

ペプチドによる高分子のサイトゾル送達および
ナノキャリア化に関する研究

2020

坂本 健太郎

目次

| | |
|---|----|
| 序論 | 5 |
| 第一章 L17E 改良ペプチド「HAad」の創出 | 8 |
| 第一節 グルタミン酸残基の置換 | 9 |
| 第二節 ヒスチジン残基の置換 | 11 |
| 第三節 2つの変異の融合による HAad の導出 | 13 |
| 第四節 ペプチドの物性と作用機序に関する考察 | 15 |
| 第五節 HAad を用いた機能性タンパク質の <i>in vitro</i> における サイトゾル送達 | 21 |
| 第六節 HAad を用いた Cre リコンビナーゼの <i>in vivo</i> における サイトゾル送達 | 25 |
| 第一章の考察 | 27 |
| 第二章 HAad の化学修飾による高活性化 | 30 |
| 第一節 グアニジノ基の導入 | 31 |
| 第一部 グアニジノ基導入 HAad の活性評価 | 31 |
| 第二部 グアニジノ基導入 HAad の物性評価 | 35 |
| 第三部 機能性タンパク質のサイトゾル送達 | 37 |
| 第四部 CRISPR/Cas9 システムのサイトゾル送達 | 39 |
| 第二章第一節の考察 | 41 |
| 第二節 HAad へのピレンブチリル基の導入による活性向上 | 42 |
| 第一部 ペプチドの合成 | 43 |

| | | |
|----------------------|---------------------------------------|-----|
| 第二部 | アシル基導入 HAad の活性評価 | 45 |
| 第三部 | コレステリルヘミスクシニル基導入 HAad の 活性評価 | 47 |
| 第四部 | ピレンブチリル基導入 HAad の活性評価 | 49 |
| 第五部 | 機能性タンパク質のサイトゾル送達 | 55 |
| 第六部 | ピレンブチリル基導入 HAad の作用機序評価 | 57 |
| 第二章第二節の考察 | | 61 |
| 第二章の考察 | | 63 |
| 第三章 HAad 搭載ナノキャリアの開発 | | 65 |
| 第一節 | 蛍光標識 HAad の細胞内局在観察 | 66 |
| 第二節 | HAad 搭載ナノキャリアの合成 | 67 |
| 第三節 | HAad 搭載ナノキャリアの形成確認と高分子の内包 | 73 |
| 第四節 | HAad 搭載ナノキャリアの細胞内局在および 高分子のサイトゾル送達 | 79 |
| 第三章の考察 | | 85 |
| 総括 | | 87 |
| 実験の部 | | 90 |
| 引用文献 | | 108 |
| 謝辞 | | 110 |

略号表

| | |
|--------------------|---|
| Aad | L-2-aminoadipic acid |
| ANTS | 8-aminonaphtalene-1,2,3-trisulfonic acid |
| α -MEM | α -minimum essential medium |
| BMP | bis(monoacylglycelo)phosphate |
| Boc ₂ O | di-tert-butyl dicarbonate |
| BS | bovine serum |
| CAC | critical aggregation concentration |
| CD | circular dichroism |
| CLSM | confocal laser scanning microscope |
| CPP | cell-penetrating peptide |
| CRISPR | clustered regularly interspaced short palindromic repeat |
| DBCO | dibenzocyclooctyne |
| DCM | dichloromethane |
| Dex10-Alexa | Alexa Fluor 488-labeled polydextran (10 kDa) |
| di-4-ANEPPDHQ | 2-hydroxy-3-[2-[(2-hydroxyethyl)dimethylamino]ethyl]-4-[2-[6-(dibutylamino)-2-naphthyl]ethenyl]pyridinium dibromide |
| DIEA | <i>N,N</i> -diisopropylethylamine |
| DLS | dynamic light scattering |
| DPX | <i>p</i> -xylene-bis(pyridinium)bromide |
| DsRed | red fluorescent protein derived from coral discosoma |
| EIPA | 5-(<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -isopropyl)amiloride |
| EDT | 1,2-ethanedithiol |

| | |
|-----------------------|--|
| EGFP | enhanced green fluorescent protein |
| EGFP-His ₆ | His tag-fused EGFP |
| HBTU | 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1 <i>H</i> -benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate |
| HFIP | hexafluoroisopropanol |
| HOBt | 1-hydroxybenzotriazole |
| hR | homoarginine |
| IgG-Alexa | Alexa Fluor 488-labeled human immunoglobulin G |
| LDH | lactate dehydrogenase |
| LUV | large unilamellar vesicle |
| MWCO | molecular weight cut off |
| NPC | nuclear pore complex |
| NTA | nitrilotriacetic acid |
| PBS(+) | phosphate buffered saline containing Ca ²⁺ and Mg ²⁺ |
| POPC | 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine |
| POPG | 1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol |
| PyB | 1-pyrenebutylic acid |
| SDS-PAGE | sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis |
| sgRNA | single guide RNA |
| TEM | transmission electron microscope |
| TFA | trifluoroacetic acid |
| TIS | triisopropylsilane |

序論

抗体をはじめとする生理活性タンパク質を細胞内に送達することは医療において非常に大きな衝撃を与える^[1-3]。また、化学修飾されたペプチドやタンパク質の細胞内送達はケミカルバイオロジーの分野においても細胞内の分子間相互作用を明らかにするという点で有用である。しかしながら、そのような親水性の高い高分子は細胞膜を透過することができない。そのため細胞外物質を取り込む細胞の機構であるエンドサイトーシスが細胞外分子を細胞内に輸送する代替の経路として用いられてきた。抗体などのタンパク質をはじめとする高分子が上述の機能を細胞内で発揮するためには、エンドソームから脱出してサイトゾルに到達する必要がある^[4-12]。エンドソーム脱出を促進するような技術はこれまで多数開発されてきたが、より効率的にエンドソーム脱出を促進する技術の開発が望まれている。

エンドソーム脱出を達成するためにはエンドソーム膜の不安定化が必要である。細胞に致命的な影響を与えずにエンドソーム脱出を引き起こすためには、細胞膜には影響を与えずにエンドソーム膜のみを不安定化する必要がある。そのためには細胞膜とエンドソーム膜への指向性を変えることが求められる。主要なアプローチの一つとして、エンドソーム成熟に伴って低下したエンドソーム内 pH (pH ~ 5.0) と細胞外 pH (pH ~ 7.4) の差を利用するという方法があり、これまで様々な pH 感受性膜不安定化ペプチドやポリマーが開発されてきた。その中でも、カルボン酸を pH 感受性官能基として用いるアプローチが頻用されている。カルボン酸は細胞外の中性 pH ではイオン型で存在しているが、酸性 pH 条件下ではプロトン化して分子型となる。そのためグルタミン酸を膜傷害性ペプチドやポリマーに導入することで細胞膜との疎水性相互作用を抑制し、一方でエンドソーム内でのプロトン化によりエンドソーム膜との親和性を回復して不安定化を引き起こせるのではないかと考えられる。しかしながら、グルタミン酸のカルボキシ基

の pK_a は 4.07 であることから、エンドソーム内の低 pH 条件においては相当の割合がイオン型として存在していると考えられる。これによりエンドソーム内での膜との親和性の回復が十分に達成できないことが予想される。より優れたエンドソーム脱出ツールを開発するためには、より効果的な pH 感受性官能基を用いることや新たな視点からのデザインが求められる。

筆者の研究室ではこれまでに、高分子をサイトゾルへ送達することのできるペプチドとして「L17E」を開発した^[13]。L17E はカチオン性両親媒性ヘリックスを形成するクモ毒由来ペプチド M-lycotoxin の疎水面に存在する 17 番目のロイシンをグルタミン酸に置換したペプチドであり、上述のようなエンドソーム脱出を実現することを狙って開発された。実際に L17E と生理活性タンパク質を混合して細胞に投与することにより、約半数の細胞において生理活性タンパク質をサイトゾルへと送達することに成功した。しかしながら、詳細な作用機序解明により L17E は予想されたほどのエンドソーム脱出 (Figure 0, 経路 ii) を引き起こさないことが明らかになった^[14]。L17E はエンドサイトーシスの最初期の段階において細胞膜のラフリングを引き起こし、そこで一過性の膜透過性を向上させる (Figure 0, 経路 i) ことで 5 分という非常に短いタイムスケールで高分子をサイトゾルに送達することが分かった。

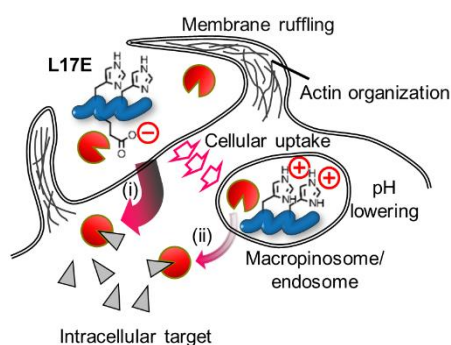


Figure 0. Schematic representation of the mode of intracellular delivery by L17E. L17E was found to have an ability to induce membrane ruffling, leading to transient permeabilization of membranes at early stages of endocytosis and cytosolic translocation of biomacromolecules (route (i)). However, endosomal escape (route (ii)) did not play a significant role in attaining cytosolic translocation.

また、L17E による高分子、特に抗体のサイトゾルへの送達には 40 μM の L17E および 0.5 ~ 1 mg/mL もの抗体を必要とする。ペプチドを用いた高分子のサイトゾルへの送達をケミカルバイオロジー分野、さらには医療方面へと応用していくことを考えると、ペプチド及び高分子の使用濃度を低下させる必要がある。第一章で筆者はまず、上述したグルタミン酸残基の pH 感受性の弱さなどを念頭に L17E のアミノ酸配列に変異を加えることで、L17E と比較してペプチドの使用濃度または高分子の使用濃度を半減することのできるペプチド「HAad」を得た。さらに第二章では 2 つの観点から HAad よりも高い活性を持つペプチドを 2 種類得ることができた。

また、特に医療方面への応用を考えたときに、現在のペプチドと高分子を混合して細胞に投与する手法では全身循環に投与した際にペプチドと高分子の体内動態を一致させることができないという致命的な問題がある。この問題を解決するために、筆者は HAad 搭載ナノキャリアの開発を目指した。HAad 搭載ナノキャリア中に高分子を内包できれば、ナノキャリアの体内動態にペプチドと高分子の体内動態を一致させることができると期待される。その第一歩として第三章ではモデルタンパク質として EGFP-His₆ を内包したナノキャリアを作製し、細胞において EGFP-His₆ のサイトゾルへの送達を行った。

第一章 L17E 改良ペプチド「HAad」の創出

L17E の活性向上を目指すうえで、筆者は L17E の弱いエンドソーム脱出能に着目した。L17E のエンドソーム脱出能を高めるために L17E 中のヒスチジン残基およびグルタミン酸残基に注目し、それらに変異を加えることでそれぞれ L17E よりも高い活性を持つ変異体を得た。さらに 2 つの変異を組み合わせることで、L17E 改良ペプチドとして HAad を得ることに成功した。HAad を用いることで、L17E と比較してペプチドの使用濃度または高分子の使用濃度を半減させることができた。

HAad を用いることで、デキストラン、抗体、Cre リコンビナーゼをサイトゾルに送達できた。さらに、マウスを用いた実験により HAad による高分子のサイトゾルへの送達が *in vivo* においても有用であることが示された。

リポソームを用いたペプチドの膜不安定化活性評価および二次構造評価により、HAad はエンドソーム内を模した環境である酸性脂質存在下かつ低 pH 下において高い膜不安定化活性およびヘリックス性を示すことが分かった。また、エンドソーム酸性化阻害剤を用いた実験により HAad の高い活性にはエンドソームの酸性化が重要であることが示唆された。

第一節 グルタミン酸残基の置換

L17E の先行研究において、L17D は L17E よりもサイトゾルに高分子を送達する活性が低いことが分かっていた^[13]。アスパラギン酸 (Asp) の β -カルボキシ基の pK_a (3.90) はグルタミン酸 (Glu) の γ -カルボキシ基の pK_a (4.07) よりも低い^[15]。これによりエンドソーム内での低 pH 環境における分子型の割合は β -カルボキシ基のほうが小さく、エンドソーム膜との相互作用に重要である疎水性が β -カルボキシ基を持つ L17D のほうが低くなっていることが低い活性に関与していると考えられる (Fig. 1A,B)。ここで、L-2-アミノアジピン酸 (Aad) はグルタミン酸よりも側鎖が 1 炭素分長いアミノ酸であり、その分疎水性が高くさらに pK_a も大きい (4.21)^[15,16]。Glu を Aad に置換することによってエンドソームにおける膜不安定化活性を高められ、結果として高分子のサイトゾルへの送達能を高められるのではないかと考えた。

Alexa Fluor 488 標識 10 kDa デキストラン (Dex10-Alexa) はエンドソームマーカーとして頻用されている高分子であり、本研究においてモデル高分子として用いた。Dex10-Alexa とペプチドを HeLa 細胞に 1 時間投与し、細胞内蛍光局在を共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM) にて観察することでサイトゾルへの高分子送達能を評価した (Fig. 1C)。ペプチドによってサイトゾルへと Dex10-Alexa が送達されれば Dex10-Alexa は細胞全体に均一に存在するように観察される。ペプチド非存在下では Dex10-Alexa は核周辺に点状のシグナルとして観察され、これはエンドソームに滞留していることを意味するが、40 μ M の L17E もしくは L17D 存在下ではそれぞれ約 50%、25%の細胞においてサイトゾルに分布する Dex10-Alexa のシグナルが観察された (Fig. 1C and D, L17E, L17D)。ここで、40 μ M の L17Aad 存在下では L17E よりも多くの約 65%の細胞においてサイトゾルに分布する Dex10-Alexa のシグナルが観察された (Fig. 1C and D, L17Aad) ことから、Glu から Aad への置換によって高分子のサイトゾルへの送達能を 15%向上させることに成功した。

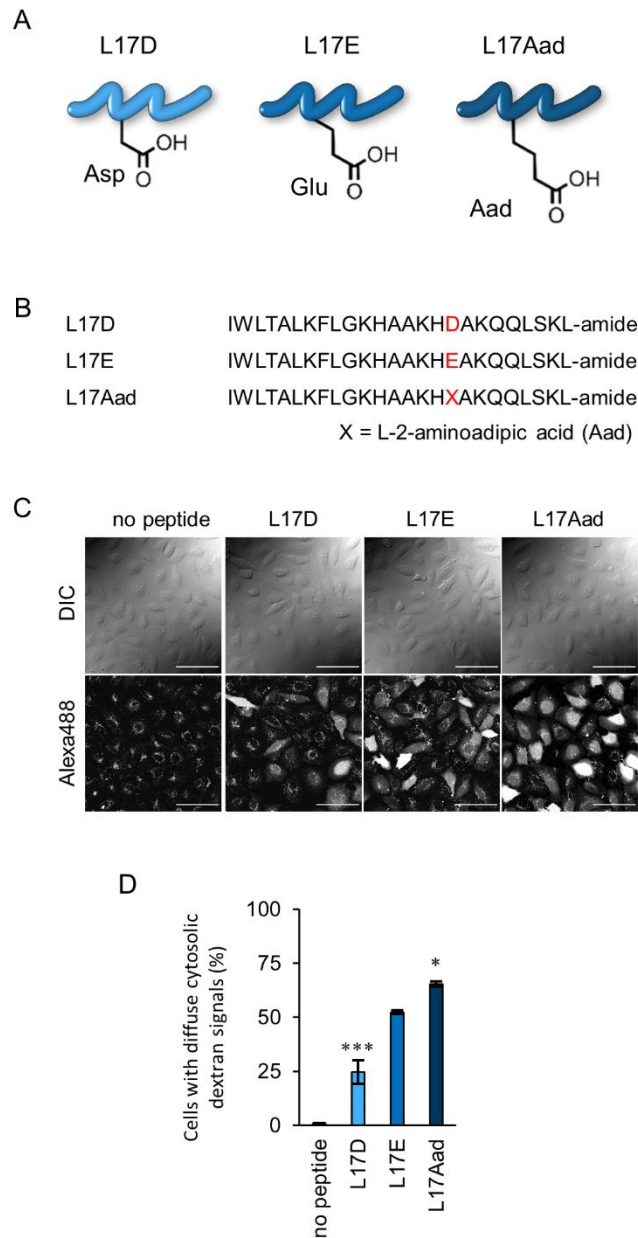


Figure 1. Effect of Glu¹⁷ substitution of L17E on cytosolic delivery activity. (A) Schematic representation of L17E and its analogs. (B) Sequences of peptides. (C) Cytosolic appearance of Dex10-Alexa after treatment with L17E and its analogs (40 μ M each) for 1 h. Scale bar, 100 μ m. (D) Percentages of cells bearing diffuse cytosolic dextran signals. Results are presented as mean \pm standard error (SE) (n = 3). *, p<0.05, ***; p<0.001 v.s. L17E (one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test).

第二節 ヒスチジン残基の置換

第一節の結果は高分子のサイトゾルへの送達において、エンドソーム内の pH 条件におけるペプチドの疎水性を向上させることの重要性を示唆するものである。L17E の配列中には2つのヒスチジン (His) が含まれる。His の pK_a は 6.0 程度である^[15]ことから、これら2つの His はエンドソーム内の pH 条件ではプロトン化し正に荷電していると考えられる。この荷電に伴ってペプチドの疎水性は減少し、ペプチドとエンドソーム膜との相互作用が減弱するのではないかと考えた筆者は、His を中性アミノ酸に置換することで疎水性減少に伴う膜との相互作用減弱を抑制できると考えた。そこで、2つの His を中性アミノ酸アラニン (Ala) に置換したペプチド「HA/E1」を得た (Fig. 2A, B)。しかし、HA/E1 は使用濃度 40 μ M において顕微鏡観察時に細胞毒性を示した (data not shown) ため、先行研究で得られていた L17E の類縁体で L17E よりも低いながらも同様の高分子のサイトゾルへの送達能を有するペプチド「L17E/Q21E」中の2つの His を Ala に置換したペプチド「HA/E2」を得た (Fig. 2A, B)。

第一節と同様の Dex10-Alexa を用いた実験から、HA/E2 は約 70%の細胞においてサイトゾルに分布する Dex10-Alexa のシグナルが観察された (Fig. 2C, D) ことから、HA/E2 は L17E よりも約 20%高いサイトゾルへの Dex10-Alexa の送達活性を持つペプチドであることが示唆された。また、L17E/Q21E では約 13%の細胞でしかサイトゾルに分布する Dex10-Alexa のシグナルが観察されなかった (Fig. 2C, D) ことから、His を Ala に置換することで劇的に高分子のサイトゾルへの送達能を高めることができたと考えられる。

His を含むペプチドは His がプロトンを吸着することで pH 低下を抑制し、より多くのプロトンと水分のエンドソーム内への移行を促進して浸透圧を増大させることによりエンドソーム崩壊を引き起こす「プロトンスポンジ効果」を持つことが提唱されている^[17,18]。L17E 中にも2つの His が含まれており、プロトンスポンジ効果を引き起こす可能性があったが、L17E は顕著なエンドソーム脱出能を有していないことから、想定され

るほどのプロトンスポンジ効果はみられないと考えられる。その理由としてプロトンスポンジ効果を引き起こすには多数の His が必要とされる^[19]ということが挙げられる。

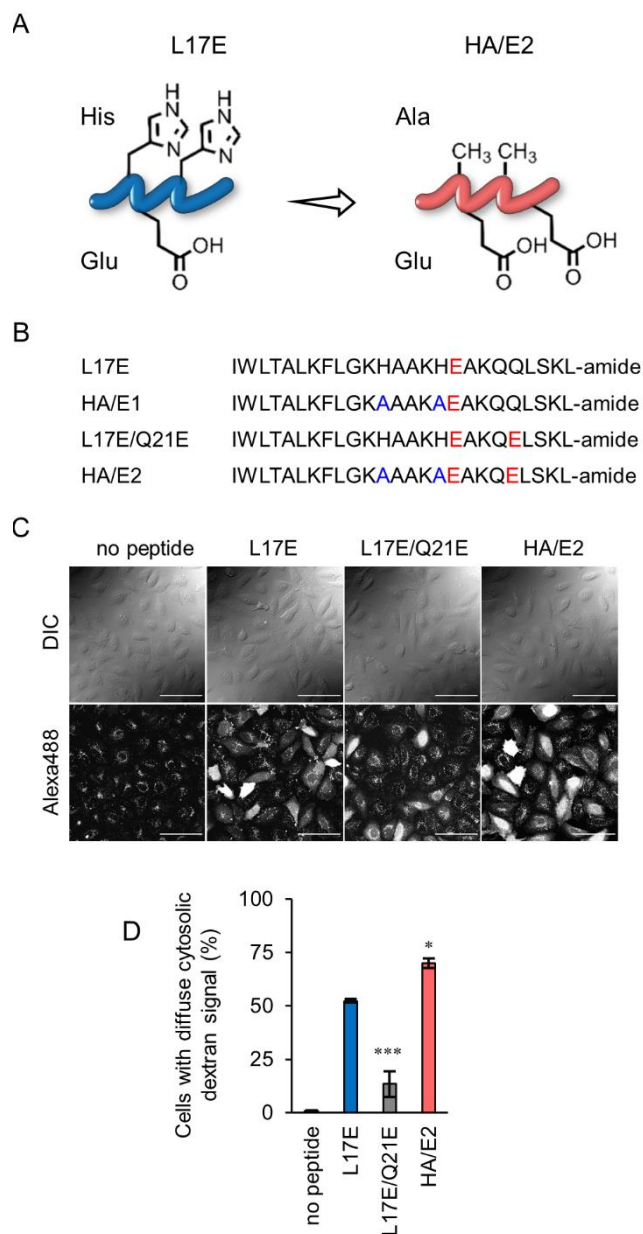


Figure 2. Improvement of cytosolic delivery efficacy of L17E by His-to-Ala substitution. (A) Outline of sequence modification. (B) Sequences of peptides bearing His-to-Ala substitutions. (C) The cytosolic appearance of Dex10-Alexa after treatment with L17E and its analogs (40 μ M each) for 1 h. Scale bar, 100 μ m. (D) Percentages of cells bearing diffuse cytosolic dextran signals. Results are presented as mean \pm SE (n = 3). *, p < 0.05, ***, p < 0.001 vs. L17E (one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test).

第三節 2つの変異の融合による HAad の導出

第一節と第二節で得られた 2 つの改良ペプチドである L17Aad と HA/E2 を組み合わせ、L17E の His を Ala へと置換し、17 番目の Glu と 21 番目の Gln を Aad に置換することで新たなペプチド「HAad」を得た (Fig. 3A, B)。第一節と同様の Dex10-Alexa を用いた実験から、HAad は約 75% の細胞においてサイトゾルに分布する Dex10-Alexa のシグナルが観察された (Fig. 3C, D) ことから、HAad は最も活性の高い L17E 変異体であることが示された。また、約半数の細胞においてサイトゾルに Dex10-Alexa を送達するのに必要な濃度は、L17E では 40 μ M であるのに対して HAad では 20 μ M と、半減させることに成功した。このことから、HAad は L17E の 2 倍の活性を有するといえる。Dex10-Alexa の細胞内総取り込み量をフローサイトメトリーで解析した結果からも、HAad は L17E よりも約 30% 多くの量を細胞内に送達できることが示された (Fig. 3E)。

HAad は L17E と同様に細胞膜のラフリングを引き起こすことがアクチン骨格の挙動観察から示された (Fig. 4A)。また HAad による Dex10-Alexa のサイトゾルへの送達はアクチンの挙動を伴うエンドサイトーシスの阻害剤として知られる 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA) 存在下で顕著に抑制された (Fig. 4B) ことから、HAad は L17E と同様の作用機序を有していることが示唆された。Dex10-Alexa のサイトゾル送達の間依存性を評価した実験 (Fig. 3F) において、L17E と HAad はともに 5 分の段階で約半数の細胞においてサイトゾルに Dex10-Alexa を送達した。興味深いことに、L17E においてはインキュベーション時間を延長しても送達された細胞の割合に変化はなかったが、HAad においてはインキュベーション時間を延長するに従い送達された細胞の割合が増加した。この結果は HAad がインキュベーション時間延長に伴うエンドソームの成熟化を感知して、L17E と比較して高いエンドソーム膜不安定化能を発揮したものだと考えられる。

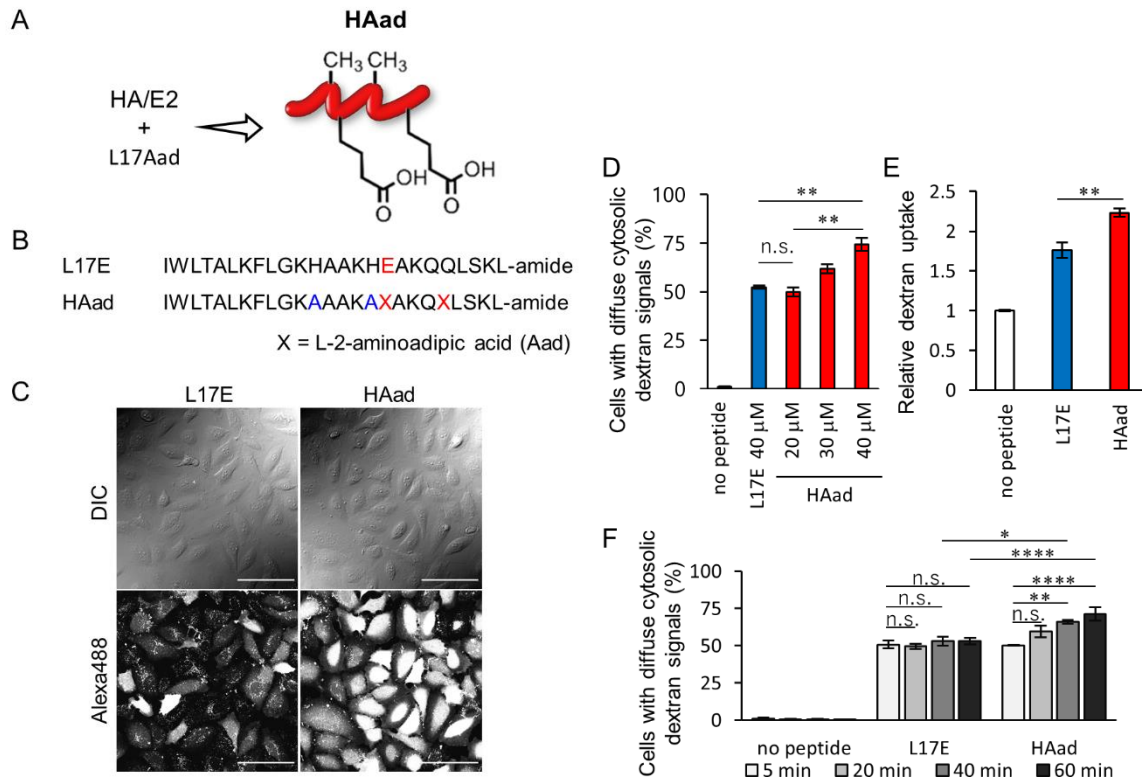


Figure 3. High efficacy cytosolic delivery peptide HAAd. (A) Merged design of HA/E2 and L17Aad to obtain HAAd. (B) Sequence of HAAd. (C) High efficacy cytosolic delivery of Dex10-Alexa with the help of HAAd (40 μ M). Incubation, 1 h. Scale bar, 100 μ m. (D) Percentages of cells bearing diffuse cytosolic dextran signals (incubation, 1 h). (E) Comparison of total cellular uptake amount of Dex10-Alexa by the incubation with each peptide (40 μ M). (F) Time-dependent increase in the percentage of cells with diffuse cytosolic dextran signals by the treatment with L17E or HAAd (40 μ M each). Results are presented as mean \pm SE ($n = 3$). ****; $p < 0.0001$, **; $p < 0.01$, *; $p < 0.05$, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly-significant difference test (D, F) or Student's t-test (E).

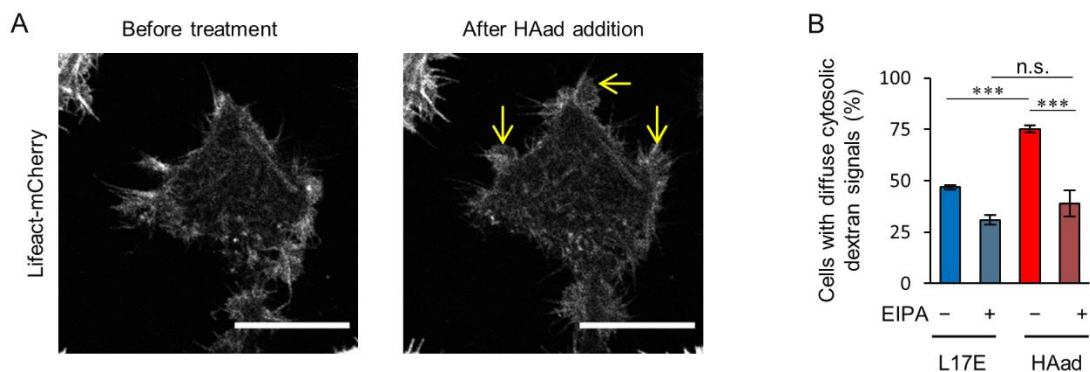


Figure 4. (A) HAAd induces actin organization and membrane ruffling at HeLa cells expressing Lifeact-mCherry after 5 min treatment with 20 μ M HAAd. Scale bars; 20 μ m. (B) Effects of Effects of 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA) on the percentages of cells having diffuse cytosolic Dex10-Alexa signals. Results are presented as mean \pm SE ($n = 3$). ***; $p < 0.001$, n.s.; not significantly different (one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer's honestly-significant difference test).

第四節 ペプチドの物性と作用機序に関する考察

ペプチドの膜不安定化活性は、蛍光色素である 8-aminonaphthalene-1,2,3-trisulfonic acid (ANTS) と消光剤である *p*-xylene-bis(pyridinium)bromide (DPX) を内包させた直径 100 nm の large unilamellar vesicle (LUV) を用いたリポソームリーケージアッセイにより評価した^[20]。ペプチドによりリポソーム膜が傷害されると ANTS と DPX が放出されることにより消光が解除され、蛍光量が増大する。細胞膜を模した組成として 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) からなる LUV を、エンドソーム膜を模した組成として POPC と 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol (POPG) を 3 : 1 (mol : mol) で含む LUV を用いた。エンドソームには酸性脂質である bis(monoacylglycelo)phosphate (BMP) が豊富に含まれる^[21,22]ため、BMP の異性体である POPG を用いた。また、細胞外とエンドソーム内の pH として pH 7.4 および pH 5.0 の条件で実験を行った。

先行研究と同様に、L17E は POPC LUV に対してどちらの pH においても膜不安定化活性を示さなかった一方で、POPC/POPG LUV に対してペプチド/脂質比 (mol/mol, P/L 比) 10^{-2} 以上で膜不安定化活性を示した (Fig. 5 左)。この結果は L17E の膜不安定化活性に関して脂質感受性は認められるが pH 感受性は顕著には認められないことを示す。それに対して HAad は POPC/POPG LUV に対して pH 5.0 の時に pH 7.4 よりも高い膜不安定化活性を示した (Fig. 5 右)。HAad の pH 5.0 における POPC/POPG LUV への膜不安定化活性は同条件における L17E のそれよりも高いことから、HAad は L17E よりも高いエンドソーム膜に対する膜不安定化活性を有している可能性が示唆された。

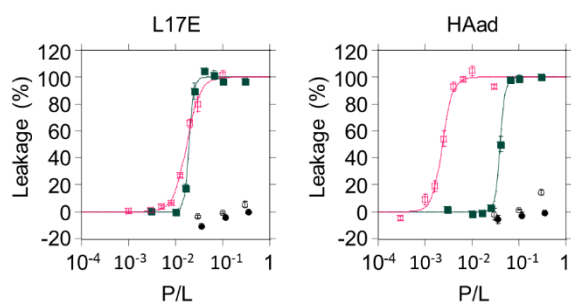


Figure 5. Liposomal dye leakage by the treatment with L17E and HAad. Open magenta square, POPC/POPG (3:1) LUV at pH 5.0; filled green square, POPC/POPG (3:1) LUV at pH 7.4; open circle, POPC LUV at pH 5.0; filled circle, POPC LUV at pH 7.4. Temperature; 25°C, lipid concentration; 100 μ M.

ペプチドの二次構造を明らかにするために円偏光二色性 (CD) スペクトル測定を行った。222 nm におけるモル楕円率はペプチドのヘリックス含有率を評価する値として用いられる^[23]。L17E は POPC/POPG LUV 存在下でもほとんどヘリックス構造を形成しない (Fig. 6 左) のに対して、HAad は POPC/POPG LUV 存在下かつ pH 5.0 の場合において高いヘリックス性を示した (Fig. 6 右)。この高いヘリックス性は同条件の LUV に対する高い膜不安定化に関与していると考えられる。

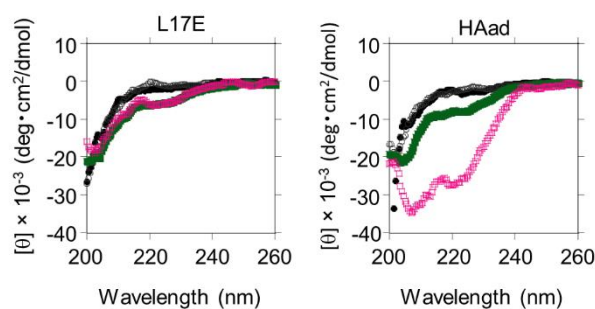


Figure 6. CD spectra of these peptides. Open magenta square, POPC/POPG (3:1) LUV at pH 5.0; filled green square, POPC/POPG (3:1) LUV at pH 7.4; open circle, POPC LUV at pH 5.0; filled circle, POPC LUV at pH 7.4. Temperature; 25°C, peptide concentration; 20 μM, lipid concentration; 2 mM.

L17E および HAad の膜への結合能を評価するために、CD スペクトル測定と同じ組成および P/L 比においてトリプトファン結合アッセイを行った。L17E と HAad はともに N 末端から 2 番目のアミノ酸としてトリプトファン (Trp) を含む。ペプチドが膜に結合すると Trp 周辺の環境が疎水性となる結果、280 nm で励起した際の蛍光波長がブルーシフトを引き起こす^[24]。POPC LUV に対してはどちらのペプチドにおいてもブルーシフトは観察されなかったが、POPC/POPG LUV に対してはブルーシフトが見られた (Fig. 7) ことから、L17E および HAad はともに酸性脂質を含む膜に優先的に結合することが示唆された。リーケージアッセイ、CD スペクトル測定の結果と合わせて考察すると、HAad への変異によって高まった低 pH 条件での疎水性によって膜の疎水部との相互作用が向上しヘリックス構造が誘起され、それにより L17E よりも高い膜不安定化活性を pH 5.0 で発揮したと考えられる。

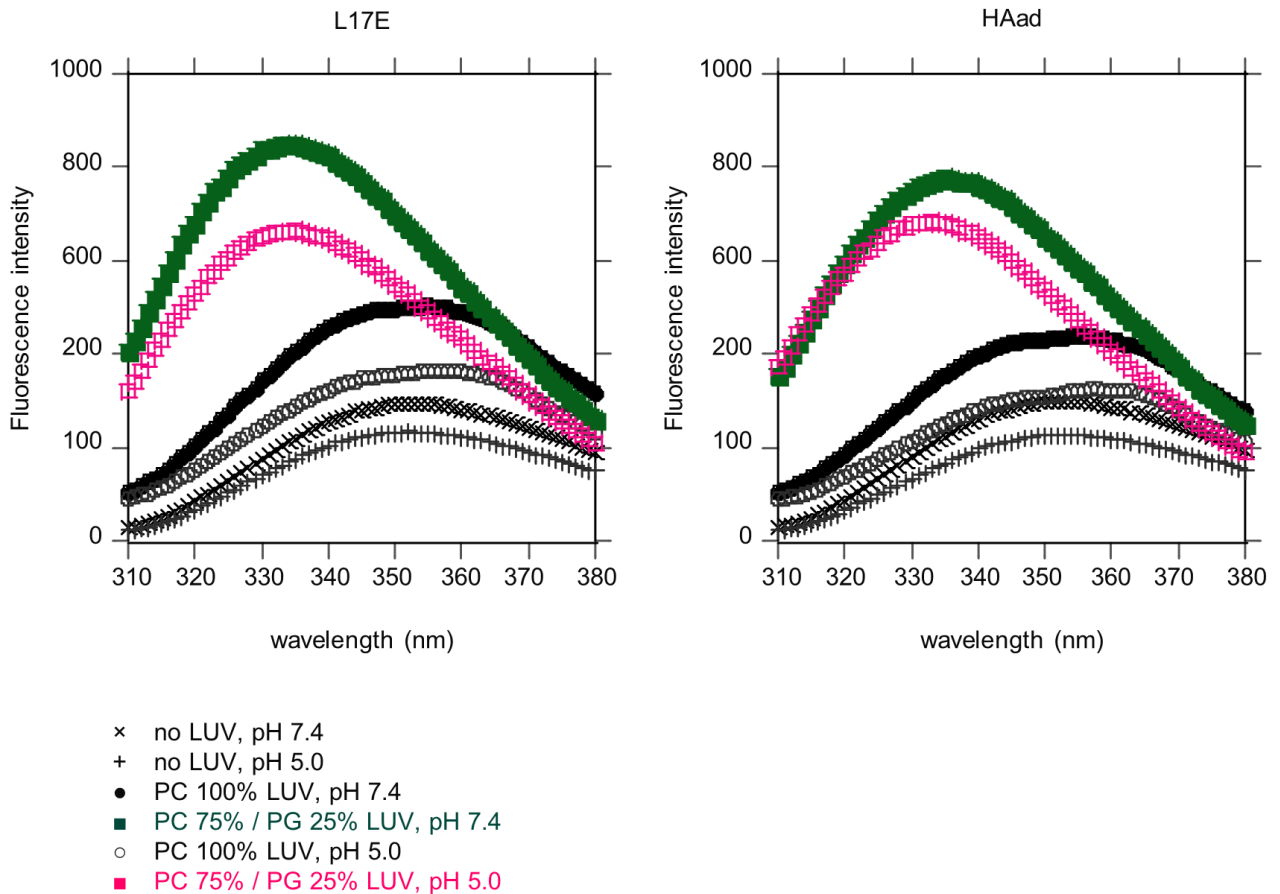


Figure 7. Tryptophan binding assay of L17E and HAad (20 μ M each) in the presence or absence of POPC or POPC/POPG (3:1) LUVs (lipids, 2 mM) in 10 μ M 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) containing 150 mM NaCl. Temperature, 25°C, peptide concentration; 20 μ M, lipid concentration; 2 mM.

L17E 中の His はヘリックス構造を形成した際には親水面と疎水面の界面に位置する (Fig. 8)。低 pH における His の正電荷は酸性脂質との相互作用に有利に働くと考えられるが、一方でヘリックス構造を形成した際に脂質膜へ「深く」挿入される際には不利に働くと考えられる。His から Ala への置換により疎水面が拡張されることで、HAad ではヘリックス構造を形成して脂質膜に深く挿入されることが可能になり、ヘリックス構造が安定化することができたと考えられる。

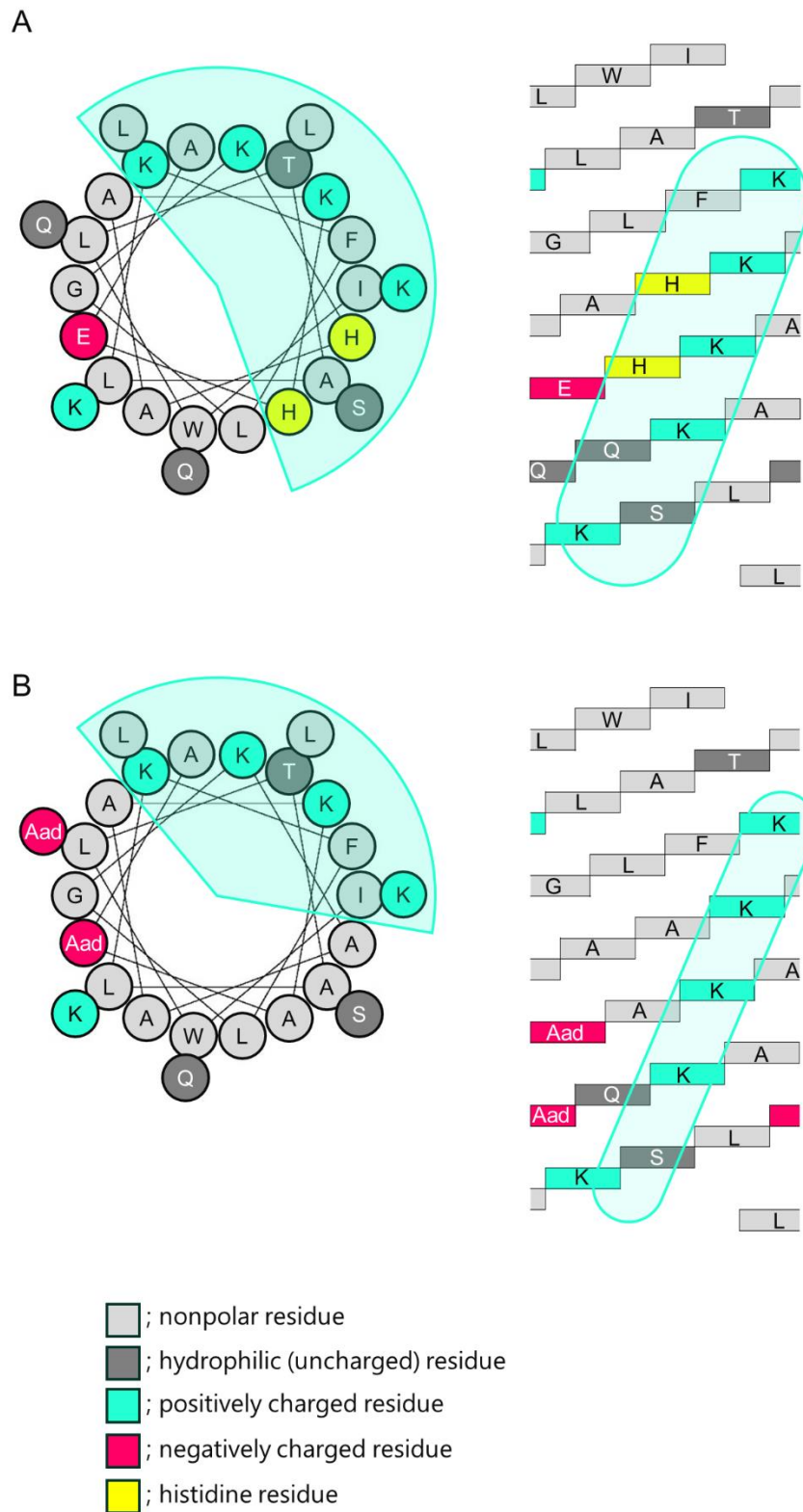


Figure 8. Helical wheel and helical net projection of (A) L17E and (B) HAad. The area colored by cyan represents the hydrophilic face of α -helical structure at pH 5.0 (histidines are protonated). Positions of histidines are highlighted in yellow.

エンドソーム酸性化阻害剤を用いた実験から、HAad の高い活性にエンドソーム酸性化が寄与していることが示された。塩化アンモニウムおよびクロロキン (CQ) の細胞への投与はエンドソームの酸性化を阻害する^[25]。L17E の活性にこれらのエンドソーム酸性化阻害剤は影響を与えなかったが、一方で HAad の活性は阻害剤存在下で約 75% から約 50% まで低減した (Fig. 9)。このことから、HAad の L17E と比較して向上した高分子のサイトゾルへの送達能は、エンドソームの酸性化を感知してヘリックス構造をとることによるエンドソーム膜の不安定化に伴う高分子のエンドソーム脱出に起因することが示唆された。

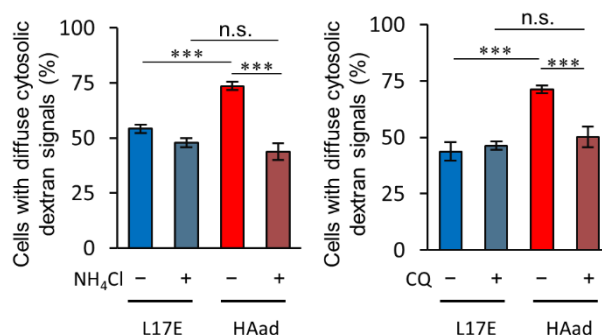


Figure 9. Effects of NH₄Cl and chloroquine (CQ) on the percentages of cells having diffuse cytosolic Dex10-Alexa signals. Results are presented as mean ± SE (n = 3). ***, p<0.001, n.s.; not significantly different (one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer's honestly-significant difference test).

HAad によるエンドソーム膜の不安定化を実際に確認するために、galectin 8 を用いた実験を行った。galectin 8 は β -ガラクトシド認識タンパク質であり^[26]、エンドソームが傷害されていない場合はサイトゾルで発現しているが、エンドソーム膜が傷害されるとエンドソーム内の β -ガラクトシドを認識しエンドソーム内へと集積する^[27]。高感度緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と融合させた galectin 8 を発現する細胞に HAad を投与したところ、傷害されたエンドソームに集積した galectin 8-EGFP の点状のシグナルが観察された (Fig. 10, arrows) ことから、HAad が実際にエンドソーム膜を不安定化していることが示された。

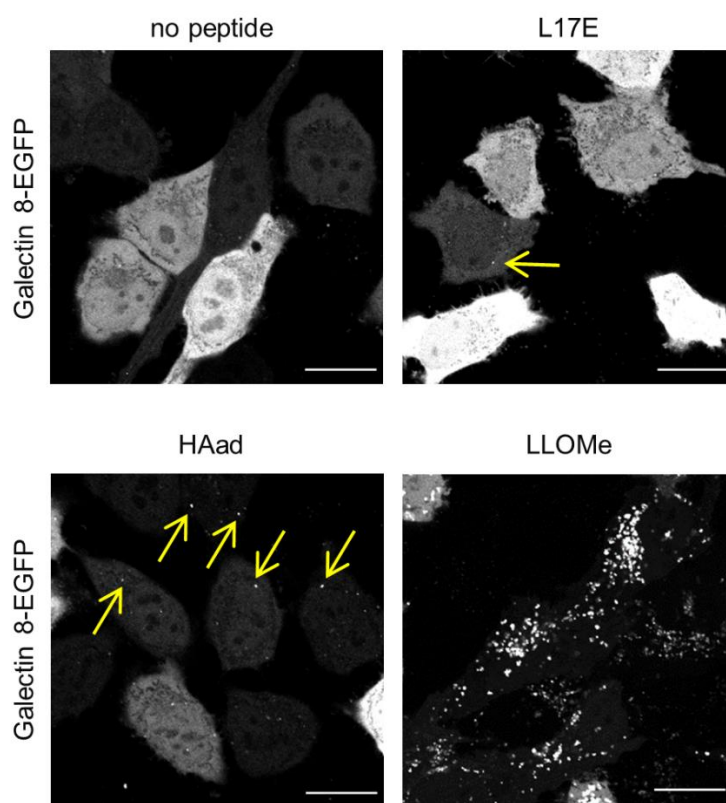


Figure 10. Rupture of endosomal/lysosomal membranes suggested by puncta of galectin 8-EGFP signals. Scale bar 20 μ m. LLOMe (= L-leucyl-L-leucine methyl ester) is known to induce rupture in lysosomal lumen by forming lysosomotropic polymer (Leu-Leu)_n-OMe ($n \geq 3$) catalyzed by lysosomal dipeptidyl peptidase I.^[28,29]

第五節 HAad を用いた機能性タンパク質の *in vitro* におけるサイトゾル送達

HAad を用いて抗体および Cre リコンビナーゼを培養細胞のサイトゾルに送達した。まず、500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Alexa Fluor 488 標識ヒト免疫グロブリン G (IgG-Alexa) と 40 μM の L17E もしくは HAad を 1 時間 HeLa 細胞に投与したところ、それぞれ約 50% および 75% の細胞においてサイトゾルに分布する IgG-Alexa のシグナルが観察された (Fig. 11A)。カーゴである IgG-Alexa の濃度を 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から 200, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と低下させていったところ、L17E は少なくとも 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上でないと顕著なサイトゾルへの IgG-Alexa の送達が認められないのに対して、HAad は 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても約 30% の細胞において IgG-Alexa をサイトゾルに送達できることが分かった (Fig. 11B, Fig. 12)。

サイトゾルに送達された抗体が抗原認識能を保持しているかどうかを評価するために、Alexa Fluor 594 標識核膜孔複合体抗体 (anti-NPC IgG-Alexa594) をサイトゾルに送達した。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の anti-NPC IgG-Alexa594 と 40 μM の L17E もしくは HAad を HeLa 細胞に投与し 1 時間インキュベートしたところ、HAad 処理細胞では核周辺に局在する anti-NPC IgG-Alexa594 のシグナルが観察されたが、L17E 処理細胞では微弱なシグナルしか観察できなかった。

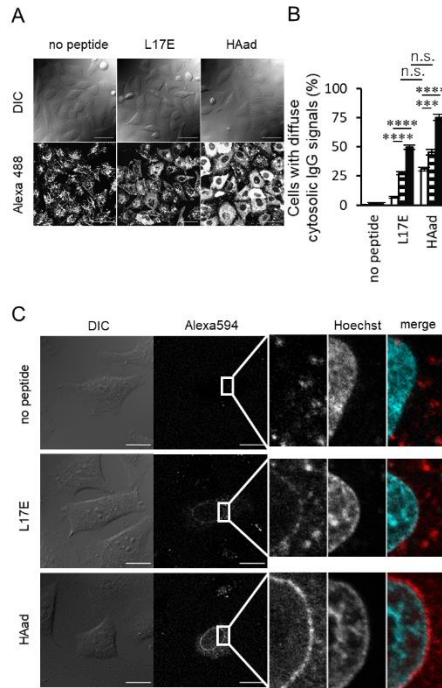


Figure 11. Superior ability of HAAd in cytosolic cargo delivery. (A) Delivery of IgG-Alexa (500 µg/mL) in the presence of peptides. Scale bar, 50 µm. (B) Percentages of the cells having cytosolic IgG-Alexa signals. Open, hatched, and filled columns represent the incubation with 50, 200, and 500 µg/mL IgG-Alexa, respectively. (C) Localization of anti-NPC IgG-Alexa594 on nuclear membranes by the incubation with HAAd. Scale bar, 20 µm. Results are presented as mean ± SE (n = 3). ****; p<0.0001, ***; p<0.001, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly-significant difference test.

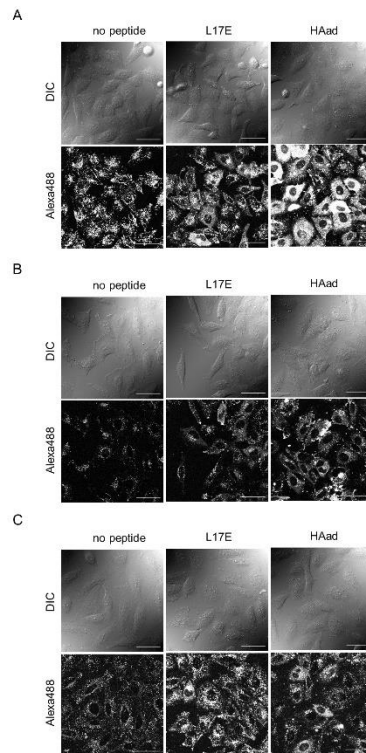


Figure 12. CLSM observation of HeLa cell treated with IgG-Alexa in the presence of 40 µM peptides for 1 h. IgG-Alexa: (A) 500, (B) 200, and (C) 50 µg/mL, respectively. Scale bar, 50 µm.

続いて、Cre リコンビナーゼのサイトゾルへの送達を Cre-loxP 組換えシステムを用いて評価した^[30]。loxP-DsRed-STOP-loxP-EGFP (DsRed; Discosoma 赤色蛍光タンパク質) を含むプラスミドをトランスフェクトした HeLa 細胞に対して、5 μM もしくは 10 μM の Cre リコンビナーゼを L17E もしくは HAad 存在下において投与した。Cre リコンビナーゼが活性を保持したままサイトゾルに送達されれば、loxP-DsRed-STOP 部分が組換えによって切り離されることで、DsRed を発現していた細胞は EGFP を発現するようになる (Fig. 13A)。

CLSM 観察の結果、HAad と 10 μM の Cre リコンビナーゼを投与された細胞では約 60%の細胞において組換えが見られた。一方で L17E と 10 μM の Cre リコンビナーゼを投与された細胞では約 40%の細胞でしか組換えが見られず、同等の組換えを引き起こすのに必要な Cre リコンビナーゼの濃度は HAad を用いた場合では L17E の半分の 5 μM であった (Fig. 13B, C)。

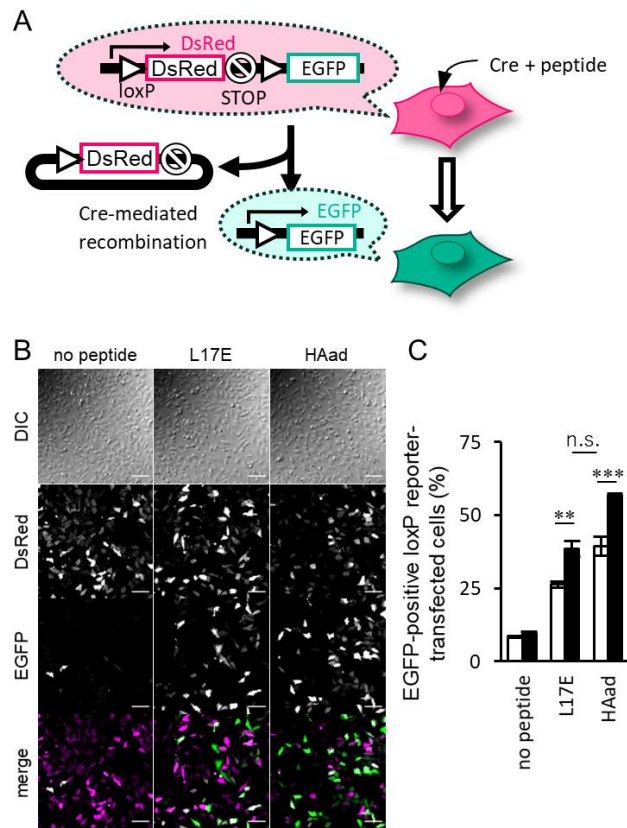


Figure 13. Superior ability of HAAd in cytosolic cargo delivery. (A) Schematic representation of the Cre-loxP recombination assay system. (B) EGFP expression after the treatment with 10 μ M Cre in the presence of 40 μ M peptides. Scale bar, 100 μ m. (C) EGFP-positive cells (%) in loxP reporter transfected cells. Open and filled columns represent the use of 5 and 10 μ M Cre, respectively. Results are presented as mean \pm SE ($n = 3$). ***, $p < 0.001$, **, $p < 0.01$, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly-significant difference test.

第六節 HAad を用いた Cre リコンビナーゼの in vivo におけるサイトゾル送達

HAad による高分子のサイトゾルへの送達が in vivo でも可能かどうかを調べるための予備実験として、Cre リポーターノックインマウス「R26GRR」^[31]に対する Cre リコンビナーゼと HAad の脳室内投与実験を行った。このモデルマウスにおいては、Cre リコンビナーゼのサイトゾルへの送達により EGFP からタンデム DsRed (tDsRed) を発現するようになる。脳室は脳脊髄液で満たされた脳内の空洞であり、脳室内投与は薬物の脳内送達の経路として期待されている^[32]。

Cre リコンビナーゼ 5 μM と HAad 40 μM を R26GRR マウスの右側脳室に脳室内投与した。投与してから7日後、マウスを麻酔下で固定し、脳を取り出し冠状面で切断した (Fig. 14A)。切断面の観察を行ったところ、Cre リコンビナーゼと HAad を共投与したマウスにおいては断面全体での EGFP の発現に加えて投与部位である右側脳室周辺での tDsRed の発現が確認された (Fig. 14B)。さらに詳細な観察を行うため薄片を作製し核染色と共に顕微鏡観察を行ったところ、tDsRed のシグナルは脳室を裏打ちする上皮細胞および、脳室内に存在し脳脊髄液の産生に関与する脈絡叢において観察された (Fig. 14C)。

以上の結果から、HAad による高分子のサイトゾルへの送達が in vivo においても有用である可能性が示唆された。一方で tDsRed のシグナルは脳実質からは観察されなかったことから、組織内部でも高分子をサイトゾルに送達するためには HAad が搭載された新たなドラッグデリバリーシステムを開発する必要があると考えられる。

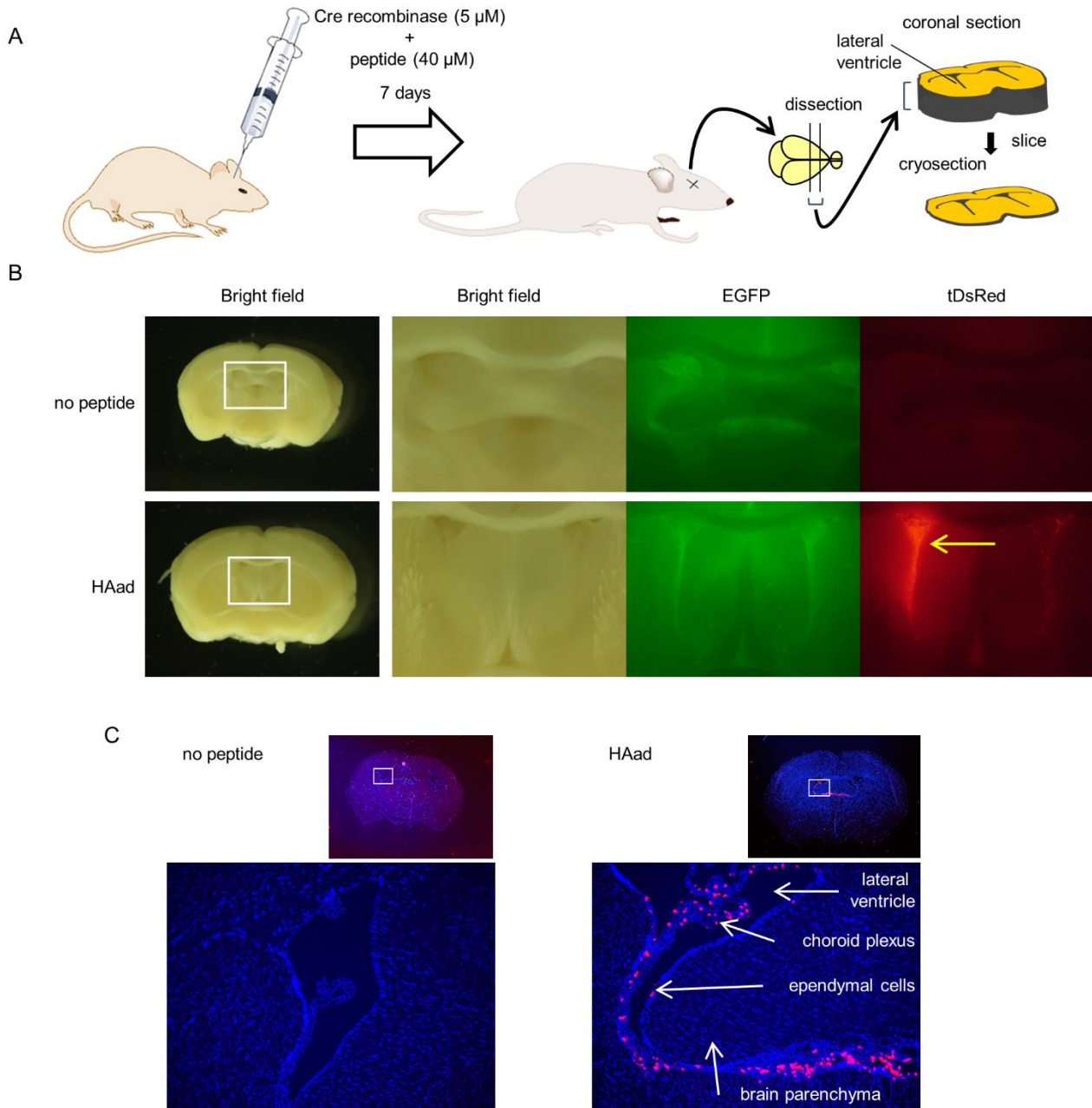


Figure 14. Peptide-mediated delivery (intracerebroventricular administration) of Cre recombinase into ependymal cells and choroid plexus faced to the lateral ventricle. (A) Schematic representation of Cre delivery into the brain. (B, C) Fluorescence images of the coronal section (B) and cryosection (C) of the brain. Right panels in (B) are enlarged images of the boxed areas in the left. Cre recombinase only (5 μ M, “no peptide”) or Cre recombinase and HAad (5 μ M and 40 μ M in 5 μ L 0.9%NaCl, respectively) were injected into the right lateral ventricle. Expression of tDsRed, indicating the cytosolic delivery of Cre, were observed around the sites of injection with peptides (arrows). Lower panels in (C) represent enlarged pictures in the boxed areas in upper panels. Nuclei were stained with DAPI (blue). The tDsRed signals were predominantly observed at ependymal cells and choroid plexus, which face to lateral ventricle, whereas no significant signals were observed in brain parenchyma.

第一章の考察

エンドソーム内の環境でのヘリックス構造の形成はペプチドとエンドソーム膜との相互作用を増強しエンドソーム膜の不安定化を引き起こす。この観点から筆者は親ペプチドである L17E よりも活性の高いペプチドである HAad を創出した。

本研究はエンドソーム不安定化ペプチドのデザインという観点から2つの知見を与える。1つは、L17E と L17Aad の間の違いである側鎖の炭素鎖長が1炭素分違うことによって pK_a および疎水性が僅かに違うことが高分子をサイトゾルに送達する活性に影響を与えうるという点、そして2つ目は、His はこれまでエンドソーム成熟に伴う pH 低下によって「プロトンスポンジ効果」を付与するために用いられてきた^[17,18]が、His の数が少ない条件では pH 低下に伴う His の荷電によって疎水性が減弱すると考えられる^[19]ため、His を Ala に置換することがエンドソーム膜の不安定化には有利に働くと考えられる点である。このことはエンドソーム脱出を達成するためにプロトンスポンジ効果を用いることの多い周辺領域に一石を投じる結果であるといえる。

HAad は細胞膜を模した条件 (POPC LUV, pH 7.4) と比較してエンドソーム膜を模した条件 (POPC/POPG LUV, pH 5.0) においてランダムコイル構造からヘリックス構造への変化および強い膜不安定化活性を示した。また、L17E と HAad はともにエンドサイトーシスの最初期の段階において細胞膜のラフリングを引き起こし、そこで一過性の膜透過性を向上させることで5分という非常に短いタイムスケールで高分子をサイトゾルに送達することができるが、HAad はさらに高いエンドソーム膜不安定化能を発揮することで高分子をサイトゾルに送達できる可能性が示唆された。HAad は高分子をサイトゾルへと送達する様々なツール^[4-12]の中でも、その作用機序において L17E の有する細胞膜のラフリング誘起に伴う一過性の膜透過性向上による迅速な高分子のサイトゾル送達という特殊な作用機序に加えて、エンドソーム脱出という頻用される作用機序の2つを有しているという点で新規性の高いユニークな存在であるといえ、高分子のサイトゾ

ル送達における新たな概念を提供するものといえる。

HAad は Dex10-Alexa のサイトゾルへの送達において L17E の半分の濃度で同等の活性を発揮することから、L17E よりも 2 倍高い活性を有していることが示され、また、Cre リコンビナーゼの送達実験から一定の活性発現に必要な高分子の濃度を半減させることに成功した。これらの成功はエンドソームにおける酸性脂質の増加および pH の低下という 2 つの観点に注目することで達成された。高分子をサイトゾルへと送達するツールにおいて、エンドソームからの脱出を促進する方策としては、1) エンドソーム内の低 pH 条件への選択性を高める、2) エンドソーム内の酸性脂質への選択性を高める、3) ペプチドの安定性を高める、4) ペプチドをオリゴマー化する、などが挙げられる^[33]。本研究では L17E の開発によって 2 を、HAad への改変によって 1 を達成した。よって今後は HAad の安定性を高めるための D 体 HAad の作製や、そのオリゴマー化によってさらなるエンドソーム脱出効率向上が見込まれる。

第二章 HAad の化学修飾による高活性化

L17E 中のアミノ酸残基を置換することで L17E よりも 2 倍活性の高いペプチド HAad を得ることに成功した筆者は、次に HAad に化学修飾を加えることでより活性の高いペプチドが得られるのではないかと考えた。

第二章第一節では、膜透過性ペプチド (cell-penetrating peptide, CPP) 中に豊富に含まれるアルギニン (Arg) 残基のグアニジノ基が持つ、リジン (Lys) 残基のアミノ基よりも高い塩基性及び強い脂質頭部との水素結合形成能力に着目し、HAad 中の Lys のアミノ基をグアニジノ化したペプチド HAad-hR を作製した。HAad-hR は HAad の 1/4 の濃度で高分子をサイトゾルに送達する活性を有しており、HAad-hR を用いることで Cas9/single guide RNA (sgRNA) 複合体のサイトゾルへの送達によるゲノム編集を引き起こすことができた。

第二章第二節では、HAad への疎水性基の導入による膜との親和性向上を狙って N 末端もしくは C 末端にプロピオニル基、ヘキサノイル基、デカノイル基、コレステリルヘミスクシニル基、ピレンブチリル基を導入したペプチドを合成した。その中でもピレンブチリル基 (pBu) を N 末端に導入したペプチド pBu-HAad は HAad の 1/20 の濃度で高分子をサイトゾルに送達する活性を有していた。Dex10-Alexa のサイトゾルへの送達の時間依存性を評価した実験や各種阻害剤を用いた実験から、pBu-HAad の活性は膜との親和性の向上や脂質パッキング緩和作用によるものであることが示唆された。

第一節 グアニジノ基の導入

Arg 残基は CPP に豊富に含まれており、その膜透過において重要な役割を示すことが分かっている^[34,35]。本節では HAad のアミノ基をグアニジノ基に置換することで、HAad の構造的特徴を CPP と類似させることの活性への影響を評価する。

第一部 グアニジノ基導入 HAad の活性評価

HAad のアミノ基のグアニジノ基への置換、すなわち Lys からホモアルギニン (hArg, hR) への置換は固相合成途上、樹脂上に担持されたペプチド上で行った (Fig. 15)。Fmoc-Lys(Mtt)-OH (Fmoc = 9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Mtt = 4-methyltrityl) を用いて、側鎖を保護された状態でペプチド鎖を固相樹脂上で構築した。N 末端を di-tert-butyl dicarbonate (Boc₂O) で保護したのち、hexafluoroisopropanol (HFIP)/dichloromethane (DCM) (1:4 (v:v)) で Mtt 基のみを選択的に脱保護した^[36]。露出した Lys 側鎖のアミノ基に対して 1-amidinopyrazole hydrochloride を *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) 存在下で反応させることによりアミノ基のグアニジノ基への置換が達成された。最後に trifluoroacetic acid (TFA)/1,2-ethanedithiol (EDT) (95:5 (v:v)) で処理することでペプチドの脱保護と樹脂からの切り出しを行い、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製した。質量分析によって目的の Lys から hR への置換が行われたペプチド、HAad-hR を得たことを確認した。

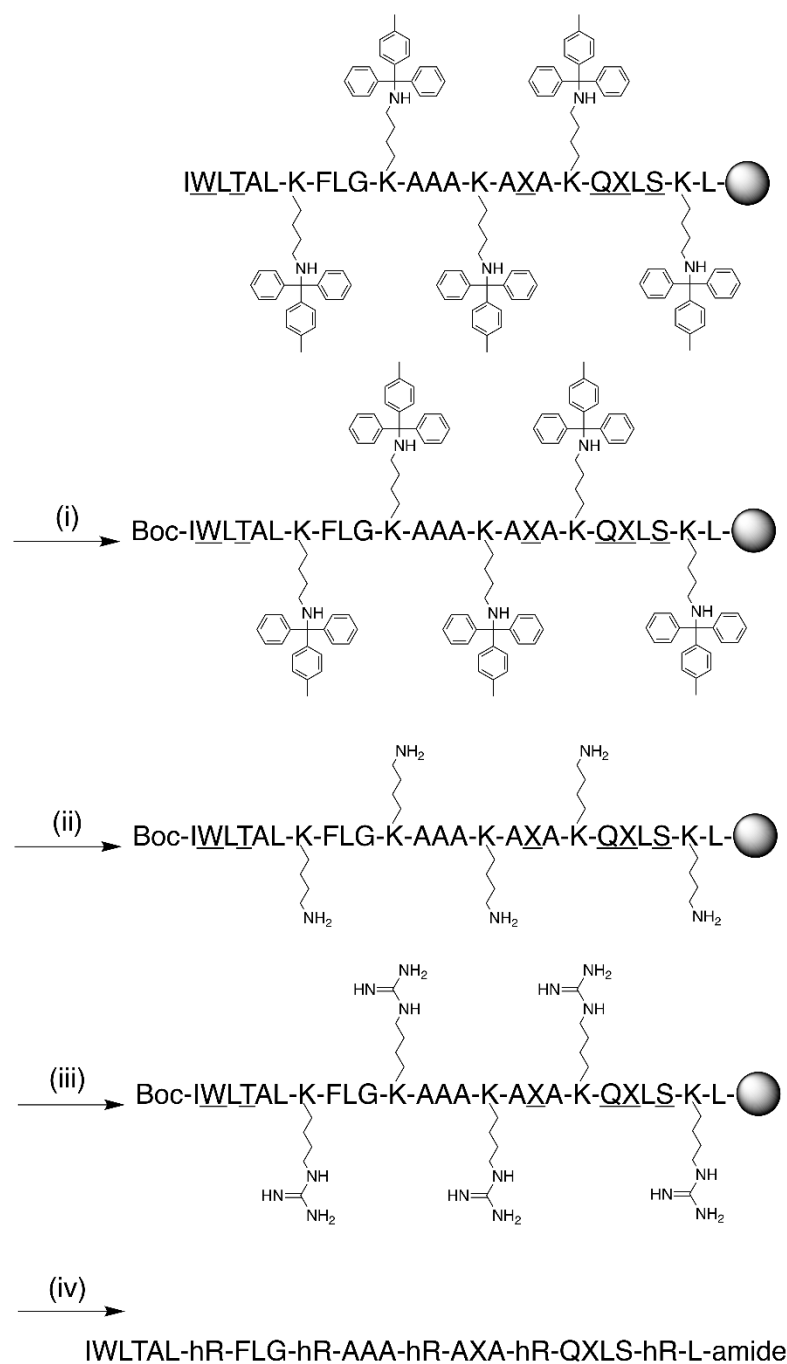


Figure 15. Synthesis scheme of HAad-hR. X; L-2-aminoadipic acid (Aad). (i) di-tert-butyl dicarbonate (4 eq.), 4-methylmorpholine (1 eq.); (ii) hexafluoroisopropanol and dichloromethane (1:4 (v:v)); (iii) 1-amidinopyrazole hydrochloride (20 eq.), *N,N*-diisopropylethylamine (20 eq.); (iv) trifluoroacetic acid and 1,2-ethanedithiol (95:5 (v:v)). Amino acids on solid-phase resin shown by one letter codes with underlines represent side chain protected amino acids: W = Trp(Boc); T = Thr(tBu); Q = Gln(Trt); X = Aad(OtBu); S = Ser(tBu).

細胞内の脱水素酵素の活性から細胞生存率を算出する WST-8 assay^[37]により HAad-hR の細胞毒性を評価した (Fig. 16A)。HAad-hR は 10 μ M 以下では劇的な細胞毒性を示さなかったため以降の実験では 10 μ M で用いることとした。

第一章と同様の Dex10-Alexa のサイトゾルへの送達実験から、HAad-hR は 10 μ M でも HAad 40 μ M と同等の活性を有することが示された (Fig. 16B, C)。このことから、HAad-hR は HAad の約 4 倍の活性を有するといえる。さらに、Dex10-Alexa の細胞内総取り込み量をフローサイトメトリーで解析したところ、HAad-hR は HAad よりも 66% 多くの量を細胞内に送達できることが示された (Fig. 16D)。

血清タンパク質の存在は時としてサイトゾルに高分子を送達するペプチドの活性に影響を与える。非働化ウシ血清含有培地に Dex10-Alexa と HAad 40 μ M または HAad-hR 10 μ M を混合し細胞と 1 時間インキュベートしたところ、HAad 存在下では約 55% の細胞で Dex10-Alexa のシグナルがサイトゾルで観察された一方で、HAad-hR 存在下では約 23% の細胞でしかシグナルが観察されなかった (Fig. 16E, F)。このことから、HAad-hR のほうが HAad よりも血清タンパク質の影響を受けやすいと考えられる。

HAad-hR の高い活性が hR の存在に起因するのか、それともグアニジノ基の存在が重要なのかを評価するために、hR のかわりに Arg に置換したペプチド「HAad-R」を合成した。驚くべきことに HAad-R は HAad と同じ 40 μ M においても Dex10-Alexa をサイトゾルに送達する活性をほとんど有していなかった (Fig. 16G)。Arg と hArg は、hArg のほうが側鎖の炭素鎖長が 1 炭素分長いことを除けばほぼ同じ構造をしているのにもかかわらず HAad-R に活性がほとんどみられなかった。HAad-hR と HAad-R には LUV 存在下における二次構造に差はほとんどみられなかった (Fig. 17B, C) ことから考察するに、僅かな疎水性の違いが高分子をサイトゾルに送達する活性に影響を与えたのだと考えられる。

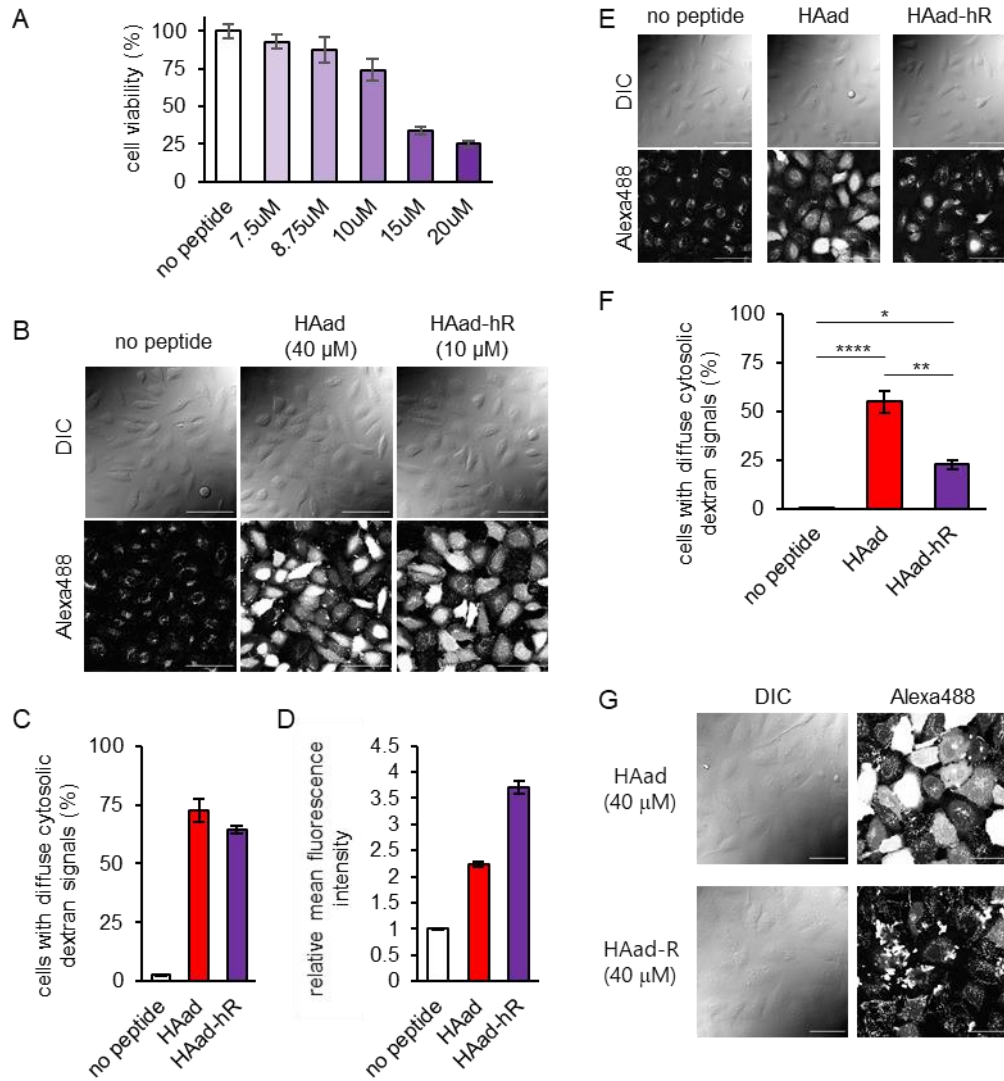


Figure 16. Cytosolic biomacromolecule delivering activity of HAad-hR. (A) Cytotoxicity of HAad-hR. HeLa cells were treated with given concentrations of HAad-hR for 1 h. Cell viability was analyzed by WST-8 assay. (B) Cytosolic distribution of Dex10-Alexa after treatment with 40 μ M HAad and 10 μ M HAad-hR for 1 h. Scale bar, 100 μ m. (C) Percentages of cells with diffuse cytosolic labeling with Dex10-Alexa in (C). (D) Total cellular uptake of Dex10-Alexa after treatment with 40 μ M HAad and 10 μ M HAad-hR for 1 h (flow cytometry analysis). (E, F) Diminishment of cytosolic Dex10-Alexa localization by HAad-hR when incubated in serum-containing α -MEM. HeLa cells were treated with peptides (40 μ M HAad and 10 μ M HAad-hR) and Dex10-Alexa (200 μ g/mL) in serum-containing α -MEM for 1 h. (G) Lack of marked cytosolic localization of Dex10-Alexa in the cells treated with 40 μ M HAad-R for 1 h. Scale bar, 50 μ m. Results are presented as mean \pm SE (n = 3). ****; p<0.0001, **; p<0.01, *; p<0.05 by Tukey-Kramer's honestly-significant difference test.

第二部 グアニジノ基導入 HAad の物性評価

第一章第四節と同様の実験により HAad-hR の膜不安定化活性および二次構造を、人工膜モデル系を用いて評価した。

膜不安定化活性の評価において、第一章第四節で示したように、HAad は POPC LUV に対して膜不安定化活性を示さず、一方で POPC/POPG LUV に対して膜不安定化活性を持っており、それは pH 5.0 の場合 ($[P/L]_{50} = 0.0023$) のほうが pH 7.4 の場合 ($[P/L]_{50} = 0.040$) よりも強かった (Table 1)。それに対して HAad-hR は POPC/POPG LUV ($[P/L]_{50}$ at pH 5.0 = 0.0056; $[P/L]_{50}$ at pH 7.4 = 0.0089) のみならず POPC LUV ($[P/L]_{50}$ at pH 5.0 = 0.024; $[P/L]_{50}$ at pH 7.4 = 0.044) に対しても膜不安定化活性を示した (Fig. 17A and Table 1)。HAad と比較すると POPC/POPG LUV pH 5.0 への選択性は低かった (HAad: $[P/L]_{50}(\text{pH } 5.0) / [P/L]_{50}(\text{pH } 7.4) = 0.058$; HAad-hR: $[P/L]_{50}(\text{pH } 5.0) / [P/L]_{50}(\text{pH } 7.4) = 0.63$)。HAad と HAad-hR の膜不安定化活性に違いが見られる理由としては、アミノ基のグアニジノ基への置換によってペプチドと脂質頭部との相互作用が増強された結果 pH および脂質組成の変化による影響が顕著でなくなったからではないかと考えられる。

CD による二次構造評価では、第一章第四節と同様に、HAad ではヘリックス性の指標である $[\theta]_{222}$ の絶対値が大きい順に POPC/POPG LUV pH 5.0 (27) \gg POPC/POPG LUV pH 7.4 (8.0) $>$ POPC LUV pH 7.4 (2.7) $>$ POPC LUV pH 5.0 (2.5) となり、POPC/POPG LUV pH 5.0 存在下においてのみ高いヘリックス性を示した (Table 2)。同様の傾向が HAad-hR にもみられたが、POPC/POPG LUV pH 5.0 存在下での HAad-hR の $[\theta]_{222}$ の絶対値 (21) は HAad のそれ (27) より低く、一方で POPC/POPG LUV pH 7.4 存在下での HAad-hR の $[\theta]_{222}$ の絶対値 (15) は HAad のそれ (8.0) より大きかった (Fig. 17B and Table 2)。POPC/POPG LUV pH 5.0 存在下での結果から、HAad-hR に含まれる hR は HAad 中の Lys と比較して完全なヘリックス構造をとりにくいアミノ酸であることが示唆された。

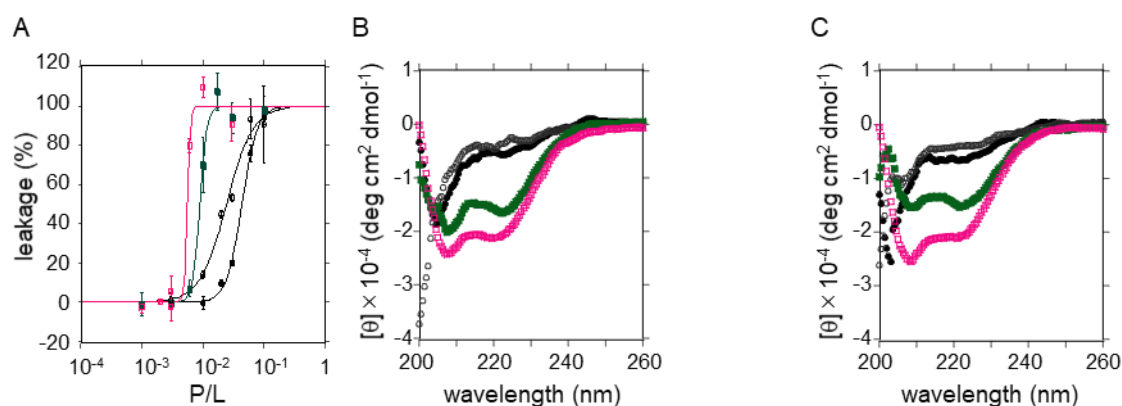


Figure 17. (A) Liposomal dye leakage upon treatment with HAad-hR, (B) circular dichroism (CD) spectra of HAad-hR and (C) CD spectra of HAad-R in the presence of liposomes. Open magenta square, POPC/POPG (3:1) LUV at pH 5.0; filled green square, POPC/POPG (3:1) LUV at pH 7.4; open circle, POPC LUV at pH 5.0; filled circle, POPC LUV at pH 7.4. Temperature; 25°C, lipid concentration; 100 μ M (A) and 2 mM (B and C), peptide concentration; 20 μ M (A).

Table 1. Half-maximal effective peptide/lipid ratios ($[P/L]_{50}$) to yield leakage for PC/PG and PC LUVs by HAad-hR and HAad

| | PC/PG | | PC only | |
|---------|--------|--------|---------|--------|
| | pH 5.0 | pH 7.4 | pH 5.0 | pH 7.4 |
| HAad-hR | 0.0056 | 0.0089 | 0.024 | 0.044 |
| HAad | 0.0023 | 0.040 | N/D | N/D |

Table 2. Molecular ellipticity at 222 nm ($[\theta]_{222}$) (10^3 deg cm² dmol⁻¹) of HAad-hR and HAad in the presence of PC/PG and PC LUVs

| | PC/PG | | PC only | |
|---------|--------|--------|---------|--------|
| | pH 5.0 | pH 7.4 | pH 5.0 | pH 7.4 |
| HAad-hR | -21 | -15 | -4.1 | -6.5 |
| HAad | -27 | -8.0 | -2.5 | -2.7 |

第三部 機能性タンパク質のサイトゾル送達

次に Cre-loxP による組換えアッセイ系を用いて HAad と HAad-hR の機能性タンパク質のサイトゾル送達活性を比較した (Fig. 18A)。loxP-DsRed-STOP-loxP-EGFP プラスミドを一過的に発現する HeLa 細胞に対して Cre リコンビナーゼ (5 or 10 μM) と HAad 40 μM または HAad-hR 10 μM を 1 時間投与した。24 時間後に CLSM 観察から組換え効率を算出したところ、HAad-hR 存在下では 5 または 10 μM の Cre リコンビナーゼによって 50% および 63% の細胞で組換えが観察された (Fig. 18B, C)。この組換え効率は HAad のそれよりも高いものであった。

HAad-hR は Dex10-Alexa や Cre リコンビナーゼだけでなく抗体をサイトゾルに送達する活性も有していた。IgG-Alexa (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と HAad 40 μM または HAad-hR 10 μM を混合して HeLa 細胞と 1 時間インキュベートした。HAad-hR 処理細胞において IgG-Alexa のシグナルがサイトゾルから観察される細胞の割合 (37%) は HAad 処理細胞 (45%) よりも低かったが、サイトゾルでの IgG-Alexa のシグナル強度は HAad-hR 処理細胞のほうが高かった (Fig. 18D, E)。

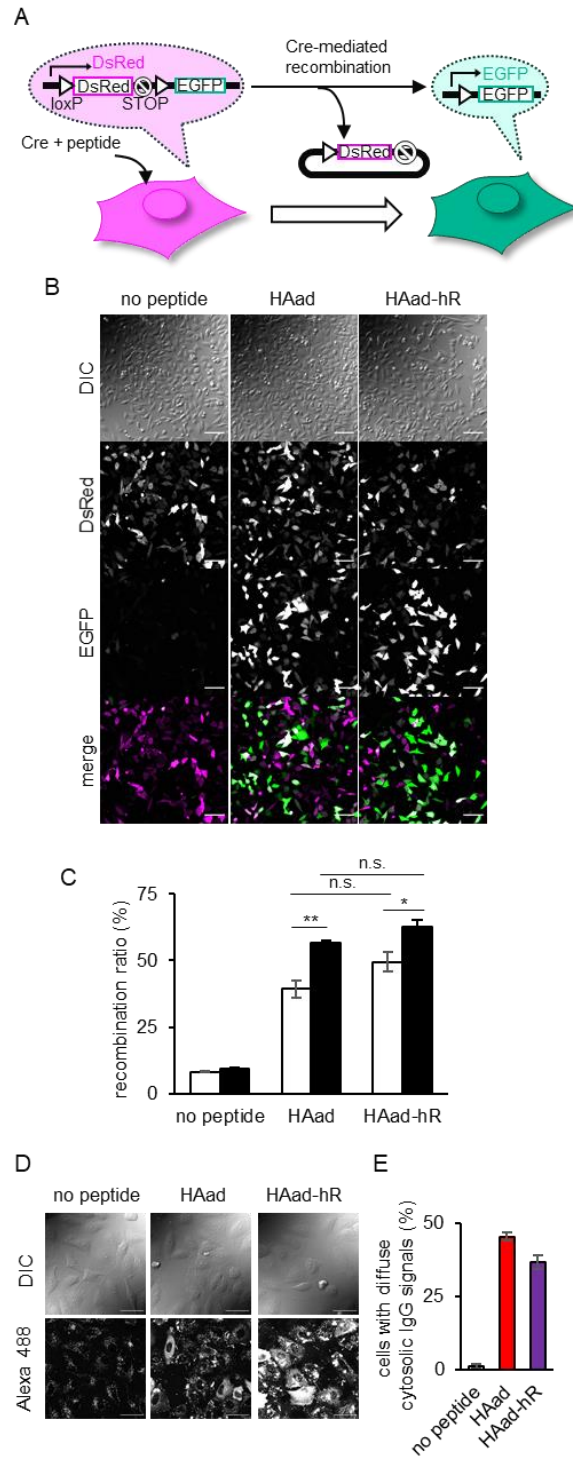


Figure 18. (A) Schematic representation of the Cre-loxP recombination assay system. (B) EGFP expression after treatment with 10 μM Cre in the presence of 40 μM HAAd and 10 μM HAAd-hR. Scale bar, 100 μm . (C) EGFP-positive cells (%) in loxP reporter-transfected cells. Open and filled columns represent the use of 5 and 10 μM Cre, respectively. Results are presented as the mean \pm SE ($n = 3$). ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, n.s.: not significantly different based on Tukey–Kramer’s honestly significant difference test. (D) Delivery of Alexa488-IgG (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the presence of 40 μM HAAd and 10 μM HAAd-hR (incubation, 1 h). Scale bar, 50 μm . (E) Percentages of cells in (D) with cytosolic IgG-Alexa signals.

第四部 CRISPR/Cas9 システムのサイトゾル送達

CRISPR/Cas9 システムの細胞内送達はドラッグデリバリーシステムの分野において近年注目されている^[38]。カチオン性脂質を用いることで効率的な Cas9 の細胞内送達が達成されているが、カチオン性脂質の持つ潜在的な毒性や肺への集積性などといった問題がその *in vivo* への応用を妨げている。そこで HAad や HAad-hR による CRISPR/Cas9 システムの細胞内送達の可能性を評価することとした。評価系として Cas9 (TrueCut Cas9 protein v2, Invitrogen) と single guide RNA (sgRNA; TrueGuide Synthetic sgRNA for human HPRT1, Invitrogen) を用い、これらを Cas9 Plus Reagent (Invitrogen) 存在下で混合することにより Cas9/sgRNA 複合体 (ribonucleoprotein, RNP) を得た。HeLa 細胞に対し HAad 40 μ M または HAad-hR 10 μ M 存在下で RNP を 6 時間投与した。細胞を洗浄してさらにインキュベーションし、2 日後のゲノム編集効率を GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen) により算出した (Fig. 19A)。

ペプチド非存在下では二本鎖切断に由来する 250bp のバンドは検出されなかったことから、ゲノム編集が起らなかったことが分かる (Fig. 19B)。一方で HAad-hR 存在下では 250bp のバンドが明確に観察されたことから、HAad-hR は Cas9/sgRNA 複合体をサイトゾルに送達する活性を有することが明らかとなった。また算出されたゲノム編集効率は 22% であった。HAad 存在下でもゲノム編集は確認されたが、その効率は HAad-hR よりも低い 16% であった。これらのゲノム編集効率はカチオン性脂質であるトランスフェクション試薬の Lipofectamine CRISPRMAX による編集効率 (63%, Fig. 19C) には及ばないが、HAad-hR の Cas9/sgRNA 複合体の細胞内送達への利用可能性を示唆するものである。

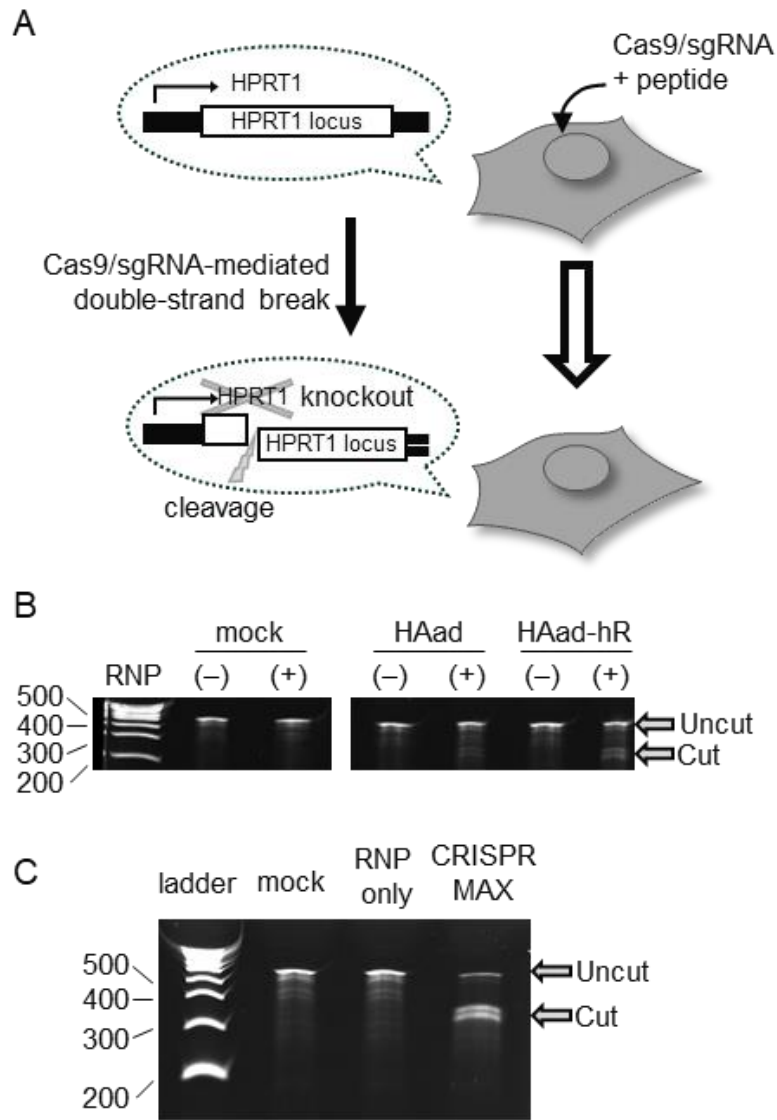


Figure 19. Delivery of the Cas9/sgRNA complex. (A) Schematic illustration of Cas9/sgRNA-mediated endogenous gene knockout. HeLa cells were treated with a complex of Cas9 protein/sgRNA (human HPRT1) and Cas9 Plus Reagent in the presence of 40 μ M HAad or 10 μ M HAad-hR for 6 h. HPRT1 knockout was analyzed using GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit. (B) Gene knockout was analyzed via non-denaturing polyacrylamide gel electrophoresis. A double-strand break in the target sequence was attained in HAad- and HAad-hR-treated cells. (C) Double-strand break in target sequence by the delivery of the sgRNA targeting HPRT1/Cas9 protein, transfected with Lipofectamine CRISPRMAX following manufacturer's protocol.

第二章第一節の考察

HAad の Lys から hArg への変換により膜との相互作用様式や膜不安定化活性が変化した。それにもかかわらず、HAad-hR は HAad と同等の高分子をサイトゾルに送達する活性を有していた。また HAad-hR は HAad のプラットフォーム上に CPP と共通する構造であるグアニジノ基を有するペプチドであるといえる。HAad-hR を用いることで Cas9/sgRNA 複合体の細胞内送達によるターゲット遺伝子座での 2 本鎖切断を引き起こすことに成功した。さらなる研究が必要であるが、グアニジノ基を有する HAad-hR はアミノ基を有する HAad よりも脂質頭部との相互作用が強いことが、HAad と HAad-hR の間に生まれた物性及び高分子のサイトゾルへの送達活性における相違点の原因ではないかと考えられる。よく誤解されることだが、L17E や HAad は共有結合した高分子をサイトゾルへと届けるペプチドではないという点で CPP とは異なる。本節で開発した HAad-hR は HAad に多くの CPP が有する特徴であるグアニジノ基^[34,35]を搭載することで、HAad よりも 66% 多くの Dex10-Alexa を細胞内へと送達することができた。このことは高分子をサイトゾルへと送達する様々なツール^[4-12]に CPP の特徴を組み合わせるといふ戦略が有効であることを示唆する結果であるといえよう。

第一章における L17E と L17Aad の間の違いにもみられるように、HAad-hR と HAad-R の結果を比較したとき、側鎖 1 つにつきたった 1 炭素分の変化が高分子をサイトゾルに送達する活性に大きく影響することが示唆された。ホモアルギニンよりもさらに 1 炭素分長いアミノ酸を導入した HAad の開発によるさらなる活性向上も期待される。

第二節 HAad へのピレンブチリル基の導入による活性向上

膜と疎水性基との疎水性相互作用によって HAad の膜との親和性を向上させるために、プロピオニル基、ヘキサノイル基、デカノイル基、コレステリルヘミスクシニル基、ピレンブチリル基を HAad の N 末端もしくは C 末端に導入したペプチドを各種合成した。その中でも細胞膜のパッキングを緩和すると考えられるピレンブチリル基を N 末端に導入したペプチド「pBu-HAad」が最も活性が高かった。この高い活性には細胞膜のパッキング緩和作用が寄与している可能性が示唆された。

第一部 ペプチドの合成

第二節で用いた疎水性基導入 HAad は固相樹脂上で合成した (Fig. 20)。HAad の N 末端もしくは C 末端にテトラグリシンリンカーを介して Fmoc-Lys(Mtt)-OH を提示したペプチドを、側鎖を保護された状態で樹脂上で合成した。Boc₂O を用いた N 末端の Boc 基による保護後、HFIP/DCM (1:4 (v:v)) での Mtt 基の選択的脱保護^[35]ののち、露出した Lys 側鎖のアミノ基に対してプロピオン酸、ヘキサン酸、デカン酸、コレステリルヘミコハク酸、1-ピレンブタン酸を 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate (HBTU), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), DIEA 存在下で反応させることによって疎水性基を導入した。最後に TFA/EDT (95:5 (v:v)) を反応させペプチドを樹脂から切り出すとともに側鎖の脱保護を行い、HPLC によって精製した。質量分析によって目的のペプチドを得たことを確認した。

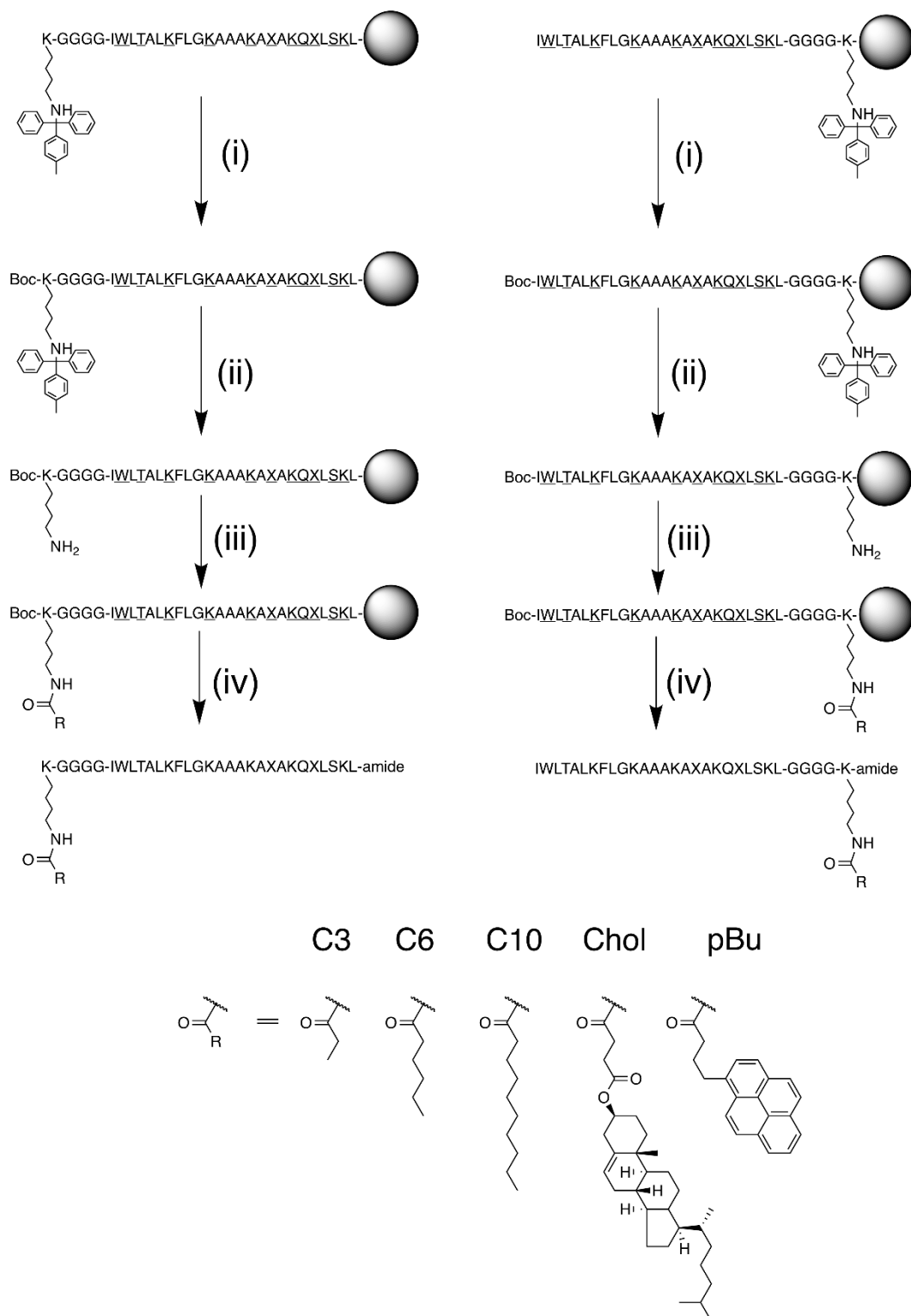


Figure 20. Outline of peptide synthesis and final peptide structures. (i) di-tert-butyl dicarbonate (4 eq.), 4-methylmorpholine (1 eq.); (ii) hexafluoroisopropanol and dichloromethane (1:4 (v:v)); (iii) RCOOH (10 eq.), 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate (10 eq.), 1-hydroxybenzotriazole (10 eq.); *N,N*-diisopropylethylamine (20 eq.). (iv) trifluoroacetic acid and 1,2-ethanedithiol (95:5 (v:v)). Amino acids on solid-phase resin shown by one letter codes with underlines represent side chain protected amino acids: W = Trp(Boc); T = Thr(tBu); K = Lys(Boc); X = Aad(OtBu); Q = Gln(Trt); S = Ser(tBu).

第一部 アシル基導入 HAad の活性評価

まず、構造のより単純なアシル基を疎水性基として用いたときの HAad のサイトゾルへの Dex10-Alexa の送達促進効果を調べた。アシル基 HAad として N 末端もしくは C 末端にそれぞれプロピオニル基 (C3) が導入された C3-HAad, HAad-C3, ヘキサノイル基 (C6) が導入された C6-HAad, HAad-C6, デカノイル基 (C10) が導入された C10-HAad, HAad-C10 (Fig. 21A) に関して細胞操作において顕著な毒性を示さない濃度を決定するために WST-8 assay を行った (Fig. 21B)。結果、以下の濃度は顕著な毒性が見られず、より長鎖のアシル基を導入するほど、また、アシル基を N 末端に導入したペプチドのほうが C 末端に導入したペプチドよりも毒性が強くと表れた：C3-HAad; 40 μ M, HAad-C3; 40 μ M, C6-HAad; 20 μ M, HAad-C6; 30 μ M, C10-HAad; 2 μ M, HAad-C10; 10 μ M。

上記の濃度を用いて Dex10-Alexa のサイトゾル送達実験を行った (Fig. 21C, D)。ペプチドと Dex10-Alexa を 1 時間細胞とインキュベートし、そののちの細胞内蛍光局在を CLSM により観察した。N 末端にアシル基を導入したペプチドよりも C 末端に導入したペプチドを用いた際により多くの細胞で Dex10-Alexa のシグナルがサイトゾルで認められた。この傾向は毒性の強弱の傾向と逆であった。C 末端にアシル基を導入したペプチドの中でも、HAad-C10 は HAad の 1/4 の濃度でほぼ同程度の割合の細胞でのサイトゾルへと Dex10-Alexa を送達する活性を有していた。このことから、HAad-C10 がアシル基導入 HAad の中では最も高い活性を有するペプチドであるといえる。しかしながらこの際に必要な HAad-C10 の濃度 (10 μ M) は HAad-hR と同等であった。HAad-hR よりも低濃度で活性を発揮するペプチドを得ることを目指し、第二部、第三部においてコレステリルヘミスクシニル基、ピレンブチリル基の導入効果を検討した。

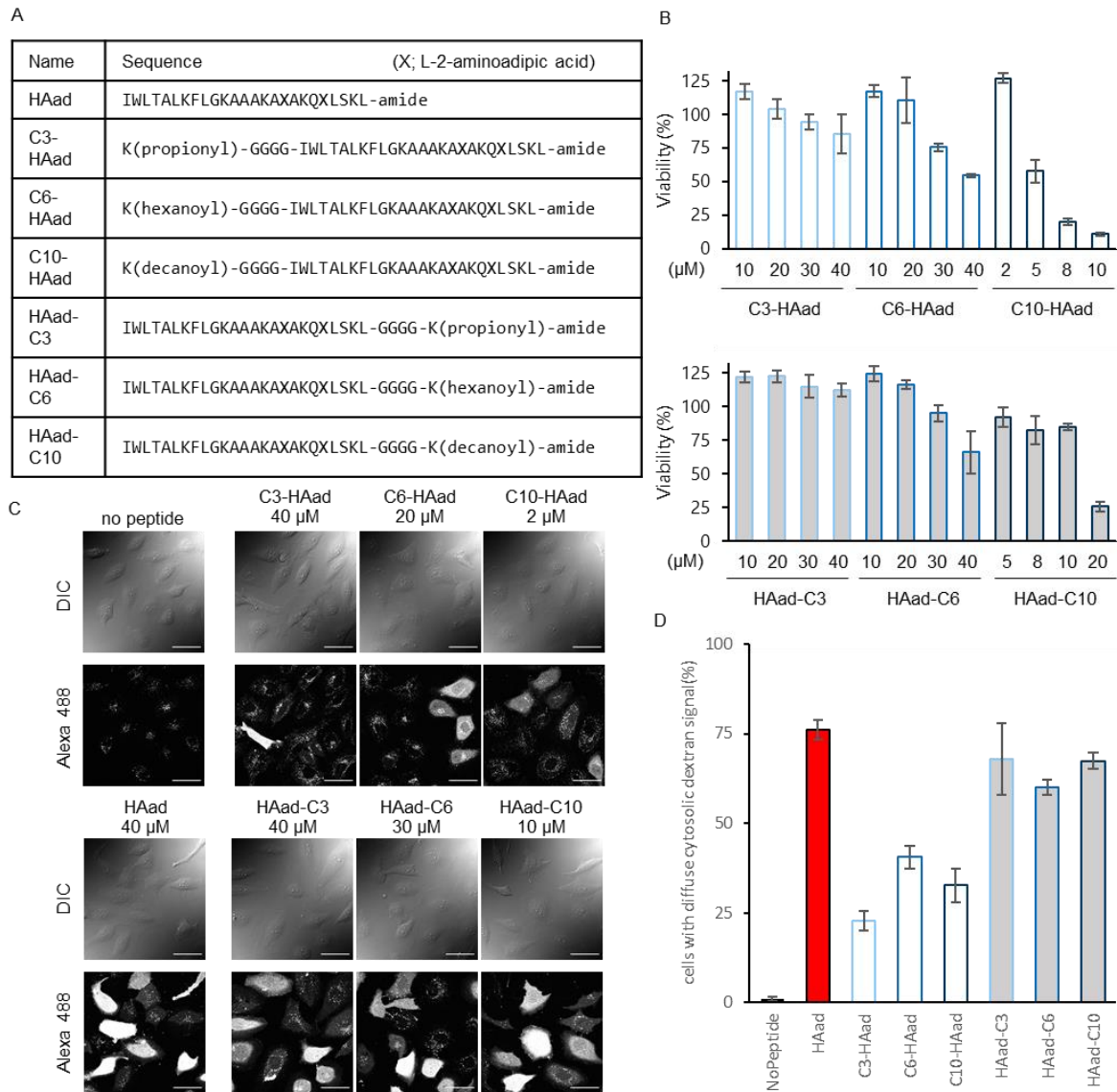


Figure 21. Effect of conjugation of hydrocarbon to HAad. (A) Sequences of peptides. (B) Cytotoxicity of peptides treated for 1 h in serum-free α -MEM. (C) Cytosolic delivery of Dex10-Alexa delivered by peptides in serum-free α -MEM. Scale bars; 50 μ m. (D) Percentage of cells showing diffuse cytosolic dextran signals. Results are shown as mean \pm SE (n = 3).

第二部 コレステリルヘミスクシニル基導入 HAad の活性評価

コレステリルヘミスクシニル基を HAad の N 末端もしくは C 末端に導入したペプチドとして Chol-HAad, HAad-Chol (Fig. 22A) を用いて、第一部と同様に WST-8 assay から顕著な毒性を示さない濃度を決定した (Fig. 22B)。この結果をもとに、Chol-HAad, HAad-Chol とともに 5 μ M を用いて同様に Dex10-Alexa のサイトゾル送達実験を行った (Fig. 22C, D)。その結果、Chol は C10 に比べより疎水性が高いと考えられるにもかかわらず、Chol-HAad, HAad-Chol とともに顕著な Dex10-Alexa のサイトゾル送達効果は認められなかった。コレステリルヘミスクシニル基は HAad のアンカリング素子として実用的ではないと考えられる。

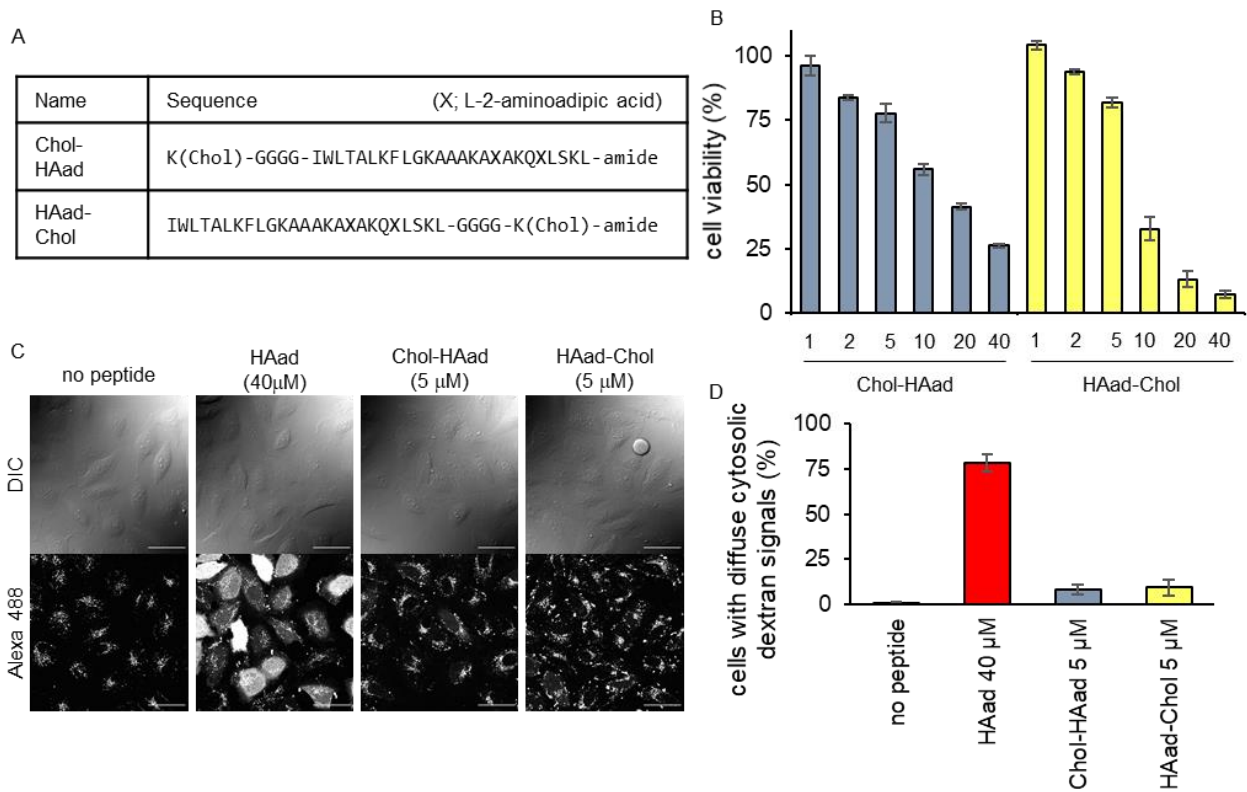


Figure 22. Effect of conjugation of HAad with cholesteryl hemisuccinate. (A) Sequences of peptides. (B) Cytotoxicity of peptides treated for 1 h in serum-free α -MEM. (C) Cytosolic delivery of Dex10-Alexa delivered by peptides in serum-free α -MEM. Scale bars; 50 μ m. (D) Percentage of cells showing diffuse cytosolic dextran signals. Results are shown as mean \pm SE ($n = 3$).

第三部 ピレンブチリル基導入 HAad の活性評価

第一章で述べたように、HAad の元となったペプチド L17E は細胞膜のラフリングを引き起こし、その場で一過的に膜透過性を向上させることで高分子をサイトゾルに送達することが想定されている。その際に細胞膜の脂質パッキングを緩和することが分かっている^[14]。一方で、オリゴアルギニンをはじめとする CPP の細胞膜の直接透過はピレンブチレート (PyB) 存在下で亢進することが知られている^[39]。この 2 つを合わせて考えると、L17E をはじめとするペプチドによる高分子のサイトゾルへの送達に脂質パッキングの緩和が効果を発揮すると仮定すれば、ピレンブチリル基 (pBu 基) を HAad のアンカリング素子として用いることで高分子のサイトゾルへの送達が亢進するのではないかと考えた。

WST-8 assay から、pBu 基を HAad の N 末端もしくは C 末端に導入したペプチドとして pBu-HAad, HAad-pBu (Fig. 23A) が顕著な毒性を示さずに使用可能な濃度は pBu-HAad, HAad-pBu とともに 2 μ M であることが分かった (Fig. 23B)。

Dex10-Alexa のサイトゾル送達実験を同様に行った結果、pBu-HAad, HAad-pBu はともに 2 μ M で 75% の細胞に Dex10-Alexa を送達できた (Fig. 23C, D)。これにより pBu-HAad, HAad-pBu は HAad 40 μ M と同等の高分子のサイトゾルへの送達活性を有していることが示唆され、HAad の 1/20 の濃度で活性を発揮するという点で HAad-hR や HAad-C10 より高い活性を有するペプチドであった。一方で、HAad 2 μ M や PyB 2 μ M、その両者の混合サンプルを用いた場合では Dex10-Alexa のサイトゾルへの効率的な送達は達成されなかったことから、pBu-HAad や HAad-pBu を用いた高分子のサイトゾルへの送達には pBu 基と HAad のコンジュゲーションが重要であることが示された。

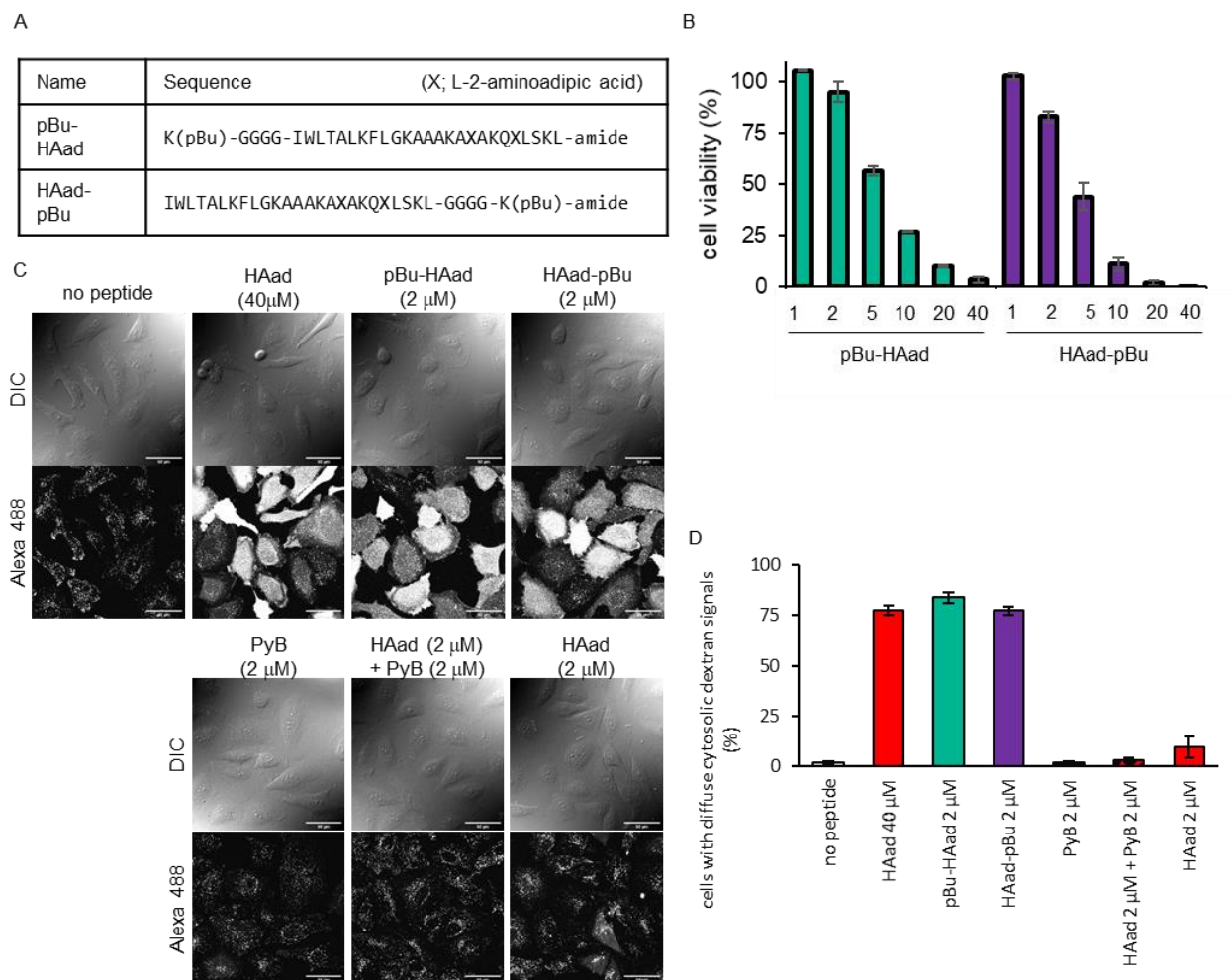


Figure 23. Effect of conjugation of HAad with pBu. (A) Sequences of peptides. (B) Cytotoxicity of peptides treated for 1 h in serum-free α -MEM. (C) Cellular localization of Dex10-Alexa delivered by peptides in serum-free α -MEM. Scale bars; 50 μ m. (D) Percentage of cells showing diffuse cytosolic dextran signals. Results are shown as mean \pm SE (n = 3).

ペプチドによって細胞内へと導入された Dex10-Alexa の相対量を評価するためにフローサイトメトリーにより血清非存在下での Dex10-Alexa の細胞内総取り込み量を定量したところ、pBu-HAad 2 μ M は HAad 40 μ M と同等の総取り込み量を示したが、HAad-pBu 2 μ M はそれらよりも低い総取り込み量であった (Fig. 24A)。

第二章第一節と同様に血清タンパク質の影響を評価するため、血清存在下で Dex10-Alexa のサイトゾル送達実験を行った。まず血清存在下で WST-8 assay を行ったところ、pBu-HAad, HAad-pBu はともに 10 μ M で顕著な毒性を示さず使用可能であった (Fig. 24B)。次に各ペプチドと Dex10-Alexa を細胞に投与し、1 時間後の細胞内蛍光を CLSM で評価したところ、pBu-HAad では 10 μ M で HAad 40 μ M と同等の割合の細胞においてサイトゾルに分布する Dex10-Alexa のシグナルが観察されたが、一方で HAad-pBu 処理細胞ではそのような細胞の割合は有意に低かった (Fig. 24C, D)。このことから、HAad-pBu は血清の影響を受けやすいと考えられる。

血清非存在下でのフローサイトメトリーの結果と血清存在下の Dex10-Alexa のサイトゾル送達実験の結果から、2 つのピレンブチリル基導入 HAad の中では pBu-HAad がより多くの高分子の細胞内取り込みを可能とし、かつ血清の影響を受けにくいペプチドであることが分かったため、以降の実験では pBu-HAad を用いることとした。pBu-HAad は血清非存在下で HAad の 1/20 の濃度で活性を発揮することから、HAad の 20 倍の活性を有していると考えられる。

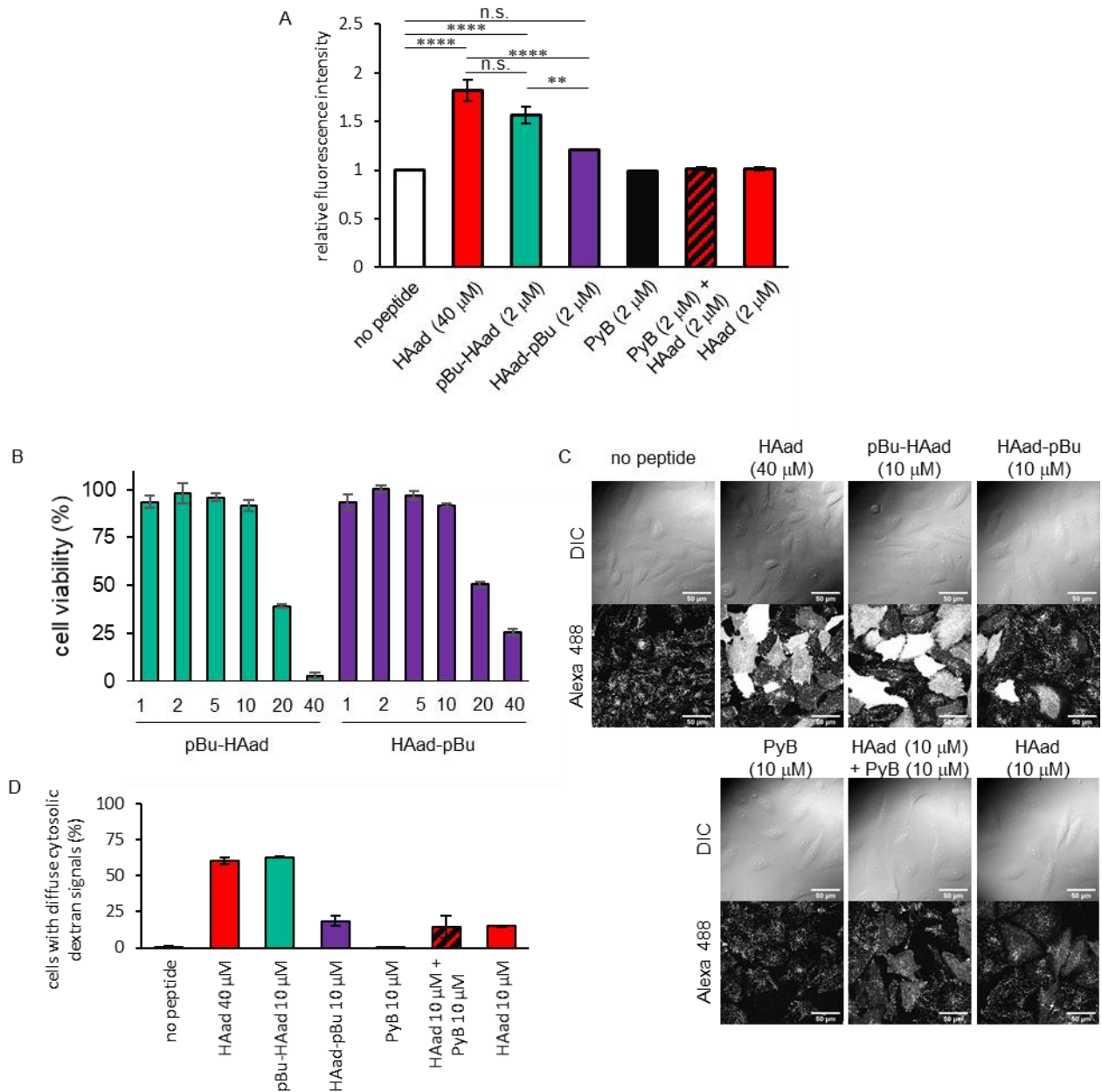


Figure 24. Comparison of pBu-HAad and HAad-pBu. (A) Flow cytometry analysis of peptides treated for 1 h in serum-free α -MEM. Results are shown as mean \pm SE ($n = 3$). **, $p < 0.01$, ****, $p < 0.0001$, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly significant difference test. (B) Cellular toxicity of peptides treated for 1 h in serum-containing α -MEM. (C) Cellular localization of Dex10-Alexa delivered by peptides in serum-containing α -MEM. Scale bars; 50 μ m. (D) Percentage of cells showing diffuse cytosolic dextran signals in (C). Results are shown as mean \pm SE ($n = 3$).

第三部の冒頭で述べた、L17E をはじめとするペプチドによる高分子のサイトゾルへの送達に脂質パッキングの緩和が効果を発揮するという仮説を検証するために、以前の検討³⁹⁾で用いた 25 μM の PyB を用いて HAad 20 μM または 40 μM 存在下での Dex10-Alexa のサイトゾルへの送達活性を評価した。

PyB 非存在下では HAad 20 μM または 40 μM はそれぞれ約 50%、75%の細胞において Dex10-Alexa をサイトゾルに送達したが、PyB 25 μM を 30 分間前処理したのちに PyB 25 μM 存在下において HAad 20 μM または 40 μM と Dex10-Alexa を細胞と 1 時間インキュベートすると、顕微鏡観察において顕著な細胞毒性を伴うことなく、サイトゾルに Dex10-Alexa のシグナルを有する細胞は約 80%、87%にまで向上した (Fig. 25A, B)。一方で、ペプチド非存在下では PyB 25 μM 前処理／共投与によって脂質パッキングが緩和された状態でも Dex10-Alexa のサイトゾル送達はみられなかった (Fig. 25C) ことから、Dex10-Alexa のサイトゾル送達には HAad の存在が必要であることが示されたとともに、HAad の活性が PyB による脂質パッキングの緩和によって亢進することが示唆された。

特に、本実験で得られた PyB 25 μM かつ HAad 40 μM 存在下でのサイトゾルに Dex10-Alexa を示す細胞の割合 (87%) は L17E やその類縁体、さらには HAad の活性向上体としての HAad-hR や pBu-HAad を用いた際にみられる割合 (75%) を大きく上回るものであり、より多くの細胞に対して高分子をサイトゾルに送達したい場合における現状における最良の投与手段であると考えられる。本節では pBu と HAad の共有結合による活性向上の評価を行いたいため、以降の実験ではここで見られた最良の投与手段ではなく、pBu-HAad と HAad の比較を行った。

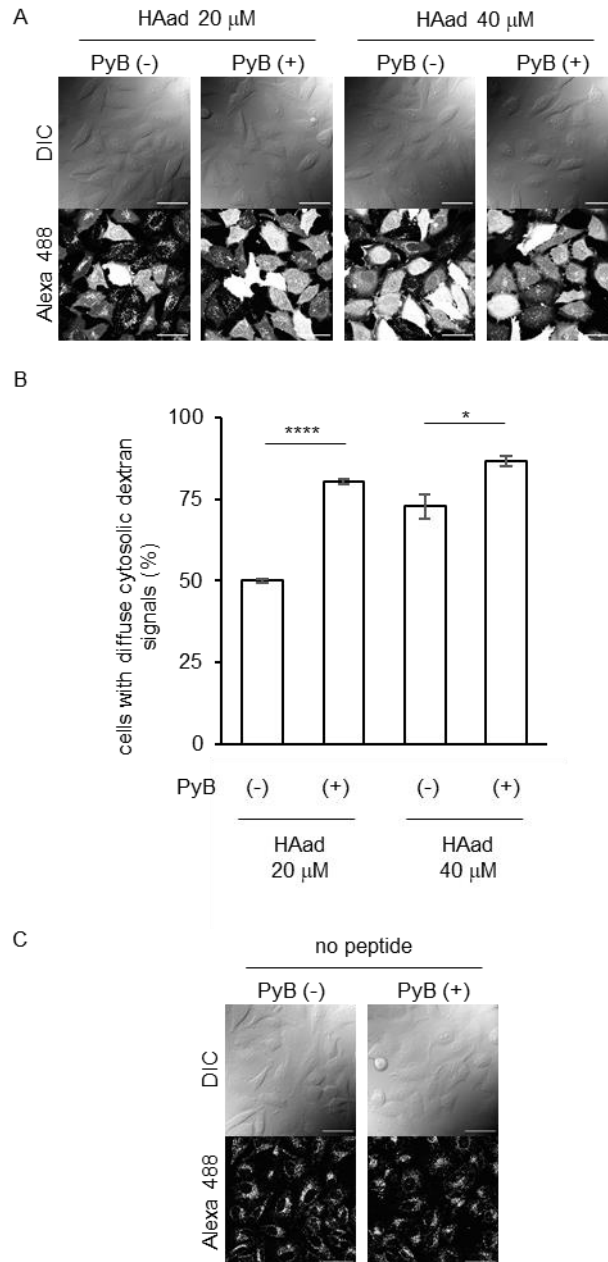


Figure 25. Pre/cotreatment of PyB with HAad. (A) Cytosolic delivery of Dex10-Alexa by HAad with or without PyB. Pretreatment; serum-free α -MEM with or without 25 μ M PyB. Dex10-Alexa treatment (200 μ g/mL); serum-free α -MEM containing 20 or 40 μ M HAad and 200 μ g/mL Dex10-Alexa in the presence and absence of 25 μ M PyB. Scale bars; 50 μ m. (B) Percentage of cells showing diffuse cytosolic dextran signals with or without PyB. Results are shown as mean \pm SE (n = 3). *, p<0.05, ****; p<0.0001 by Tukey-Kramer's honestly significant difference test. (C) Dot-like localization of Dex10-Alexa in the presence and absence of PyB in the absence of peptide. Scale bars; 50 μ m.

第四部 機能性タンパク質のサイトゾル送達

pBu-HAad による高分子のサイトゾルへの送達が Dex10-Alexa 以外の高分子にも適用できるかを検証した。まず、第一章第五節、第二章第一節第三部と同様に Cre-loxP 組換えアッセイ系を用いて、pBu-HAad による Cre リコンビナーゼの送達活性を評価した。loxP-DsRed-STOP-loxP-EGFP プラスミドを一過的に発現する HeLa 細胞に対し、Cre リコンビナーゼ 10 μ M および HAad 40 μ M もしくは pBu-HAad 2 μ M を投与した。ペプチド非存在下では DsRed から EGFP への組換えは 9% の細胞でしか見られなかったが、HAad もしくは pBu-HAad 存在下では約半数の細胞において DsRed から EGFP への組換えが観察された (Fig. 26A, B)。HAad と pBu-HAad の間には組換え効率の差はみられなかったことから、pBu-HAad が HAad の 20 倍の活性を有していることが Cre リコンビナーゼを用いた実験からも示された。

pBu-HAad は HAad や HAad-hR と同様に Cre リコンビナーゼだけでなく抗体をもサイトゾルへと送達する能力を有していた (Fig. 26C, D)。pBu-HAad により約 1/3 の細胞においてサイトゾルでの抗体のシグナルが観察された。この割合は HAad で抗体が導入される細胞の割合 (~50%) よりも低かったことから、pBu-HAad は分子量数万程度までの高分子のサイトゾル送達により適している可能性が示唆された。

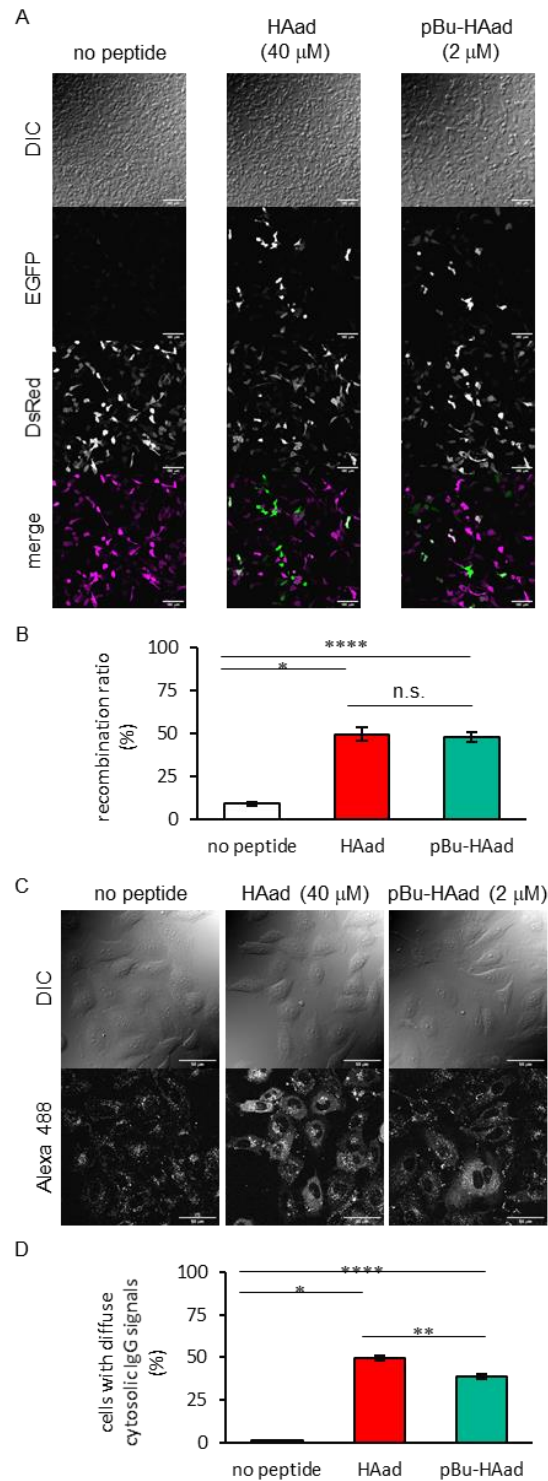


Figure 26. Cytosolic delivery of biomacromolecules by pBu-HAad. (A) Cre recombinase-mediated recombination in cells expressing loxP-DsRed-STOP-loxP-EGFP plasmid treated by peptides and Cre recombinase. Scale bars; 100 μ m. (B) Recombination ratio of cells treated by peptides and Cre recombinase. Results are shown as mean \pm SE (n = 3). *, p<0.05, ****; p<0.0001, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly significant difference test. (C) Cytosolic delivery of IgG-Alexa by peptides. Scale bars; 50 μ m. (D) Percentage of cells showing diffuse cytosolic IgG signals in (C). Results are shown as mean \pm SE (n = 3). *, p<0.05, **, p<0.01, ****; p<0.0001 by Tukey-Kramer's honestly significant difference test.

第五部 ピレンブチリル基導入 HAad の作用機序評価

第一章第三節で述べたように、HAad の活性は EIPA 存在下で抑制されることから、HAad の活性には L17E の場合と同様に細胞膜のラフリングが重要であることが示唆されている。pBu-HAad の高分子をサイトゾルに送達する活性もアクチンの挙動を伴うエンドサイトーシスの阻害剤として知られる EIPA 存在下において抑制された (Fig. 27A)。このことから、pBu-HAad による高分子のサイトゾルへの送達への細胞膜のラフリングの重要性が示唆された。

第一章第四節でのエンドソーム酸性化阻害剤の実験結果から、L17E の活性にはエンドソーム酸性化が関与しないのに対して HAad の L17E と比べて向上した活性にはエンドソーム酸性化が必要であることが示唆されている。ここで、pBu-HAad の活性はエンドソーム酸性化阻害剤であるクロロキン (CQ) 存在下でほとんど抑制されなかった (CQ(-); 72%, CQ(+); 67%) (Fig. 27B) ことから、pBu-HAad の活性にはエンドソーム酸性化に伴うエンドソーム膜の不安定化による高分子のエンドソームからの脱出は HAad ほど重要でなく、むしろ細胞膜のラフリングを引き起こし、その場で一過性の膜透過性向上によって高分子を直接細胞外からサイトゾルへと送達する活性が主たるものであることが示唆された。

上記の考察は Dex10-Alexa のサイトゾル送達の時間依存性評価実験からも支持されるものである。HAad 40 μ M ではインキュベーション時間 5 分の段階で約 50%の細胞でサイトゾル由来のシグナルが見られ、インキュベーション時間を延長するほどに導入された細胞の割合は向上し 1 時間後には 75%に達する。一方で、pBu-HAad 2 μ M ではインキュベーション時間 5 分の段階ですでに約 63%の細胞でサイトゾル由来のシグナルが見られた (Fig. 27C) ことから、pBu-HAad は上記で述べた作用機序によって HAad よりも多くの細胞に 5 分の段階でサイトゾルに高分子を直接送達できたと考えられる。

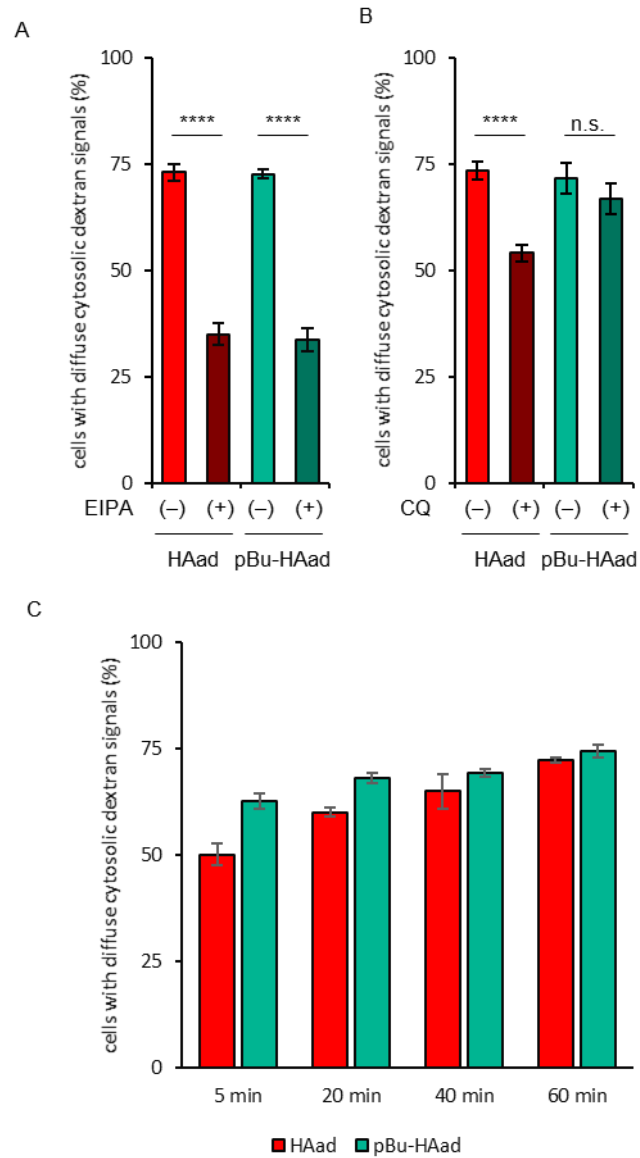


Figure 27. Mode of action of pBu-HAad. (A, B) Effect of EIPA (A) and chloroquine (CQ) (B) on the activities in the cytosolic Dex10-Alexa delivery of HAAd or pBu-HAad. (C) Time course study of cytosolic delivery of Dex10-Alexa by HAAd or pBu-HAad. Results are shown as mean \pm SE (n = 3). ****; $p < 0.0001$, n.s.; not significantly different by Tukey-Kramer's honestly significant difference test.

第三部で、高濃度 (25 μM) の PyB 処理による脂質パッキングの緩和が HAad による高分子のサイトゾルへの送達を亢進することが示された。それでは、pBu-HAad 処理はどの程度脂質パッキングを緩和するかを評価するために、本研究では極性感受性蛍光色素の di-4-ANEPPDHQ (2-hydroxy-3-[2-[(2-hydroxyethyl)dimethylamino]ethyl]-4-[2-[6-(dibutylamino)-2-naphthyl]ethenyl]pyridinium dibromide) による細胞膜の染色を用いた。Di-4-ANEPPDHQ の蛍光波長は高極性環境下 (脂質パッキングが疎である場所など) においてレッドシフトする^[40]。488 nm レーザーで励起した際の 510-550 nm と 630-670 nm の 2 つの波長域における蛍光強度の差と和の比、すなわち generalized polarization 値 (GP 値) を算出し、脂質パッキング密度の評価に用いた。ここで GP 値の低下は細胞膜の極性の増大、すなわち脂質パッキングの緩和を意味する。細胞膜を di-4-ANEPPDHQ で染色したのち、ペプチドを添加する 5 分前および 5 分後の細胞膜周辺の GP 値を CLSM で得た画像から算出し、添加前後の GP 値の差、すなわち ΔGP 値を求めた (Fig. 28)。

L17E の先行研究^[14]と同様に、HAad 40 μM によっても細胞膜の GP 値の低下がみられたことから、HAad も L17E と同様にそれ自体が脂質パッキングを緩和する作用を有していることが示唆された。ここで pBu-HAad 2 μM は HAad の 1/20 の濃度で HAad よりも低い ΔGP 値を示した。HAad 2 μM の処理は GP 値に変化を与えなかった一方で、PyB 2 μM は pBu-HAad 2 μM よりもさらに低い ΔGP 値を示したことから、pBu-HAad では pBu 基の修飾によって細胞膜との親和性が向上した結果、HAad の 1/20 の濃度でも同等以上に脂質パッキングを緩和することができ、高分子を直接細胞外からサイトゾルへと送達できるものだと考えられる。

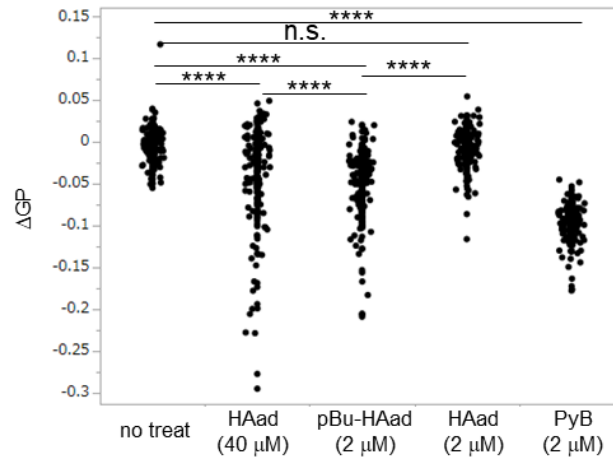


Figure 28. Changes of GP values (ΔGPs) at cell membrane treated by HAad (2 or 40 μM), PyB-HAad (2 μM) or PyB (2 μM). ΔGP was calculated as $GP_{after} - GP_{before}$, where GP_{after} is GP at 5 min after treatment and GP_{before} is GP at 5 min before treatment. Results are shown as dot plot ($n = 240$). ****; $p < 0.0001$, n.s.; not significantly different by Bartlett's test followed by Kruskal-Wallis test and Steel-Dwass' nonparametric multi comparison test.

第二章第二節の考察

HAad の膜との親和性を向上させることを目的とし、疎水性基を N 末端もしくは C 末端に導入したペプチドとして C3-HAad, C6-HAad, C10-HAad, HAad-C3, HAad-C6, HAad-C10, Chol-HAad, HAad-Chol, pBu-HAad, HAad-pBu の計 10 種類のペプチドを合成し、Dex10-Alexa のサイトゾル送達実験からその活性を評価した。

HAad-C10 は HAad-hR と同等の濃度 (10 μM) で HAad 40 μM と同程度の活性を發揮した。pBu-HAad, HAad-pBu はそれよりもさらに低い 2 μM で同程度の活性を發揮できた。特に pBu-HAad は Dex10-Alexa の細胞内総取り込み量でも HAad に比肩しており、さらに血清存在下においても活性を有していた。これにより pBu-HAad が HAad の 20 倍の活性を持つペプチドとして有用であることが示唆された。またその作用機序は、高分子をサイトゾルへと送達するツールの中でも L17E でしか報告のない細胞膜のラフリング誘起に伴う一過性の膜透過促進^[4]という稀有なものである。今後はこの作用機序を有するような他のツール^[4-12]の開発が期待できる。

興味深い結果としては、高濃度 (25 μM) の PyB 前/共投与による脂質パッキングの緩和によって HAad による高分子のサイトゾルへの送達効率が向上したことがあげられる。L17E および HAad の細胞膜のラフリング誘導及びそれに伴う細胞膜の一過性の膜透過性向上による高分子の直接サイトゾル送達において、脂質パッキング緩和がそれを亢進することが新たに判明した。また、PyB 25 μM 前/共投与条件下での HAad 40 μM 処理によって、これまでのどの条件をも上回る 87%の細胞において Dex10-Alexa をサイトゾルに送達することができた。この条件は今後、HAad によって高分子をサイトゾルに送達したいときに用いることができる現状における最良の条件であると考えられる。これほどの高効率で高分子をサイトゾルへと送達するためには、ペプチドを用いるような化学的なツールではなくマイクロインジェクションによって細胞一つごとに導入する^[4]などといったスループットの非常に低い方法に頼らざるを得ないと考えられる。そ

の点において本法は特に優れた手法であるといえる。

脂質パッキング緩和作用の評価 (GP 値測定) から、pBu-HAad の高い活性は pBu 基の導入による細胞膜との親和性向上に加え、低濃度でも脂質パッキングを緩和することができることも寄与している可能性が示唆された。この発見は L17E や HAad、R8 をはじめとする CPP^[39]に加えて、他の高分子をサイトゾルへと送達するツール^[4-12]においても細胞膜での脂質パッキング緩和を引き起こすことが寄与している可能性を示唆するものであると考えられる。

第二章の考察

第二章では HAad に化学修飾を加えることで活性の高いペプチドを得ることを目指し、第一節では HAad-hR、第二節では pBu-HAad を得ることに成功した。HAad-hR、pBu-HAad はそれぞれ利点と欠点を補完する関係性にある。

まず、HAad-hR は血清存在下で活性を発揮することができない (Fig. 16E, F) が、pBu-HAad は血清存在下でも活性を有する。このことから、血清の影響を無視できないと考えられる全身循環を含めた *in vivo* への応用を目指す際には HAad もしくは pBu-HAad がより適しているといえるであろう。

一方で、HAad-hR は Dex10-Alexa よりも分子量が大きい抗体や Cas9/sgRNA 複合体をサイトゾルに送達することができるが、pBu-HAad は抗体を HAad ほど効率よくサイトゾルに送達することができない (Fig. 26C, D)。HAad-hR の利用法としてはこれらの高分子を *in vitro* においてサイトゾルに送達する試薬としての利用が相応しいと考えられる。

本章では HAad への化学修飾による活性向上を目指し、その例としてグアニジノ基の導入及びピレンブチリル基の付与という 2 つの例を示した。これらは他の高分子をサイトゾルへと送達するツール^[4-12]にも適用できる化学修飾であると言える。本研究はより活性の高いツールの開発に向けた嚆矢となる研究であると期待される。

第三章 HAad 搭載ナノキャリアの開発

筆者は第一章で、礎となった L17E の改良体ペプチドである HAad を開発し、第二章では、HAad に化学修飾を加えることで HAad よりも活性の高いペプチドである HAad-hR および pBu-HAad を開発した。次のステップとして、HAad およびその改変体を用いた高分子のサイトゾルへの送達法の *in vivo* での応用が考えられる。第一章では HAad の局所 (脳室内) 投与への適用可能性を例示したが、医療応用という観点からは一般的な全身投与がより望まれる形態といえる。現在の HAad らによる高分子のサイトゾルへの送達では、ペプチドと高分子は混合された状態で細胞に投与されている。この混合物を全身循環にのせると、ペプチドと高分子の体内動態は異なったものとなることが予想され、ペプチドが作用する部位において送達したい高分子が存在しないという問題が起こりうる。この問題を解決するためにはペプチドと高分子の体内動態を一致させる必要がある。そこで筆者は、第三章で高分子を内包して HAad で修飾されたナノキャリアの開発を目指した。その第一歩として、モデルタンパク質として His タグ融合タンパク質のナノキャリアへの内包およびその細胞におけるサイトゾルへの送達を実現した。

第一節 蛍光標識 HAad の細胞内局在観察

ペプチドと高分子の体内動態を一致させるためにはペプチドと高分子との共有結合がまず考えられるが、それでは高分子をサイトゾルに送達できない可能性が蛍光標識 HAad (HAad-(Gly)₄Cys(Alexa488)) の細胞内局在観察の結果から示唆された。HAad-(Gly)₄Cys(Alexa488) (40 μM) を HeLa 細胞と 1 時間インキュベートし、その後の蛍光の細胞内局在を顕微鏡観察により評価した (Fig. 29)。その結果蛍光標識 HAad は点状のシグナルとして観察され、HAad そのものはエンドソーム/リソソームに滞留もしくはその膜に結合していることが示唆された。蛍光標識によって HAad の細胞内局在が変化している可能性も考えられるものの、HAad は Dex10-Alexa や抗体などの高分子を細胞膜もしくはエンドソームを介してサイトゾルへと送達する能力を有しているが、その際に HAad 自体もサイトゾルへと移行するわけではないと考えられる。本実験では最小単位のカーゴとして蛍光色素を用いた。より HAad の活性に影響を与えると考えられるほかの高分子との共有結合をした場合も同様に、共有結合した高分子は HAad と同じ細胞内局在、すなわちエンドソーム/リソソームへの局在を示すのではないかと考えられる。この結果は HAad 修飾ナノキャリアへの高分子の内包という本章の目的の妥当性を示唆するものである。

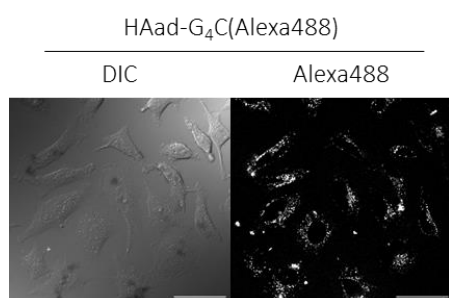


Figure 29. Cellular localization of HAad-G₄C(Alexa488). Cells were treated with 40 μM HAad-(Gly)₄Cys(Alexa488) for 1 h. Scale bar, 50 μm.

第二節 HAad 搭載ナノキャリアの合成

ナノキャリアのプラットフォームとしては、リポソームや脂質ナノ粒子、ウイルスベクターなどが考えられるが、筆者は水中で人工ウイルスキャプシドを形成する β -annulus ペプチド (INHVGTTGGAIZAPVAVTRQLVGS-OH, Z; L-norleucine) をプラットフォームとして選んだ。 β -annulus ペプチドはトマトブッシースタントウイルスのキャプシド由来のペプチドであり、鳥取大学の松浦らにより開発された^[42]。人工ウイルスキャプシドにおいて、 β -annulus ペプチドは N 末端を内側に、C 末端を外側に向ける。そのため N 末端にタグを介して GFP を結合させることで GFP を人工ウイルスキャプシドに内包させたり^[43]、C 末端を改変することで人工ウイルスキャプシド表面に金コロイド^[44]や DNA^[45]、ペプチド^[46]などを修飾させたりすることが可能である。この改変の容易さに加え、ペプチド性のベクターであるため筆者のこれまでのペプチド化学の知識を十分に適用できることが、 β -annulus ペプチドをナノキャリアのプラットフォームとして選んだ理由である。

筆者はこの β -annulus ペプチドの N 末端側に高分子を配位させ、C 末端側に HAad を結合させたものを設計・合成した。これが人工ウイルスキャプシドを形成すると、高分子は人工ウイルスキャプシドの内側に位置し、HAad は人工ウイルスキャプシドの外側に位置すると考えられる。よって本章の目的である高分子を内包して HAad で修飾されたナノキャリアが開発できないかと考えた。N 末端に高分子が、C 末端に HAad が結合した β -annulus ペプチドは水中で自己集合してトリマーを形成し、そのトリマーを頂点とするようにさらに自己集合することで内側に高分子を有し外側が HAad で修飾された正十二面体の人工ウイルスキャプシドを形成する (Fig. 30)。この人工ウイルスキャプシドは 60 個の HAad に修飾されることとなる。

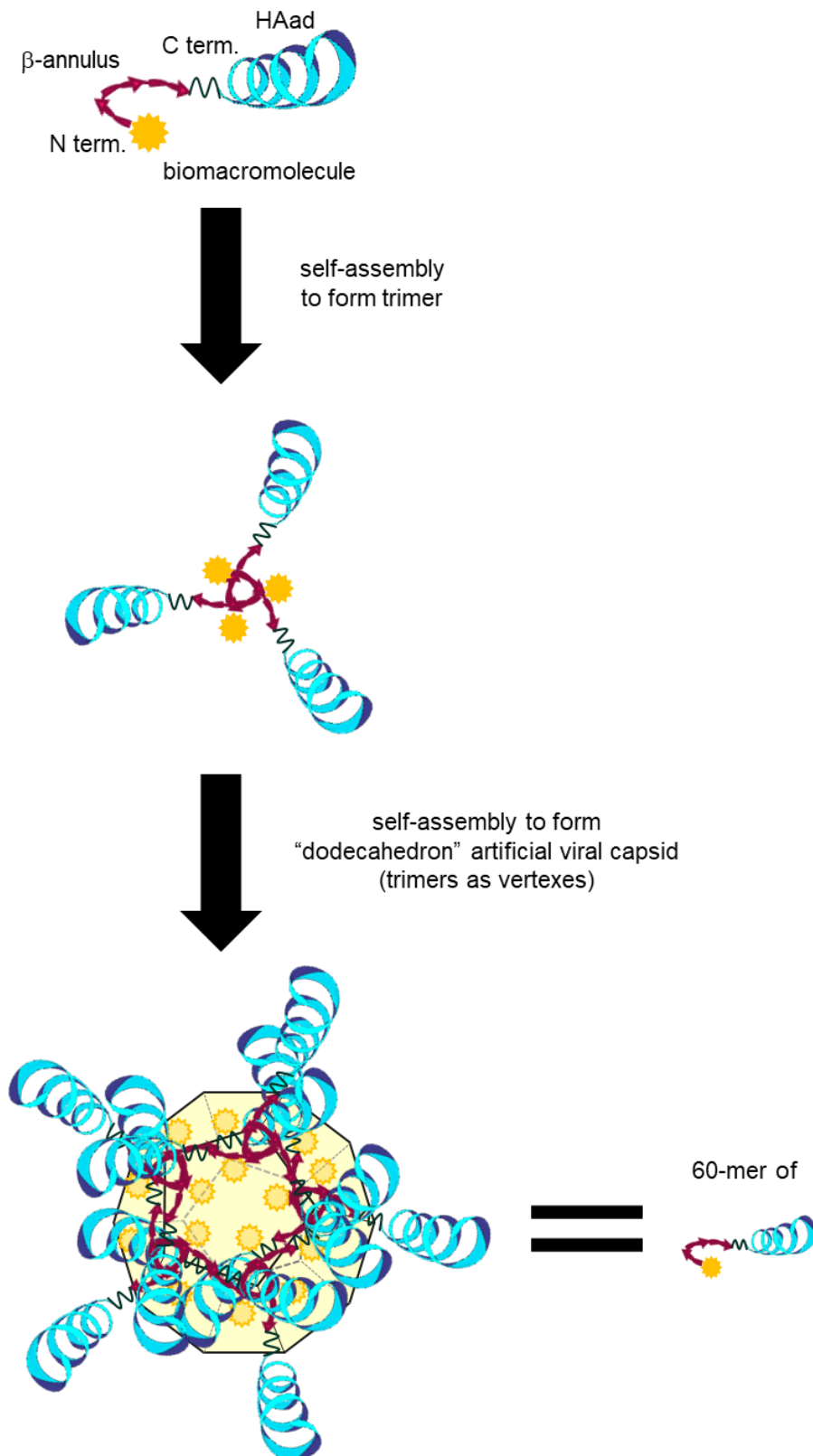


Fig. 30. Schematic view of the artificial viral capsid formed by the assembly of the β -annulus peptide bearing biomacromolecule to be delivered into cells and HAad at the N- and C-termini, respectively.

人工ウイルスへの高分子の内包の可能性を検討するために、内包タンパク質のモデルとして His タグ融合タンパク質を選んだ。β-annulus ペプチドの N 末端を介して高分子を人工ウイルスキャプシドに内包させるために、N 末端には nitrilotriacetic acid (NTA) タグを結合させた。Ni²⁺存在下において、Ni-NTA タグと His タグが相互作用することで His タグ融合タンパク質を内包できると期待される。またβ-annulus ペプチドの C 末端に HAad を修飾する際には、HAad の N 末端と C 末端のどちらを人工ウイルスキャプシドに結合させるかを調節するために、アジド基とジベンゾシクロオクチン (DBCO) 間のクリック反応を用いた。

N 末端にシステインを、C 末端に Lys(Mtt)を有するβ-annulus ペプチドを樹脂上で合成し、N 末端の Boc₂O による保護 (i)、Mtt 基の脱保護 (ii) を経て azido-PEG₁₂-NHS ester (Quanta BioDesign) と C 末端のリジンのアミノ基を反応させた (iii)。TFA/triisopropylsilane (TIS)/H₂O (95:2.5:2.5 (v:v:v)) により樹脂から切り出し (iv)、HPLC 精製の後に maleimido-C3-NTA (Dojindo) を反応させる (v) ことで Cys(NTA)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH [I] を得た (Fig. 31)。

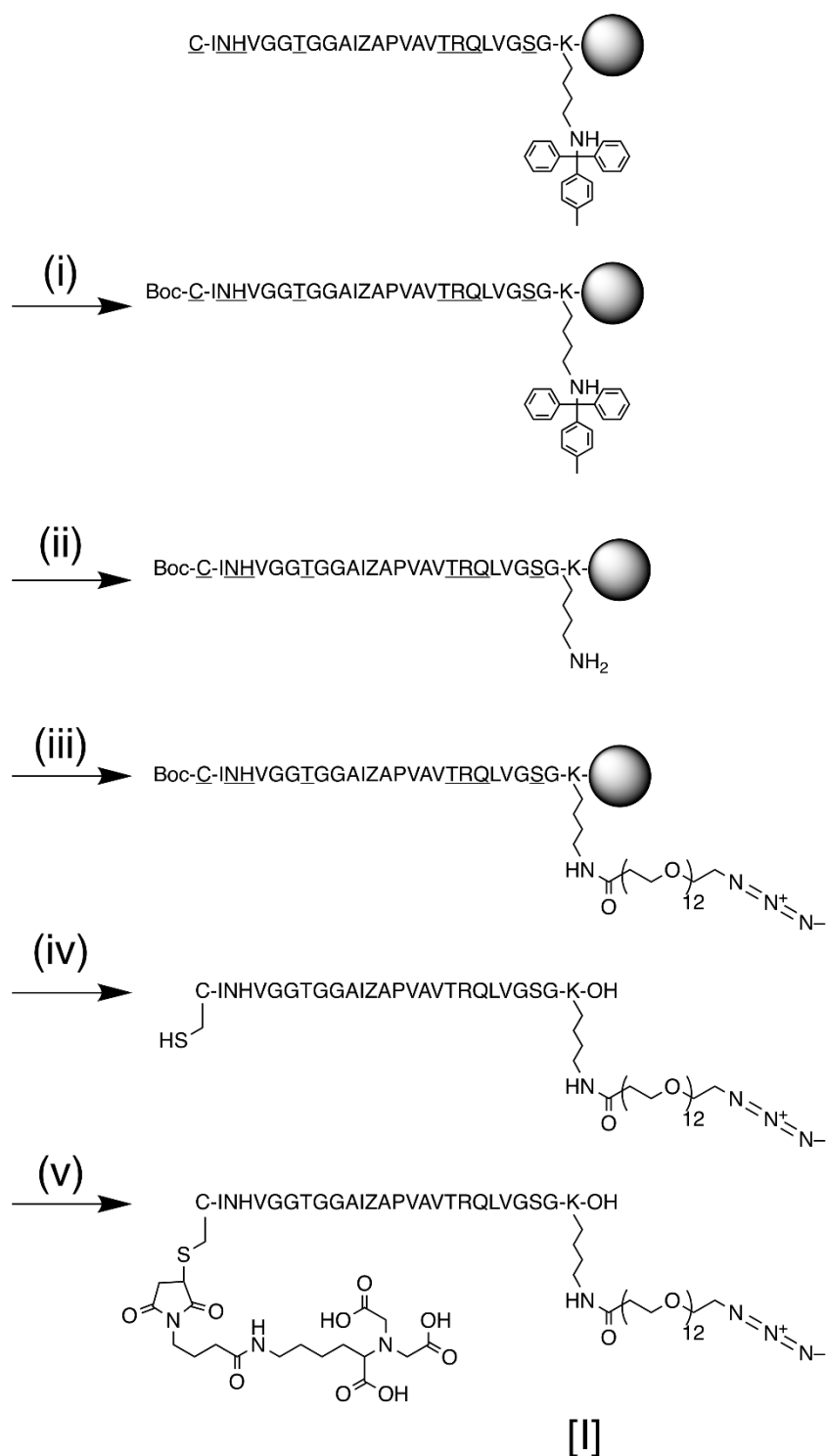


Fig. 31. Synthesis scheme of Cys(NTA)- β -annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH [I]. Z; L-norleucine. (i) di-tert-butyl dicarbonate (4 eq.), 4-methylmorpholine (1 eq.); (ii) hexafluoroisopropanol and dichloromethane (1:4 (v:v)); (iii) azido-PEG₁₂-NHS ester (1.5 eq.), *N,N*-diisopropylethylamine (1.5 eq.); (iv) trifluoroacetic acid, triisopropylsilane and H₂O (95:2.5:2.5 (v:v:v)); (v) maleimido-C3-NTA (2 eq.). Amino acids on solid-phase resin shown by one letter codes with underlines represent side chain protected amino acids: C = Cys(Trt); N = Asn(Trt); T = Thr(tBu); R = Arg(Pbf); Q = Gln(Trt); S = Ser(tBu).

次に、N 末端もしくは C 末端にテトラグリシンリンカーを介してシステインを有する HAad を合成し、そのシステイン側鎖に DBCO-maleimide (東京化成工業) を反応させることで Cys(DBCO)(Gly)₄-HAad-amide [II] および HAad-(Gly)₄Cys(DBCO)-amide [III] を得た (Fig. 32)。

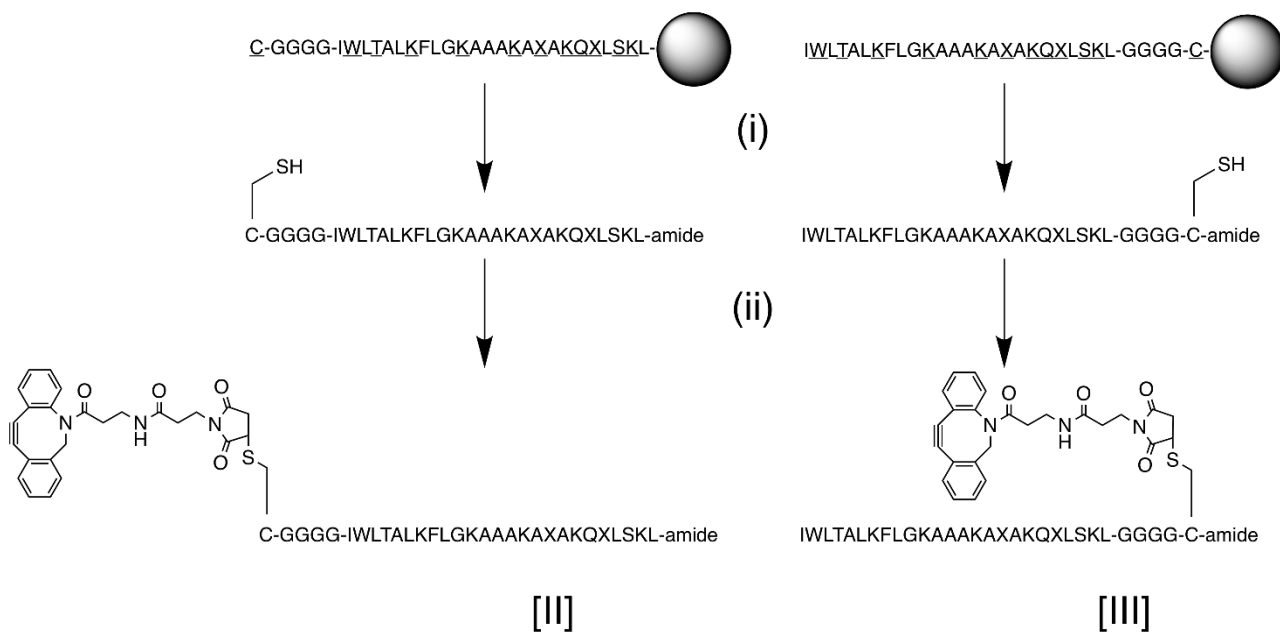


Fig. 32. Synthesis scheme of Cys(DBCO)(Gly)₄-HAad-amide [II] HAad-(Gly)₄Cys(DBCO)-amide [III]. (i) trifluoroacetic acid and 1,2-ethanedithiol (95:5 (v:v)); (ii) DBCO-maleimide (1.2 eq.) and N-methylmorpholine (5 eq.). Amino acids on solid-phase resin shown by one letter codes with underlines represent side chain protected amino acids: C = Cys(Trt); W = Trp(Boc); T = Thr(tBu); K = Lys(Boc); X = Aad(OtBu); Q = Gln(Trt); S = Ser(tBu).

最後に[I]と[II]もしくは[III]を dimethylformamide/H₂O (1:1 (v:v))中で混合することでクリック反応により目的のペプチドである NTA-β-annulus-N[HAad]および NTA-β-annulus-C[HAad]を得た (Fig. 33)。ここで N[HAad]、C[HAad]はβ-annulus の C 末端に HAad の N 末端もしくは C 末端がそれぞれ結合していることを意味する。

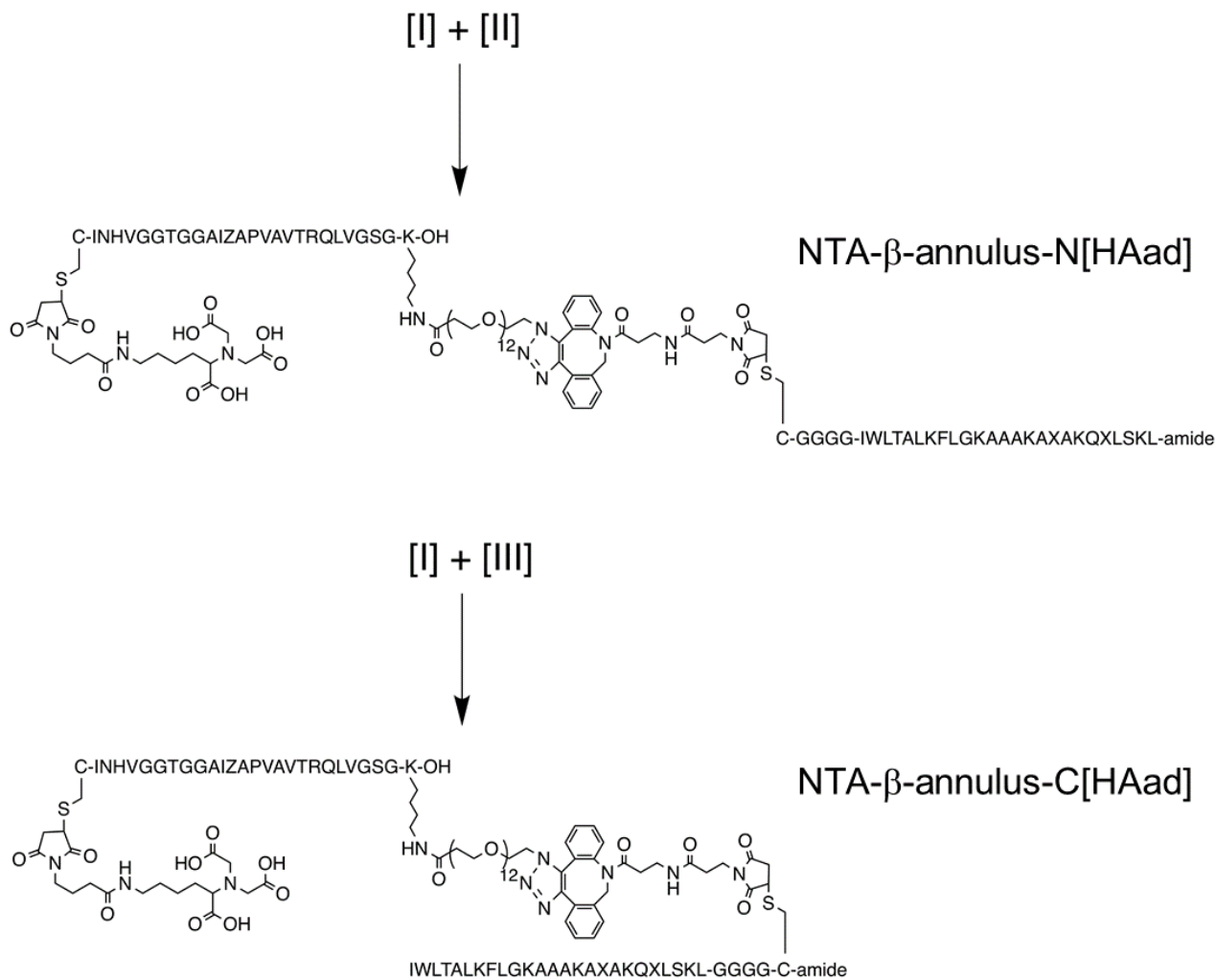


Fig. 33. Click reaction between A and B or C in dimethylformamide/H₂O (1:1(v:v)).

第三節 HAad 搭載ナノキャリアの形成確認と高分子の内包

合成したペプチドが人工ウイルスキャプシドを形成するかどうかを動的光散乱 (DLS) 法を用いて解析した。

HAad 修飾されていないペプチドである NTA- β -annulus-G-OH (Cys(NTA)-INHVGTTGGAIZAPVAVTRQLVGS-G-OH)、NTA- β -annulus-N[HAad] または NTA- β -annulus-C[HAad] を 40 μ M となるように水中に溶解し、1 時間静置後に DLS 測定を行った (Fig. 34)。NTA- β -annulus-G-OH の水溶液では約 40 nm の粒子が観察された。この値は先行研究^[41]で得られていた値 (46.8 ± 10.5 nm) とほぼ同等の値であった。HAad 修飾されたペプチドである NTA- β -annulus-N[HAad] または NTA- β -annulus-C[HAad] の水溶液中でも、約 30 nm の粒子が観察され、これらのペプチドが水中で人工ウイルスキャプシドを形成することが示唆された。

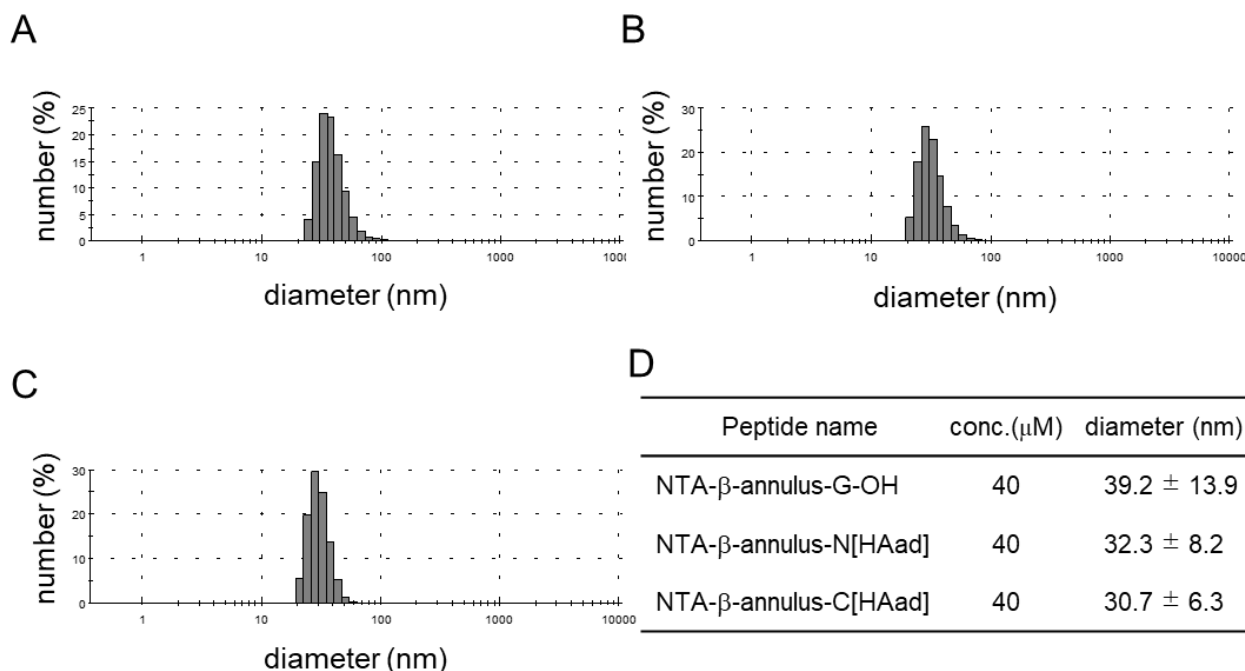


Fig. 34. DLS measurement of peptide solution (40 μ M) in water. Histogram of (A) NTA- β -annulus-G-OH, (B) NTA- β -annulus-N[HAad], (C) NTA- β -annulus-C[HAad], and (D) average diameter (nm) measured in each solution.

後述のとおり、NTA- β -annulus-C[HAad]が最も良い内包物 (EGFP-His₆) のサイトゾルへの送達活性を示した (第四節参照) ことから、NTA- β -annulus-C[HAad]の濃度を 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 μ M と変えて DLS 測定を行うことにより粒子形成に必要な濃度を検討した (Fig. 35)。NTA- β -annulus-C[HAad]水溶液中の粒子の計測数は 5 μ M 以上の濃度域において濃度依存的に直線的に増加したことから、5 μ M が NTA- β -annulus-C[HAad]の臨界凝集濃度 (critical aggregation concentration, CAC) であると見積もられた (Fig. 35A)。また、同時に測定した粒子径の濃度による変化を評価した (Fig. 35B) ところ、NTA- β -annulus-C[HAad]は CAC 以上の濃度で約 20-30 nm の粒子を形成しており、CAC 以上での人工ウイルスキャプシドの安定した形成が示唆された。

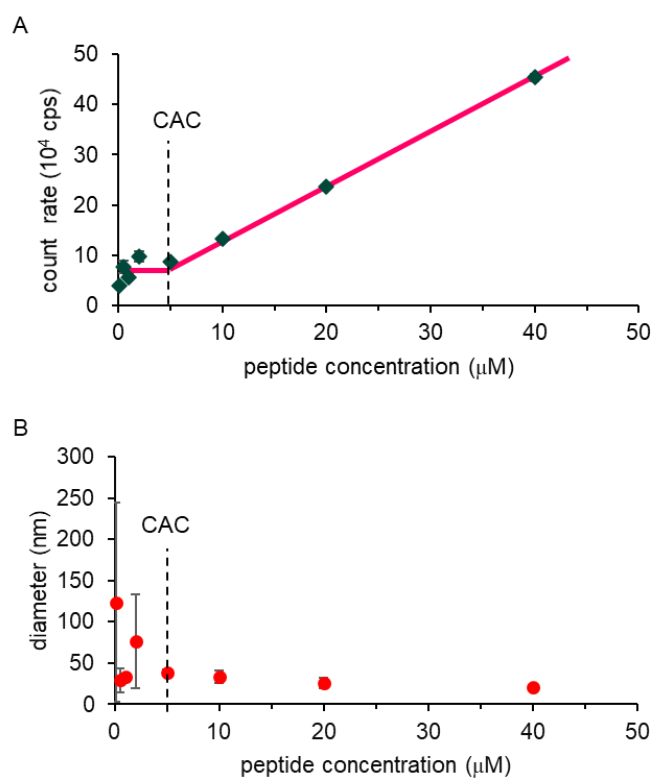


Fig. 35. Estimation of critical aggregation concentration (CAC) of NTA- β -annulus-C[HAad] solution. (A) Change of count rate and (B) measured diameter in solution in the solution at various peptide concentration.

NTA- β -annulus-N[HAad]や NTA- β -annulus-C[HAad]が人工ウイルスキャプシドを形成することを形態的に評価するために、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。

ペプチドを 40 μ M となるように $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ 含有リン酸緩衝生理食塩水 (PBS(+)) 中に溶解し、1 時間静置後にグリッドに載せ乾燥後ネガティブ染色し TEM を用いて観察した (Fig. 36)。NTA- β -annulus-G-OH、NTA- β -annulus-N[HAad]、NTA- β -annulus-C[HAad]いずれのサンプルにおいても約 50 nm の球状の粒子が観察された。よって、第三節において細胞に添加する条件である PBS(+))中においてもこれらのペプチドが人工ウイルスキャプシドを形成することが示された。

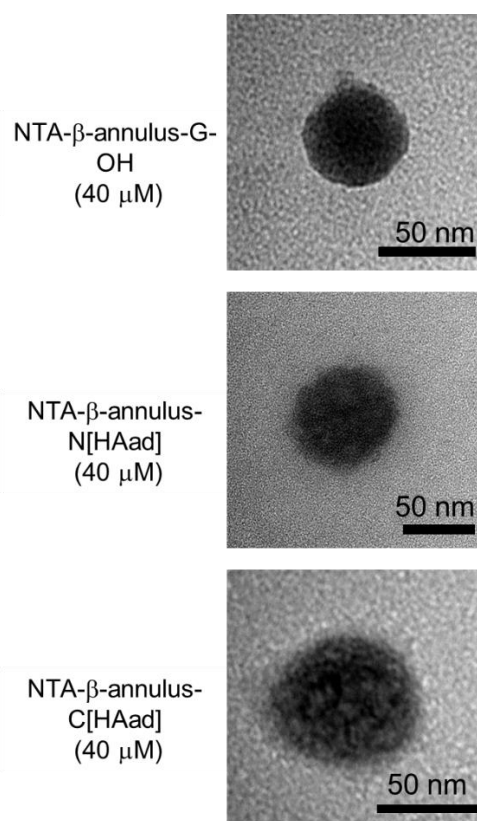


Fig. 36. Transmission electron microscope (TEM) image of each peptide in PBS(+). Staining solution; EM stainer, TEM; JEM-1400 Plus (JEOL), applied voltage; 80 kV.

形成されることが明らかになった NTA- β -annulus-C[HAad]による人工ウイルスキャプシドに His タグ融合タンパク質を内包することができるかを評価するために、EGFP-His₆ をモデルタンパク質として用い、限外濾過によって内包効率を算出した。EGFP-His₆ は約 27 kDa のタンパク質であり、分画分子量 (molecular weight cut off, MWCO) 100K (100 kDa) の限外濾過膜を用いた場合には限外濾過膜を通過すると考えられる。一方で EGFP-His₆ が Ni²⁺存在下において Ni-NTA タグとの相互作用を介して人工ウイルスキャプシドに内包されれば、約 7 kDa の NTA- β -annulus-C[HAad]の 60 量体である人工ウイルスキャプシド (~420 kDa) に内包されることとなり、1 つの人工ウイルスキャプシドに 1 つの EGFP-His₆ が内包されるとするとその分子量は約 450 kDa と見かけの分子量が大きくなるために MWCO 100K の限外濾過膜を通過できないと考えられる。

NTA- β -annulus-C[HAad]を、EGFP-His₆ を含む Ni²⁺含有／非含有 PBS(+)に溶解し 1 時間静置後、MWCO 100K の限外濾過デバイス (Amicon Ultra 0.5 mL, MWCO 100K, Merck Millipore) に移して遠心した。限外濾過膜に保持された画分 (trapped) と濾過された画分 (filtered) の体積をそろえたのちにそれぞれに含まれる EGFP-His₆ の量比を sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) によって求めた (Fig. 37A)。

EGFP-His₆ は当初の想定通りそのほとんどが MWCO 100K の限外濾過膜を通過し、限外濾過膜に保持された画分に残った EGFP-His₆ は全体の 9%であった (Fig. 37B)。一方、Ni²⁺存在下での NTA- β -annulus-C[HAad] (Ni-NTA- β -annulus-C[HAad]) があるとき EGFP-His₆ は MWCO 100K の限外濾過膜を通過できず、93%が保持された。Ni²⁺非存在下 (NTA- β -annulus-C[HAad]) では EGFP-His₆ は MWCO 100K の限外濾過膜を通過できたことから、EGFP-His₆ は Ni²⁺存在下においてのみ Ni-NTA タグとの相互作用により NTA- β -annulus-C[HAad]が形成する人工ウイルスキャプシドに内包されることが示唆された。また、その内包効率は 93%と算出された。

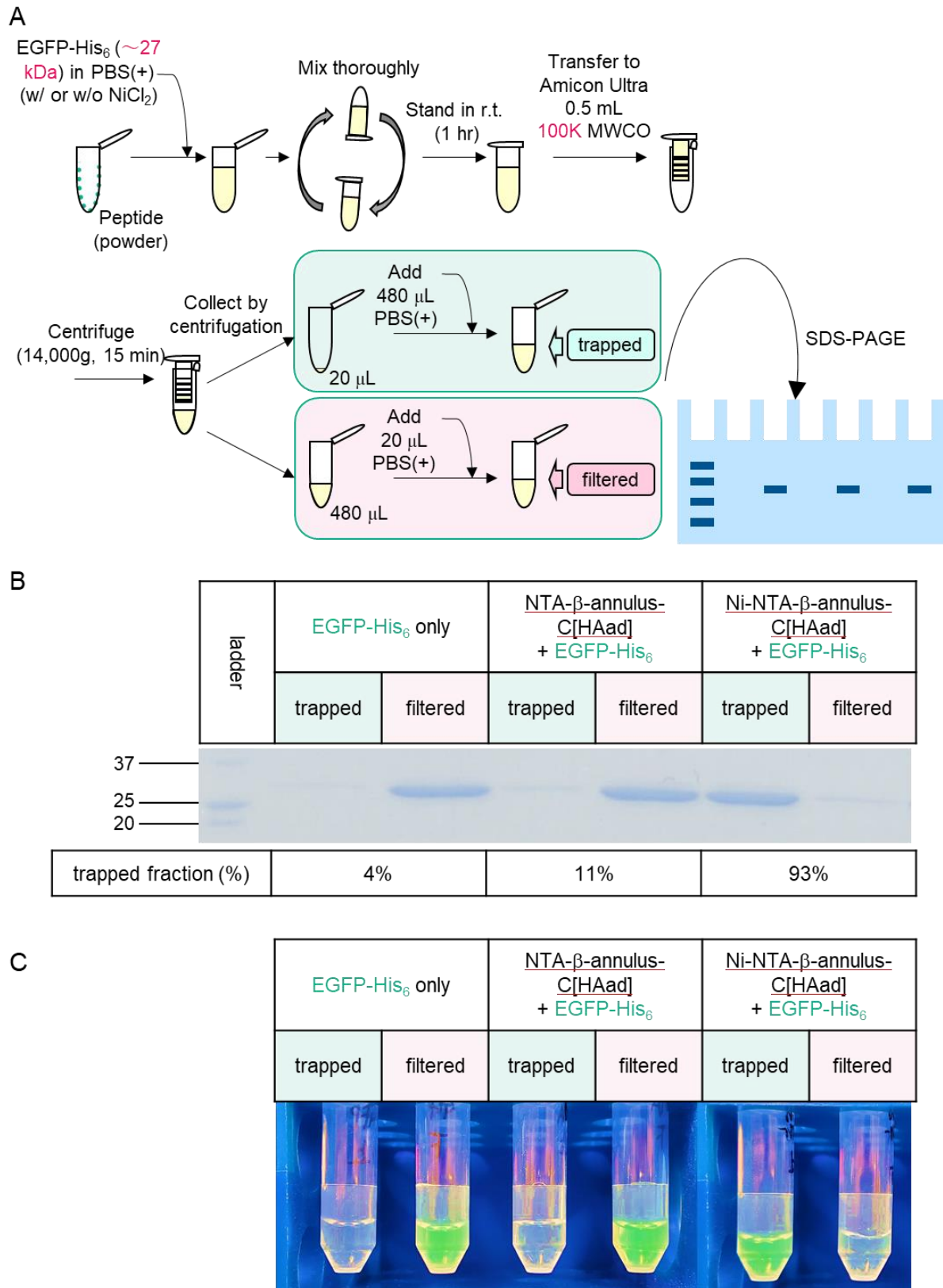


Fig. 37. Estimation of encapsulation ratio of EGFP-His₆ in artificial viral capsid formed by NTA- β -annulus-C[HAad]. (A) Experimental workflow of ultrafiltration assay. (B) Gel image of SDS-PAGE and trapped fraction (%) calculated from the gel image. (C) Picture of the solution.

第四節 HAad 搭載ナノキャリアの細胞内局在および高分子のサイトゾル送達

第二節で形成が確認された各ペプチド由来の人工ウイルスキャプシドの細胞内局在を評価するために、NTA タグの代わりにシステインの側鎖が Alexa Fluor 488-maleimide によって標識されたペプチド (Alexa488- β -annulus-G-OH, Alexa488- β -annulus-N[HAad], Alexa488- β -annulus-C[HAad]) によって形成される人工ウイルスキャプシドを細胞に添加する実験を行った。

各ペプチドを PBS(+)中に 10 μ M となるように溶解して 1 時間静置後、HeLa 細胞に添加して 1 時間インキュベートしたのちの細胞内蛍光局在を CLSM 観察により評価した (Fig. 38)。Alexa488- β -annulus-G-OH および Alexa488- β -annulus-N[HAad]処理細胞では蛍光はエンドソーム/リソソームへの局在を示唆する点状のシグナルとして観察された。一方で Alexa488- β -annulus-C[HAad]処理細胞においては、エンドソーム/リソソーム由来と考えられる点状のシグナルに加えてサイトゾル全体に蛍光が分布している様子が観察された。このことから、Alexa488- β -annulus-G-OH および Alexa488- β -annulus-N[HAad]からなる人工ウイルスキャプシドはエンドサイトーシスにより取り込まれるがほとんどサイトゾルに移行できないと考えられる一方で、Alexa488- β -annulus-C[HAad]からなる人工ウイルスキャプシドはサイトゾルへと移行できることが示唆された。しかし Alexa488- β -annulus-C[HAad]処理細胞で観察されたサイトゾル全体に分布するシグナルが、Alexa488- β -annulus-C[HAad]からなる人工ウイルスキャプシドによるものなのか、人工ウイルスキャプシドが崩壊しておりモノマーやトリマーとして存在しているものなのかは明らかでない。

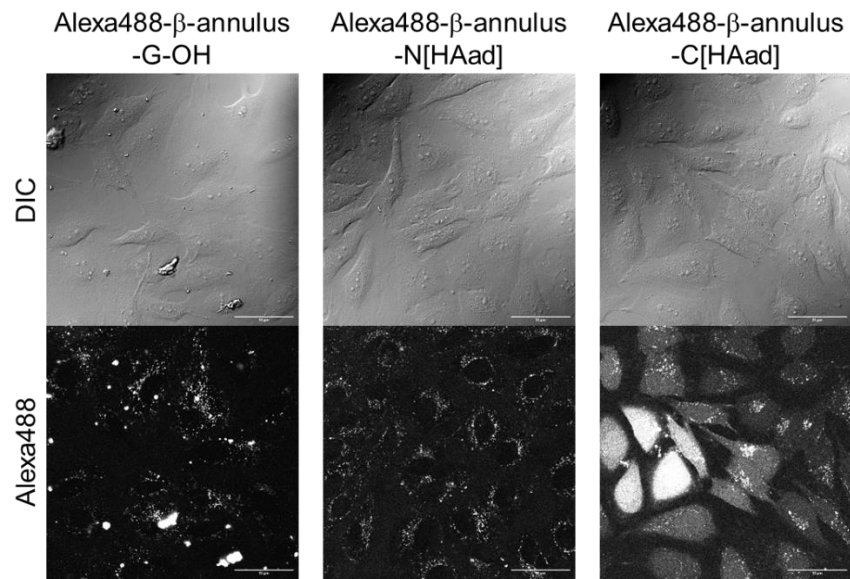


Fig. 38. Cellular localization of Alexa Fluor 488-labeled peptides. Alexa488-β-annulus-G-OH, Alexa488-β-annulus-N[HAad] or Alexa488-β-annulus-C[HAad] were dissolved in PBS(+) and left at room temperature for 1 h. Then the solution was added to HeLa cells and incubated for 1 h. After incubation cells were washed and CLSM observation was conducted.

第二節で調製が確認された人工ウイルスキャプシドを細胞に添加することで、内包した EGFP-His₆ をサイトゾルに送達できるかどうかを CLSM 観察により評価した。

まずは Ni²⁺存在下において各ペプチド (Ni-NTA-β-annulus-G-OH, Ni-NTA-β-annulus-N[HAad], Ni-NTA-β-annulus-C[HAad]) を EGFP-His₆ 含有 PBS(+)中にペプチド濃度 40 μM となるよう溶解し 1 時間静置した。サンプルを細胞に添加して 1 時間インキュベートし、細胞を洗浄後 EGFP-His₆ の細胞内局在を CLSM により観察した (Fig. 39A, B)。ペプチド非存在下ではほとんどの EGFP-His₆ はエンドソームに滞留していたが、HAad 存在下では約 76%の細胞においてサイトゾルに分布する EGFP のシグナルが観察された。Ni-NTA-β-annulus-G-OH を含むサンプルでは 3%の細胞でしかサイトゾル由来の EGFP のシグナルは観察されなかった。Ni-NTA-β-annulus-N[HAad]を含むサンプルでは 24%の細胞でサイトゾルに分布する EGFP のシグナルが観察された。一方、Ni-NTA-β-annulus-C[HAad]が形成する人工ウイルスキャプシド中に EGFP-His₆ を内包させたサンプルでは、74%の細胞で EGFP のシグナルがサイトゾルで観察された。この割合は HAad を用いた場合と同等であった。このことから、Ni-NTA-β-annulus-C[HAad]は PBS(+)中で EGFP-His₆ を内包した人工ウイルスキャプシドを形成し、その人工ウイルスキャプシドを細胞に投与することで内包した EGFP-His₆ をサイトゾルに送達できることが示唆された。

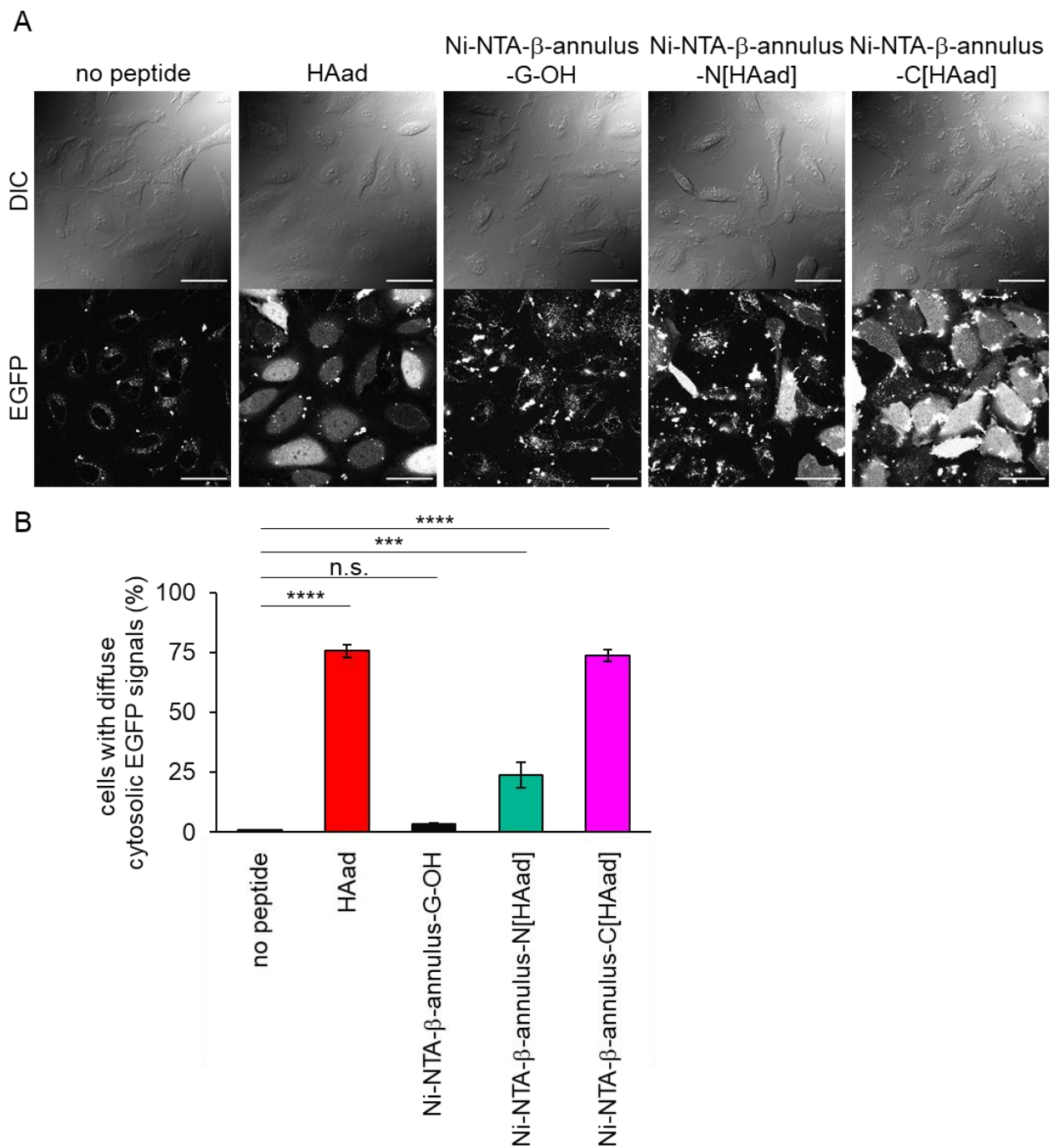


Fig. 39. Cytosolic delivery of EGFP-His₆ by HAad-decorated artificial viral capsid. (A) Cellular localization of EGFP-His₆ delivered by peptides. (B) Percentage of cells yielding diffuse cytosolic EGFP signals. Results are presented as mean \pm SE (n = 3). ***, p<0.001, ****, p<0.0001, n.s.; not significantly different v.s. no peptide (one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test).

EGFP-His₆ のサイトゾルへの送達に成功した Ni-NTA-β-annulus-C[HAad]に関して、種々のコントロール実験を行った (Fig. 40A, B)。

Ni²⁺非存在下においては NTA-β-annulus-C[HAad]は EGFP-His₆ を内包できない (Fig. 37B) が、その条件においても約 47%の細胞においてサイトゾルに分布する EGFP のシグナルが観察された。NTA-β-annulus-C[HAad]が形成する人工ウイルスキャプシドは表面が HAad で修飾されており、HAad と同じように、溶液中に含まれる高分子をサイトゾルに送達する能力を有していると考えられる。

Ni-NTA-β-annulus-C[HAad]と EGFP-His₆ の混合物 (非単離) を細胞に投与すると 74%の細胞のサイトゾルに EGFP-His₆ のシグナルが認められるのに対し、それらを混合後 Fig. 37 と同様の実験により限外濾過で単離した人工ウイルスキャプシド (Ni-NTA-β-annulus-C[HAad] (trapped)) を細胞に投与すると、45%の細胞のサイトゾルに弱い EGFP-His₆ のシグナルが観察された。限外濾過によって EGFP-His₆ を内包する人工ウイルスキャプシド以外を濾過し精製したサンプルによってもサイトゾルに EGFP-His₆ を送達できることが示唆された。導入できる細胞の割合が限外濾過後に低下する理由は不明だが、限外濾過膜に吸着した人工ウイルスキャプシドを回収しきれていない可能性もあり、今後さらに検討を行いたい。

将来的な *in vivo* への応用を考えた際に血清の影響を受けるかどうかは大きな懸念点だと考えられる。その点を評価するために血清 (bovine serum, BS) 存在下での実験を行った。Ni²⁺存在下で NTA-β-annulus-C[HAad]を EGFP-His₆/10% BS 含有 PBS(+)中に溶解し 1 時間静置したサンプル (Ni-NTA-β-annulus-C[HAad] (w/ 10% BS)) を細胞に投与したところ、Ni-NTA-β-annulus-C[HAad]よりも細胞内蛍光強度は弱いながらも同等の割合 (71%) の細胞において EGFP をサイトゾルに送達できることが示された。このことから Ni-NTA-β-annulus-C[HAad]からなる人工ウイルスキャプシドは血清存在下においても内包した高分子をサイトゾルへと送達できる可能性が示唆された。

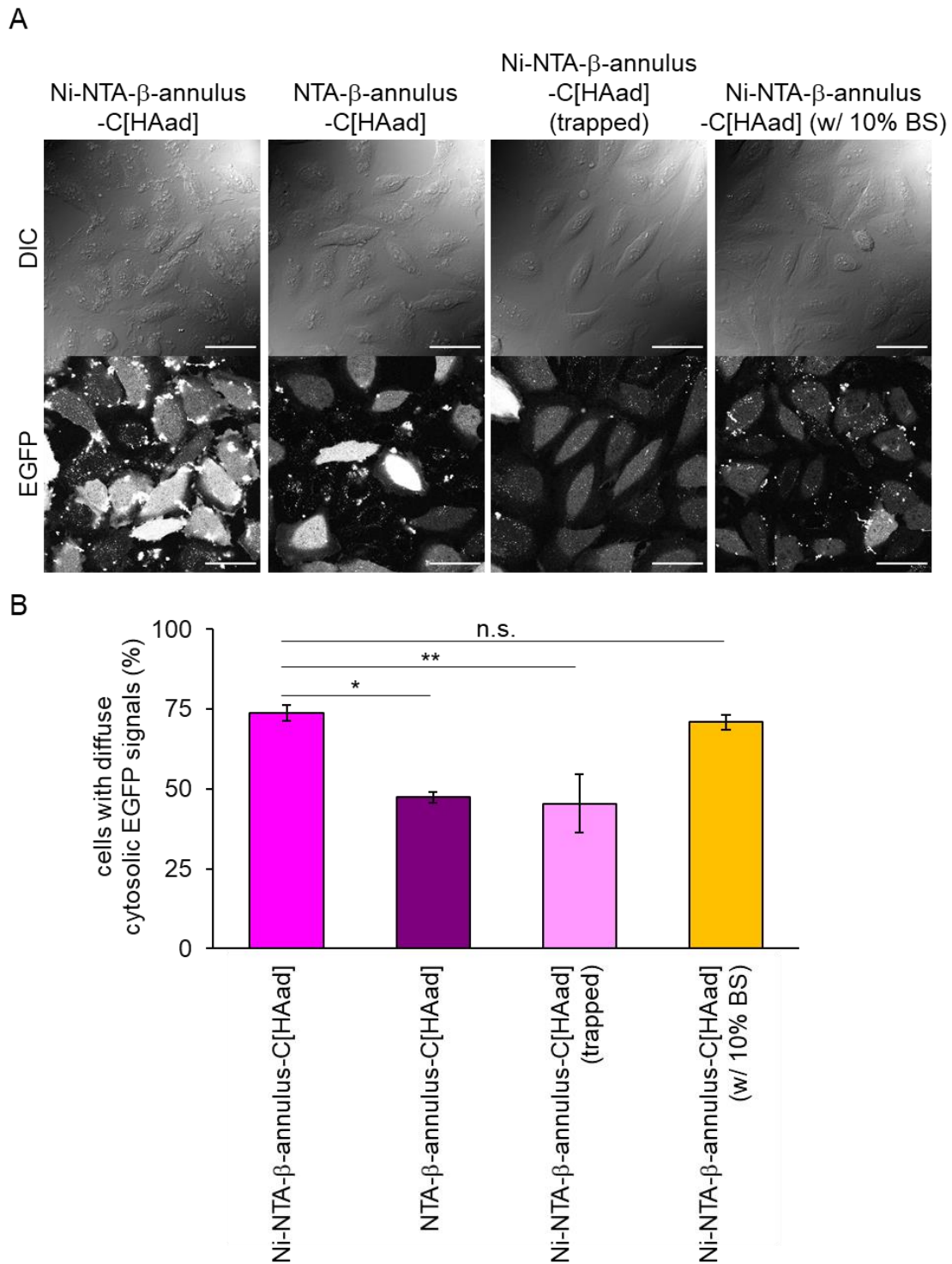


Fig. 40. Cytosolic delivery of EGFP-His₆ by Ni-NTA- β -annulus-C[HAad] at various conditions. (A) Cellular localization of EGFP-His₆ delivered by Ni-NTA- β -annulus-C[HAad], NTA- β -annulus-C[HAad], trapped fraction of Ni-NTA- β -annulus-C[HAad] by ultrafiltration (Ni-NTA- β -annulus-C[HAad] (trapped)), Ni-NTA- β -annulus-C[HAad] in the presence of 10% bovine serum (BS) (Ni-NTA- β -annulus-C[HAad] (w/ 10% BS)). (B) Percentage of cells yielding diffuse cytosolic EGFP signals. Results are presented as mean \pm SE (n = 3). *; p<0.05, **; p<0.01, n.s.; not significantly different v.s. Ni-NTA- β -annulus-C[HAad] (one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test).

第三章の考察

HAad による高分子のサイトゾルへの送達を医薬応用することを見据えた際に、HAad と高分子の体内動態を一致させることを目指し、高分子を内包して HAad で修飾されたナノキャリアの開発を試みた。ナノキャリアのプラットフォームとして水中で自己集合して人工ウイルスキャプシドを形成する β -annulus ペプチドを選び、その人工ウイルスキャプシド内部に Ni-NTA タグを介して EGFP-His₆ を内包し、表面に HAad を修飾したものを得ることに成功した。人工ウイルスキャプシド表面に HAad の N 末端もしくは C 末端が結合した 2 種類の人工ウイルスキャプシドを作製したが、内包した EGFP-His₆ をサイトゾルへと送達することができたのは HAad の C 末端が結合した Ni-NTA- β -annulus-C[HAad]からなる人工ウイルスキャプシドであった。この理由は不明だが、HAad の細胞膜との相互作用時の配向などが関与している可能性がある。Ni-NTA- β -annulus-C[HAad] は血清存在下でも EGFP をサイトゾルへと送達する活性を有していたことから、第三章の目的であった高分子を内包して HAad で修飾されたナノキャリアである Ni-NTA- β -annulus-C[HAad]による人工ウイルスキャプシドを *in vivo* において投与できる可能性が示唆された。しかしながら、この人工ウイルスキャプシドは CAC 以下の濃度になるとキャプシドを形成できなくなるという致命的な問題がある。そのため、*in vivo* において投与する際には現状では局所投与による投与部位でのサイトゾル送達しか実現できない可能性があり、この点は今後改善が望まれている。

本章ではナノキャリアのプラットフォームとして人工ウイルスキャプシドを形成する β -annulus ペプチドを選んだ。 β -annulus ペプチドをナノキャリアのプラットフォームとして用いたのは本研究が初めてであり、また β -annulus ペプチドを用いた高効率な高分子のサイトゾル送達例は未だなく、その点においても本研究は新規性が非常に高いといえる。ナノキャリアのプラットフォームとしては他にリポソームや脂質ナノ粒子、ウイルスベクターなどが考えられるが、それらの問題点として脂質からなるナノキャリアは

アポリポタンパク質の吸着による肝臓への集積^[47]、ウイルスベクターはウイルス性であるが故のウイルス由来のゲノムの挿入の危険性^[48]などといった問題点が挙げられる。一方で HAad と結合した β -annulus ペプチドからなる HAad 修飾人工ウイルスキャプシドはそれらの問題点を考慮する必要がない点で優れているといえる。HAad 修飾人工ウイルスキャプシドの体内動態はまだ明らかになっておらず、in vivo における問題点は CAC の問題以外は現状あまり明らかとなっていないため、今後の研究が期待される。

HAad のナノキャリアの搭載を目指し、本研究では β -annulus ペプチドを用いたが、その他のリポソームや脂質ナノ粒子への搭載についても今後の研究課題として挙げられる。それらについては所属研究室において今後達成されることを期待している。

総括

抗体などの生理活性タンパク質のサイトゾルへの送達の医療への展開を視野に、当研究室ではペプチドを用いた送達法を開発してきた。開発された L17E による高分子のサイトゾルへの送達法をより実用性の高いものにするため、第一章では L17E の改良ペプチドである HAad を開発することに成功した。また HAad を用いることで *in vivo* においても生理活性タンパク質 (Cre) をサイトゾルへと送達することができた。第二章では HAad のさらなる活性向上のために使用濃度の低減を目指し、HAad に化学修飾を加えることで HAad の 1/4 の濃度で活性を発揮する HAad-hR および 1/20 の濃度で活性を発揮する pBu-HAad を得ることができた。第三章では HAad で修飾された高分子内包ナノキャリアの開発を目指した。人工ウイルスキャプシドを形成するペプチドである β -annulus を用いることで、EGFP-His₆ の HAad 修飾人工ウイルスキャプシドへの内包および HAad 修飾人工ウイルスキャプシドに内包された EGFP-His₆ のサイトゾルへの送達を実現した。これらの研究は、L17E や HAad による高分子のサイトゾルへの送達法を現在の細胞レベルの実験から *in vivo* での実験、さらには医薬応用へとつなげるための重要なステップとなると期待される。エンドソーム選択的に膜を傷害するように開発されたペプチドなどのツールは多々存在するが、それらの中で *in vivo* でも効果を発揮し、さらに医薬応用へとつながった例は乏しい。HAad を基盤骨格としたツールやナノキャリアの開発が最終的に医療へと貢献できることを強く願っている。

本研究で得たペプチドである HAad, HAad-hR, pBu-HAad は、L17E を基本骨格とする同様の作用機序での高分子のサイトゾルへの送達においては一つの到達点であると言える。また今回は β -annulus ペプチドをナノキャリアのプラットフォームとして用いた。得られた HAad 修飾人工ウイルスキャプシドの詳しい作用機序や *in vivo* での適用可能性は今後の研究課題として残っており、今後はそれらの解明に取り組んでいきたい。

本研究を通して、ペプチドもしくは HAad 修飾人工ウイルスキャプシドによる蛍光高分子のサイトゾルへの導入効率は、顕微鏡観察によって算出した導入された細胞の割合のことである。視野中の全細胞数のうち、サイトゾルへの高分子の分布が見られる細胞を逐次数え上げることで算出している。サイトゾルへと高分子が導入された細胞の割合は高分子のサイトゾル送達において重要であるが、一方でサイトゾルに導入された高分子の量もまた重要なパラメータである。フローサイトメトリーで定量される細胞内蛍光強度は 1) サイトゾルに分布する高分子の量 に加えて 2) エンドソームに滞留する高分子の量 や 3) 細胞表面に吸着したまま除去されていない高分子の量 を含めたものであり、本研究において 1) を定量した実験はない。Cre リコンビナーゼの導入によるレポータープラスミドの組換えから導入効率を算出した実験においても、レポータープラスミドは一過性発現であるためレポータープラスミドが何コピー導入されている細胞に何個の Cre リコンビナーゼが導入された結果組換えが引き起こされたのかが分からないという点で定量性に欠ける。

サイトゾルに導入された高分子の量を定量する手法としては他に、カーゴに結合した小分子とサイトゾル内の小分子レセプターとの相互作用解析^[49]やスプリット GFP を用いたレポーターアッセイ^[50]、カーゴに結合したクロロアルカンとサイトゾル内 Halo タグの相互作用解析^[51]、同位体標識したカーゴを内部標準として用いることによる MALDI-TOFMS でのサイトゾル内移行量の絶対的評価^[52]、などが開発されているが、これらは定量性に欠けていたり操作が煩雑で熟練した技術が必要であったり、全細胞の平均としての導入量として算出されるなど、レポーターアッセイと同様に欠点を有している。しかしながら近年サイトゾルに導入された高分子の量を絶対的に定量する手法として FCS を用いた例が報告された^[53]。FCS により 1 細胞におけるサイトゾル内の共焦点領域中の蛍光分子の個数を算出することができる。この手法を HAad や HAad 修飾人工ウイルスキャプシドによる Dex10-Alexa や EGFP-His₆ のサイトゾル送達に適用して、サ

イトゾルへと高分子が送達された細胞の割合に加えてサイトゾルに導入された高分子の絶対量も算出できれば、HAad やそれに続くツールによる高分子のサイトゾル送達についてより深く議論できるようになると期待される。また、他の高分子をサイトゾルへと送達するツール[4-12]と比較したときの本研究で開発された手法の利点をより明示できると考えられる。

実験の部

第一章の実験

ペプチドの合成

ペプチド鎖の構築は TGS-RAM 樹脂 (島津製作所) を用い、PSSM-8 ペプチド固相合成機 (島津製作所) で行った。その後 TFA/EDT (95:5 (v:v)) で 23°C で 3 時間処理し、樹脂からの切り出しと脱保護を行った後に HPLC によりペプチドの精製を行い、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法—飛行時間型質量分析 (MALDI-TOFMS) により分子量が正しいことを確認した。合成したペプチドの配列と質量分析結果は Table 3 のとおりである。

Table 3. Sequence of peptides and results of MS analysis

| peptide | sequence (X; L-2-aminoadipic acid) | 実測値 m/z | 理論値 [M+H] ⁺ _{calcd.} |
|-----------|------------------------------------|------------|---|
| L17E | IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQLSKL-amide | 2858.7 | 2858.7 |
| L17D | IWLTALKFLGKHAAKHDAKQQLSKL-amide | 2844.7 | 2844.7 |
| L17Aad | IWLTALKFLGKHAAKHXAKQQLSKL-amide | 2873.5 | 2873.7 |
| L17E/Q21E | IWLTALKFLGKHAAKHEAKQELSKL-amide | 2859.5 | 2859.7 |
| HA/E1 | IWLTALKFLGKAAAKAEAKQQLSKL-amide | 2726.2 | 2726.6 |
| HA/E2 | IWLTALKFLGKAAAKAEAKQELSKL-amide | 2727.5 | 2727.6 |
| HAad | IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide | 2755.9 | 2755.7 |

細胞培養

ヒト子宮頸癌由来細胞 (HeLa 細胞) (The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) (93021013)) の培養は 10% (v/v) 非働化ウシ血清 (Invitrogen) を含むア

ルファ最小必須培地 (α -MEM(+)) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下で行われ、3-4 日ごとに継代した。

細胞生存試験

細胞生存率は Cell Counting Kit-8 (CCK8) (Dojindo) を用い、推奨の方法に準拠して測定した。HeLa 細胞を 96 ウェルマイクロプレート (Iwaki) に播種しコンフルエントになるまで培養した。培地を除き、40 μ M のペプチドを含み血清を含まないアルファ最小必須培地 (α -MEM(-), FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 中で、37°C、5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) で 2 回洗浄し、 α -MEM(+) と WST-8 試薬を加えて 2 時間インキュベートした。インキュベート後吸光度 ($A_{450nm} - A_{650nm}$) から細胞生存率を算出した。

蛍光標識 10 kDa デキストランの細胞内取り込みと顕微鏡観察

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し、37°C、5% CO₂ 存在下でコンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、ペプチドおよび 200 μ g/mL の Alexa Fluor 488 標識 10 kDa デキストラン (Dex10-Alexa) を含む α -MEM(-) もしくは α -MEM(+) を細胞に投与し 37°C、5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、5 μ g/mL Hoechst 33342 (Invitrogen) を含む α -MEM(+) を添加して 10 分インキュベートすることにより核染色を行った。インキュベート後 α -MEM(+) に溶液を置換し、Dex10-Alexa の細胞内局在を FV3000 Olympus laser scanning microscope により観察を行った。各サンプルについて、200 以上の細胞においてサイトゾル全体に分布する Dex10-Alexa のシグナルが観察される細胞の割合を評価した。時間依存性を評価する実験では、細胞を Dex10-Alexa とペプチドを含む α -MEM(-) 中で 5, 20, 40, 60 分間インキュベートし、細胞の洗浄後 α -MEM(+) に置換し、すぐに観察した。

フローサイトメトリー

HeLa 細胞を 24 ウェルマイクロプレート (Iwaki) に播種し、37°C、5% CO₂ 存在下でコンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、ペプチドおよび 200 μg/mL の Dex10-Alexa を含む α-MEM(-) を細胞に投与し 37°C、5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し 0.01% トリプシンで 10 分間処理することにより細胞を懸濁させチューブに回収した。これを遠心 (800×g, 5 min) し、ペレットとなった細胞を PBS(-) で再懸濁した。これを 2 回繰り返して細胞を洗浄した。得られた細胞を最終的に PBS(-) で希釈して Attune NxT flow cytometer (Invitrogen) により各サンプルあたり 10,000 個の細胞について蛍光量を定量した。

生細胞内アクチンのタイムラプス観察

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 80%-90% コンフルエントになるまで 1 晩培養した。先行研究^[14]に従い LifeAct-mCherry を Lipofectamine LTX を用いてトランスフェクトし、24 時間後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄したのちに α-MEM(-) 100 μL を添加した。ディッシュを CLSM 備え付けのインキュベーター-STXF-IX3WX-SET (TOKAI HIT) (TOKAI HIT) (37°C、5% CO₂) に移し 10 分間平衡化した。HAad 非存在下での一連のタイムラプスイメージングの後直ちに 60 μM HAad を含む α-MEM(-) 50 μL を添加した (最終 HAad 濃度 20 μM)。添加後 5 分まで経時的に画像取得した。

リポソームの調製

リン脂質として 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) (NOF) および 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (POPG-Na) (NOF) を用い、中性脂質膜として 100% POPC large unilamellar vesicle (LUV) を、酸性脂質膜として

POPC/POPG (3:1 (mol:mol)) LUV を用いた。ナス型フラスコに各組成の脂質をクロロホルムに溶解したものを加え、ロータリーエバポレーターを用いてフラスコの底面に脂質薄膜を形成した。脂質薄膜を真空乾燥したのちバッファー (10 mM MES, 150 mM NaCl (pH 7.4 or 5.0)) で水和させた。LiposoFast extrudersystem (Avestin) および 0.1 μ m Nucleopore polycarbonate filter (Whatman) 2 枚を用いて 11 回通過させることで均一な粒径 (100 nm) にしたベシクルを調製した。調製後の LUV 濃度は LabAssay Phospholipid Kit (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いてリン脂質の濃度として求めた。

リーケージアッセイでは脂質薄膜の真空乾燥の後蛍光色素 8-aminonaphtalene-1,2,3-trisulfonic acid (ANTS, 12.5 mM) とその消光剤 *p*-xylene-bis(pyridinium)bromide (DPX, 45.0 mM) を含むバッファーを加え水和させたものを用いた。凍結融解を 5 回繰り返し、エクストルーダー処理をしたのちに、PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより ANTS/DPX 内包リポソームを遊離の色素から分離精製したのちに濃度決定をした。

CD 測定とトリプトファン結合アッセイに用いた LUV は、脂質薄膜の真空乾燥後バッファーで水和し、エクストルーダーで粒径をそろえ、濃度決定を行って最終濃度となるように調製した。

リーケージアッセイ

ペプチドのリポソーム不安定化活性は ANTS/DPX 内包 LUV から漏出した ANTS の蛍光強度から評価した。ペプチドを 100 μ M LUV と共にバッファー (10 mM MES, 150 mM NaCl (pH 7.4 or 5.0)) 中で 37°C 条件下 1 時間インキュベートした。蛍光は Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (PerkinElmer) にて励起波長 355 nm、蛍光波長 535 nm で測定した。界面活性剤 (TritonX-100, 最終濃度 0.1% (v/v)) を加えたときの蛍光強度 (F_{\max}) を

100%として以下の式で求められるリーケージ (%) からペプチドの膜不安定化活性を評価した (F_{blank} ; ペプチドを加えないときの蛍光強度)。

$$\text{leakage (\%)} = (F_{\text{obs}} - F_{\text{blank}}) / (F_{\text{max}} - F_{\text{blank}}) \times 100$$

円偏光二色性

ペプチドの円偏光二色性スペクトル (CD スペクトル) は、ペプチド 20 μM , LUV 2 mM 存在下において光路長 1 mm のセルを用いて 25°C で JASCO J-820 spectropolarimeter により測定された。各スペクトルは 5 回の積算の平均値を示している。

トリプトファン結合アッセイ

ペプチドのトリプトファンの蛍光はペプチド 20 μM , LUV 2 mM 存在下において 25°C で Shimadzu RF-5300PC spectrofluorophotometer により励起波長 280 nm、蛍光波長 310-380 nm で測定した。

阻害剤実験

阻害剤実験では細胞を各種阻害剤 (塩化アンモニウム; 25 mM, クロロキン; 100 μM , 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA); 100 μM) を含む α -MEM(-) 中で 30 分間インキュベートした。そののちペプチドおよび 200 $\mu\text{g/mL}$ の Dex10-Alexa、各種阻害剤を含む α -MEM(-) を細胞に投与し 37°C、5% CO_2 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、5 $\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 および各種阻害剤を含む α -MEM(+) を添加して 10 分インキュベートすることにより核染色を行った。インキュベート後各種阻害剤を含む α -MEM(+) に溶液を置換し、Dex10-Alexa の細胞内局在を CLSM で観察した。

Galectin 8-EGFP アッセイ

Galectin 8-EGFP のプラスミドは GenScript にて作製され、Lipofectamine LTX とその推奨プロトコルに従いトランスフェクションした。トランスフェクションの 24 時間後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄したのちにヒト免疫グロブリン G (IgG) 1 mg/mL とペプチド (L17E および HAad, 40 μ M; LLOMe, 1 mM) を含む α -MEM(-) を添加し 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、 α -MEM(+) を添加し CLSM により Galectin 8-EGFP の蛍光を CLSM によって観察した。

Alexa Fluor 488 標識ヒト免疫グロブリン G の調製と細胞内送達

Alexa Fluor 488 標識ヒト免疫グロブリン G (IgG-Alexa) を作製するために、ヒト血清由来免疫グロブリン G (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) の PBS(-) 溶液 (10.2 mg/mL, 100 μ L) に 1M NaHCO₃ 50 μ L とジメチルスルホキシドに溶解した Alexa Fluor 488 5-sulfodichlorophenol ester (Invitrogen) (10 mg/mL, 10 μ L) を混合し全量 500 μ L となるよう PBS(-) を加えて室温で 1 時間攪拌した。反応溶液は PBS(-) で平衡化した PD-10 脱塩カラムにより精製され、さらに Amicon Ultra-4 (MWCO 10K, Merck Millipore) を用いた限外濾過により濃縮した。

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下でコンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、ペプチドおよび 50, 200, 500 μ g/mL の IgG-Alexa を含む α -MEM(-) を細胞に投与し 37°C、5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、5 μ g/mL Hoechst 33342 を含む α -MEM(+) を添加して 10 分インキュベートし核染色を行った。インキュベート後 α -MEM(+) に溶液を置換し、IgG-Alexa の細胞内局在を CLSM で解析した。

Alexa Fluor 594 標識核膜孔複合体抗体による核膜孔複合体の認識

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下でコンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、ペプチドおよび 50 µg/mL の Alexa Fluor 594 標識核膜孔複合体抗体 (anti-NPC IgG-Alexa594, BioLegend, mAb414) を含む α-MEM(-) を細胞に投与し 37°C、5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、5 µg/mL Hoechst 33342 を含む α-MEM(+) を添加して 10 分インキュベートし核染色を行った。インキュベート後 α-MEM(+) に溶液を置換し、anti-NPC IgG-Alexa594 の細胞内局在を CLSM で解析した。

Cre/loxP 組換え実験

loxP-DsRed-loxP-EGFP-N1 プラスミド (loxP レポータープラスミド) および Cre リコンビナーゼは先行研究^[13]で調製されたものを用いた。loxP レポータープラスミドは HeLa 細胞に対して Lipofectamine LTX を用い推奨プロトコルに従ってトランスフェクションした。24 時間後、細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、ペプチドおよび 5 ないし 10 µM の Cre リコンビナーゼを含む α-MEM(-) を細胞に投与し 37°C、5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、さらに 24 時間インキュベートした。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄したのちに α-MEM(+) を添加し CLSM にて DsRed および EGFP のシグナルを観察した。

Cre レポーターノックインマウスの右側脳室における Cre/loxP 組換え実験

全てのマウスを用いた実験は筑波大学動物実験委員会の許可を得たうえで行われた。ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N マウス (R26GRR マウス、メス、成体) を本実験で用いた。麻酔下 HAad 40 µM および Cre リコンビナーゼ 5 µM を含む溶液 5 µL を右側脳室に投与し、7 日間飼育した。そののちマウスを麻酔下で生理食塩水およびパラホル

ムアルデヒドを用いて灌流固定した。10%, 20%, 30%スクロースで平衡化したのちに脳を OCT コンパウンドに包埋し、冷凍脳切片 (10 mm) を得た。核は DAPI により染色され tDsRed (タンDEM DsRed) と DAPI の蛍光を観察した。

統計解析

全ての統計解析は JMP Pro (ver. 14.0.0; SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。2 群間の比較には F 検定による分散が等しいことを確認したのちにスチューデントの t 検定を用いた。多群間の比較には一元配置分散分析の後に Dunnett の方法もしくは Tukey-Kramer の方法を用いた。p 値が 0.05 よりも小さい場合に有意な差があるとみなした。

第二章の実験

ペプチドの合成

ペプチド鎖の構築は TGS-RAM 樹脂を用い、PSSM-8 ペプチド固相合成機で行った。Lys 側鎖の修飾には 9-fluorenylmethyloxycarbonyl-Lys(4-methyltrityl)-OH (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) を用い、側鎖を保護された状態でペプチド鎖を樹脂上で合成した。N 末端を di-tert-butyl dicarbonate (Boc₂O) を用いて Boc 基で保護した後、hexafluoroisopropanol (HFIP)/dichloromethane (DCM) (1:4 (v:v)) で Mtt 基のみを選択的に脱保護した。第二章第一節では露出した Lys 側鎖のアミノ基に対して 1-amidinopyrazole hydrochloride を *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) 存在下で反応させることによりアミノ基へのアミジノ基の付加を行うことでアミノ基をグアニジノ基へと置換した。第二節では上述と同様の手法で露出させた Lys 側鎖のアミノ基に対してプロピオン酸、ヘキサン酸、デカン酸、コレステリルヘミコハク酸、1-ピレンブタン酸を 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1*H*-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate (HBTU)と 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)および DIEA 存在下で反応させることで各種疎水性基を導入した HAad (C3-HAad, C6-HAad, C10-HAad, Chol-HAad, pBu-HAad, HAad-C3, HAad-C6, HAad-C10, HAad-Chol, HAad-pBu) に対応するペプチド樹脂を得た。その後 TFA/EDT (95:5 (v:v)) で 23°C で 3 時間処理し、樹脂からの切り出しと脱保護を行った後に HPLC によりペプチドの精製を行い、MALDI-TOFMS により分子量が正しいことを確認した。合成したペプチドの配列と質量分析結果は Table 4 のとおりである。

Table 4. Sequence of peptides and results of MS analysis

| peptide | sequence (X; L-2-aminoadipic acid, hR; homoarginine) | 実測値 m/z | 理論値 [M+H] ⁺ calcd. |
|-----------|--|------------|----------------------------------|
| HAad | IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide | 2755.9 | 2755.7 |
| HAad-hR | IWLTAL-hR-FLG-hR-AAA-hR-AXA-hR-QXLS-hR-L-amide | 2965.5 | 2965.8 |
| HAad-R | IWLTALRFLGRAAARAXARQXLSRL-amide | 2895.6 | 2895.7 |
| C3-HAad | K(propionyl)-GGGG-IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide | 3168.0 | 3167.8 |
| C6-HAad | K(hexanoyl)-GGGG-IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide | 3210.1 | 3209.9 |
| C10-HAad | K(decanoyl)-GGGG-IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide | 3266.3 | 3266.0 |
| HAad-C3 | IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-GGGG-K(propionyl)-amide | 3168.0 | 3167.8 |
| HAad-C6 | IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-GGGG-K(hexanoyl)-amide | 3210.2 | 3209.9 |
| HAad-C10 | IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-GGGG-K(decanoyl)-amide | 3266.2 | 3266.0 |
| Chol-HAad | K(Chol)-GGGG-IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide | 3579.3 | 3579.8 |
| HAad-Chol | IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-GGGG-K(Chol)-amide | 3579.3 | 3579.8 |
| pBu-HAad | K(pBu)-GGGG-IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-amide | 3382.4 | 3382.3 |
| HAad-pBu | IWLTALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-GGGG-K(pBu)-amide | 3382.5 | 3382.3 |

(注) K 後の () 内は側鎖アミノ基に導入されたアシル基を示す。

Cas9/sgRNA 複合体の細胞内送達とゲノム編集効率の算出

HeLa 細胞を 24 ウェルマイクロプレートに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 40-50% コンフルエントになるまで培養した。Cas9/sgRNA 複合体 (リボヌクレオタンパク質、RNP) は Cas9 (TrueCut Cas9 protein v2, Invitrogen) と sgRNA (TrueGuide Synthetic sgRNA for human HPRT1, Invitrogen) および Cas9 Plus Reagent (Invitrogen) を混合することにより調

製した。RNP は Opti-MEM I reduced serum medium (Invitrogen) 中でペプチドと混合した後、細胞と 37°C で 6 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、 α -MEM(+) を添加し、さらに 37°C で 42 時間インキュベートした。lipofectamine CRISPRMAX (Invitrogen) を用いたトランスフェクションでは、RNP と lipofectamine CRISPRMAX を混合して 20°C で 15 分静置後ウェルに添加し 48 時間インキュベートした。

ゲノム編集効率は GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Invitrogen) を使い、推奨プロトコルに従って導出した。細胞溶解後にタンパク質を分解し、のちにゲノム中の HPRT1 の遺伝子座を以下のプライマー (Forward: 5'-ACATCAGCAGCTGTTCTG-3', Reverse: 5'-GGCTGAAAGGAGAGAACT-3') を用いた PCR により増幅した。増幅した 2 本鎖 DNA を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Kit (Promega) を用いて精製後、変性・再アニーリングさせることで、RNP により挿入欠失が起こった HPRT1 領域由来の 1 本鎖と挿入欠失が起こらなかった 1 本鎖がアニールすることにより mismatches を含むヘテロ 2 本鎖を形成させた。この mismatches を選択的に認識し切断する Detection Enzyme で処理した。酵素処理した DNA を非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動することで、切断された 2 本鎖 DNA の割合を挿入欠失が起こった割合から算出した。

PyB 存在下での蛍光標識 10 kDa デキストランの細胞内局在観察

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下でコンフルエントになるまで培養した。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、PyB 25 μ M を含むもしくは含まない α -MEM(-) を細胞に投与し 37°C、5% CO₂ 存在下で 30 分インキュベートした。インキュベート後溶液を除き、HAad 20 ないし 40 μ M、および 200 μ g/mL Dex10-Alexa を含み、PyB 25 μ M 含有 (もしくは非含有の) α -MEM(-) を細胞に投与し 37°C、5% CO₂ 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、5

$\mu\text{g/mL}$ Hoechst 33342 を含む $\alpha\text{-MEM}(+)$ を添加して 10 分インキュベートし、核染色した。その後 $\alpha\text{-MEM}(+)$ に溶液を置換し、Dex10-Alexa の細胞内局在を評価した。

Generalized Polarization (GP) 値解析による細胞膜パッキングの評価

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュに播種し、 37°C 、5% CO_2 存在下でコンフルエントになるまで培養した。細胞を $\text{PBS}(-)$ で 2 回洗浄後、極性感受性蛍光色素の di-4-ANEPPDHQ (2-hydroxy-3-[2-[(2-hydroxyethyl)dimethylamino]ethyl]-4-[2-[6-(dibutylamino)-2-naphthyl]ethenyl]pyridinium dibromide, Molecular Probes) を含む $\alpha\text{-MEM}(-)$ 150 μL を細胞に投与し、FV3000 Olympus laser scanning microscope に併設された超音波ステージ IX3-SSU (Olympus) に搭載した顕微鏡用培養システム STXF-IX3WX-SET (TOKAI HIT) 上で 37°C 、5% CO_2 存在下で 10 分インキュベートした。インキュベート中にマルチエリアタイムラプスのための撮影視野を 8 つ決定し、インキュベート終了後にマルチエリアタイムラプスを開始した (インターバル 2 分、6 枚)。di-4-ANEPPDHQ の励起には 488 nm のレーザーを用い、蛍光を 510-550 nm と 630-670 nm の波長範囲を 2 つのチャンネルに分けて撮影した。画像取得の出力はサンプル添加前において 2 チャンネルの蛍光強度が同程度となるように調整した。マルチエリアタイムラプス開始 5 分後にペプチドもしくは PyB を含む $\alpha\text{-MEM}(-)$ 50 μL を添加した。マルチエリアタイムラプスで得られた画像のうち 1 枚目 (添加 5 分前) と 6 枚目 (添加 5 分後) を以下の解析に用いた。

GP 値の解析では、510-550 nm と 630-670 nm の各蛍光波長域のピクセル単位の蛍光強度をそれぞれ $I_{510-550}$ 、 $I_{630-670}$ として以下の式より GP 値を算出した。

$$GP = \frac{I_{510-550} - I_{630-670}}{I_{510-550} + I_{630-670}}$$

GP 値の算出および得られた GP 値の分布画像の作成は先行研究^[39]で報告されているマクロを用いて ImageJ 1.47 (NIH) で行った。ペプチドもしくは PyB による細胞膜の GP

値の変化を解析する際には、GP 値の分布画像上で細胞膜部分を手動で選択した領域を region of interest (ROI) とし、8つの撮影視野1つごとに10個のROIを選択し、それを3日にかけて行ったため結果として240個のROIを選択した。

以下の式からROI内のdigital number (0-255, DN) の平均値を-1から+1のGP値に変換した。

$$GP = \frac{DN}{127.5} - 1$$

得られたGP値の変化の大きさ (ΔGP 値) の分布を表した dot plot (n = 240) の作成や統計解析は JMP Pro (ver. 14.0.0; SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。Bartlett 検定の結果等分散ではないサンプルであることが明らかとなったため、Kruskal-Wallis 検定を行い、その事後検定として Steel-Dwass 検定を行った。

第三章の実験

ペプチドの合成

全てのペプチドの鎖の構築は PSSM-8 ペプチド固相合成機で行った。C 末端アミドのペプチド (Cys(Gly)₄-HAad-amide, HAad-(Gly)₄Cys-amide) の合成には TGS-RAM 樹脂を、その他の C 末端カルボン酸のペプチドの合成には TGS-PHB 樹脂を用いた。

蛍光標識 HAad (HAad-(Gly)₄Cys(Alexa488)) の合成では、HPLC 精製した未標識ペプチドに Alexa Fluor 488 C5-maleimide (Invitrogen) を反応させることで目的のペプチドを得た。HPLC による精製、MALDI-TOFMS による分子量の同定を行った。

Cys(NTA)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH の合成の際には特殊アミノ酸として Fmoc-Lys(Mtt)-OH を用い、最初のアミノ酸として TGS-PHB 樹脂に導入するために Fmoc-Lys(Mtt)-OH (4 eq.), HOBt (4 eq.), *N, N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC, 4 eq.) および 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 0.1 eq.) をこの順番で添加した。反応後、未反応のヒドロキシ基をキャッピングするために無水酢酸 (2 eq.) と DIEA (2 eq.) を添加した。C 末端から数えて 2 つ目のアミノ酸以降は PSSM-8 を用いて合成し、最終的に Lys(Mtt) の側鎖を保護された状態でペプチド鎖を樹脂上で合成した。Boc₂O を用いて N 末端を Boc 修飾し、HFIP/DCM (1:4 (v:v)) での Mtt 基のみの選択的な脱保護を行った後、azido-PEG₁₂-NHS ester (Quanta BioDesign) (1.5 eq.), DIEA (1.5 eq.) を反応させた。TFA/triisopropylsilane (TIS)/H₂O (95:2.5:2.5 (v:v:v)) 処理によって TGS-PHB 樹脂からペプチドを切り出して Mtt 基以外の保護基の脱保護を行った後に HPLC によりペプチドの精製を行った。精製したペプチドに対して maleimido-C3-NTA (Dojindo, 2 eq.) または Alexa Fluor 488 C5-maleimide を反応させ、HPLC 精製、MALDI-TOFMS による分子量の同定を経て Cys(NTA)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH または Cys(Alexa488)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH を得た。

Cys(DBCO)(Gly)₄-HAad-amide および HAad-(Gly)₄Cys(DBCO)-amide の合成の際には

TGS-RAM 樹脂と PSSM-8 により N 末端もしくは C 末端にテトラグリシンリンカーを介してシステインを有する HAad を合成した。樹脂からの切り出しと脱保護、HPLC による精製の後、DBCO-maleimide (東京化成工業, 1.2 eq.), *N*-methylmorpholine (5 eq.) を反応させた。反応物の HPLC 精製、MALDI-TOFMS による分子量の同定によって Cys(DBCO)(Gly)₄-HAad-amide および HAad-(Gly)₄Cys(DBCO)-amide を得た。

最後に、dimethylformamide/H₂O (1:1 (v:v))中で、Cys(NTA)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH と Cys(DBCO)(Gly)₄-HAad-amide, Cys(NTA)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH と HAad-(Gly)₄Cys(DBCO)-amide, Cys(Alexa488)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH と Cys(DBCO)(Gly)₄-HAad-amide, Cys(Alexa488)-β-annulus-GlyLys(PEG₁₂-N₃)-OH と HAad-(Gly)₄Cys(DBCO)-amide, を混合してクリック反応により NTA-β-annulus-N[HAad], NTA-β-annulus-C[HAad], Alexa488-β-annulus-N[HAad], Alexa488-β-annulus-C[HAad]を得た。得られたペプチドは HPLC による精製、MALDI-TOFMS による分子量の同定を行った。合成したペプチドの配列および構造は Fig. 31-33 および Table 5 に、質量分析結果は Table 5 に示す。

Table 5. Sequence of peptides and results of MS analysis

| peptide (X; L-2-aminoadipic acid) | 実測値 m/z | 理論値 [M+H] ⁺ calcd. |
|--|------------|----------------------------------|
| HAad-(Gly) ₄ Cys(Alexa488) (IWL TALKFLGKAAAKAXAKQXLSKL-GGGG-Cys(Alexa488)-amide) | 3785.2 | 3784.3 |
| Cys(NTA)-β-annulus-GlyLys(PEG ₁₂ -N ₃)-OH [I] | 3628.1 | 3626.9 |
| Cys(Alexa488)-β-annulus-GlyLys(PEG ₁₂ -N ₃)-OH | 3900.0 | 3899.3 |
| Cys(DBCO)(Gly) ₄ -HAad-amide [II] | 3514.2 | 3513.9 |
| HAad-(Gly) ₄ Cys(DBCO)-amide [III] | 3513.6 | 3513.9 |
| NTA-β-annulus-G-OH | 2874.9 | 2872.7 |
| NTA-β-annulus-N[HAad] | 7139.5 | 7138.8 |
| NTA-β-annulus-C[HAad] | 7139.4 | 7138.8 |
| Alexa488-β-annulus-G-OH | 3146.5 | 3145.7 |
| Alexa488-β-annulus-N[HAad] | 7411.4 | 7411.2 |
| Alexa488-β-annulus-C[HAad] | 7411.6 | 7411.2 |

DLS 測定

DLS 測定においては、ペプチド 8 nmol を 0.2 nm フィルター処理した純水 200 μL に溶解することで 40 μM のペプチド水溶液とした。CAC を求める実験では上記と同様に 40 μM とした水溶液を段階的に希釈することで 40, 20, 10, 5, 2, 1, 0.5, 0.1 μM に調製した。調製したペプチド水溶液を 23°C で 1 時間静置させた。静置後サンプルをディスポーザブルキュベット (ZEN0040, Malvern Panalytical) に移し、Zetasizer Nano S (Malvern Panalytical) を用いて 25°C、測定角 173°、測定時間 10 秒、積算時間 10 回、測定回数 3 回の条件で DLS 測定を行った。得られた結果の中から個数ベースの粒子径分布を結果

として用いた。

TEM 観察

TEM 観察ではペプチド 8 nmol を PBS(+) 200 μ L に溶解することで 40 μ M とした。調製したペプチド水溶液を 23°C で 1 時間静置させた。静置後サンプルのうち 5 μ L を C-SMART Hydrophilic カーボンフィルム TEM グリッド (10 nm, ALLIANCE Biosystems) に載せ 1 分静置後濾紙で水気を除き、5 μ L EM スтейナー (日新 EM) を用いてネガティブ染色 (15 分) した。濾紙で余った EM スтейナーを除き、真空乾燥 (3 時間) したのちに JEM-1400 Plus (JEOL) により印加電圧 80 kV にて TEM 観察を行った。

限外濾過を用いた EGFP-His₆ の人工ウイルスキャプシドへの内包効率の導出

限外濾過による EGFP-His₆ の内包試験ではペプチド 20 nmol を NiCl₂ 40 μ M, EGFP-His₆ 5 μ M を含む PBS(+) 500 μ L に溶解させてペプチド 40 μ M とした。23°C で 1 時間静置させたのち、サンプルを Amicon Ultra 0.5 mL (MWCO 100K, Merck Millipore) に移して 14,000g にて 15 分遠心した。遠心後限外濾過膜に残った画分 (20 μ L) と濾過された画分 (480 μ L) にそれぞれ 480 μ L, 20 μ L の PBS(+)を加えて共に 500 μ L とした。それぞれのサンプル 15 μ L と 2-メルカプトエタノール含有 4x SDS sample buffer 5 μ L を混合し 95°C で 5 分加熱後 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE, 15% acrylamide, 100 V, 1 h) を行った。泳動後、rapid stain CBB (ナカライテスク) を用いて 20 分染色し、そののち純水で一晩脱染色を行った。脱染色後のゲルをスキャナーにて画像化し、ImageJ によりゲル画像のバンドを定量化した。

蛍光標識ペプチドを用いた人工ウイルスキャプシドの細胞内局在観察

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュに播種し、37°C、5% CO₂ 存在下でコンフルエントになるまで培養した。蛍光標識ペプチド 2 nmol を PBS(+) 200 μ L に溶解するこ

とで 10 μM とした。細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、23°C で 1 時間静置させたサンプルを細胞に添加して 37°C、5% CO_2 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、 α -MEM(+) に溶液を置換したのちにペプチドの細胞内局在を CLSM 観察により評価した。

EGFP-His₆ 内包人工ウイルスキャプシドの細胞内取り込みと顕微鏡観察

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュに播種し、37°C、5% CO_2 存在下でコンフルエントになるまで培養した。ペプチド 8 nmol を NiCl_2 40 μM , EGFP-His₆ 5 μM を含む PBS(+) 200 μL に溶解させてペプチド 40 μM とした。同様にして Ni^{2+} を含まないサンプル、10% BS を含むサンプルを用意した。それらは 23°C で 1 時間静置させることで人工ウイルスキャプシドを形成させた。また、限外濾過膜に残った画分を投与するサンプルでは、ペプチド 8 nmol を NiCl_2 40 μM , EGFP-His₆ 5 μM を含む PBS(+) 200 μL に溶解させてペプチド 40 μM としたものを Amicon Ultra 0.5 mL (MWCO 100K) に移して 14,000g にて 15 分遠心した。遠心後限外濾過膜に残った画分 (20 μL) を PBS(+) 180 μL で希釈したものをサンプルとして用いた。

細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、サンプルを細胞に投与し 37°C、5% CO_2 存在下で 1 時間インキュベートした。インキュベート後細胞を PBS(-) で 2 回洗浄し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst 33342 を含む α -MEM(+) を添加して 10 分インキュベートすることにより核染色を行った。インキュベート後 α -MEM(+) に溶液を置換し、EGFP-His₆ の細胞内局在を CLSM にて評価した。

引用文献

- [1] S. Guillard, R. R. Minter, R. H. Jackson, *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 163–171.
- [2] K. Singh, W. Ejaz, K. Dutta, S. Thayumanavan, *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 1028–1041.
- [3] P. D. Kaiser, J. Maier, B. Traenkle, F. Emele, U. Rothbauer, *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1844*, 1933–1942.
- [4] S. A. Smith, L. I. Selby, A. P. R. Johnston, G. K. Such, *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 263–272.
- [5] D. Pei, M. Buyanova, *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 273–283.
- [6] D. J. Brock, H. M. Kondow-Mcconaghy, E. C. Hager, J. P. Pellois, *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30*, 293–304.
- [7] A. El-Sayed, S. Futaki, H. Harashima, *AAPS J.* **2009**, *11*, 13–22.
- [8] W. Li, F. Nicol, F. C. Szoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 967–985.
- [9] A. Erazo-Oliveras, K. Najjar, L. Dayani, T. Y. Wang, G. A. Johnson, J. P. Pellois, *Nat. Methods* **2014**, *11*, 861–867.
- [10] M. Meyer, A. Philipp, R. Oskuee, C. Schmidt, E. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3272–3273.
- [11] S. Kim, S. Hyun, Y. Lee, Y. Lee, J. Yu, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3007–3015.
- [12] M. Li, Y. Tao, Y. Shu, J. R. LaRochelle, A. Steinauer, D. Thompson, A. Schepartz, Z. Y. Chen, D. R. Liu, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 14084–14093.
- [13] M. Akishiba, T. Takeuchi, Y. Kawaguchi, K. Sakamoto, H.-H. Yu, I. Nakase, T. Takatani-Nakase, F. Madani, A. Gräslund, S. Futaki, *Nat. Chem.* **2017**, *9*, 751–761.
- [14] M. Akishiba, S. Futaki, *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 2540–2548.
- [15] R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, K. M. Jones, *Data for Biochemical Research (Third Edition)*, Oxford University Press, Oxford, **1986**.
- [16] S. Kim, S. Hyun, Y. Lee, Y. Lee, J. Yu, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 3007–3015.
- [17] Y. W. Cho, J.-D. Kim, K. Park, *J. Pharm. Pharmacol.* **2003**, *55*, 721–734.
- [18] T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, T. Kawano, Y. Nakayama, *J. Control. Release* **2015**, *210*, 115–124.
- [19] J. Shi, J. G. Schellinger, R. N. Johnson, J. L. Choi, B. Chou, E. L. Anghel, S. H. Pun, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 1961–1970.
- [20] H. Ellens, J. Bentz, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1984**, *23*, 1532–1538.
- [21] T. Kobayashi, E. Stang, K. S. Fang, P. De Moerloose, R. G. Parton, J. Gruenberg, *Nature* **1998**, *392*, 193–197.
- [22] H. Matsuo, J. Chevallier, N. Mayran, I. Le Blanc, C. Ferguson, J. Fauré, N. S. Blanc, S. Matile, J. Dubochet, R. Sadoul, R. G. Parton, F. Vilbois, J. Gruenberg., *Science* **2004**, *303*, 531–534.
- [23] R. W. Woody, *Methods Enzymol.* **1995**, *246*, 34–71.
- [24] K. Matsuzaki, O. Murase, H. Tokuda, S. Funakoshi, N. Fujii, K. Miyajima, *Biochemistry* **1994**, *33*, 3342–3349.
- [25] B. Poole, S. Ohkuma, *J. Cell Biol.* **1981**, *90*, 665–669.
- [26] Y. R. Hadari, K. Paz, R. Dekel, T. Mestrovic, D. Accili, Y. Zick, *J. Biochem. Chem.* **1995**, *270*, 3447–3453.
- [27] K. V. Kilchrist, S. C. Dimobi, M. A. Jackson, B. C. Evans, T. A. Werfel, E. A. Dailing, S. K. Bedingfield, I. B. Kelly, C. L. Duvall, *ACS Nano* **2019**, *13*, 1136–1152.
- [28] D. L. Thiele, P. E. Lipsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1990**, *87*, 83–87.

- [29] S. Aits, J. Krickler, B. Liu, A. M. Ellegaard, S. Hämälistö, S. Tvingsholm, E. Corcelle-Termeau, S. Høgh, T. Farkas, A. H. Jonassen, I. Gromova, M. Mortensen, M. Jäättelä, *Autophagy* **2015**, *11*, 1408–1424.
- [30] K. Araki, M. Araki, J. I. Miyazaki, P. Vassalli, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 160–164.
- [31] Y. Hasegawa, Y. Daitoku, K. Sekiguchi, Y. Tanimoto, S. Mizuno-Iijima, S. Mizuno, N. Kajiwara, M. Ema, Y. Miwa, K. Mekada, A. Yoshiki, S. Takahashi, F. Sugiyama, K. Yagami, *Exp. Anim.* **2013**, *62*, 295–304.
- [32] J. L. Cohen-Pfeffer, S. Gururangan, T. Lester, D. A. Lim, A. J. Shaywitz, M. Westphal, I. Slavic, *Pediatr. Neurol.* **2017**, *67*, 23–35.
- [33] F. Nadal-Bufí, S. T. Henriques, *Pept. Sci.* **2020**, *112*, DOI 10.1002/pep2.24168.
- [34] S. Futaki, I. Nakase, *Acc. Chem. Res.* **2017**, *50*, 2449–2456.
- [35] E. G. Stanzl, B. M. Trantow, J. R. Vargas, P. A. Wender, *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2944–2954.
- [36] Y. Kawaguchi, T. Takeuchi, K. Kuwata, J. Chiba, Y. Hatanaka, I. Nakase, S. Futaki, *Bioconjugate Chem.* **2016**, *27*, 1119–1130.
- [37] M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sakamoto, Y. Ohkura, K. Ueno, *Talanta.* **1997**, *44*, 1299–1305.
- [38] S. F. Dowdy, *Nat. Biotechnol.* **2017**, *35*, 222–229.
- [39] T. Murayama, T. Masuda, S. Afonin, K. Kawano, T. Takatani-Nakase, H. Ida, Y. Takahashi, T. Fukuma, A. S. Ulrich, S. Futaki, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 7644–7647.
- [40] D. M. Owen, C. Rentero, A. Magenau, A. Abu-Siniyeh, K. Gaus, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 24–35.
- [41] T. K. Kim, J. H. Eberwine, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3173–3178.
- [42] K. Matsuura, K. Watanabe, T. Matsuzaki, K. Sakurai, N. Kimizuka, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9662–9665.
- [43] K. Matsuura, T. Nakamura, K. Watanabe, T. Noguchi, K. Minamihata, N. Kamiya, N. Kimizuka, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 7869–7874.
- [44] K. Matsuura, G. Ueno, S. Fujita, *Polym. J.* **2015**, *47*, 146–151.
- [45] Y. Nakamura, S. Yamada, S. Nishikawa, K. Matsuura, *J. Pept. Sci.* **2017**, *23*, 636–643.
- [46] S. Fujita, K. Matsuura, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 5070–5077.
- [47] X. Yan, F. Kuipers, L. M. Havekes, R. Havinga, B. Dontje, K. Poelstra, G. L. Scherphof, J. A. A. M. Kamps, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *328*, 57–62.
- [48] D. Stone, A. David, F. Bolognani, P. R. Lowenstein, M. G. Castro, *J. Endocrinol.* **2000**, *164*, 103–118.
- [49] J. S. Appelbaum, J. R. Larochele, B. A. Smith, D. M. Balkin, J. M. Holub, A. Schepartz, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 819–830.
- [50] N. Milech, B. A. Longville, P. T. Cunningham, M. N. Scobie, H. M. Bogdawa, S. Winslow, M. Anastasas, T. Connor, F. Ong, S. R. Stone, et al., *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 1–11.
- [51] L. Peraro, K. L. Deprey, M. K. Moser, Z. Zou, H. L. Ball, B. Levine, J. A. Kritzer, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 11360–11369.
- [52] S. Aubry, B. Aussedat, D. Delaroche, C. Y. Jiao, G. Bolbach, S. Lavielle, G. Chassaing, S. Sagan, F. Burlina, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2010**, *1798*, 2182–2189.
- [53] R. F. Wissner, A. Steinauer, S. L. Knox, A. D. Thompson, A. Schepartz, *ACS Cent. Sci.* **2018**, *4*, 1379–1393.

謝辞

終わりに臨み、終始ご懇篤なるご指導ならびにご鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 二木 史朗 教授に謹んで感謝の意を表します。

数々のご指導、ご助言をいただきました今西 未来 博士（京都大学化学研究所 准教授）、広瀬 久昭 博士（京都大学化学研究所 特定准教授）、河野 健一 博士（京都大学化学研究所 助教）に深く感謝いたします。

第一章の動物実験を遂行して頂いた杉山 文博 教授、水野 聖哉 准教授、村田 知弥 助教（筑波大学実験動物学研究室）に深く御礼申し上げます。また、第二章のデータ解析に関してご指導、ご助言をいただきました中瀬（高谷）朋夏 教授（武庫川女子大学薬学部）に深く感謝いたします。研究に加えて、折に触れご助言やご激励を頂きました秋柴 美沙穂 博士（九州大学）、実験の一部を担当してくださいました道端 淳也 学士をはじめ京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域の皆様にご心より感謝いたします。

また本研究の一部は日本学術振興会 DC1 の援助によるものであり、感謝いたします。

最後に、私の研究活動を温かく見守り支えてくださった家族に、この場を借りて深く感謝申し上げます。