

蛍光バイオイメージングを基盤とするペプデュシン細胞内移行機構  
の解明と新規細胞内送達システムの開発に関する研究

2013

辻 美 恵 子

# 目次

## 理論の部

序論	…1
著者の研究方針	…4
第一章 ペプデュシンを基盤とするレドックス感受性蛍光プローブの開発と細胞内移行機構の解析	
第一節 緒言	…6
第二節 ペプデュシンを基盤とするレドックス感受性蛍光プローブの分子設計	…7
第三節 ペプデュシン型蛍光プローブの合成	…9
第四節 レドックス感受性 FRET モデル化合物の評価	…13
第五節 膜局在型蛍光プローブによる細胞内移行の解析	
第一項 膜局在型ペプデュシンプローブの膜透過における構造因子に関する検討	…16
第二項 膜局在型ペプデュシンプローブによる細胞内移行の解析	…18
第六節 細胞質放出型プローブによる細胞内移行の解析	
第一項 コントロール化合物 <b>21</b> の還元方法について	…20
第二項 プローブ <b>14</b> とその細胞内移行の解析について	…21
第七節 考察	…22
第二章 PAR1 発現細胞におけるペプデュシンの細胞内動態の解析	
第一節 緒言	…23
第二節 PAR1 非発現細胞 MCF7 及び PAR1 発現細胞 MDA-MB-231 におけるペプデュシンの細胞内動態	…25
第三節 MDA-MB-231 におけるペプデュシンの細胞内局在性の解析	
第一項 リソソームへの局在	…26

第二項	フルオレセイン標識ペプデュシンの合成	…27
第三項	プローブ <b>26</b> と PAR1 蛋白質の局在性の比較	…27
第四節	D-アミノ酸から成るペプデュシンプローブ <b>28</b> の合成と蛍光イメージング	
第一項	プローブ <b>28</b> の合成	…29
第二項	プローブ <b>28</b> を用いたライブセルイメージング	…30
第五節	考察	…31
第三章	総括及び考察	…33
謝 辞		…35
	実験の部	
第一章 第三節	第一項に関する実験	…36
	第四節に関する実験	…45
第五節	第一項に関する実験	…45
	第二項に関する実験	…46
第六節	第一項に関する実験	…46
	第二項に関する実験	…47
第二章 第二節	に関する実験	…50
第三節	第一項に関する実験	…50
	第二項に関する実験	…51
第四節	第一項に関する実験	…52
引用文献		…55

## 理論の部

## 序 論

細胞膜は細胞の内側と外側を区別する境界であり、物質輸送、情報伝達、分子認識の場として機能し、細胞の恒常性の維持において重要な役割を果たしている。通常、親水性が高い物質やイオン性物質は脂質二重層から成る細胞膜を透過しない。このため、細胞機能の解析や制御、あるいは治療を目的として機能性分子や医薬品を細胞内に導入することは一般的に困難である。そこで、このような膜透過性のない化合物を細胞内へ送達させる方法の確立は、創薬における重要な課題の一つとなっている。

細胞内送達のキャリアとして膜透過ペプチド (cell-penetrating peptides; CPPs) やナノキャリアが近年広く用いられている。CPP の細胞への取り込み様式として、受容体を介したエンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、直接的な膜透過の3つの機構が考えられる (Fig. 1)<sup>1</sup>。エンドサイトーシスに基づく取り込み様式では、最終的に積荷分子がリソソームに運搬されて分解されてしまう恐れがあるため、リソソームからの脱出機構が必要となる<sup>2</sup>。これに対して、エンドサイトーシスを介さず分子を直接膜透過させる方法を用いれば、細胞質に直接届けることができることから、細胞内送達システムとして有用性が高いと考えられる<sup>3</sup>。直接膜透過による医薬品送達システムを確立することを目指し、本研究に着手した。

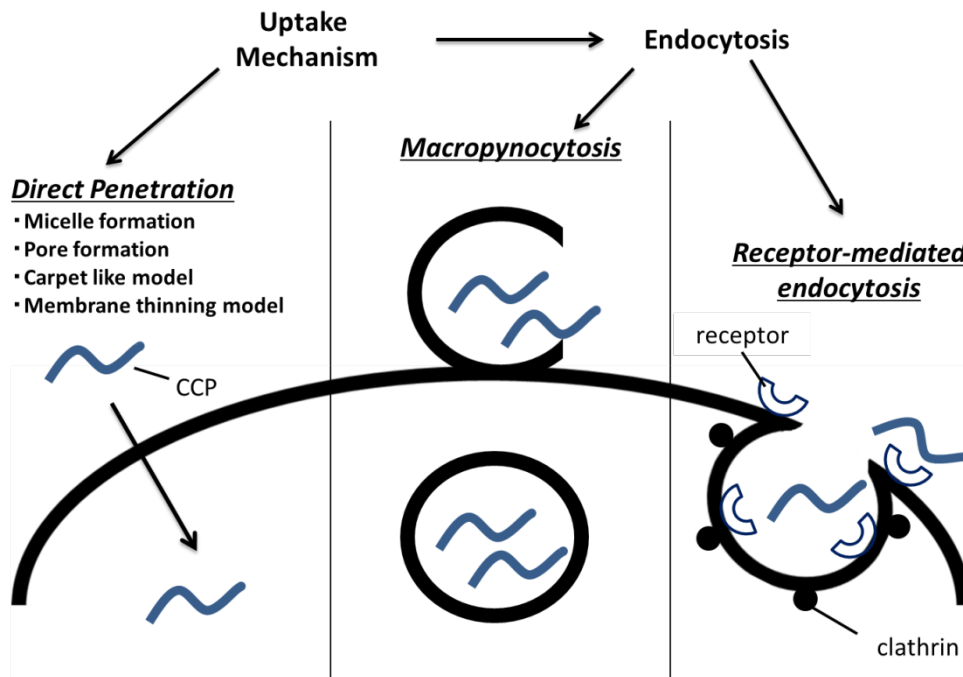


Figure 1 膜透過ペプチドの細胞内送達機構

そこで、著者はまずユニークな細胞膜透過能を有するリポ化ペプチドの pepducin に着目した。Pepducin は、2000 年代初期に G タンパク質共役受容体 (GPCR) のアロステリックモジュレーターとして開発された分子である<sup>4</sup>。これまでに様々な GPCR や膜タンパクに特異的に作用する種々の pepducin が開発されてきた<sup>5</sup>。Pepducin は、標的とする GPCR の細胞内ループ領域ペプチド配列に基づく 10 から 20 個のアミノ酸配列からなるペプチド部位とパルミチン酸のような疎水性部位から構成された合成ペプチドである。従来の GPCR モジュレーターが、細胞外受容体のリガンド結合部位に作用することで活性を示すのに対して、pepducin は細胞膜を透過し標的とする受容体に内側から作用するものと考えられている (Fig. 2)<sup>6</sup>。その膜透過のメカニズムとして pepducin の脂質部位が細胞膜にアンカリングした後、ペプチド部分がフリップ運動によって細胞内へ移行して、GPCR の細胞内ループ領域と相互作用できると考えられている<sup>6,7</sup>。

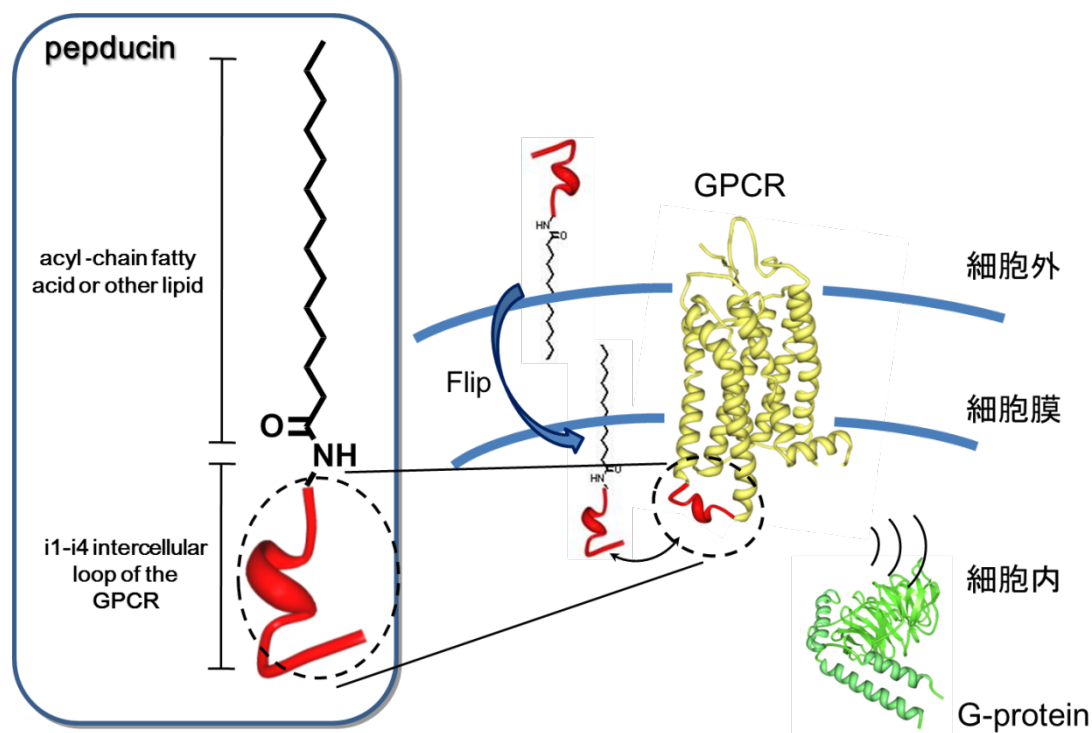


Figure 2. Pepducin の構造及び作用機構

Pepducin の細胞内透過に関して、これまでにいくつかの光化学的方法論による解析が行われ、上記のように pepducin は細胞膜でフリップ運動することにより、標的とする GPCR の細胞内領域と相互作用して活性を示すと考えられている。<sup>4b, 7-8</sup>。例えば、

Covic らは、血小板に高発現する GPCR の一種である Protease activated receptor 1 (PAR1)を標的とする pepducin を蛍光標識したプローブを作成し、フローサイトメトリー解析を行った。その結果、マウスの血中で pepducin が血小板に取りこまれていることを明らかにした<sup>4b</sup>。さらに Wielders らは、7-nitro-benzo[c][1,2,5]-oxadazol-4yl phospholipids (NBD-PS 及び NBD-PC)とローダミン標識 pepducin を用いて膜透過過程に関する蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)解析を行った<sup>7</sup>。フォスファチジルセリン(PS)は細胞膜の細胞質側にのみ存在するのに対し、フォスファチジルコリン(PC)は細胞外膜に多く存在する脂質である。また、NBD(ドナー)はローダミン(アクセプター)との蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)により消光される。そこで、NBD-PS 及び NBD-PC をそれぞれ血小板に投与した後にローダミン標識 pepducin を投与して、NBD の蛍光強度の変化をフローサイトメトリーで測定したところ、NBD-PS と NBD-PC いずれを投与した血小板においても有意に蛍光の減弱がみられたことから、ローダミン標識 pepducin は細胞膜の内側と外側の両方に分布することを明らかにした。これらの研究により、pepducin が細胞膜上で外側から内側に移動することが示唆された。

そこで著者は、pepducin が細胞膜を横切る運動を可視化するために、細胞の内と外で酸化還元環境が異なることに着目して、レドックス応答リンカーシステムを基盤とする新たな蛍光プローブの開発を計画した。本プローブは FRET ドナーとアクセプターをジスルフィドリンカーで結合し、細胞内のグルタチオン(GSH)により、消光が解除されて蛍光を発する機構を有する。ここ十年の間、還元応答性ジスルフィドリンカーは、様々なプロドラッグ、ケージド化合物、ドラッグデリバリーシステムなどに応用されてきた<sup>9</sup>。特に蛍光団と消光団を繋ぐリンカーとして FRET センサーに用いられ、ライブセルイメージングに幅広く応用されている<sup>10</sup>。

本研究は、上記のように pepducin を基盤とするレドックス応答 FRET プローブを開発し、共焦点蛍光顕微鏡によるライブセルイメージングを行って、分子の直接膜透過の機構解明を目指す。さらにそのような直接膜透過システムに必要な構造因子を明らかにし、膜透過性を持たない分子を細胞内に直接送達するための、新規ドラッグデリバリーシステムへと発展させるための基礎研究である。

## 著者の研究方針

Pepducin を基盤とする細胞内送達システムの構築のために、まず、pepducin の直接膜透過のプロセスを可視化する新規蛍光プローブを開発し、光イメージング解析を行うこととした。近年、ライフサイエンス研究においてバイオイメージング技術は重要な役割を果たしている。中でも、光イメージングは非侵襲性、簡便性に優れ、生命科学分野で不可欠な存在となっている。そこで、本研究では、共焦点蛍光顕微鏡による蛍光バイオイメージングを基盤として、分子の直接膜透過機構を解明することとした。

序論で述べたように、pepducin は細胞膜にアンカリングした後、flip 運動すると考えられている。そこで、FRET システムを利用して、細胞膜の外側リーフレットと細胞質側リーフレットを区別して蛍光の ON/OFF 制御を可能にする蛍光プローブの開発を計画した。細胞質は GSH が豊富に存在する還元的な環境であることに着目し、ジスルフィド結合によるレドックス応答リンカーシステムを導入した FRET プローブを考案した。本プローブはジスルフィド結合で繋いだ FRET ドナーとアクセプターを有し、細胞外の非還元条件では消光状態にあり (OFF)、一方、細胞内の還元的環境ではジスルフィド結合が開裂して消光が解除され蛍光を発する (ON) 仕組みを有する。このようなレドックス応答 FRET システムを利用することで、特別な試薬や酵素を必要とせず、より簡便に pepducin の膜透過運動を光イメージングによって解析することが可能になるものと考えられる。

プローブ設計においては、まず、レドックス応答 FRET システムが細胞内環境で機能して蛍光を発することを確かめるために、モデル化合物を合成し、分光蛍光光度計、LC-MS を用いた評価を行うこととした。これにより確立した FRET システムと pepducin を組み合わせて目的の蛍光プローブを設計・合成する。次いで、本プローブを細胞に投与して、蛍光の時空間的な変化を観察し、pepducin による直接膜透過機構の解析を行う。すなわち、本プローブは、FRET 部分が細胞質側に配向した場合のみ蛍光を発するので、蛍光局在とその経時変化を共焦点顕微鏡で観察することによって、細胞膜上の flip 運動を視覚的に捉えることができるものと考えられる。以上で、pepducin が FRET 部位を積荷として細胞内に直接送達することを証明できれば、このシステムを利用して pepducin の膜透過能に必要な構造要件を検討し、細胞内送達システムとしての構造最適化を図る。

一方、一般に GPCR はリガンドが結合すると、エンドサイトーシスによってリガン



ドとともに細胞内に移行することが知られている<sup>11</sup>。そこで、標的 GPCR 発現細胞と非発現細胞株を用いて、標的とする GPCR の存在が pepducin の細胞内動態に与える影響についてライブセルイメージングにより解析する。この際、標的 GPCR との共局在性や細胞小器官局在性について調べ、pepducin の細胞内移行と標的 GPCR のリサイクリング及び分解系との関連性について検討する。

# 第一章 ペプデュシンを基盤とするレドックス感受性 蛍光プローブの開発と細胞内移行機構の解析

## 第一節 緒言

実際に pepducin が細胞内へ移行していく様子を観察するためにライブセルイメージングを行うこととした。ライブセルイメージングは生細胞をそのまま観察することの出来る優れた技術であり、細胞内の動態を観察するうえでは非常に有用な手法となる。今回、pepducin の細胞内移行・動態を観察するために細胞内外で蛍光が OFF から ON にスイッチングする FRET 機構を利用して、pepducin の細胞内移行を観察することにした。

FRET 効率は、蛍光団と消光団との間の距離（約 1-10 nm）と配向の変化に対して鋭敏に変化し、距離の 6 乗の関数として急速に減少する<sup>12</sup>。そこで、細胞内へ移行すると、蛍光団と消光団の距離が増大するような仕組みを pepducin に組み込めば、細胞外では FRET 消光によって蛍光が OFF で、細胞内に移行すると FRET が解除されて初めて蛍光が ON となるように制御できる。

細胞内と細胞外を区別するために、酸化還元環境の違いに着目した。序論で述べたように、細胞内の還元的環境で開裂するレドックス応答リンカーとしてジスルフィド結合が広く用いられている<sup>9-10</sup>。そこで、このジスルフィドリンカーで蛍光団と消光団を結合させれば、細胞内に移行すると、細胞内の GSH などによりジスルフィド結合が還元的に開裂し、細胞内特異的に蛍光を検出できるものと考え、このようなレドックス応答 FRET システムを pepducin に組み込むこととした。

本章では、このような蛍光プローブ分子の設計と合成およびその機能解析について述べる。機能解析においては、各種 SH 阻害剤、還元酵素阻害剤を用いて、FRET 応答が細胞外ではなく、細胞内で起こっていることを証明する。さらに、プローブ分子の構造展開を行って FRET 機能部位や脂質部位の構造が、膜透過に及ぼす影響について検討する。また、膜透過能を持たない蛍光団を積み荷分子に見立て、pepducin を利用したエンドサイトーシスを介さない、直接的な細胞内送達について、ライブセルイメージングによって検証する。

## 第二節 ペプデュシンを基盤とするレドックス感受性蛍光プローブの分子設計

序論で述べたように、本研究では、Covic らによって初めて開発された、GPCR のひとつである PAR1 を標的とする pepducin、P1pal-13 を基盤として蛍光プローブを開発することとした<sup>4</sup>。PAR1 は、トロンビン受容体のひとつで、トロンビンによる細胞外領域の切断によって活性化され、血小板凝集を引き起こす GPCR である<sup>13</sup>。Covic らは、PAR1 の細胞内ループドメイン i3 のアミノ酸配列からなる種々のペプチドにパルミチン酸を結合させたリポペプチドを GPCR モジュレーターとして開発し、pepducin と命名した<sup>4</sup>。これらの PAR1 を標的とした pepducin 類のなかで、PAR1 の 301 から 313 番目の 13 アミノ酸残基からなる P1pal-13 は、PAR1 リガンドとして知られる合成ペプチド SFLLRN やトロンビンと比較して、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  シグナル誘導においても、血小板凝集についても十分なアゴニスト活性を示した。また、同様の活性を示した pepducin、P1pal-19 に比べ、アミノ酸配列が短いことから合成が簡便であると考えた。以上の点より pepducin 部位は P1pal-13 を用いることとした。

細胞内外での蛍光 ON/OFF スイッチングを可能にするため、細胞内に高濃度で存在するグルタチオン(GSH) に着目した。細胞内は還元的環境に維持されており、それにもっとも寄与するのが GSH である。GSH は細胞内で 1 から 10 mM という高濃度で存在しており、血管中では数  $\mu\text{M}$  という低濃度で存在することが知られている<sup>14</sup>。ジスルフィド結合と GSH を用いた FRET プローブやケージド化合物は非常に多く報告されており、細胞外でのジスルフィド結合の安定性や有用性が示されている<sup>15</sup>。そこで、著者はジスルフィド結合をリンカーとして用いることで、細胞内 GSH によって FRET の解除が起こる仕組みを pepducin に組み込んだプローブを設計した。Figure 1-1 に示すように、蛍光団として 5(6)-carboxyfluorescein (FAM)、消光団として dabcy1 (Dab) を用いることとした。この FAM と Dab の間では FRET が効率良く起こることがすでに知られており、また、色素としても非常に安価であることから、これらの組み合わせを用いることとした。上記したようにリンカーについてもジスルフィド結合を用いることとした<sup>10</sup>。リンカーとしては、pepducin の N 末端に Lys を結合させ、Lys の  $\alpha$  アミノ基にパルミチン酸を結合させた。一方、 $\epsilon$  アミノ基にさらに Lys を結合させ、その  $\alpha$  アミノ基に 3-mercaptopropionic acid を結合させ、ジスルフィド結合を介して 2-mercaptoethylamine を結合し、色素 Y を導入した。また、 $\epsilon$  アミノ基に色素 X を導入した。以上のようなリンカー設計に於いて、立体障害を少なくし GSH によるリンカーの切断が速やかに進むこ

とや、消光団と蛍光団の柔軟な接近による消光効果の増強を配慮した。

さらに X と Y に導入する色素を入れ替えることで2種類のプローブを設計した。すなわち、X に FAM を導入した Pep-13-FL-SS-Dab (13) では細胞内でジスルフィド結合が開裂すると、消光団の Dab が細胞質に放出され、蛍光団の FAM が膜に留まっていると予想される pepducin 部位に結合したままで残るため、細胞膜に局在した蛍光が検出される。一方、X に Dab を導入した Pep-13-Dab-SS-FL (14) では細胞質に FAM が放出されるため、細胞全体から蛍光が検出されるものと予想される。以上の両方のプローブを用いてライブセルイメージングを行うことで、エンドサイトーシスによらない、flip 運動による直接的な膜透過の過程を視覚的に捉えることができると考えた。

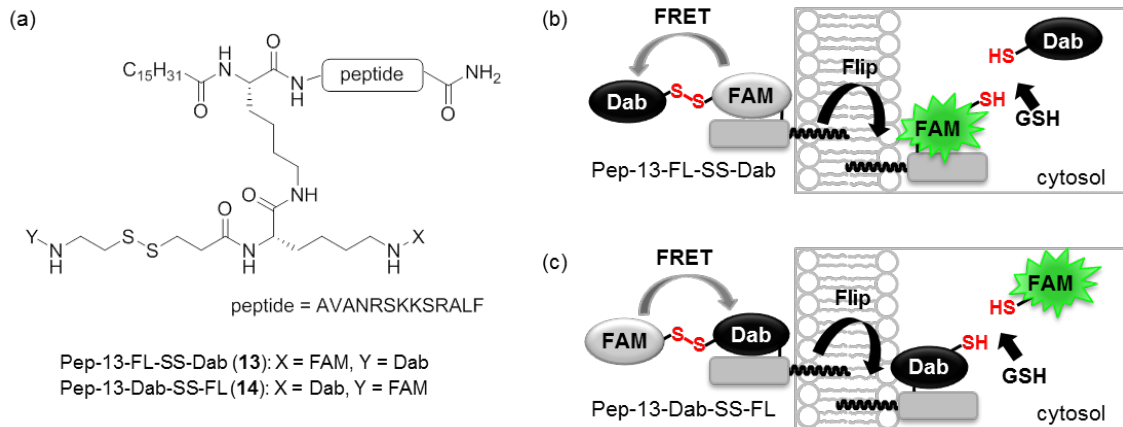
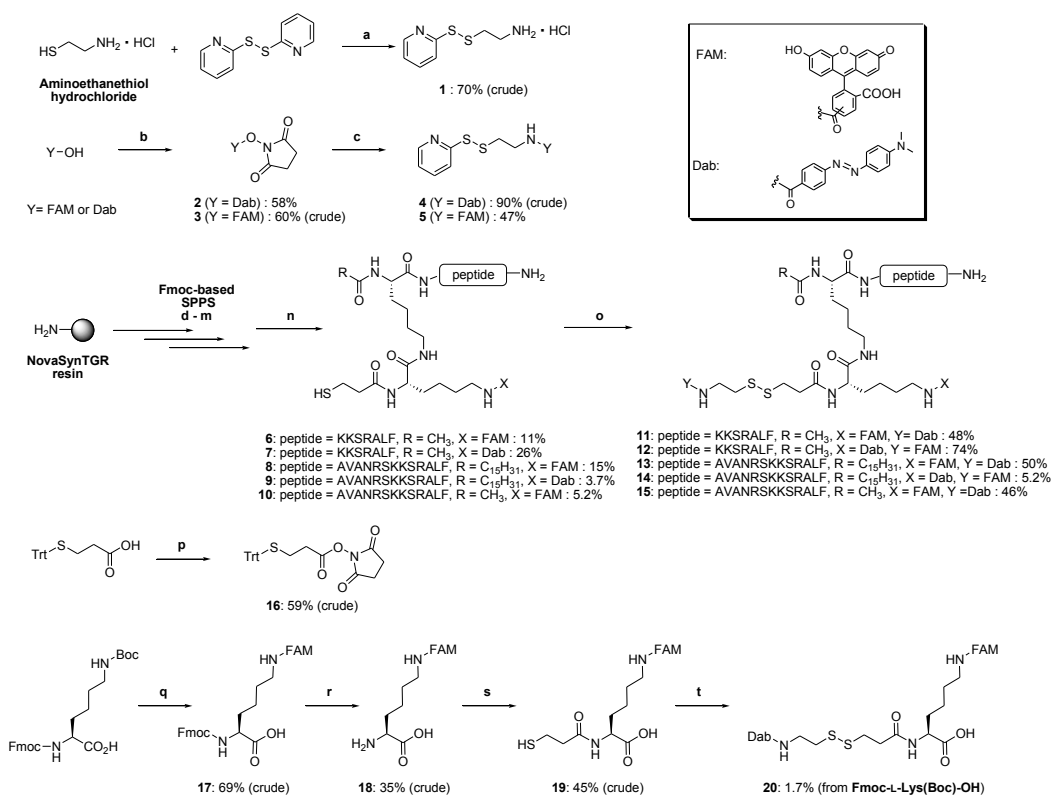


Figure 1-1 Pepducin 膜透過機構解析のための FRET 蛍光プローブの分子設計

### 第三節 ペプデュシン型蛍光プローブの合成



**Scheme 1-1 Reagents and conditions:** (a) MeOH/AcOH, Ar, rt, 24 h; (b) HOSu, EDC·HCl, DMF, 0 °C, 30 min to rt, overnight; (c) **1**, Et<sub>3</sub>N, DMF, 0 °C, 30 min to rt, overnight; (d) i) Fmoc-AA-OH, HOBt·H<sub>2</sub>O, DIPCI, DMF, rt, 1.5 h; ii) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; i), ii) repeat; (e) Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, HBTU, DIPEA, DMF, rt, 5 h; (f) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; (g) Ac<sub>2</sub>O, pyridine, DMF, rt, 1.5 h; or C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>COOH, HBTU, DIPEA, DMF, rt, 5 h; (h) AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4 × 15 min; (i) Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, HBTU, DIPEA, DMF, rt, 5 h; (j) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; (k) Trt-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH, HBTU, DIPEA, DMF, rt, 5 h; (l) AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4 × 15 min; (m) **2** or **3**, DIPEA, rt, overnight; (n) thioanisole/*m*-cresol/EDT/H<sub>2</sub>O/TFA, rt, 3 h; (o) **4** or **5**, DMF and 100 mM phosphate buffer (pH 6.0–8.0), rt, 20 min–24 h; (p) HOSu, EDC·HCl, DMF, 0 °C, 30 min to rt, overnight; (q) i) TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), 0 °C, 10 min; ii) **3**, Et<sub>3</sub>N, DMF, 0 °C, 15 min to rt, overnight; (r) 20% piperidine, DMF, rt, 30 min; (s) i) **16**, DIPEA, DMF, 0 °C, 30 min to rt, 34 h; ii) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA/TIPS, rt, 1 h; (t) **4**, DMF and 100 mM phosphate buffer (pH 8.0), rt, 2 h.

最初に、FRET 部位のレドックス応答性を評価するため、モデルペプチド **11** 及び **12** を合成した。この場合、脂質部位にはアセチル基を、またペプチド部位は合成を短縮するため、P1pal-13 の C 末側 7 残基を用いた(Scheme 1-1)。

さらに、FRET 部位を導入することで pepducin の膜透過能に影響を与えないかを調べるために FRET 部位のみからなる化合物 **20** を合成した。また、pepducin の膜透過に脂質分子が重要な役割を担うかを調べるためのパルミトイル基の代わりにアセチル基を導入したコントロール化合物 **15** を合成した。

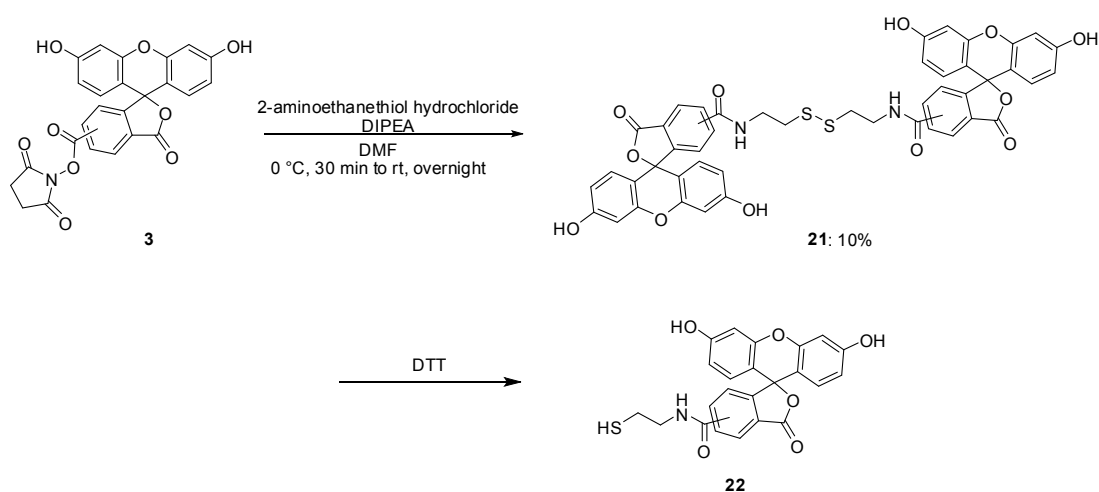
Scheme 1-1 に示すように、まず始めに FRET 機能部位の一部となる化合物 **4** 及び **5** を合成した。2-aminoethanethiol hydrochloride を出発原料とし化合物 **1** を得た。また、5(6)-carboxyfluorescein 及び dabcyl acid を原料とし、HOSu の活性エステル体 **2** 及び **3** を得た。**1** のアミノ基と **2** 及び **3** との反応を行うことで目的とする化合物 **4** 及び **5** をそれぞれ得た。

次いで Novasy TGR resin を出発原料とし、coupling reagent として HOBt/DIPCI を用い、各保護アミノ酸を結合させた。直鎖ペプチドの合成には Fmoc 固相合成法を用いた。ペプチドの C 末側をアミドにする必要があったので、今回は NovaSyn TGR resin を使用した。保護アミノ酸として、Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Ser(*t*-Bu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH を用いた。Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH を用いた理由は、他のアミノ酸保護基に影響を与えることなく、固相上で Lys の側鎖を修飾するためである。Fmoc 基の脱保護には 20% piperidine/ DMF 溶液を用いた。保護アミノ酸を上記の coupling reagent を用いて反応を行った。その後、Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, acetic anhydride を順に反応させるが、この際使用する coupling reagent は HOBt/DIPCI ではなく、HBTU/DIPEA を用いた。Fmoc-Lys(Mmt)-OH の側鎖の保護基である 4-monomethoxytrityl (Mmt)基は非常に酸に弱いことが知られている。そのため、HOBt/DIPCI の coupling reagent では Mmt が外れてしまう可能性がある。そこで、その問題を解決するために HBTU/DIPEA を用いた coupling reagent での反応を行った。その後、その他の保護基に影響を及ぼすことなく、Mmt のみを選択的に脱保護できる条件、AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を用いて、Mmt を取り除いた。さらに、Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, Trt-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH、各種色素を反応させた。

樹脂上に構築した保護ペプチドを TFA/thioanisole/*m*-Cresol/EDT/H<sub>2</sub>O で処理し、樹脂からの切り出し及び脱保護を行った。その後、HPLC による精製を行い、目的とするペプチド誘導体 **6-10** を得た。なお、Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH 導入前の反応の進行は Kaiser test

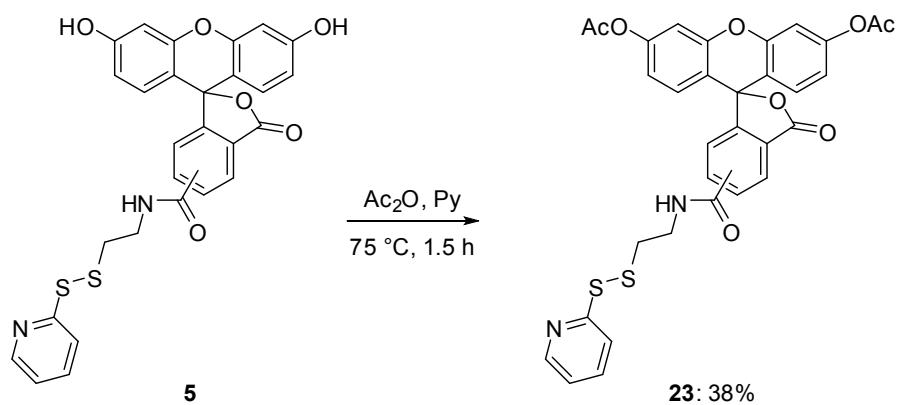
で確認し、導入後は TNBS test によって確認した。これは、Kaiser test 条件下では Mmt が外れてしまうためである。さらに得られた **6-10** を別途合成した **4, 5** と反応を行うことで目的とする化合物 **11-15** を得た。

コントロール化合物 **20** の合成については、まず始めに 3-(tritylthio)propionic acid を原料とし、HOSu の活性エステル体 **16** を得た。Fmoc-L-Lys(Boc)-OH を TFA で脱 Boc 化し、その Lys の  $\epsilon$ -アミノ基と 5(6)-carboxyfluorescein の活性エステル体である **3** と反応を行い、**17** を得た。次に、20% piperidine で処理をし、脱 Fmoc 化し、**18** を得た。**18** の Lys の  $\alpha$ -アミノ基と **16** を反応させ、次いで酸処理によって Trt 基を脱保護し **19** を得た。**19** の SH 基と化合物 **4** を反応させることで目的とするコントロール化合物 **20** を得た。



Scheme 1-2

Scheme 1-2 に示すように、コントロール化合物として、化合物 **14** を細胞に処理した際に細胞質へ放出されると考えられる SH 体 **22** の合成を試みた。スクシイミド体 **3** を原料として、2-aminoethanethiol hydrochloride を反応させたところ、化合物 **22** は非常に酸化されやすく、ジスルフィド体 **21** が得られた。そこで、**21** を細胞実験の直前に dithiothreitol (DTT) にて還元して処理することとした。



Scheme 1-3

膜透過能があり、細胞内で GSH とエステラーゼによって化合物 **22** が生じるコントロール化合物 **23** を合成した。化合物 **5** を pyridine 中、acetic anhydride で反応させることで目的とする化合物 **23** を得た。



#### 第四節 レドックス感受性 FRET モデル化合物の評価

得られた各モデルペプチド **11, 12** を HEPES buffer (pH 7.5) で  $0.1 \mu\text{M}$  に希釈し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5 \text{ mM}$  GSH で処理し、フルオレセインの蛍光測定を蛍光分光光度計にて 1 分毎に行った。細胞内の GSH 濃度は  $1\sim 10 \text{ mM}$  であることが知られている。そのため、今回は細胞の標準的な GSH 濃度として  $5 \text{ mM}$  を用い、 $37^\circ\text{C}$  で測定した。Fig. 1-2 に示すように、各モデルペプチドを  $5 \text{ mM}$  GSH で処理した際、1 分後には、蛍光強度は処理前と比較して 25 倍の値を示し、15 分後に一定値を示すようになり、処理前と比較して約 50 倍の蛍光強度となった。これらの結果は、今回用いたジスルフィドリンカーが、pepducin の細胞内移行を検出するために、生体内 GSH に対する十分に速い反応性を有していることを示している。

次に、モデルペプチド  $0.5 \text{ mM}$  を  $5 \text{ mM}$  GSH で処理し、生じるピークについて LC-MS を用いて解析した。LC-MS で解析する標品については  $0.05\%$  ギ酸 acetonitrile 溶液にて  $0.1 \text{ mM}$  にまで希釈したものをを用いた。測定結果より、ジスルフィド結合が切断されたペプチドチオール体 **6, 7** と色素チオール体 **22, 25**、またそれらの二量体 **21, 24** が確認された。これらの結果より、GSH によってジスルフィド結合が還元的に切断されて生じる FAM 誘導体 **6, 22** が蛍光を示していることが分かった。色素チオール体の二量体については、空気中の酸素によって酸化されたものであると考えた。

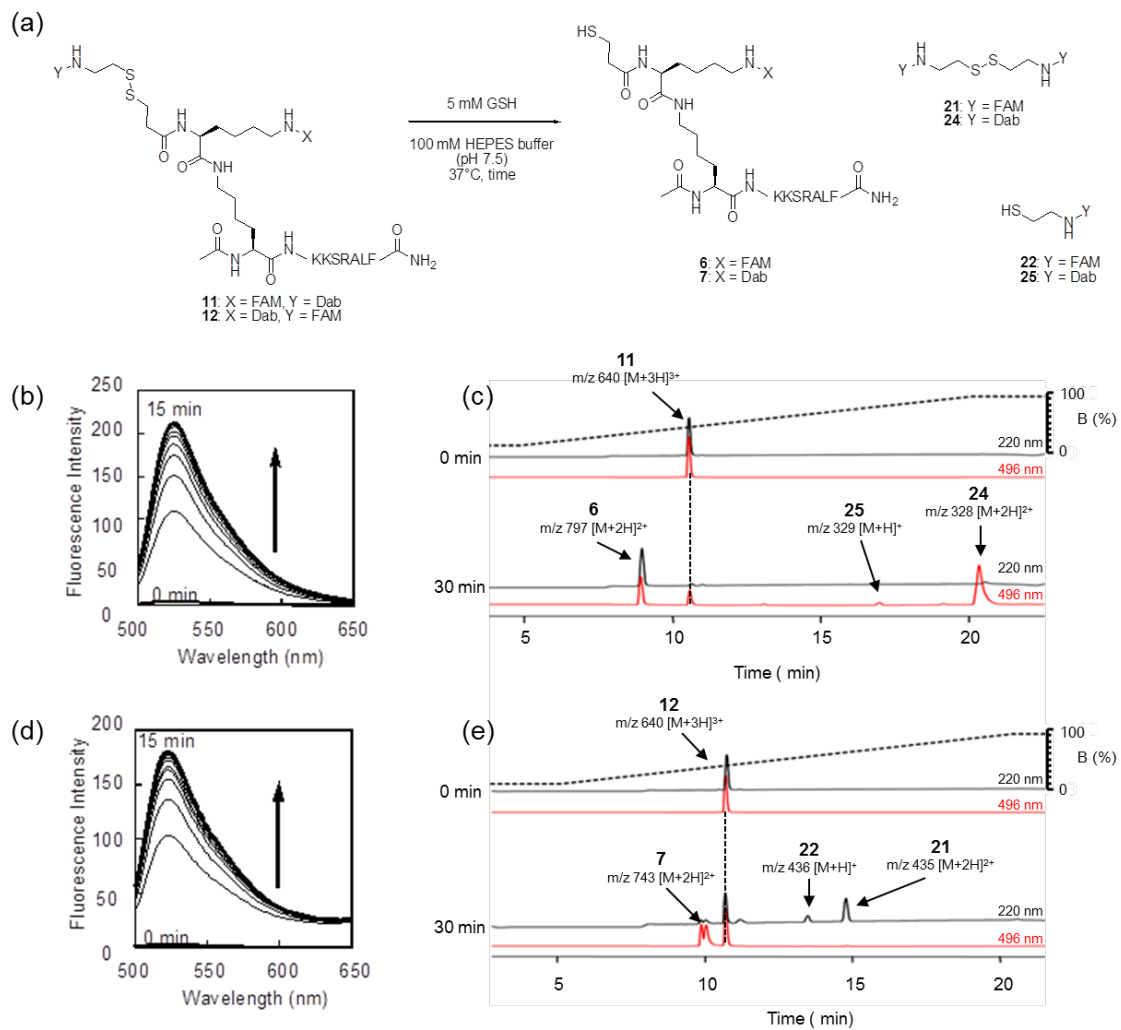


Figure 1-2. (a) The reaction of model peptide **11** and **12** with GSH. (b, d) Time courses of fluorescence spectrum of **11** (b) and **12** (d) at a dose of 0.1  $\mu$ M treated with GSH (5 mM), before (0 min) and from 1 to 15 min after GSH addition. (c, e) HPLC analyses of the reactions of **11** (c) and **12** (e) at a dose of 0.5 mM with GSH (5 mM), before (0 min) and 30 min after GSH addition at 37 °C. Column: Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6  $\times$  75 mm), Buffer A: 0.05% formic acid in ultra-pure water mQ, B: 0.05% formic acid MeCN. Linear Gradient (B): 10% for 5 min, 10–95% for 15 min then 95% for 5 min, Flow rate: 0.5 mL/min.

ジスルフィド結合が細胞外 GSH 濃度において安定であることはすでに知られている<sup>9b, 16</sup>。そこで、著者らの合成したジスルフィドリンカーの細胞外環境における安定性について検討した。様々な GSH 濃度でモデルペプチド **11** を処理し、蛍光強度を測定した。測定結果より、GSH の細胞内濃度(1–8 mM)では、蛍光強度の大幅な増加が確認されたが、細胞外 GSH 濃度(1–10  $\mu$ M)では、ほぼ変化はみられなかった。このことから、今回、リンカーに用いたジスルフィドリンカーは細胞外で十分安定であると予想された。

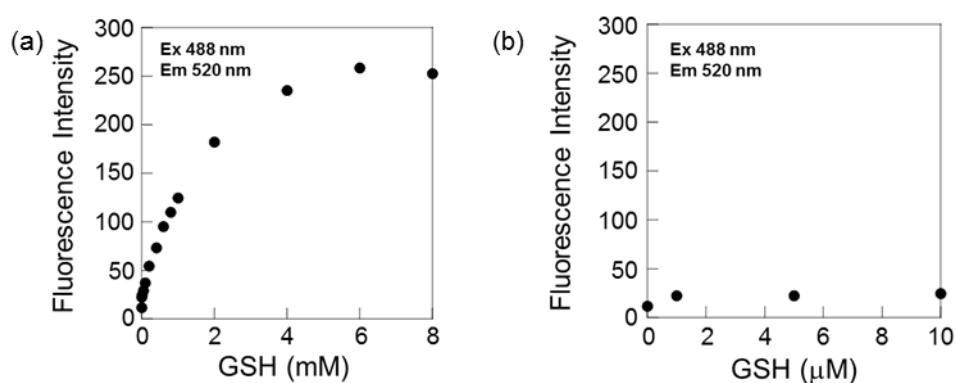


Figure 1-3. The fluorescence emissions ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) were monitored, when the model peptide **11** (0.1  $\mu$ M) was treated with GSH in the range of concentrations (a) from 0 to 8 mM or (b) from 1 to 10  $\mu$ M in 100 mM HEPES buffer (pH 7.5) at 37  $^{\circ}\text{C}$  for 15 min.

## 第五節 膜局在型蛍光プローブによる細胞内移行の解析

### 第一項 膜局在型ペプデュシンプローブの膜透過における 構造因子に関する検討

合成した膜局在型プローブ **13** と各種コントロール化合物の膜透過能を確認するために、それぞれを MCF-7 細胞に投与し共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した(Fig. 1-4)。**13** では、予想通り細胞膜に局在している様子が確認された。これは、**13** が細胞内へ移行し、細胞内 GSH によって還元されることで FRET の解除が起こったためと考えられた。この結果から、pepducin は細胞膜上で flip 運動することで細胞内へ移行することが示唆された。

次に、脂質分子を持たない **13** のコントロール化合物 **15** を同様に細胞に投与し、共焦点蛍光顕微鏡で観察したところ有意な蛍光は得られなかった。また、FRET 機能部位のみから構成されるコントロール化合物 **20** を同様に処理した細胞からも有意な蛍光は得られなかった。**15** から得られた結果より、pepducin の flip 運動には脂質部位が重要な役割を担っていることが分かった。FRET 機能部位 **20** は膜透過能を示さなかったことから、**13** の膜透過において、FRET 機能部位の寄与は認められず、pepducin 部分が重要であることが示唆された。

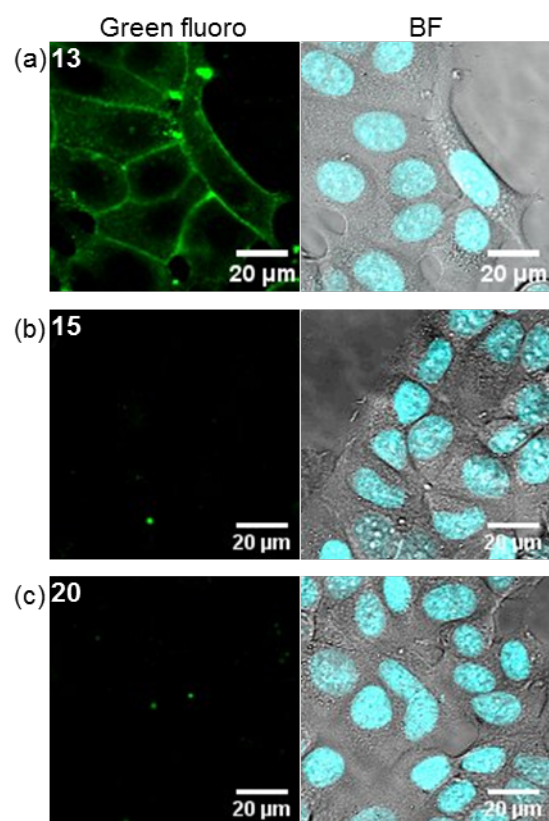


Figure 1-4. Confocal microscopy images and bright field images of live MCF-7 cells. Cells were treated with (a) 1  $\mu$ M of **13** for 15 min, (b) 1  $\mu$ M of **15** for 15 min, (c) 1  $\mu$ M of **20** for 15 min. BF images were overlaid by nuclear staining (Hoechst 33342). Excitation was provided with 488 nm laser.

## 第二項 膜局在型ペプデュシンプローブによる細胞内移行の解析

細胞膜や細胞外には還元酵素やチオールを含む膜タンパクが多く存在していることが知られている<sup>16b</sup>。このことから、**13**由来の細胞膜に局在する蛍光が細胞膜の外側で還元されたためではなく、細胞内での還元によるものであることを確認するために、各種 SH 阻害剤を用いた実験を行った。

*N*-Ethylmaleimide (NEM) は細胞膜を透過するチオール阻害剤として知られている。また、5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)は膜透過性を有しない SH 阻害剤である<sup>16b</sup>。これらの阻害剤で処理した細胞を用いて **13** の挙動を観察した。NEM で処理した細胞では、細胞膜に局在する蛍光は観察されなかった。しかし、DTNB で処理した細胞では細胞膜に局在する蛍光が観察された(Fig. 1-5)。

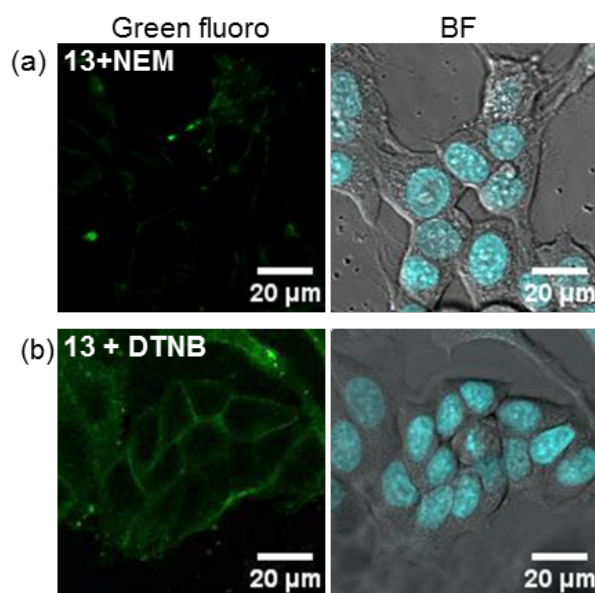


Figure 1-5. Confocal microscopic images and bright field (BF) images of live MCF-7 cells. Cells were incubated with (a) 50 μM of NEM for 30 min and (b) 100 μM DTNB for 60 min prior to treatment with 1 μM of Pep13-FL-SS-Dab (**13**) for 15 min. BF images were overlaid by nuclear staining (Hoechst 33342). Excitation was provided with 488 nm laser.

さらに、細胞外でジスルフィド結合を開裂することが知られている protein disulfide isomerase (PDI) 阻害剤の bacitracin で処理した細胞についても共焦点レーザー蛍光顕微

鏡によって **13** の挙動を調べた<sup>16b,17</sup>。Bacitracin で処理した細胞についても細胞膜に蛍光が局在する様子が観察された(Fig. 1-6)。これらの結果から、**13** を処理した細胞で検出された蛍光は細胞内チオール還元によるものであることが証明された。

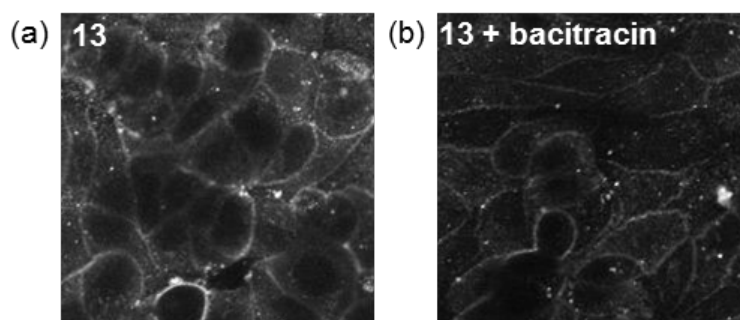


Figure 1-6. Confocal microscopy images of live MCF-7 cells. (a) 1  $\mu$ M of Pep13-FL-SS-Dab (**13**) for 15 min. (b) Cells were incubated with 10 mM of bacitracin for 60 min prior to treatment with 1  $\mu$ M of Pep13-FL-SS-Dab (**13**) for 15 min.

## 第六節 細胞質放出型プローブによる細胞内移行の解析

### 第一項 コントロール化合物 **21** の還元方法について

細胞質放出型プローブ **14** 由来の細胞質に放出される還元体に相当する化合物 **22** の合成を検討したところ、**22** 自体が非常に酸化されやすく合成が困難であった。そのため、酸化体 **21** を下記の方法(Scheme 1-4)で、細胞実験を行う直前に還元することで **22** を調製することにした。

化合物 **21** を DTT で室温下、120 分間処理し、還元体である **22** を得た。反応のモニタリングは LC-MS で行った。120 分後、化合物 **21** が 83% 消失し、新たに **22** のピークが検出された(Fig. 1-7)。

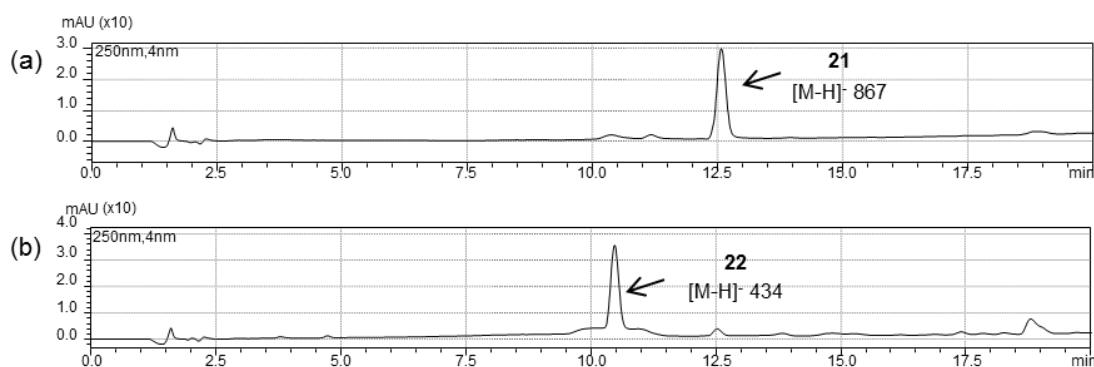
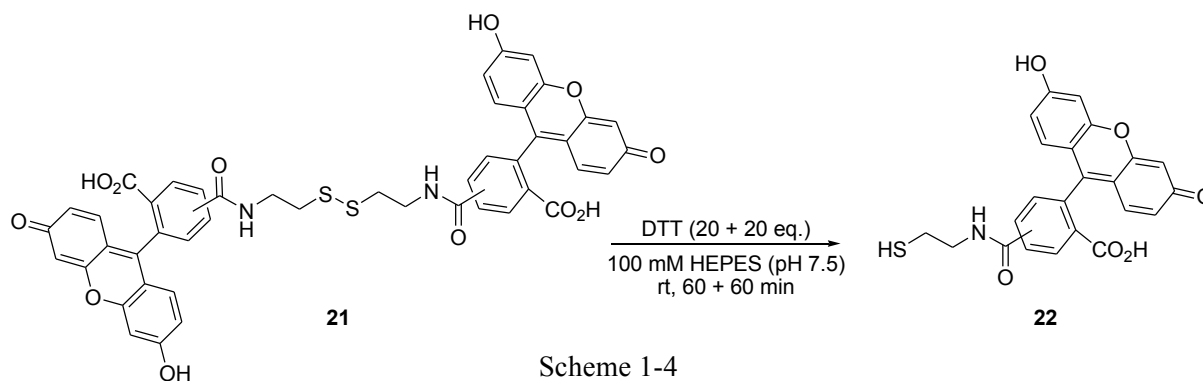


Figure 1-7. HPLC chart of monitoring the reaction of **21** and DTT. Analytical HPLC condition: column; Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient (B): 10 to 90% over 20 min. (a) before and (b) after reduction with the above method.



## 第二項 プローブ **14** とその細胞内移行の解析について

細胞質放出型プローブ **14** を MCF-7 細胞に投与すると細胞質全体からの蛍光が認められた(Fig. 1-8)。その蛍光を発すると考えられる還元体 **22** が細胞内還元で生じたのか、細胞外で還元されて膜透過したのかを調べるために、まず、**14** で処理した細胞を洗浄せずに観察したところ、Fig. 1-8 (b)に示すように細胞内からは蛍光は検出されたが、培地から有意な蛍光は検出されなかった。また、第六節第一項の方法で **21** から DTT 処理して調製した **22** を投与した細胞では、有意な蛍光は検出されなかった。また、**22** のケージド化合物であり、膜透過能を有する **23** で処理した細胞では細胞質全体から蛍光が検出された。このことから、**22** 自体には膜透過能はなく、**14** で処理した際、確認された蛍光は **14** が細胞内で還元を受けた結果 **22** が生じたためであると考えられた。この結果は、膜局在型プローブである **13** から得られた、pepducin がエンドサイトーシスを介さず、flip 運動によって細胞内に移行するという結果を支持するものである。また、pepducin を用いて、膜透過能を有しない化合物を細胞内へ送達できる可能性を示唆した。

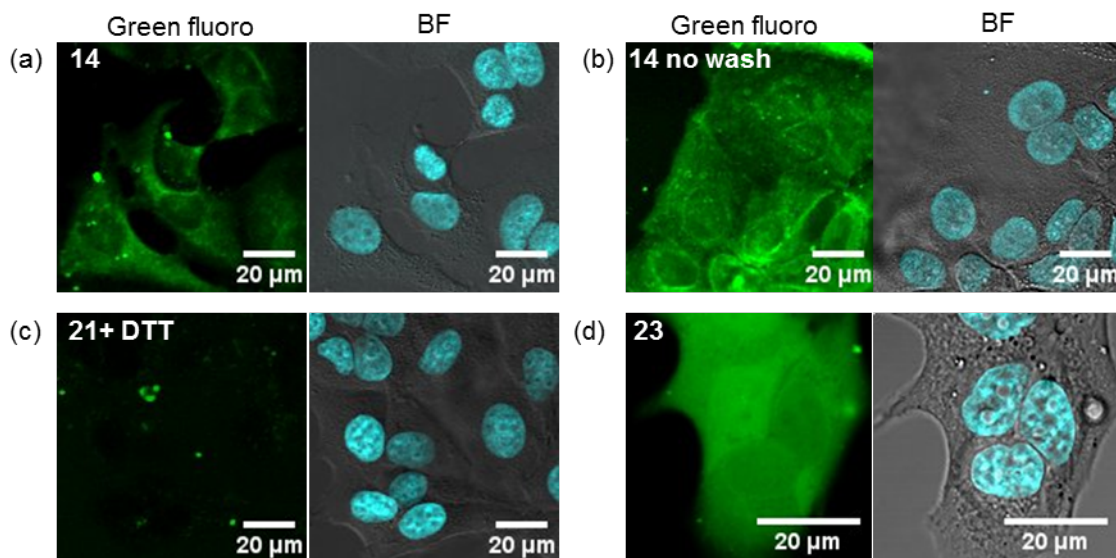


Figure 1-8. Confocal microscopy images and bright field images of live MCF-7 cells. The cells were treated with 1 μM of Pep13-Dab-SS-FL (**14**) for 15 min, and then the image was acquired (a) with washing or (b) without washing. (c) The reduced **21** with DTT by the above method was diluted to 0.5 μM with MEM (-). Cells were treated with the solution of the reduced **21** for 15 min, (d) 1 μM of **23** for 15 min. BF images were overlaid by nuclear staining (Hoechst 33342). Excitation was provided with 488 nm laser.

## 第七節 考 察

Pepducin の細胞内移行を視覚的に捉えることの出来る FRET プローブ Pep13-FL-SS-Dab (**13**)及び Pep13-Dab-SS-FL (**14**) の合成に成功した。

細胞内での還元後、蛍光団が pepducin 側に残ると考えられる Pep13-FL-SS-Dab (**13**)で処理した MCF-7 細胞の細胞膜に蛍光団が局在し、長く留まる様子が観察された。細胞内外の SH 化合物を枯渇させる NEM で処理した細胞に **13** を投与し観察すると、有意な蛍光は検出されなかった。一方、細胞外の SH 阻害剤である DTNB や細胞外の還元酵素を阻害する bacitracin で処理した細胞では、細胞膜に局在する蛍光が検出された。これらのことより、**13** で処理した細胞において細胞膜で局在している蛍光は、**13** が細胞内へ移行し、細胞内 GSH などによって還元を受けることによって生じたことが明らかになった。以上より、**13** が flip 運動して細胞膜のインナーリーフレットに移行し、そこに留まる様子を視覚的に捉えられたものと考えられる。また、**13** から脂質部位を除いた化合物 **15** 及び pepducin 部位を持たず、FRET 部位のみから成る **20** で処理した細胞では有意な蛍光は検出されなかった。脂質分子修飾した化合物が細胞内への移行を増強することが数多く報告されている<sup>18</sup>。同様に pepducin の膜透過にも脂質部位が重要な役割を果たしていることが分かった。また、FRET 部位は pepducin の膜透過能に影響を与えないことが示唆された。

還元後蛍光団が細胞質に放出すると予想される Pep13-Dab-SS-FL (**14**)を処理すると、細胞質全体からの蛍光が検出された。この蛍光に寄与する還元体 **22** が細胞内で **14** が還元されて生じたものか、細胞外で還元されて生じた **22** が細胞内へ移行したものか証明するため、コントロール化合物 **21** 及び **23** を用いた細胞実験を行った。**22** で処理した細胞では有意な蛍光は検出されなかったが、膜透過能を有する **22** のケージド化合物である **23** で処理した細胞には、細胞質に蛍光が検出された。**14** で処理した後、洗浄せずに観察した場合でも、培地からは有意な蛍光は検出されなかった。これらの結果により、**14** が細胞内へ移行し還元を受けて **22** が生じ、細胞内へ放出された結果、細胞質に蛍光が認められたと考えられた。このことは、pepducin によって膜透過能を持たない **22** を細胞内へ送達させることが出来たことを示しており、pepducin を利用した細胞内送達システムの有用性を示唆するものである。今後、**14** を評価モデルとして利用することで、種々の積荷分子について分子量、分子サイズ、電荷の有無などの適用範囲を蛍光観察によって検討できるものと考えられる。

## 第二章 PAR1 発現細胞におけるペプデュシンの細胞内 動態の解析

### 第一節 緒言

GPCR はリガンド結合後、ユビキチン化等の様々な修飾を受け、エンドサイトーシスによってリガンドとともに細胞内へ移行することは広く知られており、このような GPCR の脱感作とそれに引き続くエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みは、GPCR シグナルのダウンレギュレーションにおいて中心的な役割を果たしている<sup>19</sup>。十島らによると、GPCR の一種である Ste2p は、リガンド非存在下では、細胞膜上に均一に存在するが、リガンド結合後はクラスリン小胞へと移動し、エンドサイトーシスで細胞内へ移行する<sup>11</sup>。エンドサイトーシスによって取り込まれた GPCR は後期エンドソームにおいてリガンドとの結合が解除され、細胞膜にリサイクルされるものとそのままリソソームによって分解されるものに分かれる (Fig. 2-1)。

一方、Tchernychev らは、C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4) に対するアゴニスト活性を有する pepducin の ATI-2341 を開発し、ATI-2341 によって CXCR4 の細胞内への移行が誘導されることを、EGFP 融合 CXCR4 発現細胞の蛍光イメージングによって示した<sup>20</sup>。さらに、Janz らは、蛍光ラベルした CXCR4 アゴニスト pepducin である ATI-2766 を合成し、ATI-2766 が CXCR4 の内在化を誘導して、細胞内に CXCR4 と共に局在していることを示した<sup>8</sup>。以上の報告から、pepducin が標的 GPCR のエンドサイトーシスによる細胞内在化を誘導し、標的 GPCR とともに細胞内へ移行することが示唆された。

第一章では PAR1 発現のほとんどみられない、MCF7 乳がん細胞を用いて、pepducin が膜上で flip 運動し、膜の内側に留まることを示した。そこで本章では、PAR1 を強く発現することが知られている MDA-MB-231 乳がん細胞<sup>21</sup>を用いて蛍光イメージングを行い、標的とする GPCR 発現の有無によって pepducin の細胞内動態がどのように変化するかを調べ、pepducin の構造と標的 GPCR との相互作用の相関についても考察する。

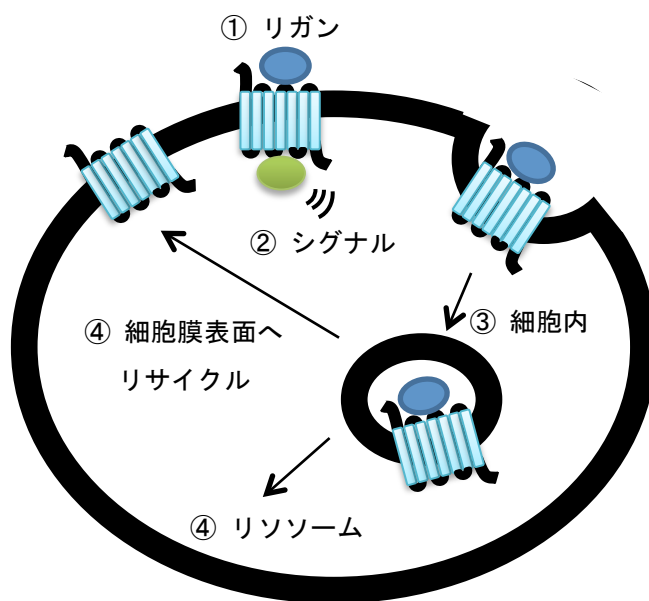


Figure 2-1. GPCR の細胞内在化

## 第二節 PAR1 非発現細胞 MCF7 及び PAR 1 発現細胞 MDA-MB-231 におけるペプデュシンの細胞内動態

第一章では、膜局在型プローブ **13** を 15 分間処理した MCF-7 細胞において、細胞膜に局在する蛍光が観察された。そこで観察時間を延長し、MCF-7 に **13** を 15 分間処理した後、細胞を洗浄し、さらに 60 分間、120 分間インキュベートした細胞を観察したところ、いずれの細胞においても蛍光の局在性の変化はほとんど見られず、細胞膜に蛍光が局在し続けていた(Fig. 2-2 a, b)。そこで、PAR1 発現率の高い MDA-MB-231 細胞について同様の実験を行った。**13** を MDA-MB-231 に 15 分間処理し、洗浄後、60 分間インキュベートした細胞では、細胞膜に局在する蛍光に加え、細胞内に強く粒状蛍光が観察された。さらに 120 分間インキュベートしたものでも、60 分後と同様に細胞内に粒状蛍光が観察された (Fig. 2-2 c, d)。

このように、プローブ **13** は、その標的である PAR1 発現がない細胞では、少なくとも処理後 120 分まで細胞膜のインナーリーフレットに留まっており、PAR1 発現がある細胞では細胞内に移行して、粒状に局在することが明らかになった。

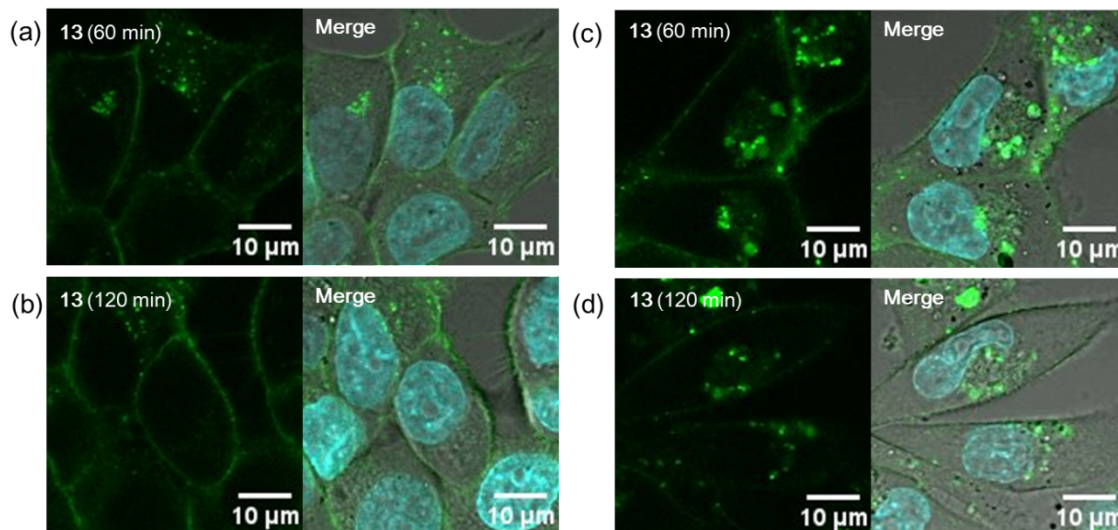


Figure 2-2. Confocal microscopy images and of live MCF-7 cells (a, b) and MDA-MB-231 cells (c, d). The cells were treated with 1  $\mu$ M of Pep13-FL-SS-Dab (**13**) for 15 min and washed twice, incubated for 60 min (a, c) or 120 min (b, d) at 37  $^{\circ}$ C.

### 第三節 MDA-MB-231 におけるペプデュシンの細胞内局在性の解析

#### 第一項 リソソームへの局在

先の実験で、PAR1 が発現している MDA-MB-231 細胞にプローブ **13** を処理すると細胞内に粒状蛍光が観察された。これより、**13** が PAR1 に作用して、エンドサイトーシスを誘起して、細胞内移行してエンドソームに取り込まれたものと予想した。そこで、**13** と後期エンドソーム及びリソソームのマーカールとして知られるリソトラッカーとの共染色を行った。**13** を 15 分間処理した MDA-MB-231 細胞を洗浄後、90 分間インキュベートし、さらにリソトラッカーで 30 分間処理し、細胞内局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。Fig. 2-3 に示すように、**13** 由来の蛍光とリソトラッカー由来の蛍光に重なりがみられたことから、**13** を投与した MDA-MB-231 細胞で観察された粒状蛍光がエンドソームもしくはリソソームに存在することが示唆された。

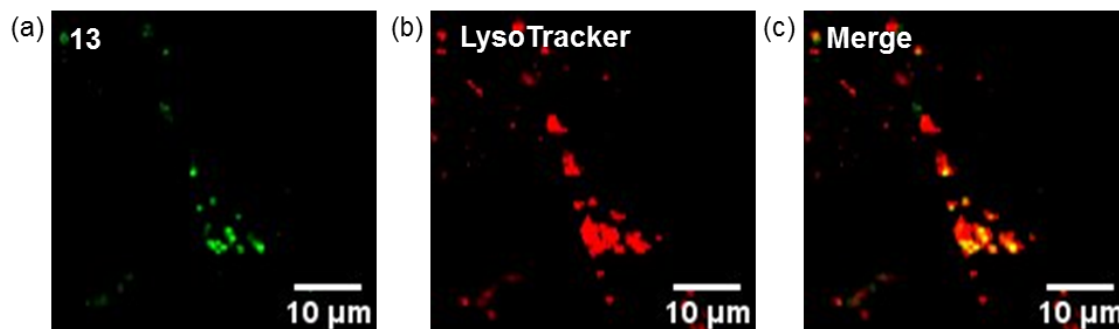
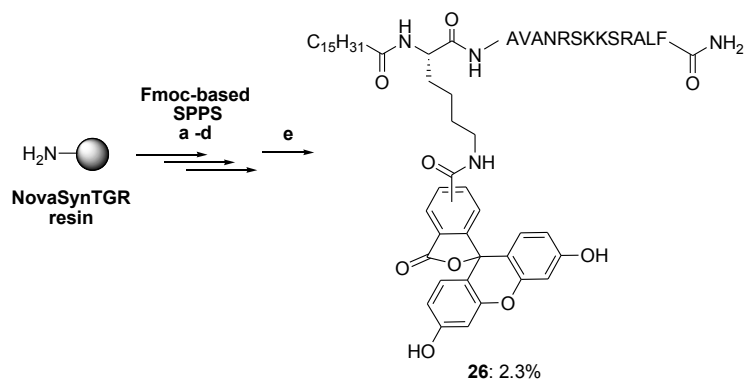


Figure 2-3. Confocal microscopy images of Pep13-FL-SS-Dab (**13**) (a) and LysoTracker Red DND-99 (b), merge (c) of MDA-MB-231 cells. The cells were treated with 1  $\mu$ M of Pep13-FL-SS-Dab (**13**) for 15 min at 37 °C. Treated cells were washed twice, and incubated for 90 min at 37 °C. Then, the cells were incubated with LysoTracker Red DND-99 (50 nM) for 30 min at 37 °C, washed twice.

## 第二項 フルオレセイン標識ペプチドの合成

Pepducin の細胞内動態を見るために、より簡便に合成できるフルオレセイン標識した P1pal-13 (**26**) を合成した。NovaSynTGR resin を用いて、第一章第三節と同様の方法で Fmoc 固相法によって合成した。



Scheme 2-1. *Reagents and conditions:* (a) i) Fmoc-AA-OH, HOBt·H<sub>2</sub>O, DIPCl, DMF, rt, 1.5 h; ii) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; i), ii) repeat; (b) **17**, HOBt·H<sub>2</sub>O, DIPCl, DIPEA, DMF, rt, overnight; (c) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; (d) C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>COOH, HOBt·H<sub>2</sub>O, DIPCl, DMF, rt, 1.5 h; (e) thioanisole/*m*-cresol/EDT/H<sub>2</sub>O/TFA, rt, 3 h

## 第三項 プローブ **26** と PAR1 蛋白質の局在性の比較

上記で合成したプローブ **26** は **13** と違って消光団をもたないことから、膜の内外にかかわらず、常に蛍光を発している。まず、**13** の場合と同様に、**26** で MDA-MB-231 細胞を処理し、ライブイメージング観察を行ったところ、15 分後は、細胞膜にのみ顕著な蛍光が認められたのに対し、120 分後になると、細胞内に複数の顆粒状の蛍光が認められた (Fig. 2-4)。同時に各時間で、細胞を固定し、PAR1 抗体を用いた抗体染色を行い、**26** 由来の蛍光の局在性と比較した。その結果、Fig. 2-5 に示すように、15 分後のサンプルでは細胞膜上に **26** 由来の緑色蛍光が認められ、その一部が PAR1 の赤色蛍光と重なっていた。一方、120 分後のサンプルでは、**26** 由来の顆粒状蛍光が多く観察され、そのほとんどが PAR1 と共局在していた。この際、固定したサンプルでは、ライブイメージングにくらべて **26** の緑色蛍光が一部細胞質に拡散して見えるのは、パラホルムアルデ

ヒドで固定した後にメタノールによる透過処理をしているためだと考えられる。

以上により、pepducin が PAR1 と何らかの相互作用により、エンドサイトーシスを誘発して、PAR1 と共に細胞内に移行してエンドソームに局在していると考えられた。

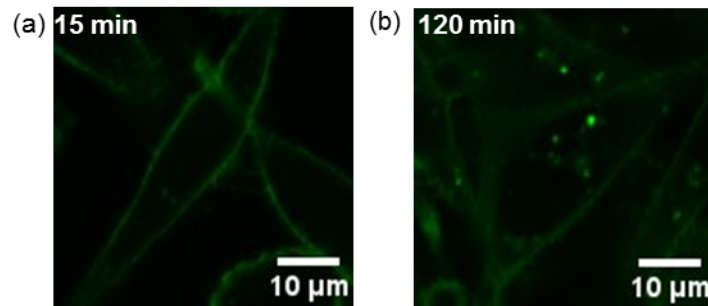


Figure 2-4. Confocal microscopy images of **26** of MDA-MB-231 cells. The cells were treated with 1  $\mu$ M of **26** for 15 min and washed twice, incubated for (a) 15 min and (b) 120 min at 37 °C.

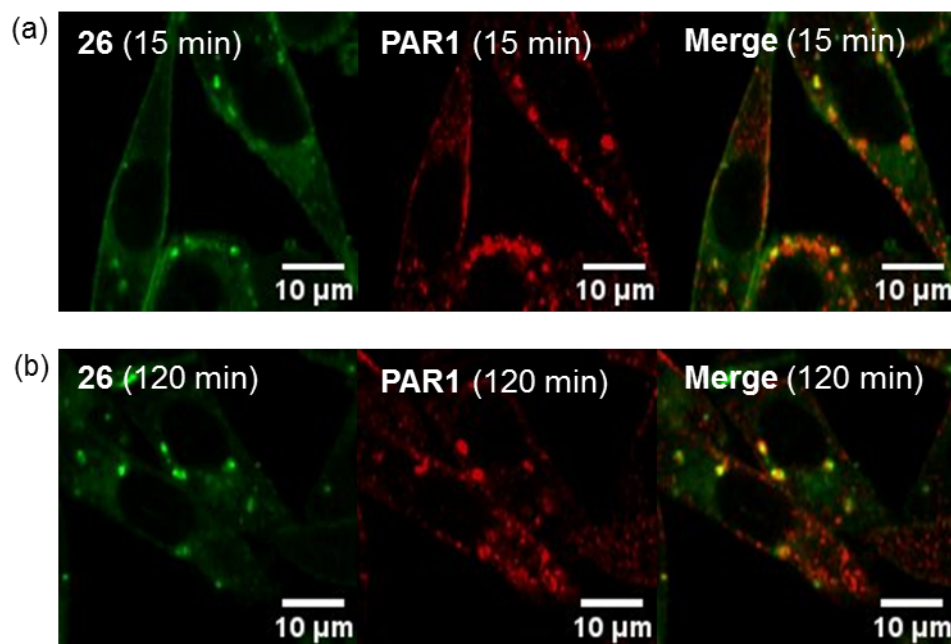


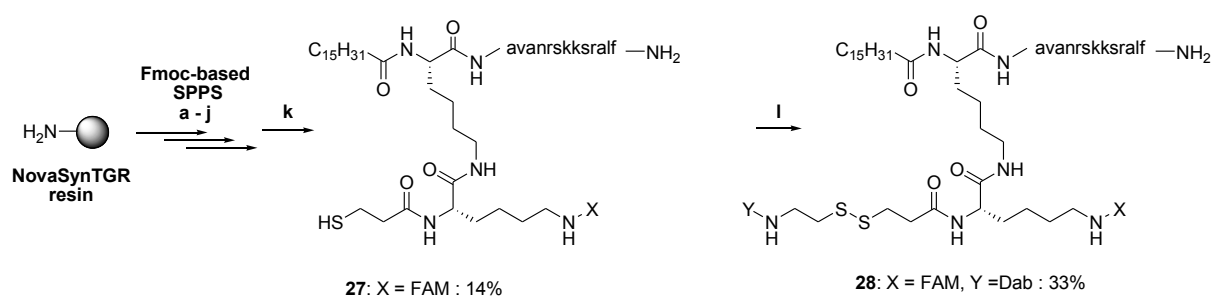
Figure 2-5. Confocal microscopy images of **26** and PAR1 immunostaining of MDA-MB-231 cells. The cells were treated with 1  $\mu$ M of **26** for 15 min and washed twice, incubated for (a) 15 min and (b) 120 min at 37 °C. Then the cells were fixed with PFA and immunostained



## 第四節 D-アミノ酸から成るペプチドシンプローブ **28** の合成 と蛍光イメージング

### 第一項 プローブ **28** の合成

PAR1 との相互作用にペプチド部分の構造がどのように影響するかを調べるため、**13** のペプチド部分を D 体に変換したプローブ **28** を合成した。前駆体 **27** を Fmoc 固相法によって合成し、得られた **27** を **4** と反応させることで目的とする化合物 **28** を得た。



Scheme 2-2. *Reagents and conditions:* (a) i) Fmoc-AA-OH, HOBt·H<sub>2</sub>O, DIPCl, DMF, rt, 1.5 h; ii) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; i), ii) repeat; (b) Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, HBTU, DIPEA, DMF, rt, 5 h; (c) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; (d) C<sub>15</sub>H<sub>31</sub>COOH, DIPEA, DMF, rt, 5 h (e) AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4 × 15 min; (f) Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, HBTU, DIPEA, DMF, rt, 5 h; (g) 20% piperidine, DMF, rt, 20 min; (h) Trt-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH, HBTU, DIPEA, DMF, rt, 5 h; (i) AcOH/TFE/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 4 × 15 min; (j) **3**, DIPEA, rt, overnight; (k) thioanisole/*m*-cresol/EDT/H<sub>2</sub>O/TFA, rt, 3 h; (l) **4**, DMF and 100 mM phosphate buffer (pH 6.0), rt, 12 h.

## 第二項 プローブ **28** を用いたライブセルイメージング

得られた **28** を MDA-MB-231 細胞に投与し、15 分間作用させた後、洗浄後 120 分して共焦点蛍光顕微鏡による観察を行った。Fig. 2-6 に示すように、細胞内に粒状蛍光が観察されたことから、対応する L 体プローブ **13** の場合と同様にエンドソームに局在している可能性が示唆された。すなわち、D 体ペプチドの場合でも、PAR1 のエンドサイトーシスを引き起こし、それと一緒に細胞内に移行していると考えられた。一方、データは示さないが、MCF7 細胞に **28** を作用させた場合は、細胞膜に存在していた。このように、D 体 **28** は L 体 **13** とほぼ同様の細胞内動態を示した。すなわち、PAR1 が発現していない MCF7 では、膜状でフリップ運動してそのまま留まっているが、PAR1 発現細胞ではエンドサイトーシスを引き起こし、PAR1 と共に細胞内に移行することが示唆された。

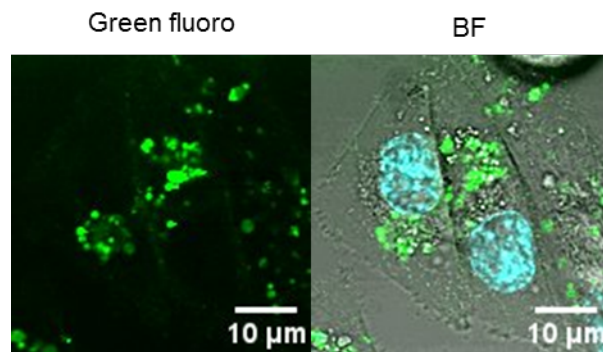


Figure 2-6. Confocal microscopic images and bright field (BF) images of live MDA-MB-231 cells. The cells were treated with 1  $\mu$ M of **28** for 15 min and washed twice, incubated for 120 min at 37 °C.

## 第五節 考 察

標的 GPCR の存在によって pepducin の取り込み様式への影響を調べるため、PAR1 発現の強い、MDA-MB-231 乳がん細胞を用いてイメージングを行い、MCF-7 乳がん細胞での結果と比較した。PAR1 発現率の低い MCF7 細胞では、**13** 処理 120 分後でも膜に局在し続ける様子が観察された。一方 PAR1 発現率の高い MDA-MB-231 細胞では、細胞内に粒状蛍光が観察された(Fig. 2-2)。これらの結果から、**13** を処理した MDA-MB-231 細胞で見られた粒状蛍光は pepducin の作用によって引き起こされる GPCR の内在化の一つであると予想された。GPCR の内在化がクラスリン小胞によるエンドサイトーシスで起こることが知られているため<sup>11</sup>、MDA-MB-231 細胞で見られた粒状蛍光は細胞内のエンドソームもしくはリソソームであると考えられた。

そこで **13** を用いてエンドソームもしくはリソソームのマーカーであるリソトラッカーによる共染色を行った。**13** を処理した細胞に、リソトラッカーで共染色し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、**13** とリソトラッカー由来の蛍光に重なりが確認された(Fig. 2-3)。これらの結果から、**13** 処理した MDA-MB-231 細胞で検出された蛍光はエンドソームもしくはリソソームに局在していることが明らかとなった。

さらに、pepducin の標的である PAR1 の細胞内取り込みに関与を調べるために、**13** に対応する pepducin をフルオレセインのみで標識したプローブ **26** を合成し、**26** 処理した細胞で PAR1 の抗体染色を行った。**26** 処理 15 分後の細胞では、緑色蛍光は、細胞膜と一部細胞内の粒子に検出された。これらは、PAR1 の抗体染色によって生じた赤色蛍光と重なっていた。また、120 分後の細胞では、細胞膜に局在している蛍光はほぼ検出されず、細胞内に粒状蛍光が検出された。この蛍光は大部分が PAR1 と重なっていた。緒言に述べたように、pepducin が標的 GPCR と相互作用してエンドサイトーシスによる内在化を誘導することが報告されている<sup>8, 20</sup>。よって **13** 及び **26** で処理した細胞内で検出された蛍光は、**13** 及び **26** が PAR1 に作用した結果、PAR1 のエンドサイトーシスによる内在化が引き起こされ、それに伴って **13** 及び **26** がエンドソームに取りこまれたことを示すものと考えられた。

GPCR 発現の有無で pepducin の細胞内動態が異なったことから、**13** 及び **26** と PAR1 と相互作用にはペプチド構造が重要と考えられた。そこで **13** の pepducin のペプチド部分を D 体アミノ酸から成るペプチドにおきかえた **28** を合成し、MDA-MB-231 での細胞内局在化について共焦点蛍光顕微鏡によって観察を行った。予想に反して、**28** で処理

した細胞についても粒状蛍光が検出されたことから、プローブを構成する pepducin、P1pal-13 の絶対配置にかかわらず PAR1 の内在化が引き起こされることが明らかになった。これまでに pepducin のペプチドの絶対配置と活性の相関に関する報告は見られず、非常に興味深い。今後さらに、pepducin のペプチド構造と細胞内動態の関連性を検討する必要がある。

### 第三章 総括及び考察

細胞内分子送達の一つとして、CPPs が広く知られている。多くの CPPs が開発されているが、その多くがエンドサイトーシスを介するものになっており、積荷分子をエンドソームから細胞質へ放出される仕組みがさらに必要となる。一方、pepducin は、GPCR の細胞内標的作動薬として非常に注目が集まっている人工リポ化ペプチドであり、flip 運動によって細胞膜を直接透過すると考えられている。著者は、このような pepducin の細胞内移行に着目し、flip 運動を利用した新たな細胞内送達システムを構築することを目指した。まず始めに、pepducin の細胞内移行を可視化する事の出来る pepducin プローブを開発し、ライブセルイメージングを行った。

GPCR はリガンド結合後、クラスリン小胞によるエンドサイトーシスによって細胞内へ内在化することが知られており、pepducin 誘導体によってもこのような内在化が引き起こされることが報告されている。そこで、標的とする GPCR の発現が pepducin の細胞内動態に与える影響についても調べた。

以下に得られた知見を要約する

1. GPCR の一つである PAR1 を標的とする pepducin, P1pal-13 に FRET 蛍光機能部位を組み込んだ分子設計を行った。FRET 機能部位の蛍光団と消光団の場所を入れ替えた 2 種類のプローブ、膜結合型プローブ Pep-13-FL-SS-Dab (**13**)及び細胞質放出型プローブ Pep-13-Dab-SS-FL (**14**)を開発した。また、**13** のパルミトイル基をアセチル基に置換したコントロール化合物 **15** 及び FRET 蛍光機能部位から成るコントロール化合物 **20** の合成も行った。
2. **13** 処理した MCF-7 細胞では細胞膜に局在する蛍光が検出された。一方コントロール化合物である **15** 及び **20** で処理した細胞については有意な蛍光は検出されなかったことから、pepducin の脂質及び、リポ化ペプチド構造が直接膜透過に重要な役割を果たすことが明らかになった。
3. 各種 SH 阻害剤で処理した細胞についても **13** 処理し、評価を行った。細胞膜透過性の SH 阻害剤の NEM で処理した細胞には有意な蛍光は認められなかったが、細胞外の SH 阻害剤である DTNB や bacitracin で処理した場合、細胞膜に局在する蛍光が検出された。以上により、細胞膜に局在する蛍光は、細胞膜の内側で SH 還元

を受けて FRET が解除されたためであることが明らかになった。これより、pepducin が flip 運動によって細胞内に移行することが示唆された。

4. **14** で処理した細胞では、細胞質全体からの蛍光が検出された。一方、**14** の還元で生じる SH 体色素 **22** は細胞膜を透過しなかったことから、細胞膜透過能を持たない **22** を pepducin につなげることにより、細胞内に送達できたと考えられた。
5. PAR1 発現のない MCF-7 細胞を **13** で処理したサンプルでは 120 分後においても細胞膜に局在し続けた。一方、PAR1 発現率が高い MDA-MB-231 細胞では、細胞内に粒状蛍光が検出され、リソトラッカーによる共染色すると重なったことから、エンドソームまたはリソソームに局在しているものと考えられた。また、この粒状蛍光は抗 PAR1 抗体染色において、PAR1 と共局在することも明らかになった。以上により **13** が PAR1 に作用して、PAR1 のエンドサイトーシスによる内在化を誘起し、それに伴って **13** がエンドソームに取り込まれることが示唆された。
6. D 体アミノ酸から成る **28** を合成し、MDA-MB-231 細胞で評価したところ、L 体の **13** と同様に GPCR の細胞内在化を誘起することが示唆された。これより pepducin のペプチド構造と細胞内移行に関するさらなる検討が必要と考えられる。

以上により、本研究によって、pepducin の flip 運動による細胞内移行を生き細胞ではじめて可視化することに成功した。また、pepducin は細胞膜上で flip 運動して細胞内に配向し、その後標的 GPCR の発現の有無で異なる細胞内動態をたどることが考えられた。このような特徴を生かして、細胞膜、細胞質、エンドソームまたはリソソームなど異なるオルガネラへのターゲティングも可能であると考えられる。このように pepducin を基盤とする細胞内送達システムはこれまでにない非常にユニークで有用なシステムと考えられ、薬物送達への応用が期待される。本研究により、今後の pepducin に基づいた細胞内送達システム構築において有用な知見を得ることが出来たと考えられる。

## 謝 辞

終わりに臨み、本研究に対して終始御懇篤なる御指導とご鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・永澤秀子教授に深甚なる謝意を表します。本研究にあたり直接御指導、御討論、並びにご激励を頂きました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・奥田健介准教授、上田聡助教、平山祐助教に感謝致します。

細胞実験の実施に当たり、直接御指導、御助言並びにご激励を頂きました岐阜薬科大学学生体機能解析学大講座分子生物学研究室・福光秀文准教授、宗宮仁美助教、名古屋市立大学医学研究科・酒々井眞澄教授に感謝致します。

本研究の推進に当たりご協力いただきました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室・因幡栄美氏に感謝いたします、実験に際してご協力いただきました坂口義明修士、磯野蒼学士、及び研究室諸氏に感謝致します。

本研究の一部は笹川科学研究助成(24-340)及び日本学術振興会若手スタートアップ(19890179)による助成を得て遂行されたものであり、ここにこの助成に対して心より感謝致します。

## 実験の部



## 実験の部

Fmoc アミノ酸、NovaSyn TGR resin は Novabiochem (Merck) から購入した。他の試薬はシグマ-アルドリッチ、和光純薬工業、東京化成工業から購入した。HPLC 用 MeCN は、和光純薬工業から購入した。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは AP-300 (大興商事) を用いた。

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルは JEOL ECA-500 (500 MHz) または JEOL JNM AL-400 (400 MHz) を用いて測定した。 $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルは JEOL ECA -500 (125 MHz) または JEOL JNM AL-400 (100 MHz) を用いて測定した。 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは、 $\text{CDCl}_3$ 、 $d_6\text{-DMSO}$  もしくは  $\text{CD}_3\text{OD}$  で測定を行った。 $^1\text{H-NMR}$  の化学シフト値は tetramethylsilane (0.00 ppm) を内部標準として ppm 単位で表示した。 $^{13}\text{C-NMR}$  の化学シフト値は溶媒のスペクトル  $\text{CDCl}_3$  (77.0)、 $d_6\text{-DMSO}$  (39.5)、 $\text{CD}_3\text{OD}$  (49.0) を内部標準物質として ppm 単位で表示した。

RP-HPLC は 20-AD series (Shimadzu) を用いた。分析用カラムは Waters Symmetry C18 (Waters,  $4.6 \times 75$  mm, flow rate 0.5 mL/min) もしくは Inertsil C4 (GL sciences,  $3 \times 150$  mm, flow rate 0.5 mL/min) を用いた。分析のための HPLC 溶出溶媒は、0.05% formic acid in ultra-pure water (v/v, solvent A) / 0.05% formic acid in MeCN (v/v solvent B) もしくは 0.1% TFA in ultra-pure water (v/v, solvent C) / 0.1% TFA in MeCN (v/v solvent D) を用いた。吸収波長 220 nm 及び 496 nm により溶出物を検出した。分取 HPLC の際にはカラムとして Cosmosil 5C18-ARII preparative column (Nacalai Tesque,  $20 \times 250$  mm, flow rate 8 or 5 mL/min), Cosmosil 5C18-AR II (Nacalai Tesque,  $10 \times 250$  mm, flow rate 3 or 5 mL/min), Bensil 5-C18 preparative column (Bentech,  $20 \times 250$  mm, flow rate 8 or 5 mL/min), もしくは Inertsil WP300 C4 preparative column (GL sciences,  $20 \times 150$  mm, flow rate 8 or 5 mL/min) を用いた。分取のための HPLC 溶出溶媒は 0.1% TFA in ultra-pure water (v/v) / 0.1% TFA in MeCN (v/v) を用いた。220 nm での UV 吸収により溶出物を検出した。MPLC 分取は YFLC W-Prep 2XY (YAMAZEN) を用いて行った。溶出溶媒は 0.1% TFA in ultra-pure water (v/v) / 0.1% TFA in MeCN (v/v) を用いた。220nm での UV 吸収により溶出物を検出した。

高分解能マスペクトルは JMS-SX102A (JEOL) もしくは LCMS-IT-TOF (Shimadzu) を用いた。低分解能 ESI (electron spray ionization) は HP1100 series (Hewlett-Packard) を

用いた。EI (Electron impact) もしくは FAB (fast atom bombardment)は JEOL JMS-SX102A を用いた。

蛍光スペクトルは、FP-6600 (JASCO) を用いて測定をおこなった。

全てのペプチドは分析 HPLC によって、95%以上の純度までの単離精製を行ったことを確認した。

共焦点レーザー蛍光顕微鏡は LSM 700 (Zeiss) を用いた。20× もしくは 40× 油浸対物レンズを用いた。

略語: EDC·HCl: 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, HOSu: *N*-hydroxysuccinimide, DIPEA: *N,N*-diisopropylethylamine, HOBT·H<sub>2</sub>O: *N*-hydroxybenzotriazole hydrate, DIPCI: 1,3-diisopropylcarbodiimide, TFE: trifluoroethanol, HBTU: 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethylaminium hexafluorophosphate, EDT: 1,2-ethanedithiol, GSH: glutathione, HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid, Fmoc: 9-fluorenylmethoxycarbonyl, Boc: *t*-butoxycarbonyl, Trt: trityl, Mmt: 4-methoxytrityl, Pbf: 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofurane-5-sulfonyl, TIPS: triisopropylsilane.

## 第一章 第三節 第一項に関する実験

### 2-(2-Pyridinyl)disulfanyl-ethanamine hydrochloride (1)の合成<sup>22</sup>

Aldrithiol-2<sup>TM</sup> (2.0 g, 10 mmol) を AcOH (0.80 mL)を含む MeOH (20 mL)に溶解した。そこに 2-aminoethanethiol hydrochloride (570 mg, 5.0 mmol) を MeOH (10 mL)で溶かしたものを 30 分以内に加えた。その反応溶液を室温アルゴン雰囲気下で 24 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後に、その残渣を Et<sub>2</sub>O で 2 回洗浄し、MeOH で溶解した。そこに過剰の Et<sub>2</sub>O を加え、沈殿を集め、目的とする化合物 **1** (780 mg, 70% crude yield) を無色透明な固体として得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 3.14 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 3.30 (t, *J* = 6.2 Hz, 2 H), 7.22–7.27 (m, 1H), 7.37–7.39 (m, 1 H), 7.60–7.64 (m, 1 H), 8.69–8.70 (m, 1 H), 9.35 (br s, 3H); LRMS (FAB) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup> 187.

### (2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl) (E)-4'-dimethylaminoazobenzene-4-carboxylate (2) の合成<sup>23</sup>

(E)-4'-dimethylaminoazobenzene-4-carboxylic acid (200 mg, 0.70 mmol) と *N*-hydroxysuccinimide (HOSu, 110 mg, 0.97 mmol) を DMF (10 mL) に溶解し、EDC·HCl (200 mg, 1.0 mmol) を 0 °C で加えた。その反応液を 0 °C で 30 分間、さらに室温で終夜攪拌を行った。溶媒を減圧留去した後に、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 mL) に溶解し、H<sub>2</sub>O (80 mL × 3) で洗浄した。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 3:1, AcOH 0.5% → hexane : ethyl acetate = 1:1, AcOH 0.5% → CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) で精製し、**2** (157 mg, 58% yield) をオレンジ色の粉体として得た。<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ 2.91 (s, 4 H), 3.12 (s, 6 H), 6.76 (d, *J* = 9.2 Hz, 2 H), 7.92 (d, *J* = 8.7 Hz, 4 H), 8.23 (d, *J* = 8.7 Hz, 2 H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ 25.7, 40.3, 111.5, 122.4, 124.6, 125.8, 131.7, 143.7, 153.2, 157.2, 161.7, 169.2; LRMS (EI) *m/z*: [M]<sup>+</sup> 366.

### 2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl 3',6'-dihydroxy-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthene]-5(6)-carboxylate (3) の合成<sup>24</sup>

5(6)-carboxyfluorescein (1.0 g, 2.6 mmol) を DMF (10 mL) で溶解し、EDC·HCl (767 mg, 4.0 mmol)、HOSu (460 mg, 4.0 mmol) を加え、遮光しながら 0 °C で 30 分間、さらに室温で終夜攪拌した。溶媒を減圧蒸留した後、ethyl acetate (120 mL) に溶解し、0.5% citric acid (80 mL × 3) 、sat. brine (80 mL × 3) で洗浄した。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、溶媒を減圧留去し、**3** (0.78 g, 60% yield) を黄色粉体として得た。この化合物は精製を行わず次

の反応に用いた。Analytical HPLC condition: linear gradient of solvent D into C, 10 to 90% D over 15 min. r.t. = 10.8 min; LRMS (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> 474.

#### (E)-N-[2-(2-pyridinyldithio)ethyl]-4'-dimethylaminoazobenzene-4-carboxamide (4)の合成

23

**10** (760 mg, 2.0 mmol) を DMF (10 mL) に溶解し、Et<sub>3</sub>N (2.6 mL, 18.6 mmol) と **1** (600 mg, 2.7 mmol) を加え、0 °C で 30 分間、さらに室温で終夜攪拌を行った。溶媒を減圧留去した後に CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (120 mL) で溶解し、sat. brine (80 mL × 3)、0.5% citric acid (80 mL × 3) で洗浄した。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) で精製し、**4** (800 mg, 90% yield) をオレンジ色の粉体として得た。Analytical HPLC condition: linear gradient of solvent D into C, 30 to 95% D over 15 min. r.t. = 10.3 min; LRMS (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> 438.

#### N-[2-(2-pyridinyldithio)ethyl]-3',6'-dihydroxy-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthene]-5(6)-carboxamide (5)の合成<sup>23</sup>

**11** (470 mg, 1.0 mmol) を DMF (10 mL) に溶解し、Et<sub>3</sub>N (0.70 mL, 5.0mmol) と **1** (330 mg, 1.5 mmol) を加え、0 °C で 30 分間攪拌し、さらに室温で終夜攪拌を行った。溶媒を減圧留去した後、MPLC で精製し凍結乾燥することで **5** (250 mg, 47% yield) を黄色粉体として得た。 <sup>1</sup>H-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 500MHz): δ 3.00 (t, *J* = 6.3 Hz, 0.8 H), 3.12 (t, *J* = 6.6 Hz, 1.2 H), 3.64 (t, *J* = 6.3 Hz, 0.8 H), 3.76 (t, *J* = 6.6 Hz, 1.2 H), 6.72–6.78 (m, 2.4 H), 6.87–6.93(m, 3.6 H), 7.17–7.19 (m, 0.4 H), 7.25–7.27 (m, 0.6 H), 7.39 (d, *J* = 8.2 Hz, 0.6 H), 7.68 (s, 0.4 H), 7.70–7.78 (m, 0.8 H), 7.82–7.90 (m, 1.2 H), 8.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 0.4 H), 8.21–8.23 (m, 1 H), 8.30 (d, *J* = 5.0 Hz, 0.4 H), 8.42 (d, *J* = 5.0 Hz, 0.6 H), 8.55 (s, 0.6 H). <sup>13</sup>C-NMR (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz): δ 38.6, 40.0, 103.5, 113.0, 113.2, 116.1, 116.2, 121.9, 122.7, 125.8, 127.1, 127.7, 130.0, 130.5, 131.5, 134.5, 137.8, 139.7, 139.9, 141.3, 149.9, 150.0; HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>28</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 545.0836, found 545.0862.

#### ペプチド 6–10 の合成に関する実験

ペプチド合成は、Fmoc固相合成 (Solid phase peptide synthesis, SPPS) によって行った。Fmocアミノ酸は、Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Val-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Ser(*t*-Bu)-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Lys(Mmt)-OHを

用いた。保護ペプチド鎖は、0.10 mmolスケールでNovaSynTGR resin (0.20–0.25 mmol/g) を用いて構築した。アミノ酸の縮合は、Fmocアミノ酸 (5 eq.), DIPCI (5 eq.), HOBt·H<sub>2</sub>O (5 eq.)を含むDMF (1 mL) 溶液を加え、室温で1.5時間振とうすることで行った。

Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, palmitic acid, Trt-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOHの縮合は、それぞれの化合物 (3 eq.), DIPEA (10 eq.), HBTU (2.9 eq.) を含むDMF (1 mL) 溶液を加え、室温で5時間振とうすることで行った。アセチル化は、無水酢酸 (10 eq.), pyridine (10 eq.) を含むDMF (1 mL) 溶液を加え、室温で1.5時間振とうすることで行った。DabcyI-OSu (**10**) or 5(6)-FAM-OSu (**11**) (1.5 eq.) はDIPEA (5 eq.) を用いることで縮合を行った。Fmoc脱保護は、20% ピペリジン/DMF溶液 (v/v)で室温、20分間処理した。Mmt脱保護はAcOH–TFE–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 2 : 7)で室温、15分間で4回繰り返すことで処理した。保護ペプチド鎖 (500 mg) を thioanisole/*m*-cresol/EDT/H<sub>2</sub>O/TFA (5 : 5 : 5 : 5 : 80 (v/v), 5 mL) を用いて室温で3時間、攪拌することで樹脂からの切り出しと脱保護を行った。冷Et<sub>2</sub>Oを加えて生じた沈殿を遠心で集め、その沈殿をEt<sub>2</sub>Oで三回洗浄した。分取用HPLCにて精製し、凍結乾燥することで目的とする各ペプチドを得た。

### Compound 6

上記の方法でペプチド**6** (24.0 mg, 11% from resin)を黄色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 50% B over 15 min. r.t. = 5.6, 5.8 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>77</sub>H<sub>111</sub>N<sub>17</sub>O<sub>18</sub>S<sup>2+</sup> [M + 2H]<sup>2+</sup> 796.9001, found 796.8983.

### Compound 7

上記の方法でペプチド**7** (47.7 mg, 26% from resin)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 90% B over 15 min. r.t. = 5.0 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>71</sub>H<sub>114</sub>N<sub>20</sub>O<sub>13</sub>S<sup>2+</sup> [M + 2H]<sup>2+</sup> 743.4292, found 743.4282.

### Compound 8

上記の方法でペプチド**8** (32.2 mg, 15% from resin)を黄色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 90% B over 15 min. r.t. = 6.8

min, HRMS (ESI) m/z: calcd for  $C_{115}H_{181}N_{27}O_{26}S^{2+}$   $[M + 2H]^{2+}$  1194.1690, found 1194.1642.

#### Compound 9

上記の方法でペプチド**9** (10.6 mg, 3.7% from resin)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters,  $4.6 \times 75$  mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 30 to 60% B over 15 min. r.t. = 6.2 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for  $C_{109}H_{185}N_{30}O_{21}S^{3+}$   $[M + 3H]^{3+}$  760.8012, found 760.8008.

#### Compound 10

上記の方法でペプチド**10** (13.8 mg, 5.2% from resin)を黄色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters,  $4.6 \times 75$  mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 50% B over 15 min. r.t. = 4.8 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for  $C_{101}H_{155}N_{27}O_{26}S^{4+}$   $[M + 4H]^{4+}$  548.5334, found 548.5322.

#### ジスルフィド結合ペプチ**11–15**の合成に関する実験<sup>25</sup>

ペプチド**6–10**を**4**または**5** (2 eq.)とDMF/100 mM sodium phosphate buffer (pH 6.0–8.0)中室温で反応させ、HPLC精製・凍結乾燥を行うことで目的とするジスルフィド体**11–15**を得た。

#### Compound 11

ペプチド**6** (10 mg, 0.005 mmol) と化合物**4** (4.4 mg, 0.010 mmol)をDMF (0.9 mL)/phosphate buffer (pH 6.0, 0.1 mL)中、室温で5時間反応を行うことで目的とするペプチド**11** (5.42 mg, 48%)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters,  $4.6 \times 75$  mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10% B for 5 min then 10 to 90% B over 15 min. r.t. = 10.8 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for  $C_{94}H_{130}N_{21}O_{19}S_2^{3+}$   $[M + 3H]^{3+}$  640.3092, found 640.3085.

#### Compound 12

ペプチド**7** (10 mg, 0.005 mmol) と化合物**5** (5.4 mg, 0.010 mmol)をDMF (0.9

mL)/phosphate buffer (pH 8.0, 0.1 mL)中、室温で1.5時間反応を行うことで目的とするペプチド**12** (8.5 mg, 74%)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10% B for 5 min, 10 to 95% B over 15 min and then 95% for 5 min. r.t. = 10.7 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>94</sub>H<sub>130</sub>N<sub>21</sub>O<sub>19</sub>S<sub>2</sub><sup>3+</sup> [M + 3H]<sup>3+</sup> 640.3092, found 640.3095.

#### Pep13-FL-SS-Dab (13)

ペプチド**8** (12 mg, 0.005 mmol) と化合物**4** (4.4 mg, 0.010 mmol)をDMF (1.9 mL)/phosphate buffer (pH 8.0, 0.1 mL)中、室温で20分間反応を行うことで目的とするペプチド**13** (8.0 mg, 50%)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 90% B over 15 min. r.t. = 7.7 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>132</sub>H<sub>202</sub>N<sub>31</sub>O<sub>27</sub>S<sub>2</sub><sup>5+</sup> [M + 5H]<sup>5+</sup> 543.4960, found 543.4985.

#### Pep13-Dab-SS-FL (14)

ペプチド**9** (23 mg, 0.008 mmol) と化合物**5** (8.7 mg, 0.016 mmol)をDMF (1.44 mL)/phosphate buffer (pH 6.0, 0.16 mL)中、室温で24時間反応を行うことで目的とするペプチド**14** (1.3 mg, 5.2%)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: an Inertsil C4 analytical column (GL sciences, 3 × 150 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 90% B over 15 min. r.t. = 7.8 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>132</sub>H<sub>199</sub>N<sub>31</sub>O<sub>27</sub>S<sub>2</sub><sup>2+</sup> [M + 2H]<sup>2+</sup> 1357.2291, found 1357.2243.

#### Compound 15

ペプチド**10** (6.6 mg, 0.003 mmol) と化合物**4** (2.6 mg, 0.006 mmol)をDMF (1.9 mL)/phosphate buffer (pH 6.0, 0.1 mL)中、室温で24時間反応を行うことで目的とするペプチド**15** (5.0 mg, 46%)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B in solvent A, 10 to 90% B over 15 min. r.t. = 5.3 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>118</sub>H<sub>172</sub>N<sub>31</sub>O<sub>27</sub>S<sub>2</sub><sup>3+</sup> [M + 3H]<sup>3+</sup> 839.7488, found 839.7484

#### 2,5-Dioxo-1-pyrrolidinyl 3-[(triphenylmethyl)thio]propanoate (16)の合成 <sup>26</sup>

3-(Tritylthio)propionic acid (200 mg, 0.57 mmol) を DMF (2.0 mL) に溶解し、HOSu (99 mg, 0.86 mmol) と EDC·HCl (170 mg, 0.86 mmol) を加え、0 °C で 30 分間攪拌し、さらに室温で終夜攪拌を行った。溶媒を減圧留去した後、ethyl acetate (80 mL) に溶解し、10% citric acid (20 mL × 3), sat. NaHCO<sub>3</sub> (20 mL × 3), H<sub>2</sub>O (20 mL × 3) で洗浄を行った。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、溶媒を減圧留去し、**16** (crude, 180 mg, 59%) を白色固体として得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 2.40 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 2.55 (t, *J* = 7.3 Hz, 2 H), 2.80 (s, 4 H), 7.28–7.31 (m, 9 H), 7.43–7.45 (m, 6H).

**N<sup>6</sup>-[(3',6'-Dihydroxy-3-oxospiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthene)-5(6)-carbonyl]-N<sup>2</sup>-[(9H-fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl]-L-lysine (17)の合成**

CAS: 1158088-23-3

Fmoc-L-Lys(Boc)-OH (470 mg, 1.0 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (1:1) (12 mL) に溶解し、0 °C で 10 分間攪拌し、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を DMF (4 mL) で溶解し、Et<sub>3</sub>N (0.14 mL, 1.0 mmol) と **3** (570 mg, 1.2 mmol) を加え、遮光しながら 0 °C で 15 分間攪拌し、さらに室温で終夜攪拌を行った。さらに Et<sub>3</sub>N (0.11 mL, 0.75 mmol) を加え、室温で終夜攪拌を行った。溶媒を減圧留去した後、ethyl acetate (160 mL) に溶解し、飽和食塩水 (40 mL × 3), 0.5% citric acid (40 mL × 3) で洗浄を行った。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、溶媒を減圧留去し、**17** (1.0 g, 69% crude yield for two steps) を黄色粉体として得た。Analytical HPLC condition: linear gradient of solvent D into C, 10 to 90% D over 30 min. r.t. = 20.0 min; LRMS (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> 727.

**Compound 18の合成**

化合物**17** (120 mg, 0.17 mmol) を 20% piperidine/DMF を用いて室温で 30 分間処理を行った。冷Et<sub>2</sub>O を加えて沈殿を生じさせ、遠心を行うことで目的とする化合物**18** (32 mg, 35% crude yield) を黄色固体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B in solvent A, 10 to 90% over 15 min. r.t. = 5.4 min, 5.6 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>27</sub>H<sub>23</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub><sup>-</sup> [M - H]<sup>-</sup> 503.1460, found 503.1456.

**Compound 19の合成**

化合物**18** (32 mg, 0.06 mmol) と **16** (38 mg, 0.11 mmol) を DMF (5.0 mL) に溶解し、DIPEA



(51  $\mu$ L, 0.29 mmol)を加え、0 °Cで30分間攪拌し、さらに室温で34時間攪拌を行った。溶媒を減圧留去し、MPLCで精製、凍結乾燥を行うことで黄色粉体を得た。それをTIPS (18  $\mu$ L, 0.088 mmol)を含むCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/TFA (1 : 1, 10 mL) 中、室温で1時間攪拌を行った。Et<sub>2</sub>Oを加えることで沈殿を生じさせ、遠心を行うことで目的とする化合物**19** (16 mg, 45% crude yield for two steps)を黄色固体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6  $\times$  75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 30 to 95% B over 60 min. r.t. = 13.6 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>30</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>S<sup>+</sup> [M + H]<sup>+</sup> 593.1588, found 593.1560.

#### Compound **20**の合成

化合物**19** (15 mg, 0.026 mmol) と化合物**4** (23 mg, 0.052 mmol)を DMF (0.9 mL)/100 mM phosphate buffer (pH 8.0, 0.1 mL)中、室温で2時間攪拌を行った。溶媒を減圧留去し、HPLC精製、凍結乾燥を行うことで目的とする化合物**20** (4.0 mg, 1.7% yield from Fmoc-L-Lys(Boc)-OH)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6  $\times$  75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 90% B over 15 min. r.t. = 12.0 min. HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>47</sub>H<sub>45</sub>N<sub>6</sub>O<sub>10</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> [M - H]<sup>-</sup> 917.2644, found 917.2660.

#### ***N,N'***-(dithiodi-2,1-ethanediyl)bis[**3',6'**-dihydroxy-3-oxospiro[isobenzofuran-1(**3*H*),9'-[9*H*]xanthene]-5(6)-carboxamide] (**21**)の合成**<sup>27</sup>

化合物 **3** (300 mg, 0.63 mmol)を DMF (3.0 mL)に溶解し、DIPEA (0.54 mL, 5.0 mmol)と 2-aminoethanethiol hydrochloride (116 mg, 0.76 mmol)を加え、0 °C で 30 分間攪拌し、さらに室温で終夜攪拌を行った。溶媒を減圧留去し、MPLCによる精製、凍結乾燥を行い目的とする化合物 **21** (27.8 mg, 10% yield)を黄色粉体として得た。<sup>1</sup>H-NMR (*d*<sub>6</sub>-DMSO, 500 MHz):  $\delta$  2.81–3.00 (m, 4H), 3.45–3.64 (m, 4H), 6.53–6.60 (m, 8H), 6.69 (s, 4H), 7.38 (s, 1H), 7.68 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 8.17–8.26 (m, 2H), 8.46 (d, *J* = 14.3 Hz, 1H), 8.86 (d, *J* = 23.1 Hz, 1H), 9.01 (d, *J* = 23.1 Hz, 1H), 10.17 (br s, 4H); HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>46</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub><sup>-</sup> [M-H]<sup>-</sup> 867.1324, found 867.1329.

#### **3-Oxo-5(6)-[2-(pyridin-2-yl)disulfanyl]ethylcarbamoyl]-3*H*-spiro[isobenzofuran-1,9'-[9*H*]xanthene]-3',6'-diyl diacetate (**23**)の合成**

化合物 **5** (100 mg, 0.18 mmol) を pyridine (75  $\mu$ L) を含む acetic anhydride (5 mL) に溶解し、75  $^{\circ}$ C で 1.5 時間攪拌し、冷水を加えた。生じた沈殿を集め、CHCl<sub>3</sub> (60 mL) で溶解し、5% acetic acid (40 mL  $\times$  3), sat. brine (40 mL  $\times$  3) で洗浄を行った。有機層を MgSO<sub>4</sub> で乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー(hexane : ethyl acetate = 1:3) で精製し、**23** (30 mg, 38 %) を白色個体として得た。 <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  2.24 (s, 6H), 2.94 (m, 2H), 3.69 (m, 2H), 6.81–6.72 (m, 4H), 6.94–6.91 (m, 0.5H), 7.04 (dd,  $J$  = 7.5, 1.2 Hz, 2H), 7.10–7.13 (m, 0.5H), 7.32 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 0.5H), 7.40 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 0.5H), 7.44–7.49 (m, 0.5H), 7.53–7.59 (m, 0.5H), 7.60 (s, 0.5H), 7.91–7.95 (m, 0.5H), 8.05 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 0.5H), 8.14 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 0.5H), 8.19–8.23 (m, 0.5H), 8.46 (m, 1.5H), 8.63 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 0.5H), 8.59 (t,  $J$  = 6.0 Hz, 0.5H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz):  $\delta$  168.49, 168.41, 167.90, 165.13, 151.90, 151.20, 151.16, 149.60, 149.03, 136.72, 128.60, 128.54, 128.02, 121.64, 121.58, 121.52, 117.59, 117.57, 115.47, 110.23, 81.90, 60.37, 38.47, 37.09; HRMS (ESI)  $m/z$ : calcd for C<sub>32</sub>H<sub>25</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup> 629.1052, found 629.1079.

## 第一章 第四節に関する実験

### 蛍光スペクトル測定

蛍光スペクトル測定は、JASCOFP6600 (slit width: 5 nm and 10 nm) を用いて、37  $^{\circ}$ C にて測定を行った。用いたセルは1 cm幅のものを用い、サンプル容量は3 mLで行った。

### ジスルフィド結合開裂に関するHPLC解析

化合物**11**もしくは**12**を100 mM HEPES buffer (pH 7.5) に溶解し、濃度を1 mMに調整を行い、5 mM GSHで37  $^{\circ}$ Cで30分間処理を行った。反応溶液を0.05% formic acid in MeCN で0.5 mM にまで希釈を行い、LC-MSによる解析を行った。

## 第一章 第五節 第一項に関する実験

### 細胞培養

MCF-7細胞は、10% FBS, 50 U/mL penicillin, 0.05% streptomycin と kanamycin を含む MEM を用いて、37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養を行った。

### ライブセルイメージング

共焦点蛍光顕微鏡は、Zeiss LSM 700 laser-scanning microscope systemを用いた。実験では、20× 対物レンズ、40× 油浸レンズを用いた。MCF-7 cells ( $7.5 \times 10^4$  cells per well)を35 mm glass-bottomed dish (treated TC, Greiner) 上で60–70% の密度になるまで培養した。

MCF-7 cellsの核を染色するために、Hoechst 33342 (1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , from 0.1 mg /mL stock solution in water) で10分間プレインキュベーションを行った。その後、各プローブ(1  $\mu\text{M}$ , 1% DMSO as a cosolvent) を37 °C, 15分間、MEM (-) (without FBS)中でプレインキュベーションを行い、MEM (-)で洗浄を行い新たなMEM (-)を加え、観察を行った。各プローブ、阻害剤の処理・細胞洗浄は、MEM (-)で行った。

## 第一章 第五節 第二項に関する実験

### 細胞培養

第一章 第五節 第一項で述べた方法に準ずる。

### ライブセルイメージング<sup>16b</sup>

第一章 第五節 第一項で述べた方法に準ずる。

N-Ethylmaleimide (NEM)を用いた実験では、プローブを加える前に細胞を50  $\mu\text{M}$  NEMで30分間インキュベーションを行った。

5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)用いた実験では、プローブを加える前に細胞を100  $\mu\text{M}$  DTNBで60分間インキュベーションを行った。

Bacitracinを用いた実験では、プローブを加える前に10 mM bacitracinで60分間インキュベーションを行った。

## 第一章 第六節 第一項に関する実験

### 化合物21のDTTによる還元に関する実験

化合物21 (5.0 mM in DMSO, 1.0  $\mu\text{L}$ )を100 mM HEPES buffer (pH 7.5, 100  $\mu\text{L}$ ) を用いて50  $\mu\text{M}$ の濃度になるまで希釈し、DTT (20 eq.)を加えて60分間、室温で攪拌を行った。さらに反応溶液にDTT (20 eq.)を加え60分間、室温で攪拌を行った。0.05% formic acid in

MeCNを用いて反応溶液を12.5  $\mu\text{M}$ の濃度にまで希釈を行い、LC-MSによって解析を行った。

## 第一章 第六節 第二項に関する実験

### 細胞培養

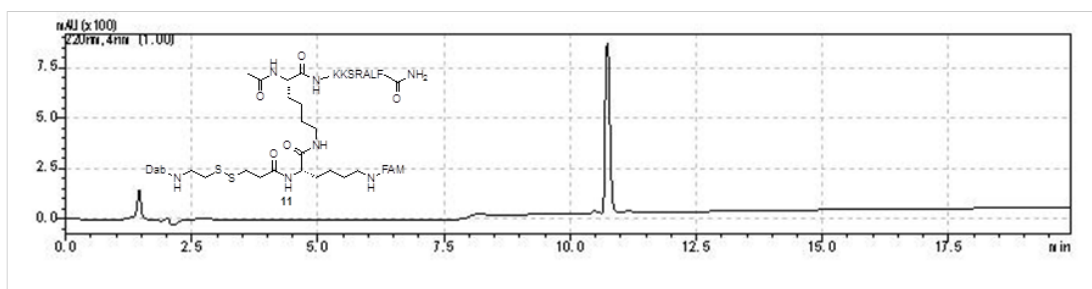
第一章 第五節 第一項で述べた方法に準ずる。

### ライブセルイメージング

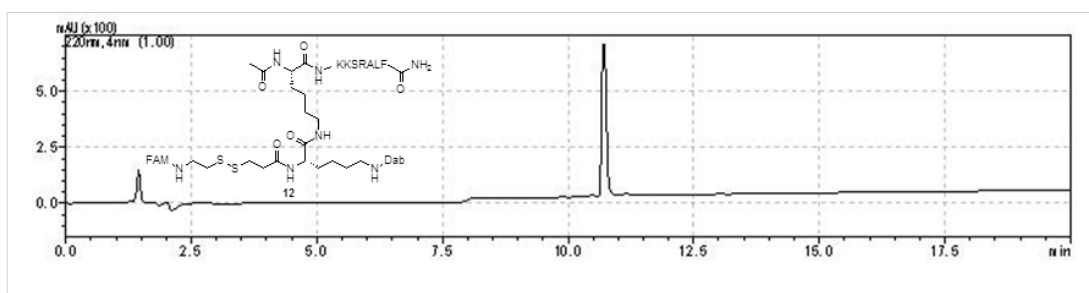
第一章 第五節 第一項で述べた方法に準ずる。

コントロール化合物**21**を用いた実験では、第一章 第六節 第一項で述べた還元方法に従い、化合物**22**がおおよそ1.0  $\mu\text{M}$ の濃度で培地中に存在するように加えた。

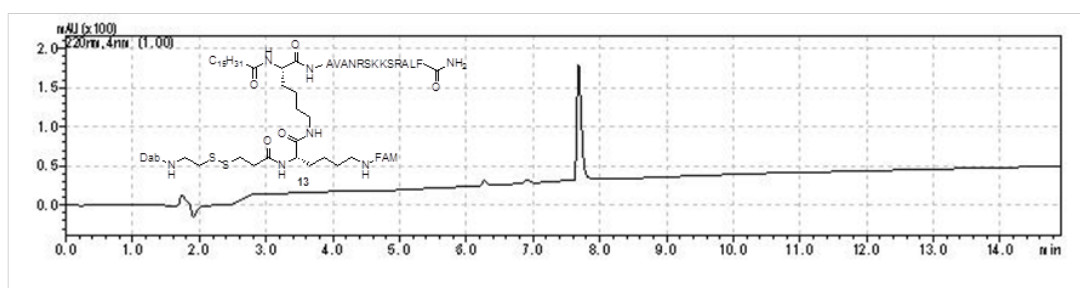
## 化合物11–15, 20のHPLCチャート



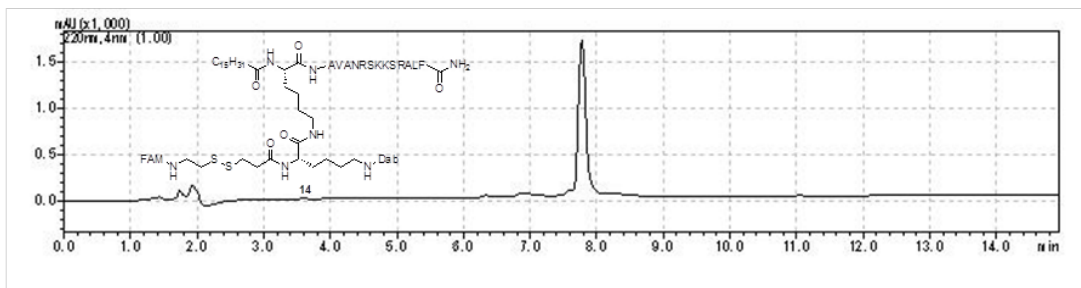
**Figure S1.** HPLC chart of **11**. Analytical HPLC condition: column; a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A; 10% B for 5min then 10 to 90% B over 15 min



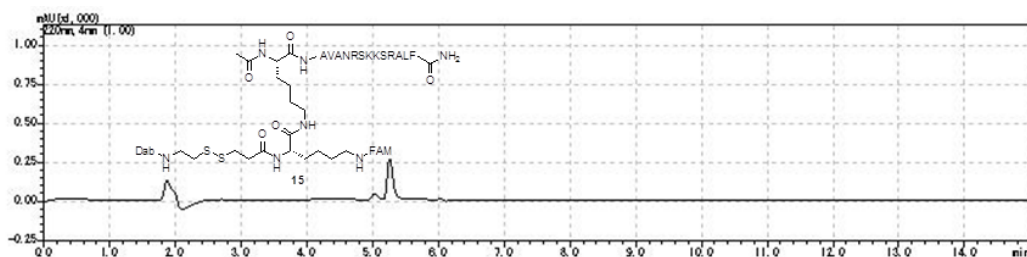
**Figure S2.** HPLC chart of **12**. Analytical HPLC condition: column; a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A; 10% B for 5min, 10 to 95% B over 15 min.



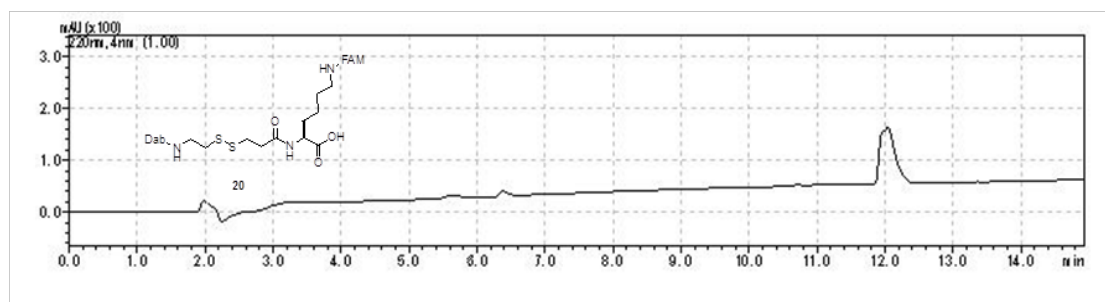
**Figure S3.** HPLC chart of **13**. Analytical HPLC condition: column; a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A; 10 to 90% B over 15 min.



**Figure S4.** HPLC chart of **14**. Analytical HPLC condition: column; an Inertsil C4 analytical column (GL Science, 3 × 150 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A; 10 to 90% B over 15 min.



**Figure S5.** HPLC chart of **15**. Analytical HPLC condition: column; a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A; 10 to 90% B over 15 min.



**Figure S6.** HPLC chart of **20**. Analytical HPLC condition: column; a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A; 10 to 90% B over 15 min.

## 第二章 第二節に関する実験

### 細胞培養

MCF-7細胞は、10% FBS, 50 U/mL penicillin, 0.05% streptomycin と kanamycinを含むMEMを培地として用いた。MDA-MB-231細胞は、10% FBS, 50 U/mL penicillin, 0.05% streptomycin と kanamycinを含むRPMI-1640を用いた。37 °C, 5% CO<sub>2</sub>雰囲気下で培養を行った。

### ライブセルイメージング

MCF-7 cells ( $7.5 \times 10^4$  cells per well)またはMDA-MB-231 cells ( $7.5 \times 10^4$  cells/well)を35 mm glass-bottomed dish (treated TC, Greinerまたはtreated ADVANCED TC, Greiner)上で60–70% の密度になるまで培養した。核を染色するために、Hoechst 33342 (1.0 µg/mL, from 0.1 mg /mL stock solution in water) で10分間プレインキュベーションを行った。その後、各プローブ (1 µM, 1% DMSO as a cosolvent) を37 °Cで15分間、血清を含まない培地中でインキュベーションを行い、洗浄を行った。60分後または120分後、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。共焦点蛍光顕微鏡は、Zeiss LSM 700 laser-scanning microscope systemを用いた。実験では、40× 油浸レンズを用いた。

## 第二章 第三節 第一項に関する実験

### 細胞培養

第二章 第二節で述べた方法に準ずる。

### ライブセルイメージング

MDA-MB-231 cells ( $7.5 \times 10^4$  cells/well)を35 mm glass-bottomed dish (treated ADVANCED TC, Greiner)上で60–70% の密度になるまで培養した。**13** (1 µM, 1% DMSO as a cosolvent) を37 °Cで15分間、血清を含まない培地中でインキュベーションを行い、洗浄を行った。洗浄が終了した後90分後にLysoTracker Red DND-99 (50 nM)を37 °Cで30分間インキュベーションを行い、細胞洗浄後に観察を行った。共焦点蛍光顕微鏡は、Zeiss LSM 700 laser-scanning microscope systemを用いた。実験では、40× 油浸レンズを用いた。

## 第二章 第三節 第二項に関する実験

### Compound 26の合成

NovaSynTGR resin (0.20 mmol)を用いて固相合成を行った。アミノ酸の縮合は、Fmoc アミノ酸 (5 eq.), DIPCI (5 eq.), HOBt·H<sub>2</sub>O (5 eq.)を含むDMF (2 mL) 溶液を加え、室温で1.5時間振とうすることで行った。17の縮合は、17 (3 eq.), HOBt·H<sub>2</sub>O (6 eq.), DIPCI (2 eq.), DIPEA (2 eq.)を用いて終夜攪拌することで行った。Fmoc脱保護は、20% ピペリジン /DMF溶液 (v/v)で室温、20分間処理した。保護ペプチド鎖 (480 mg) を thioanisole/*m*-cresol/EDT/H<sub>2</sub>O/TFA (5 : 5 : 5 : 5 : 80 (v/v), 4.8 mL) を用いて室温で3時間、攪拌すること樹脂からの切り出しと脱保護を行った。冷Et<sub>2</sub>Oを加えて生じた沈殿を遠心で集め、その沈殿をEt<sub>2</sub>Oで三回洗浄した。分取用HPLCにて精製し、凍結乾燥することで目的とするペプチド26 (14 mg, 2.3%)黄色粉体として得た。Analytical HPLC condition: linear gradient of solvent D into C, 10 to 90% D over 30 min. r.t. = 23.8 min; LRMS (ESI) m/z: [M+H]<sup>+</sup> 2172.

### 細胞培養

MDA-MB-231細胞は、10% FBS, 50 U/mL penicillin, 0.05% streptomycin と kanamycin を含むL-15を用いた。37 °Cで培養を行った。

### 抗体染色

MDA-MB-231 cells ( $7.5 \times 10^4$  cells/well) を 35 mm glass-bottomed dish (treated ADVANCED TC, Greiner) 上で60–70% の密度になるまで培養した。その細胞を26 (1 μM, 1% DMSO as cosolvent)を37 °Cで15 分間、血清を含まない培地(L-15 (-))でインキュベートを行った。続いて、L-15 (-)を用いて細胞洗浄を2回行い、37 °Cで15分間または、120分間インキュベートを行った。MDA-MB-231 cells を2% paraformaldehydeで室温10分間放置することで固定し、PBS で室温5分間放置することで洗浄した後、MeOHで-20 °C, 5分間処理した。細胞をPBS洗浄し、2% blockaceで30分間処理を行った、続いて、細胞を PAR1 antibody (ab63445, abcam<sup>®</sup>, 1/500)で4 °C、一晚処理し、PBS洗浄を行った。その後、細胞をAlexa-488 conjugated secondary antibody (Alexa Fluorfor<sup>®</sup> 594 goat anti-rabbit IgG [H+L], A1103, molecular probes<sup>®</sup>, 1/1000)で37 °C、30分間処理し、PBS洗浄を行った。共焦点蛍光顕微鏡は、Zeiss LSM 700 laser-scanning microscope systemを用いた。実験では、



40× 油浸レンズを用いた。

## 第二章 第四節 第一項に関する実験

### Compound 27の合成

NovaSynTGR resin (0.10 mmol)を用いて固相合成を行った。用いたアミノ酸は、Fmoc-L-Lys(Mmt)-OHを除いて全てD体のものを用いた。アミノ酸の縮合は、Fmocアミノ酸 (5 eq.), DIPEA (5 eq.), HOBT·H<sub>2</sub>O (5 eq.)を含むDMF (1 mL) 溶液を加え、室温で1.5時間振とうすることで行った。Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, palmitic acid, Trt-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOHの縮合は、それぞれの化合物 (3 eq.), DIPEA (10 eq.), HBTU (2.9 eq.) を含むDMF (1 mL) 溶液を加え、室温で5時間振とうすることで行った。3はDIPEA (5 eq.) を用いることで縮合を行った。Fmoc脱保護は、20% ピペリジン/DMF溶液 (v/v)で室温、20分間処理した。Mmt脱保護はAcOH-TFE-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 : 2 : 7)で室温、15分間で4回繰り返すことで処理した。保護ペプチド鎖 (600 mg) をthioanisole/*m*-cresol/EDT/H<sub>2</sub>O/TFA (5 : 5 : 5 : 5 : 80 (v/v), 4.8 mL) を用いて室温で3時間、攪拌することで樹脂からの切り出しと脱保護を行った。冷Et<sub>2</sub>Oを加えて生じた沈殿を遠心で集め、その沈殿をEt<sub>2</sub>Oで三回洗浄した。分取用HPLCにて精製し、凍結乾燥することで目的とするペプチド27 (40mg, 14%)黄色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 95% B over 15 min. r.t. = 6.5 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>115</sub>H<sub>182</sub>N<sub>27</sub>O<sub>26</sub>S<sup>2+</sup> [M + 3H]<sup>3+</sup> 796.4485, found 796.4475.

### Compound 28の合成<sup>25</sup>

ペプチド27 (20 mg, 7.0 μmol) と化合物5 (6.1 mg, 14 μmol)をDMF (1.44 mL)/phosphate buffer (pH 6.0, 0.16 mL)中、室温で12時間反応を行った。HPLC精製、凍結乾燥を行うことで目的とするペプチド28 (7.3 mg, 33%)を赤色粉体として得た。Analytical HPLC conditions: column, a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters, 4.6 × 75 mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A, 10 to 95% B over 15 min. r.t. = 7.7 min, HRMS (ESI) m/z: calcd for C<sub>132</sub>H<sub>200</sub>N<sub>31</sub>O<sub>27</sub>S<sub>2</sub><sup>2+</sup> [M + 3H]<sup>3+</sup> 905.1552, found 905.1538.

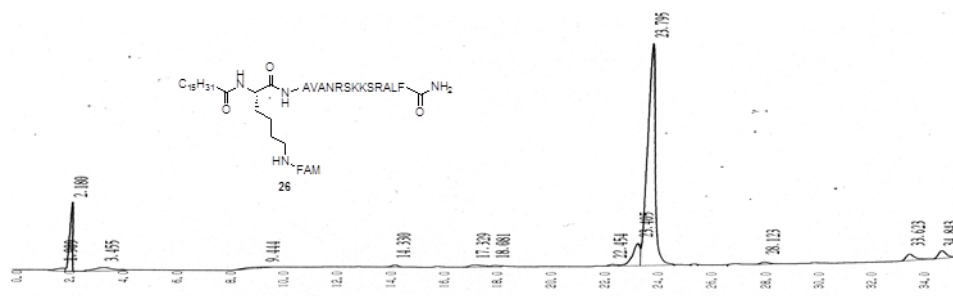
### 細胞培養

第二章 第二節で述べた方法に準ずる。

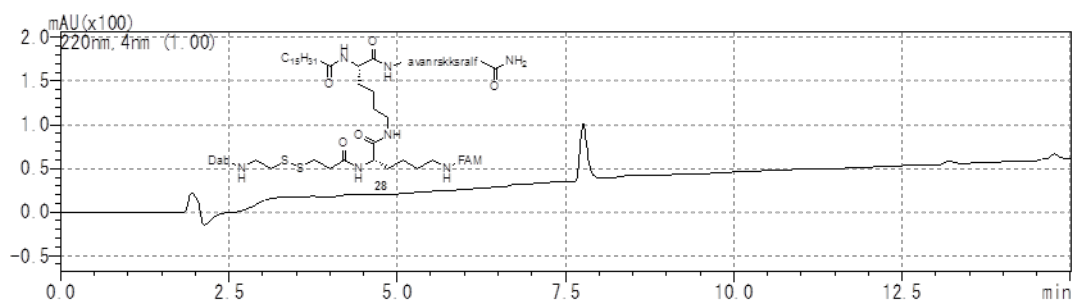
ライブセルイメージング

第二章 第二節で述べた方法に準ずる。

化合物26及び28のHPLCチャート



**Figure S7.** HPLC chart of **26**. Analytical HPLC condition: column; a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters,  $4.6 \times 75$  mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent C to solvent D; 10 to 90% over 30 min.



**Figure S8.** HPLC chart of **28**. Analytical HPLC condition: column; a Waters Symmetry C18 analytical column (Waters,  $4.6 \times 75$  mm), flow rate 0.5 mL/min, linear gradient of solvent B into A; 10 to 95% B over 15 min.

## 引用文献

1. (a) Bareford, L. M.; Swaan, P. W., Endocytic mechanisms for targeted drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **2007**, *59* (8), 748-58; (b) Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, U.; Futaki, S.; Graslund, A., Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* **2011**, *2011*, 414729.
2. (a) Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J., Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* **2011**, *151* (3), 220-228; (b) Torchilin, V., Intracellular delivery of protein and peptide therapeutics. *Drug Discovery Today: Technologies* **2008**, *5* (2), e95-e103.
3. (a) Katayama, S.; Hirose, H.; Takayama, K.; Nakase, I.; Futaki, S., Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J. Control. Release* **2011**, *149* (1), 29-35; (b) Takeuchi, T.; Kosuge, M.; Tadokoro, A.; Sugiura, Y.; Nishi, M.; Kawata, M.; Sakai, N.; Matile, S.; Futaki, S., Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1* (5), 299-303; (c) Futami, M.; Watanabe, Y.; Asama, T.; Murata, H.; Tada, H.; Kosaka, M.; Yamada, H.; Futami, J., Uniformly cationized protein efficiently reaches the cytosol of Mammalian cells. *Bioconjug. Chem.* **2012**, *23* (10), 2025-31.
4. (a) Covic, L.; Gresser, A. L.; Talavera, J.; Swift, S.; Kuliopulos, A., Activation and inhibition of G protein-coupled receptors by cell-penetrating membrane-tethered peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99* (2), 643-8; (b) Covic, L.; Misra, M.; Badar, J.; Singh, C.; Kuliopulos, A., Pepducin-based intervention of thrombin-receptor signaling and systemic platelet activation. *Nat. Med.* **2002**, *8* (10), 1161-5.
5. (a) O'Callaghan, K.; Kuliopulos, A.; Covic, L., Turning receptors on and off with intracellular pepducins: new insights into G-protein-coupled receptor drug development. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (16), 12787-96; (b) Carlson, K. E.; McMurry, T. J.; Hunt, S. W., Pepducins: lipopeptide allosteric modulators of GPCR signaling. *Drug Discovery Today: Technologies* **2011**.
6. Miller, J.; Agarwal, A.; Devi, L. A.; Fontanini, K.; Hamilton, J. A.; Pin, J. P.; Shields, D. C.; Spek, C. A.; Sakmar, T. P.; Kuliopulos, A.; Hunt, S. W., 3rd, Insider access: pepducin symposium explores a new approach to GPCR modulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2009**, *1180 Suppl 1*, E1-12.
7. Wielders, S. J.; Bennaghmouch, A.; Reutelingsperger, C. P.; Bevers, E. M.; Lindhout, T., Anticoagulant and antithrombotic properties of intracellular protease-activated receptor antagonists. *J. Thromb. Haemost.* **2007**, *5* (3), 571-6.
8. Janz, J. M.; Ren, Y.; Looby, R.; Kazmi, M. A.; Sachdev, P.; Grunbeck, A.; Haggis, L.;

Chinnapen, D.; Lin, A. Y.; Seibert, C.; McMurry, T.; Carlson, K. E.; Muir, T. W.; Hunt, S., 3rd; Sakmar, T. P., Direct interaction between an allosteric agonist pepducin and the chemokine receptor CXCR4. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (40), 15878-81.

9. (a) West, K. R.; Otto, S., Reversible covalent chemistry in drug delivery. *Current Drug Discovery Technologies* **2005**, *2* (3), 123-60; (b) Santra, S.; Kaittanis, C.; Santiesteban, O. J.; Perez, J. M., Cell-specific, activatable, and theranostic prodrug for dual-targeted cancer imaging and therapy. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (41), 16680-8.

10. (a) Razkin, J.; Jossierand, V.; Boturyn, D.; Jin, Z. H.; Dumy, P.; Favrot, M.; Coll, J. L.; Texier, I., Activatable fluorescent probes for tumour-targeting imaging in live mice. *ChemMedChem* **2006**, *1* (10), 1069-72; (b) Foillard, S.; Sancey, L.; Coll, J. L.; Boturyn, D.; Dumy, P., Targeted delivery of activatable fluorescent pro-apoptotic peptide into live cells. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (2), 221-4; (c) Christie, R. J.; Tadiello, C. J.; Chamberlain, L. M.; Grainger, D. W., Optical properties and application of a reactive and bioreducible thiol-containing tetramethylrhodamine dimer. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (3), 476-80.

11. Toshima, J. Y.; Toshima, J., [Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis via ubiquitination]. *Seikagaku* **2010**, *82* (7), 636-41.

12. Miyawaki, A., Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Dev. Cell* **2003**, *4* (3), 295-305.

13. Coughlin, S. R., Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **2000**, *407* (6801), 258-64.

14. (a) Hou, Y.; Guo, Z.; Li, J.; Wang, P. G., Seleno compounds and glutathione peroxidase catalyzed decomposition of S-nitrosothiols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *228* (1), 88-93; (b) Ducry, L.; Stump, B., Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (1), 5-13.

15. (a) Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A., Releasable luciferin-transporter conjugates: tools for the real-time analysis of cellular uptake and release. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (20), 6526-7; (b) Dubikovskaya, E. A.; Thorne, S. H.; Pillow, T. H.; Contag, C. H.; Wender, P. A., Overcoming multidrug resistance of small-molecule therapeutics through conjugation with releasable octaarginine transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105* (34), 12128-33; (c) Henkin, A. H.; Cohen, A. S.; Dubikovskaya, E. A.; Park, H. M.; Nikitin, G. F.; Auzias, M. G.; Kazantzis, M.; Bertozzi, C. R.; Stahl, A., Real-time noninvasive imaging of Fatty Acid uptake in vivo. *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7* (11), 1884-91.

16. (a) Pires, M. M.; Chmielewski, J., Fluorescence imaging of cellular glutathione using a latent rhodamine. *Org. Lett.* **2008**, *10* (5), 837-40; (b) Yang, J.; Chen, H.; Vlahov, I. R.; Cheng, J. X.; Low, P. S., Evaluation of disulfide reduction during receptor-mediated

- endocytosis by using FRET imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*(37), 13872-7.
17. Mandel, R.; Ryser, H. J.; Ghani, F.; Wu, M.; Peak, D., Inhibition of a reductive function of the plasma membrane by bacitracin and antibodies against protein disulfide-isomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1993**, *90*(9), 4112-6.
18. (a) Rajendran, L.; Udayar, V.; Goodger, Z. V., Lipid-anchored drugs for delivery into subcellular compartments. *Trends Pharmacol. Sci.* **2012**, *33*(4), 215-22; (b) Rajendran, L.; Knolker, H. J.; Simons, K., Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9*(1), 29-42; (c) Wikstrom, P.; Kirschke, H.; Stone, S.; Shaw, E., The properties of peptidyl diazoethanes and chloroethanes as protease inactivators. *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *270*(1), 286-93; (d) Resh, M. D., Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1451*(1), 1-16.
19. (a) Hicke, L.; Riezman, H., Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell* **1996**, *84*(2), 277-87; (b) Hoxie, J. A.; Ahuja, M.; Belmonte, E.; Pizarro, S.; Parton, R.; Brass, L. F., Internalization and recycling of activated thrombin receptors. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*(18), 13756-63.
20. Tchernychev, B.; Ren, Y.; Sachdev, P.; Janz, J. M.; Haggis, L.; O'Shea, A.; McBride, E.; Looby, R.; Deng, Q.; McMurry, T.; Kazmi, M. A.; Sakmar, T. P.; Hunt, S., 3rd; Carlson, K. E., Discovery of a CXCR4 agonist pepducin that mobilizes bone marrow hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2010**, *107*(51), 22255-9.
21. Yang, E.; Boire, A.; Agarwal, A.; Nguyen, N.; O'Callaghan, K.; Tu, P.; Kuliopulos, A.; Covic, L., Blockade of PAR1 signaling with cell-penetrating pepducins inhibits Akt survival pathways in breast cancer cells and suppresses tumor survival and metastasis. *Cancer Res.* **2009**, *69*(15), 6223-31.
22. Gnaccarini, C.; Peter, S.; Scheffer, U.; Vonhoff, S.; Klussmann, S.; Gobel, M. W., Site-specific cleavage of RNA by a metal-free artificial nuclease attached to antisense oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*(24), 8063-7.
23. Lee, Y. J.; Datta, S.; Pellois, J. P., Real-time fluorescence detection of protein transduction into live cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*(8), 2398-9.
24. Adamczyk, M.; Fishpough, J. R.; Heuser, K. J., Preparation of Succinimidyl and Pentafluorophenyl Active Esters of 5- and 6- Carboxyfluorescein. *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*(2), 253-255.
25. Bonnet, D.; Thiam, K.; Loing, E.; Melnyk, O.; Gras-Masse, H., Synthesis by chemoselective ligation and biological evaluation of novel cell-permeable PKC-zeta pseudosubstrate lipopeptides. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*(3), 468-71.
26. Galibert, M.; Renaudet, O.; Dumy, P.; Boturyn, D., Access to Biomolecular

Assemblies through One-Pot Triple Orthogonal Chemoselective Ligations. *Ang. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50* (8), 1901-1904.

27. Fernandez-Carneado, J.; Van Gool, M.; Martos, V.; Castel, S.; Prados, P.; de Mendoza, J.; Giralt, E., Highly efficient, nonpeptidic oligoguanidinium vectors that selectively internalize into mitochondria. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (3), 869-74.