

## 疎水性相互作用に基づく細胞膜修飾により細胞を機能化する分子の開発

畠中, 渉

<https://hdl.handle.net/2324/2236204>

---

出版情報：九州大学, 2018, 博士（工学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：



KYUSHU UNIVERSITY

## 博士論文

# 疎水性相互作用に基づく細胞膜修飾により 細胞を機能化する分子の開発

平成 31 年 3 月

九州大学大学院  
工学府 材料物性工学専攻  
片山研究室 富中 渉

指導教官: 片山 佳樹



第一章 .....	1
序論 .....	1
1. 1 細胞膜修飾による細胞の機能化 .....	1
1. 1. 1 遺伝子工学的手法による膜修飾 .....	1
1. 1. 2 化学的手法による膜修飾 .....	1
1. 2 疎水性相互作用に基づく細胞膜修飾 .....	2
1. 2. 1 細胞膜外葉の修飾 .....	3
1. 2. 2 細胞膜内葉の修飾 .....	11
1. 2. 3 細胞膜貫通型の修飾 .....	13
1. 3 本論文の目的および構成 .....	15
1. 4 参考文献 .....	16
第二章 .....	19
細胞膜表面への安定な分子提示を可能にするペプチド型膜アンカーの開発 .....	19
2. 1 緒言 .....	19
2. 1. 1 ペプチド型膜アンカー .....	19
2. 1. 2 本研究の目的および戦略 .....	19
2. 2 実験 .....	20
2. 2. 1 試薬 .....	20
2. 2. 2 Fmoc 固相合成法によるペプチド型膜アンカーの合成 .....	20
2. 2. 3 細胞培養 .....	21
2. 2. 4 細胞へのペプチド型膜アンカーの修飾 .....	21
2. 2. 5 ペプチド型膜アンカーの溶解性 .....	22
2. 2. 6 ペプチド型膜アンカーの細胞上での安定性 .....	23
2. 2. 7 ペプチド型膜アンカーの濃度依存的な修飾量および細胞生存率の変化 .....	23
2. 2. 8 ペプチド型膜アンカーの細胞内局在 .....	23
2. 2. 9 リサイクリング経路によるペプチド型膜アンカーの再提示 .....	23
2. 2. 10 レセプターとして機能するペプチド型膜アンカーの合成 .....	24
2. 2. 11 細胞表面におけるレセプター/リガンド認識 .....	25
2. 3 結果と考察 .....	26
2. 3. 1 Fmoc 固相合成法によるペプチド型膜アンカーの合成 .....	26
2. 3. 2 細胞へのペプチド型膜アンカーの修飾 .....	27
2. 3. 3 ペプチド型膜アンカーの溶解性 .....	30

2. 3. 4 ペプチド型膜アンカーの細胞上での安定性.....	32
2. 3. 5 ペプチド型膜アンカーの濃度依存的な修飾量および細胞生存率の変化 .....	33
2. 3. 6 ペプチド型膜アンカーの細胞内局在 .....	35
2. 3. 7 リサイクリング経路によるペプチド型膜アンカーの再提示 .....	36
2. 3. 8 レセプターとして機能するペプチド型膜アンカーの合成.....	38
2. 3. 9 細胞表面におけるレセプター/リガンド認識.....	39
2. 4 結語 .....	42
2. 5 参考文献.....	43
第三章 .....	44
膜貫通タンパク質の機能模倣を目指した膜貫通分子の開発 .....	44
3. 1 緒言 .....	44
3. 1. 1 膜貫通タンパク質の機能.....	44
3. 1. 2 膜貫通状態を達成する膜修飾法 .....	45
3. 1. 3 膜貫通分子の設計 .....	46
3. 1. 4 本研究の目的および戦略.....	48
3. 2 実験.....	49
3. 2. 1 試薬.....	49
3. 2. 2 Fmoc 固相合成法によるペプチドの合成.....	49
3. 2. 3 ペプチドの溶解性 .....	51
3. 2. 4 細胞培養.....	52
3. 2. 5 細胞上でのペプチドの挙動 .....	52
3. 2. 6 ペプチドの細胞内局在 .....	52
3. 2. 7 膜電位阻害条件下でのペプチドの細胞内局在の変化.....	52
3. 2. 8 ペプチド濃度に依存した細胞生存率への影響 .....	53
3. 2. 9 人工脂質二重膜を使用したペプチドの膜透過能の評価 .....	53
3. 2. 10 膜貫通分子の細胞表面におけるレセプター/リガンド認識 .....	53
3. 3 結果と考察 .....	55
3. 3. 1 Fmoc 固相合成法によるペプチドの合成.....	55
3. 3. 2 ペプチドの溶解性 .....	57
3. 3. 3 細胞上でのペプチドの挙動 .....	59
3. 3. 4 ペプチドの細胞内局在 .....	60
3. 3. 5 膜電位阻害条件下でのペプチドの細胞内局在の変化.....	61
3. 3. 6 ペプチド濃度に依存した細胞生存率への影響 .....	61
3. 3. 7 人工脂質二重膜を使用したペプチドの膜透過能の評価 .....	62
3. 3. 8 膜貫通分子の細胞表面におけるレセプター/リガンド認識 .....	65

3.4 結語	69
3.5 参考文献	70
第四章	71
内葉上に分子提示する膜貫通分子のクリック反応による合成とその機能評価	71
4.1 緒言	71
4.1.1 クリック反応を用いた複雑な分子の合成	71
4.1.2 本研究の目的および戦略	73
4.2 実験	74
4.2.1 試薬	74
4.2.2 クリック反応用分子の合成	74
4.2.3 膜貫通分子のクリック反応による合成	77
4.2.4 膜貫通分子の溶解性	78
4.2.5 細胞培養	78
4.2.6 細胞上での膜貫通分子の挙動	78
4.2.7 mCherry-eDHFR の発現	79
4.2.8 mCherry-eDHFR 発現細胞膜内葉上でのレセプター/リガンド認識	79
4.3 結果と考察	80
4.3.1 クリック反応用分子の合成	80
4.3.2 膜貫通分子のクリック反応による合成	82
4.3.3 膜貫通分子の溶解性	84
4.3.4 細胞上での膜貫通分子の挙動	84
4.3.5 mCherry-eDHFR 発現細胞膜内葉上でのレセプター/リガンド認識	87
4.4 結語	90
4.5 参考文献	91
第五章	92
結論	92
謝辞	95



# 第一章

## 序論

### 1. 1 細胞膜修飾による細胞の機能化

細胞膜は、主に両親媒性のリン脂質とコレステロールから成る厚さ約5 nmの二重膜であり、受容体、イオンチャネルや接着タンパク質を含む様々なタンパク質で満たされている。そのため細胞膜は、細胞の内外を分けるバリアとしての働きだけでなく、細胞内へのシグナル伝達、細胞内外への基質の輸送や細胞間のコミュニケーションといった様々な機能発現の場となっている<sup>1</sup>。近年、細胞膜を種々の方法で修飾することで細胞機能の制御や新たな機能を付与する、細胞膜修飾による細胞の機能化が盛んに研究されている<sup>2-4</sup>。細胞を機能化する膜修飾法は、二つの手法に大別される<sup>5</sup>。一つ目が遺伝子工学的手法であり、二つ目が化学的手法である。

#### 1. 1. 1 遺伝子工学的手法による膜修飾

本手法は、目的のタンパク質をコードした遺伝子を細胞に導入することで、人工的に細胞膜にタンパク質を発現させる一般的な方法である<sup>6</sup>。物理的に一時的な細孔を細胞膜に開けDNAを導入する方法やカチオン性の脂質とDNAを複合体化させて細胞に導入する方法がある。後者はキットとして市販されており、遺伝子工学的に細胞膜を改変する場合に簡便に実行できる。遺伝子工学的手法の利点は、タンパク質を細胞膜上に永続的に導入できる点であり、導入したタンパク質によるシグナル伝達の誘起など細胞の高度な機能化が実現する。例えば、細胞傷害性の免疫細胞（T細胞）にがん細胞特異的なキメラ抗原受容体（CAR）を発現させ治療を行うCAR-T療法は、特定のがんに対して効果を発揮、実用化されている<sup>7</sup>。一方、改変手段がタンパク質の発現に限られ、また目的のタンパク質をコードした遺伝子の設計や発現条件の最適化など研究者に技量を要求する。さらに、遺伝子導入による細胞表現系への影響、つまり細胞元来の機能を損なう危険性がある点には注意を要する。

#### 1. 1. 2 化学的手法による膜修飾

本手法は、化学結合を利用して細胞膜表面に分子を導入することで修飾を行う方法である。分子を膜タンパク質へ共有結合で導入する方法、正電荷に調整した分子を負電荷を帯びた細胞表面に静電相互作用により結合させる方法や分子に疎水基を修飾して細胞膜に対して疎水性相互作用により修飾する方法などが報告されている（Figure 1-1）<sup>3, 4</sup>。化学的手法では、あらゆる分子を細胞に添加するだけの簡便な操作で短時間に修飾できるという汎用性と利便

性を備えている。また、遺伝子工学的手法で問題視される細胞表現型への影響も少ない。しかし、共有結合での分子提示であれば修飾量がタンパク質の発現量に依存し、また修飾によりタンパク質の機能を損なう危険性がある。静電相互作用による修飾は、強い細胞毒性が懸念されている。その点、疎水性相互作用に基づく膜修飾は、分子を膜に修飾するため修飾量の制限や細胞毒性の心配が少ない点で優れている。また、膜内葉にも分子を提示できるため、多くの分子が疎水性相互作用によって細胞膜上に修飾され、その物性評価や細胞の機能化が報告されている。

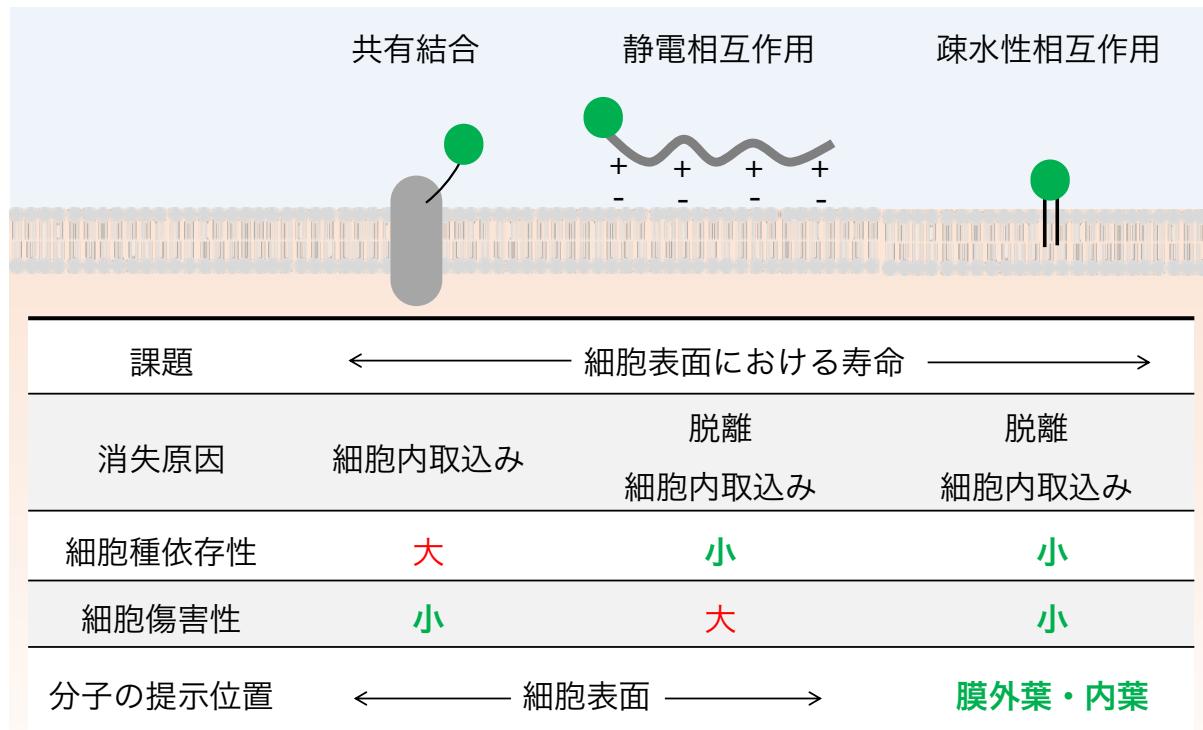
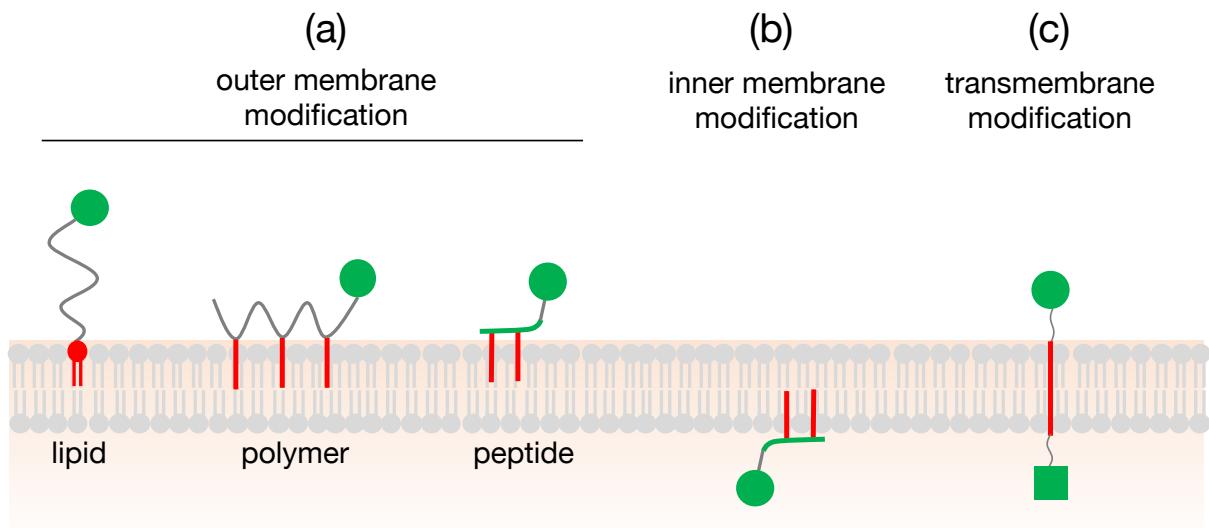


Figure 1-1. 代表的な細胞膜の化学的な修飾方法

## 1.2 疎水性相互作用に基づく細胞膜修飾

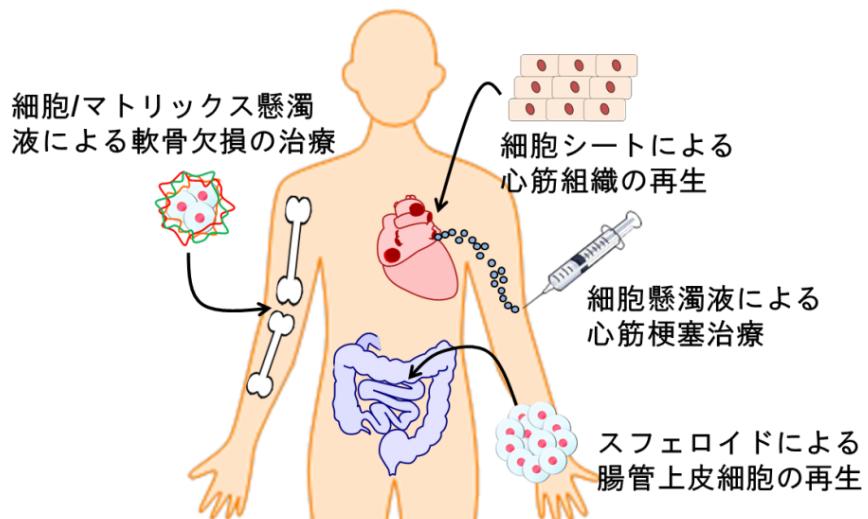
これまでに報告されている疎水性相互作用に基づいた膜修飾分子を (Figure 1-2) にまとめた。膜修飾分子を大別すると、分子提示の対象が細胞膜外葉または内葉の分子および膜貫通型の三種類に分類することができる (Figure 1-2(a), (b))。



**Figure 1-2.** (a) 膜外葉上に分子を提示する各種膜修飾分子、(b) 膜内葉上に分子を提示する膜修飾分子、(c) 細胞膜外、内葉上に分子を提示する膜貫通型の膜修飾分子

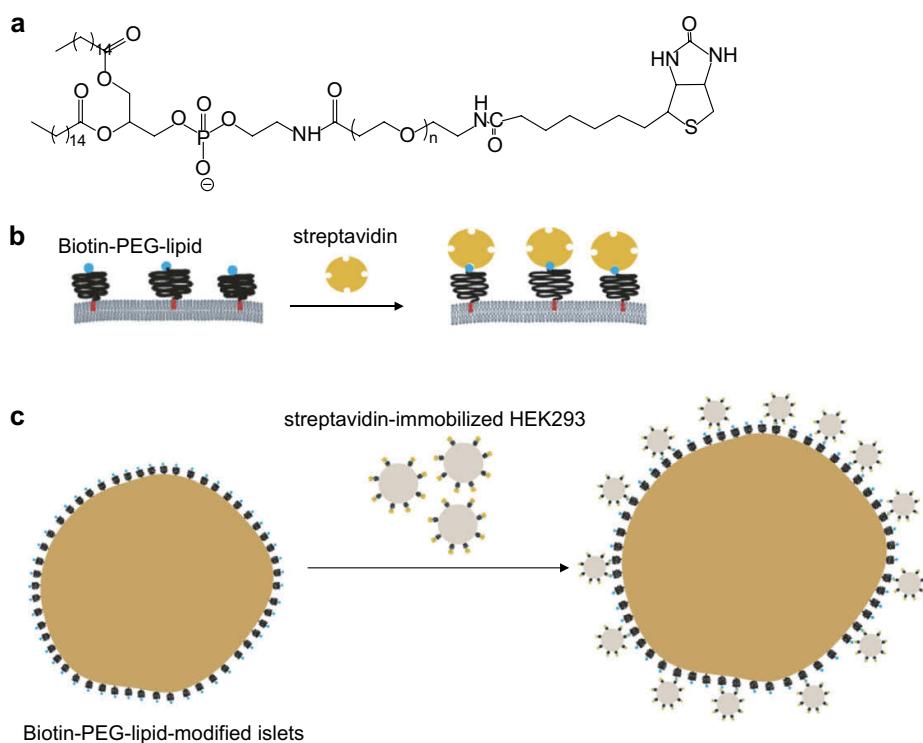
### 1. 2. 1 細胞膜外葉の修飾

膜修飾分子による膜外葉の修飾 (**Figure 1-2(a)**) は、これまでに多くの研究が報告されており、タンパク質<sup>8-10</sup>、ペプチド<sup>11</sup> および DNA<sup>12,13</sup> などが提示可能と示されてきた。提示できる分子の多様性に加え、細胞機能への摂動や細胞毒性の低さから、疎水性相互作用に基づいて機能化された細胞が再生医療分野へ応用されている。再生医療とは、自家の幹細胞や人工多能性幹細胞を用いて炎症や機能低下した組織を回復させる治療法である。再生医療における細胞の投与形態として、細胞懸濁液<sup>14</sup>や細胞/マトリックス混合物<sup>15</sup>、スフェロイド<sup>16</sup>、細胞シート<sup>17</sup>があり、いずれも組織機能の回復に一定の効果を示している (**Figure 1-3**)<sup>5</sup>。



**Figure 1-3.** 再生医療における細胞の投与形態<sup>5</sup>

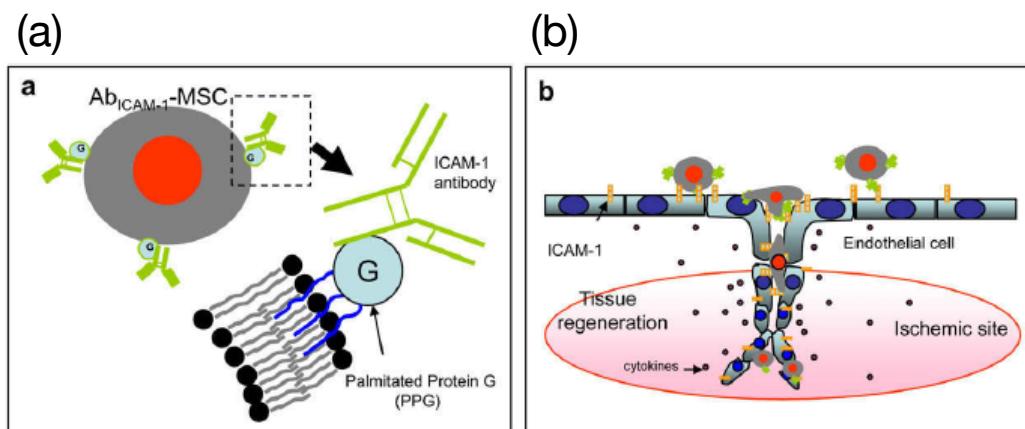
中でも、疎水性相互作用に基づいた細胞の機能化により細胞接着を誘導し、細胞を組織化することで治療に貢献する研究が報告されている。Iwata らは、糖尿病治療に向けた臍島移植で問題となる免疫応答を、膜修飾分子を介した臍島表面への細胞の被覆により回避する戦略を報告している<sup>18</sup>。彼らは、PEG 修飾脂質型膜修飾分子を介して線維芽細胞である HEK293 細胞膜上にビオチンついでストレプトアビジンを導入した。そこに PEG 修飾脂質型膜修飾分子を介してビオチンを修飾した臍島を加えた結果、HEK293 細胞を臍島表面に固定化できた (Figure 1-4)<sup>18</sup>。臍島細胞は正常に機能し、培養数日後には臍島の表面が細胞層で完全に覆われた。このことから、膜修飾分子による細胞の機能化が細胞集合体の形成に応用できることが示された。彼らは、同様の戦略を肝臓細胞にも適用し効果があることを示している<sup>19</sup>。また彼らは、相補的な DNA を有する一対の膜修飾分子を異なる細胞膜上に修飾するという戦略を用いた異種細胞間の接着にも成功している<sup>20</sup>。そして、胚葉体への適用により再生医療への応用の可能性を示している。



**Figure 1-4.** (a) ビオチンを修飾した脂質型膜修飾分子、(b) ビオチン修飾脂質型膜修飾分子を介した細胞表面へのストレプトアビジンの修飾、(c) 脍島細胞を別の細胞で覆う戦略の模式図<sup>18</sup>

Reprinted with permission from *Biomaterials*, 2009, 30, 2270. Copyright 2009 Elsevier Ltd.

また、再生医療の中でも細胞懸濁液の投与は、血中投与も可能な簡便かつ低侵襲な方法であるという大きな利点がある。しかし、投与した細胞の標的部位への生着率は一般的に 3% 以下ときわめて低いことが問題として認識されている<sup>21</sup>。そのため、膜修飾分子による細胞の機能化により、標的組織への細胞の選択性を高める戦略が有効と考えられる。例えば Ko らは、間葉系幹細胞 (MSC) 表面にパルミトイル化したプロテイン G (PPG) を介して炎症状態の血管内皮細胞に高発現している細胞間接着分子-1 (ICAM-1) に対する抗体を修飾した細胞を調製した (Figure 1-5(a), (b))<sup>22</sup>。この細胞を用いることで炎症状態の血管内皮細胞への MSC の送達に *in vitro* で成功している。また Bull らは、虚血性心筋梗塞後に心筋細胞上に高度に発現する stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) を認識する CXC ケモカイン受容体 4 (CXCR4) を MSC 上に脂質型膜修飾分子を介して修飾した<sup>23</sup>。この細胞は、*in vitro*において SDF-1 に応答した遊走を示した。これらの研究から、疎水性相互作用に基づいた細胞の機能化が MSC の投与による再生医療へ応用できる可能性が示された。



**Figure 1-5.** (a) PPG を介して抗体を修飾した MSC の模式図、(b) 抗体修飾 MSC の患部への送達の模式図<sup>22</sup>

Reprinted with permission from *Biomaterials*, 2009, 30, 3702. Copyright 2009 Elsevier Ltd.

Ko や Bull らにより疎水性相互作用に基づいて機能化された細胞が細胞の投与という治療法へ応用できる可能性が示されたものの、その実現には至っていない。この原因として、分子の提示時間（寿命）の短さが挙げられる<sup>20</sup>。特に、血中ではせん断応力による物理的な脱離が懸念されるため、安定した分子の提示が機能化した細胞の体内投与に求められると考えられる<sup>22</sup>。これは、共有結合や転移酵素の処理により膜タンパク質を修飾した細胞では効果的な細胞の送達が *in vivo* で達成されていることからも推察される<sup>24,25</sup>。寿命の短さという弱点を克服することで、その利点から疎水性相互作用による膜修飾の応用範囲が広がり、より簡便な再生医療の実現に繋がると期待される。そのため、この寿命を延ばす方法が研究されている。

疎水性相互作用により細胞膜上に修飾された分子の寿命を左右する要因として、分子の膜からの脱離およびエンドサイトーシスによる取り込みが挙げられる。そこで、分子の寿命を延ばす方法として、三つの戦略が報告されている。それらは、(1) 膜修飾分子上の疎水基の数を増やす方法、(2) 疎水基の疎水性を高くする方法により膜からの脱離を抑制する戦略、および(3) 取り込まれた分子をリサイクリングエンドソームにより再提示させるという戦略である。一つ目の戦略では、Nagamune らが脂質型膜修飾分子の疎水基が二つの分子の方が一つのものよりも細胞膜上での半減期が長いことを報告している (Figure 1-6)<sup>26</sup>。彼らは、オレイル基を一または二本有する膜修飾分子に Poly(ethylene glycol) (PEG) を修飾した脂質型膜修飾分子を用意した。それらを細胞に修飾後、膜上での分子の寿命をラベルされている蛍光分子の蛍光強度から評価した。

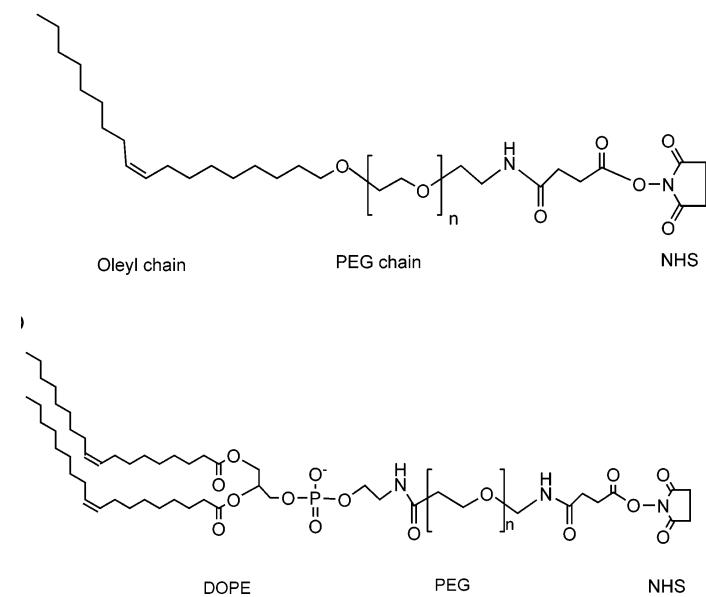


Figure 1-6. 異なる数の疎水基をもつ脂質型膜修飾分子<sup>26</sup>

Reprinted with permission from *Biotechnol. Prog.*, 2004, 20, 897. Copyright 2004 John Wiley & Sons, Inc.

二つ目の戦略では、Iwata らが、より長い脂肪酸を有する脂質型膜修飾分子を使用することで細胞表面上での分子の寿命が延びることを明らかにしている (Figure 1-7) <sup>27</sup>。本研究で彼らは、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DPPE) を基準に、1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DMPE) および 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DSPE) を用意し、それぞれに分子量 5 k の PEG を修飾した脂質型膜修飾分子を用意した。そして、それらを細胞に修飾した後に、膜上での分子の寿命および脱離した分子の定量をラベルされている蛍光分子の蛍光強度から評価した。また、ここで示された結果と同様の報告が他の研究グループからなされている <sup>28,29</sup>。

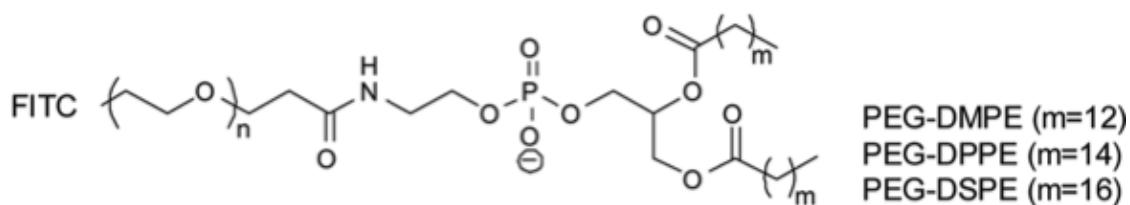
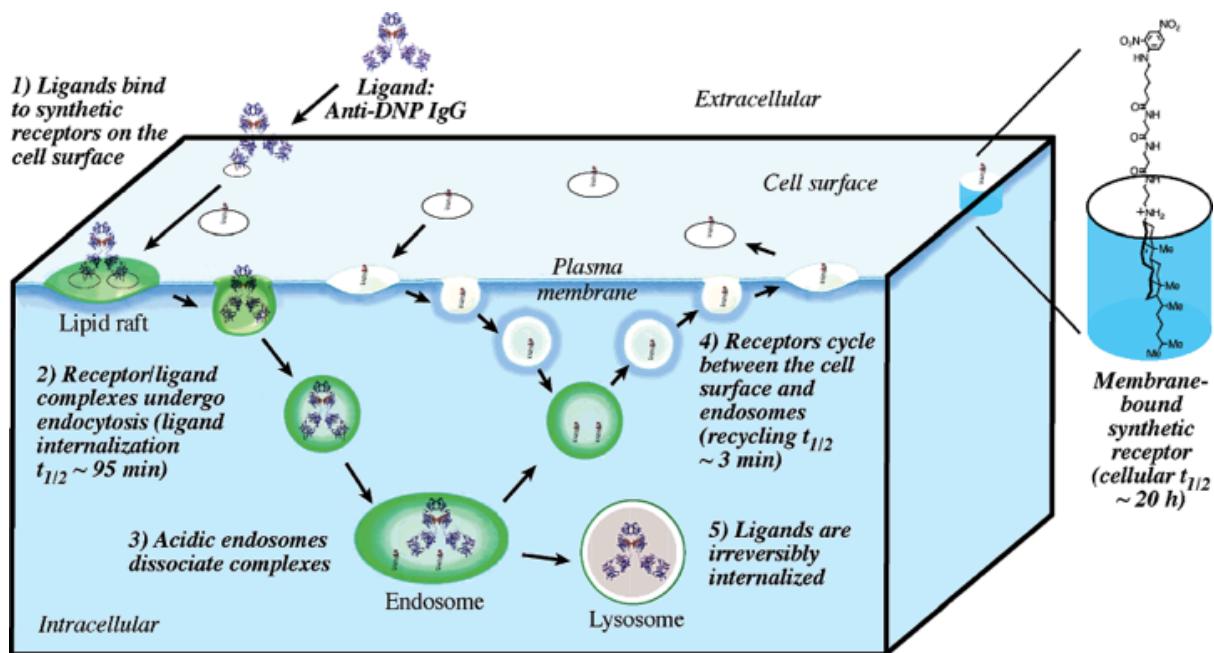


Figure 1-7. 各脂肪酸が修飾された脂質型膜修飾分子 <sup>27</sup>

Reprinted with permission from *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, 2010, 2, 1514. Copyright 2010 American Chemical Society

三つ目の戦略では Peterson らが、リガンドにコレステロールを修飾した脂質型膜修飾分子を細胞に修飾し、エンドソームによる取り込み後のリサイクリングエンドソームによる分子の膜外葉への再提示の評価を報告している <sup>30</sup>。彼らの膜修飾分子は、リサイクリングエンドソーム経路により 3 分程度で細胞膜上に再提示されることがわかった (Figure 1-8) <sup>30</sup>。リサイクリングエンドソームによる膜上への分子の再提示は、細胞が受容体など天然のタンパク質を再利用する場合に利用される <sup>31</sup>。そのため、再提示機構を膜修飾分子に応用することで、天然のタンパク質並みの寿命 (葉酸受容体の半減期は 24 時間 <sup>32</sup>) が期待できる。実際彼らの膜修飾分子は、その半減期が 20 時間であることが示されている。

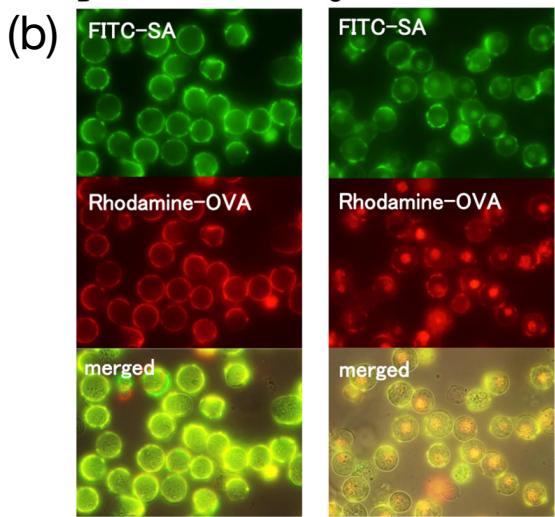
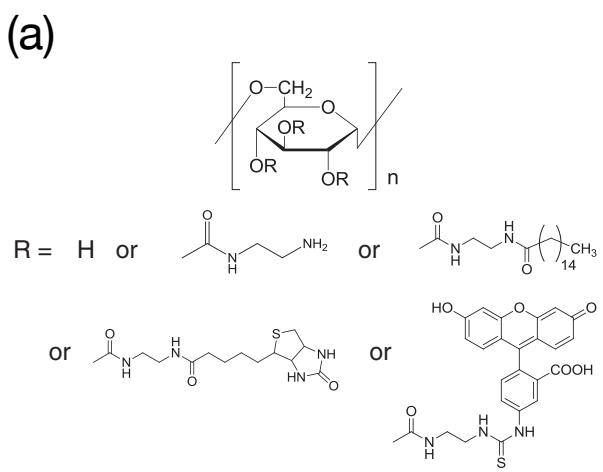


**Figure 1-8.** (左) リガンド修飾コレステロールがエンドサイトーシスにより取り込まれ、リサイクリングエンドソームによって膜上に再提示される経路および(右) リガンド修飾コレステロールの構造<sup>30</sup>

Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, 2004, 126, 16379. Copyright 2004 American Chemical Society

ここまでをまとめると、細胞膜外葉を修飾する分子の寿命向上を考えた場合、膜修飾分子に導入する疎水基の数およびその疎水性を上げることによって、膜からの脱離を抑制し寿命を延ばすことができると考えられる。また、エンドサイトーシスにより分子が取り込まれてもリサイクリングエンドソームによる膜上への再提示を利用することで、寿命が延びると期待できる。以上の戦略を膜修飾分子の設計に落とし込む場合、ここまでに取り上げたリン脂質を中心とする脂質型の基体では、その設計の自由度に限界があると考えられる。

そこで、提示分子の寿命を延ばすことを目標として、様々な種類の疎水基を任意の数、簡便に導入可能な基体としてポリマーやペプチドを採用した研究が報告されている (Figure 1-2 polymer and peptide)。例えば、我々の研究室では、複数の疎水性分子をデキストラン主鎖上に導入可能なポリマー型膜修飾分子を用いて、細胞膜上にストレプトアビシン (SA、53 kDa) を介してオボアルブミン (OVA、45 kDa) が安定に提示できることを報告した (Figure 1-9(a),(b))<sup>33</sup>。このようなポリマー型の膜修飾分子は、他にも報告されている<sup>34,35</sup>。



**Figure 1-9.** (a) デキストランを主鎖とするポリマー型膜修飾分子、(b) ポリマー型膜修飾分子により膜上に修飾された SA (緑) および OVA (赤) (左: 修飾直後、右: 培養 1 時間後) <sup>33</sup>

Reprinted with permission from *J. Control. Release*, 2014, 177, 27. Copyright 2013 Elsevier Ltd.

ポリマー以外の基体としてペプチドが用いられるが、その理由として天然の膜結合型のタンパク質は、細胞膜内葉への安定した提示のためにペプチドを基体とした疎水性のアンカーを使用することが報告されているからである<sup>36</sup>。そのような天然のタンパク質の例としてSrcファミリープロテインキナーゼやGタンパク質がある。それらのタンパク質は、自身のアミノ酸配列のNまたはC末端に疎水性アンカーが二つ導入された状態で膜上に安定に提示される<sup>36</sup>。この知見に基づき Silvius らは、短いペプチド上に疎水基を二つ導入したペプチドが一つの分子よりもリポソーム膜上でより安定であることを見出している(Figure 1-10)<sup>37</sup>。本研究で彼らは、上記のような翻訳後修飾によって脂質が修飾されるアミノ酸配列を模したペプチドに種々の疎水基を導入し、それらペプチド型の膜修飾分子のリポソーム上での安定性を評価している。この研究から、ペプチドが膜修飾分子の基体として利用できることが示された。

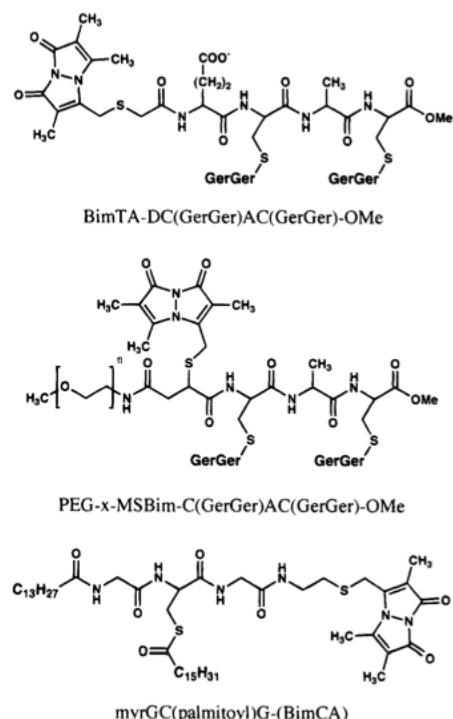


Figure 1-10. 疎水基が導入されたペプチドの構造<sup>37</sup>

Reprinted with permission from *Biochemistry*, 1995, 34, 3813. Copyright 1995 American Chemical Society

### 1.2.2 細胞膜内葉の修飾

細胞膜内葉に分子を提示し細胞質内のタンパク質の局在を制御することで細胞機能を制御する試みが報告されている (Figure 1-2(b))。膜内葉上への分子の修飾は、細胞内のタンパク質の動きを制御することで細胞機能を制御できる点で従来にはない作用機序の薬が開発される可能性がある。Gunning らは、細胞の分化や増殖に関与する signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) 特異的に結合するリガンド配列 (GpYLPQTV-NH<sub>2</sub>) にコレステロールを修飾した分子を膜内葉に提示することで、細胞質内に存在する STAT3 の細胞核への移行を阻害した (Figure 1-11(a))<sup>38</sup>。興味深いことに、リガンドとコレステロールの間にエチレンギリコール (EG) のスペーサーを導入すると、STAT3 の膜への結合量が大きく減少した。この原因として彼らは、スペーサーの効果によって分子が折りたたまれ、STAT3 の認識に関与できる分子の量が減少したためと推察している。Tsukiji らは、膜内葉に局在化するモチーフに大腸菌由来ジヒドロ葉酸還元酵素 (eDHFR) 特異的に結合する trimethoprim (TMP) を修飾した分子を 5 μM の濃度で細胞に添加することで、10 分という短時間で細胞内に発現した eDHFR の細胞膜内葉への局在を確認している (Figure 1-11(b))<sup>39</sup>。本研究で用いられた局在化モチーフは、Lyn キナーゼの N 末端に存在する翻訳後修飾によってパルミトイル基が修飾される配列 (MyrGC)<sup>40</sup> (Myr: ミリスチン酸) である。この配列中の Cys 側鎖のシステインがゴルジ体表面でパルミトイ化され、膜内葉へ移行し局在化することがわかっている。しかし、このようなペプチドが細胞に添加された後どのようにして細胞質に移行するかは分かっていない。

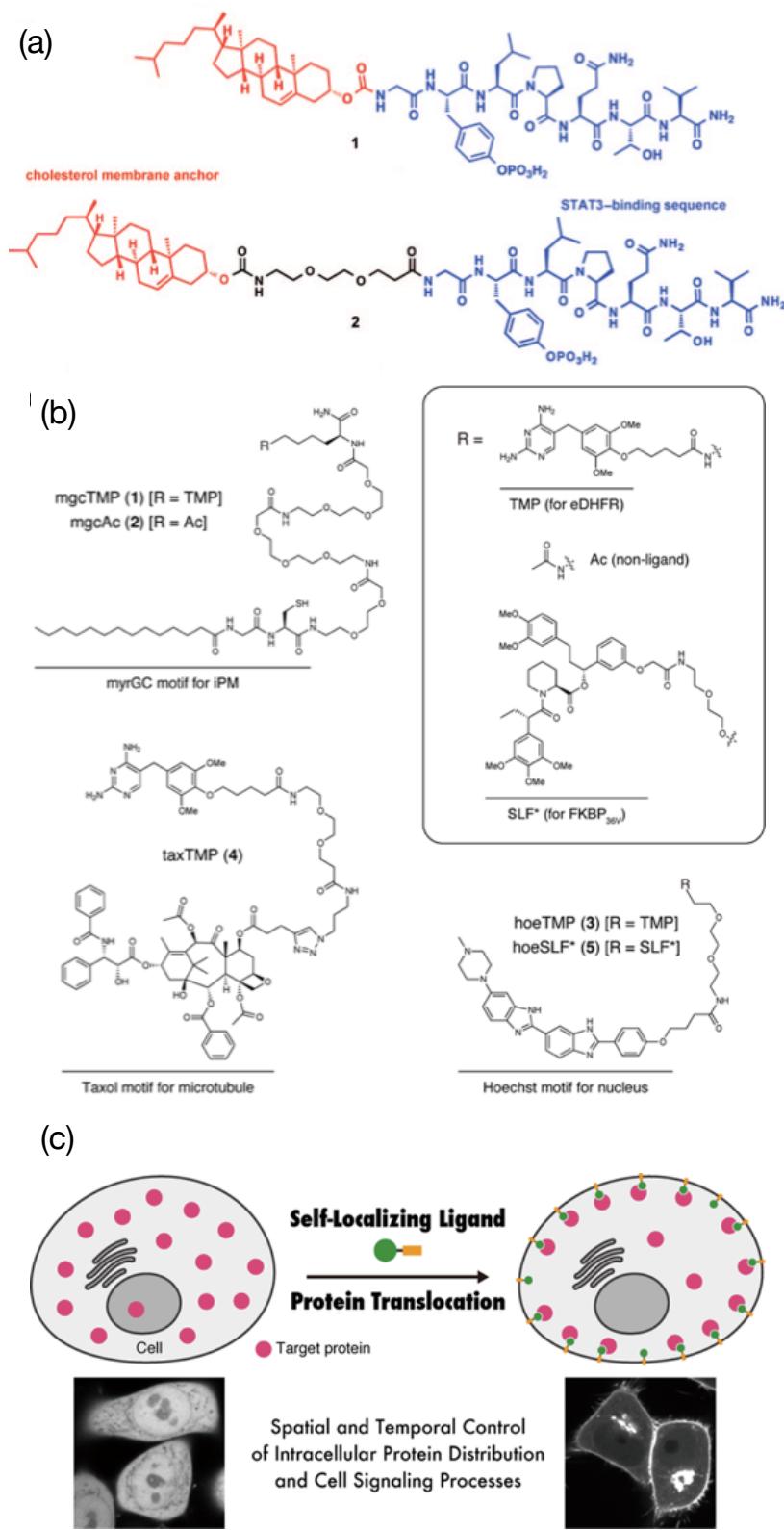


Figure 1-11. (a) リガンド配列にコレステロールを修飾した脂質型膜修飾分子<sup>38</sup>、(b) TMP を修飾した脂質型膜修飾分子<sup>39</sup>、(c) TMP による eDHFR の膜内葉への局在化<sup>39</sup>

Reprinted with permission from *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 6248. Copyright 2011 John Wiley & Sons, Inc.

Reprinted with permission from *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12684. Copyright 2013 American Chemical Society

### 1.2.3 細胞膜貫通型の修飾

細胞膜上で膜貫通状態をとる分子 (Figure1-2(c)) として、Engelman らはバクテリオロドプシンの膜貫通領域 (配列下線部) とその両端にある二つのフランキング配列から成るペプチド (配列 : AEQNPIYWARYADWLFTTPLLLLDADEGT, pH Low Insertion Peptide: pHLIP) を報告している<sup>41</sup>。このペプチドは、がん細胞表面など酸性 pH 条件 (< 7.0) に応答して C 端側のフランキング配列中の二つの Asp 側鎖がプロトン化され、疎水性を高めることで C 末端側から膜に挿入され、最終的に膜貫通修飾を達成する (Figure 1-12)<sup>41</sup>。本ペプチドの利点は、その機構が不明であるものの、方向を制御して膜に挿入され、膜貫通状態が達成されることである。そのため、N 末端に分子を修飾することで膜外葉に分子を提示できる<sup>42,43</sup>。また、C 末端に分子を修飾することで膜内葉に分子を提示でき、上皮成長因子受容体 (EGFR) の二量体化の阻害が可能であることが報告されている<sup>44</sup>。さらに、分子をジスルフィド結合で C 末端に修飾することで、膜内葉上で分子が放出される設計が可能であり、蛍光試薬<sup>45</sup>、環状ペプチド<sup>46,47</sup>そして micro RNA<sup>48</sup>などが pHLIP を介して細胞内部へと送達されている。しかし pHLIP は、酸性条件でのみ膜修飾が達成される点や pH の変化に過敏で Asp 側鎖の脱プロトン化により即座に膜貫通状態が解かれる点<sup>49</sup>で膜修飾分子として使い勝手が良いとは言い難い。また細胞膜に対して方向を制御して挿入される機構が不明であるため、本ペプチドへの分子の修飾にはその機能を損なわないように配慮する必要がある。

pHLIP 以外にも、イオンチャネルの機能<sup>50</sup>を模倣した分子<sup>51</sup>や GPCR<sup>52</sup>のように細胞外部の刺激を内部へと伝達する機能に着目した分子が報告されている<sup>53</sup>。これらの分子は、脂質人工二重膜を再構成する段階で分子を組み込むことで膜上に修飾するという点で疎水性相互作用に基づいた膜修飾分子として分類した。しかし、これらの分子は脂質人工二重膜上でのみその機能が報告されており、生細胞膜上での機能発現には至っていない。それは、二つの理由によると推察される。一つ目は、膜貫通を達成する多くの分子が水溶性に乏しいため、細胞培養液に添加した段階で凝集し、細胞膜に対する分子の導入が困難という点である。二つ目は、pHLIP のように分子を細胞膜に対して挿入方向を制御して修飾できない点である。実際、人工膜上で機能する膜貫通型の膜修飾分子の多くは、その構造を対称にすることで、膜上での方向に依らず機能する分子設計となっている<sup>51,53</sup>。膜を貫通した状態での分子の修飾は、膜貫通タンパク質の機能を模倣できる可能性が十分にあり、細胞膜上に導入できるようになれば細胞膜外葉や内葉のみを分子で修飾するよりも高度な細胞の機能化が可能になると考えられる。

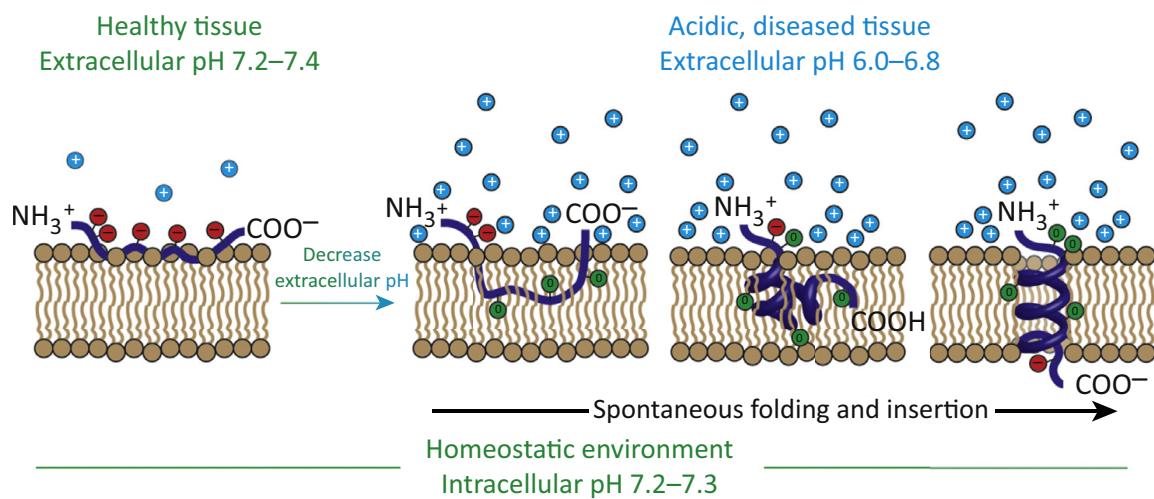


Figure 1-12. pHLIP の細胞膜上での挙動<sup>41</sup>

Reprinted with permission from *Trends Biotechnol.*, 2017, 35, 653. Copyright 2017 Elsevier Ltd.

### 1.3 本論文の目的および構成

本章では、細胞の機能化を目的とした細胞膜修飾法の中でも、疎水性相互作用に基づいた細胞膜修飾分子についてまとめた(**Figure 1-2**)。細胞膜内葉上への分子の修飾(**Figure 1-2(b)**)は、細胞内のタンパク質の動きを制御することで細胞機能を制御できる点で、従来にない作用機序の薬が開発される可能性を秘めている。細胞膜外葉上への分子の修飾(**Figure 1-2(a)**)は、最も研究されており、脂質型のみならずポリマー型やペプチド型の膜修飾分子が報告されている。その応用が再生医療分野で期待されものの、特に投与形態として細胞懸濁液を用いる場合、分子の膜上での寿命がボトルネックとなり実用には至っていないと考えられる。そのため、分子の寿命を延ばす戦略を取り入れ、細胞投与を見据えた膜修飾分子の設計および評価が望まれる。

また、細胞膜を貫通した状態での分子の修飾(**Figure 1-2(c)**)は、細胞膜内外に分子を捉え、膜貫通タンパク質の機能を模倣した高度な細胞の機能化が期待できる。pHLIP で膜貫通の修飾が達成されているものの、低 pH 条件に限られる。環境に依存することなく方向を制御して膜を貫通し、その状態を維持できる分子が必要と考えられる。

以上より本論文では、膜修飾による細胞の機能化法として有望な化学的な手法、中でも細胞機能への摂動が最も少ない疎水性相互作用に基づいた膜修飾による細胞の機能化を達成する分子の開発をテーマに、以下の二点を報告する。一点目は、細胞投与を見据えて提示分子の膜上での寿命を延ばすこと目的とした、ペプチド型膜修飾分子(ペプチド型膜アンカー)の開発とその詳細な評価および応用についてである(二章)。二点目は、膜貫通状態での膜修飾を実現する分子の開発とその修飾法(三章)および細胞膜を貫通した状態で細胞内外に分子を提示可能な膜修飾分子の開発とその効率的な合成方法(四章)についてである。

#### 1.4 参考文献

1. D. Morgan, V. L. Mager, M. S. Molly, *Nat. Chem.*, **2011**, *3*, 582.
2. M. Sadelain, R. Brentjens, I. Rivière, *Cancer Discov.*, **2013**, *3*, 338.
3. B. Kellam, P. D. Bank, K. Shakesheff, *Chem. Soc. Rev.*, **2003**, *32*, 327.
4. M. T. Stephan, D. J. Irvine, *Nanomaterials*, **2011**, *6*, 309.
5. 松田雅義, “修士論文”, 片山研究室 (2014)
6. P. S. Bisen, “Laboratory Protocols in Applied Life Sciences 1st Edition”, CRC Press, 2014
7. C. H. June, R. S. O'Connor, O. U. Kawalekar, S. Ghassemi, M. C. Milon, *Science*, **2018**, *359*, 1361.
8. eI. K. Ko, T. J. Kean, J. E. Dennis, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 3702.
9. M. Notohamiprodjo, R. Djafarzadeh, A. Mojaat, I. V. Luttichau, H. J. Grone, P. J. Nelson, *Protein Eng. Des. Sel.*, **2006**, *19*, 27.
10. J. E. Dennis, N. Cohen, V. M. Goldberg, A. I. Caplan, *J. Orthop. Res.*, **2004**, *22*, 735.
11. D. Hymel, B. R. Peterson, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, *64*, 797.
12. T. Tokunaga, S. Namiki, K. Yamada, T. Imaishi, H. Nonaka, K. Hirose, S. Sando, *J. Am. Chem. Soc.*, **2012**, *134*, 9561.
13. N. S. Selden, , M. E. Todhunter, N. Y. Jee, J. S. Liu, K. E. Broaders, Z. J. Gartner, *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *134*, 765.
14. I. M. Barbash, P. Chouraqui, J. Baron, M. S. Feinberg, S. Etzion, A. Tessone, L. Miller, E. Guetta, D. Zipori, L. H. Kedes, R. A. Kloner, J. Leor, *Circulation*, **2003**, *108*, 863.
15. K. Katsube, M. Ochi, Y. Uchio, S. Maniwa, M. Matsusaki, M. Tobita, J. Iwasa, *Arch. Orthop. Trauma Surg.*, **2000**, *120*, 121.
16. S. Yui, T. Nakamura, T. Sato, Y. Nemoto, T. Mizutani, X. Zheng, S. Ichinose, T. Nagaishi, R. Okamoto, K. Tsuchiya, H. Clevers, M. Watanabe, *Nat. Med.*, **2012**, *18*, 618.
17. T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi, T. Okano, *Biomaterials*, **2003**, *24*, 2309.
18. Y. Teramura, H. Iwata, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 2270.
19. K. Tatsumi, K. Ohashi, Y. Teramura, R. Utoh, K. Kanegae, N. Watanabe, S. Mukobata, M. Nakayama, H. Iwata, T. Okano, *Biomaterials*, **2012**, *33*, 821.
20. Y. Teramura, H. Iwata, *Soft Matter*, **2010**, *6*, 1081.
21. D. J. Mooney, H. Vandenburgh, *Cell Stem Cell*, **2008**, *2*, 205.
22. I. K. Ko, T. J. Kean, J. E. Dennis, *Biomaterials*, **2009**, *30*, 3702.
23. Y. W. Won, A. N. Patel, D. A. Bull, *Biomaterials*, **2014**, *35*, 5627.

24. R. Sackstein, J. S. Merzaban, D. W. Cain, N. M. Dapia, J. A. Spencer, C. P. Lin, R. Wohlgemuth, *Nat. Med.*, **2008**, *14*, 181.
25. D. Sarkar, J. A. Spencer, J. A. Phillips, W. Zhao, S. Schafer, D. P. Spelke, L. J. Mortensen, J. P. Ruiz, P. K. Vemula, R. Sridharan, S. Kumar, R. Karnik, C. P. Lin, J. M. Karp, *Blood*, **2011**, *118*, 184.
26. K. Kato, C. Itoh, T. Yasukouchi, T. Nagamune, *Biotechnol. Prog.*, **2004**, *20*, 897.
27. O. Inui, Y. Teramura, H. Iwata, *ACS Appl. Mater. Interfaces.*, **2010**, *2*, 1514.
28. T. Tokunaga, K. Kuwahata, S. Sando, *Chem. Lett.*, **2013**, *42*, 127.
29. Y. Takafuji, Y. Higuchi, A. Muro, K. Oshiro, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida, *Biol. Pharm. Bull.*, **2013**, *36*, 1731.
30. S. Boonyarattanakalin, S. E. Martin, S. A. Dykstra, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16379.
31. M. S. Brown, J. L. Goldstein, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1986**, *25*, 583.
32. K. N. Chung, S. Roberts, C. H. Kim, M. Kirassova, J. Trepel, P. C. Elwood, *Arch. Biochem. Biophys.*, **1995**, *322*, 228.
33. K. Tobinaga, C. Li, M. Takeo, M. Matsuda, H. Nagai, T. Niidome, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, *J. Control. Release*, **2014**, *177*, 27.
34. M. Takeo, C. Li, M. Matsuda, H. Nagai, W. Hatanaka, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2015**, *26*, 353.
35. T. Totani, Y. Teramura, H. Iwata, *Biomaterials*, **2008**, *29*, 2878.
36. D. R. Marilyn, *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, *2*, 584.
37. S. Shahinian, J. R. Silvius, *Biochemistry*, **1995**, *34*, 3813.
38. M. Avadisian, S. Fletcher, B. Liu, W. Zhao, P. Yue, D. Badali, W. Xu, A. D. Schimmer, J. Turkson, C. C. Grdinaru, P. T. Gunning, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 6248.
39. M. Ishida, H. Watanabe, K. Takigawa, Y. Kurishita, C. Oki, A. Nakamura, I. Hamachi, S. Tsukij, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12684.
40. S. P. Creaser, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, *124*, 2444.
41. L. C. Wyatt, J. S. Lewis, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, D. M. Engelman, *Trends Biotechnol.*, **2017**, *35*, 653.
42. S. Macholl, M. S. Morrison, P. Iveson, B. E. Arbo, O. A. Andreev, *Mol. Imaging Biol.*, **2012**, *14*, 725.
43. D. W. Demoin, L. C. Wyatt, K. J. Edwards, D. Abdel-Atti, M. Sarparanta, J. Pourat, V. A. Longo, S. D. Carlin, D. M. Engelman, O. A. Andreev, *Bioconjugate Chem.*, **2016**, *27*, 2014.

44. J. Gerhart, A. F. Thévenin, E. Bloch, K. E. King, D. Thévenin, *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 2623.
45. Y. K. Reshetnyak, O. A. Andreev, U. Lehnert, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2006**, *103*, 6460.
46. M. An, D. Wijesinghe, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2010**, *107*, 20246.
47. D. Wijesinghe, D. M. Engelman, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, *Biochemistry*, **2011**, *50*, 10215.
48. C. J. Cheng, R. Bahal, I. A. Babar, Z. Pincus, F. Barrera, C. Liu, A. Svoronos, D. T. Braddock, P. M. Glazer, D. M. Engelman, W. M. Saltzman, F. J. Slack, *Nature*, **2015**, *518*, 107.
49. O. A. Andreev, A. G. Karabadzhak, D. Weerakkody, G. O. Andreev, D. M. Engelman, Y. K. Reshetnyak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2010**, *107*, 4081.
50. W. N. Zgotta, *Nature*, **2006**, *440*, 427.
51. S. Matile, A. V. Jentzsch, J. Montenegro, A. Fin, *Chem. Soc. Rev.*, **2011**, *40*, 2453.
52. D. Wootten, A. Christopoulos, M. M. Solano, M. M. Babu, P. M. Sexton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2018**, *19*, 638.
53. S. L. Cockroft, *Nat. Chem.*, **2017**, *9*, 406.

## 第二章

### 細胞膜表面への安定な分子提示を可能にするペプチド型膜アンカーの開発

#### 2.1 緒言

序論で紹介したとおり疎水性相互作用に基づく膜修飾方法は、細胞機能や生存率への影響が低く、多様な分子を提示できるなど細胞の機能化を目指した場合に他の修飾法に勝る利点を有している。しかし、再生医療分野で有望とされる細胞懸濁液の投与への応用を考えた場合、分子の膜上での寿命の短さが課題となっている。そのため、分子の寿命を延ばす戦略を取り入れ、細胞投与を見据えた膜修飾分子の設計および評価が望まれる。そこで、従来の脂質型の膜修飾分子に代わる分子として、ポリマー型やペプチド型の膜修飾分子（ポリマー型膜アンカー、ペプチド型膜アンカー）がその設計の自由度の高さから注目されている。

#### 2.1.1 ペプチド型膜アンカー

各膜アンカーは、主鎖上に複数の疎水基を簡便に導入できるため、分子の寿命を延ばす戦略を立てやすい。しかし、ポリマー型膜アンカーでは複数導入した疎水基の一部が細胞外を向き、細胞同士を架橋することで細胞凝集体の形成を誘導することが報告されている<sup>1</sup>。細胞投与を考えた場合、細胞の凝集は血管の詰まりの原因になる危険性があるため避けるべきである。その点ペプチド型膜アンカーは、固相合成法を使用することで比較的短い主鎖上に多様な疎水基をその導入数や導入位置を正確に把握して合成できる。そのため、複数の疎水基を導入することによる細胞間の架橋など望まれない反応を防ぐことができると予想される。しかし知る限りでは、細胞懸濁液の投与という応用を指向してペプチド型アンカーを合理的に設計し評価した報告はない。

#### 2.1.2 本研究の目的および戦略

本研究では、膜上に分子を安定して提示するペプチド型膜アンカーの合理的なデザインおよびその機能についての評価を目的とした。ペプチド型膜アンカーは、細胞膜への修飾過程で膜へ効率的に分配されるのに十分な水溶性と、膜上ではアンカー分子として十分な安定性を示すだけの疎水性を兼ね備える必要がある。そこで、その設計戦略として荷電性のアミノ酸を主鎖として側鎖に疎水基を導入することで、一見すると相反する性質を併せ持つペプチドの開発に取り組んだ。また、ペプチド型膜アンカーを発展させてリガンドとしてビオチンを細胞表面上に安定して提示できるペプチドを合成し、その相補的タンパク質である SA による認識を細胞膜上で評価した。

## 2.2 実験

### 2.2.1 試薬

以下に本研究で使用した試薬を記す。

NovaSyn TGR resin、Fmoc amino acids、Fmoc-N- $\varepsilon$ -biotinyl-L-lysine および Fmoc-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoic acid は Novabiochem (Darmstadt, Germany) から購入した。2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate (HBTU)、N-hydroxybenzotriazole (HOBr)、piperidine、trifluoroacetic acid (TFA)、N,N'-diisopropylethylamine (DIEA) および N-methylpyrrolidone (NMP) は Watanabe Chemical (Hiroshima, Japan) から購入した。HPLC grade acetonitrile および sodium dithionite は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。N,N-dimethylformamide (DMF) および diethyl ether used for peptide synthesis は Kanto Chemical (Tokyo, Japan) から購入した。Dimethyl sulfoxide (DMSO) for biochemistry は Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) から購入した。Triisopropylsilane および D-glucose は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。6-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino) hexanoic acid (NBD-hexanoic acid)、Hoechst 33342 および Lysotracker Red DND-99 は Invitrogen から購入した。D-Mannitol は Sigma から購入した。CellBrite Green Cytoplasmic Membrane-Labeling Kit は Biotium から購入した。FluoroLinkCy3-labeled streptavidin (Cy3-SA) は Amersham Biosciences から購入した。1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (16:0 NBD PE) は Avanti Polar Lipids から購入した。

### 2.2.2 Fmoc 固相合成法によるペプチド型膜アンカーの合成

ペプチドはすべて Fmoc 固相合成法に基づき、対応する Fmoc アミノ酸を用いて NovaSyn<sup>®</sup>TGR 樹脂上で 0.025 mmol スケールにおいて行った。パルミトイル基修飾ペプチドにおいては、Fmoc-N- $\varepsilon$ -palmitoyl-L-lysine を用いた。また、リノール基修飾ペプチドにおいては、Fmoc-Lys(Mtt)-OH に対して、リノール酸を導入した。具体的には、ペプチドの N 末端に NBD-hexanoic acid を修飾後、1 % TFA と室温で 30 分間反応させたあと、リノール酸 (3 eq)、HOBT (3 eq)、HBTU (3 eq) を添加し、室温で 15 分攪拌した。脱樹脂は、樹脂に TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5 (v/v)) の混合溶液 (1 mL) を加え室温で 90 分攪拌させて、ろ液を回収した。脱樹脂後、回収したろ液を 40 mL の cold Et<sub>2</sub>O と混合し再沈殿させた。次いで、混合溶液を 4 °C、10 min、3,500 × g で遠心することで黄色ペレット状の粗ペプチドを得た。各ペプチドの精製は、逆相高速液体クロマトグラフ (HPLC) (Hitachi LaChrom Elite, Tokyo, Japan) を用いて行った。目的物の確認は、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF-MS) (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) を用いて行った。

(Figure 2-1)。精製したペプチドは、DMSO を用いて 1.0 mM の濃度に調製し、4 °C にて保存した。濃度決定は、DMSO 中で 478 nm における NBD の吸光度 (モル吸光係数 = 33186 /M/cm) を用いて行った<sup>2</sup>。

### 2.2.3 細胞培養

K562 細胞 (ヒト慢性骨髓性白血病細胞株) の培養は、10 % ウシ胎児血清 (FBS)、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.25 µg/mL アンフォテリシン B を含む RPMI-1640 を用いて、5 % CO<sub>2</sub> 存在下、37 °C で培養した。

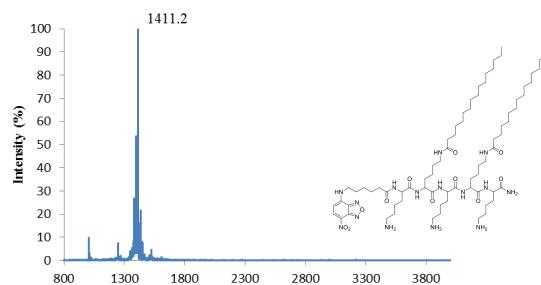
Jurkat 細胞 (ヒト T 細胞性白血病細胞株) の培養は、10 % FBS、100 U/mL ペニシリン、100 µg/mL ストレプトマイシン、0.25 µg/mL アンフォテリシン B を含む RPMI-1640 を用いて、5 % CO<sub>2</sub> 存在下、37 °C で培養した。

### 2.2.4 細胞へのペプチド型膜アンカーの修飾

K562 細胞 ( $2 \times 10^6$  cells/mL) を遠心分離して上澄みを除去し、2 mL の無血清培地を細胞に加えて懸濁させ、遠心分離を行った。上澄みを除去し、同様の操作を再度行うことで細胞を洗浄した。細胞は、250 µL の 10 mM HEPES で緩衝された 300 mM マンニトール等張液 (pH 7.4) 中に懸濁させた。その後、1.0 mM ペプチドの DMSO 溶液 3.0 µL を 247 µL の 300 mM マンニトール含有 10 mM HEPES 緩衝液で希釈して調製した、250 µL (終濃度 12 µM) のペプチド溶液と細胞懸濁液を混合させた。この懸濁液を 37 °C で 5 分間培養した後、2 mL の血清含有培地を加えて、遠心分離を行った。同様の操作を再度行うことで未修飾のペプチドを除去し、培地中で任意の時間培養した。培養後、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8000 (KEYENCE, Osaka, Japan) および Tali<sup>TM</sup> イメージベースサイトメーター (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) により評価を行った。

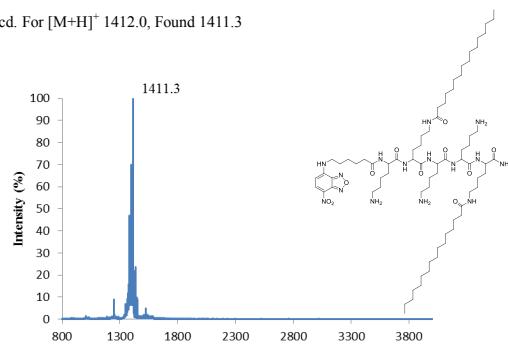
### MALDI-TOF spectrum of XX1

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1412.0, Found 1411.2



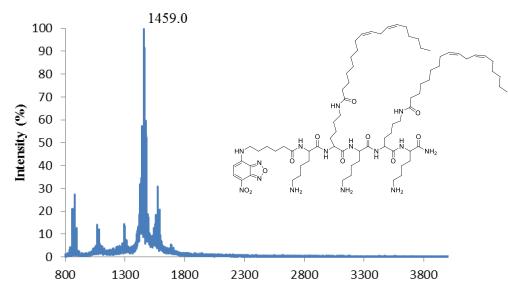
### MALDI-TOF spectrum of XX2

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1412.0, Found 1411.3



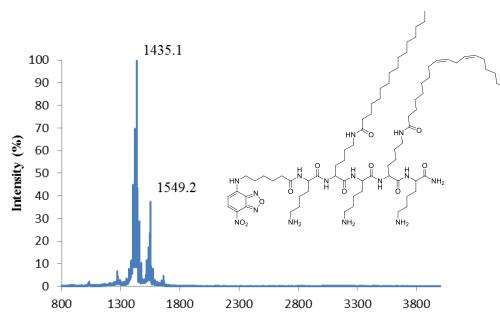
### MALDI-TOF spectrum of ZZ

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1460.0, Found 1459.0



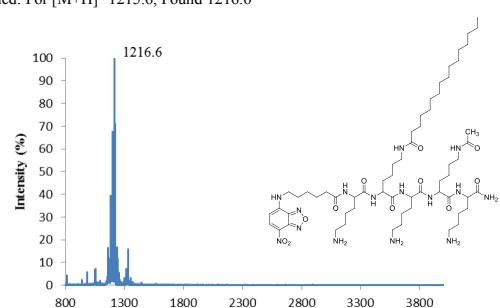
### MALDI-TOF spectrum of XZ

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1436.0, Found 1435.1



### MALDI-TOF spectrum of XB

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1215.6, Found 1216.6



### MALDI-TOF spectrum of BB

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1019.2, Found 1020.0

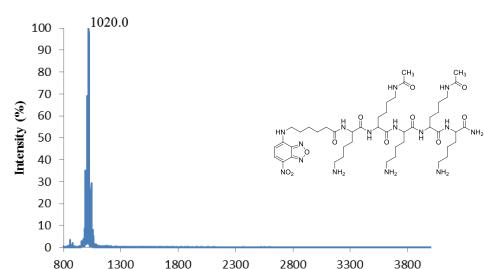


Figure 2-1. 各ペプチド型膜アンカーの MS スペクトルとその構造

## 2.2.5 ペプチド型膜アンカーの溶解性

20  $\mu$ L の 1.0 mM ペプチドの DMSO 溶液を 980  $\mu$ L の 300 mM マンニトール含有 10 mM HEPES 緩衝液で希釈し、最終濃度 20  $\mu$ M の溶液を調製し、ボルテックスで完全に攪拌させた。30 分間室温で放置した後、ペプチド溶液を 0.22  $\mu$ m フィルターを通過させた。そして液中の NBD 基の 478 nm における吸光度を UV-2550 紫外/可視吸光度計 (Shimadzu) により測定した。溶解度は、(フィルター濾過後の  $A_{478}$ ) / (フィルター濾過前の  $A_{478}$ ) として定義した。

## 2.2.6 ペプチド型膜アンカーの細胞上での安定性

2.2.4 の方法に従ってペプチドを添加した K562 細胞または Jurkat 細胞を任意の時間 5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37 °C で培養した。ついで、0、1、3、6、24 および 48 時間培養後の細胞上に存在しているペプチドを NBD 由来の蛍光からそれぞれ定量した。蛍光の定量には、Tali™ イメージベースサイトメーターを使用した。

## 2.2.7 ペプチド型膜アンカーの濃度依存的な修飾量および細胞生存率の変化

細胞膜上に修飾されたペプチドを定量するため、まず 2.2.4 に従って細胞にペプチドを添加した。このとき、ペプチドと反応させた後の細胞懸濁液から遠心分離によって、上澄みを回収した。100 μL の上澄み溶液を 900 μL の DMSO により希釈し、NBD 由来の 478 nm における蛍光を 96-well マイクロプレートリーダー (WALLAC 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer) により測定した。上澄み溶液中のペプチド濃度は、事前に同種のペプチドから作成した検量線を用いて算出した。

細胞に修飾されたペプチドの毒性を定量するため、まず 2.2.4 に従って細胞表面修飾を行った後、細胞を培地中に懸濁させた。この後、修飾直後および修飾後 48 時間培養後の細胞生存率を以下の方法により定量した。100 μL の細胞懸濁液を微小遠心管に移し、1.0 μL の Tali® Dead Cell Red reagent (containing PI) を添加し、ピペットティングしたあと、暗所で 1 分間置いた。その後、Tali™ イメージベースサイトメーターを用いて生存率を測定した。

## 2.2.8 ペプチド型膜アンカーの細胞内局在

2.2.4 の方法に従って細胞表面修飾を行った後、細胞懸濁液 1 mL に対して、1 μL の Hoechst を添加することで細胞核を染色した。さらに、LysoTracker Red を 50 nM で添加して 1 時間培養することでリソソームを染色した後にこの細胞を観察した。細胞の観察には共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (CLSM) (LSM700, Carl Zeiss) を使用した。

## 2.2.9 リサイクリング経路によるペプチド型膜アンカーの再提示

2.2.4 の方法に従って細胞表面修飾を行った後、2 mL の DPBS (2 g/L グルコース入り) 中に細胞を懸濁させた。この細胞懸濁液を 4 °C で 10 分間保持した後、30 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 含有無血清培地 1 mL を添加し、4 °C で 5 分間保持し細胞表面に存在する NBD 基の消光を行った<sup>3</sup>。その後、懸濁液を遠心分離して上澄みを除去し、2 mL の DPBS (2 g/L グルコース入り) で細胞を懸濁させ、さらに遠心分離を行った。同様の操作を再度行うことで残存 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> を除去し、2 mL の DPBS (2 g/L グルコース入り) 中に細胞を懸濁させた。細胞懸

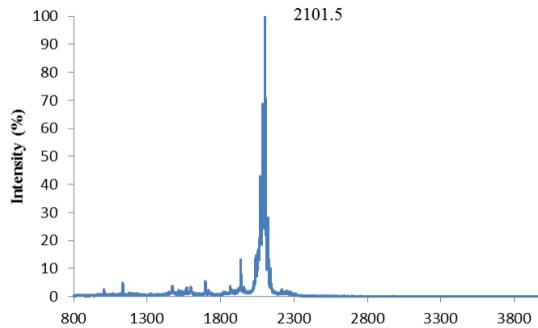
濁液を 1.5 mL エッペンチューブに等量ずつ分注し、一方を 4 °C で 30 分間保持し、もう一方を 37 °C で 30 分間保持した。その後、細胞を 96-well ガラスボトムプレートに移し、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8000 により観察した。

## 2.2.10 レセプターとして機能するペプチド型膜アンカーの合成

ペプチドはすべて Fmoc 固相合成法に基づき、対応する Fmoc アミノ酸を用いて NovaSyn®TGR 樹脂上で 0.025 mmol スケールにおいて行った。パルミトイル基の導入には Fmoc-N-ε-palmitoyl-L-lysine を、オリゴエチレングリコールの導入には Fmoc-21-amino-4, 7, 10, 13, 16, 19-hexaoxaheneicosanoic acid を、そしてビオチンの導入には、N-α-Fmoc-N-ε-biotinyl-L-lysine をそれぞれ用いた。またペプチドの N 末端には、NBD-hexanoic acid を修飾し、蛍光標識を行った。脱樹脂は、樹脂に TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5 (v/v)) の混合溶液 (1 mL) を加え室温で 90 分攪拌させて、ろ液を回収した。脱樹脂後、回収したろ液を 40 mL の cold Et<sub>2</sub>O と混合し再沈殿させた。次いで、混合溶液を 4 °C、10 min、3,500 × g で遠心することで黄色ペレット状の粗ペプチドを得た。各ペプチドの精製は、逆相 HPLC を用いて行った。目的物の確認は MALDI-TOF-MS を用いて行った (Figure 2-1(b))。精製したペプチドは、DMSO を用いて 1.0 mM の濃度に調製し、4 °C にて保存した。濃度決定は、DMSO 中で 478 nm における NBD の吸光度 (モル吸光係数 = 33186 /M/cm) を用いて行った<sup>2</sup>。

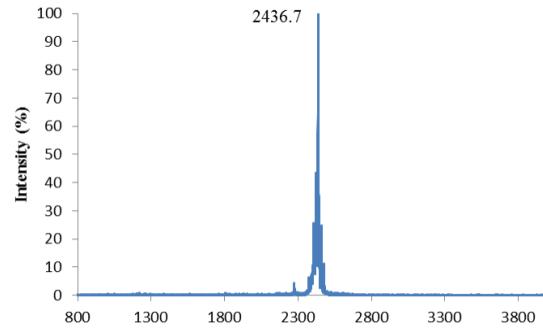
#### MALDI-TOF spectrum of XX2-1

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  2101.8, Found 2101.5



#### MALDI-TOF spectrum of XX2-2

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  2437.2, Found 2436.7



#### MALDI-TOF spectrum of XX2-3

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano- 4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  2772.6, Found 2772.4

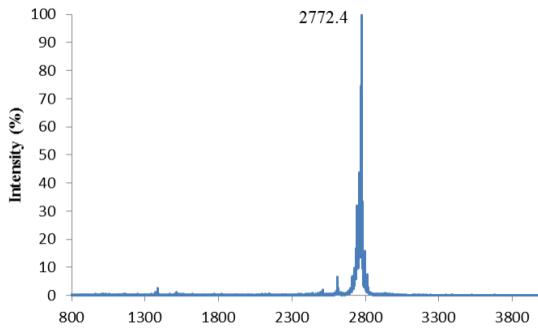


Figure 2-2. 各ビオチン修飾ペプチド型膜アンカーの MS スペクトルとその構造

### 2.2.11 細胞表面におけるレセプター/リガンド認識

2.2.4 と同様の手順で各レセプター修飾ペプチド型膜アンカー (XX2-1, 2, 3) による細胞表面修飾を行った後、ペプチドに修飾されているビオチン (1  $\mu$ mol) の 1/10 の Cy3 SA (0.1  $\mu$ mol) を 500  $\mu$ L の細胞懸濁液に添加し、室温で 10 分間保持した。その後、細胞懸濁液から遠心分離によって上澄みを回収し、上澄み中の Cy3 由来の 575 nm における蛍光を 96-well マイクロプレートリーダーにより測定した。この結果と、培地中に 0.2  $\mu$ M に調製した Cy3 SA 溶液の蛍光強度を比較することで、細胞表面に結合した SA を定量した。また、細胞には培地を加えて懸濁させ、遠心分離を行った。同様の操作を再度行うことで未修飾の SA を完全に除去し、培地中に任意時間培養した。得られた細胞の観察および定量的な評価には、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8000 および Tali<sup>TM</sup> イメージベースサイトメーターを使用した。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 Fmoc 固相合成法によるペプチド型膜アンカーの合成

細胞膜表面に分子を安定に提示できるペプチド型アンカーを開発するにあたって、まず五つのアミノ酸残基からなる六種類のペプチドをアンカーモチーフとして設計した (Table 2-1)。基本的な分子設計として各ペプチドは、三つの L-Lys 残基と二つ以下の疎水性アンカーを有している。ペプチド中の三つの L-Lys 残基は、ペプチドの水溶液への溶解性向上だけでなく、負に帯電した細胞膜との静電相互作用を介して細胞膜表面に安定してペプチドが修飾されることへの寄与が期待される。疎水性アンカーには二つの異なるタイプの疎水性分子として、飽和パルミトイル基 (X)、不飽和リノレオイル (Z) を採用し、各疎水性アンカーは L-Lys 残基の側鎖  $\varepsilon$  アミノ基にアミド結合で導入された (Figure 2-3)。また、疎水性アンカーの細胞膜修飾に対する効果を確認するための対照として、アセチル (B) 基を使用した。上記の各疎水性アンカーの導入位置は、二番目および五番目の位置に X 基を含む XX2 を除いて、全てのペプチドの二番目および四番目の位置である。以上の異なる疎水性アンカーおよびその導入位置を変えたペプチドを使用することで、細胞膜修飾に対する疎水基の影響を評価した。全てのペプチドは、細胞膜上での挙動を蛍光顕微鏡で観察できるように N 末端を NBD で標識されている。合成した各ペプチドの MS スペクトルと対応する構造を Figure 2-1 に示した。

**Table 2-1.** 設計した各ペプチド型膜アンカーの配列とその特性 (a) ペプチド修飾後の細胞のペプチド由来の蛍光強度、(b) ペプチドの水溶液への溶解性、(c) 細胞上でのペプチドの半減期 (d) 修飾量が少ないため評価不可

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

name	peptide sequence					F.I. ( $\times 10^{-4}$ a.u.) <sup>a</sup>	solubility (%) <sup>b</sup>	$t_{1/2}$ (h) <sup>c</sup>
	1	2	3	4	5			
XX1	NBD-Lys-Lys (X)-Lys-Lys (X)-Lys-NH <sub>2</sub>					1.2	0	- <sup>d</sup>
XX2	NBD-Lys-Lys (X)-Lys-Lys - Lys (X)-NH <sub>2</sub>					4.0	72	14
ZZ	NBD-Lys-Lys (Z)-Lys-Lys (Z)-Lys-NH <sub>2</sub>					3.7	58	6.7
XZ	NBD-Lys-Lys (X)-Lys-Lys (Z)-Lys-NH <sub>2</sub>					1.5	0	- <sup>d</sup>
XB	NBD-Lys-Lys (X)-Lys-Lys (B)-Lys-NH <sub>2</sub>					1.2	74	- <sup>d</sup>
BB	NBD-Lys-Lys (B)-Lys-Lys (B)-Lys-NH <sub>2</sub>					1.1	82	- <sup>d</sup>

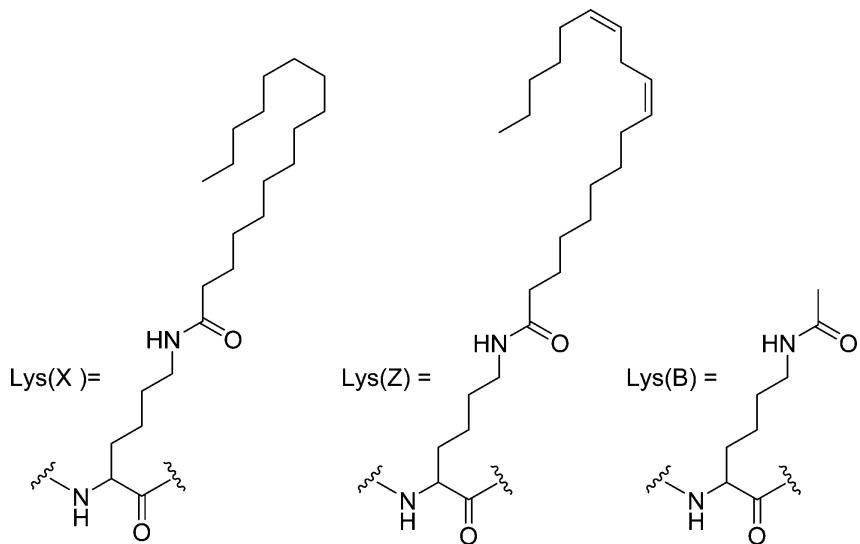
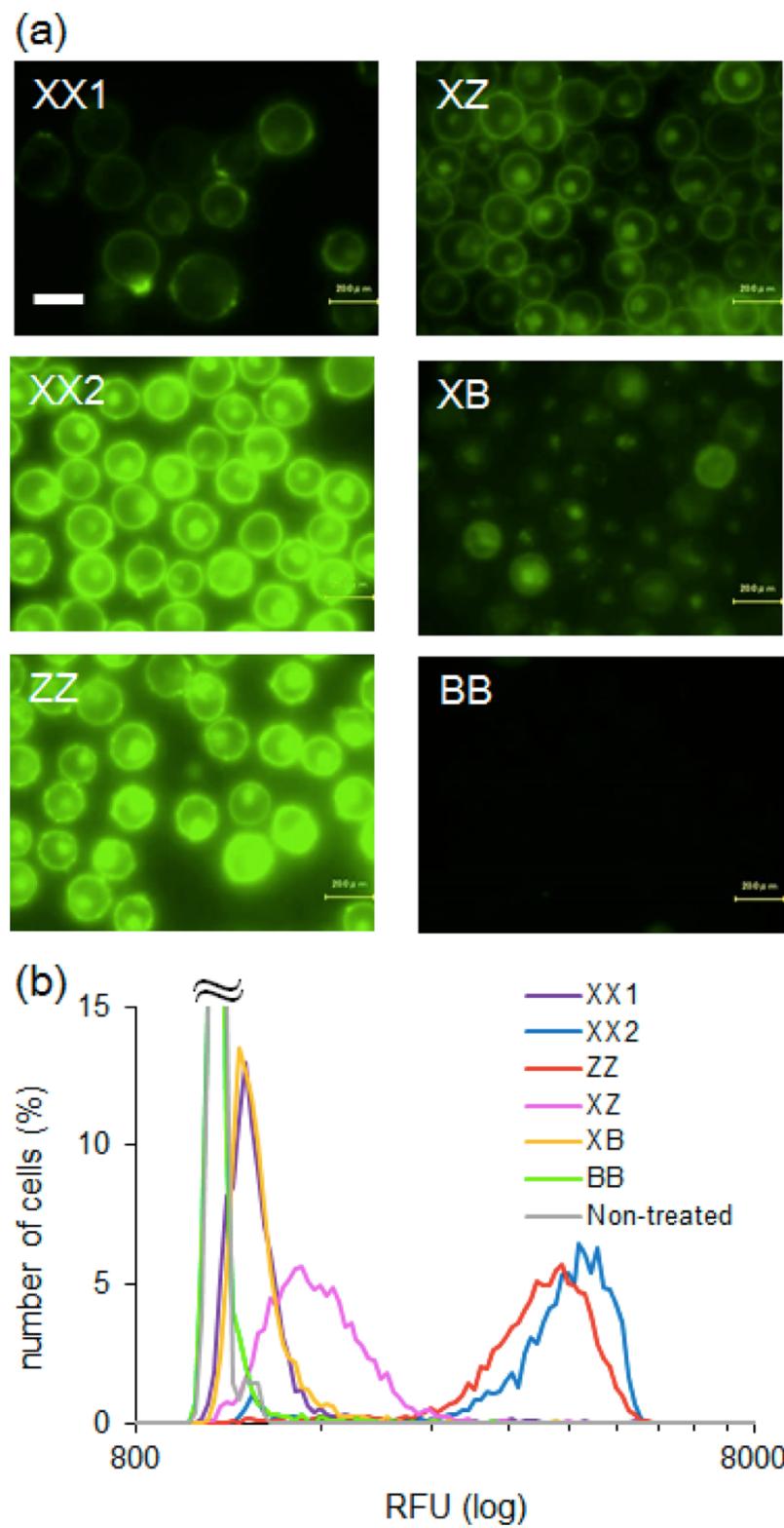


Figure 2-3. 各種疎水基修飾 L-Lys の構造

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

### 2.3.2 細胞へのペプチド型膜アンカーの修飾

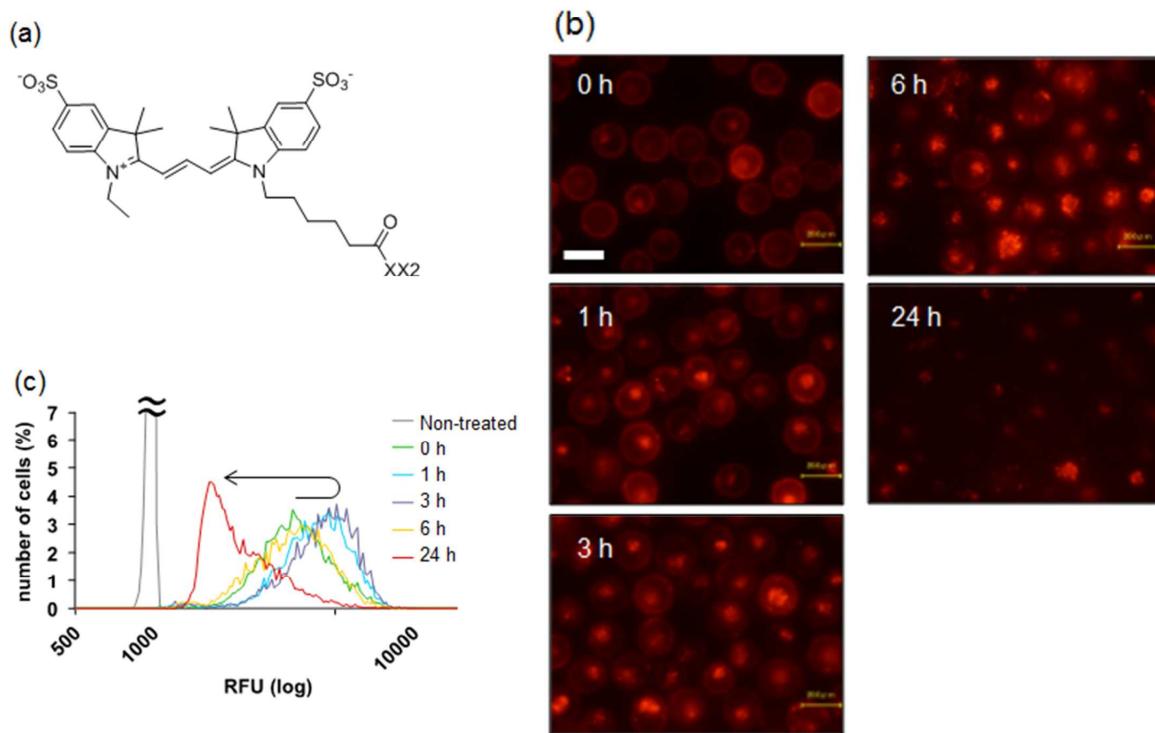
疎水基を修飾した各ペプチドは、DPBS 中で疎水性相互作用により凝集してしまい細胞膜にうまく修飾されなかった。そこで細胞膜修飾実験では、10 mM HEPES (pH7.4) で緩衝化された 300 mM マンニトール等張液を使用することで、ペプチドの溶解性を向上させ分散状態で細胞膜に修飾した。Figure 2-4(a), (b) は、それぞれ 37°C で 5 分間各ペプチドを修飾した K562 細胞の蛍光顕微鏡画像およびイメージングサイトメトリーによる結果を示す。Table 2-1 には、イメージングサイトメトリーの結果から得られた各ペプチド修飾細胞の蛍光強度の中央値をまとめている。蛍光顕微鏡画像の結果から、疎水部を二つ有するペプチド XX2、ZZ、および XZ では、細胞膜上および細胞内部から NBD 由来の蛍光が確認された (Figure 2-4(a))。後述するが、細胞内部に存在するペプチドは、LysoTracker Red と共に局在化しており、ペプチドが膜へ修飾されたあとにエンドサイトーシスによって速やかに細胞内部へ取り込まれたことを示唆している。一方、疎水部を一つだけ有する XB および疎水部を含まない BB は、細胞上で蛍光を示さなかった。これは、疎水性アンカーと細胞膜の疎水性相互作用がペプチドの安定した膜修飾に必須であることを示している。



**Figure 2-4.** (a) 各ペプチド型膜アンカーで修飾した K562 細胞の蛍光顕微鏡画像 (スケールバー : 20  $\mu$ m)、(b) 各ペプチドを修飾した K562 細胞のイメージングサイトメトリーによる評価

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

次に、細胞表面修飾において最も良い修飾結果を示した XX2 について、ペプチドに標識された蛍光基が膜修飾に与える効果を調べた。蛍光基として NBD の代わりに Cy3 を用いてペプチドの N 末端を修飾したペプチドを合成した (Figure 2-5)。この Cy3 修飾 XX2 を K562 細胞に添加した結果、NBD 修飾 XX2 と同様に細胞表面から蛍光が確認された (Figure 2-5(b))。しかし、その後の時間経過とともに奇妙な蛍光強度の変化、つまり蛍光強度が最初は増加し、その後減少するという挙動を細胞上で示した (Figure 2-5(c))。この挙動は、修飾初期段階で Cy3 修飾 XX2 が Cy3 特異的に膜上で凝集して蛍光が消光していることが可能性として考えられる。

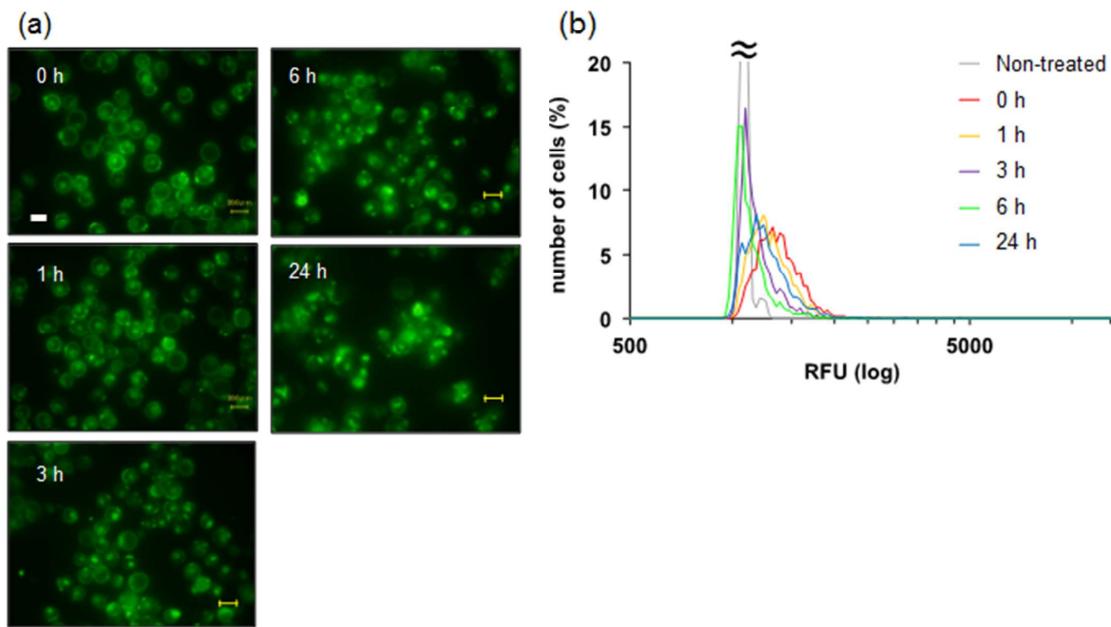


**Figure 2-5.** (a) Cy3 の構造、(b) Cy3 修飾 XX2 で修飾した K562 細胞の蛍光顕微鏡画像 (スケールバー : 20  $\mu$ m)、(c) Cy3 修飾 XX2 で修飾した K562 細胞のイメージングサイトメトリーによる評価

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

また、XX2 の結果から XX2 を改良した以下のペプチドを合成した (NBD-Lys-Lys (X)-Lys-Lys-Lys (X)-Lys-Lys-Lys (X)-NH<sub>2</sub>)。このペプチドは、 $\beta$  シートの周期性を避けつつ二番、五番、および八番目の位置にそれぞれパルミトイル基を有する。このペプチドが適切な溶解度を保持しつつ、XX2 よりも一つ多いパルミトイル基が細胞膜上でより高い安定性を示すと予想された。細胞膜修飾の結果、ペプチドは細胞表面に修飾されたものの、ペプチド自体の

溶解性がかなり低いことに起因して修飾量が少なく、修飾されたペプチドの半減期を決定するには至らなかった (Figure 2-6)。この結果から私は、溶解性を考慮すると一つのペプチド上に修飾できるパルミトイル基の数が最大二つであると結論づけた。



**Figure 2-6.** (a) X 残基を三つ有するペプチド型膜アンカーで修飾した K562 細胞の蛍光顕微鏡画像 (スケールバー: 20  $\mu$ m)、(b) X 残基を三つ有するペプチド型膜アンカーで修飾した K562 細胞のイメージングサイトメトリーによる評価

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

### 2.3.3 ペプチド型膜アンカーの溶解性

これまでの実験から、四つの異なるペプチド (XX1、XX2、ZZ、XZ) の細胞膜に対する修飾量や半減期の違いは、細胞膜修飾時に使用される等張液中のペプチドの溶解度の差に起因することが示唆された。そこで次に、各ペプチドの溶解性を評価した。Figure 2-7 は、DMSO (実線) および 10 mM HEPES (pH7.4) 含有 300 mM マンニトール等張液 (破線) 中の XX1 および XX2 の吸収スペクトルを示す。等張液中の各ペプチドの吸収スペクトルには、淡色効果および NBD 由来の吸収波長のブルーシフトが観察された。この結果は、各ペプチドが等張液中で NBD 基同士の相互作用により H 会合していることを示唆した。等張液中のペプチドの溶解度を調べるために、各ペプチド溶液を 0.22  $\mu$ m のフィルターに通してろ過し、ろ液の吸収スペクトルを測定することで溶液中に残存するペプチドを定量した (Figure 2-7、点線)。その結果、XX1 ではそのほとんどがろ過により除去されたのに対して、XX2 ではその 72%がろ液中に残った。ろ過前とろ過後のペプチド溶液の吸収スペクトルからペプチドの溶解度を定義し、各ペプチドの溶解度を Table 2-1 にまとめた。

溶解度の調査から、四種類のペプチドの溶解度はそれらの細胞上での蛍光強度に比例することがわかった。従ってペプチドの溶解度は、水相から細胞膜へのペプチドの効果的な分配において重要な役割を果たしていることが明らかにされた。特に、XX1 および XX2 の溶解度から、ペプチドが同じ二つの疎水基を含んでいたとしても、その溶解性は全く異なることが見出された。XX1 の低い溶解度は、ペプチド配列中の X 残基の周期性 (n および n+2 位) に起因し、またこの周期性が  $\beta$  シートと同じであることから XX1 は、 $\beta$ -シートを形成する傾向があると考えられる<sup>4</sup>。その結果として、XX1 はより多くのペプチドが凝集したと考察される。一方、二つの不飽和リノレオイル基を有する ZZ は、同様の周期性を有するにもかかわらず比較的高い溶解度を示し、膜修飾効率も高かった。ZZ が高い溶解性を示した理由として、リノレオイル基がパルミトイル基に比べて分子の自由度が高く、パッキングに不利であることが考えられる。同様の結果が脂質を基体とした膜アンカーの研究において報告されており、一つの不飽和結合を含むジオレオイル脂質がジステアロイル脂質よりも溶解度が高く、かつより高い修飾率を示した<sup>5</sup>。

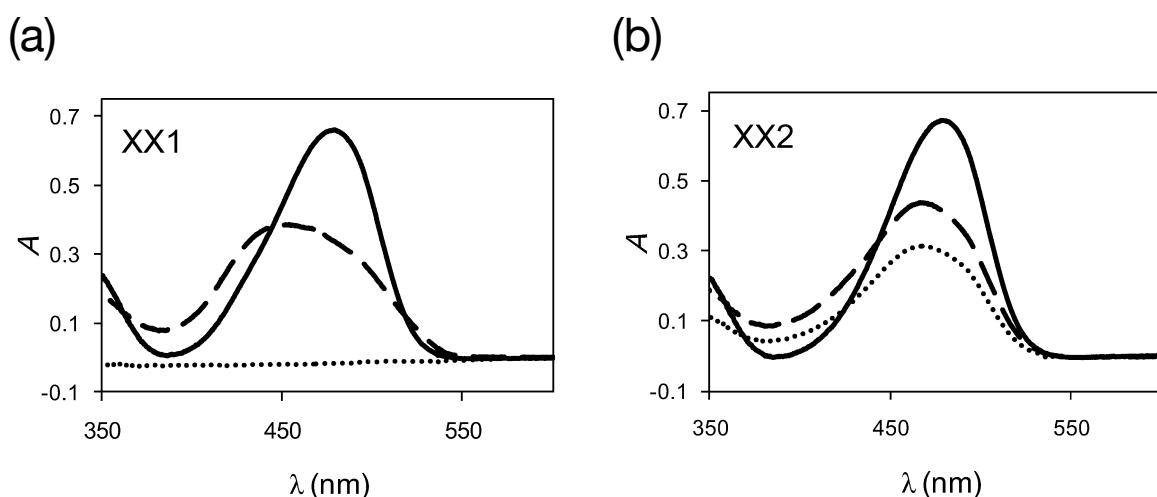
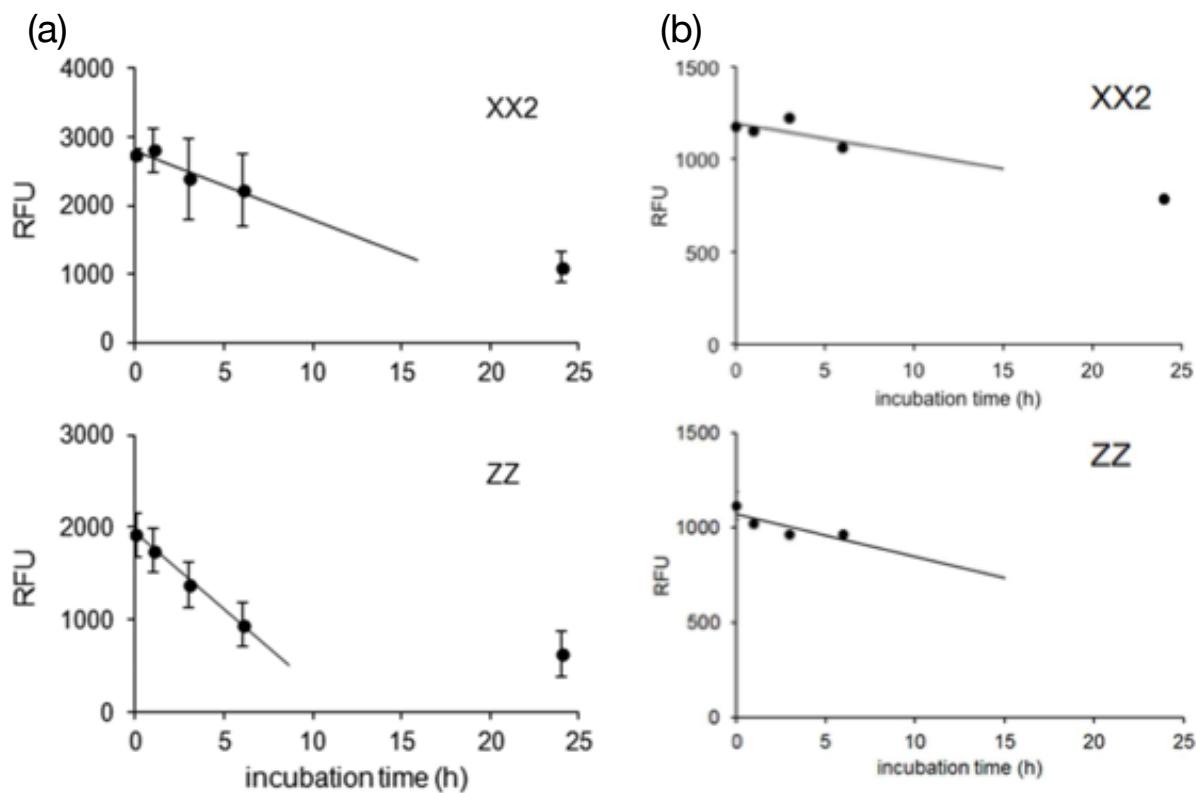


Figure 2-7. XX1 (a) および XX2 (b) の吸収スペクトル（実践：DMSO 中、破線：10 mM HEPES (pH7.4) 含有 300 mM マンニトール等張液中、点線：10 mM HEPES (pH7.4) 含有 300 mM マンニトール等張液中 0.22  $\mu$ m のフィルターろ過後）

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

#### 2.3.4 ペプチド型膜アンカーの細胞上での安定性

次に、細胞上に修飾されたペプチドがどれだけの時間細胞上に存在し続けるかを、血清含有培地中 5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37 °C でペプチド修飾細胞を任意の時間培養した後に蛍光強度から評価した。Figure 2-8(a), (b) は、培養時間に対して XX2 および ZZ で修飾した K562 細胞の蛍光強度をプロットした結果である。図から細胞の蛍光強度が経時に減少することがわかり、この結果は時間経過とともにペプチドが細胞から脱離していることを示す。蛍光強度の初期の減衰は、線形性を有するため各ペプチドの細胞上での半減期が近似直線から計算できた。その結果 XX2 および ZZ の半減期は、それぞれ 14 および 6.8 時間であった (Figure 2-8(a))。この結果と合わせて、別の細胞株である Jurkat 細胞においても同様の評価を行い、ペプチドの半減期がそれぞれ 37 時間および 23 時間であることを見出している (Figure 2-8(b))。これらの結果から両細胞株において XX2 は、最も高い修飾効率および最長の半減期を示した。そのため私は、本ペプチドが本研究での最良のペプチド型膜アンカーであると決定した。特に膜アンカーの性能として XX2 で注目すべきは、両細胞株における XX2 の半減期が、不飽和炭化水素基を有する脂質型の膜アンカーの半減期 (8 時間) よりも長かったことである<sup>6</sup>。ZZ よりも XX2 の半減期が長い理由は、リノレオイル基よりもパルミトイル基の疎水性のほうが高いことに起因すると考えられる。今後の課題として、ペプチドが細胞に存在する加水分解酵素によって分解されている場合を考慮する必要がある。本研究で決定したペプチドの半減期は、加水分解の影響を考慮していない結果であるため、加水分解の影響を精査するためには D 体のアミノ酸に置換したペプチドでの検討が必要である。

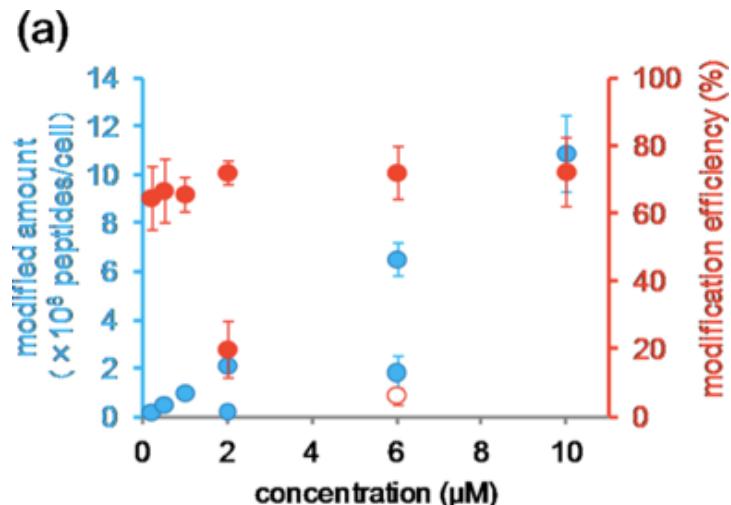


**Figure 2-8.** (a) K562 細胞上でのペプチド由来の蛍光強度の経時変化、(b) Jurkat 細胞上でのペプチド由来の蛍光強度の経時変化

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

### 2. 3. 5 ペプチド型膜アンカーの濃度依存的な修飾量および細胞生存率の変化

ここまで検討によって、XX2 が最も効果的なペプチド型膜アンカーであることが判明した。そこで、本項では細胞膜への修飾において最適な XX2 の濃度を検討した。具体的には、細胞に添加するペプチド溶液の濃度を変えることで、細胞膜に修飾されるペプチドの量および細胞生存率に与える影響を精査した。Figure 2-9(a)に示すように、細胞膜上のペプチド密度は、添加するペプチド溶液の濃度が上昇するのに伴って直線的に増加し、 $10 \mu\text{M}$  の濃度で  $11 \times 10^8 \text{ peptide}/\text{cell}$  と計算された。また XX2 の修飾効率は、添加したペプチド量の 60~70% とその濃度に関わらず高いことが見出された。そして XX2 の修飾率は、 $6.0 \mu\text{M}$  の濃度で修飾した場合、市販の NBD 標識脂質 (Figure 2-9(b)) よりも 3.6 倍高かった。この XX2 の高い修飾率は、その高い溶解度に起因すると考えられる。



(b)

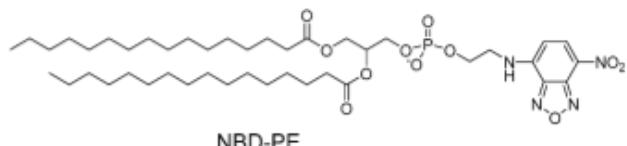


Figure 2-9. (a) K562 細胞に修飾される XX2 の量 (●) および修飾効率 (●)

(○ : NBD-PE の修飾効率)、(b) NBD-PE の構造

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

高い修飾効率を示す XX2 について、その細胞傷害性をペプチド修飾直後および培養 48 時間後の 2 つの時点で調べた。Figure 2-10(a), (b) は、それぞれペプチド修飾直後および修飾後 48 時間後の細胞生存率を示す。どちらの条件においても、XX2 の濃度が 2.0  $\mu\text{M}$  まではペプチド由来の細胞傷害性が観察されなかった。ペプチド由来の細胞毒性が生じる原因として、ペプチドが細胞膜と相互作用し修飾される段階で、膜の構造が破壊され細胞にダメージを与えていている可能性が考えられる。細胞毒性と同時に、ペプチド修飾が細胞の増殖能に与える影響についても検討を行い、XX2 が少なくとも 48 時間後までの細胞増殖能に対して負の影響がないことを確認した。細胞に対する低い毒性および増殖能に与える影響が少ないとすることは、膜修飾分子として XX2 が有望であることを示している。今後のさらなる検討事項として、ペプチドがエンドサイトーシスなどの細胞機能に対して与える影響が挙げられる。一例として Ishiwata らは、コレステロールを修飾した比較的高分子量のポリエチレングリコールが細胞修飾後にクラスリン依存性エンドサイトーシスを特異的に阻害することを見出した<sup>7,8</sup>。このことから、本ペプチドが細胞機能に対してどのような影響を持つか検討することは、ペプチドの機能を理解するために有益であると考えられる。

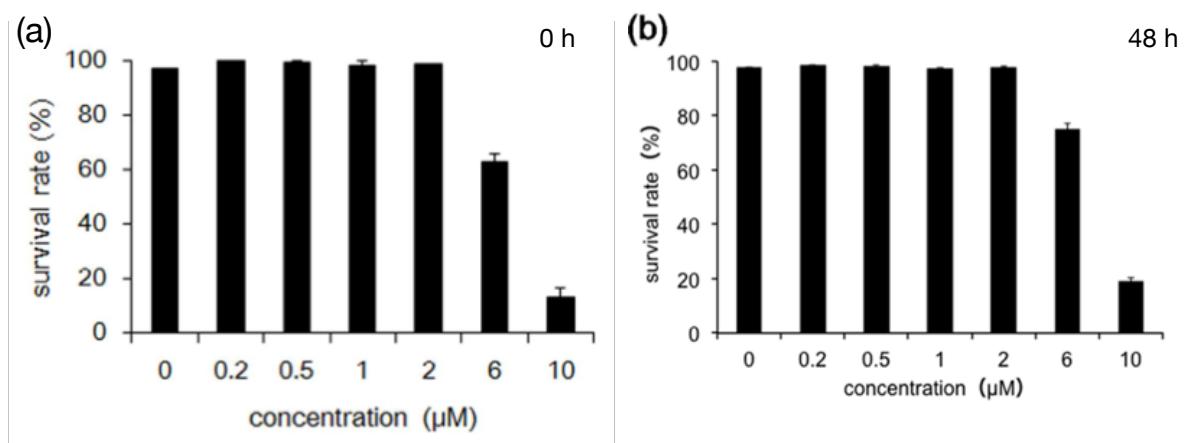


Figure 2-10. 各濃度の XX2 を修飾した K562 細胞の生存率 (a) 修飾直後、(b) 48 時間培養後

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

### 2. 3. 6 ペプチド型膜アンカーの細胞内局在

本項では、細胞内部に取り込まれた XX2 が細胞内のどこに局在しているか精査した。具体的には、市販の細胞小器官染色試薬および XX2 による共染色を行った後に、ペプチドの細胞内局在を CLSM を用いた観察により確認した。その際、ペプチドの比較対象として市販の膜染色試薬である CellBrite Green を使用した (Figure 2-11(a))。Figure 2-11(b) に示すように CellBrite Green は、形質膜、リソソーム膜、エンドソーム膜および核膜を含むすべての膜に局在した。対照的に XX2 は、形質膜、リソソームおよびエンドソーム膜に特異的に局在した。XX2 に対して CellBrite Green がすべての膜に非特異的に局在した理由は、分子全体としての高い疎水性に起因した高い膜透過性によるものと考えられる。一方 XX2 の特異的な局在は、膜透過性が不十分であるためと考えられ、ペプチドが細胞膜外葉に修飾された後、それらがエンドサイトーシスにより取り込まれ、リソソームおよびエンドソーム膜の内葉に分布したと予想される。XX2 が膜透過性に乏しい原因としては、その両親媒性が考えられる。

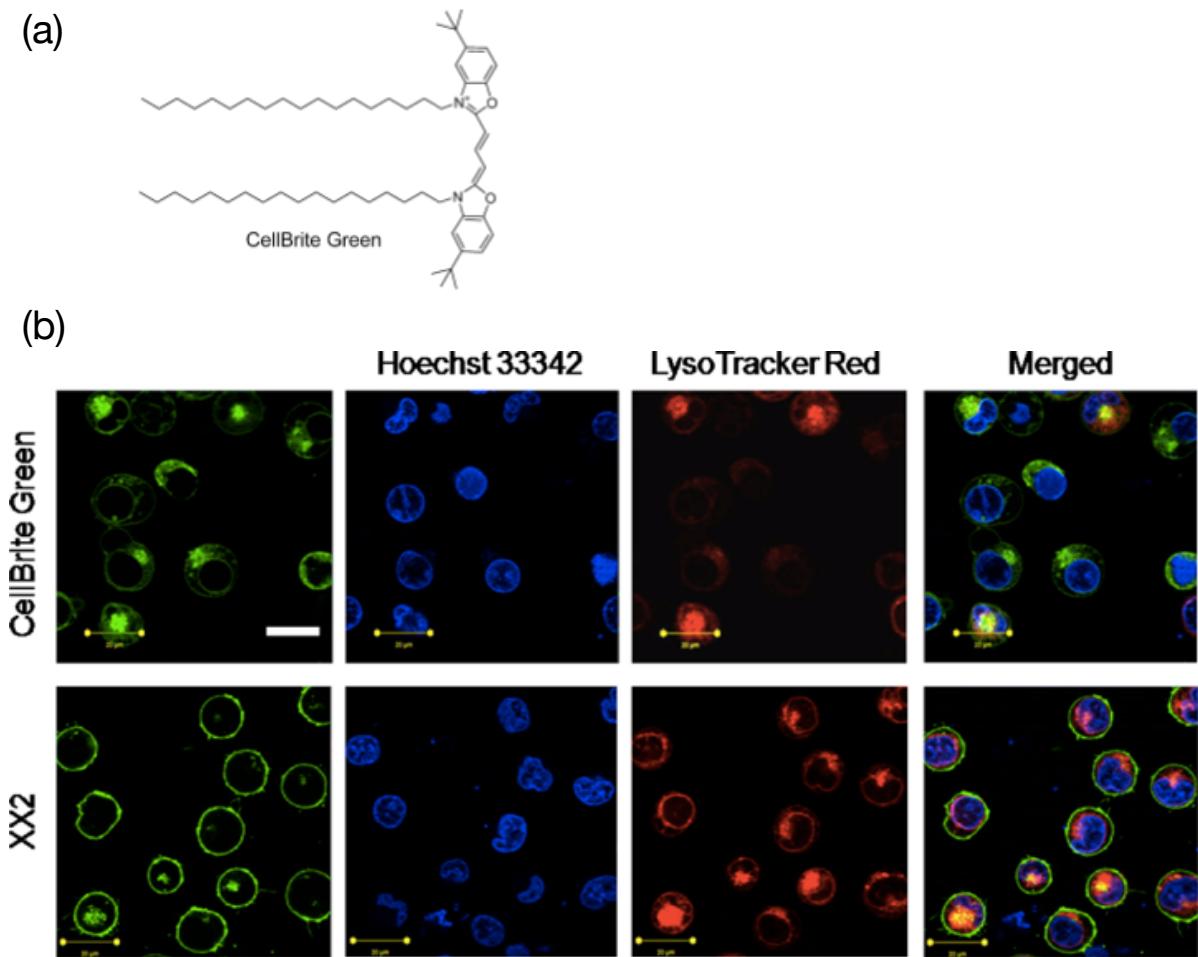


Figure 2-11. (a) CellBrite Green の構造、(b) 各種細胞小器官染色試薬と CellBrite Green (上) または XX2 (下) で修飾した K562 細胞の CLSM 画像 (スケールバー : 20  $\mu$ m)

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

### 2.3.7 リサイクリング経路によるペプチド型膜アンカーの再提示

XX2 は、細胞表面からエンドサイトーシスにより細胞内部へと取り込まれた。そこで次に、取り込まれたペプチドがリサイクリングエンドソーム経路に乗って、再び細胞表面上に提示されるかどうかを調査した。想定されるようなリサイクリングエンドソームによる分子の再提示は、トランスフェリンや G タンパク質共役受容体などの内因性受容体ならびにコレステロールを含有した人工両親媒性膜修飾分子において報告されている<sup>9-14</sup>。XX2 の再提示を証明するために、細胞表面に修飾されているペプチド上の NBD 基を膜非透過性の  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  によって選択的に還元し消光させ、ついでペプチドの再提示による細胞膜上の蛍光の回復を蛍光顕微鏡によって評価した (Figure 2-12)。Figure 2-12(a) は、K562 細胞を 6.0  $\mu\text{M}$  の XX2

で修飾し、エンドサイトシスによる取り込みを可能にするために  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間培養した後に、細胞を  $4^{\circ}\text{C}$  で冷却してリサイクリングプロセスの速度を低下させた細胞である。この細胞を cold  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  で処理することで、膜外葉に存在する XX2 の NBD 基を消光した (Figure 2-12(b))。次に、処理した細胞を 4 または  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間培養した (Figure 2-12(c), (d))。その結果、 $4^{\circ}\text{C}$  での培養結果と比較して  $37^{\circ}\text{C}$  で培養した細胞では膜上の蛍光の有意な回復が観察された。これは、XX2 がエネルギー依存的なりサイクリングエンドソーム経路を通して細胞表面に再び提示されたことを示している。XX2 がリサイクリングエンドソームによって膜上に再分配される性質は、細胞表面に特定の分子を長時間提示するという膜修飾分子の目的上有益であるといえる。

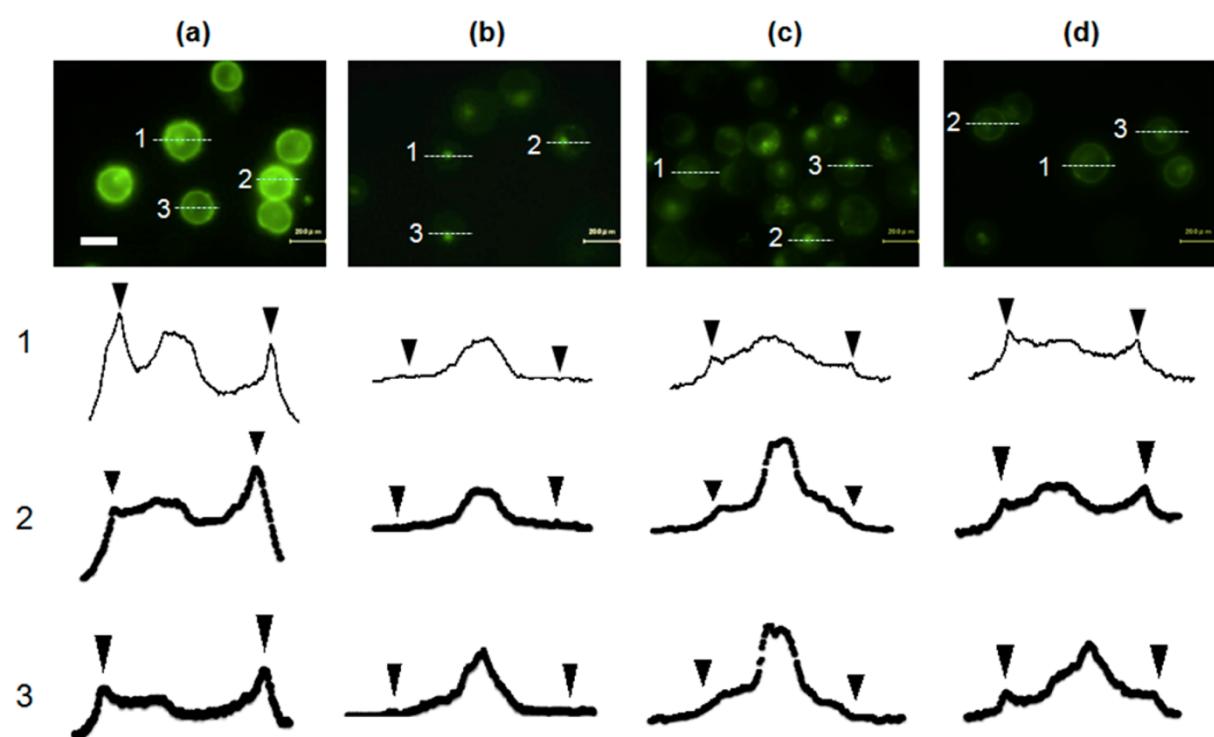


Figure 2-12. XX2 を修飾後以下の処理をした K562 細胞の蛍光顕微鏡画像 (スケールバー :  $20 \mu\text{m}$ ) (a) : 修飾後  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間培養し、 $4^{\circ}\text{C}$  で冷却した細胞、(b) : (a)の細胞を  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  で処理した細胞、(c), (d) : (b)の細胞を  $4^{\circ}\text{C}$  または  $37^{\circ}\text{C}$  で 30 分間培養した細胞

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

### 2.3.8 レセプターとして機能するペプチド型膜アンカーの合成

ここまで評価から、開発した XX2 はペプチド膜アンカーとして優れた性質を示したため、XX2 を基体として用いて細胞表面上にモデルリガンドとしてビオチンを提示する分子を設計した。本分子の設計にあたって、ビオチンと SA の認識がリンカーの長さに影響を受けることを考慮し、リンカーとして長さの異なる柔軟なオリゴエチレングリコール (OEG) を使用した三種類のビオチン化 XX2 を合成した (Figure 2-2, 2-12)。合成したビオチン化 XX2 を、そのリンカーの長さからそれぞれ XX2-1、XX2-2 および XX2-3 と命名した (Table 2-2)。

Table 2-2. 各ビオチン修飾ペプチド型膜アンカーの特性

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

name	<i>n</i> of spacer	extended spacer length (nm)	normalized F.I. of peptide <sup>a</sup>	normalized ratio of SA/ peptide <sup>b</sup>	<i>t</i> <sub>1/2</sub> (h)
XX2	-	-	1.00	-	14
XX2-1	1	2.7	0.84	1.0	9.8
XX2-2	2	5.4	0.84	0.94	11
XX2-3	3	8.1	0.74	1.3	7.0

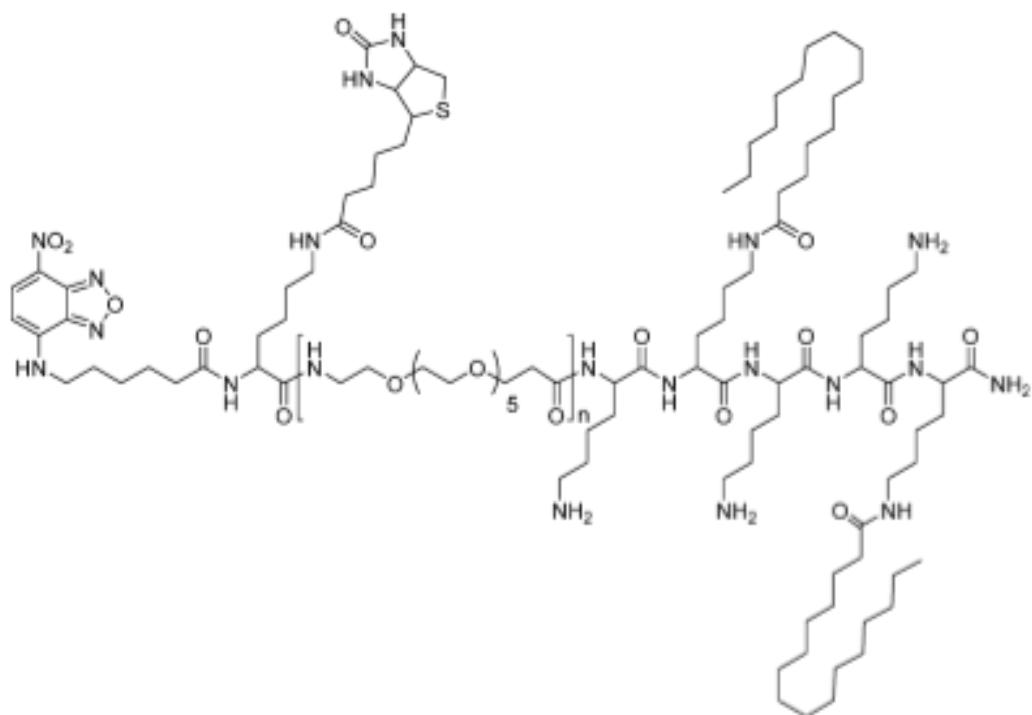


Figure 2-12. (a) XX2-1、XX2-2 および XX2-3 の構造

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

### 2.3.9 細胞表面におけるレセプター/リガンド認識

合成した各ビオチン化XX2の細胞膜上でのSAの認識能を評価するために、各ペプチドを2.0 μMの濃度でK562細胞に修飾し、その細胞に0.2 μMのCy3 SAを添加した。**Figure 2-13(a)**は、XX2-3で修飾された細胞の蛍光画像である。Cy3 SA由来の赤色蛍光およびペプチド由来の緑色蛍光が細胞表面上で共局在化していることから、ペプチドを介したビオチンの細胞膜上への提示が成功し、SAによる認識が起こったことが示された。

**Figure 2-13(b)**は、三種類のビオチン化ペプチドで修飾された細胞のイメージングサイトメトリーの結果である。細胞上のペプチド量は、スペーサー長の増加に伴い減少する傾向にあった。この傾向は、スペーサー長の増加に伴いペプチドの水溶性が増加し、その結果細胞膜へのペプチドの分配量が減少したことに起因すると考えられる。各ペプチドの半減期を2.3.4項と同様の方法で評価した結果、XX2-3は最短の半減期を示した(**Table 2-2, Figure 2-14**)。この理由として、XX2-3が最も長い親水性のリンカーを有するために、分子全体の水溶性が最も高いことが挙げられる。**Figure 2-13(c)**には、細胞表面上に結合したSAのイメージングサイトメトリーの結果を示す。興味深いことに、細胞に結合したSAの量はXX2-3で最も高く、この結果はXX2-3が最も低い修飾率であったことと合致しない。このような結果になった理由について以下で考察する。XX2-3と比較して、XX2-1およびXX2-2で修飾された細胞に対するSAの結合量は少なく、この結果からSAのビオチンの認識にはスペーサー長が重要であることが示唆される。事実、SAの結合効率は、XX2-1からXX2-3になると30%増加した。以上のことから、XX2-3が最も高いSA修飾効率を示した理由として、細胞表面に存在する糖鎖、例えば膜タンパク質上に高密度で存在する多糖などが関与していると考えられる。つまり、膜上に存在する糖鎖の影響を受けない程度のリンカー長を有していることがSAのビオチンの認識には重要であるといえる<sup>15</sup>。今回、見出したXX2-3を利用することで、細胞表面にペプチドおよびSAを介したビオチン化分子の提示が可能になると期待できる。また、XX2-3の知見から、XX2を応用することでビオチンのみならず様々なリガンド分子を細胞表面にレセプターに認識される状態で提示できる可能性がある<sup>15</sup>。

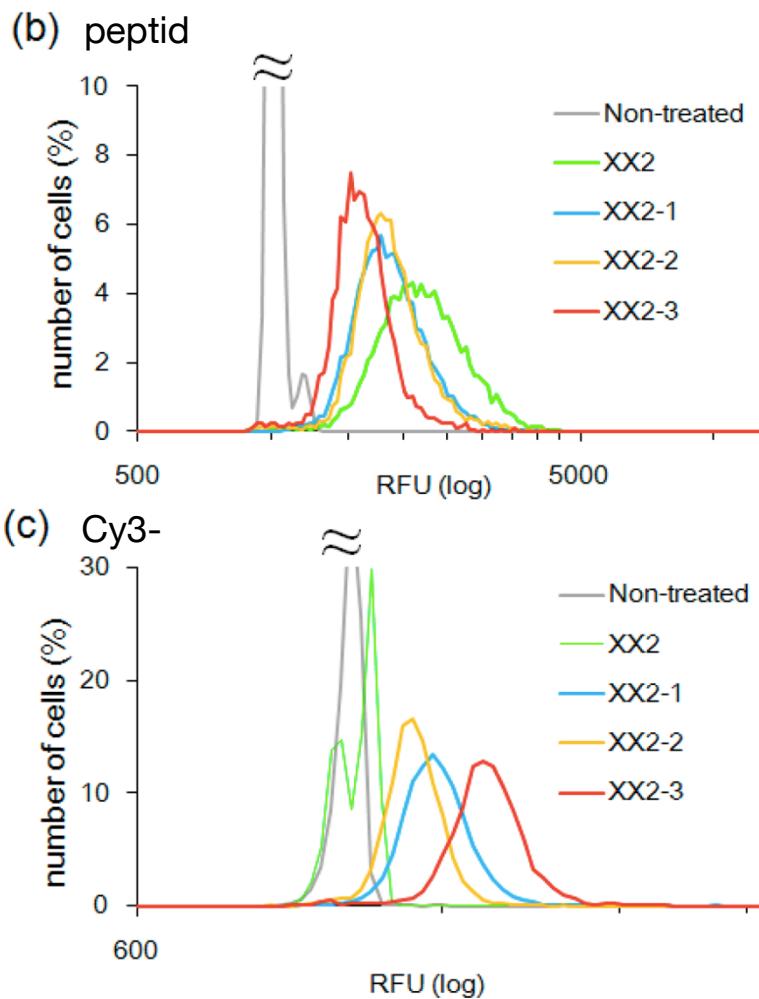
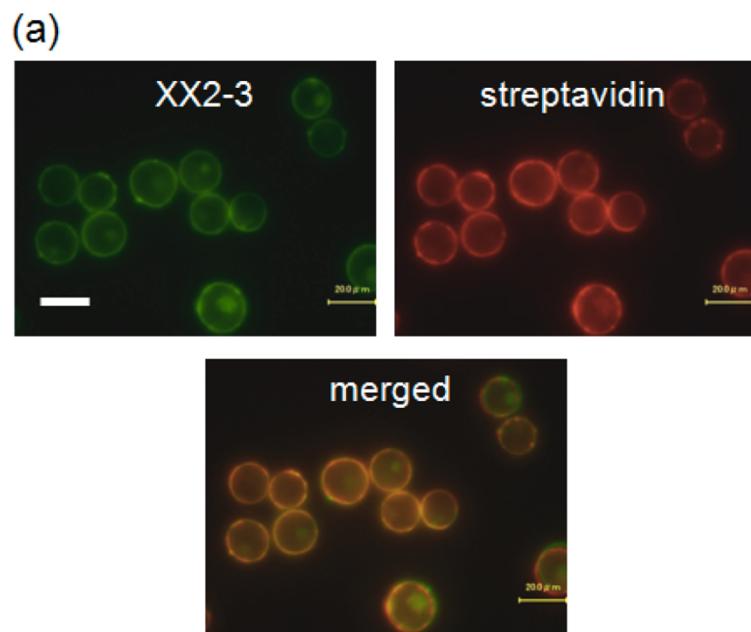


Figure 2-13. (a) XX2-3 および Cy3 SA を修飾した K562 細胞の蛍光顕微鏡画像 (スケールバー : 20  $\mu$ m)、(b), (c) XX2-1, 2, 3 で修飾した K562 細胞のイメージングサイトメトリーによる評価 (b : ペプチド由来の緑色蛍光、c : Cy3 SA 由来の赤色蛍光)

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

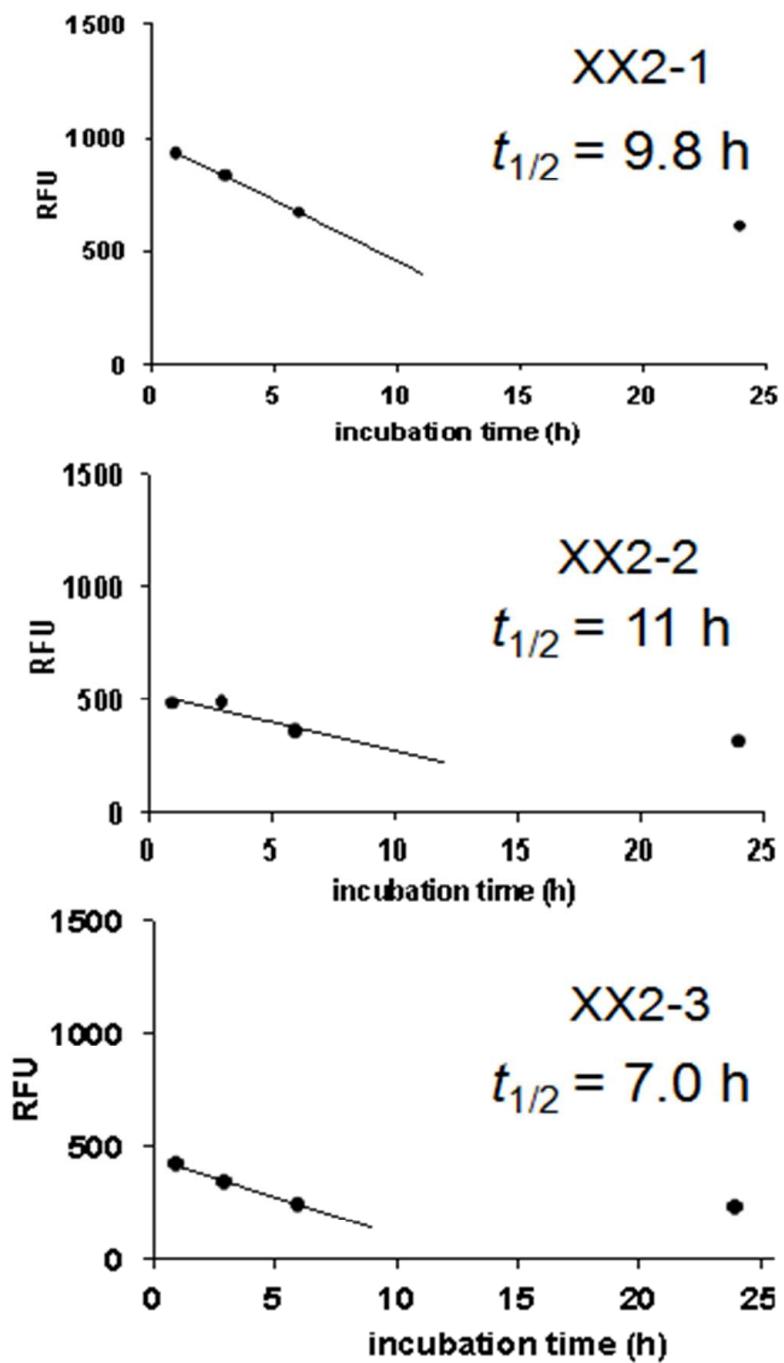


Figure 2-14. K562 細胞上での各ペプチド由来の蛍光強度の経時変化 (細胞膜上での半減期  $t_{1/2}$  は修飾後 6 時間までの蛍光強度から作成した各近似直線より算出)

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2014, 25, 2134. Copyright 2014 American Chemical Society.

## 2.4 結語

本章では、膜修飾分子の寿命を延ばすことを目的に、細胞膜への安定な分子提示を可能にするペプチド型膜アンカーの開発についての研究を紹介した。XX2 は、比較的高い溶解性と細胞膜への迅速かつ効率的な分配（60~70%）を示し、これは合成した六種のペプチドの中で膜修飾分子として最高の性能であった。また、ペプチド配列中の疎水基の周期性は、ペプチドの溶解性に大きな影響を及ぼした。XX2 は、細胞膜上で 14 時間という長い半減期を示し、これが疎水性の細胞膜に対するパルミトイル基の高い親和性に起因することであるとわかった。さらに XX2 の長い半減期には、エンドサイトーシスによる取り込み後のリサイクリング経路を通じた細胞膜上への再提示も寄与していることが見出された。ペプチド型膜アンカーとして優れた XX2 を基体として用いて、ビオチンを修飾した分子（XX2-3）を合成した結果、細胞膜上に SA を提示することに成功した。そして、このビオチンと SA の認識にはペプチドが有するリンカーの長さが重要であることがわかった。この理由としては、細胞膜上が膜タンパク質や糖鎖が密集しており、それらの SA に対する立体障害が考えられる。以上の結果から、本章で紹介したペプチド型膜アンカーは、その応用として細胞選択性を持つ分子を細胞上に修飾する手段として活用できる。その結果、機能性の細胞の選択性的送達を必要とする再生医療に貢献できると考えられる。

実際、我々の研究室ではペプチド型膜アンカーを応用した細胞の送達に関する研究を展開している。炎症部位の内皮細胞表面に特異的に発現するレセプターである E-セレクチンを認識する E-セレクチンホーミングペプチド（E-sel-HP）<sup>16</sup> をリガンドとして採用し、細胞を炎症部位特異的に集積させ、治療効果が出るかどうか検討している<sup>17</sup>。

## 2.5 参考文献

1. M. Takeo, C. Li. M. Matsuda, H. Nagai, W. Hatanaka, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2015**, *26*, 353.
2. S. Lin, W. S. Struve, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, *54*, 361.
3. S. Boonyarattanakalin, S. E. Martin, S. A. Dykstra, B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 16379.
4. P. S. Joel, W. K. Jeffery, *Chem. Rev.*, **1995**, *95*, 2168.
5. T. Tokunaga, K. Kuwahata, S. Sando, *Chem. Lett.*, **2013**, *42*, 127.
6. K. Kato, C. Itoh, T. Yasukouchi, T. Nagamune, *Biotechnol. Prog.*, **2004**, *20*, 897.
7. H. Ishikawa, S. B. Sato, A. Vertut-Doi, Y. Hamashima, K. Miyajima, *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, *1359*, 123.
8. T. Baba, C. Rauch, M. Xue, N. Terada, Y. Fujii, H. Ueda, I. Takayama, S. Ohno, E. Farge, S. B. Sato, *Traffic*, **2001**, *2*, 501.
9. D. Morgan, V. L. Mager, M. S. Molly, *Nat. Chem.*, **2011**, *3*, 582.
10. A. Claing, S. A. Laporte, M. G. Caron, R. J. Lefkowitz, *Prog. Neurobiol.*, **2002**, *66*, 61.
11. S. S. G. Ferguson, *Pharmacol. Rev.*, **2001**, *53*, 1.
12. P. Stahl, P. H. Schlesinger, E. Sigardson, J. S. Rodman, Y. C. Lee, *Cell*, **1980**, *19*, 207.
13. D. R. Sheff, E. A. Daro, M. Hull, I. Mellman, *J. Cell Biol.*, **1999**, *145*, 123.
14. F. R. Maxfield, T. E. McGraw, *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.*, **2004**, *5*, 121.
15. W. Zhao, G. S. L. Teo, N. Kumar, J. M. Karp, *Mater. Today*, **2010**, *13*, 14.
16. C. L. Martens, S. E. Cwirla, R. Y. W. Lee, E. Whitehorn, E.Y. F. Chen, A. Bakker, E. L. Martin, C. Wagstrom, P. Gopalan, C. W. Smith, E. Tate, K. J. Koller, P. J. Schatz, W. J. Dower, R. W. Barrett, *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 21129.
17. 松田雅義, “修士論文”, 片山研究室 (2014)

### 第三章

## 膜貫通タンパク質の機能模倣を目指した膜貫通分子の開発

### 3.1 緒言

本章では、膜貫通状態での膜修飾が可能な膜貫通分子 (Transmembrane Molecule: TM) の開発と膜貫通状態を達成する修飾法について紹介する。膜貫通型の膜修飾が達成されれば、膜貫通タンパク質の機能を模倣した TM の実現が期待でき、細胞膜外葉や内葉を分子で修飾するよりも高度な細胞の機能化が可能になると考えられる。

#### 3.1.1 膜貫通タンパク質の機能

細胞の機能を制御する膜貫通タンパク質として、各種のイオンチャネルや七回膜貫通型のタンパク質である G タンパク質共役受容体 (GPCR) が存在する (Figure 3-1(a), (b))。イオンチャネルは、イオン選択性的認識によってイオンの透過を制御し<sup>1</sup>、浸透圧や静止膜電位の調節を行っている。静止膜電位は、細胞種や周期により異なるが、膜の外側を 0 mV として -5 mV から -90 mV 程度の電位であることが知られている<sup>2</sup>。GPCR は、外部でリガンドを認識することで細胞内部にシグナルを伝達し、多数の細胞プロセスを調節している<sup>3</sup>。また細胞は、複数回膜貫通型のタンパク質以外にも各種の一回膜貫通型タンパク質を受容体として提示しており、リガンドを認識しシグナルを誘起して増殖や分化の制御を行っている (Figure 3-1(c))。一回膜貫通型タンパク質は、一回の膜貫通でその機能を発現しているため、TM による模倣対象として適当であると考えられる。

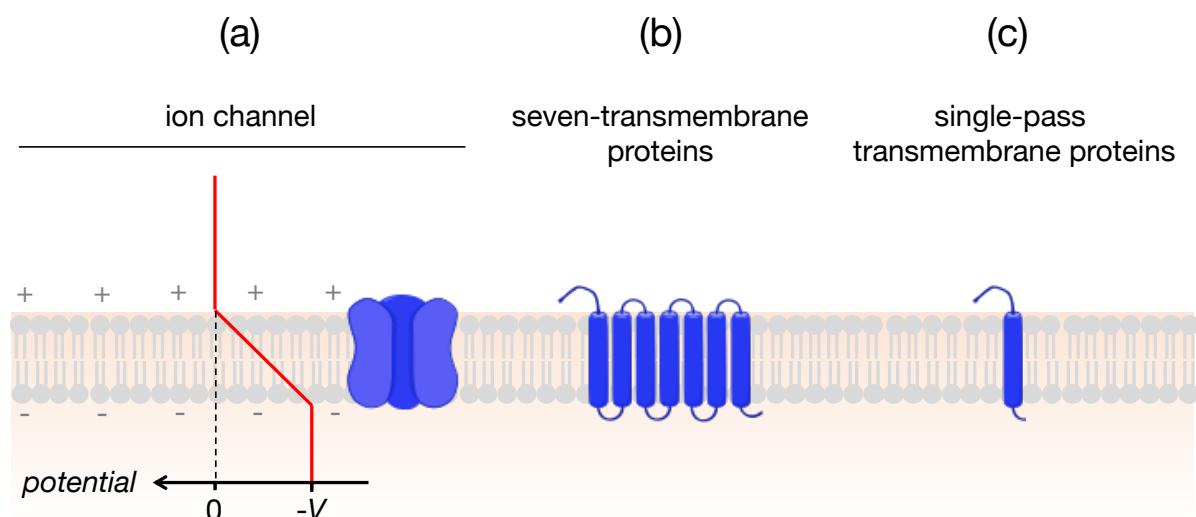


Figure 3-1. 細胞膜上に存在する膜貫通タンパク質 (a) イオンチャネル、(b) GPCR、(c) 一回膜貫通型タンパク質

### 3.1.2 膜貫通状態を達成する膜修飾法

これまで、膜を貫通した修飾が達成されているのは pHLIP のみである<sup>3</sup>。しかし pHLIP は、酸性条件でのみ膜貫通が達成される点や膜貫通状態が pH 依存的に解かれる<sup>4</sup>という欠点を持つ。また、方向を制御した膜修飾の機構が不明であるため、ペプチド上への分子の修飾に配慮する必要がある。そのため TM の設計には、環境に依存することなく方向が制御されて膜を貫通し、その状態を維持できる戦略が必要と考えられる。そこで、私は細胞が必ず有する膜電位を利用することで方向を制御して分子を膜に挿入する膜修飾法を考案した (Figure 3-2)。本修飾法では、膜電位を感受性して膜を透過する性質を備えた膜透過分子を TM に修飾することで方向を制御した膜への挿入および膜貫通状態での膜修飾を達成する戦略である。

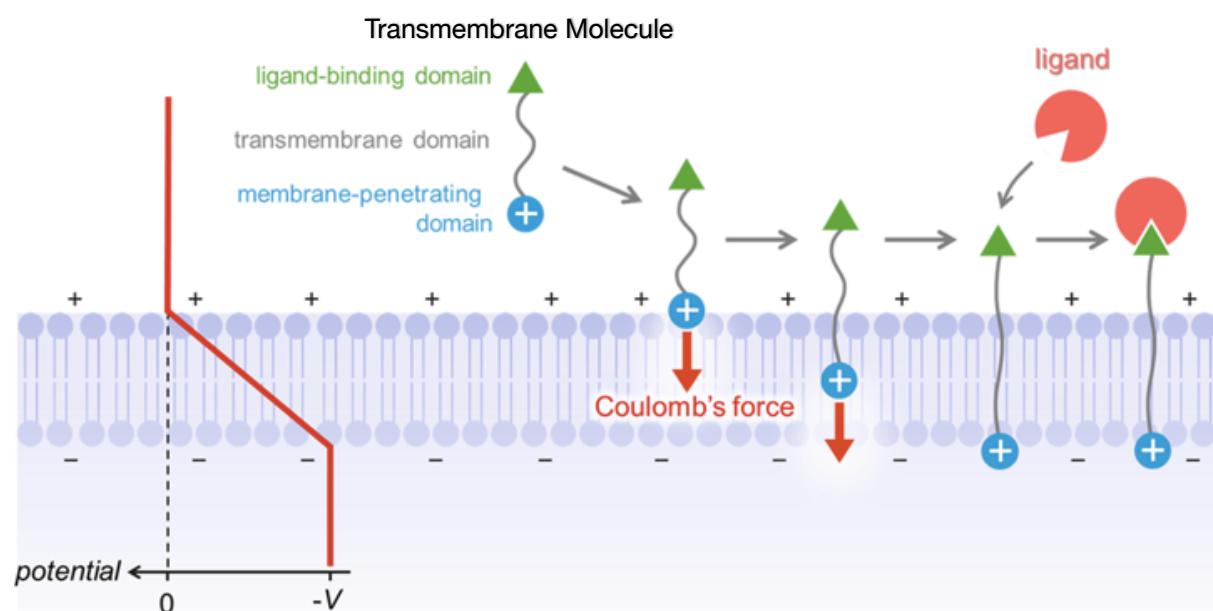


Figure 3-2. 膜貫通状態を達成するための TM を用いた膜修飾法 (▲: リガンド結合部、●: 膜透過部)

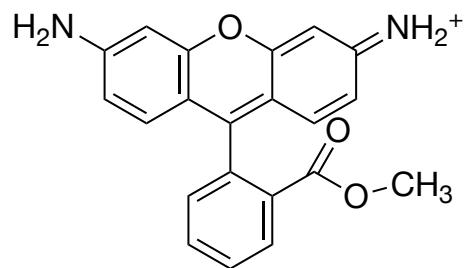
Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.1.3 膜貫通分子の設計

**Figure 3-2** の修飾法に対応した膜修飾分子として、リガンド結合部、膜貫通部および膜透過部の三つのドメインから成る TM を考えた。リガンド結合部は、細胞外でリガンドと結合する機能を備えたドメインである。膜貫通部は、膜に修飾されると貫通状態で膜の中に存在するドメインである。そして、膜透過部は疎水性相互作用により膜に修飾された後に、膜電位を感受性して膜を透過、膜内葉に移行するドメインである。

膜電位を感受して膜を透過する分子として、疎水性かつカチオン性の分子が挙げられる。例えば、蛍光色素である Rhodamine 123 は、膜電位を感受して細胞膜を透過することが報告されている (**Figure 3-3(a)**)<sup>5</sup>。これは、分子の疎水性の高さにより膜に分配しやすく、カチオン性により膜電位がかかった細胞膜中で電場由来のクーロン力を感受して細胞内部方向へ移動した結果と考えられる。また、このような機構が関与した膜透過が一部のペプチドにおいても報告されている。Wender らは、ヒト免疫不全ウイルスの Tat タンパク質由来の配列 (tat ペプチド) および Arg 八量体 (R8) の膜を透過する量が膜電位に依存することを明らかにしている<sup>6</sup>。また Kelley らやは、非天然の疎水性アミノ酸とカチオン性のアミノ酸から成るペプチドが膜透過すること、そしてペプチドの疎水性が向上するのに伴ってペプチドのミトコンドリアへの集積量が増加することを明らかにしている (**Figure 3-3(b)**)<sup>7,8</sup>。ミトコンドリアは、形質膜よりも大きい膜電位を有するため、分子の集積が膜電位依存的に起こったと考えられる。この知見を活かして、ペプチド型膜アンカーに疎水基および Arg を導入し疎水性およびカチオン性を調節することで、膜透過部として適した分子および TM の合成が達成できると考えられる。

(a)



(b)

カチオン性

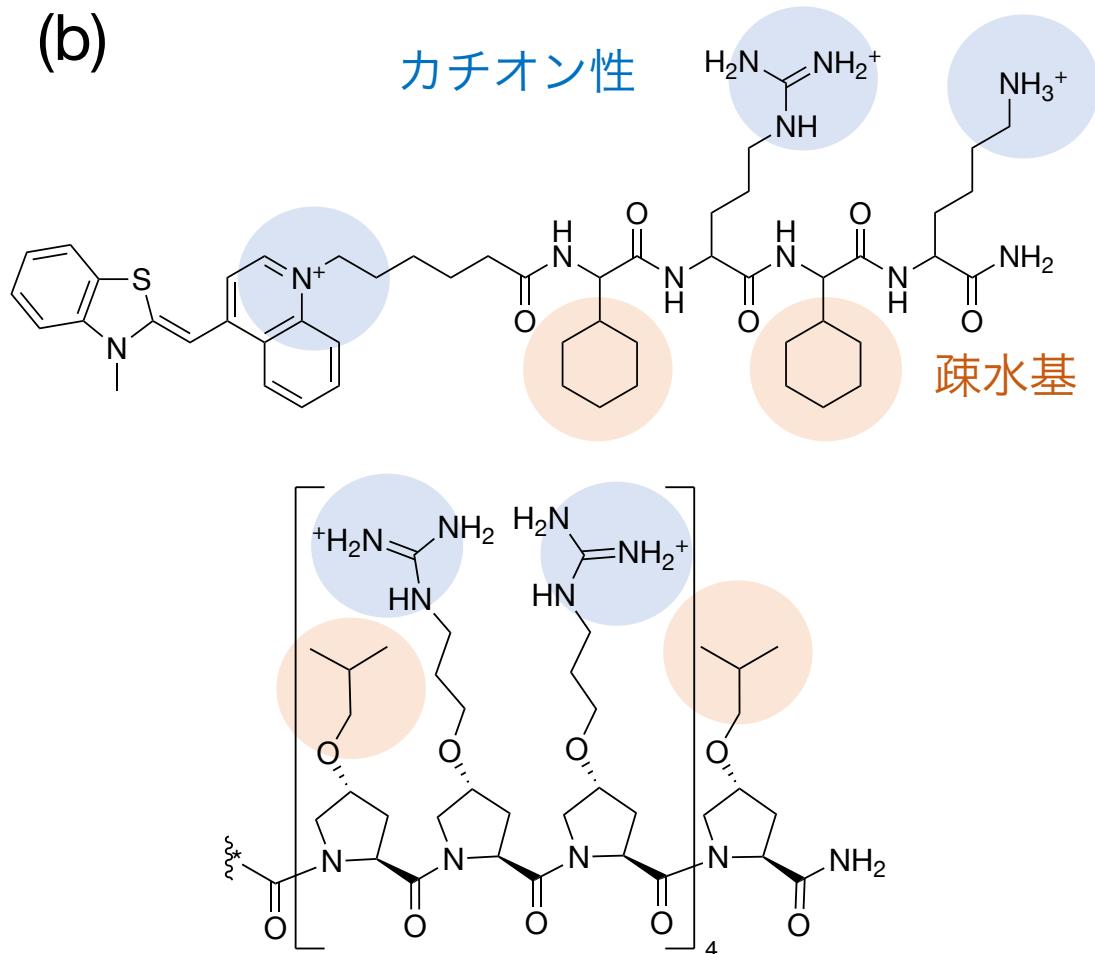


Figure 3-3. (a) Rhodamine 123、(b) 非天然の疎水性アミノ酸とカチオン性のアミノ酸から成る細胞膜透過能を有するペプチド<sup>7,8</sup>

### 3.1.4 本研究の目的および戦略

本研究では、疎水性相互作用に基づいた膜修飾によって膜貫通状態での膜修飾を達成するための膜修飾分子およびその膜修飾法の開発を目的とする。本研究で膜を貫通した状態で TM を膜に修飾する戦略は、Figure 3-2 に示した。今回設計した TM は、リガンド結合部、膜貫通部および膜透過部の各ドメインから成る。膜透過部は、既報の膜電位感受性の膜透過分子から着想を得て、疎水性のペプチド型膜アンカーに Arg を導入することでカチオン性を付与することにした。膜透過部を有する TM を細胞に添加すると、膜透過部が疎水性相互作用により膜に修飾され、膜電位により生じるクーロン力をを利用して細胞膜を透過する。そして、膜透過部が膜内葉表面に達することで、TM の方向を制御した膜貫通状態での膜修飾が達成される戦略である。このような分子は前例がなく非常に挑戦的であるが、疎水性相互作用に基づく細胞の機能化の幅を広げる可能性をもつ膜貫通タンパク質の機能模倣につながる有意義な研究と考えられる。

### 3.2 実験

#### 3.2.1 試薬

以下に本研究で使用した試薬を記す。

NovaSyn TGR resin、Fmoc amino acids、Fmoc-N- $\varepsilon$ -biotinyl-L-lysine および Fmoc-21-amino-4,7,10,13,16,19-hexaoxaheneicosanoic acid は Novabiochem (Darmstadt, Germany) から購入した。2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate (HBTU)、N-hydroxybenzotriazole (HOBr)、piperidine、trifluoroacetic acid (TFA)、N,N'-diisopropylethylamine (DIEA)、N-methylpyrrolidone (NMP) および Fmoc-N- $\varepsilon$ -Palmitoyl-L-lysine は Watanabe Chemical (Hiroshima, Japan) から購入した。HPLC grade acetonitrile は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。N,N-dimethylformamide (DMF) および diethyl ether used for peptide synthesis は Kanto Chemical (Tokyo, Japan) から購入した。Dimethyl sulfoxide (DMSO) for biochemistry および sodium dodecyl sulfate for biochemistry は Wako Pure Chemical (Osaka, Japan) から購入した。Triisopropylsilane は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。Hoechst 33342、MitoTracker Red CMXRos および Lysotracker Red DND-99 は Life Technologies (Grand Island, NY, USA) から購入した。D-Mannitol、fetal calf serum (FCS)、lithocholic acid (LCA) および methyl- $\beta$ -cyclodextrin (CD) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した。FluoroLinkCy3-labeled streptavidin (Cy3-SA) は Amersham Biosciences (Pittsburgh, PA, USA) から購入した。4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) は Dojindo (Kumamoto, Japan) から購入した。

#### 3.2.2 Fmoc 固相合成法によるペプチドの合成

ペプチドはすべて Fmoc 固相合成法に基づき、対応する Fmoc アミノ酸を用いて NovaSyn<sup>®</sup>TGR 樹脂上で 0.025 mmol スケールにおいて行った。ペプチド側鎖の LCA 基は、Fmoc-Lys(Mtt)-OH に対して脱 Mtt 後に LCA を修飾することで導入した。ペプチド側鎖のパルミトイル基は、Fmoc-Lys(Mtt)-OH に対して脱 Mtt 後にパルミチン酸を導入した。そして、NBD は、アミノ酸 N 末端のアミノ基に対して脱 Fmoc 後に NBD-F を用いて導入した。TM 3 については、細胞膜を貫通する部位として、Fmoc-N-amido-dPEG6-acid を使用することでヘキサエチレングリコール (6EG) を三つ連続してペプチドに導入した。そして、その N 末端を脱保護後に Fmoc-Lys(biotin)-OH を SA に特異的に認識されるリガンド部位として導入した。

peptide 1 および peptide 2 の脱樹脂は、樹脂に TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5 (v/v)) の混合溶液 (1 mL) を加え室温で 1 時間攪拌させて、ろ液を回収する操作を三回繰り返すことで行った。脱樹脂後、回収したろ液を 40 mL の cold Et<sub>2</sub>O と混合し再沈殿させた。次いで、混合

溶液を 4 °C、10 min、3,500 × g で遠心することで黄色ペレット状の粗ペプチドを得た。各ペプチドの精製は、逆相高速液体クロマトグラフ (HPLC) (Hitachi LaChrom Elite, Tokyo, Japan) を用いて、Protein R カラム (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 上で行った。1 は、eluent A/eluent B = 30/70 から 10/90 へ 20 分かけて流出させた (eluent A: H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA, eluent B: CH<sub>3</sub>CN + 0.1% TFA)。2 は、eluent A/eluent B = 35/65 から 15/85 へ 20 分かけて流出させた。目的物の確認はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF-MS) (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) を用いて行った (Figure 3-4(a), (b))。精製したペプチドは、DMSO を用いて 1.0 mM の濃度に調製し、4 °C にて保存した。濃度決定は、DMSO 中で 478 nm における NBD の吸光度 (モル吸光係数 = 33186 /M/cm) を用いて行った<sup>9</sup>。

3 の脱樹脂後、回収したろ液を減圧除去することで黄褐色かつ粘性状の粗ペプチドを得た。この粗ペプチドを DMSO に再溶解後、任意の割合で混合した HPLC の展開溶媒で希釈し、3 の精製を逆相 HPLC を用いて、Atlantis dc18 OBD カラム (Nihon Waters K.K., Tokyo, Japan) 上で行った。その際、3 は eluent A/eluent D = 25/75 から 5/95 へ 20 分かけて流出させた (eluent A: H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA, eluent D: MeOH + 0.1% TFA)。目的物の確認には MALDI-TOF-MS を用いた (Figure 3-4(c))。精製した 3 を DMSO により 0.5 mM の濃度に調製し、4 °C にて行った。濃度決定は、DMSO 中で 478 nm における NBD の吸光度を用いて行った<sup>9</sup>。

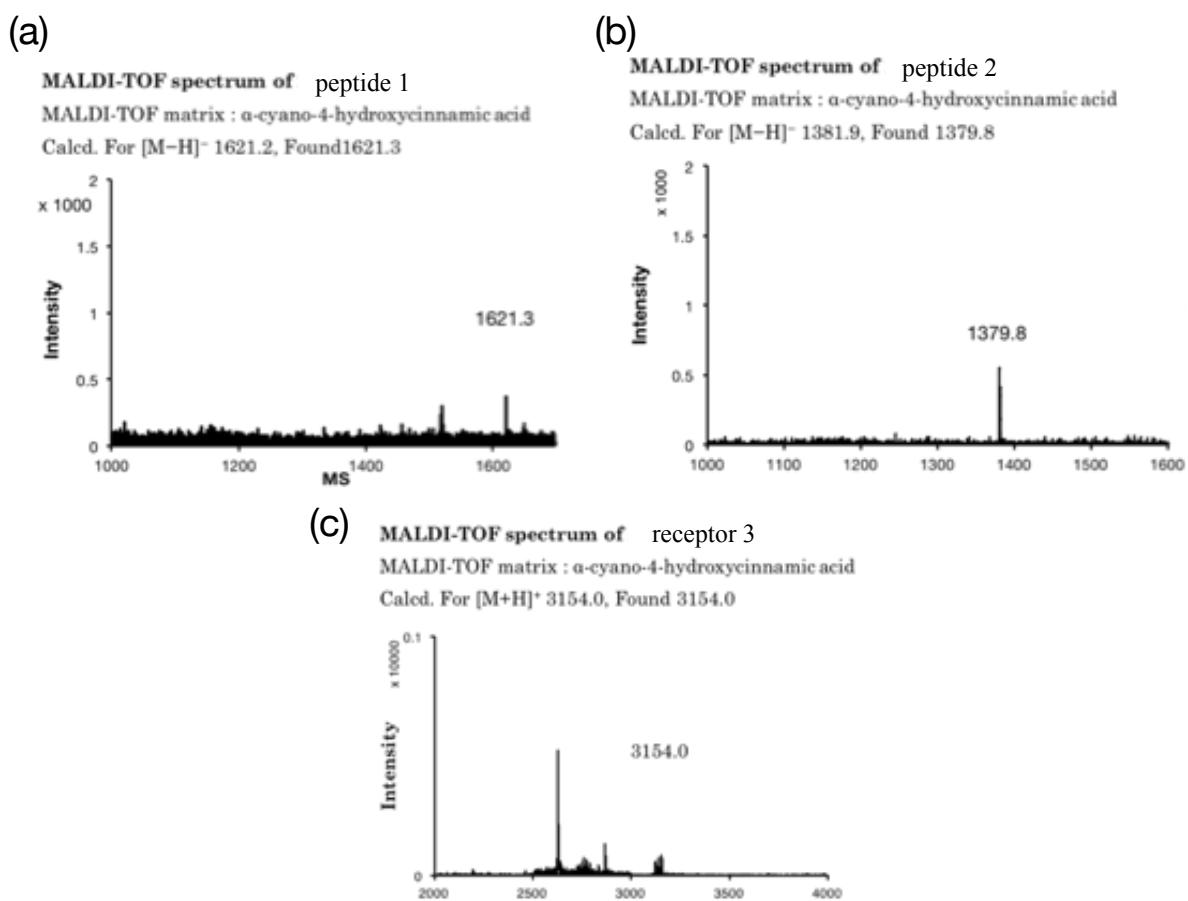


Figure 3-4. ペプチドの MS スペクトル (a) peptide 1、(b) peptide 2、(c) TM 3

### 3.2.3 ペプチドの溶解性

3.2.2 で合成したペプチドは高い疎水性を有するため、水溶液中でペプチドが十分な溶解性を示すかどうか確認した。その際、溶解性向上の戦略として疎水基を包摂し、その溶解性を向上させることができると報告されている methyl- $\beta$ -cyclodextrin (CD) を用いた<sup>10-13</sup>。各ペプチドの DMSO 溶液 (18  $\mu$ L, 100  $\mu$ M) を 72  $\mu$ L の DMSO、300 mM mannitol 含有 10 mM HEPES 緩衝液または 20 mM CD 含有 HEPES 緩衝液で希釈して、最終濃度 20  $\mu$ M の溶液を調製し、ボルテックスで完全に攪拌させた。なお、本実験条件では CD (20 mM) とペプチド (20  $\mu$ M) の濃度および CD とコレステロールの結合定数 ( $K_d = 1.8 \times 10^{-6}$ )<sup>14</sup> を考慮すると、平衡状態で 99% 以上のペプチドが CD と会合していると算出された。そして、ペプチド溶液調製直後、室温で 30 分間放置後、0.22  $\mu$ m フィルター (MILLIPORE, PVDF (タンパク質低吸着), SLGVR04NL) 通過後の計三回、NBD の極大吸収波長である 478 nm における溶液の吸光度を UV-2550 紫外/可視吸光度計 (JASCO, Tokyo, Japan) により測定した。溶解度は、(フィルター濾過後の  $A_{478}$ ) / (DMSO 中での  $A_{478}$ ) として定義した。

### 3.2.4 細胞培養

K562 細胞 (ヒト慢性骨髓性白血病細胞株) の培養は、10 % 仔ウシ血清 (FCS)、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、0.25  $\mu$ g/mL アンフォテリシン B を含む RPMI-1640 を用いて、5 % CO<sub>2</sub> 存在下、37 °C で培養した。

### 3.2.5 細胞上でのペプチドの挙動

K562 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells) を遠心分離して上澄みを除去し、2 mL の無血清培地を細胞に加えて懸濁させ遠心分離を行った。上澄みを除去し、同様の操作を再度行い細胞を洗浄した。細胞に添加するペプチド溶液を調製するためにペプチドの DMSO 溶液 (20  $\mu$ M) と 20 mM CD 含有 HEPES 緩衝液を混合し、室温で 30 分かけて包摶させた。回収した細胞に上記のペプチド溶液を添加し、37 °C で 5 分間修飾した (ペプチド終濃度 : 2  $\mu$ M)。その後、血清含有培地を加えて懸濁させ、遠心分離を行うことで未修飾のペプチドを除去し、血清培地中で任意の時間培養した。ペプチド修飾細胞の観察および評価には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (CLSM) (LSM700, Carl Zeiss) および Tali™ イメージベースサイトメーター (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) を使用した。

### 3.2.6 ペプチドの細胞内局在

K562 細胞の懸濁液 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) に対して、Hoechst33342 を 1  $\mu$ L 添加し 5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37 °C で 30 分培養し、細胞核の染色を行った。その後、リソソームを染色する細胞については LysoTracker® Red DND-99 を 1  $\mu$ M で添加して 15 分間培養することで染色した。一方、ミトコンドリアを染色する細胞については、MitoTracker® Red CMXRos を 1  $\mu$ M で添加して 30 分間培養することで染色した。その後、3.2.5 の方法に従ってペプチドを細胞に修飾し、CLSM を用いて細胞の観察および共局在率の評価を行った。

### 3.2.7 膜電位阻害条件下でのペプチドの細胞内局在の変化

細胞膜電位を阻害するためにリン酸カリウムを用いた生理食塩水 (K<sup>+</sup>PBS) を以下に示す方法で調製した<sup>7</sup>。KCl (13.69 mmol)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.15 mmol) および K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.83 mmol) を 100 mL の超純水に加え溶解後、滅菌済みの 0.22  $\mu$ m フィルター (MILLIPORE) に通して滅菌処理をした<sup>15</sup>。調製した K<sup>+</sup>PBS を使用して 20 mM CD 含有 K<sup>+</sup>PBS 溶液を調製し、ペプチドの DMSO 溶液と混合し細胞実験用のペプチド溶液を得た。また、K<sup>+</sup>PBS を使用して細胞懸濁液を調製し、3.2.5 に従ってペプチドを細胞に修飾した。細胞の観察には CLSM を使用した。

### 3.2.8 ペプチド濃度に依存した細胞生存率への影響

ペプチドが細胞生存率に与える影響を評価するために、3.2.5の方法に従ってペプチドを細胞に修飾した後、細胞を培地中に懸濁させた。そこに Propidium Iodide (PI) 水溶液 (1  $\mu$ L, 1  $\mu$ g/ml) を添加し攪拌後、暗所に 1 分間置いた。各濃度のペプチドで処理した細胞の生存率は、PI 由来の蛍光強度を Tali<sup>TM</sup> イメージベースサイトメーターにより測定することで算出された。

### 3.2.9 人工脂質二重膜を使用したペプチドの膜透過能の評価

人工脂質二重膜を用いたペプチドの膜透過メカニズムの調査は、東京農工大学川野研究室のデバイスおよび測定装置を使用して行った<sup>16,17</sup>。測定は、電圧印加条件でペプチドが膜を透過する際に発生するカリウムイオンの移動を電流として Jet patch clamp amplifier (Tecella, Foothill Ranch, CA, USA) を用いて検出した。実際の操作では、デバイスの 2 つのウェルそれぞれに人工脂質である 1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC) 溶液 (10 mg/mL in CH<sub>3</sub>Cl) を 2  $\mu$ L ずつ加えた。その後、各ウェルに 4.7  $\mu$ L ずつカリウムイオン水溶液 (1 M KCl, 10 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)) を添加し、ウェルを繋ぐ細孔上で平面脂質膜が形成されるまで静置した。脂質膜が形成されない場合または測定中に壊れた場合には、疎水性のチップで細孔をなぞることで余分な脂質分子を除去し、脂質膜の形成を促した。平面脂質膜の形成は、二つのウェルの間の抵抗値または測定後の膜破壊時にみられる特異的なシグナルから確認した。得られた結果の解析には、pCLAMP ver. 10.5 (Molecular Devices) を用いた。

ペプチドの膜透過能を評価するにあたっては、上記の手順で平面脂質膜を細孔上に作製する際、一方の水相にあらかじめ CD と包接させた各ペプチドを添加した溶液(終濃度 peptide: 5  $\mu$ M, CD: 5 mM) を用いた。また、測定はウェル間に 180 mV または 100 mV の電圧を印加した条件で行った。

### 3.2.10 膜貫通分子の細胞表面におけるレセプター/リガンド認識

3.2.5 と同様の手順で K562 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells) に **3** を修飾した。**3** 修飾細胞の観察および評価には、CLSM および Tali<sup>TM</sup> イメージベースサイトメーターを使用した。さらに、500  $\mu$ L の培地に懸濁させた **3** 修飾後の細胞に対して、添加したビオチン (10 pmol) の 1/10 量の Cy3-SA (1 pmol) を添加し、37°C で 10 分間反応させた。その後、細胞に血清含有培地を加えて懸濁させ、遠心分離を行うという操作を二回行い未修飾の SA を完全に除去し、培地中で任意時間培養した。また、**3** の細胞毒性を評価するために、3.2.8 と同様の方法で評価を行った。

細胞内に存在する **3** がエンドソームによって取り込まれたことを確認するために、3.2.6

と同様の実験を行った。具体的には、K562 細胞懸濁液 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) に対して、リソソームを染色するために LysoTracker® Red DND-99 を添加した。その後に、3.2.5 の方法に従って **3** を細胞に修飾し、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-8000 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて細胞の観察を行った。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 Fmoc 固相合成法によるペプチドの合成

まず、膜電位感受性の膜透過ドメインの合成を行った。先行研究から、Arg<sup>8,18</sup> またはグアニジニウム基<sup>19</sup>を有する疎水性ペプチドやその類似体は、膜電位によって生じるクーロン力により膜を透過することが報告されている。そこで、私は上記の条件を満たすペプチドとして、Arg 残基と疎水基で修飾された Lys 残基を有する分子を (peptide 1, peptide 2) 設計した (Figure 3-5)。二種類のペプチドはそれぞれ疎水基として飽和脂肪酸であるパルミトイル基または胆汁酸の二次代謝物であるリトコール酸 (LCA) をその配列に二つ有する。二章の研究から、分子全体の疎水性向上を狙って導入する疎水性基の数は二つとした<sup>15</sup>。細胞修飾後のペプチドの挙動を蛍光顕微鏡で観察できるように、これらのペプチドの N 末端を NBD で標識した。Figure 3-4(a), (b) に MS スペクトルの結果を示す。

また、1 を膜透過部として TM の設計を行った。膜貫通部には両親媒性の hexaethylene glycol (6EG) を三つ繋げた構造を採用した。6EG は、水溶液だけでなく有機溶媒中にも可溶であるため、疎水性の細胞膜中で貫通した状態で存在することが期待される。これまでの報告から、オリゴエチレングリコールといくつかの種類の脂質は、均一に混和することがわかっている<sup>20</sup>。また、この研究で使用された膜貫通部は、伸び切り鎖長が 8.2 nm であり、これは細胞膜の厚さ (4.25 nm) の二倍の長さであった<sup>21</sup>。リガンド結合部のビオチンは、膜貫通部の 6EG の N 末端に修飾され、細胞膜外にビオチンを提示できるデザインとした。以上のように設計した TM 3 を Fmoc 固相合成法により合成した (Figure 3-5, Figure 3-4(c))。

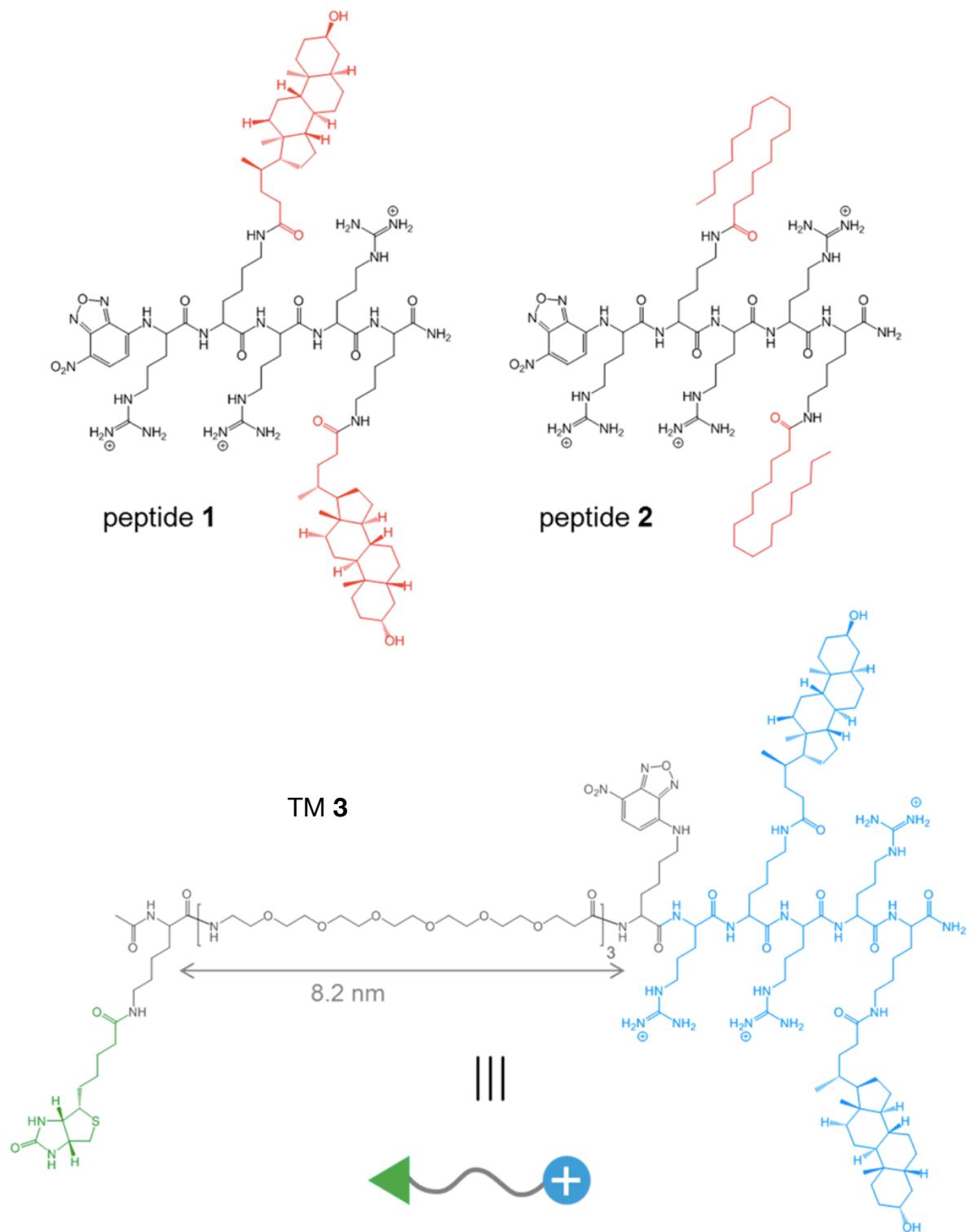


Figure 3-5. 本研究で合成した各ペプチド

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.3.2 ペプチドの溶解性

ペプチドへの疎水基の導入は、その水溶性の低下を招き膜修飾効率を低下させる原因となっていた。そこで、疎水性分子の可溶化剤として一般的に使用される methyl- $\beta$ -cyclodextrin (CD) を使用することで合成した疎水性ペプチドの溶解性の改善を試みた。CD が可溶化剤として使用されている一例として、 $\beta$ -CD に胆汁酸を包摶させて水溶液中に可溶化させる研究が報告されており、複合体形成の解離定数 ( $K_d$ ) は  $10^{-3}\sim10^{-5}$  M であった<sup>12</sup>。この程度の解離定数であれば、CD は疎水性のペプチドの水溶液への分散を促進させつつ、細胞膜へのペプチドの分配を妨げない可溶化剤としての機能が期待できる。実際、CD は疎水性脂質の細胞膜への修飾に利用されているため、本研究でも可溶化剤として採用した<sup>13</sup>。

二章と同様のろ過法を用いて **1** および **2** の溶解度を評価した。Figure 3-6 に、0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターによるろ過後の CD の存在下（破線）、非存在下（点線）および DMSO（実線）中での **1** および **2** の水溶液の吸収スペクトルを示す。Figure 3-6(a)から **1** は、CD の非存在下では 10 mM HEPES (pH7.4) 含有 300 mM マンニトール等張液にほとんど不溶であった。しかし、CD 存在下では、**1** の約 70%が等張液に可溶化された。**2** についても **1** と同様の溶解度の改善がみられたが、その改善の程度は **1** よりも顕著ではなかった (Figure 3-6(b))。この結果は、疎水基である胆汁酸およびアルキル鎖と CD との会合定数の差を反映していると考えられる。また、**3** についても CD が可溶化剤として有効であることがわかった。

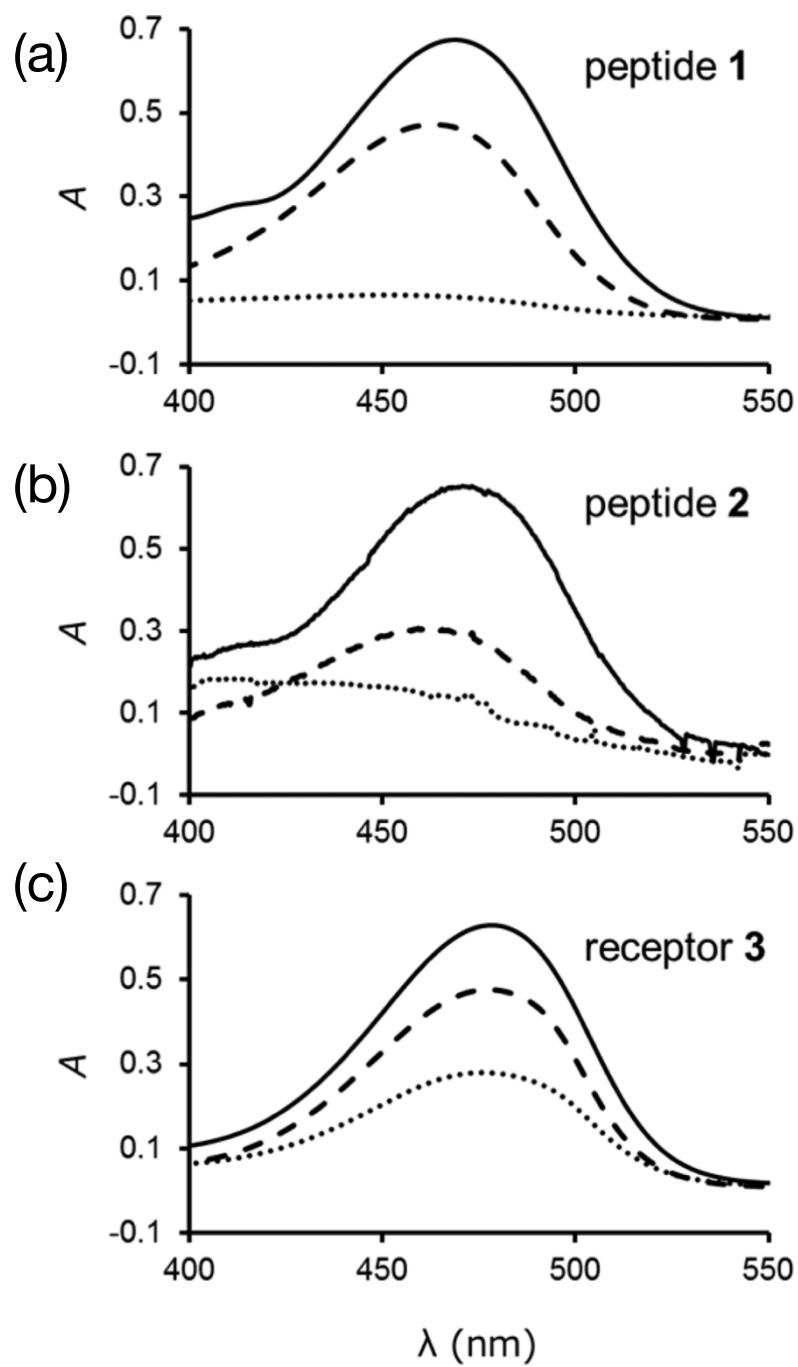


Figure 3-6. フィルターろ過後の各ペプチド溶液の吸収スペクトル(破線) CD 存在下、(点線)  
CD 非存在下、(実線) DMSO (a) peptide 1、(b) peptide 2、(c) receptor 3

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.3.3 細胞上でのペプチドの挙動

CD がペプチドの可溶化剤として機能したため、引き続き CD を可溶化剤として用いて各ペプチド (2  $\mu$ M) を K562 細胞に修飾した。その結果 Figure 3-7 に示されるように、1 および 2 は細胞内分布において明らかな違いを示した。1 は、その蛍光の大部分が細胞内から確認され、この結果は 1 が膜透過に成功していることを示している (Figure 3-7(a))。一方、2 は細胞膜から強い蛍光が確認された (Figure 3-7(b))。この結果は、二章で報告した XX2 に似ていることから、2 に膜透過能がないもしくは、膜透過に時間がかかり観察時間中には膜透過が観察されなかつた可能性がある。

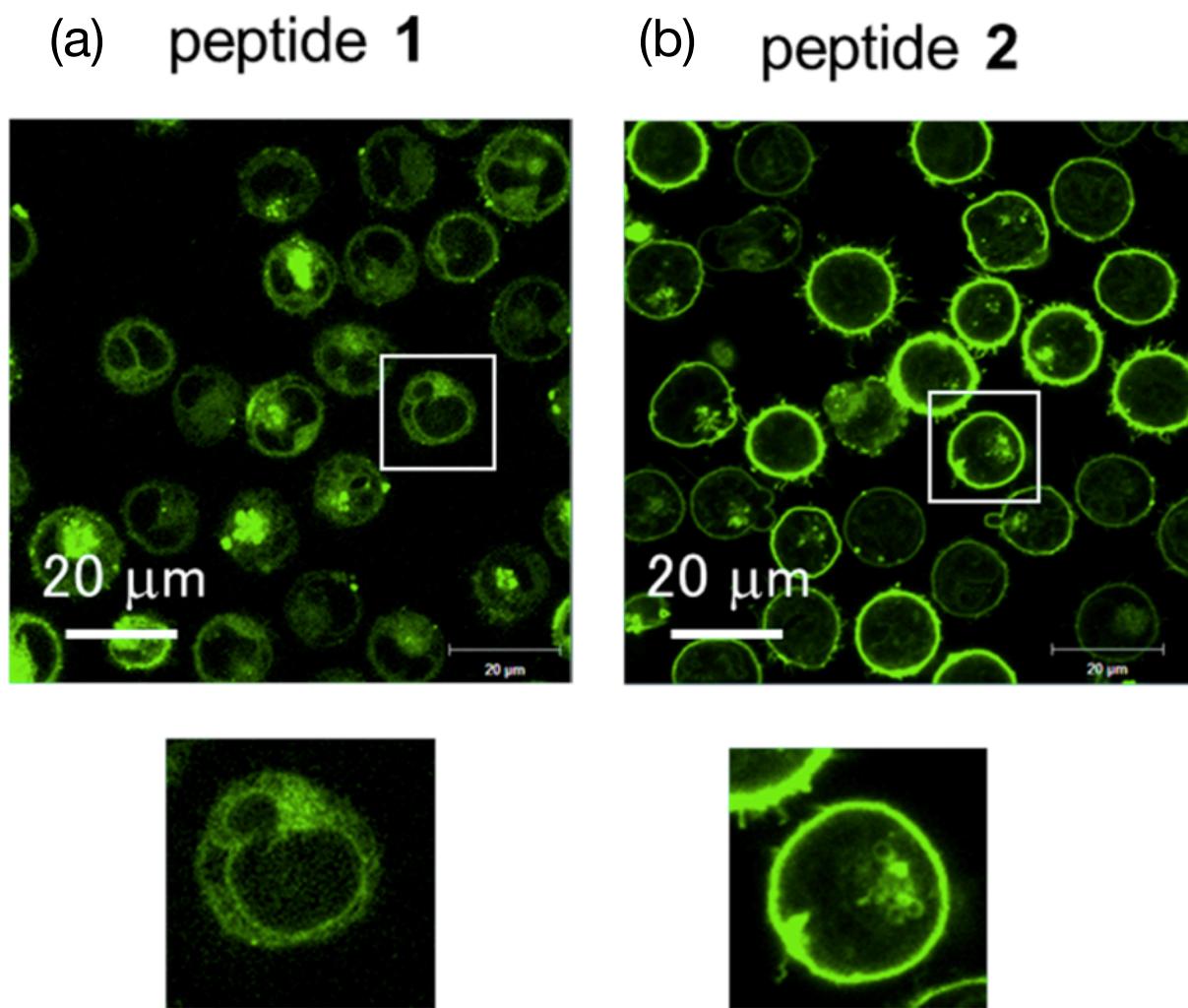


Figure 3-7. ペプチド修飾後の K562 細胞の CLSM 観察画像（下図は上図中の白枠内を拡大したもの）(a) 1、(b) 2 をそれぞれ修飾した細胞

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.3.4 ペプチドの細胞内局在

**1** が膜透過能をもつことがわかったため、**1** が膜透過後に細胞内のどこに局在するかを市販の各オルガネラの蛍光標識試薬を用いて精査した。その結果 **1** は、エンドソームおよびリソソームのマーカーである Lysotracker Red よりもむしろミトコンドリアのマーカーである MitoTracker Red とよく共局在した (Figure 3-8)。共局在率を計算すると、**1** とエンドソームおよびリソソームについては 32%、ミトコンドリアについては 72% であった。**1** がミトコンドリアにより局在した理由として、ミトコンドリアの内膜も形質膜同様に負の膜電位を有するためと考えられる<sup>22</sup>。この結果は、膜電位由来のクーロン力を介したペプチドの膜透過を支持する結果である。我々と同様に分子がミトコンドリアへ蓄積するという報告が、本ペプチドの設計戦略と似た戦略を取る研究グループから報告されている<sup>8,19</sup>。これらの研究から、**1** および **2** の膜透過能の違いは、それらの相対的な疎水性の違いに起因しているといえる。つまり、**2** が有するパルミトイル基は、疎水基として細胞膜を透過するのに適した疎水性ではないと考えられる。

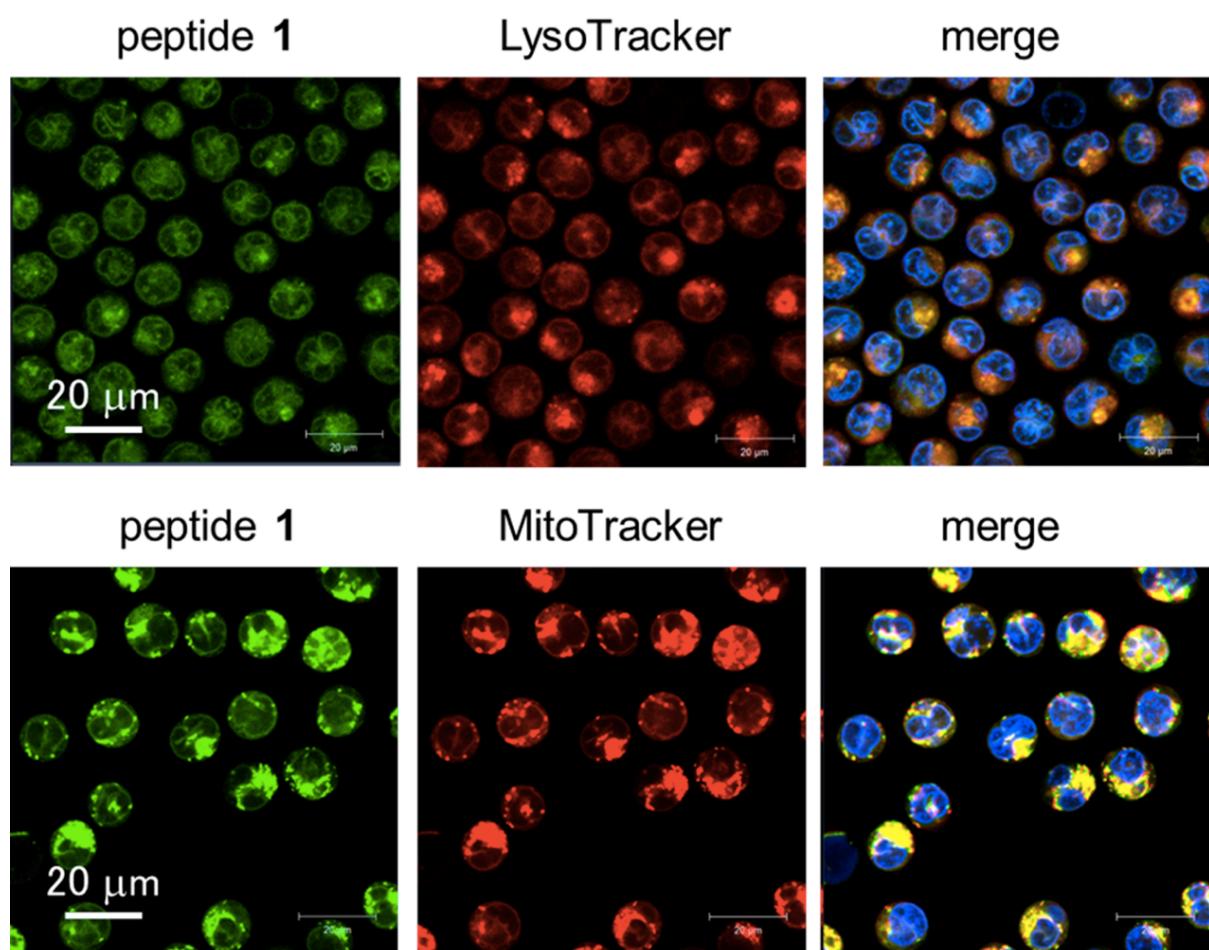
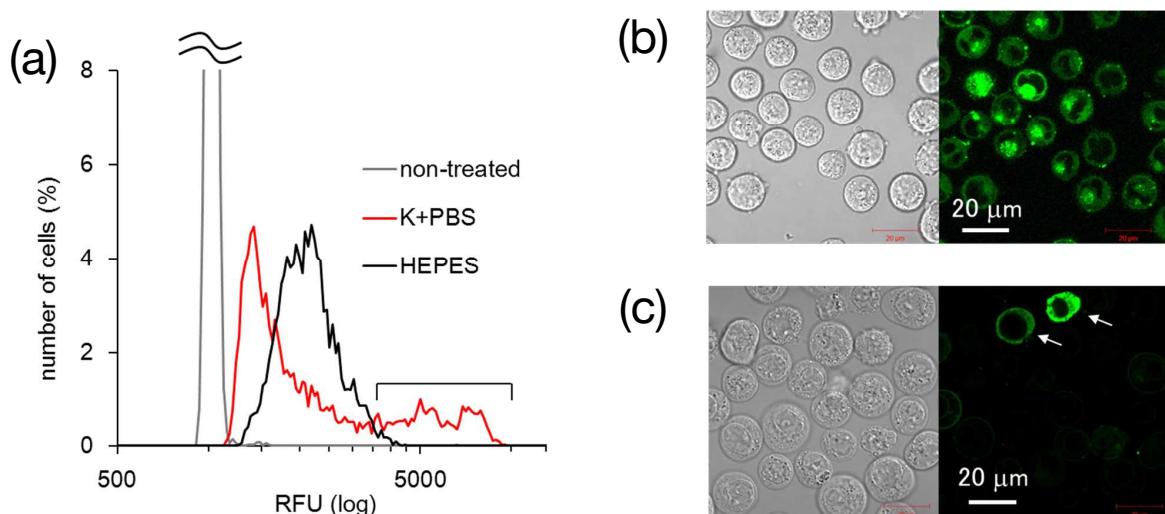


Figure 3-8. **1** の細胞内での局在評価 (上) リソソーム、(下) ミトコンドリア

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.3.5 膜電位阻害条件下でのペプチドの細胞内局在の変化

**1** が膜を透過する要素として膜電位の重要性が示唆されたため、次に膜電位を阻害した条件下でペプチドを細胞に修飾して、その挙動を評価した。本実験では、膜電位を阻害するため **1** の修飾を  $10\text{ mM}$  HEPES (pH7.4) 含有  $300\text{ mM}$  マンニトール等張液中から  $\text{K}^+\text{PBS}$  中へ変更して行った。 $\text{K}^+\text{PBS}$  とは、リン酸緩衝生理食塩水中の  $\text{Na}^+$ を  $\text{K}^+$ に置換したものである。膜電位を阻害した結果、細胞上に修飾された **1** の量がマンニトール等張液と比較して減少した (Figure 3-9(a))。このことから、**1** が膜電位由来のクーロン力により膜を透過していることが示唆された。一方、CLSM 画像から  $\text{K}^+\text{PBS}$  中で培養した細胞はその形態が一部変化しており、また強い蛍光を発する死細胞のような細胞が確認された (Figure 3-9(b), (c))。そのため、膜電位を阻害しての実験には慎重な検討が必要と考えられる。

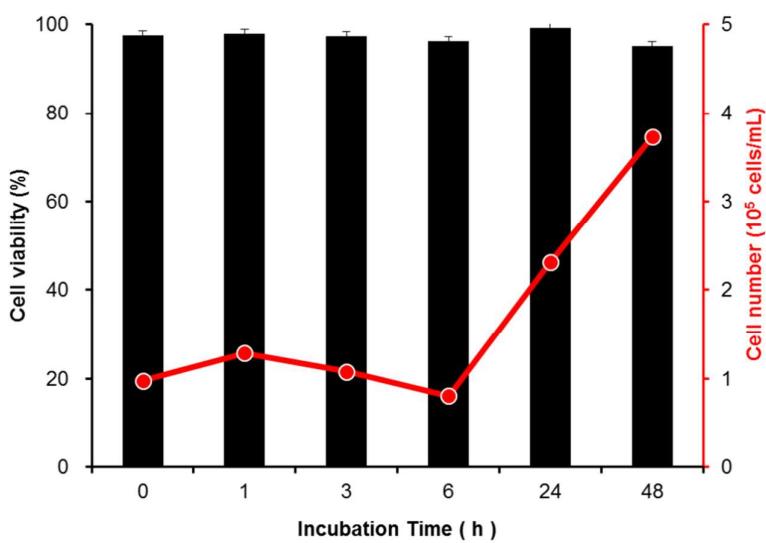


**Figure 3-9.** 膜電位阻害条件下での **1** による細胞修飾 (a) イメージングサイトメトリーの結果、(b) 膜電位非阻害条件下でのペプチド修飾細胞、(c) 膜電位阻害条件下でのペプチド修飾細胞 (矢印: 死細胞)

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.3.6 ペプチド濃度に依存した細胞生存率への影響

**1** が膜を透過し、ミトコンドリアへ集積することが明らかになったことで、その細胞毒性が懸念された。そこで、**1** の K562 細胞に対する細胞毒性を調べたところ、 $2\text{ }\mu\text{M}$  の濃度で **1** が修飾された細胞は、48 時間培養後も目立った細胞死を示さなかった (Figure 3-10)。また  $2\text{ mM}$  の **CD** は、細胞生存率に対して悪影響を及ぼさなかった。以上のことから、**1** は TM の膜透過部として使用可能であることが示された。

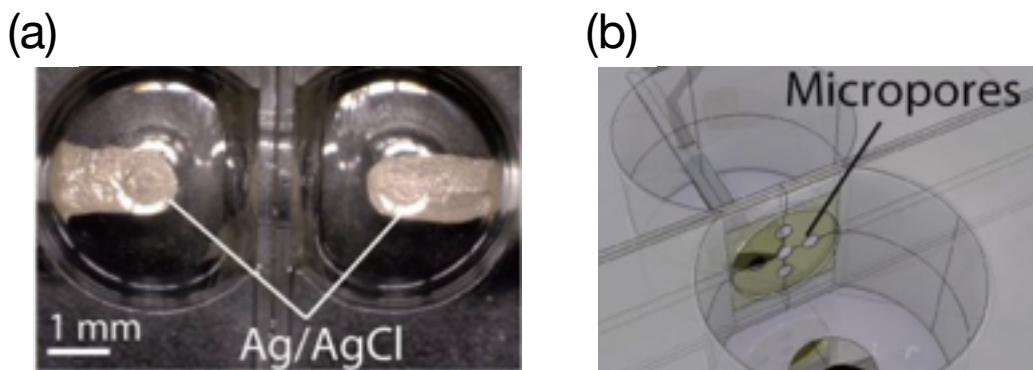


**Figure 3-10.** 1 修飾細胞の各培養時間後の細胞生存率（黒）および細胞数（赤）

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.3.7 人工脂質二重膜を使用したペプチドの膜透過能の評価

1 が細胞膜を透過する要素として膜電位由来のクーロン力の関与が示されたため、より詳細な膜透過のメカニズムについて評価を行った。具体的には、1 の膜の透過過程を平面脂質二重膜（pBLM）上で分析することで、どのようにして膜を透過しているかを調べた。本研究遂行にあたり、当研究室では pBLM の作製や分析が困難であったため、全ての測定は東京農工大学の川野研究室にて行った。また、実験で使用したデバイスおよび実験方法は全て川野グループで確立、報告されたものを使用した<sup>16,17</sup>。デバイスは、二つのウェルとそのウェルを繋ぐ細孔（半径 50  $\mu$ m）から成り、ウェルの底面には、Ag/AgCl 電極が設置されている物を使用した（Figure 3-11）<sup>16</sup>。測定は、電圧印加条件でペプチドが膜を透過する際に発生するカリウムイオンの移動を電流として検出した。



**Figure 3-11.** (a) 二つのウェルと電極の写真、(b) デバイスの模式図<sup>16</sup>

分析の結果、CD (5 mM) 存在下での **1** (5  $\mu$ M) は、+ 180 mV の電圧を印加することで、デバイス上で主にスパイク状のシグナルを示した (Figure 3-12(a))。川野らのシグナルの分類<sup>17</sup>から、このシグナルは瞬間的に膜が欠損した場合に発生し、この現象は **1** が膜を直接透過したことを示す。ここで重要な点は、印加電圧が+ 100 mV の条件では電流信号が観測されなかつたことである (Figure 3-12(b))。これは、**1** が脂質二重層を直接貫通するためには十分な膜電位、つまり十分なクーロン力が必要であることを示し、本研究の仮説を証明するものである。また、**2** について同様の実験を行った結果、+ 180 mV の電圧を印加してもシグナルは確認されなかつた (Figure 3-12(c))。このことから、**2** はやはり膜透過能に乏しく、**1** が膜透過部として優れていることが本実験からも示された。以上の結果と細胞膜上での **1** の挙動を合わせると、**1** が細胞膜から内部へと移行するメカニズムとして考えられるのは、クーロン力による直接的な膜の貫通である。**1** が膜を直接透過するというメカニズムは、本研究で目的とする膜貫通状態での膜修飾の達成に必須であるため、**1** は TM の膜透過部として適していると結論付けることができる。

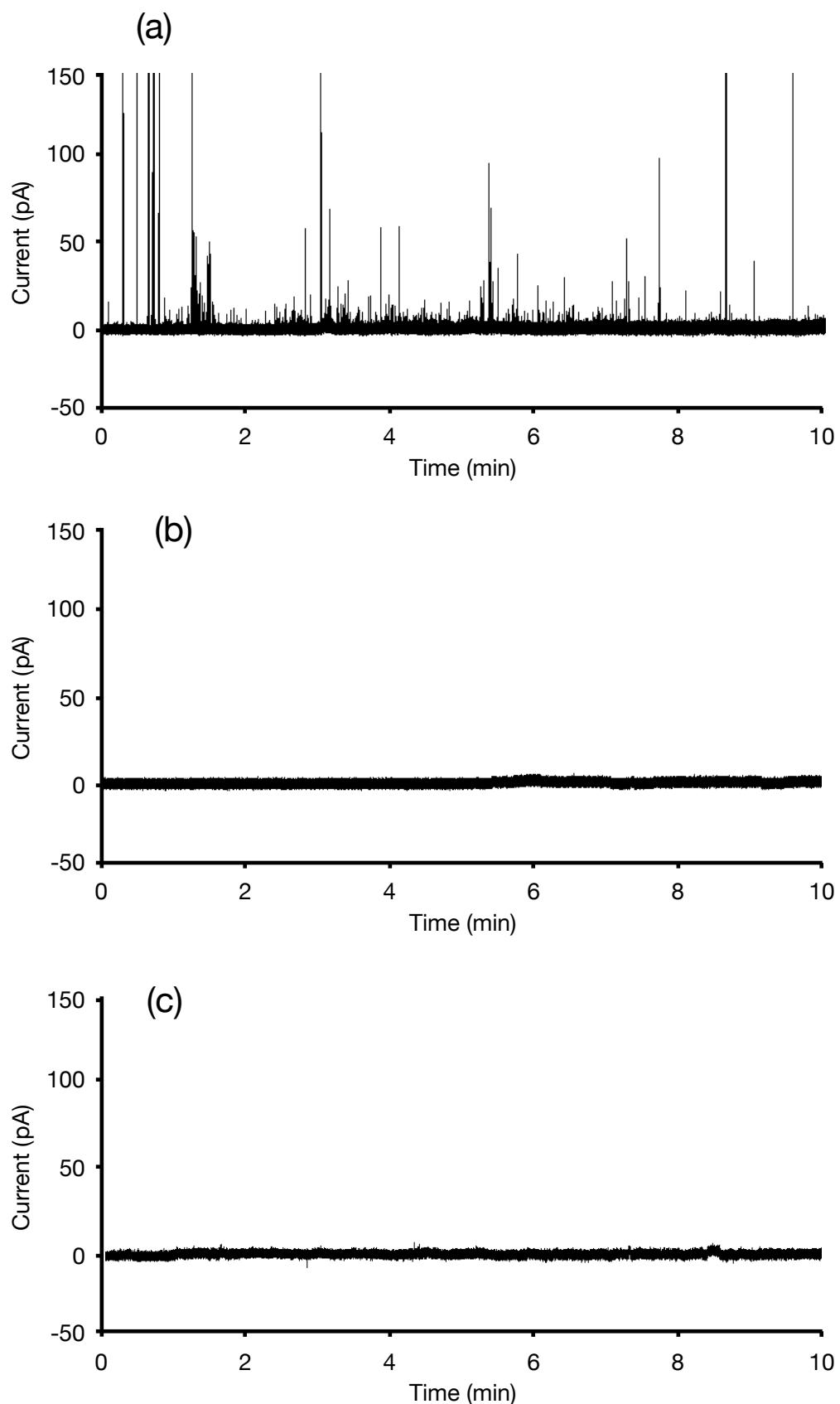


Figure 3-12. (a)～(c) 各ペプチドを添加した人工膜上での電流の観測 ((a) **1** : 5  $\mu$ M, 電圧 : + 180 mV、(b) **1** : 5  $\mu$ M, 電圧 : + 100 mV、(c) **2** : 5  $\mu$ M, 電圧 : + 180 mV)

### 3.3.8 膜貫通分子の細胞表面におけるレセプター/リガンド認識

合成した **3** の細胞上での挙動を評価するために、Figure 3-13(a) に示す異なる二つの手順で実験を行った。具体的には、K562 細胞を **3** で修飾した後に細胞に直ちに SA を添加するか (Figure 3-13(a), procedure 1)、または 37°C で 3 時間培養した後に SA を添加した (Figure 3-13(a), procedure 2)。procedure 1 では、**3** および SA の蛍光は細胞膜上で共局在したため、細胞膜上に **3** が修飾され SA がビオチンを認識したことを示している (Figure 3-13(b) i)。また、一部の SA は細胞質内の核に隣接した部分に局在することがわかった。これは **3-SA** 複合体がエンドサイトーシスにより取り込まれ、微小管形成中心 (MTOC) に蓄積した結果と予想される<sup>23</sup>。実際にエンドソームおよびリソソームをマーカーによって染色した結果、**3-SA** 複合体が細胞質内でマーカーと共に局在したため、複合体のエンドサイトーシスによる取り込みが確認された (Figure 3-14)。一方、細胞質から観察された **3** の蛍光の一部は、MTOC 上で SA と共に局在しなかった。この結果は、6EG の親水性に関わらず **3** の一部が SA による認識の前に膜を透過して細胞質内に移行したことを示唆している。Figure 3-13(b) ii は、Figure 3-13(b) i に示される細胞から 5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37°C で 3 時間培養後の結果である。3 時間の培養後でも細胞膜上から **3-SA** 複合体由来の強い蛍光が確認できた。この結果は、**3-SA** 複合体が SA の親水性およびその大きなサイズ (長軸方向の長さ : 6.8 nm) が原因で、もはや細胞膜を透過できないことを明らかにしている<sup>23,24</sup>。対照的に procedure 2 の場合は、procedure 1 で観察されるよりはるかに **3-SA** 複合体由来の蛍光が弱くなった (Figure 3-13(b) iii)。この結果から、3 時間の培養中に膜上の **3** が細胞質移行し細胞膜から消失したことで、SA の認識が起こらなかったことが示唆された。イメージングサイトメトリーによる結果からも、Figure 3-13(a) 中 (iii) の細胞の SA 由来の蛍光強度が (ii) の細胞よりもはるかに弱いことが示された (Figure 3-13(c))。

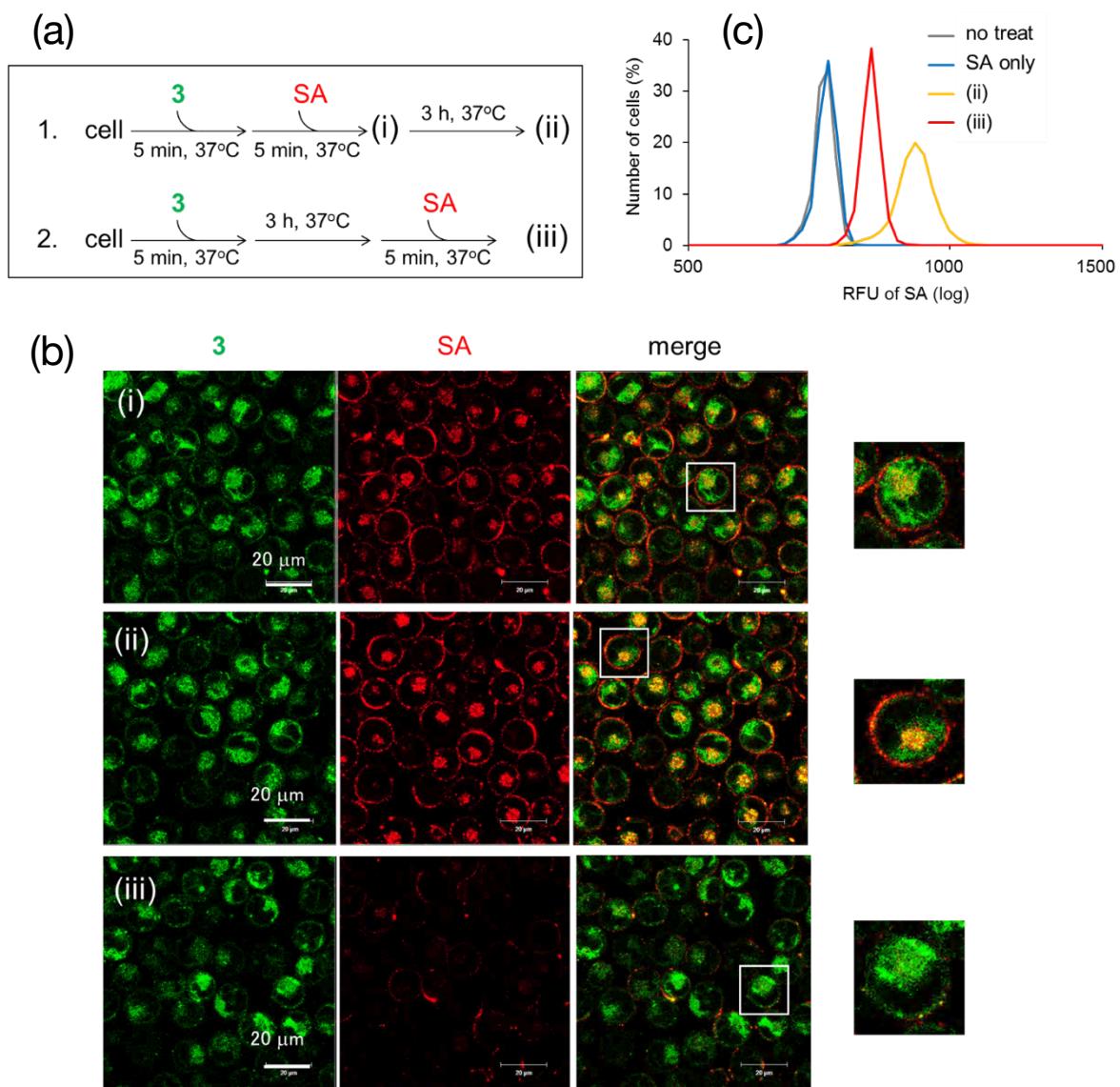
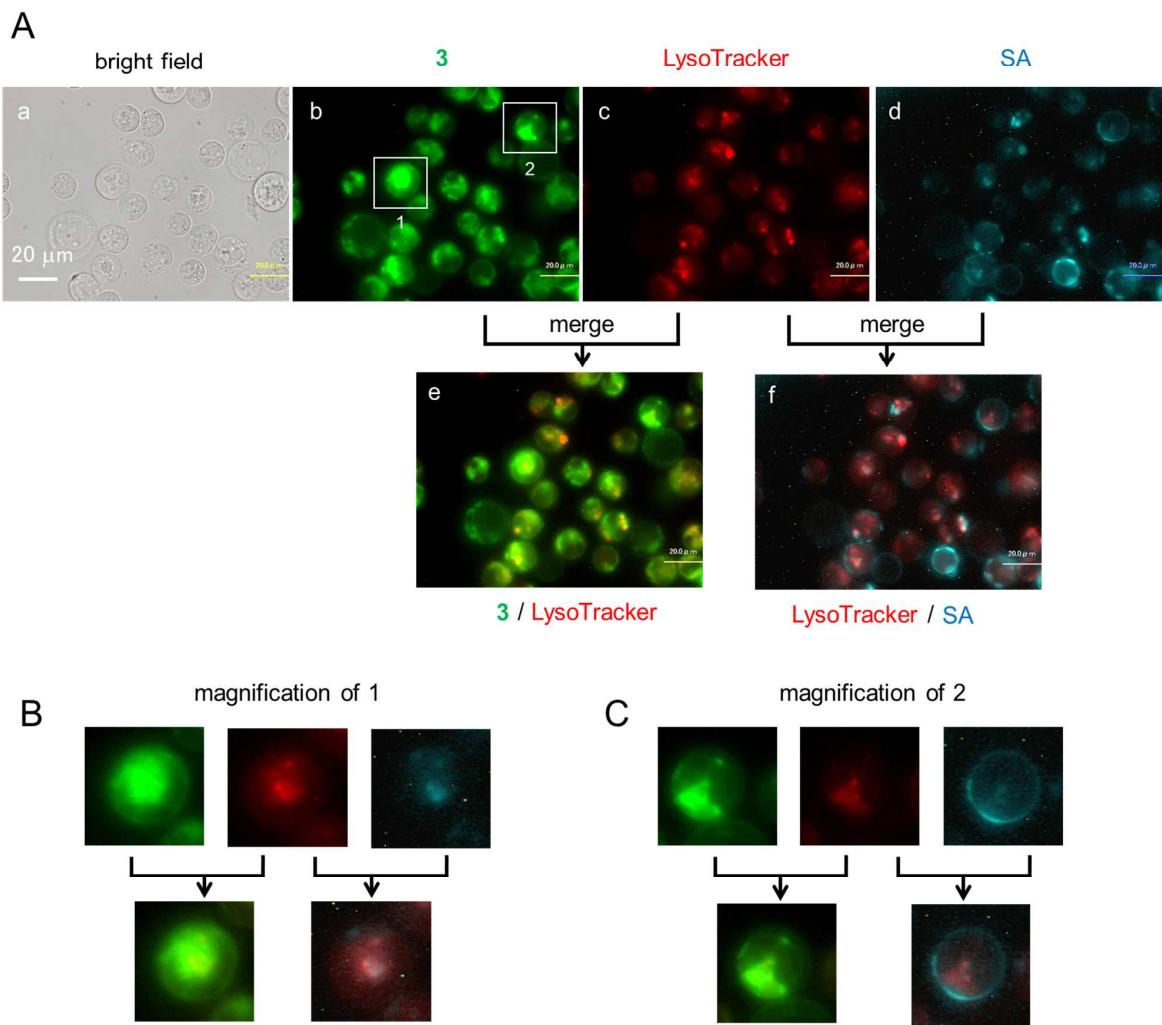


Figure 3-13. (a) 実験スキーム、(b) 各条件で細胞に修飾された **3** および Cy3 SA の蛍光画像  
(右端の画像は merge 画像中の白枠の拡大図) (i, ii, iii はそれぞれ(a)中の各条件の細胞) (c) イメージングサイトメトリーの結果

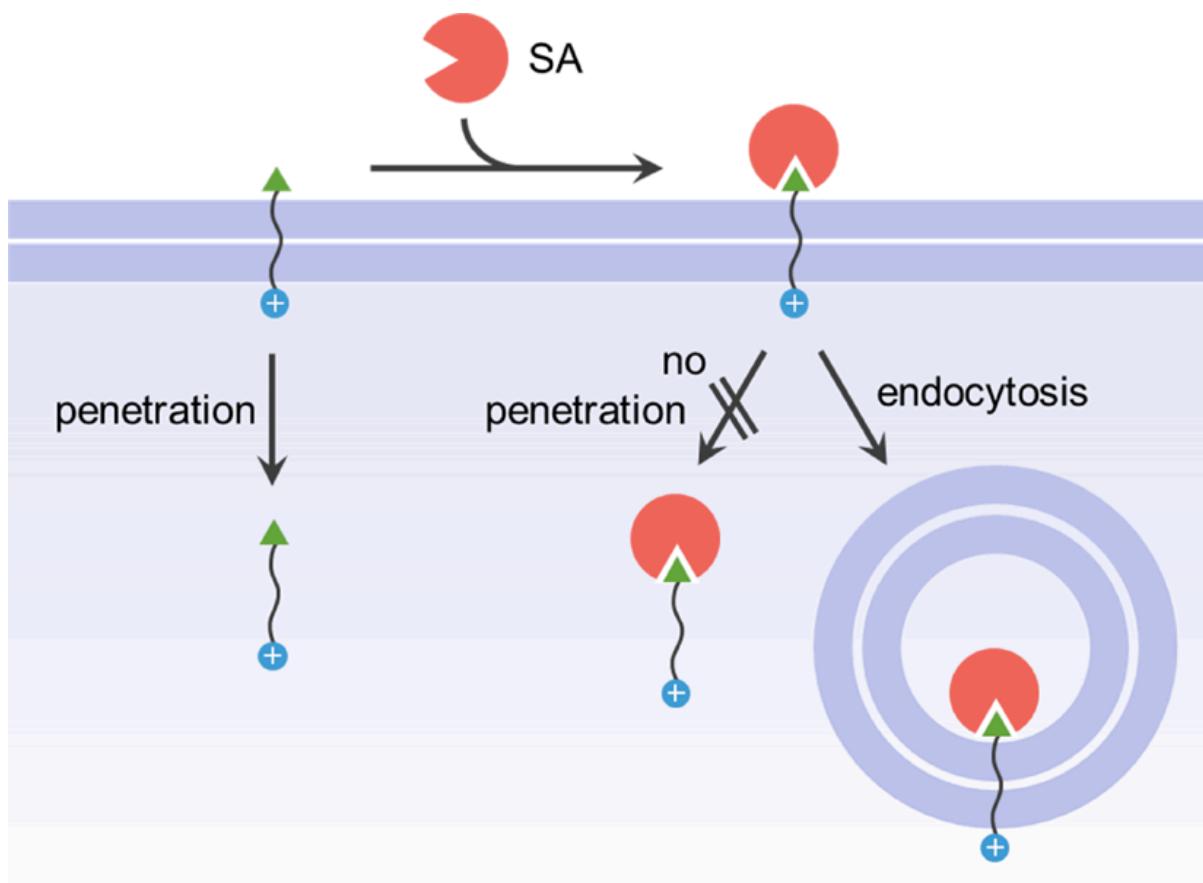
Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.



**Figure 3-14. 3-SA のリソソームとの局在画像 (下図は上図中白枠の拡大図)**

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

本実験で得られた結果から考察される **3** の細胞膜上での挙動を **Figure 3-15** にまとめた。実験の結果から、膜透過部が膜内葉表面に達した後、ペプチドにクーロン力が働くかなくても **3** は細胞膜を透過して細胞質に移行した。この説明として、膜内葉表面に存在する **3** を疎水性相互作用を介して膜から引き抜く細胞質内タンパク質の存在が示唆される。一方、ペプチドの添加直後に SA を添加した場合は、**3** に結合した SA の親水性およびサイズが寄与して **3** の完全な膜透過を抑制した。そして **3-SA** 複合体は直接の膜透過ではなく、エンドサイトーシスによる取り込みによって膜上から細胞内へ移行した。これらをまとめると、**3** はそれ自体では膜を完全に透過し細胞質へ移行してしまうが、SA の存在により完全な膜透過が抑制され、膜上で膜透過部のみが膜を透過した膜貫通状態で膜上に存在することが期待される。



**Figure 3-15.** 推測される **3** の細胞膜上での挙動

Reprinted with permission from *Bioconjugate chem.*, 2017, 28, 296. Copyright 2017 American Chemical Society.

### 3.4 結語

本章では、膜貫通状態での膜修飾が可能な TM の開発と膜貫通状態を達成する修飾法の開発を目指した。その結果 TM の膜透過部として機能する、クーロン力により膜を透過するカチオン性 peptide **1** の開発および機能評価に成功した。さらに、このペプチドに 3 つの 6EG を介してビオチンを修飾した TM **3** は、それ単体では親水性のオリゴエチレングリコールを有するにもかかわらず短時間で細胞膜を透過し細胞質へ移行した。しかし、SA が結合した場合には、その大きさと親水性から、細胞膜の完全な透過が抑制された。その結果として、TM の膜透過部のみが膜を透過し膜貫通状態で **3-SA** 複合体が膜上に存在することが示唆された。この TM を応用することで、TM の細胞外ドメインのリガンド認識に対応したシグナル伝達の人工的な誘導が達成される可能性がある。このような応用を見据えた場合に、細胞内に提示する分子としては、比較的小さなアゴニストまたはアンタゴニスト分子が膜透過ドメインの機能を妨げない良い候補になると考えられる。

### 3.5 参考文献

1. W. N. Zgotta, *Nature*, **2006**, *440*, 427.
2. D. Wootten, A. Christopoulos, M. M. Solano, M. M. Babu, P. M. Sexton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2018**, *19*, 638.
3. L. C. Wyatt, J. S. Lewis, O. A. Andreev, Y. K. Reshetnyak, D. M. Engelman, *Trends Biotechnol.*, **2017**, *35*, 653.
4. O. A. Andreev, A. G. Karabadzhak, D. Weerakkody, G. O. Andreev, D. M. Engelman, Y. K. Reshetnyak, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **2010**, *107*, 4081.
5. L. V. Johnson, M. L. Walsh, L. B. Chen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **1980**, *77*, 990.
6. J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray, P. A. Wender, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*, 9506.
7. S. O. Kelly, *Chem. Biol.*, **2008**, *15*, 375.
8. J. Kuriakose, V. Hernandez-Gordillo, M. Nepal, A. Brezden, V. Pozzi, M. N. Seleem, J. Chmielewski, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 9664.
9. S. Lin, W. S. Struve, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, *54*, 361.
10. M. V. Rekharsky, Y. Inoue, *Chem. Rev.*, **1998**, *98*, 1875.
11. X. Tan, S. Lindenbaum, *Int. J. Pharm.*, **1991**, *74*, 127.
12. Y. Yu, C. Chipot, W. Cai, X. Shao, *J. Phys. Chem. B*, **2006**, *110*, 6372.
13. M. Koivusalo, M. Jansen, P. Somerharju, E. Ikonen, *Mol. Biol. Cell*, **2007**, *18*, 5113.
14. L. X. Song, H. M. Wang, X. Q. Guo, L. Bai, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 8305.
15. M. Matsuda, W. Hatanaka, M. Takeo, C. W. Kim, T. Niidome, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, *Bioconjugate Chem.*, **2014**, *25*, 2134.
16. R. Kawano, Y. Tsuji, K. Sato, T. Osaki, K. Kamiya, M. Hirano, T. Ide, N. Miki, S. Takeuchi, *Scientific Reports*, **2013**, *3*, 1995.
17. Y. Sekiya, S. Sakashita, K. Shimizu, K. Usui, R. Kawano, *Analyst*, **2018**, *143*, 3540.
18. S. Futaki, *Biopolymers (Peptide Science)*, **2006**, *84*, 241.
19. L. Li, I. Geisler, J. Chmielewski, J. X. Cheng, *J. Control. Release*, **2010**, *142*, 259.
20. H. N. Prajapati, D. M. Dalrymple, A. T. M. Serajuddin, *Pharm. Res.*, **2012**, *29*, 285.
21. K. Mitra, I. Ubarretxena-Belandia, T. Taguchi, G. Warren, D. M. Engelman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2004**, *101*, 4083.
22. L. B. Chen, *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1988**, *4*, 155.
23. K. Tobinaga, C. Li, M. Takeo, M. Matsuda, H. Nagai, T. Niidome, T. Yamamoto, A. Kishimura, T. Mori, Y. Katayama, *J. Control. Release*, **2014**, *177*, 27.
24. P. C. Weber, D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, F. R. Salemme, *Science*, **1989**, *243*, 85.

## 第四章

### 内葉上に分子提示する膜貫通分子のクリック反応による合成とその機能評価

#### 4.1 緒言

三章で疎水性かつカチオン性のペプチド型膜アンカーを膜透過部としてもつ TM が細胞膜上で膜貫通状態を達成している可能性を見出した。しかし、TM が膜を貫通した状態で膜に修飾されていることを直接証明することはできていなかった。そこで本章では、TM が膜貫通を達成していることを証明するべく、細胞内葉上に分子を提示可能な新規 TM の合成およびその評価を行った。また、新規 TM が膜貫通状態で分子を膜内葉上に提示できれば、膜貫通タンパク質の機能模倣に向けた新たな知見の獲得につながる。新たな TM を合成するにあたって、これまで用いてきた Fmoc 固相合成法のみによる合成では、より複雑な構造を持つ分子を効率よく合成することが困難であると予想された。事実、三章の TM の合成収率は十分と言えず、その理由として嵩高い LCA のペプチド側鎖への導入および長いオリゴエチレングリコールドメインの主鎖への導入が挙げられる。そこで私は、既報の TM を新たに膜貫通ドメインと膜透過ドメインに二分しそれぞれを樹脂状上で合成し回収、銅を触媒として使用するアジド-アルキン 1,3-双極子付加環化反応、通称クリック反応により組み合わせる方法を採用した。本戦略により、合成収率の向上およびより複雑な構造を持つ TM の合成が可能になると期待できる。

#### 4.1.1 クリック反応を用いた複雑な分子の合成

クリック反応とは、1963 年に Huisgen らが報告したアジドとアルキンの加熱によるトリアゾール環形成反応<sup>1</sup>を、2002 年に Sharpless らが銅触媒存在下で行うことで室温中でも 100 万倍速く選択的に環化反応が進行するという報告<sup>2</sup>により発展させ、命名した反応である。クリック反応は、簡便さと汎用性の高さから、ペプチドを基体とした複雑な分子の合成に利用してきた。Danishefsky らは、ペプチドの複数の Lys 側鎖にアルキンを導入し、アジド修飾した嵩高い多糖をクリック反応によりペプチドに修飾し、複雑な分子の合成を達成している<sup>3</sup>。また Li らは、Danishefsky らと同じくペプチド性のワクチンの合成にクリック反応を利用した (Figure 4-1)<sup>4</sup>。彼女らは、20 残基以上のオリゴペプチドの主鎖末端にアジドを、疎水基を有するリポペプチドの主鎖末端にアルキンを修飾した二つのペプチドクリック反応により二つの分子にした。また、二つおよび四つのオリゴペプチドをクリック反応により複数のアルキンを持つリポペプチドに導入し、さらに複雑な分子の合成を達成している。これらの報告からクリック反応を利用することで、TM の課題であった嵩高く、長いペプチ

ドの合成による収率の低下を克服できると期待される。

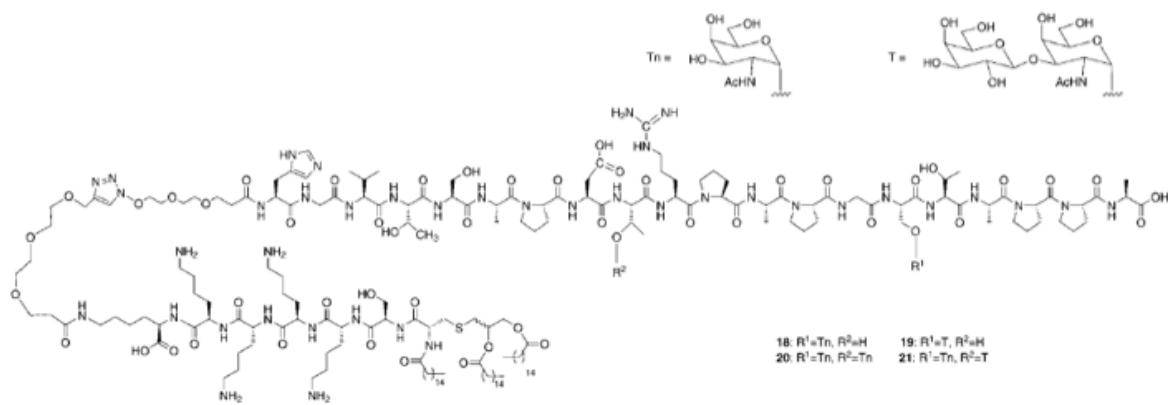


Figure 4-1. Li らが報告したペプチド<sup>4</sup>

Reprinted with permission from *Angew. Chem. Eur. J.*, 2011, 17, 6396. Copyright 2011 John Wiley & Sons, Inc.

#### 4.1.2 本研究の目的および戦略

本研究では、既報 TM の知見を活かして細胞膜の内外に分子を提示する TM を合成し、細胞膜上での膜貫通状態の達成を証明することを目的とした。既報の TM を発展させ細胞膜内葉上にも分子を提示できるような新規 TM は、複雑な分子構造から従来の Fmoc 固相合成法だけでは合成が厳しいと予想された。そこで、TM の合成戦略として固相合成法とクリック反応を組み合わせることにした。また、今回目的とするような TM は今までに報告がないため、膜内葉上にどのような分子を提示可能か予想できなかった。そこで、これまでに膜内葉上に分子を提示する研究として報告されている Gunning らや Tsukiji らの分子<sup>5,6</sup>を参考にすることとした。幸い、Tsukiji らとの共同研究により、eDHFR の細胞内局在を変化させた実績のある TMP を使用できることになったため、TMP を膜内葉上に提示するリガンドとして採用した。この TMP を膜透過ドメインに修飾した新規 TM を固相合成法およびクリック反応により合成した後、三章で確立した修飾方法によって細胞膜に導入し、細胞質に存在する eDHFR を膜内葉上に局在させることができるかどうか評価した。予想される新規 TM の細胞膜内葉上への TMP 提示までの過程を Figure 4-2 に示す。TM を細胞に添加すると膜透過ドメインが疎水性相互作用により膜へ水相から移行し、膜電位由来のクーロン力を受け細胞膜を透過、膜内葉上に到達する。この時、SA が存在することで TM の完全な膜透過が抑制、膜貫通状態で膜に修飾され、膜内葉上に TMP が提示される。膜内葉上の TMP を eDHFR が認識しその局在を変えることを観察することで膜貫通状態の証明を試みた。

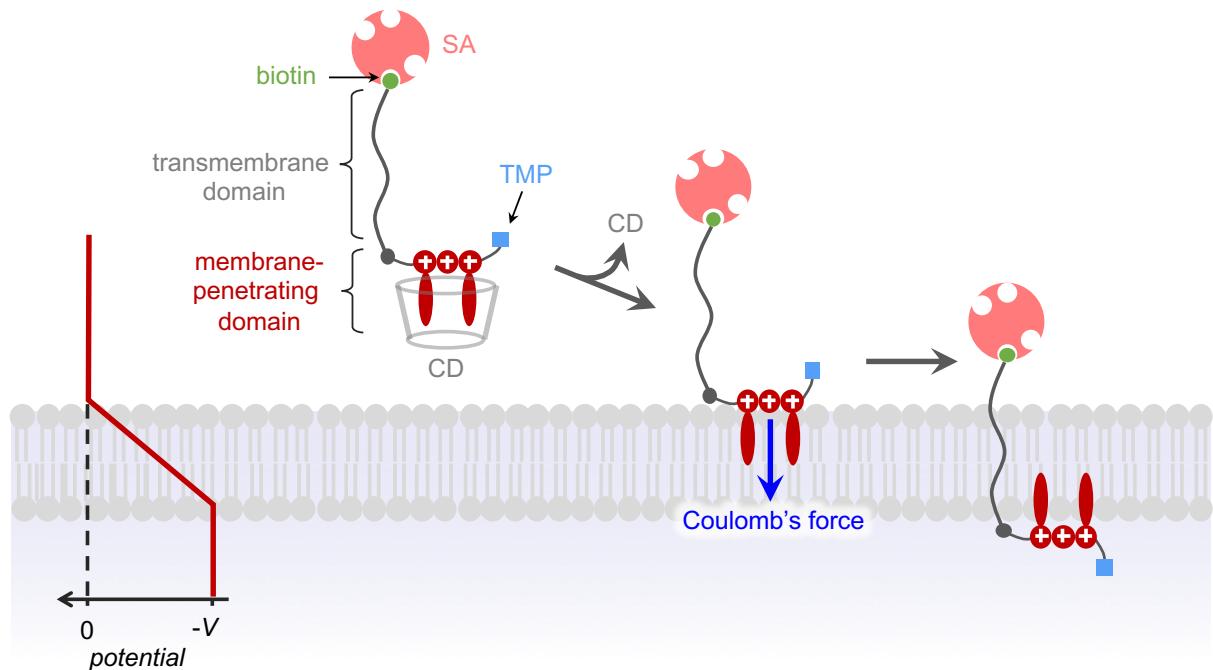


Figure 4-2. 予想される新規 TM の細胞膜内葉上への TMP 提示までの過程

## 4.2 実験

### 4.2.1 試薬

以下に本研究で使用した試薬を記す。

NovaSyn TGR resin、all Fmoc-protected l-amino acids および d-amino acids は Novabiochem (Darmstadt, Germany) から購入した。2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium hexafluorophosphate (HBTU)、N-hydroxybenzotriazole (HOBr)、piperidine、trifluoroacetic acid (TFA)、N,N'-diisopropylethylamine (DIEA)、N-methylpyrrolidone (NMP) および Fmoc-N-ε-Palmitoyl-L-lysine は Watanabe Chemical (Hiroshima, Japan) から購入した。HPLC grade acetonitrile は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から購入した。N,N-dimethylformamide (DMF)、diethyl ether used for peptide synthesis および tetrahydrofuran (THF) dehydrated stabilizer free は Kanto Chemical (Tokyo, Japan) から購入した。Dimethyl sulfoxide (DMSO) for biochemistry、for organic synthesis、N-hydroxysuccinimide (NHS)、copper(I) iodide、triethylamine (Et<sub>3</sub>N) および sodium dodecyl sulfate for biochemistry は FUJIFILM Wako Pure Chemicals (Osaka, Japan) から購入した。Triisopropylsilane、azido acid、4-Pentylic acid、N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC) および Tris [(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] amine (TBTA) は Tokyo Chemical Industry (Tokyo, Japan) から購入した。Hoechst 33342、MitoTracker Red CMXRos および Lysotracker Red DND-99 は Life Technologies (Grand Island, NY, USA) から購入した。D-Mannitol、fetal calf serum (FCS)、lithocholic acid (LCA) および methyl-β-cyclodextrin (CD) は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) から購入した。FluoroLinkCy3-labeled streptavidin (Cy3-SA) は Amersham Biosciences (Pittsburgh, PA, USA) から購入した。4-Fluoro-7-nitrobenzofuran (NBD-F) は Dojindo (Kumamoto, Japan) から購入した。Fmoc-N-amido-dPEG6 acid は Quanta BioDesign (San Diego, CA, USA) から購入した。Fmoc-11-Amino-3,6,9-Trioxaundecanoic Acid (miniPEG) は Peptides International, Inc. (Louisville, KY, USA) から購入した。Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 および Opti-MEM<sup>®</sup> Reduced Serum Media は Thermo Fisher Scientific K.K. (Tokyo, Japan) から購入した。

### 4.2.2 クリック反応用分子の合成

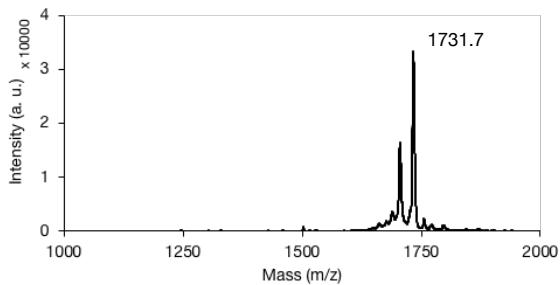
クリック反応に使用する **3**、**3'**、**5** および **5'** は、すべて Fmoc 固相合成法に基づき対応する Fmoc アミノ酸を用いて NovaSyn<sup>®</sup>TGR 樹脂上で 0.025 mmol スケールにおいて行った。**3** および **3'** は、膜貫通部である 6EG を有しており (**3** : 6EG × 3、**3'** : 6EG × 4)、その両末端に L-Lys を介して biotin および NBD を修飾した。さらに、本ペプチドの N 末端には脱 Fmoc 後ペニン酸を縮合させることでクリック反応の反応点となるアルキンを修飾した。

**5** および **5'** は、膜透過部として膜電位感受性の Arg を三残基、後に疎水基である LCA を導入するために側鎖未修飾の Lys を二残基有していた。また、両ペプチドともに主鎖の N 末端に miniPEG を介してアジド酢酸を縮合させることでクリック反応の反応点となるアジドを修飾した。**5'** に修飾した TMP は、名古屋工業大学築地研究室からご提供頂いた TMP-COOH を用いて導入された。なお、**5'** の合成には、細胞内に存在する加水分解酵素等によるペプチドの分解を防ぐため、L-Arg, Lys に代わり D-Arg, Lys を使用した。脱樹脂は、各樹脂に TFA/TIS/H<sub>2</sub>O (95/2.5/2.5 (v/v)) の混合溶液 (1 mL) を加え室温で 1 時間攪拌させて、ろ液を回収する操作を三回繰り返すことで行った。脱樹脂後、回収した各ろ液を 40 mL の cold Et<sub>2</sub>O と混合し再沈殿させた。次いで、混合溶液を 4 °C、10 min、3,500 × g で遠心することでペレット状の粗ペプチドを得た。各ペプチドの精製を、逆相高速液体クロマトグラフ (HPLC) (Hitachi LaChrom Elite, Tokyo, Japan) を用いて、Atlantis dc18 OBD カラム (Nihon Waters K.K., Tokyo, Japan) 上で行った。**3** および **3'** は、eluent A/eluent B = 75/25 から 60/40 へ 15 分かけて流出させた (eluent A: H<sub>2</sub>O + 0.1% TFA, eluent B: CH<sub>3</sub>CN + 0.1% TFA)。**5** および **5'** は、eluent A/eluent B = 100/0 から 50/50 へ 50 分かけて流出させた。目的物の確認はマトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF-MS) (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA) (Figure 4-3) を用いて行った。精製した **3** および **3'** は、DMSO を用いて 100 mM の濃度に調製し、4 °C にて保存した。濃度決定は、DMSO 中で 478 nm における NBD の吸光度 (モル吸光係数 = 33186 /M/cm) を用いて行った<sup>7</sup>。

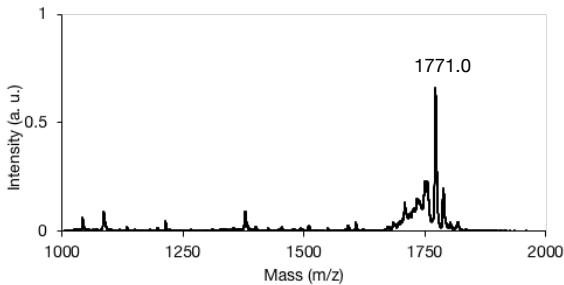
合成・精製した **5** および **5'** を使用して、クリック反応に使用する **2** および **2'** の合成を行った。本合成では、疎水性分子である LCA を活性エステル化してペプチド上の Lys 側鎖のアミノ基と反応させることで疎水基をペプチドに導入した<sup>8</sup>。具体的には、LCA を活性エステル化するために LCA (226 mg, 600 μmol)、NHS (76 mg, 660 μmol) および 4.7 mL の無水 THF を混合した。この溶液を DCC (136 mg, 660 μmol) に添加し窒素雰囲気下、室温で 4 時間攪拌した。その後、ろ過して生成した LCA の活性エステル体 **4** から不溶性の尿素を除去した。次に Et<sub>3</sub>N (200 μmol, 16eq)、50 μL の **5** および **5'** の DMSO 溶液 (12.5 μmol、最終濃度: 12.5 mM) の混合液それぞれに回収した **4** の THF 溶液 (785 μL, 100 μmol, 8eq) を滴下し窒素雰囲気下、室温で一晩反応させた。その後、反応液に 1 M HCl 水溶液を加えて中和した。得られた **2** および **2'** の精製を逆相 HPLC 上で CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA (35%~60% v/v) を移動相として Protein R カラム (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を使用して行った。目的物の確認は MALDI-TOF-MS を用いて行った (Figure 4-3)。精製した **2** および **2'** は、その重量から収量を確認し、DMSO を用いて 100 mM の濃度に調製し、4 °C にて保存した。

**MALDI-TOF spectrum of 2**

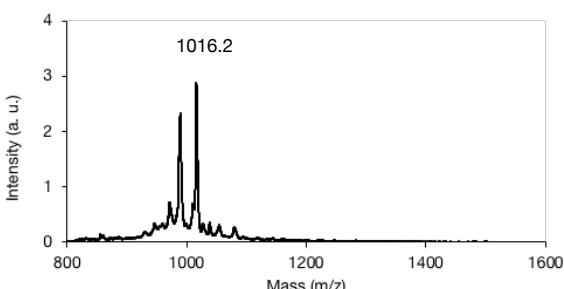
MALDI-TOF matrix: 2,5-dihydroxybenzoic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1730.2, Found 1731.7

**MALDI-TOF spectrum of 3**

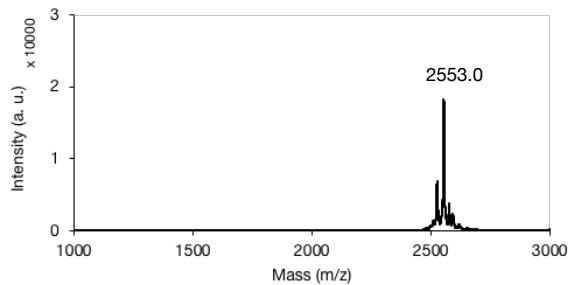
MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+Na]^+$  1770.9, Found 1771.0

**MALDI-TOF spectrum of 5**

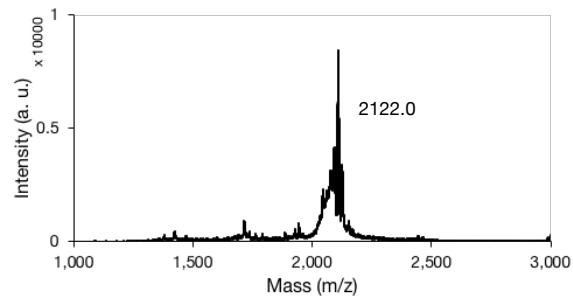
MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1013.6, Found 1016.2

**MALDI-TOF spectrum of 2'**

MALDI-TOF matrix: 2,5-dihydroxybenzoic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  2551.6, Found 2553.0

**MALDI-TOF spectrum of 3'**

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+K]^+$  2122.1, Found 2122.0

**MALDI-TOF spectrum of 5'**

MALDI-TOF matrix:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid  
Calcd. For  $[M+H]^+$  1835.1, Found 1836.5

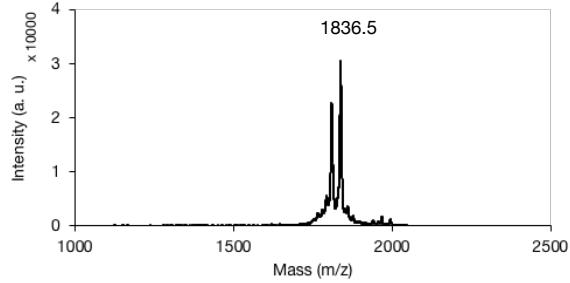


Figure 4-3. 各分子の MS スペクトル

#### 4.2.3 膜貫通分子のクリック反応による合成

4.2.2 で合成・精製した **2**、**2'**、**3** および **3'** を使用して、銅触媒存在下クリック反応により目的物である **1**、**1'** および **1''** を合成した。具体的には、CuI (I) (10 mM, 2eq)、TBTA (10 mM, 2eq) および Et<sub>3</sub>N (10 mM, 2eq) の混合液に DMSO に溶解させた **2** または **2'** (5 mM) および **3** または **3'** (5 mM) を添加した。この溶液に N<sub>2</sub> ガスを 5 分間吹き込み、室温で 12 時間攪拌した。ついで、得られた **1**、**1'** および **1''** の精製を逆相 HPLC 上で CH<sub>3</sub>CN/0.1%TFA (30%~60% v/v) を移動相として Protein-R カラムを使用して行った。目的物の確認は MALDI-TOF-MS を用いて行った (Figure 4-4)。各分子は、DMSO を用いて 1.0 mM の濃度に調製し、4°C にて保存した。濃度決定は、DMSO 中で 478 nm における NBD の吸光度 (モル吸光係数 = 33186 /M/cm) を用いて行った<sup>7</sup>。

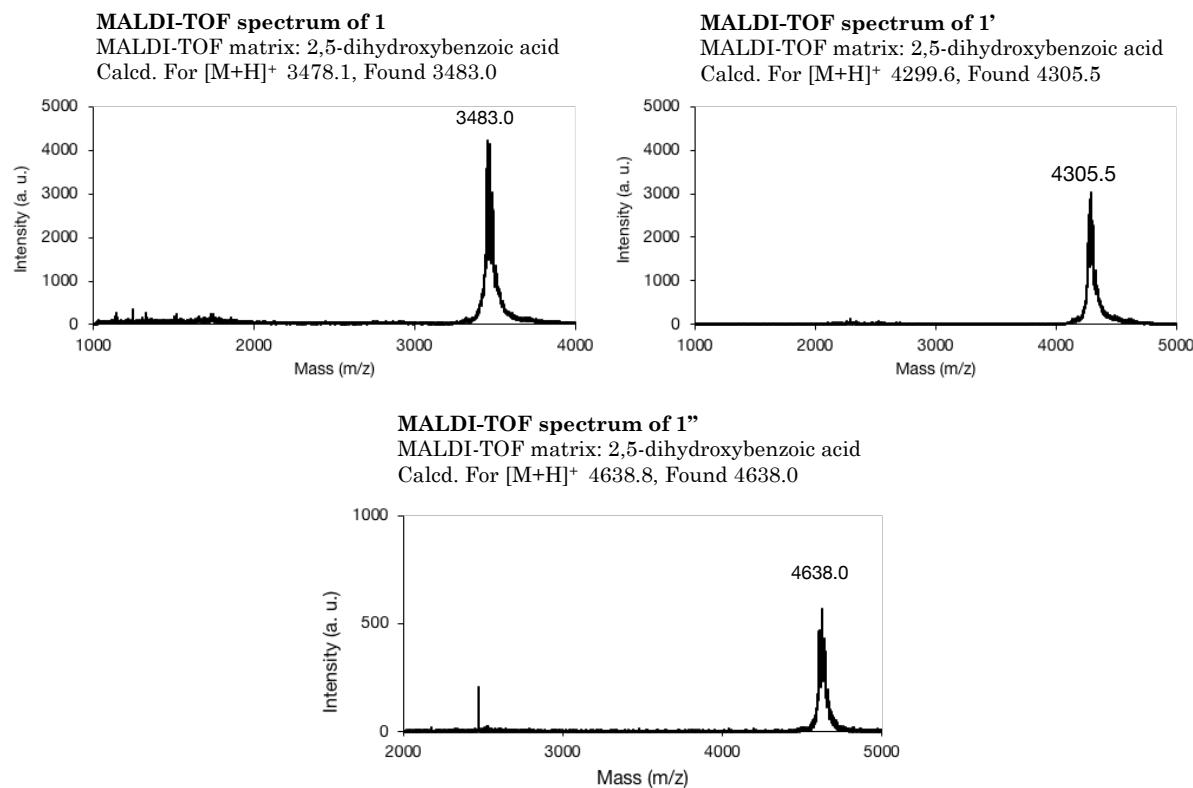


Figure 4-4. 各分子の MS スペクトル

#### 4.2.4 膜貫通分子の溶解性

合成した **1**、**1'** および **1''** は、高い疎水性を有すると予想されるため溶液中での分子の溶解性を評価し、十分な溶解性を示すか確認した。溶解性の評価には、これまでと同様の手順で合成した分子の溶解性を評価した。溶解度は、(フィルター濾過後の  $A_{478}$ ) / (DMSO 中での  $A_{478}$ ) として定義した。

#### 4.2.5 細胞培養

K562 細胞（ヒト慢性骨髓性白血病細胞株）の培養は、10 % ウシ胎仔血清 (FBS)、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、0.25  $\mu$ g/mL アンフォテリシン B を含む RPMI-1640 を用い、5 %  $CO_2$  存在下、37 °C で培養した。

CHO 細胞（チャイニーズハムスター卵巣由来細胞）は、10 % FBS、100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、0.25  $\mu$ g/mL アンフォテリシン B を含む RPMI-1640 を用い、5 %  $CO_2$  存在下、37 °C で培養した。

#### 4.2.6 細胞上での膜貫通分子の挙動

CHO 細胞 ( $2 \times 10^4$  cells/mL) を予め 96-well ガラスボトムプレートに播種し、一日 5 %  $CO_2$  存在下 37 °C で培養した。この細胞の培養液を除去し、200  $\mu$ L の無血清培地および 10 mM HEPES 含有 300 mM マンニトール等張液 (pH 7.4) で洗浄した。一方、細胞に添加する **1** の溶液の調製のために、**1** の DMSO 溶液 (40  $\mu$ M) と 20 mM CD 含有 HEPES 緩衝液を混合し、室温で 30 分かけて包摶させた (CD-**1**)。そして、CD-**1** に対して Cy3 SA (4  $\mu$ M) を添加、攪拌し 10 分間室温で保持した。準備した細胞に調製した **1**-SA または **1**-Cy3 SA をそれぞれ添加し、37 °C で 10 分間修飾した (**1** 終濃度 : 4  $\mu$ M)。その後、200  $\mu$ L の血清含有培地で二回洗浄することで未修飾の **1**-SA または **1**-Cy3 SA を除去した。細胞の観察には、共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡 (CLSM) (LSM700, Carl Zeiss) を使用した。**1'** の細胞修飾についても、上記と同様の条件および方法で行った。ただし、使用した SA は蛍光標識されていないものを使用した。

**1** の細胞毒性についての評価は、以下の方法によって行った。K562 細胞 ( $2 \times 10^5$  cells) を遠心分離して上澄みを除去し、2 mL の無血清培地を細胞に加えて懸濁させ遠心分離を行った。上澄みを除去し、同様の操作を再度行い細胞を洗浄した。細胞に添加する **1** の溶液を調製するために **1** の DMSO 溶液と 20 mM CD 含有 HEPES 緩衝液を混合し、室温で 30 分かけて包摶させた。回収した細胞に各濃度に調製した **1** の溶液を添加し、37 °C で 5 分間修飾した。その後、血清含有培地を加えて懸濁させ、遠心分離を行うことで未修飾の **1** を除去し、血清培地中で細胞を懸濁させた。そこに Propidium Iodide (PI) 水溶液 (1  $\mu$ L, 1  $\mu$ g/ml) を添加し攪拌後、暗所に 1 分間置いた。各濃度の **1** で処理した細胞の生存率を PI 由来の蛍

光強度を Tali™ イメージベースサイトメーター (Life Technologies Japan, Tokyo, Japan) により測定することで算出した。

#### 4. 2. 7 mCherry-eDHFR の発現

CHO 細胞 ( $2 \times 10^4$  cells/mL) を予め 96-well ガラスボトムプレートに播種し、一日 5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37 °C で培養した。トランスフェクション用の試薬である Lipofectamine® 2000 (2 μL) を Opti-MEM® 培地 (23 μL) で希釈し、室温で 5 分間保持した (溶液 A)。一方、mCherry-eDHFR をコードしたプラスミド DNA 溶液 (287.0 μg/mL, 1.8 μL, 0.5 μg) を Opti-MEM® 培地 (23.2 μL) で希釈することによって溶液 B を調製した。溶液 A と B をそれぞれ等量ずつ混ぜ合わせ、室温で 20 分間保持することでプラスミド DNA と脂質の複合体を調製した (溶液 C)。この溶液 C (10 μL) を Opti-MEM® 培地 (90 μL) で希釈し、トランスフェクション用の溶液 D を調製した。次に血清含有培地中で培養した CHO 細胞の培養液を除去し、200 μL の DPBS で二回洗浄した。そこへ溶液 D (100 μL) をウェル毎に加え、5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37 °C で 4 時間培養することでプラスミド DNA を細胞内へ導入した。その後、細胞を血清含有培地で洗浄し、血清含有培地中で更に 20 時間 5 % CO<sub>2</sub> 存在下 37 °C で培養した。本実験で使用した mCherry-eDHFR をコードしたプラスミド DNA は、名古屋工業大学築地研究室より頂いたものである。

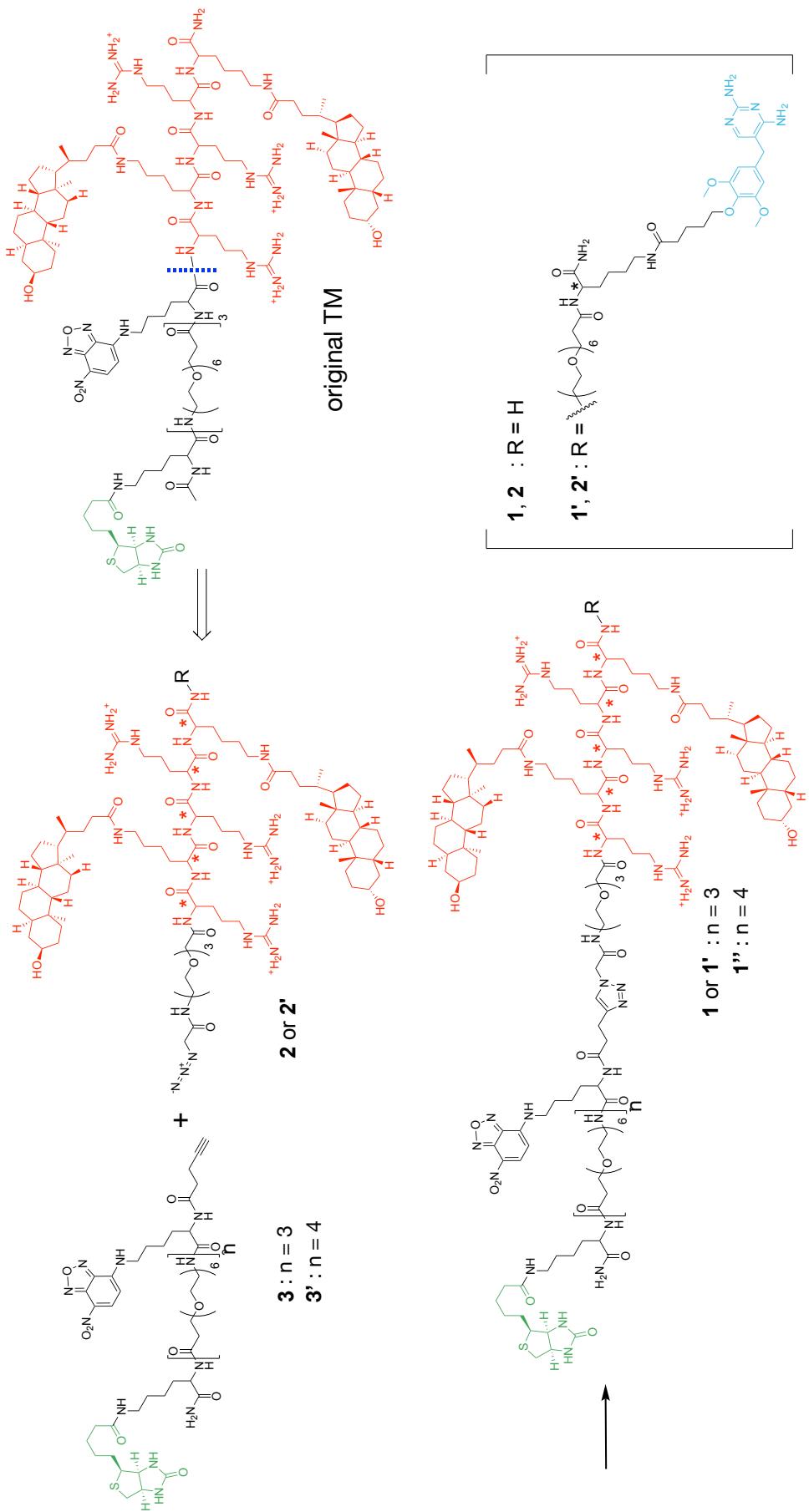
#### 4. 2. 8 mCherry-eDHFR 発現細胞膜内葉上でのレセプター/リガンド認識

mCherry-eDHFR を発現した CHO 細胞を使用して 1' および 1" の細胞膜上での挙動を確認した。1' および 1" の細胞修飾は、4. 2. 6 と同様の手順で行った。SA として蛍光標識されていないものを使用した。細胞の観察には、CLSM を使用した。

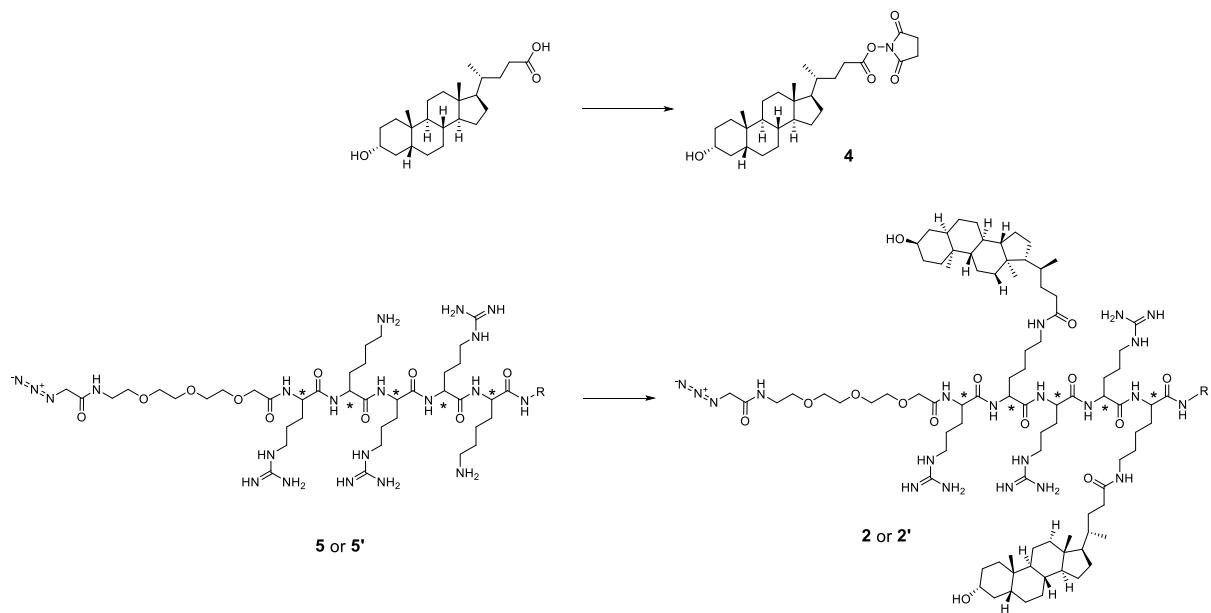
## 4.3 結果と考察

### 4.3.1 クリック反応用分子の合成

提案する合成アプローチが新規 TM の合成に有効かどうかを調べるために、まず三章で紹介した TM **3** を新たな合成アプローチで合成した (**Scheme 4-1**)。本合成で最終的にクリック反応により **1**、**1'** および **1''** を合成するために使用する分子として **2**、**2'**、**3** および **3'** を合成した。**2** および **2'** は、三章で報告した三つの Arg 残基と二つの LCA 基が修飾された Lys から構成される膜透過ドメインを有する。そして、そのドメインに対してスペーサーとして miniPEG を介してアジド基を修飾した。**2'** に関しては、**2** の C 末端に 6EG と Lys を介して TMP がリガンドとして修飾されている。また、TMP と **2** 間のスペーサー長は既報の分子設計を参考にして決定した<sup>6</sup>。**2'** は、膜内葉上に TMP を安定して提示するために加水分解酵素等による分解を防ぐ目的で L-Arg, Lys に代わり、D-Arg, Lys を使用した。一方 **3** および **3'** は、リガンドとしてビオチンを片端に有し、膜貫通部位である 6EG を三つないし四つ介してクリック反応の反応点となるアルキンを有している。以上の四種類のペプチドについて、**3** および **3'** を固相合成法で合成し、**2** および **2'** を固相合成法と LCA の Lys 側鎖への修飾の組み合わせ (**Scheme 4-2**) で合成した。本合成手順の利点として、固相合成中に嵩高い LCA を導入することで続く反応の効率を低下させる懼れをなくすことができ、また LCA 上の水酸基が反応点になり収率が低下するという問題を克服することができる。合成後、各ペプチドを逆相 HPLC で精製した。以下に各分子の MS スペクトルを示す (**Figure 4-3**)。



Scheme 4-1. クリック反応による TM の合成



Scheme 4-2. ペプチドの Lys 側鎖への LCA の修飾

#### 4.3.2 膜貫通分子のクリック反応による合成

クリック反応用のペプチドの合成に成功したため、合成したペプチドを用いてクリック反応により **1**、**1'** および **1''** の合成を行った。アルキン修飾分子およびアジド修飾分子と銅触媒および反応の活性化剤である TBTA<sup>9</sup> を DMSO 中、窒素雰囲気下で 12 時間反応させた。この時、DMSO は各ペプチド、塩化銅 (I) および TBTA を完全に溶解させる溶媒として最適であった。Figure 4-5 は、12 時間後の反応液を逆相 HPLC により分析した結果であり、目的物を含むピークが確認された。ピークに目的物が含まれていることは、MALDI-TOF-MS により確認した (Figure 4-4)。反応収率は、**1** が 6.4%、**1'** が 14.4%、**1''** が 20% となった。この反応収率は、既報の TM **3** と比較して格段に高くなったものの、十分とは言い難い。より高収率で目的物を合成するためには、反応条件の最適化が必要と考えられる。本実験から、合成戦略は、**1** のような比較的長く合成が困難な分子を効率よく得るために有効といえる。また、TMP を修飾した **1'** および **1''** の合成を確認できたことから、より複雑な構造を持つ TM の合成にも有用な汎用性の高い方法であることが示された。

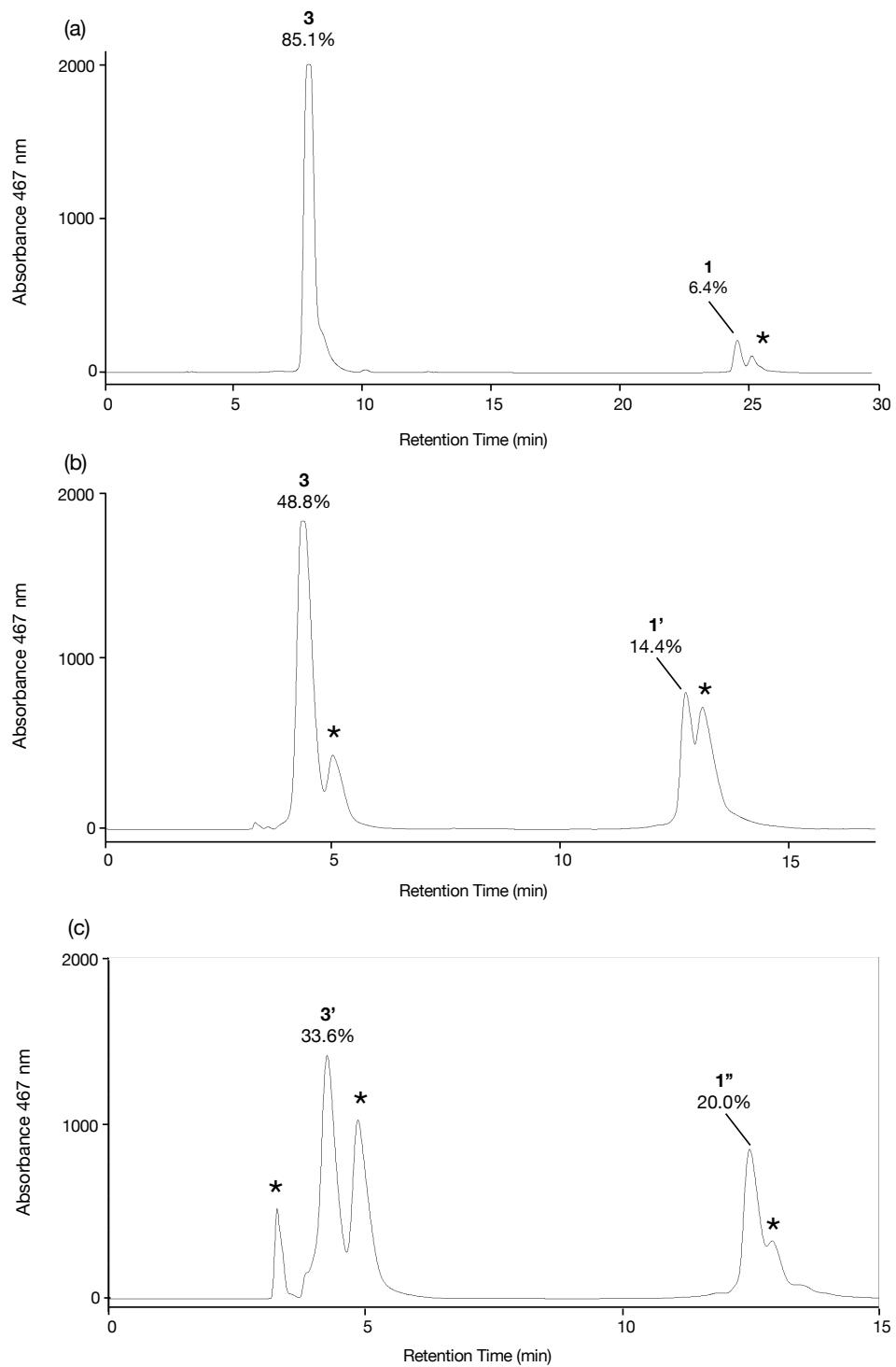


Figure 4-5. クリック反応の各反応液 (a : **1**, b : **1'**, c : **1''**) の HPLC による分析 (\*のピークは副生成物を含む)

#### 4.3.3 膜貫通分子の溶解性

合成に成功した各 TM についてこれまでと同様の方法で溶解度を評価した。得られたろ液の吸収スペクトルを Figure 4-6 に示す。1 は、10 mM HEPES (pH7.4) 含有 300 mM マンニトール等張液中で 55%がろ液中に存在し、可溶化剤である CD を使用した場合溶解度が 100%まで向上した。1' は、マンニトール等張液中で 20%がろ液中に存在し、可溶化剤である CD を使用した場合溶解度が 67%まで向上した。1 と比較して 1' の溶解性が低い理由は、修飾されている TMP の疎水性にあると推察される。以上の結果から合成した TM は、CD 存在下で水溶液に対して高い溶解性を示したことから、これまでと同様に細胞修飾実験において分散状態で細胞膜へ分配されることが期待できる。

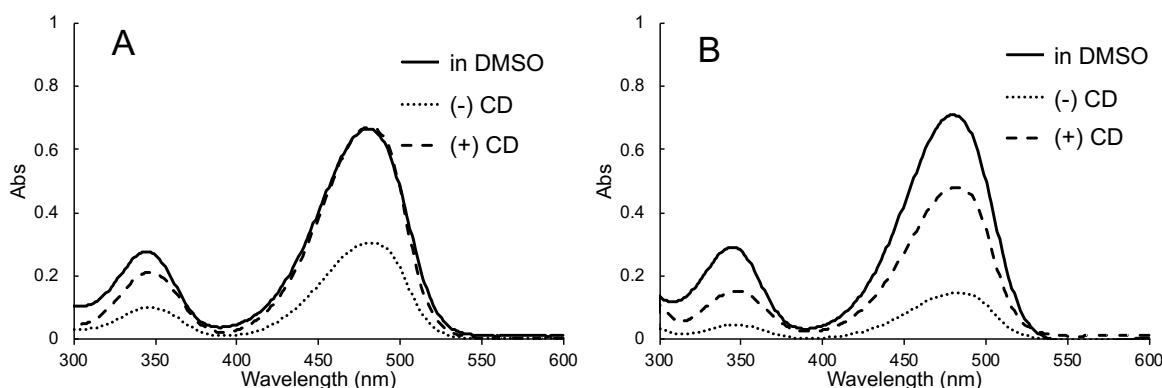


Figure 4-6. (A) 1、(B) 1' の各溶液を 0.22  $\mu$ m のフィルターに通したろ液の吸収スペクトル

#### 4.3.4 細胞上での膜貫通分子の挙動

合成した 1 (4  $\mu$ M) を CD (2 mM) と包摂させた後に Cy3 SA と結合させた複合体 (1-Cy3 SA) を CHO 細胞に添加し 10 分間保持することで、細胞上に複合体を修飾した。この時、1 を 4  $\mu$ M で細胞に添加しても顕著な細胞毒性を示さないことを予め確認している (Figure 4-7(a))。Figure 4-7(b) は、SA と複合体を形成させない分子 (CD-1) を修飾した CHO 細胞の CLSM 画像である。この画像から 1 は、核を除く細胞質全体からその存在がされたため、10 分以内に 1 が膜を透過したことが示唆された。一方、1-Cy3 SA を細胞に添加した場合、Cy3 SA 由来の赤色蛍光が主に細胞表面から観察され 1 由来の緑色蛍光とよく共局在した (Figure 4-7(c))。ここで注目すべきは、TM の細胞上での局在が SA の存在の有無によって完全に異なっていたことである。このような 1 の細胞上での挙動は、三章で報告した TM 3 と同様であり、このことからクリック反応で合成した 1 が既報の分子と同じように機能する可能性が高いことを示している。それはつまり、ビオチンに SA が結合することで 1 全体の膜透過を抑制し、膜透過ドメインのみが膜内葉表面近傍へとクーロン力によって移行、そし

て細胞膜を貫通した構造を達成する可能性が高いということである。

クリック反応によって合成した **1** が既報の分子と同様の挙動を示したため、次に TMP を修飾した新規 TM である **1'**を細胞に **1** と同条件で添加し、その挙動を確認した。その結果 SA 非存在下では **1'**由来の蛍光が細胞質内から観察され (Figure 4-7(d))、この結果は、**1** と比較して **1'**が **1** ユニット分多く 6EG を有し、またリガンドとして TMP を提示しているにもかかわらず、**1'**が膜透過能を有することを示唆している。一方、SA との複合体である **1'-SA** を添加した場合は、細胞膜上から蛍光が確認された (Figure 4-7(e))。細胞室内からいくらかの緑色の輝点が観察されたが、これは複合体がエンドサイトーシスによって取り込まれたものと考えられる。**1**を修飾した細胞と比較して **1'**を修飾した細胞では、SA 非存在下で比較的大きな輝点 (Figure 4-7(d) 白色矢印)、SA 存在下で細胞膜上からドット状の蛍光が観察された。これらの現象は、**1** と比較して **1'**の疎水性が高いことに起因して (Figure 4-6)、分子同士が凝集した結果と推察される。

以上の結果をまとめると **1** および **1'**は、既報の TM と同様の挙動を細胞上で示した。そのため、**1** および **1'**は細胞膜上で膜貫通状態を達成している可能性がある。そして、**1'**は膜貫通状態を達成すると同時に、膜透過ドメイン上に修飾された TMP を膜内葉上に提示していることを期待させる。そこで、次に TMP の相補的なタンパク質である eDHFR に蛍光タンパク質を修飾した mCherry-eDHFR を発現させた CHO 細胞を使用して、TMP の認識が起るかどうか検証を行った。

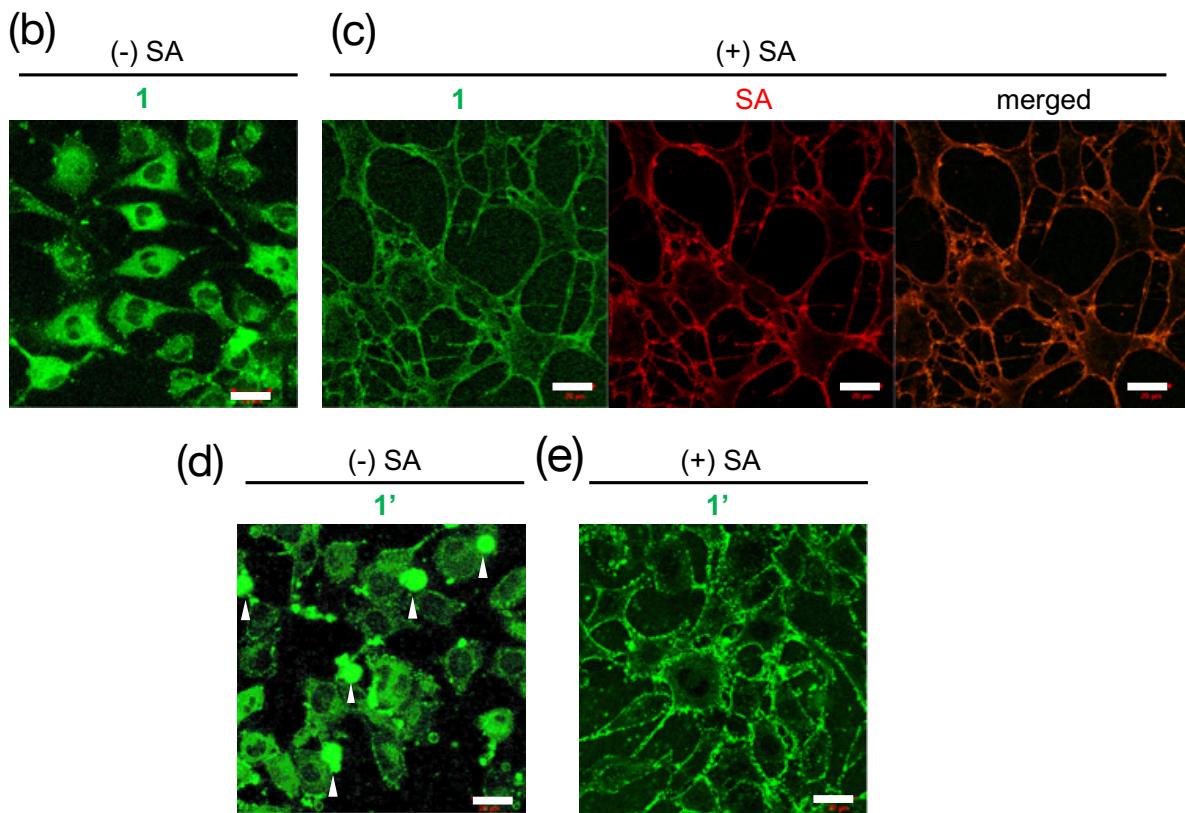
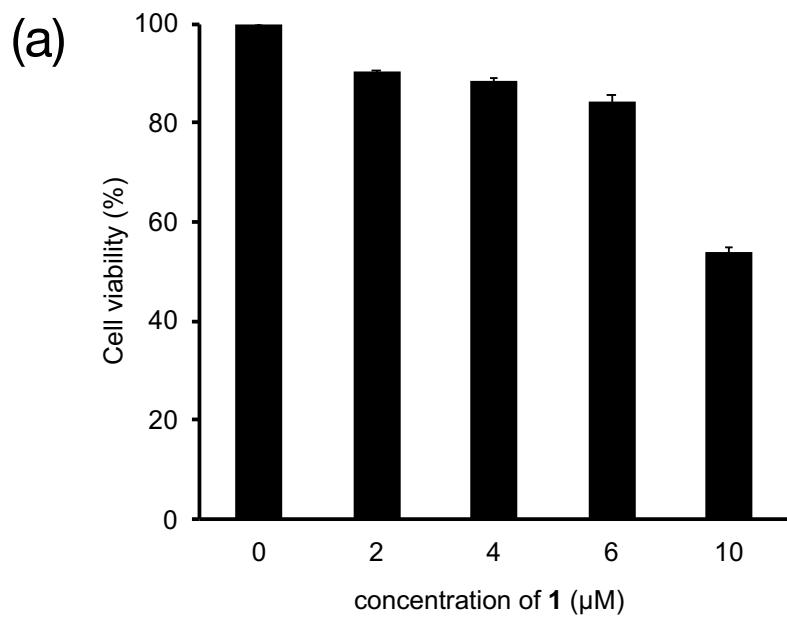


Figure 4-7. (a) 各濃度の **1** を添加した場合の細胞毒性、(b) CD-**1** (4 μM) を修飾した細胞、(c) **1**-Cy3 SA (**1**: 4 μM, SA: 4 μM) を修飾した細胞（緑：**1** または **1'**、赤：Cy3 SA)、(d) CD-**1'** (4 μM) を修飾した細胞、(e) **1'**-SA (**1'**: 4 μM, SA: 4 μM) を修飾した細胞（スケールバー：20 μm）

#### 4. 3. 5 mCherry-eDHFR 発現細胞膜内葉上でのレセプター/リガンド認識

4. 3. 4 と同様の条件で **1'** および **1''** を SA と複合体化させた状態で mCherry-eDHFR を発現した CHO 細胞に添加した。Figure 4-8(a) は、**1'**-SA を細胞に修飾した結果であり、mCherry-eDHFR を発現した細胞膜上から **1'** 由来の緑色蛍光がドット状で確認された。しかし、細胞質内に存在する eDHFR が膜内葉上に局在することはなかった。この原因として、**1'** の膜貫通ドメインの長さが十分でなく、TMP が膜内葉上に提示されていないことを考えた。そこで、**1'** より 6EG1 つ分長い **1''** を 4  $\mu$ M で修飾した細胞を用意し観察した (Figure 4-8(b))。しかし、結果は Figure 4-8(a) と同様に細胞上からペプチド由来の蛍光が確認できるものの、eDHFR の局在が変化することはなかった。

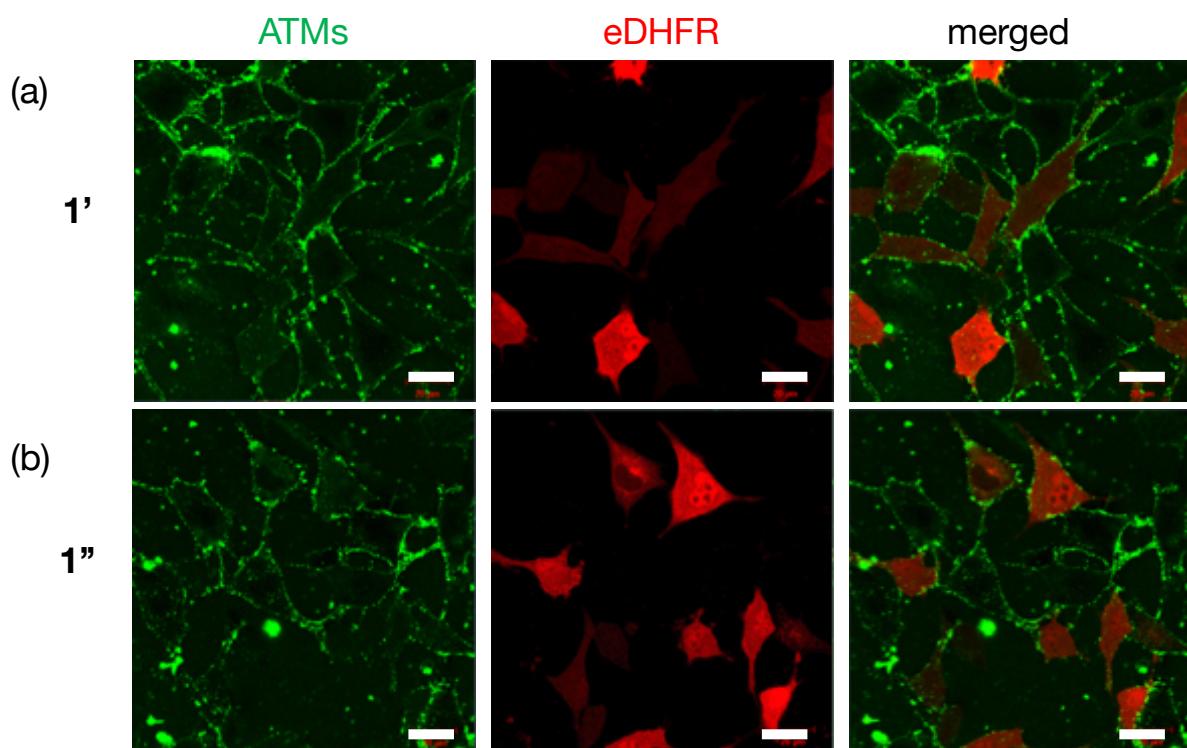


Figure 4-8. (a) **1'**-SA (**1'**: 4  $\mu$ M, SA: 4  $\mu$ M) を修飾した細胞、(b) **1''**-SA (**1''**: 4  $\mu$ M, SA: 4  $\mu$ M) を修飾した細胞 (緑: **1'** または **1''**、赤: mCherry-eDHFR) スケールバー: 20  $\mu$ m

以上より、新規 TM を用いて eDHFR の細胞内局在を変化させるには至らなかった。そのため、TMP が膜内葉上に提示されていないことが考えられる。その原因として (1) 細胞膜表面を覆う糖鎖層の立体障害、(2) TM の凝集および (3) TMP の膜内葉への埋没の三点が考えられる。

(1) の場合、細胞膜表面を覆う厚い糖鎖層の立体障害により TM の膜貫通状態が達成されず、TMP が膜内葉上に提示されていないと考えられる (Figure 4-8(a))。糖鎖の厚みは、50~300 nm 程度であり、細胞種によって大きく異なる<sup>10</sup>。CHO 細胞は糖鎖が厚い上皮細胞であるため、厚い糖鎖が SA と TM の複合体の膜への挿入を妨げている可能性がある。そのため、対策として糖鎖層以上の膜貫通部をもつ TM を用いることが考えられる。Devaraj らは、snap-tag<sup>11,12</sup>に対して特異的な反応基質となる benzylguanine (BG) を脂質に修飾した分子を用いた局在制御の研究において報告している<sup>13</sup>。彼らは、BG と脂質間のスペーサーがなしあるエチレングリコールの繰り返しが 7 の場合 snap-tag による認識が起こらず、その繰り返しが 17 および 45 の場合、認識が起こることを明らかにした。このような小分子とタンパク質の認識に適切な長さのスペーサーが必要であることは、K562 細胞上でのビオチンと SA の認識についても同様であることを二章の研究から見出している。K562 細胞は、糖鎖の厚みが約 40 nm と報告されている<sup>14</sup>。そのため、膜貫通部の長い TM を合成するという対策の他に、糖鎖の薄い K562 細胞や糖タンパク質の糖鎖が欠損した CHO 細胞株<sup>15</sup>を使用しての実験が有効と考えられる。

(2) の場合、TM と SA の複合体が凝集し膜貫通状態が達成されず、TMP が膜内葉上に提示されていないことが考えられる (Figure 4-8(b))。また、凝集の結果 TM の実行濃度が低下し eDHFR の局在変化が確認されないことも考えられる。TM の凝集は、Figure 4-7 の顕微鏡画像から確認されており、この凝集が TMP の疎水性に由来するものと疑われる (Figure 4-6)。SA と複合体化しても TM を介した凝集が確認されるため、複数の TM が SA に結合していることが疑われる。そのため、対策として大過剰の SA に TM を添加して複合体化することが考えられる。また、TMP 近傍に正荷電を導入することで凝集を抑制するという方法も考えられる。

(3) の場合 TMP の埋没原因も、その疎水性が考えられる (Figure 4-8(c))。今回、Tsukiji らが報告している分子<sup>6</sup>を参考に新規 TM を設計した。しかし、彼らの分子とは膜内葉への分子の提示のされ方が根本的に異なるため、同様の結果が得られなかつたと推察される。そのため、(2) と同様に正荷電を TMP 近傍に導入することが有効と考えられる。

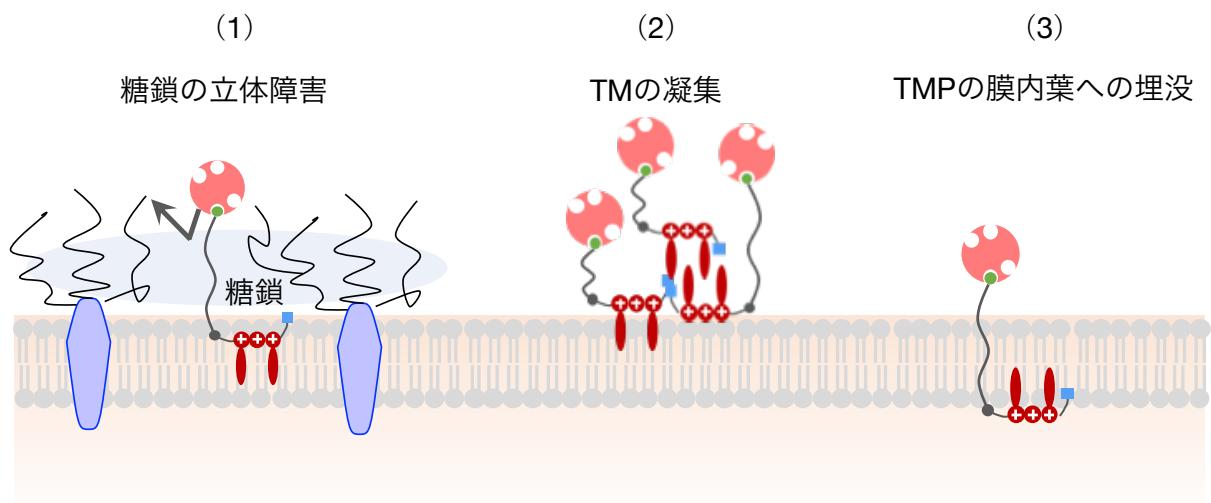


Figure 4-9. mCherry-eDHFR の局在変化が起らなかった原因

#### 4.4 結語

本研究では、これまで用いてきた Fmoc 固相合成法と銅を触媒として使用するクリック反応の組み合わせにより、TM の効率的な合成を達成した。また、その分子がこれまでの TM と同様の挙動を細胞上で示すことを明らかにした。そして、同様の合成法によって細胞膜内葉上に分子を提示可能な新規 TM の合成に成功した。膜内葉上に提示する分子としては、これまでに eDHFR の細胞内局在を変化させた実績のある TMP を採用し、Figure 4-2 のような戦略で膜貫通状態で TMP の膜内葉上への提示を試みた。しかし、新規 TM が細胞質に存在する eDHFR を膜内葉上に局在させることはなかった。その原因として、(1) TM の膜貫通状態での膜修飾が達成されていない、もしくは (2) 膜貫通状態が達成されているものの、TMP が膜内葉に埋もれてしまっていることが疑われた。そのため、今後の検証として (1) に対しては、膜貫通部の長さを更に長くした TM の使用、糖鎖の薄い K562 細胞や糖鎖欠損 CHO 細胞株<sup>15</sup>を使用しての実験が必要と考えられる。また、TM の凝集を抑制するために大過剰の SA に TM を添加して複合体化することや、TMP 近傍に正荷電を導入することが有効と考えられる。TMP 近傍への正荷電の導入は、(2) に対しても有効と考えられる。また、モデルを TMP と eDHFR の系から GpYLPQTV-NH<sub>2</sub> と STAT3 の系<sup>5</sup>や BG と snap-tag の系<sup>13</sup>に変更することも有用と考えられる。

#### 4.5 参考文献

1. R. Huisgen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1963**, *2*, 565.
2. V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 2596.
3. Q. Wan, J. Chen, G. Chen, S. J. Danishefsky, *J. Org. Chem.*, **2006**, *71*, 8244.
4. H. Cai, Z. H. Huang, L. Shi, Y. F. Zhao, H. Kunz, Y. M. Li, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 6396.
5. M. Avadisian, S. Fletcher, B. Liu, W. Zhao, P. Yue, D. Badali, W. Xu, A. D. Schimmer, J. Turkson, C. C. Gradinaru, P. T. Gunning, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 6248.
6. M. Ishida, H. Watanabe, K. Takigawa, Y. Kurishita, C. Oki, A. Nakamura, I. Hamachi, S. Tsukij, *J. Am. Chem. Soc.*, **2013**, *135*, 12684.
7. S. Lin, W. S. Struve, *Photochem. Photobiol.*, **1991**, *54*, 361.
8. V. Janout, B. Jing, S. L. Regen, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 15862.
9. T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Org. Lett.*, **2004**, *6*, 2853.
10. A. Singh, S. C. Satchell, C. R. Neal, E. A. McKenzie, J. E. Tooke, P. W. Mathieson, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2007**, *18*, 2885.
11. A. Keppler, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 86.
12. A. Keppler, H. Pick, C. Arrivoli, H. Vogel, K. Johnsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*, 9955.
13. A. K. Rudd, J. M. V. Cuevas, N. K. Devaraj, *J. Am. Chem. Soc.*, **2015**, *137*, 4884.
14. D. Boettiger, B. W. Haller, *J. Phys. Condens. Matter.*, **2010**, *22*, 194101.
15. I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 492.

## 第五章

### 結論

本論文では、疎水性相互作用に基づいた細胞膜修飾によって細胞を機能化する分子の開発を目指した。二章では、細胞膜上に提示する分子の寿命を延ばすことを目的に、安定した修飾を実現するペプチド型膜アンカーの開発に取り組んだ。また、ペプチド型膜アンカーにリガンドを修飾した分子を用いて、細胞膜上へのタンパク質の提示を行った。三章および四章では、膜貫通タンパク質の機能の模倣を指向した膜貫通分子（TM）の開発を行った。三章では、膜電位を感受性するペプチド型膜アンカーおよびTMの合成、機能評価を行った。そして四章では、細胞膜内葉上に分子を提示可能な新規TMの効率的な合成およびその機能評価に取り組んだ。

#### 細胞膜表面への安定な分子提示を可能にするペプチド型膜アンカーの開発

本研究では、多くの利点を有するものの修飾される分子の寿命の短さが応用へのボトルネックとなっていた、疎水性相互作用に基づいた細胞の機能化の課題克服を目的として、細胞膜への安定な分子提示を可能にするペプチド型膜アンカーの開発を行った。ペプチド型膜アンカーは、その配列上に複数の疎水基を導入できるため、脂質型の膜修飾分子以上の安定性が見込まれた。また、ポリマー型の膜修飾分子と比較して設計および配列の制御がしやすいため、膜上での挙動の検討や最適化が容易であると考えられた。しかし私の知る限りでは、提示される分子の寿命を延ばすことを目的としてペプチド型膜アンカーを合理的に設計し評価した報告はこれまでになかった。そこで本研究では、細胞膜外葉に分子を提示できる一連のペプチド型膜アンカーの合理的なデザインおよびその機能についての評価を行った。また、ペプチド型膜アンカーを発展させてリガンドとしてビオチンを細胞膜上に安定して提示できるペプチドを合成し、その相補的タンパク質である SA による認識を細胞膜上で評価した。

ペプチド型膜アンカーの開発では、ペプチドに導入する疎水基の種類や数、導入位置を詳細に検討した。その結果、XX2 と名付けたペプチドが最も優れた性能を示すことがわかった。これは、脂質を基体とした細胞膜アンカーと比較しても高効率な細胞表面修飾を達成していた。また、XX2 は細胞表面と細胞膜がエンドサイトーシスに取り込まれた結果、行き着く先であるリソソームに選択的に局在し、さらに、細胞内に取り込まれた XX2 においてもリサイクリングエンドソームによって細胞膜へ再分配されることがわかった。そこで、開発したペプチド型膜アンカーを利用して、実際に細胞表面に分子を提示し、提示した分子が細胞表面でタンパク質から正しく認識されるか検討した。ここでは、ペプチド型膜アンカーからスペ

ーサーであるオリゴエチレングリコール鎖を介してビオチンを提示した。細胞懸濁液中においてビオチンと SA の認識を調査した結果、スペーサーが最も長い、伸び切り鎖長で 8.1 nm のときに最も優れた効率で、ビオチンと SA の認識が起こることがわかった。以上より、XX2 がペプチド型膜アンカーとして細胞の投与を指向した細胞膜修飾分子として有望であることが示された。

### 膜貫通タンパク質の機能模倣を目指した膜貫通分子の開発

本研究では、疎水性相互作用に基づいた膜修飾によって膜貫通状態での膜修飾を達成するための膜修飾分子およびその膜修飾法の開発を目的とした。本研究で方向を制御して膜を貫通した状態で TM を膜に修飾する戦略として、膜電位により膜透過する分子の利用を考えた。そこで本戦略で使用する TM は、リガンド結合部、膜貫通部に膜透過部を修飾した構造とした。膜透過部は、既報の膜電位感受性の膜透過分子から着想を得て、疎水性のペプチド型膜アンカーにカチオン性の Arg を導入したペプチド型膜アンカーとした。膜透過部を有する TM を細胞に添加すると、膜透過部が疎水性相互作用により膜に修飾され、膜電位により生じるクーロン力をを利用して細胞膜を透過する。そして、膜透過部が膜内葉に達することで、TM の方向を制御した膜貫通状態での膜修飾が達成される戦略である。

合成したペプチド型膜アンカーの評価では、アルギニンおよび疎水基として LCA を導入した peptide 1 が細胞膜を透過する特性を有することがわかった。また、1 は、膜透過し細胞内に移行した後、リソソームにいくらか局在する以外に、大部分がミトコンドリアに集積することが示された。この結果から 1 は、膜電位によって膜透過していることが示唆された。そこで、膜電位を阻害し 1 を細胞に添加した結果、1 は細胞膜上に局在し膜を透過しなかった。また、人工膜を用いた評価においても 1 存在下では膜透過ペプチド特異的なシグナルが観測された。以上の結果から 1 は、膜電位によって直接膜を透過することが示された。そこで、1 にスペーサーであるオリゴエチレングリコールを介してビオチンを修飾した TM 3 を合成した。細胞に 3 を添加した結果、本分子が膜透過することがわかった。しかし、3 添加後に SA を添加すると、ビオチンと SA の認識が膜表面で起こり、膜透過が抑制された。以上の挙動から、3 はそれ自体では膜を完全に透過し細胞質へ移行してしまうが、SA の存在により完全な膜透過が抑制され、膜上で膜透過部のみが膜を透過した膜貫通状態で膜上に存在することが期待される結果を得た。

### 内葉上に分子提示する膜貫通分子のクリック反応による合成とその機能評価

本研究では、既報 TM の知見を活かして細胞膜の内外に分子を提示する TM を合成し、細胞膜上での膜貫通状態の達成を証明することを目的とした。細胞膜内葉上に分子を提示する新規 TM は、複雑な分子構造から従来の固相合成法だけでは合成が厳しいと予想された。そ

ここで、TM の合成戦略として固相合成法とクリック反応を組み合わせることにした。また、目的とした TM は類似研究がないため、膜内葉上にどのような分子を提示可能か予想できなかつた。そこで、これまでに膜内葉上に分子を提示する研究を参考に、eDHFR の細胞内局在を変化させた実績のある TMP を膜内葉上に提示するリガンドとして採用した。この TMP を膜透過ドメインに修飾した新規 TM を固相合成法およびクリック反応の組み合わせにより合成した。その後、三章で確立した修飾方法によって細胞膜に導入し、膜内葉上に TMP が提示されるかどうかを eDHFR の局在を観察することで評価した。

固相合成法とクリック反応の組み合わせにより、TMP を修飾した TM の合成に成功した。また、その分子が既報の TM と同様の挙動を細胞上で示すことを明らかにした。しかし、eDHFR 発現細胞に新規 TM を添加しても細胞質に存在する eDHFR の局在は変化しなかつた。また、膜貫通ドメインの長さを長くした TM を添加した場合も、同様に局在の変化は確認されなかつた。その原因として、(1) TM の膜貫通状態での膜修飾が達成されていない、もしくは (2) 膜貫通状態が達成されているものの、TMP が膜内葉に埋もれてしまっていることが疑われた。そのため、今後の検証として (1) に対しては、膜貫通部の長さを更に長くした TM の使用、糖鎖の薄い K562 細胞や糖鎖欠損 CHO 細胞株を使用しての実験が必要と考えられる。また、TM の凝集を抑制するために大過剰の SA に TM を添加して複合体化することや、TMP 近傍に正荷電を導入することが有効と考えられる。TMP 近傍への正荷電の導入は、(2) に対しても有効と考えられる。また、モデルを TMP と eDHFR の系から GpYLPQTV-NH<sub>2</sub> と STAT3 の系や BG と snap-tag の系に変更することも有用と考えられる。

以上より本論文において、疎水性相互作用に基づいた細胞膜修飾によって、細胞を機能化する分子として、ペプチド型膜アンカーの開発および膜貫通分子の合成に成功した。ペプチド型膜アンカーの今後の展望として、リガンドを E セレクチンホーミングペプチドにすることで炎症部位特異的に機能性細胞を送達することができると期待される。実際、応用研究において明るい結果も出ているため、今後の発展に期待したい。膜貫通分子の今後の展望として、まずは膜貫通状態が達成されていることの証明が必要と考えられる。そのためには、上述したような細胞を変更しての実験や分子の最適化等が望まれる。分子の最適化には、私が確立した固相合成法とクリック反応の組み合わせが効力を発揮すると考えている。また、脂質人工二重膜に分子を導入することで、細胞と比較してよりシンプルに評価できる系を構築することも有望な戦略と思う。膜貫通状態の証明が達成された際には、膜貫通タンパク質の機能の模倣など、疎水性相互作用に基づいた細胞膜修飾による細胞の機能化の可能性を広げる戦略になると感じるため、その達成を後輩に期待したい。

## 謝辞

本博士論文は、筆者が九州大学大学院工学府材料物性工学専攻博士課程中に、片山研究室において行った研究をまとめたものです。

本研究の遂行にあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻ならびに学位論文提出の機会を賜りました九州大学大学院工学研究院 片山 佳樹 教授に謹んで感謝の意を表します。

また、本研究に関して終始あたたかくご指導ご鞭撻を頂いた森 健 准教授に深謝いたします。

そして、本研究の遂行にあたり、研究に対する姿勢や研究意義など終始ご指導賜りました岸村 順廣 准教授、財団法人九州先端科学技術研究所 山本 竜廣 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究では細胞観察に後藤・神谷研究室所有の共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, ZEISS) を使用させて頂きました。後藤 雅宏 教授にこの場を借りて感謝申し上げます。人工脂質二重膜を用いた共同研究を快諾いただき、また実験環境のご提供および懇切なるご指導を頂いた東京農工大学川野竜司准教授、実験手技を教えて頂いた多田あすか女史に感謝申し上げます。TMP-COOH および mCherry-eDHFR をコードしたプラスミド DNA のご提供および有意義なディスカッションの機会を頂いた名古屋工業大学築地真也教授に感謝申し上げます。

竹尾 将史 氏 (現 久光製薬) には、日頃の実験やディスカッション、その他様々な面で熱心、かつ丁寧な御指導を頂きました。心から厚く御礼申し上げます。

また、同じ研究グループとして研究に取り組んできました松田 雅義 氏 (現 旭化成)、長井 洋子 女史 (現 信越化学)、徳永 麗雅 女史 (現 横浜ゴム)、川口 美城 女史 (現 シスメックス)、高橋 光洋 氏 (現 東洋インキ) に深く感謝致します。

博士課程一年次、九ヶ月間の研究留学の受け入れおよび懇切なるご指導を頂いた Ohio State U Professor Dr. Dennis Bong およびともに研究に切磋琢磨した Bong Group のメンバーに深く感謝致します。

研究を行う上で様々な便宜を図って下さいました補佐事務員 宮崎 万里 女史に厚く御礼申し上げます。また、九州大学工学部等事務室、九州大学分子システムデバイス国際リーダー教育センター支援室の皆様には多大なご協力を頂いたことを記し、謹んで感謝の意を表します。

日頃より私の研究室生活を絶えず温かく応援してくださった両親、畠中 誠、博美に深く感謝申し上げます。

最後になりますが、一緒に頑張って来た研究室の同期、諸先輩方、後輩の方々に心から感謝を申し上げます。

平成 31 年 3 月吉日  
畠中 渉