6-binding peptide and its structure-activity relationship, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **482**, 310-316 (2017).
32. Copolovici, D. M., Langel, K., Eriste, E., and Langel, U.: Cell-Penetrating Peptides: Design, Synthesis, and Applications, *Acs Nano*, **8**, 1972-1994 (2014).
33. Ahrens, V. M., Bellmann-Sickert, K., and Beck-Sickinger, A. G.: Peptides and peptide conjugates: therapeutics on the upward path, *Future Medicinal Chemistry*, **4**, 1567-1586 (2012).
34. Saito, G., Swanson, J. A., and Lee, K. D.: Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, **55**, 199-215 (2003).

35. Matsumoto, R., Okochi, M., Shimizu, K., Kanie, K., Kato, R., and Honda, H.: Effects of the properties of short peptides conjugated with cell-penetrating peptides on their internalization into cells, *Scientific Reports*, **5**, 9 (2015).
36. Garcia-Garcia, J. C., de la Fuente, J., Kocan, K. M., Blouin, E. F., Halbur, T., Onet, V. C., and Saliki, J. T.: Mapping of B-cell epitopes in the N-terminal repeated peptides of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a and characterization of the humoral immune response of cattle immunized with recombinant and whole organism antigens, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **98**, 137-151 (2004).
37. Kato, R., Kunimatsu, M., Fujimoto, S., Kobayashi, T., and Honda, H.: Angiotensin II inhibitory peptide found in the receptor sequence using peptide array, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **315**, 22-29 (2004).
38. Kume, A., Okochi, M., Shimizu, K., Yoshida, Y., and Honda, H.: Development of a tactical screening method to investigate the characteristics of functional peptides, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **21**, 119-127 (2016).
39. Takeshita, T., Okochi, M., Kato, R., Kaga, C., Tomita, Y., Nagaoka, S., and Honda, H.: Screening of peptides with a high affinity to bile acids using peptide arrays and a computational analysis, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **112**, 92-97 (2011).
40. Holmes, C. P. and Jones, D. G.: Reagents for combinatorial organic-synthesis - development of a new o-nitrobenzyl photolabile linker for solid-phase synthesis, *Journal of Organic Chemistry*, **60**, 2318-2319 (1995).
41. Kaga, C., Okochi, M., Nakanishi, M., Hayashi, H., Kato, R., and Honda, H.: Screening of a novel octamer peptide, CNSCWSKD, that induces caspase-dependent cell death, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **362**, 1063-1068 (2007).
42. Ochiai, T., Sugita, T., Kato, R., Okochi, M., and Honda, H.: Screening of an alpha-Amylase Inhibitor Peptide by Photolinker-Peptide Array, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **76**, 819-824 (2012).

43. Ishiyama, M., Miyazono, Y., Sasamoto, K., Ohkura, Y., and Ueno, K.: A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, *Talanta*, **44**, 1299-1305 (1997).
44. Seo, Y. W., Woo, H. N., Piya, S., Moon, A. R., Oh, J. W., Yun, C. W., Kim, K. K., Min, J. Y., Jeong, S. Y., Chung, S., and other 5 authors: The cell death-inducing activity of the peptide containing Noxa mitochondrial-targeting domain is associated with calcium release, *Cancer Research*, **69**, 8356-8365 (2009).
45. Kim, J. Y., Han, J. H., Moon, A. R., Park, J. H., Chang, J. H., Bae, J., and Kim, T. H.: Minimal killing unit of the mitochondrial targeting domain of Noxa, *Journal of Peptide Science*, **19**, 485-490 (2013).
46. Chanphai, P., Bekale, L., and Tajmir-Riahi, H. A.: Effect of hydrophobicity on protein-protein interactions, *European Polymer Journal*, **67**, 224-231 (2015).
47. Liao, S. M., Du, Q. S., Meng, J. Z., Pang, Z. W., and Huang, R. B.: The multiple roles of histidine in protein interactions, *Chemistry Central Journal*, **7** (2013).
48. Robin, E. D. and Wong, R.: Mitochondrial-DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian-cells, *Journal of Cellular Physiology*, **136**, 507-513 (1988).
49. Brighton, C. T. and Hunt, R. M.: Mitochondrial calcium and its role in calcification-histochemical localization of calcium in electron micrographs of epiphyseal growth plate with K-pyroantimonate, *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 406-416 (1974).
50. Rossier, M. F.: T channels and steroid biosynthesis: in search of a link with mitochondria, *Cell Calcium*, **40**, 155-164 (2006).
51. Witt, D.: Recent developments in disulfide bond formation, *Synthesis-Stuttgart*, **16**, 2491-2509 (2008).

52. Bulaj, G.: Formation of disulfide bonds in proteins and peptides, *Biotechnology Advances*, **23**, 87-92 (2005).
53. Begas, P., Staudacher, V., and Deponce, M.: Systematic re-evaluation of the bis(2-hydroxyethyl) disulfide (HEDS) assay reveals an alternative mechanism and activity of glutaredoxins, *Chemical Science*, **6**, 3788-3796 (2015).
54. Sugiura, H., Okazaki, N., Sugiura, T., Honda, H., and Okochi, M.: Degranulation of basophilic leukemia cells on branched-chain peptide array with an OVA-DNP double epitope, *Biochemical Engineering Journal*, **87**, 8-14 (2014).
55. Soudy, R., Ahmed, S., and Kaur, K.: NGR Peptide Ligands for Targeting CD13/APN Identified through Peptide Array Screening Resemble Fibronectin Sequences, *Acs Combinatorial Science*, **14**, 590-599 (2012).
56. Schulz, A., Adermann, K., Eulitz, M., Feller, S. M., and Kardinal, C.: Preparation of disulfide-bonded polypeptide heterodimers by titration of thio-activated peptides with thiol-containing peptides, *Tetrahedron*, **56**, 3889-3891 (2000).
57. 鈴木, 健.: 環状化ペプチドライブラリーの構築とペプチド探索に関する研究, 卒業論文, 名古屋大学工学部, (2019)
58. de Araujo, C. B., Russo, L. C., Castro, L. M., Forti, F. L., do Monte, E. R., Rioli, V., Gozzo, F. C., Colquhoun, A., and Ferro, E. S.: A novel intracellular peptide derived from G(1)/S cyclin D2 induces cell death, *Journal of Biological Chemistry*, **289**, 16711-16726 (2014).
59. Forman, H. J., Zhang, H. Q., and Rinna, A.: Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, **30**, 1-12 (2009).

本博士論文に係る発表論文

1. **Ikko Kozaki**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Effective modification of cell death-inducing intracellular peptides by means of a photo-cleavable peptide array-based screening system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 124, No. 2, pp. 209-214 (2017)
2. **Ikko Kozaki**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Disulfide linked hetero dimeric peptide arrays for screening functional peptides inside cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press (2020)

書籍及び総説

- 小崎一功**, 本多裕之: 機能性ペプチドの探索技術, 月刊ファインケミカル, Vol. 45, No. 9, pp. 16-24 (2016)

学会発表

国際学会 5 回、国内学会 10 回

(本博士論文に係る国際会議を以下に記載)

1. **Ikko Kozaki**, Kazunori Shimizu, Ryo Matsumoto, Mina Okochi, Kei Kanie, Ryuji Kato, Hiroyuki Honda: Development of a screening system for intracellular functional peptides using both peptide arrays and cell penetrating peptides, The 22nd Symposium of Young Asian Biological Engineers' Community, October 27-29, Miyazaki, Japan (2016)
2. **Ikko Kozaki**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Improvement of the activity of intracellular functional peptides using peptide array-based screening system, American Peptide Symposium 2017, June 17-22, Whistler, Canada (2017)
3. **Ikko Kozaki**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Improving the intracellular activity of functional peptides by modifying sequences using peptide array based

screening system, IGER International Symposium on Cell Surface Structures and functions 2017, November 30-December 1, Aichi, Japan (2017)

4. **Ikko Kozaki**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Development and evaluation of a heterodimeric peptide array system utilizing disulfide bond, 2019 Sakura-Bio Meeting, March 30-31, Aichi, Japan (2019)

5. **Ikko Kozaki**, Kazunori Shimizu, Hiroyuki Honda: Peptide array based synthetic method of hetero-dimeric peptides cross-linked by disulfide bond, 7th Modern Solid Phase Peptide Synthesis and Its Applications Symposium, September 5-7, Palm cove, Australia (2019)

受賞

1. 第19回 生物工学会 若手研究者の集い 夏のセミナー2016 優秀ポスター賞, 「細胞内機能性ペプチド探索系を用いたペプチドの機能改良」, 東京, 2016年7月
2. 生物学学生優秀賞(飛翔賞), 「ペプチドアレイを利用した細胞内機能性ペプチドの高活性化」, 東京, 2017年9月

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始適切な助言、指導をしてくださいました名古屋大学大学院 工学研究科 生命分子工学専攻の本多 裕之 教授、清水 一憲 准教授に厚く御礼申し上げます。またご多忙な中副査を担当していただきました工学研究科 生命分子工学専攻の清中 茂樹 教授、村上 裕 教授、名古屋大学大学院 生命農学研究科 応用生命科学専攻の中野 秀雄 教授に厚く御礼申し上げます。

本多先生と清水先生には、学部 4 年生、博士前期課程、博士後期課程の 6 年間で指導頂きました。日々のミーティングや毎週行われるゼミを通じて、研究の立案から実験の組み方、データの考察、論文化までの研究者として必要な力を享受して頂きました。他大学や他研究科、企業の方との共同研究にも参加させて頂き、幅広い知識や他者と協力して研究を進める経験ができました。この 6 年間で学んだことは私の研究者としての礎となっております。心より御礼申し上げます。また、日々の研究活動において、不自由なく研究できる環境を整えて頂き、研究活動をスムーズに行うことができました。重ねて御礼申し上げます。

名古屋大学大学院 創薬科学研究科 細胞分子情報学分野の加藤 竜司 准教授、蟹江 慧 助教には本多研究室との合同ゼミで鋭いご指摘や温かいご助言を頂きました。研究に対する考え方や、着眼点は私にとって非常に刺激的で、自身の研究に取り組むうえで大変参考になりました。厚く御礼申し上げます。

研究室のペプチドチームのメンバーの先輩である久米 暁子博士、荻原 沙緒理さん、田邊 智哉さん、魚井 清香さん、松本 凌さん、山内 望さんには日々の研究方針の立て方をはじめ、実験の手技や発表資料作成など多くのご指導を頂きました。皆様から学んだ研究に対する取り組み方、研究の進め方や伝え方、後輩指導、それら全てが私の研究者としての糧となっております。心より感謝申し上げます。また、ペプチドチームのメンバーである伊藤 雅子さん、岩田 晋明さん、今井 健人さん、田添 佳歩さん、山下 春来さん、游 盛兆さん、梁 韵姿さん、池田 彩さん、高 紫維さん、鈴木 健弘さん、森 陽子さん、吉岡 慶太郎さん、金丸 佳樹さん、木下 怜実さん、羽川 瞳さんには、ペプチドの工学的利用に向けて、活発な議論を交わし共に研究を進める経験ができました。皆様の研究に対する姿勢は私の励みとなり、研究活動を遂行することができました。心より感謝申し上げます。

日々の事務手続きでは事務員の前田 桂子さんに大変お世話になりました。技術職員の太田 ちよかさんには実験に使用する試薬の調製などの実験準備で大

変お世話になりました。お二人には日々温かい励ましのお言葉を頂き、精一杯研究活動を行うことができました。厚く御礼申し上げます。また、本研究を進めるにあたり、様々なご指摘、アイデアを提供して頂いた研究室の卒業生である佐々木 寛人博士、山本 修平博士、新井 小百合博士、丹羽 宏介さん、費 佳慧さん、後藤 友規さん、崎川 知穂さん、片山 碧さん、前川 忠儀さん、山岡 奈央さん、研究室メンバーの長島 拓則さん、大隅 早紀さん、吉川 真広さん、古谷 太樹さん、葛西 晴郎さん、中村 健人さん、村田 朱里さん、有本 加奈絵さん、山本 一貴さんには心より感謝申し上げます。名古屋大学大学院 創薬科学研究科 細胞分子情報学分野 加藤研究室の皆様、卒業生の皆様には、合同セミナーを通じて有意義な議論や鋭いご指摘を頂き、新たな視点や考え方を得ることができました。心より感謝申し上げます。

最後に、これまでの学生生活の全てを支えて頂いた両親に心より感謝申し上げます。無事最後まで大学で研究生活を送ることができました。本当にありがとうございました。これからは皆様に頂いたものを社会に還元し、社会に貢献できる研究者を目指して邁進していく所存です。

小崎 一功