



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	乙第1882号
学位記番号	論 第197号
氏名	安達 祐介
授与年月日	平成 29年 9月 28日
学位論文の題名	細胞膜透過性と薬理活性の評価に基づいた細胞内タンパク質を標的とするペプチド医薬品の研究
論文審査担当者	主査： 尾関 哲也 副査： 中川 秀彦, 梅澤 直樹, 佐藤 匡史

名古屋市立大学学位論文

細胞膜透過性と薬理活性の評価に基づいた
細胞内タンパク質を標的とするペプチド医薬品の研究

2017年度 (2017年9月)

安達 祐介

1. 本論文は、2017年9月に名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査 尾関哲也 教授
副査 中川秀彦 教授
梅澤直樹 准教授
佐藤匡史 准教授

2. 本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

1. Y. Adachi*, K. Sakamoto*, T. Umemoto, Y. Fukuda, A. Tani, T. Asami
Investigation on cellular uptake and pharmacodynamics of DOCK2-inhibitory peptides conjugated with cell-penetrating peptides.
Bioorg. Med. Chem., **25**, 2148–2155 (2017).
*The first two authors contributed equally to this work.
2. K. Sakamoto*, Y. Adachi*, Y. Komoike, Y. Kamada, R. Koyama, Y. Fukuda, A. Kadotani, T. Asami, J. Sakamoto.
Novel DOCK2-selective inhibitory peptide that suppresses B-cell line migration.
Biochem. Biophys. Res. Commun., **483**, 183–190 (2017).
*The first two authors contributed equally to this work.
3. T. Umemoto, K. Sakamoto, Y. Fukuda, Y. Adachi, A. Tani, T. Asami.
A Glutamic Acid Analog Bearing an Ethylenediamine Moiety Promotes the Cytosolic Delivery of TAT Peptides.
Chem. Lett., **46**, 889–891 (2017).

3. 本論文の基礎となる研究は、武田薬品工業株式会社化学研究所において長展生博士および浅見泰司博士の指導の下に行われた。

略語表

Ac	acetyl
Bn	benzyl
Cbz	benzyloxycarbonyl
CPP	cell penetrating peptide
CPYPP	4-[3'-(2"-chlorophenyl)-2'-propen-1'-ylidene]-1-phenyl-3,5-pyrazolidinedione
DHR-2	DOCK homology region 2
DIPE	diisopropyl ether
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformaide
DOCK2	dedicator of cytokinesis 2
Dpm	diphenylmethyl
DTT	dithiothreitol
EDCI	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Fmoc-OSu	<i>N</i> -(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide
GEF	guanin nucleotide exchange factor
HPLC	high performance liquid chromatography
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
Mmt	4-methoxytrityl
Mpa	3-mercaptopropionic acid
Nle	norleucine
NLS	nuclear localization signal
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
Nrf2	nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2
Oxyrna Pure®	ethyl cyano(hydroxyimino)acetate
PPI	protein–protein interaction
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
S1P	sphingosine-1-phosphate
SPPS	solid phase peptide synthesis
SPR	surface plasmon resonance
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TFA	trifluoroacetic acid
TIS	triisopropyl silane
TPSA	topological polar surface area

理論の部

第1章	緒言	
第1節	タンパク質間相互作用の阻害薬とモダリティ	6
第2節	CPP コンジュゲーションによる膜透過性の改善	6
第3節	DOCK2 阻害薬	8
第4節	研究方針および本論文の概要	9
第2章	DOCK2 選択的阻害ペプチドの探索	
第1節	ファージディスプレイスクリーニング	10
第2節	無細胞系における PPI 阻害活性の評価	11
第3節	細胞系における細胞遊走の阻害活性の評価	12
第4節	小括	14
第3章	CPP の膜透過性の比較	
第1節	既知 CPP の膜透過性評価	15
第2節	新規 CPP の探索	18
第3節	エンドソーム脱出を促進するための化学修飾	20
第4節	小括	24
第4章	CPP コンジュゲーションによる DOCK2 阻害ペプチドの細胞遊走阻害活性の向上	
第1節	コンジュゲートの細胞遊走阻害活性の評価	26
第2節	コンジュゲートの膜透過性評価	27
第3節	小括	28
第5章	構造変換による DOCK2 阻害ペプチドの細胞遊走阻害活性の向上	
第1節	N-メチルアミノ酸の利用	30
第2節	ジスルフィド結合の変換	30
第3節	Arg および Trp によるアミノ酸置換	31
第4節	構造変換と CPP コンジュゲーションの組合せ	32
第5節	小括	33
第6章	結語	35
	謝辞	37

実験の部

Experimental sections	38
References	49

第1章 緒言

第1節 タンパク質間相互作用の阻害薬とモダリティ

生体内におけるタンパク質同士の相互作用はタンパク質間相互作用 (protein-protein interaction、PPI) と呼ばれ、シグナル伝達や酵素反応などの重要な役割を担い、生物の発生や発達、恒常性の維持に不可欠である¹。PPI は種々の疾患とも関連しており、特に細胞内における異常な PPI を阻害することは新たな治療手段となり得る。

これまでに、リガンドと受容体との作用を標的とした多数の低分子医薬品が創出されてきた。しかしながら、従来の低分子創薬の手法では、タンパク質同士の平坦で広い作用面を阻害することは困難であった^{2,3}。近年になり、計算化学の進歩や fragment based drug discovery といった手法により、低分子 PPI 阻害薬の研究が盛んになってきている^{4,5}。一方で、分子量が大きいペプチドやマクロサイクルといった中分子化合物は、広く浅いタンパク質表面との作用に適すると考えられ、中分子 PPI 阻害薬が注目を集めている^{6,7}。中分子化合物には良好な PPI 阻害活性を期待できるものの、多くの場合、細胞膜を透過しない点が課題となっている。細胞内に到達可能な中分子 PPI 阻害薬は、アンメットメディカルニーズを満たす革新的な医薬品となる可能性がある。

第2節 CPP コンジュゲーションによる膜透過性の改善

中分子化合物の膜透過性を改善するために、様々な手法が検討されており、そのひとつとして細胞膜透過性ペプチド (cell penetrating peptide、CPP) の利用が増加している^{8,9}。CPP は細胞膜を透過するペプチドであり、1989年に初めての CPP として Tat ペプチド (Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg) が発見された¹⁰。Tat ペプチドは、HIV-1 に由来する Tat タンパク質 region III の 49 位から 57 位部分配列に相当する。Tat ペプチドの発見以降、700 種類以上の CPP が報告されており、多くの CPP は 10 から 30 残基程度のアミノ酸で構成されるカチオン性もしくは両親媒性のペプチドである^{11,12}。そして、CPP と薬効分子との共有結合的もしくは非共有結合的なコンジュゲートは、細胞内に到達すると考えられている¹³。例えば、nuclear factor (erythroid-derived 2)-like2 (Nrf2) と Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) との PPI 阻害薬が例に挙げられる。Nrf2 は細胞内に発現し、抗酸化作用に寄与している。この PPI を阻害する 14 残基ペプチド (Leu-Gln-Leu-Asp-Glu-Glu-Thr-Gly-Glu-Phe-Leu-Pro-Ile-Gln) は、細胞膜を透過できないため、THP-1 細胞に対して抗酸化活性を示さなかった¹⁴。一方で、14 残基ペプチドの N 末側に Tat ペプチドを配したコンジュゲートは heme oxygenase-1 の発現を増強し、細胞質への送達が向上していると示唆された。また、他のグループは、細胞内プロテアーゼであるカルパインで開裂するリンカー (Pro-Leu-Phe-Ala-Glu-Arg) を介して、Nrf2-Keap1 の PPI 阻害ペプチド (Leu-Asp-Glu-Glu-Thr-

Gly-Glu-Phe-Leu-Pro)と Tat ペプチドをコンジュゲーションすることで、脳虚血ラットにおける抗酸化作用を確認している¹⁵。

中分子化合物と CPP とのコンジュゲーションに基づき中分子 PPI 阻害薬を創出する際には、薬理活性のみならず膜透過性も検討する必要がある。CPP 自体は膜透過性を有しているも、薬効分子とのコンジュゲーションにより膜透過能力が変化する可能性が考えられる。また、コンジュゲートの CPP 部分によるオフターゲットもしくはオンターゲットでの作用が、目的とする薬理作用に影響する可能性もある。薬理活性と膜透過性を並行して評価することで上述のような課題を明らかにし、リード化合物の創出や最適化を進めることが重要である。しかしながら、CPP 利用による薬理活性の発現や増強に関する研究は多く報告されているにもかかわらず、膜透過性は必ずしも評価されていない。また、薬効分子として抗がん薬を用いる場合は、薬理活性としての細胞障害性が細胞内取り込みに影響を及ぼし、CPP による膜透過性の改善を正確に評価できないことが考えられる¹⁶。

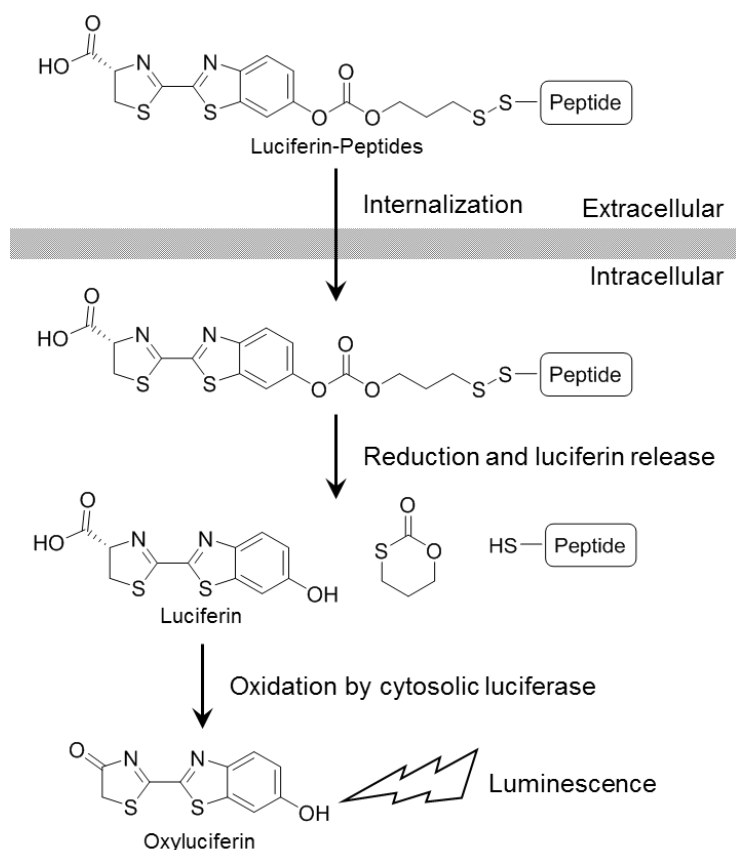


Figure 1. Schematic illustration of the principle of detecting cytosolic delivery based on luciferin–luciferase reaction.

コンジュゲーションに用いる CPP を選択する際には、何らかの基準があると望ましい。膜透過性の優劣は明確な基準のひとつと考えられるが、複数の CPP の膜透過性をひとつの評価系で比較した研究は少ない。Boisguerin らは、蛍光色素で標識した 22 種類の CPP を評価し、細胞の種類や温度などの条件が、膜透過性に影響することを明らかにしている¹⁷。このことから、CPP を用いて薬効分子の膜透過性を改善するには、コンジュゲーションに先立ち、CPP 自体の膜透過性を比較して良好な CPP を見極めることが重要といえる。蛍光色素標識されたペプチドの膜透過性評価の例は多い。しかしながら、ペプチドが細胞質に到達したときだけではなく、細胞膜上に吸着もしくはエンドソーム内でトラップされていても蛍光は観察される。Wender らは、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた膜透過性の評価系を報告している(Figure 1)¹⁸。本手法では、ジスルフィド結合を有するリンカーを介してルシフェリン修飾したペプチドを、ルシフェラーゼを発現させた HEK293 細胞で処理する。Wender らによると、ルシフェリンで修飾されたペプチドが細胞質に到達すると、細胞質のグルタチオンによりジスルフィド結合が開裂して遊離のチオールを有するペプチド、リンカー部分の環化体、およびルシフェリンへと分解し、ルシフェリンはルシフェラーゼの作用により発光性のオキシルシフェリンへと酸化される。そのため、細胞膜に吸着したペプチドやエンドソーム内にトラップされたペプチドは発光に寄与せず、細胞質に送達されたペプチドを評価できる。本研究においては、この系を用いて膜透過性を評価した。

第 3 節 DOCK2 阻害薬

中分子 PPI 阻害薬の標的として、本研究では dedicator of cytokinesis 2 (DOCK2) と Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) との PPI に着目した。DOCK2 は造血細胞に発現しているグアニンヌクレオチド交換因子(guanine nucleotide exchange factor、GEF)であり、DOCK homology region 2 (DHR-2) domain を介して Rac1 と作用し、リンパ球の遊走を誘導する(Figure 2)^{19,20}。DOCK2 欠損マウスでは、アロ反応性 T 細胞の二次リンパ器官への遊走が阻害されることで、心臓同種移植片に対する拒絶反応が減弱した²¹。そのため、DOCK2-Rac1

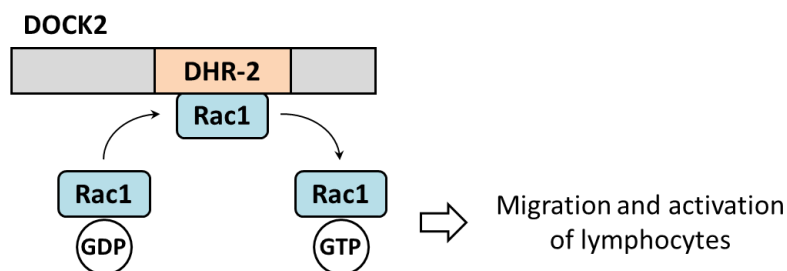


Figure 2. Cell migration induced by intracellular PPI between DOCK2 and Rac1.²²

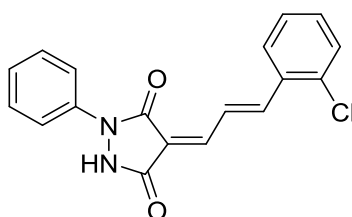


Figure 3. Structure of CPYPP, a first small molecule inhibitor of DOCK2.

の PPI 阻害は、移植片拒絶反応や炎症性疾患の治療に有効と考えられている。2012 年に、初の DOCK2-Rac1 の PPI 阻害薬として低分子化合物 4-[3'-(2"-chlorophenyl)-2'-propen-1'-ylidene]-1-phenyl-3,5-pyrazolidinedione (CPYPP)が報告された(Figure 3)²²。CPYPP は DOCK2 の DHR-2 domain に結合し、22.8 μM の IC₅₀ 値で Rac1 の活性化を阻害した。また、100 μM の濃度で T 細胞および B 細胞の遊走を完全に抑制した。しかしながら、CPYPP は DOCK2 のサブファミリーである DOCK1 および DOCK5 に対しても GEF 活性を阻害し、DOCK2 に対する選択性を示さなかった。DOCK1 はがん細胞の遊走や浸潤に、DOCK5 は骨形成に参与しているため、DOCK2-Rac1 の PPI 阻害作用を精査するには DOCK2 への選択性が重要といえる。分子量がより大きい中分子化合物であれば、活性および選択性が向上する可能性があり、DOCK2 選択的な PPI 阻害薬の創製は、DOCK2 阻害作用の解明および治療薬の開発に貢献できる。

第 4 節 研究方針および本論文の概要

本研究では、DOCK2-Rac1 の PPI を題材とし、CPP とのコンジュゲーションにより膜透過性を改善して中分子 PPI 阻害薬を創出する研究手法の構築を目指した。細胞内を標的とした中分子医薬品の創薬手法はまだ未成熟な段階であり、薬理活性と膜透過性との相関を取得して化合物を最適化することが重要であると考えた。

第 2 章では、中分子 PPI 阻害薬は低分子化合物よりも優れた活性と選択性を示すと仮説を立て、ファージディスプレイスクリーニングによる DOCK2 阻害ペプチドの取得検討について述べる。第 3 章では、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系による、優れた膜透過性を示す CPP の選抜および新規 CPP の探索について論じる。第 4 章では、PPI 阻害ペプチドと CPP とのコンジュゲーションによる薬理活性と膜透過性の変化について、続く第 5 章では、さらにペプチドの構造変換を組合せた場合の効果について述べる。

第2章 DOCK2 選択的阻害ペプチドの探索

第1節 ファージディスプレイスクリーニング

DOCK2-Rac1 の PPI を阻害する低分子化合物として CPYPP が報告されているが、PPI 阻害活性は数十 μM のオーダーであり、また DOCK1 との選択性を示さない。PPI の阻害にはタンパク質と広い面で作用する必要があるため、分子量がより大きい中分子化合物が適していると考えた。例えば低分子化合物においては、一般的な低分子薬と比べて、低分子 PPI 阻害薬の分子量やトポロジカル極性表面積(topological polar surface area, TPSA)は大きく、タンパク質との作用ポケット数は多いと示された^{3,23}。PPI におけるタンパク質間の作用面積は 1,500–3,000 \AA^2 と報告され⁵、DOCK2-Rac1 の場合では 1,744 \AA^2 と計算されている²⁴。低分子 DOCK2 阻害薬 CPYPP の分子量は 324.76、TPSA は 49.41 \AA^2 (ChemDraw にて算出)である一方、中分子化合物の分子量としては 1,000–5,000 程度が想定され、標的タンパク質とより広い面で作用することが可能といえる。ファージディスプレイスクリーニングは、標的タンパク質と親和性を有するペプチドを取得する手段のひとつである^{25,26}。多様なアミノ酸配列をファージ上に提示することで、標的タンパク質と結合するペプチドをランダムにスクリーニングすることができる(Figure 4)。

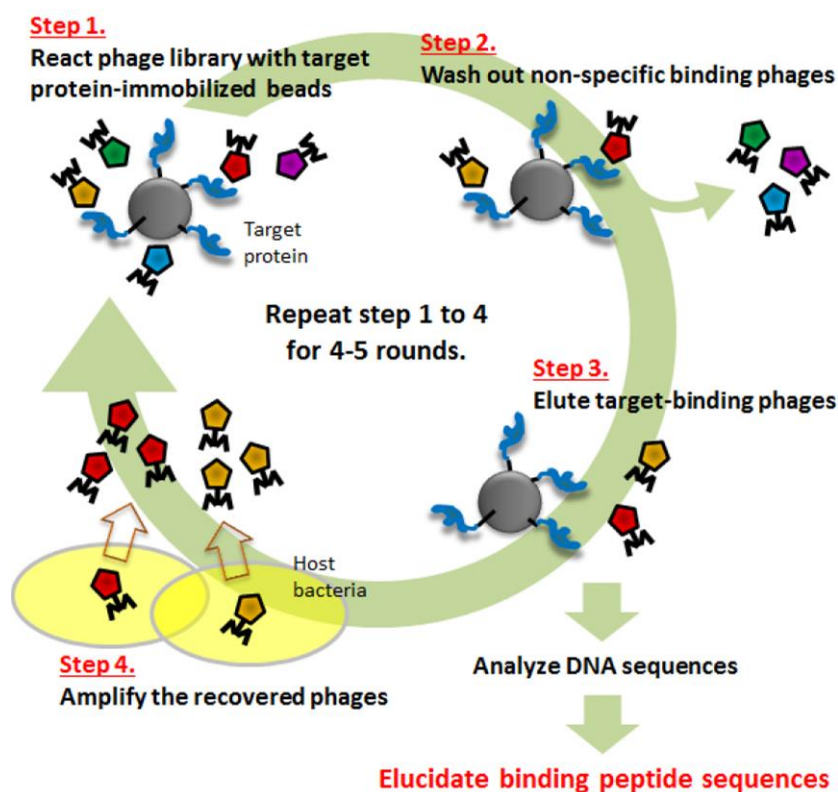


Figure 4. Schematic illustration of phage screening system.

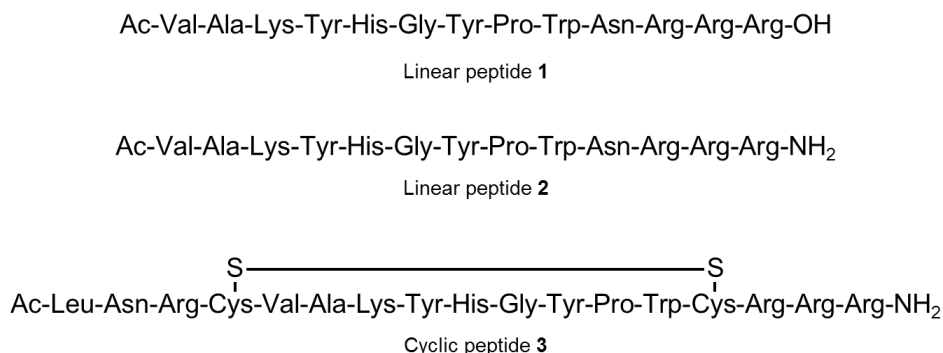


Figure 5. Structures of peptides obtained from phage screening against DOCK2.

直鎖もしくは環状のペプチドを提示した T7 ファージと樹脂に固定化した DOCK2 を混合した後、Rac1 を加えて T7 ファージを競合的に洗浄した。DOCK2 との結合を維持したファージを回収、増幅し、同様の操作を 4 回繰り返した。得られたファージから、複数のアミノ酸配列を同定したが、ひとつのクラスターに分類することができた。すなわち、取得したアミノ酸配列は、配列の中央に共通モチーフ (Val/Leu/Trp-Ala-Lys/Arg/Leu-Tyr/Phe/Trp-His/Met-Gly-Xaa-Xaa-Trp) および C 末側に複数の Arg 残基を有していた。これらの特徴は直鎖ペプチドと環状ペプチドの両方で確認された。

配列の相同性が最も高かった直鎖の配列 Val-Ala-Lys-Tyr-His-Gly-Tyr-Pro-Trp-Asn-Arg-Arg-Arg および環状の配列 Leu-Asn-Arg-Cys*-Val-Ala-Lys-Tyr-His-Gly-Tyr-Pro-Trp-Cys*-Arg-Arg-Arg (Cys*間でジスルフィド結合を構築)をヒット配列とし、直鎖ペプチド 1、2 および環状ペプチド 3 の PPI 阻害活性を評価することとした(Figure 5)。

第 2 節 無細胞系における PPI 阻害活性の評価

ペプチド 1、2 および 3 による DOCK2-Rac1 の PPI 阻害作用を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)にて評価した(Table 1)。直鎖ペプチド 1 および 2 の IC₅₀ 値はそれぞれ、dithiothreitol (DTT)が存在する還元的条件では 33 nM と 12 nM、DTT 非存在下では 31 nM と 11 nM であった。一方、環状ペプチド 3 の場合、DTT 存在下では 6.0 nM、DTT 非存在下では 2.2 nM と、ジスルフィド結合が開裂する還元的条件では活性が減弱した。直鎖体でも nM

Table 1. Inhibitory activities and binding affinities of peptides obtained from phage screening

Compound	Inhibitory activity, IC ₅₀ (nM)		Binding affinity, K _D (nM)	
	DTT +	DTT -	TCEP +	TCEP -
1	33	31	13	17
2	12	11	N.D.	N.D.
3	6.0	2.2	1.8	0.18

DTT, dithiothreitol; TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine; N.D., not determined.

オーダーの活性を維持しているものの、PPI 阻害には環状構造が望ましいと示唆された。ペプチドは標的分子と作用する際に、一定の二次構造を形成するため、構造の自由度が高い直鎖ペプチドと比べて、構造が適切に規定されたペプチドが強い親和性を示すと考えられた²⁷。また、DOCK1 との選択性を検討したところ、**1**、**2** および **3** は、1.0 μM までの濃度で DOCK1 に対する PPI 阻害活性を示さず、DOCK2 への選択性が判明した。

DOCK2 との親和性を表面プラズモン共鳴(surface plasmon resonance、SPR)法で評価した。**1** および **3** の K_D 値は、tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)が存在する還元的条件ではそれぞれ 13 nM と 1.8 nM、TCEP 非存在下では 17 nM と 0.18 nM であった。ELISA の結果と同様に、環状構造の開裂により DOCK2 との親和性が減弱することがわかった。また、**3** は、DOCK2 による Rac1 の GTP-GDP 交換反応を 35 nM の IC_{50} 値で阻害した。

ファージディスプレイスクリーニングにより取得した **1**、**2** および **3** は、DOCK2 と選択的に結合し、Rac1 との PPI を阻害することが明らかとなった。直鎖構造よりも環状構造の方が DOCK2 との親和性が高く、一定のコンフォメーションを形成することが親和性に寄与していると考えられる。

第 3 節 細胞系における細胞遊走の阻害活性の評価

細胞遊走の阻害活性は、ヒト B 細胞株である MINO 細胞を用いて評価した(Figure 6)。MINO 細胞を DOCK2 阻害ペプチドで 30 分間前処置した後、トランスウェルプレートの上側チャンバーに移した。このとき、下側チャンバーには細胞遊走を誘導する sphingosine-1-phosphate (S1P)を加えた。さらに 4 時間処置した後、下側チャンバーに移動した細胞数を計測した。細胞遊走の阻害活性は、S1P 存在下でペプチドを加えない群を陰性対照(阻害活性 0%)、S1P 非存在下でペプチドを加えない群を陽性対照(阻害活性 100%)として算出した。

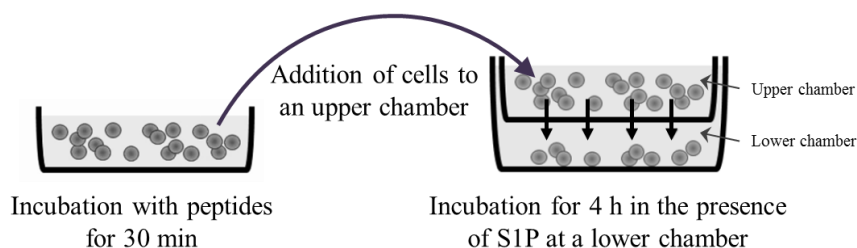


Figure 6. Schematic illustration of cell migration assay. MINO cells were treated with peptides at 37°C for 30 min. A portion of the cell suspension was added to an upper chamber of a trans-well plate, and cells were further incubated at 37°C for 4 h. Cells that moved to a lower chamber by sphingosine-1-phosphate (S1P) were counted. Inhibitory activity is represented as percentage of inhibition calculated based on the number of moved cells of vehicle control.

直鎖ペプチド **2** は、10 μM までの濃度で細胞遊走を阻害しなかった(Figure 7)。環状ペプチド **3** は、10 μM において MINO 細胞の遊走を完全に阻害し、ペプチドの環化による分子内水素結合の形成が膜透過性の向上に寄与している可能性が考えられた。一方で、3.3 μM 以下の濃度では阻害活性がみられず、**3** の膜透過性が低いためと推測した。そこで、CPP とのコンジュゲーションにより膜透過性を改善できれば、細胞遊走の阻害活性も向上すると考えた。

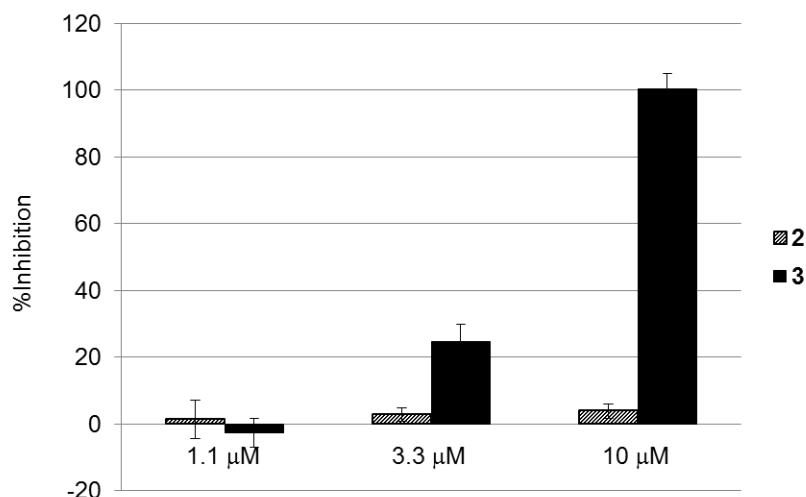


Figure 7. Cell migration inhibitory activity of linear and cyclic DOCK2-inhibitory peptides.

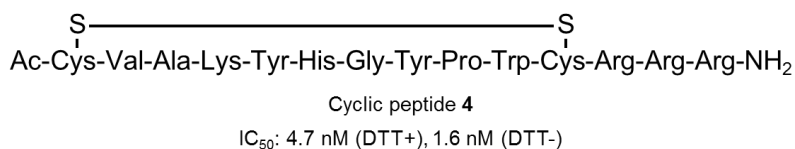


Figure 8. Structure and inhibitory activity of cyclic peptide 4.

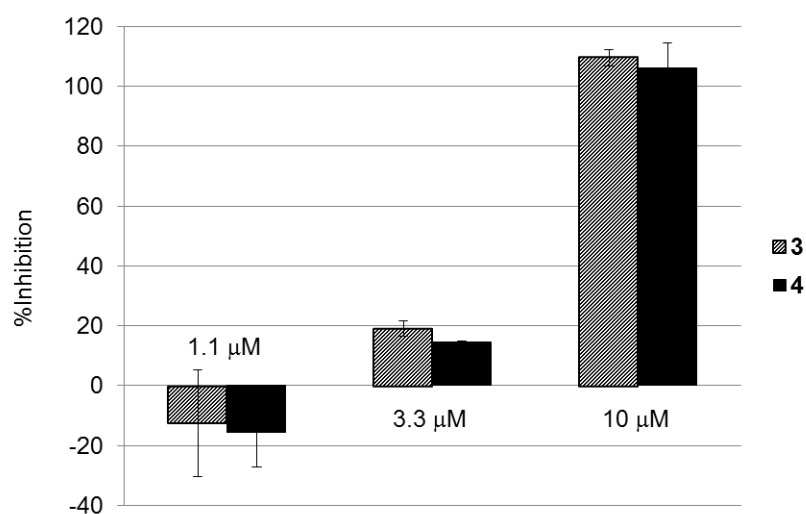


Figure 9. Comparison of cell migration inhibitory activity of two cyclic DOCK2-inhibitory peptides.

CPP とのコンジュゲーションに先立ち、合成の簡便性から **3** の短鎖化を目指し、N 末に位置する 3 つのアミノ酸残基 Leu-Asn-Arg を除去した環状ペプチド **4** を合成した(Figure 8)。 **4** は、**3** と同程度の PPI 阻害活性および細胞遊走の阻害活性を示した(Figure 9)。そこで、**4** をリードペプチドとして、CPP とのコンジュゲーションによる膜透過性の改善を検討することとした。

第 4 節 小括

ペプチドのランダムスクリーニングを行い、高い活性と選択性を両立した初の DOCK2 阻害化合物として環状ペプチド **3** を見出した。**3** を短鎖化した **4** は、DOCK2 と Rac1 との PPI を 4.7 nM の IC₅₀ 値で阻害し、DOCK1 には作用しなかった。また、10 μM の濃度で MINO 細胞の遊走を完全に抑制した。低分子 DOCK2 阻害薬 CPYPP と比較して、**4** は活性および選択性に優れており、中分子化合物は広く浅い面での作用に適していると示唆された。しかしながら、**4** は 3.3 μM 以下の濃度では細胞遊走を阻害せず、膜透過性が不十分な可能性があった。そのため、膜透過性の改善により、遊走阻害活性が向上することを検討する必要があると考えられた。

第3章 CPPの膜透過性の比較

第1節 既知CPPの膜透過性評価

CPPを利用したペプチドの膜透過性の改善例は多く報告されている。しかしながら、CPP選択の根拠となるようなCPP自体の膜透過性の比較検討は、ほとんど行われていない。そこで、単一の評価系において、複数のCPPの膜透過性を比較し、優れた膜透過性を示すCPPをDOCK2阻害ペプチド4とのコンジュゲーションに用いることとした。第1章で述べたルシフェリンとリシフェラーゼとの反応に基づいた系により膜透過性を評価した。本系において、オキシルシフェリンによる発光強度を3分毎に測定し、3分から60分までの曲線下面積を細胞膜透過量とした。各ペプチドの膜透過性は、陽性対照であるルシフェリン(50 μ M)の透過量を100%として比率計算した。評価に際し、各ペプチドのスルフヒドリル基に対して活性なジスルフィド結合を有する luciferin-linker を反応させ、ルシフェリンで修飾した (Figure 10)。Luciferin-linker の合成は experimental sections に示した。

既に報告されている既知のCPPの中から、物性(カチオン性、両親媒性)や分子量、合成難度を考慮して13種類を選択した(Table 2)。Tat ペプチド、penetratin²⁸、X-pep²⁹、Oct4-PTD³⁰、KST peptide³¹ および pVEC³² は天然のタンパク質に由来するCPPである。PTD4 はアミノ酸修飾により α -ヘリカル構造を増強した Tat ペプチドの誘導体である³³。Nle-Pen は、penetratin の13位 Met 残基を norleucine (Nle) に置換した誘導体である。OligoArg³⁴ および MAP³⁵ は人工的に設計されたCPPである。MPG³⁶、transportan³⁷ および S4₁₃-PV³⁸ は、2種類のペプチドからなるキメラ配列であり、MPG は膜結合ドメインと核移行シグナル(nuclear localization signal、NLS)、transportan はガラニン受容体リガンドとハチ毒、S4₁₃-PV は抗菌ペプチドとNLSを組合せて構成されている。上述CPPには、Langel らが HeLa 細胞を用いた同様の手法で膜透過性を評価したペプチド(Tat ペプチド、penetratin、pVEC、MAP)が含まれている³⁹。

これら13種類の既知CPPには、luciferin-linker との反応のため、必要に応じて Cys もしくは 3-mercaptopropionic acid (Mpa) を導入した。すなわち、Tat ペプチド、PTD4、X-pep のC末端への Cys 伸長、penetratin、Nle-Pen、KST peptide、pVEC、oligoArg、MAP、MPG、transportan、および S4₁₃-PV のN端側への Mpa 伸長を行った。Oct4-PTD は8位に Cys を有していた。Cys および Mpa のルシフェリン修飾体 C(luc) および Mpa(luc) の構造は Figure 11 に示した。

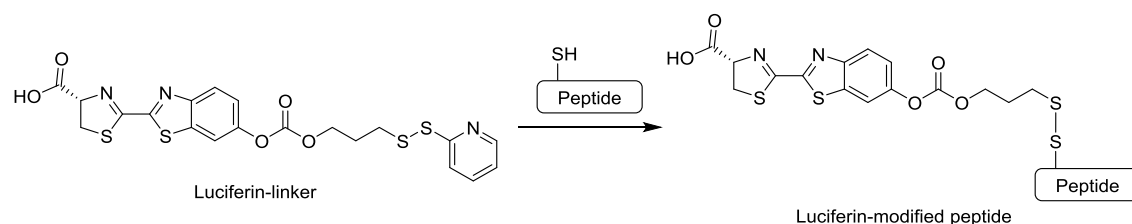
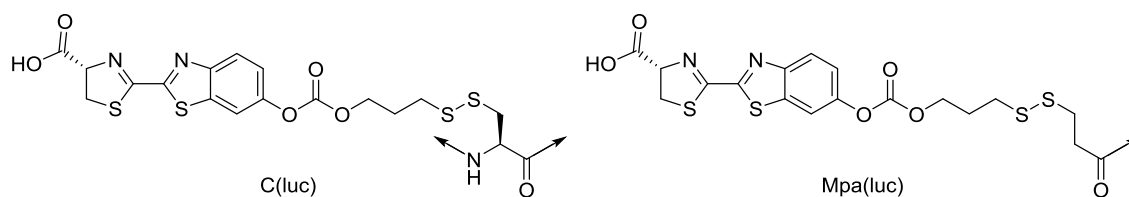


Figure 10. Luciferin modification of peptides using luciferin-linker.

Table 2. Classes and sequences of evaluated CPPs modified with luciferin

CPP	Class	Sequence	M.W.
Tat peptide	Cationic	H-GRKKRRQRRRPPQC(luc)-NH ₂	2217.6
PTD4	Amphipathic	H-YARAAARQARAC(luc)-NH ₂	1703.0
Penetratin	Cationic	Mpa(luc)-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂	2730.3
Nle-Pen	Cationic	Mpa(luc)-RQIKIWFQNRR-Nle-KWKK-NH ₂	2712.3
X-pep	Amphipathic	H-MAARLC(luc)-NH ₂	1059.3
Oct4-PTD	Cationic	H-DVVRVWFC(luc)NRRQKGKR-NH ₂	2442.9
KST peptide	Cationic	Mpa(luc)-KSTGKANKITITNDKGRLSK-NH ₂	2643.3
<i>p</i> VEC	Amphipathic	Mpa(luc)-LLILRRRIRKQAHASK-NH ₂	2693.3
OligoArg	Cationic	Mpa(luc)-RRRRRRRR-NH ₂	1751.1
MAP	Amphipathic	Mpa(luc)-KLALKLALKALKALKLA-NH ₂	2361.1
MPG	Amphipathic	Mpa(luc)-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-NH ₂	3330.0
Transportan	Amphipathic	Mpa(luc)-GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	3325.0
S4 ₁₃ -PV	Amphipathic	Mpa(luc)-ALWKTLLKVKLAPKKKRKV-NH ₂	2860.7

C(luc), luciferin-modified cysteine; Mpa(luc), luciferin-modified 3-mercaptopropionic acid; Nle, norleucine.

**Figure 11.** Structures of luciferin-modified Cys and Mpa. Mpa, 3-mercaptopropionic acid.

ルシフェリンで修飾した既知 CPP (1.9、5.6、17、50 μ M)で、ルシフェラーゼを発現した HEK293 細胞を処理した (Table 3)。Tat ペプチド、PTD4、X-pep、Oct4-PTD、KST peptide および *p*VEC の膜透過性は、本評価系においては低かった。Penetratin、MPG および transportan の膜透過量は同程度であったが、発光の反応速度曲線の形状はそれぞれ異なった (Figure 12)。Penetratin の細胞取り込みは緩やかで約 40 分で最大に達した。MPG の取り込み速度は遅く、シグモイド様の曲線を描き、約 60 分で最大となった。一方で、transportan はすばやく取り込まれて約 20 分で最大となった。こうした挙動の違いは、膜透過メカニズムや物性の差異に起因する可能性が考えられる。Nle-Pen は、penetratin と同様の挙動を示したが、取り込み量は優っていた。13 位 Met を Nle に置換することで、膜透過性が改善したと考えられる。OligoArg は、50 μ M において著しい膜透過性を示したが、17 μ M 以下では大きく低下した。ポリカチオン性の CPP は、数十 μ M 以上の濃度において細胞膜を直接透過し、急激に膜透過性が向上することが知られている⁴⁰。そのため、50 μ M における oligoArg の細胞取り込みは直接透過による可能性がある。MAP は 50 μ M において penetratin と同等の膜透過性であ

ったが、細胞の生存率が低下していた。細胞障害性により細胞膜が破綻し、CPP の取り込み量増大もしくは細胞内ルシフェラーゼの流出により膜透過性が過大評価されたと考えられる。S4₁₃-PV も同様に 50 μ M で顕著な細胞障害性を示したが、17 μ M および 5.6 μ M では障害性は減弱、消失し、膜透過性は他の CPP と比較して高かった。

細胞膜上のスルフヒドリル基がルシフェリン修飾 CPP と反応し、細胞外においてルシフェリンが遊離する場合、膜透過性が過大に評価されると考えられる。しかしながら、Langelらは、細胞外においてルシフェリン修飾 CPP はほとんど分解しないと報告している³⁹。本論文で記載したのものも含め、これまでに評価した 40 種類以上の CPP では、約半数において発光は非常に弱く、PTD4 と同等もしくはそれ以下の発光強度であった。発光強度の低い CPP の配列は多様であることから、細胞外において、一般的事象としてルシフェリン修飾 CPP が分解される可能性は低いと示唆された。また、一部の CPP が細胞外で分解し、膜透過性が過大に評価されたとしても、DOCK2 阻害ペプチドとのコンジュゲートの細胞遊走阻害活性を評価することで、結果的にその CPP の有用性は判断できる。

Table 3. Cellular uptake of thirteen known CPPs

CPP	Cellular uptake (ratio to luciferin 50 μ M) ^a				Cytotoxicity (% viability) ^b			
	1.9 μ M	5.6 μ M	17 μ M	50 μ M	1.9 μ M	5.6 μ M	17 μ M	50 μ M
Luciferin	5.3	11.8	34.8	100.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Tat peptide	1.9	2.5	4.9	11.5	94.6	100.9	90.7	94.5
PTD4	2.1	2.8	5.4	10.7	91.7	93.6	87.4	89.4
Penetratin	2.0	4.2	13.9	30.5	93.5	91.7	93.8	88.5
Nle-Pen	2.1	5.8	17.3	42.1	85.1	92.9	86.2	73.5
X-pep	1.9	2.1	4.1	6.0	97.5	100.0	95.9	98.0
Oct4-PTD	1.5	2.4	5.0	8.1	90.6	94.9	91.1	83.6
KST peptide	2.3	3.9	8.4	18.0	90.5	94.6	96.2	85.5
pVEC	1.9	2.4	5.0	11.3	98.4	101.4	95.9	95.7
OligoArg	1.9	3.7	38.6	274.1	93.4	90.6	93.9	94.8
MAP	2.1	2.5	7.1	32.4	88.8	99.1	85.8	64.4
MPG	3.5	5.4	11.2	23.4	99.2	99.7	100.3	99.7
Transportan	2.9	4.6	13.3	28.9	100.8	109.1	101.5	91.7
S4 ₁₃ -PV	3.0	9.4	36.1	41.0	94.3	95.5	85.2	55.4

^a HEK293T cells were treated with luciferin-CPPs at concentrations of 1.9, 5.6, 17, and 50 μ M at 37°C for 2 h. Total uptake from 3 to 60 min was calculated as ratio to luciferin uptake at 50 μ M. ^b Cytotoxicity is represented as percentage of viable cells compared with vehicle treatment. N. D., not determined.

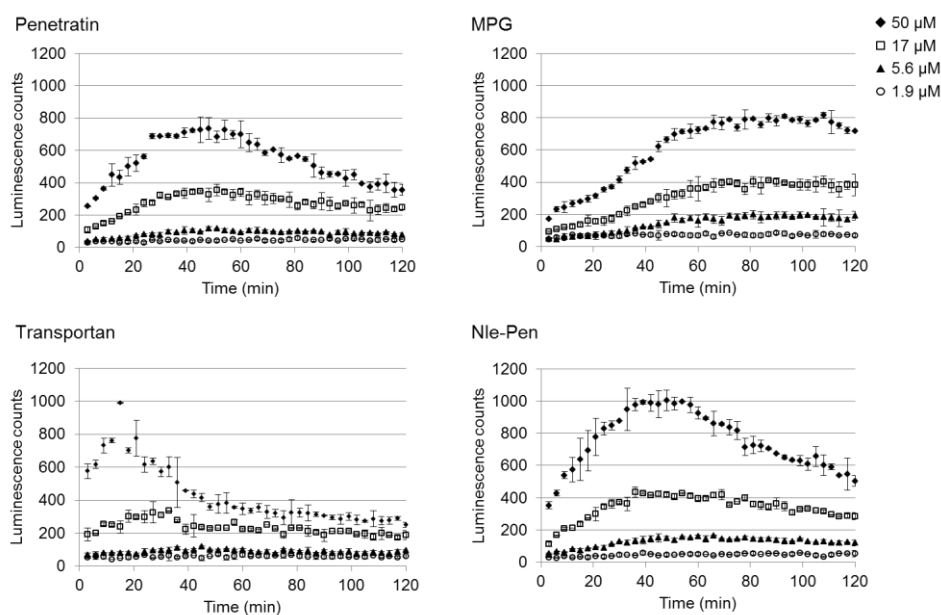


Figure 12. The uptake kinetic curves of four luciferin-CPPs with different T_{max} . Nle-Pen is a penetratin analog with norleucine (Nle) substitution at position 13.

ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系を用いて既知 CPP の膜透過性を比較することで、一律に膜透過性があると報告されているペプチドであっても、それぞれの膜透過性には大きな差があることが明らかとなった。細胞内取り込みの経時的な挙動について、penetratin や Nle-Pen、oligoArg といったカチオニックな CPP と比べ、両親媒性の MAP や transportan、S4₁₃-PV は素早く最大に達しており、両親媒性 CPP による直接透過の傾向が示唆された。エンドサイトーシス阻害薬や低温での実験により膜透過メカニズムを解析することで、今後こうした膜透過性の差異を説明できる可能性がある。ペプチド配列と膜透過性との関連性は見出せなかった。本研究では、膜透過性のみならず、合成上の観点からペプチドの鎖長も考慮し、Nle-Pen、oligoArg および S4₁₃-PV を DOCK2 阻害ペプチドとのコンジュゲーションに用いる CPP として選択した。

第 2 節 新規 CPP の探索

第 1 節において、ルシフェリンとルシフェラーゼの反応による化学発光を用いた膜透過性の比較により、CPP の優劣を判断することが可能となった。そこで、本評価系を用いて優れた CPP を新たに取得することを計画した。多くの CPP が毒素や抗菌ペプチド、ウイルスタンパク質といった天然物から発見されている。特にウイルスに由来する多様な機能性タンパク質は、膜透過や細胞小器官への集積などに重要な役割を担っており、こうしたタンパク質から新たな CPP が発見される可能性がある。本研究では、H1N8 型の A 型インフルエンザウイルスに由来するタンパク質である PB1-F2 に着目した。細胞内で発現した PB1-F2 は、C 端側のヘリカル構造を介してミトコンドリア内膜に集積することが知られて

いる⁴¹⁻⁴³。このヘリカル構造に相当する 70 位から 90 位の配列(Gly-Ser-Leu-Lys-Thr-Arg-Val-Leu-Lys-Arg-Trp-Lys-Leu-Phe-Asn-Lys-Gln-Glu-Trp-Thr-Asn)には、Lys や Arg といった塩基性アミノ酸および Leu や Val といった疎水性アミノ酸が多く含まれている。これは多くの CPP にみられる特徴と共通している。そのため、PB1-F2 の C 端側配列は細胞膜との親和性、さらには膜透過性を示す可能性があると考えた。

PB1-F2 の 70 位から 90 位の配列から、10 残基ずつの部分配列を含む 12 種類のペプチドを設計した(Table 4)。各部分配列の N 末端に Mpa を伸長して luciferin-linker を反応させ、ルシフェリン修飾体 PF1 から PF12 を合成した。これら 12 種のペプチド(1.9、5.6、17、50 μ M)で、ルシフェラーゼを発現した HEK293 細胞を処置し、膜透過性を評価した(Table 5)。75 位から 83 位のアミノ酸残基を含むペプチドが、他の配列と比較して高い膜透過性を示す傾向にあり、74 位から 83 位に相当する PF5 の膜透過性が最も高かった。疎水的かつ芳香族性を有する Trp や Phe はペプチドの脂質二重膜への挿入に寄与すると考えられている⁴⁴。PF5 および PF6 が塩基性残基と疎水性残基を多く有することは他の誘導体と同様であるが、ペプチド中央付近に Trp、C 端側に Phe が配置していることが膜透過性に奏功した可能性を考えた。細胞障害性については、PF2、PF3 および PF4 は濃度非依存的に細胞の生存率を 10–20%低下させたものの、他の誘導体に目立った障害性は観察されなかった。以上のことから、PF5 を新規 CPP とし、DOCK2 阻害ペプチドとのコンジュゲーションに利用することとした。

Table 4. Sequences of PB1-F2 C-terminal region and luciferin-modified fragments

Compound	Sequence	M.W.
PB1-F2(70–90) ^a	GSLKTRVLKRWKLFNKQEWNTN	–
PF1	Mpa(luc)-GSLKTRVLKR-NH ₂	1641.0
PF2	Mpa(luc)-SLKTRVLKRW-NH ₂	1770.2
PF3	Mpa(luc)-LKTRVLKRWK-NH ₂	1811.3
PF4	Mpa(luc)-KTRVLKRWKL-NH ₂	1811.3
PF5	Mpa(luc)-TRVLKRWKLF-NH ₂	1830.3
PF6	Mpa(luc)-RVLKRWKLFN-NH ₂	1843.3
PF7	Mpa(luc)-VLKRWKLFNK-NH ₂	1815.3
PF8	Mpa(luc)-LKRWKLFNKQ-NH ₂	1844.3
PF9	Mpa(luc)-KRWKLFNKQE-NH ₂	1860.2
PF10	Mpa(luc)-RWKLFNKQEW-NH ₂	1918.3
PF11	Mpa(luc)-WKLFNKQEWNTN-NH ₂	1863.2
PF12	Mpa(luc)-KLFNKQEWNTN-NH ₂	1791.1

^a This PB1-F2 originated from influenza A virus subtype H1N8. Mpa(luc), luciferin-modified 3-mercaptopropionic acid.

Table 5. Cellular uptake of PB1-F2 fragments

Compound	Cellular uptake (ratio to luciferin 50 μ M) ^a				Cytotoxicity (% viability) ^b			
	1.9 μ M	5.6 μ M	17 μ M	50 μ M	1.9 μ M	5.6 μ M	17 μ M	50 μ M
Luciferin	4.1	10.0	31.8	100.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
PF1	1.9	2.7	5.2	11.2	100.9	100.2	93.1	87.0
PF2	2.3	3.1	5.7	16.7	84.0	89.6	84.3	83.8
PF3	2.1	3.1	7.5	30.1	88.5	80.0	79.1	87.8
PF4	2.4	3.2	9.8	30.7	77.7	85.3	80.5	80.1
PF5	2.3	3.0	18.7	216.3	94.3	92.4	97.3	88.5
PF6	1.9	3.4	12.0	198.2	93.5	94.4	92.5	86.0
PF7	1.9	2.8	6.2	30.3	88.6	98.5	99.6	95.9
PF8	2.5	3.3	8.0	34.5	94.2	93.7	88.1	94.0
PF9	4.0	3.0	6.5	13.6	95.8	106.0	93.7	93.8
PF10	2.7	3.5	7.3	18.2	92.3	93.6	92.8	102.5
PF11	2.4	3.3	8.0	14.7	100.3	99.6	104.0	101.9
PF12	1.8	2.4	4.7	9.7	93.0	98.8	97.6	99.4

^a HEK293T cells were treated with luciferin-CPPs at concentrations of 1.9, 5.6, 17, and 50 μ M at 37°C for 2 h. Total uptake from 3 to 60 min was calculated as ratio to luciferin uptake at 50 μ M. ^b Cytotoxicity is represented as percentage of viable cells compared with vehicle treatment. N.D., not determined.

第3節 エンドソーム脱出を促進するための化学修飾

CPPによる膜透過メカニズムは十分には解明されていないものの、エネルギー非依存的な直接透過と、エネルギー依存的なエンドサイトーシスが関与し、場合によってはこれらの組合せであると考えられている^{45,46}。エンドサイトーシスの経路において、薬効分子の細胞質への送達にはエンドソームからの脱出が重要であり、エンドソーム内が酸性環境であることを利用してエンドソーム脱出を促進するアプローチが注目されている⁴⁷。例えば、側鎖にジエチレントリアミンが縮合したポリアスパラギン酸誘導体がトランスフェクション試薬として機能することが報告された⁴⁸。側鎖上のエチレンジアミン構造の pK_a は8.9と6.2であるため、pHが低下するにつれてモノカチオン、ジカチオンと順にプロトン化される(Figure 13)⁴⁹。エンドソームが成熟する過程でエンドソーム内のpHが低下し、ジプロトン化されたエチレンジアミン構造の割合が高まると(プロトンスポンジ効果)、エンドソームの浸透圧膨張が促進され、エンドソーム膜の破綻が引き起こされる。また、ポリカチオン性は細胞障害性の原因となりえるが、細胞外などの中性条件において、エチレンジアミン構造はモノプロトン化体であることから細胞障害性の低減が期待される。そこで、側鎖にジエチレントリアミンを縮合したグルタミン酸モノマーユニット(DA)を新規に設計し、CPPへ

の置換による膜透過性の改善を目指した。検討に用いる CPP には、エンドサイトーシスによる膜透過が示唆されている Tat ペプチド(Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro)を選択した⁵⁰。Tat ペプチドへの DA 導入には、Fmoc 基で保護したアミノ酸ユニット Fmoc-DA-OH (**5**)を合成して用いることとした。アミノ酸ユニットとして準備することで、ペプチド鎖中の任意の位置への DA 導入が可能であり、他のペプチドへの合成展開も容易となる。

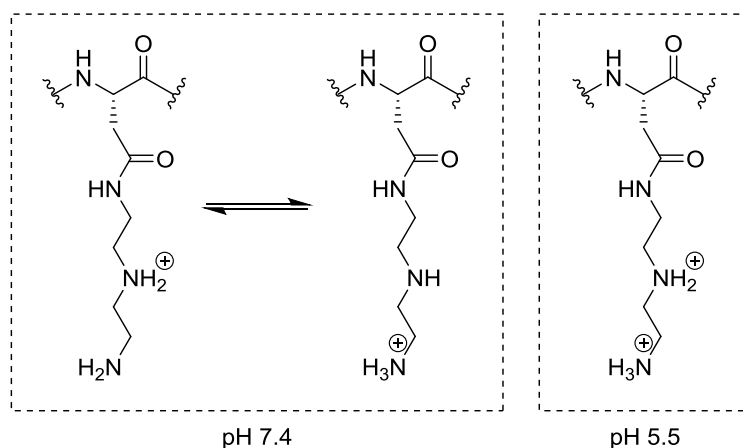
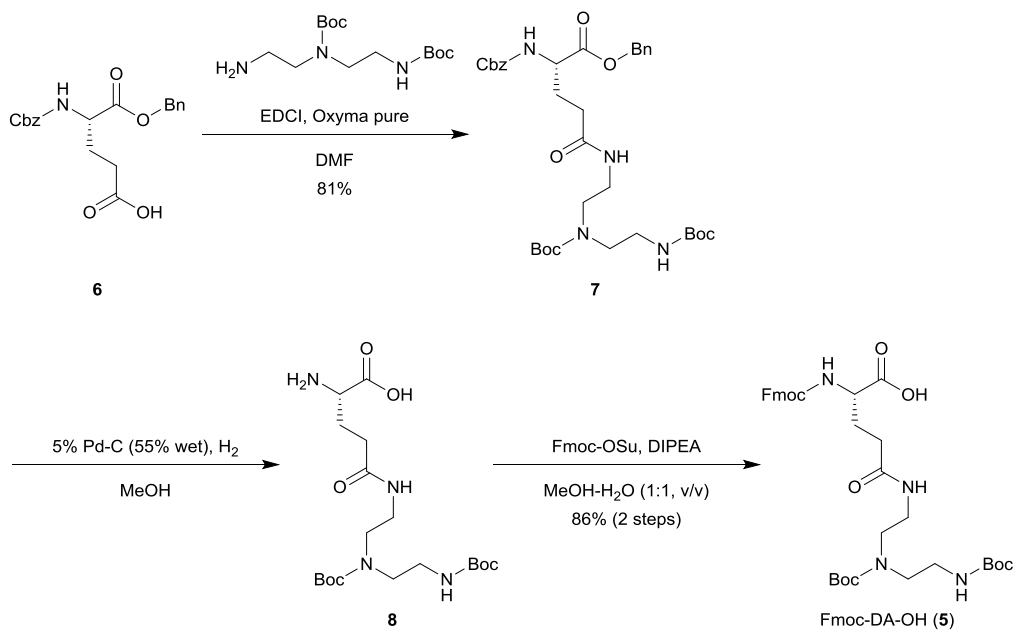


Figure 13. Major protonated structures of diethylenetriamine-conjugated polyaspartic acid at pH 7.4 and 5.5.



Scheme 1. Synthesis of a glutamic acid analog conjugated with diethylenetriamine (DA).

アミノ酸ユニット **5** は、*N*-carbobenzoxy-L-glutamic acid α -benzyl ester (**6**)を原料として合成した(Scheme 1)。1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDCI)および ethyl cyano(hydroxyimino)acetate (Oxyma pure®)の存在下、**6** と *N*¹,*N*⁴-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7-triazaheptane を縮合し **7** を得た。続いて、5% Pd-C を用いて benzyloxycarbonyl (Cbz)基および benzyl (Bn)基を選択的に除去した。得られた **7** を、*N*-(9-fluorenylmethoxycarbonyloxy)succinimide (Fmoc-OSu)と反応させ、目的とする **5** を、**6** から 3 ステップ、69%の収率で合成した。

Tat ペプチドの N 末側に Cys を伸長しルシフェリンで修飾したペプチド **9** (H-Cys(luc)-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-NH₂)を基本構造とし、DA で置換した誘導体 4 種(**10–13**)を設計した(Table 6)。ペプチド **10** は 2 つの Lys、ペプチド **11** は Lys と Arg に対してひとつおきの合計 4 箇所、ペプチド **12** は 6 つの Arg、ペプチド **13** は 2 つの Lys および 6 つの Arg について、DA で置換した。これらのペプチドの中性条件(pH 7.4)および酸性条件(pH 5.5)における正味の電荷を計算し、いずれのペプチドも中性条件では+9 程度の電荷であるが、酸性条件においては DA 残基の数が増えるにつれて荷電数が増大することがわかった。すなわち、生理的条件と比べて、エンドソーム内での酸性条件においてより多くのアミノ基がプロトン化される。

ルシフェラーゼを発現した HEK293 細胞を、合成した Tat ペプチド誘導体(**6.3**、**13**、**25**、**50** μ M)で処理し、膜透過性を評価した。発光強度を経時的にプロットすると、**9** の強度は横ばいであったのに対し、DA で置換した誘導体はいずれも 10 分後に最大となり素早く取り込まれた(Figure 14)。また、10 分後での発光強度は、DA 残基の数が多いほど強い傾向にあった。3 分から 21 分までの曲線下面積を、陽性対照であるルシフェリン(**50** μ M)を 100%として比率計算すると、**9** と比べて、**12** および **13** の細胞内取り込み量は増大していた(Table 7)。また、いずれのペプチドについても細胞障害性はみられなかった。

Table 6. Sequences and estimated net charges of DA-substituted Tat peptides

Compound	Sequence	Number of DAs	Estimated net charge ^a	
			pH 7.4	pH 5.5
9	H-C(luc)GRKKRRQRRRPP-NH ₂	0	9.0	9.0
10	H-C(luc)GRXXRRQRRRPP-NH ₂	2	9.1	10.7
11	H-C(luc)GXKXRQXRPP-NH ₂	4	9.1	12.3
12	H-C(luc)GXKXXXQXXXPP-NH ₂	6	9.2	14.0
13	H-C(luc)GXXXXXQXXXPP-NH ₂	8	9.2	15.6

^a Net charge was calculated using the following p*K*_a values⁴⁸ for the DA unit: p*K*_{a1} = 8.9 and p*K*_{a2} = 6.2. X represents DA unit.

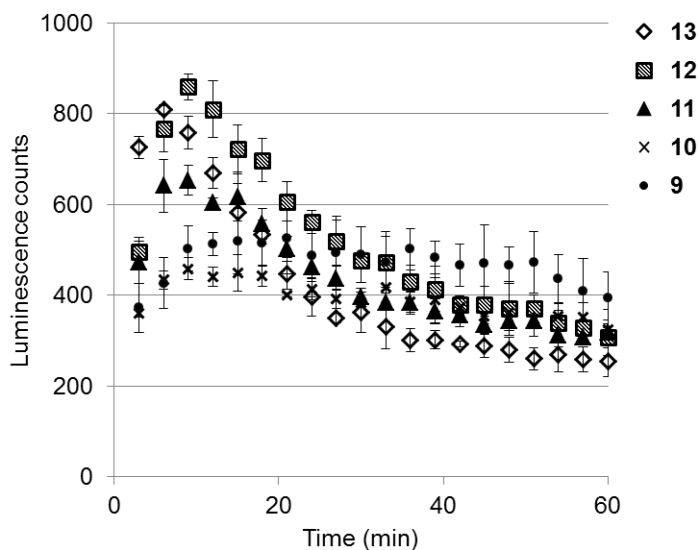


Figure 14. The uptake kinetic curves of DA-substituted Tat peptides.

Table 7. Cellular uptake of DA-substituted Tat peptides

Compound	Cellular uptake (ratio to luciferin 50 μ M) ^a				Cytotoxicity (% viability) ^b			
	6.2 μ M	13 μ M	25 μ M	50 μ M	6.2 μ M	13 μ M	25 μ M	50 μ M
Luciferin	13.7	27.5	49.5	100.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
9	3.3	7.0	11.8	22.3	102.3	108.6	104.5	104.7
10	3.0	5.6	9.9	19.9	125.8	108.8	108.2	115.2
11	3.9	8.3	11.7	27.2	94.8	97.2	91.6	96.8
12	5.4	10.8	16.9	33.7	95.4	100.8	104.7	95.2
13	4.1	7.9	13.3	30.1	122.3	118.3	112.7	111.1

^a HEK293T cells were treated with luciferin-CPPs at concentrations of 6.2, 13, 25, and 50 μ M at 37°C for 1 h. Total uptake from 3 to 21 min was calculated as ratio to luciferin uptake at 50 μ M. ^b Cytotoxicity is represented as percentage of viable cells compared with vehicle treatment. N.D., not determined.

Table 8. Sequences of FITC-labeled DA-substituted Tat peptides

Compound	Sequence	Number of DAs	Estimated net charge ^a	
			pH 7.4	pH 5.5
14	H-C(FITC)GRKKRRQRRRPP-NH ₂	0	9.0	9.0
15	H-C(FITC)GXXXXXQXXXXPP-NH ₂	8	9.2	15.6

^a Net charge was calculated using the following pK_a values⁴⁸ for the DA unit: pK_{a1} = 8.9 and pK_{a2} = 6.2. X represents DA unit.

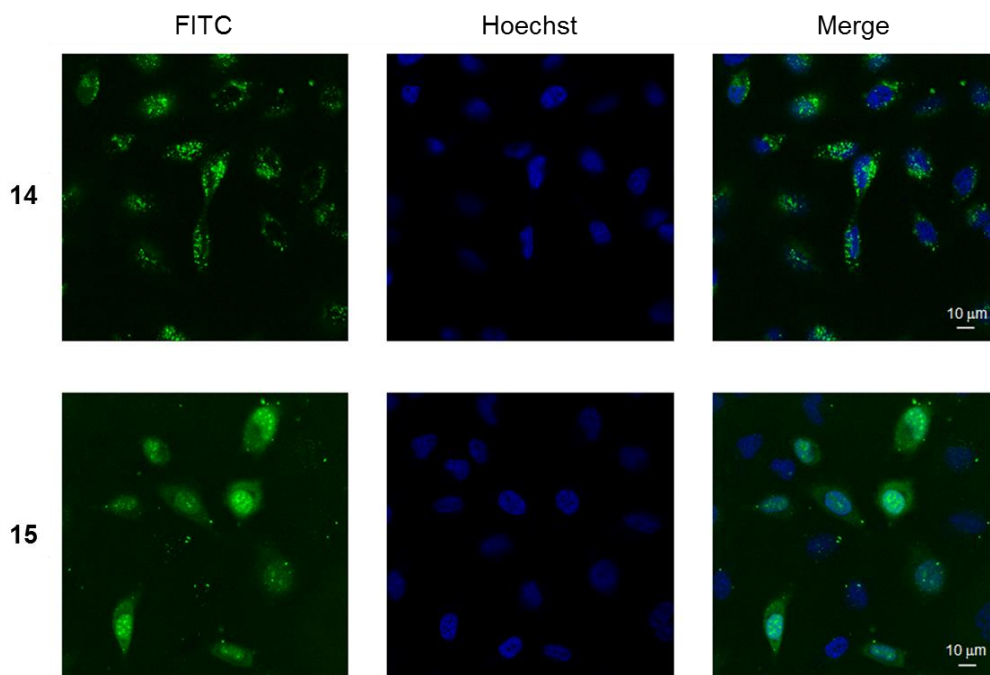


Figure 15. Cellular uptake of FITC-labeled DA-substituted Tat peptides.

エンドソームからの脱出が促進していることを確認するために、**9** および **13** について、蛍光色素修飾体 **14** および **15** を合成し、細胞質への拡散を評価した (Table 8)。蛍光標識ペプチド (50 μM) で 30 分間処理した HeLa 細胞を、共焦点顕微鏡で観察した (Figure 15)。DA で置換していない **14** では細胞内にドット状の蛍光がみられ、ペプチドがエンドソーム内にトラップされていると示唆された。一方で、DA で置換した **15** では蛍光色素が細胞質内に広がっていた。このことから、側鎖上にエチレンジアミン構造を有するグルタミン酸誘導体 DA で Tat ペプチドのアミノ酸残基を置換することで、エンドソームからの脱出が促進され、細胞質への移行が改善したと考えられる。しかしながら、膜透過性の改善効果は限定的であり、薬効分子とのコンジュゲーションに利用するには、更なる検討が必要である。

第4節 小括

中分子化合物の膜透過性を改善する手段の一つとして CPP の利用が考えられる。しかしながら、単一の評価系で複数の CPP の膜透過性を比較検討した研究は少ないため、コンジュゲーションに用いる CPP の選択基準は明確ではない。そこで、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系において膜透過性を比較し、優れた膜透過性を示す CPP を DOCK2 阻害ペプチドとのコンジュゲーションに用いることとした。13 種類の既知 CPP を評価したところ、一律に膜透過性があると報告されているペプチドであっても、本評価系においては膜透過性に優劣があることが明らかとなり、oligoArg、Nle-Pen および S4₁₃-PV の膜透過性は他の CPP よりも高かった。また、新規 CPP の発見を目指し、A 型インフルエ

ンザウイルス由来のタンパク質である PB1-F2 に着目した。ミトコンドリア内膜への集積に寄与している C 端側配列について、部分配列を含むペプチドを合成、評価したところ、74-83 位に相当する PF5 が高い膜透過性を示した。さらに、エンドサイトーシスにより取り込まれる CPP の細胞質への到達を向上するために、ペプチドの化学修飾によるエンドソーム脱出の促進を検討した。プロトンスポンジ効果によるエンドソームの破綻を意図し、エチレンジアミン構造を側鎖に導入したグルタミン酸誘導体(DA)を設計、合成した。Tat ペプチドの Arg および Lys を DA に置換することで、すばやく膜を透過するようになり、細胞内への取り込み量は増大したが、効果は限定的であった。以上の結果から、優れた膜透過性が確認された oligoArg、Nle-Pen、S4₁₃-PV および PF5 を DOCK2 阻害ペプチド **4** とのコンジュゲーションに用いることで、膜透過性の改善および薬理活性の増強、またそれらの相関を検討できると考えられた。

第4章 CPP コンジュゲーションによる DOCK2 阻害ペプチドの細胞遊走阻害活性の向上

第1節 コンジュゲートの細胞遊走阻害活性の評価

第2章で見出した新規 DOCK2 阻害ペプチド **4** の膜透過性を改善し、細胞遊走の阻害活性を向上するために、第3章で選抜した4種類の CPP (oligoArg、Nle-Pen、S4₁₃-PV、PF5) とのコンジュゲーションを検討することとした。

4 の C 末端に CPP を伸長した4種類のコンジュゲート(**16-19**)について、DOCK2-Rac1 の PPI 阻害活性を ELISA で評価したところ、oligoArg とのコンジュゲート **16** の IC₅₀ 値は 8.0 nM と、**4** と同程度の活性を示した(Table 9)。他のコンジュゲート3種では活性が減弱し、**17** は 95 nM、**18** は 71 nM、**19** は 32 nM の IC₅₀ 値であった。続いて、0.37、1.1、3.3、10 μM の濃度のコンジュゲートで MINO 細胞を処理し、細胞遊走の阻害活性を評価した(Figure 16)。**4** は、10 μM で遊走を阻害したものの、3.3 μM 以下では活性を示さなかった。**16** および **19** では、3.3 μM において細胞遊走が 89%以上阻害され、CPP とのコンジュゲーションにより活性が約3倍増強していた。**19** の無細胞系での PPI 阻害活性は **16** よりも弱いことから、PF5 による膜透過性の改善は oligoArg よりも大きいと示唆された。**17** および **18** は、10 μM では完全に、3.3 μM では約60%程度の細胞遊走を阻害し、1.1 μM においても弱い阻害活性が観察された。他のコンジュゲートと活性発現の挙動が異なることは、膜透過メカニズムの差異に起因する可能性がある。また、細胞遊走は様々な細胞プロセスと関連しており、オフターゲット由来の作用が影響していることも考えられた。一方で、CPP の膜透過性とコンジュゲートの遊走阻害活性では、これらの強弱が類似した傾向を示しているため、DOCK2 阻害による細胞遊走の阻害が支配的であると示唆された。

Table 9. Sequences and inhibitory activities of CPP-conjugated DOCK2-inhibitory peptides

Compound	CPP	CPP sequence	M.W.	Inhibitory activity, DTT(+), IC ₅₀ (nM)
4	None	–	1834.1	4.7
16	OligoArg	RRRRR	2615.1	8.0
17	Nle-Pen	RQIKIWFQNRR-Nle-KWKK	4044.8	95
18	S4 ₁₃ -PV	ALWKTLLKKVLKAPKKRKY	4193.2	71
19	PF5	TRVLKRWKLF	3162.8	32

Nle, norleucine.

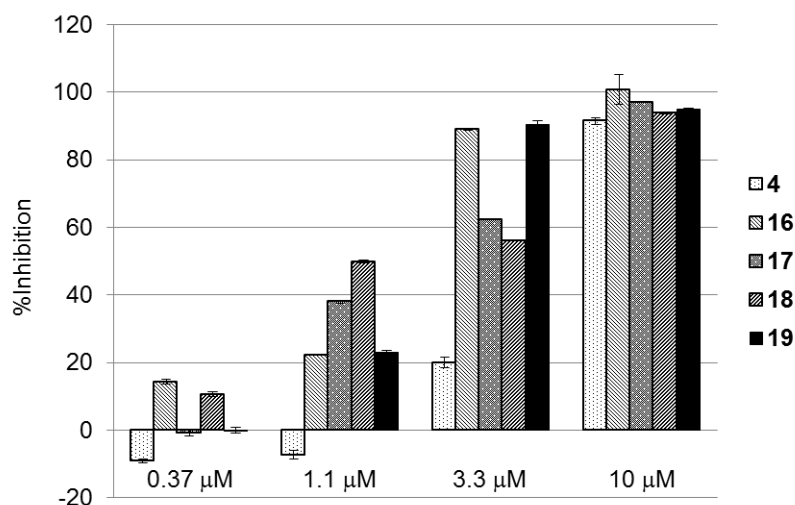
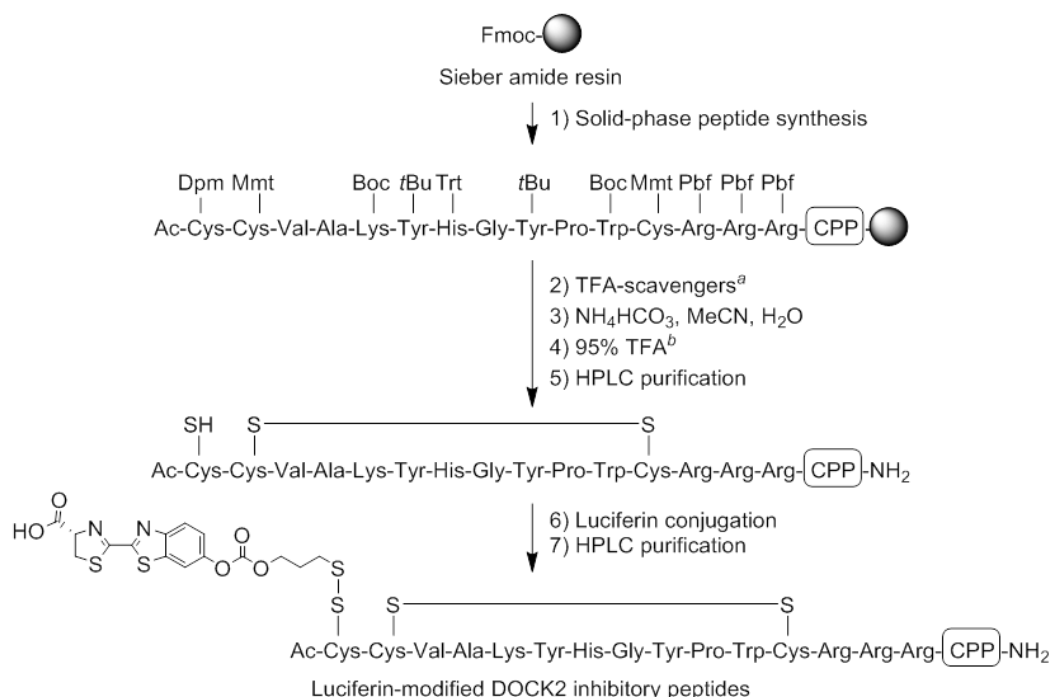


Figure 16. Cell migration inhibitory activity of CPP-conjugated DOCK2-inhibitory peptides.

第2節 コンジュゲートの膜透過性評価

CPP とのコンジュゲーションによって薬理活性が増強した **16** および **19** の膜透過性について、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系を用いて **4** と比較することとした。評価に用いるためのルシフェリン修飾体は Scheme 2 のように設計、合成した。リードペプチドである **4** はジスルフィド結合により環構造を形成しているため、ルシフェリンを導入するために N 末に Cys を伸長する際は、3 つの Cys 残基の側鎖スルフヒドリル基の保護基を工夫する必要があった。Diphenylmethyl (Dpm)基は酸に対する安定性が高く、2.5% (v/v)の triisopropyl silane (TIS)存在下、60%以上の trifluoroacetic acid (TFA)により除去される⁵¹。一方で、4-methoxytrityl (Mmt)基は酸への感受性が高く、1%の TFA でも脱保護される。そこで、Fmoc 固相合成において、1 位に Cys(Dpm)、2 位および 12 位に Cys(Mmt)を導入した。ペプチド樹脂に TFA-scavengers (TFA/*m*-cresol/thioanisole/H₂O/TIS/1,2-ethanedithiol = 80/5/5/5/2.5/2.5)を加えて室温で 20 分間処理し、Mmt 基、Boc 基、*t*Bu 基および Trt 基を完全に除去した。このとき、Dpm 基は維持され、Pbf 基は一部が脱保護された。得られた直鎖ペプチドの 2 位および 12 位の Cys 側鎖間でジスルフィド結合を構築した後、95% TFA (TFA/TIS/H₂O = 95/2.5/2.5)で処理し、遊離のスルフヒドリル基を有する環状ペプチドを取得した。Luciferin-linker と反応させ、**4**、**16**、**19** のルシフェリン修飾体 **20**、**21**、**22** を合成した。

ルシフェラーゼを発現した HEK293 細胞を、3 種類のルシフェリン修飾 DOCK2 阻害ペプチド(6.3、13、25、50 μM)で処理した (Table 10)。**20** と比べて、**21** および **22** の細胞内取り込み量は多く、CPP コンジュゲーションによる膜透過性の改善が示唆された。また、**21** は 50 μM において **22** よりも強い細胞障害性を示した。このことから、DOCK2 阻害ペプチド **4** の膜透過性を向上するという点においては、広く知られている oligoArg と同等もしくはそれ以上に PF5 は有用な CPP といえる。



Scheme 2. Synthesis of luciferin-modified DOCK2-inhibitory peptides. ^a TFA scavengers, TFA/*m*-cresol/thioanisole/H₂O/triisopropylsilane/1,2-ethanedithiol = 80/5/5/2.5/2.5. ^b 95% TFA, TFA/triisopropylsilane/H₂O = 95/2.5/2.5. Dpm, diphenylmethyl; Mmt, 4-methoxytrityl. CPP sequences: **20**, none; **21**, RRRRR; **22**, TRVLKRWKLF.

Table 10. Cellular uptake of CPP-conjugated DOCK2-inhibitory peptides

Compound	Cellular uptake (ratio to luciferin 50 μM) ^a				Cytotoxicity (% viability) ^b			
	6.2 μM	13 μM	25 μM	50 μM	6.2 μM	13 μM	25 μM	50 μM
Luciferin	17.9	29.7	55.9	100.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
20	5.8	8.7	14.5	22.8	104.8	112.3	114.8	126.4
21	6.2	10.6	22.3	61.0	108.0	104.4	99.7	71.7
22	11.6	21.3	36.1	66.8	99.1	107.5	97.1	85.9

^a HEK293T cells were treated with luciferin-CPPs at concentrations of 6.2, 13, 25, and 50 μM at 37°C for 2 h. Total uptake from 3 to 60 min was calculated as ratio to luciferin uptake at 50 μM. ^b Cytotoxicity is represented as percentage of viable cells compared with vehicle treatment. N.D., not determined.

第3節 小括

DOCK2 阻害ペプチド **4** の C 末側に oligoArg もしくは PF5 をコンジュゲーションした誘導体 **16**、**19** は、3.3 μM の濃度において MINO 細胞の遊走を 89% 以上阻害し、**4** と比較して活性は約 3 倍増強した。ついで、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた系に

て膜透過性を評価するため、**4**、**16** および **19** のルシフェリン修飾体 **20**、**21**、**22** を合成した。
50 μM の濃度における **21** および **22** の細胞内への取り込み量は、**4** の約3倍であった。このことから、**16** および **19** の細胞遊走阻害活性の増強は、CPP コンジュゲーションにより膜透過性が改善したことに起因すると示唆された。また、oligoArg と PF5 を比較すると、**16** および **19** の細胞系での活性は同等である一方で、ELISA による **19** の PPI 阻害活性は **16** よりも4倍弱く、膜透過性の評価時に **21** では高濃度での細胞障害性が確認された。ペプチド **4** の膜透過性を改善するという点においては、PF5 は oligoArg と同等以上に有用と考えられた。

第5章 構造変換による DOCK2 阻害ペプチドの細胞遊走阻害活性の向上

第1節 N-メチルアミノ酸の利用

DOCK2 阻害活性をさらに向上するため、CPP コンジュゲーションとは異なる手段での膜透過性の向上を目指した。N-メチルアミノ酸の導入は脂溶性を増大し、膜透過性が向上する可能性がある^{52,53}。そこで、DOCK2 阻害ペプチド **4** の環構造を形成している 3 位 Ala、5 位 Tyr、6 位 His、7 位 Gly、8 位 Tyr もしくは 10 位 Trp を、N-メチルアミノ酸に置換した誘導体(**23–28**)を合成した。これら誘導体 6 種類の PPI 阻害活性を ELISA で評価すると、N-MeTyr⁵ 体 **24**、N-MeGly⁷ 体 **26**、N-MeTyr⁸ 体 **27**、N-MeTrp¹⁰ 体 **28** では活性が消失し、N-MeAla³ 体 **23** および N-MeHis⁶ 体 **25** の IC₅₀ 値はそれぞれ 65 nM、260 nM と大幅に減弱した(Table 11)。N-メチル化によるペプチド主鎖のコンフォメーション変化は、DOCK2 との親和性に不適であり、2 位から 10 位の配列による立体構造が DOCK2 に厳密に認識されていることが示唆された。

第2節 ジスルフィド結合の変換

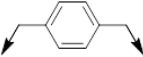
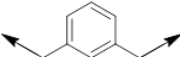
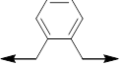
ジスルフィド結合により環構造を形成している DOCK2 阻害ペプチド **3** および **4** の PPI 阻害活性は、非還元的条件の場合と比べ、還元的条件において弱いことから、DOCK2 との親和性には環構造が重要と考えられる。また、ヒトおよび動物への投与の観点では、ジスルフィド結合は代謝安定性に劣るため、変換することが望ましい。そこで、ジスルフィド結合の代替として、ペプチド内の 2 つのスルフヒドリル基に対して α, α' -dibromoxylene を反応させて架橋することを検討した。このとき、2 つの硫黄原子間の距離を変化させるために、*p*-、*m*-および *o*-xylene の異性体を用いた。DOCK2 阻害ペプチド **3** に対して、*p*-xylene 架橋体 **29**、*m*-xylene 架橋体 **30**、*o*-xylene 架橋体 **31** を合成し、PPI 阻害活性を ELISA にて評価したところ、IC₅₀ 値はそれぞれ 100 nM、19 nM、6.7 nM であった(Table 12)。硫黄原子間の距離が最も短い **31** では活性が維持され、長くなるにつれて減弱した。また、N-メチルアミノ酸での置換を検討した環構造内のアミノ酸配列とは異なり、ジスルフィド結合を構築している部位においては、xylene 程度の大きさの分子が導入されても活性には大きく影響しないことがわかった。このように、DOCK2 阻害ペプチドのジスルフィド結合を *o*-xylene による架橋に変換することは許容された。

Table 11. Inhibitory activities of DOCK2-inhibitory peptides substituted with N-methyl amino acid
$$\text{S} \text{---} \text{Ac-Cys-Val-Ala}^3\text{-Lys-Tyr}^5\text{-His}^6\text{-Gly}^7\text{-Tyr}^8\text{-Pro-Trp}^{10}\text{-Cys-Arg-Arg-Arg-NH}_2 \text{---} \text{S}$$

Compound	Substitution	Inhibitory activity, DTT(+), IC ₅₀ (nM)
4	None	4.7
23	N-MeAla ³	65
24	N-MeTyr ⁵	N.D.
25	N-MeHis ⁶	260
26	N-MeGly ⁷	N.D.
27	N-MeTyr ⁸	N.D.
28	N-MeTrp ¹⁰	N.D.

Table 12. Inhibitory activities of DOCK2-inhibitory peptides with xylene bridging
$$\text{S} \text{---} \text{Ac-Leu-Asn-Arg-Cys-Val-Ala-Lys-Tyr-His-Gly-Tyr-Pro-Trp-Cys-Arg-Arg-Arg-NH}_2 \text{---} \text{S}$$

Bridge

Compound	Bridge type	Bridge structure	Inhibitory activity, DTT(+), IC ₅₀ (nM)
3	None		6.0
29	<i>p</i> -Xylene		100
30	<i>m</i> -Xylene		19
31	<i>o</i> -Xylene		6.7

第3節 Arg および Trp によるアミノ酸置換

多くの CPP に共通する特徴として、アミノ酸配列に Arg および Trp が頻出することがあげられる。Arg は細胞膜を構成するリン脂質のリン酸部位と強く結合し、細胞膜上への集積や膜透過に寄与している⁵⁴。Trp はグリコサミノグリカンの硫酸基と疎水性相互作用やπ-アニオン相互作用を介して結合し、ペプチドの脂質二重膜への挿入を促進すると考えられている⁴⁴。そこで、DOCK2 阻害ペプチド **4** の配列について、Arg もしくは Trp の割合の増大により、膜透過性を改善することを目指した。第 2 章のランダムスクリーニングにおいて取得した共通モチーフ (Val/Leu/Trp-Ala-Lys/Arg/Leu-Tyr/Phe/Trp-His/Met-Gly-Xaa-Xaa-Trp) を参考とし、**4** の 2 位 Val を Trp に、4 位 Lys を Arg に置換できる可能性があると考えた。実際に置換体 **32** を合成し、PPI 阻害活性を ELISA にて評価したところ、IC₅₀ 値は 2.6 nM と維持された (Table 13)。また、MINO 細胞に対する遊走阻害活性も **4** と同等であった (data not shown)。2 位 Trp および 4 位 Arg への置換は、PPI 阻害活性に影響しなかったものの、期待

に反して膜透過性は改善されなかった。

第4節 構造変換と CPP コンジュゲーションの組合せ

4 の 2 位 Trp、4 位 Arg 置換体 **32** では PPI 活性は維持されたことから、**32** に対する CPP コンジュゲーションおよび *o*-xylene 架橋により、膜透過性および細胞遊走の阻害活性を改善することを目指した。

32 の N 末および C 末の両端に Arg を 4 残基ずつ配した **33**、さらに *o*-xylene により架橋した誘導体 **34** を設計、合成した。これら誘導体 2 種の PPI 阻害活性を ELISA にて評価したところ、それぞれ 4.1 nM および 5.4 nM の IC₅₀ 値を示した (Table 14)。**32** の両端への Arg 伸長および *o*-xylene 架橋は、DOCK2 阻害作用に対して許容された。ついで、細胞系の活性を評価した。**33** および **34** は 0.37 μM において約 80% の阻害活性を示し、リードペプチド **4** と比較すると、活性はおおよそ 30 倍増強した (Figure 17)。OligoArg 修飾および *o*-xylene 架橋による膜透過性の改善を確認するため、**34** のルシフェリン修飾体 **35** を合成し膜透過性を評価した。**35** の膜透過能は陽性対照であるルシフェリンと同程度であり、構造変換および CPP コンジュゲーションによる膜透過性の改善が示唆された (Table 15)。

Table 13. Sequences and inhibitory activities of DOCK2-inhibitory peptides substituted with arginine (Arg) and tryptophan (Trp)

$\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \text{S} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Ac-Cys-AA}^2\text{-Ala-AA}^4\text{-Tyr-His-Gly-Tyr-Pro-Trp-Cys-Arg-Arg-Arg-NH}_2 \end{array}$			
Compound	AA ²	AA ⁴	Inhibitory activity, DTT(+), IC ₅₀ (nM)
4	Val	Lys	4.7
32	Trp	Arg	2.6

Table 14. Sequences and inhibitory activities of DOCK2-inhibitory peptides

$\begin{array}{c} \text{S} \text{-----} \boxed{\text{Bridge}} \text{-----} \text{S} \\ \qquad \qquad \qquad \\ \text{Ac-(R}^1\text{)-Cys-Trp-Ala-Arg-Tyr-His-Gly-Tyr-Pro-Trp-Cys-Arg-Arg-Arg-(R}^2\text{)-NH}_2 \end{array}$				
Compound	Bridge type	R ¹	R ²	Inhibitory activity, DTT(+), IC ₅₀ (nM)
32	Disulfide	–	–	2.6
33	Disulfide	RRRR	R	4.1
34	<i>o</i> -Xylene	RRRR	R	5.4

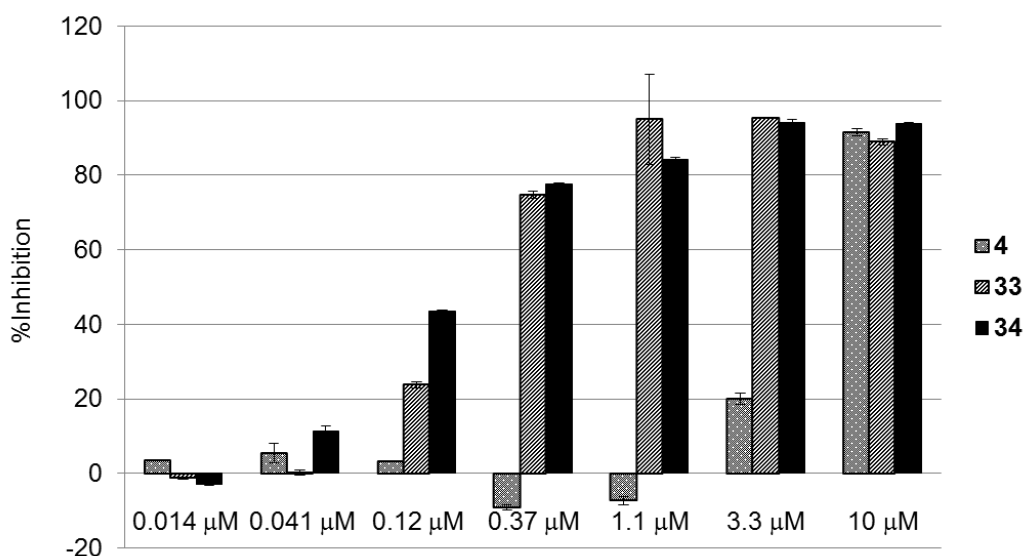


Figure 17. Cell migration inhibitory activity of CPP-conjugated DOCK2-inhibitory peptides.

Table 15. Cellular uptake of DOCK2-inhibitory peptides conjugated with CPP

Compound	Cellular uptake (ratio to luciferin 50 μM) ^a				Cytotoxicity (% viability) ^b			
	6.2 μM	13 μM	25 μM	50 μM	6.2 μM	13 μM	25 μM	50 μM
Luciferin	17.9	29.7	55.9	100.0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
35	13.3	21.3	66.2	143.4	97.3	102.9	101.9	97.9

^a HEK293T cells were treated with luciferin-CPPs at concentrations of 6.2, 13, 25, and 50 μM at 37°C for 2 h. Total uptake from 3 to 60 min was calculated as ratio to luciferin uptake at 50 μM. ^b Cytotoxicity is represented as percentage of viable cells compared with vehicle treatment. N.D., not determined.

第5節 小括

CPP コンジュゲーション以外の手法による膜透過性の改善を目指し、DOCK2 阻害ペプチドへの N-メチルアミノ酸置換、ジスルフィド結合の変換、Arg および Trp によるアミノ酸置換を検討した。4 の環構造を形成するアミノ酸に対する N-メチル化では、PPI 阻害活性は大きく減弱し、DOCK2 は環構造を厳密に認識していることが示唆された。DOCK2 の阻害には直鎖ペプチドよりも環状ペプチドが有利と考えられ、ジスルフィド結合を還元条件に安定な構造へと変換することを検討した。このとき、疎水的な構造の導入により、環状構造の安定性と膜透過性の両方の改善を期待した。2つの Cys 残基の側鎖部分を xylene により架橋したところ、二つの硫黄原子間の距離がもっとも短くなる *o*-xylene 架橋体 31 で PPI 阻害活性が維持された。また、多くの CPP に Arg や Trp が含まれるため、DOCK2 阻害ペプチド中の Arg および Trp 残基数を増やすことで、膜透過性を改善できないか検討した。4 の 2 位を Trp、4 位を Arg で置換した 32 の PPI 阻害活性は維持されたものの、細胞系での活性に

変化はなかった。PPI 阻害活性が維持された **32** について、oligoArg を両端に分割して配置した **33**、およびさらに *o*-xylene で架橋した **34** はともに、リードペプチド **4** と比較して約 30 倍強力に細胞遊走を阻害した。さらに、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系において、**35** の膜透過性は陽性対照であるルシフェリンと同程度であった。このことから、**34** の強力な細胞遊走阻害活性は、CPP コンジュゲーションおよび *o*-xylene 架橋により膜透過性が改善したことに起因すると示唆された。

第6章 結語

細胞内 PPI の阻害薬は、新たな治療手段として期待されている。ペプチドは、低分子化合物と比べ、広い面で標的タンパク質と作用することができるため、PPI 阻害に適すると考えられる。しかしながら、多くの場合、細胞膜を透過しない点が課題となっている。CPP を用いた薬理活性の改善例は多く報告されているものの、膜透過性は必ずしも評価されていない。そのため、薬理活性と膜透過性との相関を取得して化合物を最適化する研究手法の構築は、細胞内を標的としたペプチドあるいは中分子の PPI 阻害薬を指向した創薬研究の発展に貢献できると考えた。

中分子化合物が低分子化合物よりも優れた PPI 阻害活性を示すと仮説を立て、DOCK2 阻害ペプチドの取得を目指してファージディスプレイスクリーニングを行った。T7 ファージを用いて、Rac1 と競合して DOCK2 に親和性を示すペプチドのランダムスクリーニングを検討した結果、DOCK1 に対して選択性を有する DOCK2 阻害ペプチド **4** を見出した。**4** は、DOCK2-Rac1 の PPI を 4.7 nM の IC₅₀ 値で阻害し、10 μM の濃度では MINO 細胞の遊走を完全に抑制した。低分子 DOCK2 阻害薬である CPYPP と比べて優れた活性および選択性を示し、PPI の阻害には作用面積の大きい化合物が有利であると示唆された。一方、**4** は 3.3 μM 以下の濃度では細胞遊走を阻害せず、膜透過性が低いと考えられたため、CPP によるコンジュゲーションを検討することとした。

リードペプチド **4** への CPP コンジュゲーションに先立ち、ルシフェリンとルシフェラーゼとの反応に基づいた評価系を用い、CPP の膜透過性を比較した。13 種類の既知 CPP を評価したところ、一律に膜透過性があると報告されているペプチドであっても、その膜透過性には優劣があった。OligoArg、Nle-Pen および S4₁₃-PV が、他の CPP と比較して良好な膜透過性を示した。また、新規 CPP の探索として、A 型インフルエンザウイルスタンパク質 PB1-F2 に着目し、C 端側ヘリカル構造の部分配列を含むペプチドを評価した。その結果、74 位から 83 位に相当する断片ペプチド(PF5)が最も高い膜透過性を示した。

次いで、良好な膜透過性を示した CPP を **4** とコンジュゲーションし、膜透過性および細胞遊走阻害活性の増強を目指した。OligoArg および PF5 とのコンジュゲートでは、活性が約 3 倍増強し、膜透過性も改善した。さらに DOCK2 阻害ペプチドの構造変換を検討し、ペプチドの両端に oligoArg を分割して配置し、*o*-xylene リンカーで架橋した誘導体が、リードペプチド **4** と比較して、約 30 倍強い遊走阻害活性を示し、膜透過性の向上とも相関していた。一般的に CPP は細胞選択性を示さないと考えられており、CPP コンジュゲートを動物に投与するためには、標的細胞を認識する分子での修飾など工夫が必要である。しかしながら、血液中のリンパ球を標的とする DOCK2 阻害薬では、特定の臓器を標的とする場合と比べて、効率良く目的の細胞に作用できる可能性がある。今後は、標的指向性も考慮した合成検討が肝要といえる。

以上のように、PPI 阻害ペプチドの細胞内標的由来の薬理作用と、細胞質への到達との相関を明確にした効果的な研究手法を提示できた。ペプチドにとって細胞膜の透過は重大な課題であり、こうした研究手法は、PPI を阻害するペプチド医薬品の創製に大きく貢献できると考えられる。

謝辞

本研究の機会を与えて下さいました、武田薬品工業株式会社 チーフメディカル&サイエンティフィックオフィサー アンドリューS・プランプ博士、元化学研究所長 一川隆史博士、元化学研究所長 内川治博士に感謝いたします。

本研究は終始、元化学研究所リサーチマネージャー 長展生博士および元化学研究所主席研究員 浅見泰司博士のご指導のもとで行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

化合物の合成や分子設計において多大なご協力と有益なご助言を頂きました元化学研究所主席研究員 竈浦政宏博士、元化学研究所主任研究員 梅本忠士博士、元化学研究所主任研究員 安達万里氏、元化学研究所主任研究員 西澤直城氏、元化学研究所主任研究員 新居田歩博士、元化学研究所主任研究員 佐々木茂和博士、元化学研究所 兼松陽子氏に感謝いたします。

化合物の生理活性や物性をご評価いただきました元生物分子研究所主席研究員 谷昭義氏、元生物分子研究所主席研究員 坂本潤一氏、元生物分子研究所主任研究員 坂元孝太郎博士、元生物分子研究所主任研究員 角谷亮人博士、元生物分子研究所主任研究員 鎌田祐輔氏、元生物分子研究所主任研究員 小山亮吉氏、元免疫ユニット主任研究員 小茂池勇作氏、元基盤技術研究所主任研究員 福田保則氏に感謝いたします。

本研究の CRO マネジメントをご担当頂きました元化学研究所主任研究員 得能僚資博士に感謝いたします。

本研究に関して有益なご助言をいただきました元基盤技術研究所主席研究員 川俣裕二博士、元基盤技術研究所主任研究員 宮田健一博士、元基盤技術研究所主任研究員 寺谷実佳氏、元基盤技術研究所主任研究員 松本悟博士、元基盤技術研究所 落合留美子博士、元基盤技術研究所 中尾勝一氏、元循環代謝創薬ユニット主席研究員 北崎智幸博士、元循環代謝創薬ユニット主任研究員 西川洋一博士、元生物分子研究所 佐々木雅子氏、元免疫ユニット 村井愛子氏、元薬物動態研究所主任研究員 中仮屋匡紀氏、元薬物動態研究所 福士千春氏に感謝いたします。

本論文の執筆に際し、名古屋市立大学大学院薬学研究科 中川秀彦教授には終始懇篤なご指導、ご高配を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、本論文の作成にあたり、有益なご助言を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科 尾関哲也教授、梅澤直樹准教授、佐藤匡史准教授、武田薬品工業株式会社 元循環代謝創薬ユニット主任研究員 井川英之博士に深く感謝いたします。

最後に、本論文作成に際して終始あたたかく応援していただいた家族に深く感謝いたします。

Experimental sections

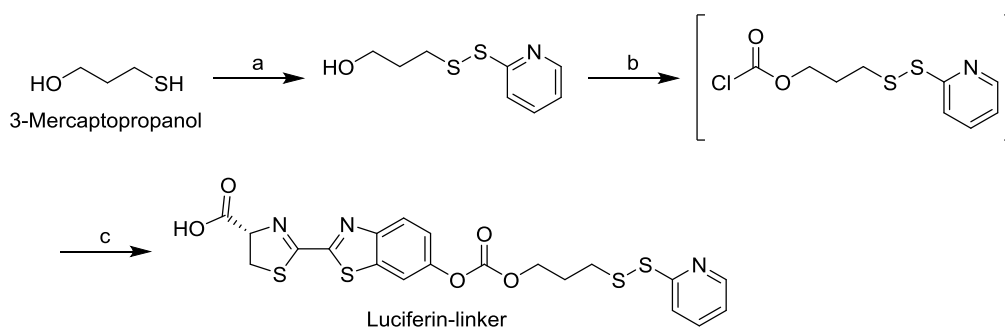
Peptide synthesis

DOCK2-inhibitory peptides **1** and **3** were synthesized by Scrum Inc. (Osaka, Japan). PTD4, KST peptide, *p*VEC, MAP, MPG, transportan, and S4₁₃-PV with an additional Mpa moiety at N-terminus were prepared by Chinese Peptide Company Ltd. (Hangzhou, China). Other peptides were synthesized on Biotage[®] Syro Wave[™] peptide synthesizer (Biotage AB, Uppsala, Sweden), Symphony[®] X peptide synthesizer (Protein Technologies, Inc., AZ, USA), and/or manual shaker using Sieber amide resin by standard Fmoc-based solid phase peptide synthesis (SPPS). Crude peptides were purified with preparative high performance liquid chromatography (HPLC). The purity of each peptide was ascertained by analytical HPLC, and the structural assignment was performed by MALDI-TOF MS.

The general procedure is described as follows as the synthesis of Tat-Cys (H-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-Cys-NH₂): The peptide chain elongation was performed using Symphony[®] X peptide synthesizer. After Sieber amide resin (211.3 mg, 0.15 mmol, 0.71 mmol/g) was swollen in *N*-methylpyrrolidone (NMP) for 20 min, Fmoc groups were removed by 20% piperidine/NMP for 7.5 min × 2. Coupling reaction was carried out with Fmoc-amino acid (0.6 mmol), *N,N*-diisopropylcarbodiimide (0.6 mmol), and ethyl cyano(hydroxyimino)acetate (Oxyma Pure[®], 0.6 mmol) in NMP (1.5 mL) for 2 h at room temperature under N₂ atmosphere. After elongation completed, the resin was washed with NMP and MeOH, and dried to yield 844.5 mg of H-Gly-Arg(Pbf)-Lys(Boc)-Lys(Boc)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Pro-Pro-Gln(Trt)-Cys(Trt)-Sieber amide resin. A portion of the resin (112.6 mg) was treated with TFA-scavengers (TFA/*m*-cresol/thioanisole/H₂O/TIS/1,2-ethanedithiol = 80/5/5/2.5/2.5, 1.2 mL) for 2 h at room temperature. After addition of diisopropyl ether (DIPE), the mixture was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated again. After the residue was extracted with MeCN/H₂O containing 0.1% TFA, the extract was filtrated and lyophilized. The crude peptide was purified with preparative HPLC using Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (250 × 21.10 mm I.D.) at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of 7% to 17% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 1 h. The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 8.0 mg of Tat-Cys. Mass spectrum: MALDI-TOF (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, monoisotopic) C₇₃H₁₃₇N₃₇O₁₆S₁ [M+H]⁺ 1821.14 (calcd. 1821.08); elution time on RP-HPLC: 7.00 min, elution conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6 × 100 mm I.D.), a linear gradient of 5% to 45% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 20 min.

Synthesis of luciferin-linker

Luciferin-linker was synthesized as previously reported (Scheme 3),⁵⁵ and was purified by silica gel flash chromatography (DIOL60, Fuji Silysia Chemical Ltd., Aichi, Japan). ¹H NMR (300 MHz, CD₃OD): δ 8.41–8.49 (m, 1H), 8.08–8.18 (m, 1H), 7.96 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 7.81–7.93 (2H, m), 7.43 (dd, 1H, *J* = 9.0, 2.4 Hz), 7.27 (ddd, 1H, *J* = 6.8, 5.1, 1.5 Hz), 5.46 (t, 1H, *J* = 9.3 Hz), 4.41 (t, 2H, *J* = 6.1 Hz), 3.77–3.87 (m, 2H), 2.95–3.05 (m, 2H), 2.12–2.25 (m, 2H); LC-MS (MeCN/H₂O/AcONH₄) C₂₀H₁₇N₃O₅S₄ [M+H]⁺ 508.1 (calcd. 508.0).



Scheme 3. Synthesis of luciferin-linker. Reagents and conditions: (a) methoxycarbonylsulfonyl chloride (1.1 eq.), 2-mercaptopyridine (1 eq.), MeOH, 0°C, 30 min, 83%; (b) triphosgene (0.37 eq.), pyridine (1 eq.), THF, 0°C, 30 min; (c) D-Luciferin K⁺ salt (0.17 eq.), NaOH (1 eq.), H₂O, r.t., 1 h, two steps 8.0%.

Luciferin modification of peptides

The general procedure of luciferin modification is described as follows as the synthesis of Tat-C(luc) (H-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-Cys(luc)-NH₂): Tat-Cys (4.7 mg, 2.1 μmol) was reacted with luciferin-linker (1.2 mg, 2.3 μmol) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (18.7 μL) for 3 h at room temperature. The mixture was diluted with a small amount of MeOH before addition of DIPE. The resulting suspension was centrifuged, and the supernatant was removed. This procedure was repeated again. The residue was dissolved in MeCN/H₂O containing 0.1% TFA, and filtrated. The filtrate was purified with preparative HPLC using Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (250 × 21.10 mm I.D.) at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of 24% to 34% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 1 h. The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 2.9 mg of Tat-C(luc). Mass spectrum: MALDI-TOF (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, average) C₃₈H₁₄₉N₃₉O₂₁S₄ [M+H]⁺ 2218.32 (calcd. 2218.64); elution time on RP-HPLC: 14.35 min, elution conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6 × 100 mm I.D.), a linear gradient of 5% to 45% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 20 min.

Modification of DOCK2-inhibitory peptides with luciferin

The general procedure of luciferin modification of cyclic DOCK2-inhibitory peptides is described as follows as the synthesis of **20**: Fmoc-Cys(Dpm)-OH was introduced into position 1, and Fmoc-Cys(Mmt)-OH into positions 2 and 12 instead of standard Fmoc-Cys(Trt)-OH. Fmoc SPPS was carried out on Syro WaveTM peptide synthesizer using Sieber amide resin (28.6 mg, 0.02 mmol, 0.70 mmol/g) to obtain 108.9 mg of Ac-Cys(Dpm)-Cys(Mmt)-Val-Ala-Lys(Boc)-Tyr(*t*Bu)-His(Trt)-Gly-Tyr(*t*Bu)-Pro-Trp(Boc)-Cys(Mmt)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Sieber amide resin. A portion of the resin (40.8 mg) was treated with TFA-scavengers (TFA/*m*-cresol/thioanisole/H₂O/TIS/1,2-ethanedithiol = 80/5/5/5/2.5/2.5, 500 μ L) for 20 min at room temperature. After addition of DIPE, the mixture was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated again. After the residue was extracted with MeCN/H₂O containing 0.1% TFA, the extract was filtrated and lyophilized to give peptide powder, which was a linear peptide protected with Dpm groups and partially with Pbf groups. The peptide was dissolved in MeCN (20 mL) and H₂O (20 mL), and NH₄HCO₃ was added to the solution until it turned basic. The mixture was vigorously stirred for 18 h at room temperature. After the solvent was removed by evaporation and lyophilization, the resulting residue was treated with 95% TFA (TFA/TIS/H₂O = 95/2.5/2.5, 500 μ L) for 2.5 h at room temperature. After addition of DIPE, the mixture was centrifuged and the supernatant was removed. This procedure was repeated again. The residue was dissolved in MeCN/H₂O containing 0.1% TFA, and filtrated. The filtrate was purified with preparative HPLC using Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (250 \times 21.10 mm I.D.) at a flow rate of 8 mL/min with a linear gradient of 21% to 31% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 1 h. The fractions containing the product were collected and lyophilized to give 1.1 mg of a cyclic peptide that had a free sulfhydryl group on a side chain of Cys¹, and formed a disulfide bridge between Cys² and Cys¹². Mass spectrum: MALDI-TOF (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, monoisotopic) C₈₅H₁₂₅N₂₉O₁₈S₃ [M+H]⁺ 1936.52 (calcd. 1936.90); elution time on RP-HPLC: 4.65 min, elution conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6 \times 100 mm I.D.), a linear gradient of 20% to 70% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min. The obtained peptide was reacted with luciferin-linker to give 1.0 mg of **20**. Mass spectrum: MALDI-TOF (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, average) C₁₀₀H₁₃₇N₃₁O₂₃S₆ [M+H]⁺ 2334.43 (calcd. 2334.75); elution time on RP-HPLC: 8.95 min, elution conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6 \times 100 mm I.D.), a linear gradient of 20% to 70% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min.

Bridging with xylene moiety

The general procedure of xylene bridging is described as follows as the synthesis of **31**: A starting linear peptide Ac-Leu-Asn-Arg-Cys-Val-Ala-Lys-Tyr-His-Gly-Tyr-Pro-Trp-Cys-Arg-Arg-Arg-NH₂ (6.7 mg, 3 μ mol) was dissolved in 30 mM NH₄HCO₃ (900 μ L, 30 μ mol). A solution of

α,α' -dibromo-*o*-xylene (0.8 mg, 3 μ mol) in MeCN (200 μ L) was added, and the mixture was stirred overnight at room temperature. After addition of 50% AcOH/H₂O, the mixture was filtrated and lyophilized. The crude peptide was purified with preparative HPLC to give **31** (2.1 mg). Mass spectrum: MALDI-TOF (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid, monoisotopic) C₁₀₆H₁₅₇N₃₅O₂₁S₂ [M+H]⁺ 2321.41 (calcd. 2321.18); elution time on RP-HPLC: 5.33 min, elution conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6 \times 100 mm I.D.), a linear gradient of 20% to 70% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min.

Synthesis of (*S*)-benzyl 15-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-8-(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,12-dioxo-3-oxa-5,8,11-triazahexadecan-16-oate (**7**)

(*S*)-5-Benzyloxy-4-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-5-oxopentanoic acid (**6**, 851 mg, 2.29 mmol) and 1,4-bis-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4,7-triazaheptane (632 mg, 2.08 mmol) were dissolved in a solution of 0.5 M Oxyma Pure[®] in DMF (4.58 mL, 2.29 mmol). EDCI (439 mg, 2.29 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred at room temperature for 2 h. The mixture was neutralized with 1 M HCl and extracted with ethyl acetate (AcOEt). The organic layer was separated, washed with 1 M HCl, water and brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography (silica gel, eluted with 0–50% 2-propanol/hexane). The residue was dissolved in AcOEt then washed 3 times with sat. NaHCO₃ and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated to give **7** (1.1 g, 81%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.36 (9H, s), 1.38 (9H, s), 1.69–1.87 (1H, m), 1.92–2.07 (1H, m), 2.16 (2H, brs), 2.93–3.06 (1H, m), 3.07–3.20 (6H, m), 4.02–4.17 (1H, m), 4.95–5.20 (4H, m), 6.80 (1H, brs), 7.28–7.40 (10H, m), 7.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.83–7.94 (1H, m). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆) δ 26.47, 28.02, 28.21, 53.66, 65.51, 65.91, 77.52, 78.53, 127.72, 127.82, 128.01, 128.33, 128.39, 135.90, 136.84, 156.12, 171.13, 172.01. HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd. for C₃₄H₄₈N₄NaO₉ [M+Na]⁺: 679.3319, found: 679.3339.

Synthesis of (*S*)-15-([[(9H-fluoren-9-yl)methoxy]carbonyl]amino)-8-(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,12-dioxo-3-oxa-5,8,11-triazahexadecan-16-oic acid (Fmoc-DA-OH, **5**)

A mixture of **7** (1.1 g, 1.67 mmol) and 5% Pd-C (4.46 g, 0.84 mmol) in MeOH (15 mL) was hydrogenated under balloon pressure at room temperature for 2 h. The catalyst was removed by filtration and the filtrate was concentrated *in vacuo* to give crude (*S*)-15-amino-8-(*tert*-butoxycarbonyl)-2,2-dimethyl-4,12-dioxo-3-oxa-5,8,11-triazahexadecan-16-oic acid (**8**) as colorless foam. Compound **8** was added to a solution of (9H-fluoren-9-yl)methyl (2,5-dioxopyrrolidin-1-yl) carbonate (572 mg, 1.7 mmol) and *N,N*-diisopropylethylamine (0.269 mL, 1.54 mmol) in MeCN/H₂O (4 mL, 1:1 (v/v)). The mixture was stirred overnight. The mixture was neutralized with 0.1 N HCl at 0°C and extracted with AcOEt. The organic layer was separated, washed with 0.1 N HCl and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column

chromatography (diol-silica gel, eluted with 20–100% AcOEt/hexane) to give **5** (926 mg, 1.414 mmol, 86 % (2 steps)) as a white foam. The obtained foam was dissolved in AcOEt then re-precipitated into hexane (300 mL) to give a white powder. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.36 (9H, s), 1.38 (9H, s), 1.69–1.87 (1H, m), 1.92–2.07 (1H, m), 2.16 (2H, brs), 2.93–3.06 (1H, m), 3.07–3.20 (6H, m), 4.02–4.17 (1H, m), 4.95–5.20 (4H, m), 6.80 (1H, brs), 7.28–7.40 (10H, m), 7.80 (1H, d, *J* = 7.5 Hz), 7.83–7.94 (1H, m). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-d₆) δ 26.77, 28.05, 28.23, 31.83, 37.04, 37.39, 38.19, 46.23, 46.65, 46.86, 53.53, 65.70, 77.56, 78.56, 120.10, 125.30, 127.08, 127.64, 140.71, 143.81, 154.7, 155.58, 156.13, 171.37, 173.64. HRMS (MALDI-TOF): *m/z* calcd. for C₃₄H₄₆N₄NaO₉ [M+Na]⁺: 677.3162, found: 677.3174.

FITC modification of peptides

The general procedure of FITC modification of peptides is described as follows as the synthesis of **15**: A starting peptide H-CGXXXXXXQXXXPP-NH₂ (12.2 mg, 5.5 μmol) and fluorescein-5-maleimide (2.4 mg, 5.5 μmol) were mixed in phosphate buffer (pH 6.86, 87 μL) and MeCN (113 μL). After stirring for 9 h at room temperature, the mixture was lyophilized. The resulting residue was dissolved in MeCN/H₂O containing 0.1% TFA, and filtrated. The crude peptide was purified with preparative HPLC to give **15** (1.2 mg). Mass spectrum: MALDI-TOF (*α*-cyano-4-hydroxycinnamic acid, monoisotopic) C₁₁₆H₁₉₀N₄₀O₂₉S₁ [M+H]⁺ 2640.56 (calcd. 2640.44); elution time on RP-HPLC: 10.93 min, elution conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6 × 100 mm I.D.), a linear gradient of 5% to 45% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 20 min.

Physicochemical properties

Table 16. Physicochemical characteristics of luciferin-modified CPPs

Compound	Sequence	Molecular weight	Mass analysis [M+H] ⁺		HPLC analysis ^c		
			calcd ^a	obsvd ^b	Condition	Retention time (min)	Purity (%)
Tat-C(luc)	H-GRKKRRQRRRPPQC(luc)-NH ₂	2217.63	2218.64	2218.32	A	14.35	98.8
PTD4-C(luc)	H-YARAAARQARAC(luc)-NH ₂	1702.96	1703.97	1703.78	B	6.07	96.4
Mpa(luc)-Penetratin	Mpa(luc)-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH ₂	2730.34	2731.35	2731.01	C	19.76	98.8
Mpa(luc)-Nle-Pen	Mpa(luc)-RQIKIWFQNRRXKWK-NH ₂ ^a	2712.30	2713.31	2713.13	C	19.84	98.6
X-pep-C(luc)	H-MAARLC(luc)-NH ₂	1059.33	1060.34	1060.50	C	18.41	96.7
[C(luc) ⁸] Oct4-PTD	H-DVVRVWFC(luc)NRRQKGR-NH ₂	2442.87	2443.88	2443.81	B	7.70	97.3
Mpa(luc)-KST peptide	Mpa(luc)-KSTGKANKITITNDKGRLSK-NH ₂	2643.25	2644.26	2644.20	B	6.09	95.4
Mpa(luc)-pVEC	Mpa(luc)-LLILRRRIRKQAHASK-NH ₂	2693.29	2694.30	2694.48	B	12.14	97.5
Mpa(luc)-R8	Mpa(luc)-RRRRRRR-NH ₂	1751.11	1752.11	1752.03	A	14.77	96.5
Mpa(luc)-MAP	Mpa(luc)-KLALKLALKALKAAALKLA-NH ₂	2361.05	2362.06	2361.79	B	21.34	95.3
Mpa(luc)-MPG	Mpa(luc)-GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKSKRKV-NH ₂	3329.96	3330.97	3330.93	B	16.45	96.1
Mpa(luc)-Transportan	Mpa(luc)-GWTLSAGYLLGKINLKALAALAKKIL-NH ₂	3325.04	3326.05	3325.69	B	18.44	98.4
Mpa(luc)-S4 ₁₃ -PV	Mpa(luc)-ALWKTLLKVKLAPKKRKV-NH ₂	2860.66	2861.67	2861.61	B	11.73	98.1

^a Calculated average molecular weight of [M+H]⁺, ^b observed average molecular weight using MALDI-TOF MS linear mode, ^c HPLC analysis was carried out in conditions A, B, or C. HPLC conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6×100 mm I.D.), a linear gradient of (A) 5% to 45% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 20 min, (B) 20% to 70% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min, and (C) 5% to 55% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min.

Table 17. Physicochemical characteristics of luciferin-modified PB1-F2 fragments

Compound	Sequence	Molecular weight	Mass analysis [M+H] ⁺		HPLC analysis ^c	
			calcd ^a	obsvd ^b	Retention time (min)	Purity (%)
PF1	Mpa(luc)-GSLKTRVLKR-NH ₂	1641.02	1642.03	1641.74	18.16	95.1
PF2	Mpa(luc)-SLKTRVLKRW-NH ₂	1770.18	1771.19	1770.97	19.22	97.0
PF3	Mpa(luc)-LKTRVLKRWK-NH ₂	1811.27	1812.28	1811.95	19.01	96.1
PF4	Mpa(luc)-KTRVLKRWKL-NH ₂	1811.27	1812.28	1812.03	18.26	97.1
PF5	Mpa(luc)-TRVLKRWKLF-NH ₂	1830.27	1831.28	1831.02	21.95	95.9
PF6	Mpa(luc)-RVLKRWKLFN-NH ₂	1843.27	1844.28	1844.18	21.09	96.2
PF7	Mpa(luc)-VLKRWKLFNK-NH ₂	1815.26	1816.27	1815.94	20.90	96.2
PF8	Mpa(luc)-LKRWKLFNKQ-NH ₂	1844.26	1845.27	1845.08	20.09	96.8
PF9	Mpa(luc)-KRWKLFNKQE-NH ₂	1860.21	1861.22	1861.02	18.58	95.5
PF10	Mpa(luc)-RWKLFNKQEW-NH ₂	1918.25	1919.26	1919.04	20.47	97.8
PF11	Mpa(luc)-WKLFNKQEW-NH ₂	1863.17	1864.18	1864.20	22.71	97.1
PF12	Mpa(luc)-KLFNKQEW-NH ₂	1791.06	1792.07	1792.02	20.45	96.7

^a Calculated average molecular weight of [M+H]⁺, ^b observed average molecular weight using MALDI-TOF MS linear mode, ^c HPLC conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6×100 mm I.D.), a linear gradient of 5% to 55% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min.

Table 18. Physicochemical characteristics of luciferin-modified Tat derivatives

Compound	Sequence	Molecular weight	Mass analysis [M+H] ⁺		HPLC analysis ^c	
			calcd ^a	obsvd ^b	Retention time (min)	Purity (%)
9	H-C(luc)GRKKRRQRRRPP-NH ₂	2089.50	2090.51	2090.27	5.07	97.5
10	H-C(luc)GRXXRRQRRRPP-NH ₂	2261.69	2262.70	2262.82	4.89	96.7
11	H-C(luc)GXKXRXQRRRPP-NH ₂	2349.83	2350.84	2350.72	4.76	95.5
12	H-C(luc)GXKXXXQRRRPP-NH ₂	2437.98	2438.99	2438.88	4.71	96.6
13	H-C(luc)GXKXXXQRRRPP-NH ₂	2610.16	2611.17	2611.25	4.65	95.0

^a Calculated average molecular weight of [M+H]⁺, ^b observed average molecular weight using MALDI-TOF MS linear mode, ^c HPLC conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6×100 mm I.D.), a linear gradient of 5% to 55% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min. X represents the DA residue.

Table 19. Physicochemical characteristics of FITC-modified Tat derivatives

Compound	Sequence	Molecular weight	Mass analysis [M+H] ⁺		HPLC analysis ^c	
			calcd ^a	obsvd ^b	Retention time (min)	Purity (%)
14	H-C(FITC)GRKKRRRQRRRPP-NH ₂	2120.41	2120.09	2120.16	11.42	96.4
15	H-C(FITC)GXXXXXXQXXXXPP-NH ₂	2089.50	2640.44	2640.57	10.93	93.0

^a Calculated monoisotopic molecular weight of [M+H]⁺, ^b observed monoisotopic molecular weight using MALDI-TOF MS reflector mode, ^c HPLC conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6×100 mm I.D.), a linear gradient of 5% to 45% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 20 min. X represents the DA residue.

Table 20. Physicochemical characteristics of DOCK2-inhibitory peptides

Compound	Sequence	Molecular weight	Mass analysis [M+H] ⁺		HPLC analysis ^c		
			calcd ^a	obsvd ^b	Condition	Retention time (min)	Purity (%)
2	Ac-VAKYHGYPWNRNR-NH ₂	1743.97	1743.93	1744.12	A	11.68	99.2
4	Ac-C*VAKYHGYPWC*RRR-NH ₂	1834.14	1833.89	1833.65	A	12.49	98.7
16	Ac-C*VAKYHGYPWC*RRRRRRR-NH ₂	2615.07	2614.40	2614.34	A	12.34	99.5
17	Ac-C*VAKYHGYPWC*RRRRQIKIWFQNR-Nle-KWKK-NH ₂	4044.81	4043.21	4043.23	A	15.20	99.2
18	Ac-C*VAKYHGYPWC*RRRALWKTLLKKVLKAPKKRKR-NH ₂	4193.18	4191.48	4191.77	A	16.66	97.6
19	Ac-C*VAKYHGYPWC*RRRTRVLKRWKLF-NH ₂	3162.79	3161.71	3161.76	A	15.84	99.2
23	Ac-C*V-MeAla-KYHGYPWC*RRR-NH ₂	1848.16	1847.91	1847.65	B	4.43	99.0
24	Ac-C*VAK-MeTyr-HGYPWC*RRR-NH ₂	1848.16	1847.91	1847.69	B	3.63	99.3
25	Ac-C*VAKY-MeHis-GYPWC*RRR-NH ₂	1848.16	1847.91	1847.69	B	3.78	96.4
26	Ac-C*VAKYH-MeGly-YPWC*RRR-NH ₂	1848.16	1847.91	1847.68	B	4.06	97.2
27	Ac-C*VAKYHG-MeTyr-PWC*RRR-NH ₂	1848.16	1847.91	1847.87	A	12.26	97.4
28	Ac-C*VAKYHGYP-MeTrp-C*RRR-NH ₂	1848.16	1847.91	1847.84	A	13.06	83.5
29	Ac-LNRC#VAKYHGYPWC#RRR-NH ₂ (<i>p</i> -xylene)	2321.73	2321.18	2321.17	A	13.89	99.1
30	Ac-LNRC#VAKYHGYPWC#RRR-NH ₂ (<i>m</i> -xylene)	2321.73	2321.18	2321.37	B	5.40	99.4
31	Ac-LNRC#VAKYHGYPWC#RRR-NH ₂ (<i>o</i> -xylene)	2321.73	2321.18	2321.41	B	5.33	98.5
32	Ac-C*WARYHGYPWC*RRR-NH ₂	1949.23	1948.91	1948.69	B	5.20	99.6
33	Ac-RRRRC*WARYHGYPWC*RRRR-NH ₂	2730.16	2729.41	2729.49	B	3.09	99.1
34	Ac-RRRRC#WARYHGYPWC*RRRR-NH ₂ (<i>o</i> -xylene)	2834.31	2833.48	2833.16	B	4.19	99.4

Disulfide bridge was formed between C* residues. Xylene-based bridge (*p*-, *m*-, or *o*-isomers used) was formed between C# residues. ^a Calculated monoisotopic molecular weight of [M+H]⁺, ^b observed monoisotopic molecular weight using MALDI-TOF MS reflector mode, ^c HPLC analysis was carried out in conditions A, or B. HPLC conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6×100 mm I.D.), a linear gradient of (A) 5% to 45% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 20 min, and (B) 20% to 70% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min.

Table 21. Physicochemical characteristics of luciferin-modified DOCK2-inhibitory peptides

Compound	Sequence	Molecular weight	Mass analysis [M+H] ⁺		HPLC analysis ^c	
			calcd ^a	obsvd ^b	Retention time (min)	Purity (%)
20	Ac-C(luc)C*VAKYHGYPWC*RRR-NH ₂	2333 74	2334 75	2334 43	8 95	96 6
21	Ac-C(luc)C*VAKYHGYPWC*RRRRRRRR-NH ₂	3114 67	3115 68	3115 91	8 02	98 0
22	Ac-C(luc)C*VAKYHGYPWC*RRRTRVLKRWKLF-NH ₂	3662 39	3663 40	3663 09	9 72	98 7
35	Ac-C(luc)RRRRC#WARYHGYPWC#RRRR-NH ₂ (<i>o</i> -xylene)	3333 91	3334 92	3334 90	6 89	97 4

Disulfide bridge was formed between C* residues. *o*-Xylene-based bridge was formed between C# residues.^a Calculated average molecular weight of [M+H]⁺,^b observed average molecular weight using MALDI-TOF MS linear mode,^c HPLC conditions: Phenomenex kinetex 5u XB-C18 column (4.6×100 mm I.D.), a linear gradient of 20% to 70% of MeCN/H₂O containing 0.1% TFA over 25 min.

Recombinant protein preparations

Proteins were prepared as previously described.²⁴ All recombinant proteins were expressed in an *Escherichia coli* BL21(DE3) culture induced overnight at 16°C. The cell pellet was collected by centrifugation, resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 300 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 20 mM imidazole, 5 U/mL Benzonase (Sigma-Aldrich, MO, USA)), disrupted by sonication, and then the crude lysate was centrifuged at 33,798 × g for 1 h. The supernatant was loaded onto a 5 mL Ni-NTA superflow cartridge (QIAGEN, Hilden, Germany) using an AKTA 10S system (GE Healthcare, IL, USA), and the cartridge was washed with wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 300 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 20 mM imidazole). Protein was eluted with elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 300 mM NaCl, 5% (v/v) glycerol, 1 mM DTT, 250 mM imidazole), and further purified by size exclusion chromatography using a Superdex 200 column (GE Healthcare) equilibrated with TBS (T9141, Wako, Osaka, Japan) containing 1 mM DTT, 5% (v/v) glycerol, 5 mM EDTA.

Phage library construction and panning

T7 phage libraries displaying random peptides, which were generated by mixed-oligonucleotides as template DNA, were constructed by using T7Select 10-3 vector from Merck, according to previously described methods.²⁴ Biotinylated His-Avi-SUMOTEV-DOCK2(1192-1622) was immobilized to streptavidin (SA) M280 Dynabeads (Invitrogen, CA, USA) in PBS (045-29795, Wako) containing 0.5% BSA (blocking buffer). After washing in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBST), beads were incubated with phage libraries for 1 h, and washed with PBST. Bound phages were competitively eluted by FLAG-His-TEV-Rac1(1-177) (1 mM) and were incubated with *Escherichia coli* BLT5615 cells (Merck) in logphase growth for phage amplification. After

bacteriolysis, phages were recovered from the culture supernatant by centrifugation and PEG-precipitation. Recovered phages were dissolved in PBS and used for the next round of panning.

DOCK2–Rac1 binding ELISA

The wells of a Nunc Maxisorp microplate (460-518) were coated with streptavidin (Wako, Osaka, Japan), and were blocked by PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA). Biotinylated DOCK2 protein was captured by the streptavidin, and mixture of synthetic peptide and Rac1 protein (2.5 nM) was added to the wells. After washing with PBS containing 0.1% Tween 20, bound Rac1 protein was detected using horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-FLAG antibody (A8592-1MG, Sigma, MO, USA). The amount of HRP in wells was measured by SuperSignal™ ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (37069, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA).

Binding analysis by SPR

SPR biosensing experiments were performed on a Biacore 3000 instrument equipped with Sensorchip SA at 25°C (GE healthcare). For immobilization, HBS-EP+ (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% SP20) was supplemented with 1 mM DTT. Biotinylated His-Avi-SUMO-TEV-DOCK2(1192-1622) was immobilized onto an SA sensorchip (GE healthcare) using SA-Biotin capturing. Immobilization levels were approximately 4000 RUs. To study interactions, HBS-EP+ supplemented with/without 0.2 mM TCEP was used as a running buffer. Peptides were injected for 120 s at flow rate of 50 mL/min and the dissociation was followed for up to 1500 s. Data processing and analysis was performed using BIAevaluation software ver. 4.1.1 (GE healthcare). Sensorgrams were double referenced prior to curve fitting of concentration series to a 1:1 binding model to determine the binding rate constants k_{on} and k_{off} . The dissociation constant K_D was calculated from the following equation: $K_D = k_{off}/k_{on}$.

Cell-free GEF assay

Mixtures of peptides, His-Avi-SUMO-TEV-DOCK2(Met1192-Met1622) (10 nM), and BODIPY-GTP (1000 nM) were incubated in assay buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0.01% Tween 20, and 0.01% BSA) on 384-well plates (784076, Greiner) at 25°C for 1 h in the dark. FLAG-His-TEV-Rac1(1-177) (10 nM) preincubated with GDP (100 nM, Wako) and anti-FLAG M2-Tb (61FG2TLA, Cisbio Bioassays, MA, USA) for 30 min at 25°C was added to the wells, and TR-FRET signals (excitation = 320 nm, emission = 486 and 520 nm) between BODIPY-GTP and anti-FLAG M2-Tb on Rac1 protein were detected by an Envision plate reader (PerkinElmer).

Cell migration assay

MINO lymphoma cells (ATCC) were grown at 37°C/5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 15% FBS (Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin (WAKO). MINO cells were adjusted to 3×10^6 cells/mL in migration medium (RPMI 1640, no phenol red (Invitrogen), 0.1% BSA) and incubated with peptides at various concentrations for 30 min at 37°C/5% CO₂. Then, 100 µL cell suspension was added to the upper chambers (5-µm pore size inserts) of the transwell plate (3388, Corning, NY, USA). Subsequently 200 µL of a mixture of 10 nM S1P (S9666, Sigma-Aldrich) and the indicated concentration of peptide in migration medium was added to the lower chambers of a 96-well transwell plate. After incubation for 4 h at 37°C/5% CO₂, the number of viable cells that migrated from the upper chamber to the lower chamber was determined using a CellTiter-Glo kit (Promega, WI, USA). Luminescent signals of viable cells were measured by an Envision plate reader (PerkinElmer).

Cellular internalization assay

Cellular internalization was evaluated as previously described.³⁹ Briefly, HEK293T (ATCC) cells were transfected with an internal reporter construct to express luciferase. Transiently luciferase-expressing cells were seeded at 1×10^4 cells/15 µL/well in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) containing 10% fetal bovine serum (FBS) on 384-well plates (3570, Corning, NY, USA). After 2 h, 15 µL of compounds diluted with Hank's Balanced Salt Solution (14025092, Invitrogen, CA, USA) containing 10% FBS were added to the wells and the luminescence was immediately measured by Envision (PerkinElmer, Waltham, MA) every 3 min (0.1 sec detection/well) for 2 h. For cytotoxicity analysis, the number of viable cells in the wells was determined using CellTiter-Glo kit (Promega, WI, USA).

Microscopic observation of fluorescein-labeled CPPs

HeLa cells were seeded for 20 h before the treatment of fluorescein-labeled CPPs. After seeding, 50 µM of the peptides and Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were incubated with cells for 30 min. Cellular images were obtained with SP8 confocal microscopy (Leica, Wetzlar, Germany).

References

- 1) Ryan, D. P.; Matthews, J. M. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2005**, *15*, 441–446.
- 2) Conte, L. L.; Chothia, C.; Janin, J. *J. Mol. Biol.* **1999**, *285*, 2177–2198.
- 3) Fuller, J. C.; Burgoyne, N. J.; Jackson, R. M. *Drug. Discov. Today.* **2009**, *14*, 155–161.
- 4) Arkin, M. R.; Tang, Y.; Wells, J. A. *Chem. Biol.* **2014**, *18*, 1102–1114.
- 5) Jin, L.; Wang, W.; Fang, G. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2014**, *54*, 435–456.
- 6) Modell, A. E.; Blosser, S. L.; Arora, P. S. *Trends. Pharmacol. Sci.* **2016**, *37*, 702–713.
- 7) Milroy, L.-G.; Grossmann, T. N.; Hennig, S.; Brunsveld, L.; Ottmann, C. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4695–4748.
- 8) Kurrikoffa, K.; Gestinb, M.; Langel, Ü. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **2016**, *13*, 373–387.
- 9) Vasconcelos, L.; Pärn, K.; Langel, Ü. *Ther. Deliv.* **2013**, *4*, 573–591.
- 10) Green, M.; Ishino, M.; Loewenstein, P. M. *Cell.* **1989**, *58*, 215–223.
- 11) Milletti, F. *Drug. Discov. Today.* **2012**, *17*, 850–860.
- 12) Kauffman, W. B.; Fuselier, T.; He, J.; Wimley, W. C. *Trends. Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 749–764.
- 13) Rizzuti, M.; Nizzardo, M.; Zanetta, C.; Ramirez, A.; Corti, S. *Drug. Discov. Today.* **2015**, *20*, 76–85.
- 14) Steel, R.; Cowan, J.; Payerne, E.; O'Connell, M. O.; Searcey, M. *ACS. Med. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 407–410.
- 15) Tu, J.; Zhang, X.; Zhu, Y.; Dai, Y.; Li, N.; Yang, F.; Zhang, Q.; Brann, D.W.; Wang, R. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 14727–14739.
- 16) Watkins, C. L.; Brennan, P.; Fegan, C.; Takayama, K.; Nakase, I.; Futaki, S.; Jones, A. T. *J. Control. Release.* **2009**, *140*, 237–244.
- 17) Mueller, J.; Kretzschmar, I.; Volkmer, R.; Boisguerin, P. *Bioconjugate. Chem.* **2008**, *19*, 2363–2374.
- 18) Jones, L. R.; Goun, E. A.; Shinde, R.; Rothbard, J. B.; Contag, C. H.; Wender, P. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 6526–6527.
- 19) Reif, K.; Cyster, J. G. *Trends. Cell. Biol.* **2002**, *12*, 368–373.
- 20) Fukui, Y.; Hashimoto, O.; Sanui, T.; Oono, T.; Koga, H.; Abe, M.; Inayoshi, A.; Noda, M.; Oike, M.; Shirai, T.; Sasazuki, T. *Nature.* **2001**, *412*, 826–831.
- 21) Jiang, H.; Pan, F.; Erickson, L. M.; Jang, M.-S.; Sanui, T.; Kunisaki, Y.; Sasazuki, T.; Kobayashi, M.; Fukui, Y. *J. Exp. Med.* **2005**, *17*, 1121–1130.
- 22) Nishikimi, A.; Uruno, T.; Duan, X.; Cao, Q.; Okamura, Y.; Saitoh, T.; Saito, N.; Sakaoka, S.; Du, Y.; Suenaga, A.; Kukimoto-Niino, M.; Miyano, K.; Gotoh, K.; Okabe, T.; Sanematsu, F.; Tanaka, Y.; Sumimoto, H.; Honma, T.; Yokoyama, S.; Nagano, T.; Kohda, D.; Kanai, M.; Fukui, Y. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 488–497.
- 23) Labbé, C. M.; Laconde, G.; Kuenemann, M. A.; Villoutreix, B. O.; Sperandio, O. *Drug. Discov.*

- Today*. **2013**, *18*, 958–968.
- 24) Kulkarni, K.; Yang, J.; Zhang, Z.; Barford, D. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 25341–25351.
 - 25) Sakamoto, K.; Kawata, Y.; Masuda, Y.; Umemoto, T.; Ito, T.; Asami, T.; Takekawa, S.; Ohtaki, T.; Inooka, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *480*, 55–60.
 - 26) Wu, C.; Liu, I.; Lu, R.; Wu, H. *J. Biomed. Sci.* **2016**, *23*, 8.
 - 27) Kawamoto, S. A.; Coleska, A.; Ran, X.; Yi, H.; Yang, C.-Y.; Wang, S. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 1137–1146.
 - 28) Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444–10450.
 - 29) Montrose, K.; Yang, Y.; Krissansen, G. W. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *453*, 64–68.
 - 30) Harreither, E.; Rydberg, H. A.; Åmand, H. L.; Jadhav, V.; Fliedl, L.; Benda, C.; Esteban, M. A.; Pei, D.; Borth, N.; Grillari-Voglauer, R.; Hommerding, O.; Edenhofer, F.; Nordén, B.; Grillari, J. *Cell. Regen. (Lond)*. **2015**, *3*, 2.
 - 31) Komarova, E. Y.; Meshalkina, D. A.; Aksenov, N. D.; Pchelin, I. M.; Martynova, E.; Margulis, B. A.; Guzhova, I. V. *Cell. Stress. Chaperones*. **2015**, *20*, 343–354.
 - 32) Elmquist, A.; Lindgren, M.; Bartifai, T.; Langel, Ü. *Exp. Cell. Res.* **2001**, *269*, 237–244.
 - 33) Ho, A.; Schwarze, S. R.; Mermelstein, S. J.; Waksman, G.; Dowdy, S. F. *Cancer. Res.* **2001**, *61*, 474–477.
 - 34) Futaki, S.; Suzuki, T.; Ohashi, W.; Yagami, T.; Tanaka, S.; Ueda, K.; Sugiura, Y. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 5836–5840.
 - 35) Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. *Biochim. Biophys. Acta*. **1998**, *1414*, 127–139.
 - 36) Morris, M. C.; Vidal, P.; Chaloin, L.; Heitz, F.; Divita, G. *Nucleic. Acids. Res.* **1997**, *25*, 2730–2736.
 - 37) Pooga, M.; Hällbrink, M.; Zorko, M.; Langel, Ü. *FASEB. J.* **1998**, *12*, 67–77.
 - 38) Mano, M.; Henriques, A.; Paiva, A.; Prieto, M.; Gavilanes, F.; Simões, S.; Pedroso de Lima, M. C. *Biochim. Biophys. Acta*. **2006**, *1758*, 336–346.
 - 39) Eiríksdóttir, E.; Mäger, I.; Lehto, T.; El Andaloussi, S.; Langel, Ü. *Bioconjugate. Chem.* **2010**, *21*, 1662–1672.
 - 40) Tünnemann, G.; Ter-Avetisyan, G.; Martin, R. M.; Stöckl, M.; Herrmann, A.; Cardoso, M. C. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 469–476.
 - 41) Bruns, K.; Studtucker, N.; Sharma, A.; Fossen, T.; Mitzner, D.; Eissmann, A.; Tessmer, U.; Röder, R.; Henklein, P.; Wray, V.; Schubert, U. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 353–363.
 - 42) Gibbs, J.; Malide, D.; Hornung, F.; Bennink, J. R.; Yewdell, J. W. *J. Virol.* **2003**, *77*, 7214–7224.
 - 43) Yamada, H.; Chounan, R.; Higashi, Y.; Kurihara, N.; Kido, H. *FEBS. Lett.* **2004**, *578*, 331–336.

- 44) Bechara, C.; Sagan, S. *FEBS. Letters.* **2013**, *587*, 1693–1702.
- 45) Madani, F.; Lindberg, S.; Langel, Ü.; Futaki, S.; Gräslund, A. *J. Biophys.* **2011**, *2011*, 414729.
- 46) Pae, J.; Pooga, M. *Ther. Deliv.* **2014**, *5*, 1203–1222.
- 47) Erazo-Oliveras, A.; Muthunkrishnan, N. Baker, R.; Wang, T.-Y.; Pellois, J.-P. *Pharmaceuticals.* **2012**, *5*, 1177–1209.
- 48) Uchida, H.; Miyata, K.; Oba, M.; Ishii, T.; Suma, T.; Itaka, K.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 15524–15532.
- 49) Uchida, H.; Itaka, K.; Nomoto, T.; Ishii, T.; Suma, T.; Ikegami, M.; Miyata, K.; Oba, M.; Nishiyama, N.; Kataoka, K. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 12396–12405.
- 50) Zhang, X.; Zhang, X.; Wang, F. *Expert. Opin. Drug. Deliv.* **2012**, *9*, 457–472.
- 51) Góngora-Benítez, M.; Mendive-Tapia, L.; Ramos-Tomillero, I.; Breman, A. C.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5472–5475.
- 52) Gracia, S. R.; Gaus, K.; Sewald, N. *Future. Med. Chem.* **2009**, *1*, 1289–1310.
- 53) Ovadia, O.; Greenberg, S.; Chatterjee, J.; Laufer, B.; Opperer, B.; Kessler, H.; Gilon, C.; Hoffman, A. *Mol. Pharmaceutics.* **2011**, *8*, 479–487.
- 54) Li, L.; Vorobyov, I.; Allen, T. W. *J. Phys. Chem. B.* **2013**, *117*, 11906–11920.
- 55) Eiríksdóttir, E.; Langel, Ü.; Rosenthal-Aizman, K. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4731–4733.