

「In-Cell NMRによる薬物の細胞内輸送の定量計測と予測モデルの構築」

姫路獨協大学薬学部 教授 岡村 恵美子

1 研究の背景と目的

薬物の輸送過程をリアルタイムで観測し、“定量化”することは、薬の効果や毒性の評価など、創薬の基礎となる重要な情報を与える。細胞に対して「磁場」という弱い摂動しか与えない核磁気共鳴 (NMR) を利用した in-cell NMR は負荷のない計測手段であり、細胞に対する薬物の作用を原子レベルで捉えることが期待される。しかしながら、薬物輸送の“定量化”は、「生きた細胞」では成功していない。

筆者らは、すでに、in-cell NMR を用いて、水溶液中に浮遊したヒト生細胞とペプチドの相互作用の直接観測に着手した。蛍光発色団で標識したペプチドと非標識のペプチドについて、生細胞への取り込みの経時変化を観測したところ、蛍光色素のもつ疎水的性質が細胞膜への結合を安定化させ、ペプチドの取り込みを加速させることが明らかとなった[1]。生きた細胞を用いた物質輸送の研究には、輸送される分子の物性を変えることなく、かつ、細胞に負荷を与えずにリアルタイムで計測する環境が必要であり、この意味で、NMR が有効であることが分ってきた。

そこで、本研究では、高分解能溶液 NMR を用いた in-cell NMR 法をさらに展開して、「生きた」細胞への薬物の分配・輸送の非侵襲定量化を確立することを目的とした。(1) 時間分解 NMR 計測によって、薬物の輸送過程をリアルタイムで捉え、(2) 細胞の「内」と「外」を識別して、薬物の結合量を“その場”で定量し、そのうえで、(3) 薬物の「結合と解離の速度論的解析」を行う。これによって、蛍光標識に代わる新しい定量計測法を確立し、細胞への「薬物輸送の予測と輸送機構の解明」を行う。小分子から巨大なタンパク質までの輸送のようすを“そのまま”捉えて、薬物輸送のライブラリーを構築し、作用や毒性の予測、創薬への応用を目指すことを最終目標とした。

2 研究方法・研究内容

細胞膜を透過することが知られるオクタアルギニンペプチド (Arg_8) をモデル薬物として選択し、ヒト白血病細胞株 HL60 (図 1) への輸送過程を、NMR により分単位の時間分解でリアルタイム計測した。これをもとに、シグナル強度の変化から、定量的な速度論へ展開した。細胞中のペプチドを識別するため、ペプチドの N 末端をパラトリフルオロメチルフェニルアラニン ($\text{CF}_3\text{-Phe}$) で修飾した $\text{CF}_3\text{-Phe-(Arg)}_8$ を固相合成して使用した。

リン酸 buffer (PBS, pH 7.4) 中に浮遊させたヒト白血病細胞株 HL60 (10^7 cells/mL) に $\text{CF}_3\text{-Phe-(Arg)}_8$ ペプチド 80 μM を加えた。ペプチド中のフッ素原子核をモニターした ^{19}F NMR スペクトルの変化を、先に開発した方法 [1] を用いて、分単位の時間分解でリアルタイム計測した。「受容体や輸送タンパク質の関与しない新しいタイプの細胞内輸送」を観測するために、温度は、タンパク質が機能しない 4 $^\circ\text{C}$ で実施した。NMR 計測



図 1. HL60 細胞. 球形で直径 10 μm .

の前後にトリパンブルー染色を行い、細胞の生存を常時確認した。得られた ^{19}F NMR スペクトルの変化から、ペプチドが細胞表面に結合し、細胞膜を通過して内部に移行する様子を分単位で定量した。膜輸送過程が平衡状態に到達した後のペプチドの細胞内分布は、可溶化と遠心分離操作で得られた各々の細胞画分について、 ^{19}F NMR で定量した。

3 研究成果

HL60 添加後にリアルタイムで観測した $\text{CF}_3\text{-Phe-(Arg)}_8$ ペプチドの ^{19}F NMR スペクトルには、4つの状態が観測された。それぞれ、水中 (F)、細胞表面の糖鎖 (G) と結合、細胞膜中 (M)、細胞質ゾル中 (C) のペプチドに帰属される。それぞれの状態にあるペプチドの濃度の時間変化から、細胞へのペプチドの輸送は、図2に示すように、正電荷を有するペプチドが負電荷をもつ細胞表面糖鎖 G にまず結合し、その後、熱揺らぎにより細胞膜 M を通過して細胞質内 C に輸送されるという「タンパク質の関与しない」新しいタイプの輸送のプロセスを確認した。

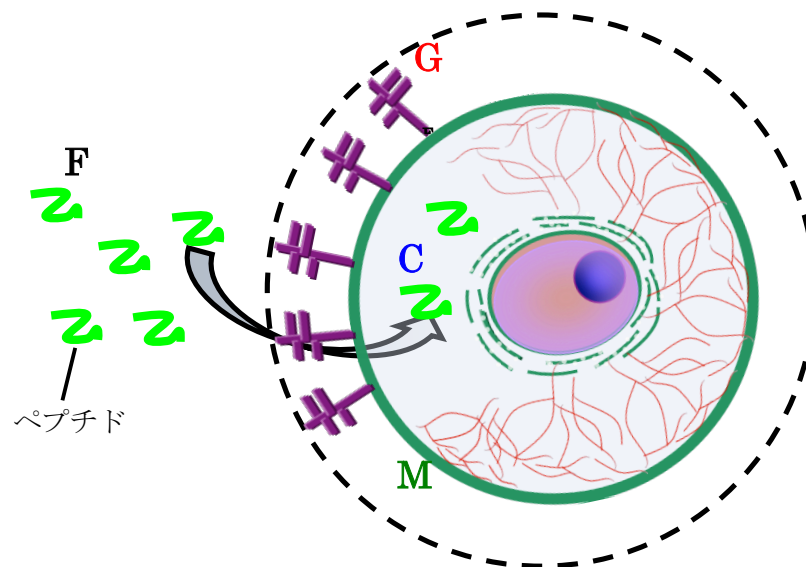


図2. In-cell NMR 計測の結果から予想される細胞へのペプチドの輸送機構。

リアルタイム計測終了後に細胞分画を行って、細胞質ゾル画分からペプチドの NMR シグナルを検出することができた。これによって、アルギニンペプチドが細胞膜を透過して確かに細胞質内に移行したことを確認した。

本研究で得られた結果は、リアルタイム in cell NMR 法が、アルギニンペプチドのような細胞膜透過ペプチドの輸送機構の詳細を探るための新しい方法論となることを示すものである。一方、細胞への輸送がおこらないと予想される α -クリスタリン由来のペプチドでは in cell NMR スペクトル変化が観測されなかった。このことから、膜輸送の有無に対応したリアルタイムの変化を in cell NMR で観測し、定量可能であることが証明された。これらの成果は、内外の学会で公表するとともに、論文が学術誌に掲載された。

【発表論文】 Y.Takechi-Haraya, K.Aki, Y.Tohyama, Y.Harano, T.Kawakami, H.Saito, E.Okamura, Glycosaminoglycan Binding and Non-Endocytic Membrane Translocation of Cell-Permeable Octaarginine Monitored by Real-Time In-Cell NMR Spectroscopy. *Pharmaceuticals* **10**, 42 (2017).

本研究を通して、in cell NMR 法が、アルギニンペプチドの細胞内への輸送過程をリアルタイムで定量計測するために有効であり、輸送の新しいメカニズムを研究する優れた方法であることが明らかとなった。しかしながら、時間の関係で、他のペプチドについて、NMR 計測による詳細な輸送過程の解析を行うことはできなかった。今後、さらに多くの輸送物質や薬物について観測を行い、in cell NMR の有効性を確認するとともに、熱揺らぎにもとづく新しい輸送機構の解明、細胞への物質の輸送を予測するための理論的なモデルの確立に向けて、研究を継続していきたい。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は、生きた細胞への薬物の輸送機構を解明する新しいアプローチとして、薬の作用や毒性の予測、創薬への応用が期待される。今後、①アルギニンペプチドに代表されるような、バイオ医薬品を細胞へ効率的に導入するツールとしてのペプチド (Cell Penetrating Peptide, CPP) の設計、②CPP の一種であるヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1、エイズウイルス) 由来ペプチドの細胞への感染メカニズムの解明と抗ウイルス薬の創出などに貢献することが期待される。

さらに、CPP で「受容体や輸送タンパク質の関与しない細胞内輸送機構」が示されたことから、今後、薬物の種類を増やして研究を継続することで、従来のメカニズムで説明のできない新しい物質輸送の概念を確立することが可能となる。生体系の物質輸送に関する新しい研究分野への展開に繋がるものと考えられる。

【謝辞】

本研究は、公益財団法人ひょうご科学技術協会 平成 25 年度学術研究助成金によって実施された。ご支援に対し、厚く御礼申し上げます。また、研究分担者として、姫路獨協大学薬学部・通山由美教授が「細胞の提供と生存率測定」を、同・武知佑樹助教が「ペプチド合成・NMR 計測とデータ解析」を、同・安岐健三助手が「ペプチド合成とデータ解析」を担当した。

【文献】

[1] E.Okamura, K.Ninomiya, S.Futaki, Y.Nagai, T.Kimura, C.Wakai, N.Matubayasi, Y.Sugiura, M.Nakahara, *Chem. Lett.* **34**, 1064 (2005).