

平成22年3月31日現在

研究種目：	基盤研究(A)
研究期間：	2007～2009
課題番号：	19209004
研究課題名（和文）	膜透過ペプチドの細胞移行のケミカルバイオロジー
研究課題名（英文）	Chemical Biology in internalization of membrane-permeable peptides
研究代表者	
	二木 史朗 (FUTAKI SHIROH)
	京都大学・化学研究所・教授
	研究者番号：50199402

研究成果の概要（和文）：

アルギニンに富む塩基性膜透過ペプチドの細胞内移行におけるマクロピノサイトーシスの関与が指摘されてきたが、光反応性のジアジリン基を有する R12 ペプチドを用いた検討により、そのマクロピノサイトーシス誘導受容体が見いだされた。ペプチド濃度、血清の有無、疎水性配列の付加などにより、アルギニンペプチドの細胞内移行効率は大きく影響を受けることも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Involvement of macropinocytosis to the internalization of arginine-rich membrane-permeable peptides has been suggested. In this study, using an R12 peptide bearing diazirine-based photo-reactive crosslinkers, a potential receptor to induce macropinocytosis by the interaction with R12 was identified. It was also elucidated that internalization efficiency of arginine-rich peptides are greatly affected by the peptide concentration, presence of serum, addition of hydrophobic segments and so on.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	28,400,000	8,520,000	36,920,000
2008年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2009年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
総計	39,500,000	11,850,000	51,350,000

研究分野：細胞ペプチド工学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：アルギニンペプチド；膜透過ペプチド；マクロピノサイトーシス；受容体；細胞内移行；細胞膜；光反応性架橋団；薬物送達

1. 研究開始当初の背景

HIV-1 由来の Tat ペプチドやオリゴアルギニンといったアルギニンに富む塩基性膜透過ペプチドを用いて、細胞内に生理活性タンパク質を効率的に導入し、細胞機能を調節す

る新しい方法が注目されている。この方法は、タンパク質のみならず、天然物、オリゴ核酸、リボソームなどの細胞導入にも適用可能であり、新しい薬物の細胞導入法としても興味が持たれている。細胞導入と機能制御に関し

て数多くの成功例が報告されてきているものの、細胞内に高効率で物質を導入できる機序に関しては不明の点が多い。

申請者らは、マクロピノサイトーシスという特殊なエンドサイトーシス（細胞内への取り込み経路）が、塩基性膜透過ペプチドの細胞移行に関与すること（Nakase, *Mol. Ther.* 2004）に加え、細胞がアルギニンペプチドと接することにより、細胞内 Rac タンパク質が活性化され、これがアクチン重合とマクロピノサイトーシスを誘導することを見出していた（Nakase, *Biochemistry*, 2007）。この結果は、アルギニンペプチドとの相互作用あるいはペプチドからの刺激により、細胞は「積極的に」物質を取り込むようになることを意味するものであり、この経路を活性化することにより、医薬品の細胞内取り込みが促進される可能性を示唆するものであり、アルギニンペプチドが単にマクロピノサイトーシス経路によってとり込まれるとされていた従来の概念を打破するものであった。しかしながら、受容体を含めて、アルギニンペプチドと細胞のどのような相互作用がこの経路を活性化するのに関しての情報は得られていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、化学合成した種々のペプチドを化学的プローブとして用いて、ペプチドにより誘導される細胞シグナルとアクチン重合化・マクロピノサイトーシスとの関係、ならびに、受容体の存在に関して検討することを目的とした。さらに、アルギニンペプチドのどのような化学的あるいは構造的要因が上記の取り込み誘導に寄与するのかに関して考察を行い、従来のアルギニンペプチドと同等あるいはそれ以上の活性を示す細胞内移行分子（キャリア、ベクター）の発見につなげることを目指し研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、アルギニンペプチドとして、細胞膜透過効率が非常に高いとされる R12 ペプチドを用い、光応答性架橋剤により、CPP が実際に生細胞において相互作用していると思われるタンパク質を捕獲することをねらった。光架橋剤としては、trifluoromethyl diazirine phenylalanine (TfmdPhe) (図 1) を使用した。Biotin を含む Bio-TfmdPhe-R12 ペプチドをデザインし、Fmoc 固相合成により合成した。HeLa 細胞にペプチドを投与後、光照射を行い、ペプチドと架橋された細胞由来タンパク質を Streptavidin beads を用いて単離した。得られた光架橋複合体サンプルを、SDS-PAGE で泳動し、ネガティブコントロールのペプチドで処理した細胞由来のサンプルと差のあるバンド (図 2) を回収し、

トリプシン分解の後、MALDI-TOF MS において質量を分析し、データベースと照合し、タンパク質を同定する Peptide Mass Fingerprint (PMF) 解析を行った。

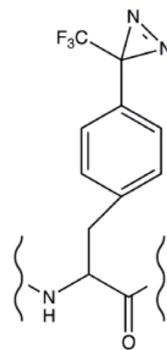


図 1. TfmdPhe の構造

4. 研究成果

Bio-TfmdPhe-R12 と相互作用する細胞表面分子を光架橋により捕捉し、ストレプトアビジンビーズで精製・濃縮し SDS-PAGE に展開し、PMF 解析を行った結果、myosin-9 が同定された。Myosin-9 はケモカイン受容体の CXCR4 の内在化に強く関与することが知られている。また、CXCR4 は塩基性のリガンドと結合することが知られている。そこで CXCR4 が R12 の内在化に関与しているか検討を行った。siRNA を導入して CXCR4 をノックダウンした HeLa 細胞は、コントロール siRNA を導入したものと比較し R12 の細胞内移行量が 40%程度低下した。また CXCR4 のアンタゴニストで処理した細胞も R12 の細胞内移行量が減少した。これらの結果は R12 の細胞内移行に CXCR4 が関与していることを示唆する。

G タンパク質共役受容体である CXCR4 は、Gi Protein 経由でアクチンの再構築を誘導することが知られている。そこで CXCR4 ノックダウン細胞を R12 で刺激し、phalloidin-TRITC を用いて重合化したアクチンをコントロール細胞と比較した。結果、CXCR4 ノックダウン細胞では、R12 の刺激によるアクチン重合化が阻害された。次に Gi Protein を介したシグナルが R12 ペプチドの取り込みに関与しているかに関して検討した。Gi Protein の細胞内シグナルを阻害する Pertussis Toxin で処理した細胞は R12 の取り込み量が 30%程度低下した。これらのことから CXCR4 は膜透過ペプチド R12 の受容体として機能し、これらの結合が起点となりマクロピノサイトーシスが誘起されることで、R12 は細胞内に効率的に移行している可能性が示された。また、非常に興味あることに、R12 に較べアルギニン数が少ない R8 などではこの受容体の活性化

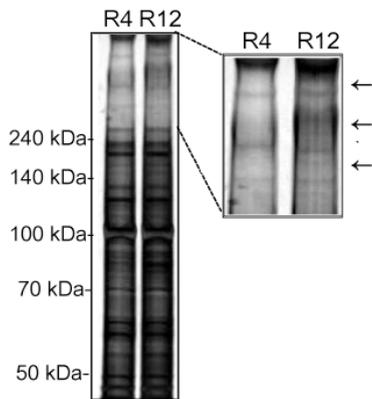


図2. SDS-PAGEによるR12と架橋されたタンパク質の同定

は起こらなかった。この結果は、アルギニンペプチドの細胞内移行に伴うマクロピノサイトーシスの誘導機序は単一のものではなく、複数の経路が関与していることを示唆するものである。

上記の結果に加え、本研究では、アルギニンペプチドの細胞内動態とペプチドにより誘導される細胞内情報伝達に関して、ペプチド内のアルギニン数が非常に重要であり、細胞表面への親和性の高さがマクロピノサイトーシスの誘導と細胞内取り込みに非常に重要な働きをすることを明らかとした。更に上記のように、アルギニンペプチドの細胞内移行にはマクロピノサイトーシスをはじめとする生理的取り込み機序が関与することが明らかとなった反面、これで説明出来ない様々な現象も観察された。例えば、エンドサイトーシスはATPなどのエネルギーを利用して行われる過程であり、低温では休止する。ところが、蛍光ラベルしたアルギニンペプチドを低温条件下に細胞と処理すると、37°Cでインキュベートした時とは異なり、細胞全体に拡散したペプチドのシグナルが観察される。この条件下においては、形質膜の顕著な損傷は見られず、形質膜との直接相互作用により、アルギニンペプチドが直接サイトゾルへ移行したことが考えられた。このようにサイトゾルへのペプチドの直接移行を示唆する結果は、たとえば、血清欠失条件下、あるいは高濃度のペプチド存在下、あるいは配列中のアルギニン数が多くなるにしたがい顕著に認められ、形質膜とペプチドの相互作用が強まる条件下では、アルギニンペプチドは形質膜を直接透過する可能性を示唆するものである(図3)。

以上、本研究では、ペプチドを化学的プローブとして用いることにより、アルギニンペプチドの細胞内移行や膜透過、またこれに伴う細胞への物質取り込みに関する新しい知

見を得ることが出来た。特に従来、不明であったアルギニンペプチドの受容体として、ケモカイン受容体であるCXCR4が同定出来たことは非常に有意義な結果であり、今後の詳細な検討により、アルギニンペプチドの細胞との相互作用と情報伝達経路、また、これにより誘起される細胞取り込み機序が明らかとなることが期待され、また、この経路を活性化することで新規の薬物投与方法が生まれるかも知れない。ペプチドと細胞との相互作用様式は単一のものではなく、様々な条件によって変化することも明らかとなり、これらの取り込み様式や細胞との相互作用を詳細に検討することで、新しい細胞応答の概念の発見につながることを期待される。

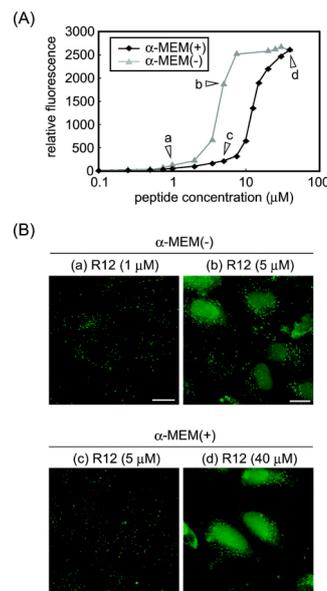


図3. アルギニンペプチドの細胞内移行様式はペプチド濃度や血清の存在により顕著な影響を受け、条件に応じて細胞膜を直接透過する：(A)血清の有無における細胞へのR12の取り込み量；(B)濃度依存的なサイトゾルへの拡散

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

〔雑誌論文〕(計6件)(すべて査読有)

- ① Nakase I, Hirose H, Tanaka G, Tadokoro A, Kobayashi S, Takeuchi T, Futaki S. Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient internalization via macropinocytosis. *Mol. Ther.*, 2009, 17, 1868-76
- ② Takayama K, Nakase I, Michiue H, Takeuchi T, Tomizawa K, Matsui H, Futaki S. Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J.*

Control. Release, 2009, 138, 128-33

- ③ Watkins CL, Brennan P, Fegan C, Takayama K, Nakase I, Futaki S, Jones AT. Cellular uptake, distribution and cytotoxicity of the hydrophobic cell penetrating peptide sequence PFVYLI linked to the proapoptotic domain peptide PAD. *J. Control. Release*, 2009, 140, 237-44.
- ④ Watkins CL, Schmaljohann D, Futaki S, Jones AT. Low concentration thresholds of plasma membranes for rapid energy-independent translocation of a cell-penetrating peptide. *Biochem. J.*, 2009, 420, 179-89.
- ⑤ Takayama K, Tadokoro A, Pujals S, Nakase I, Giralt E, Futaki S. Novel system to achieve one-pot modification of cargo molecules with oligoarginine vectors for intracellular delivery. *Bioconjug. Chem.*, 2009, 20, 249-57.
- ⑥ Kosuge M, Takeuchi T, Nakase I, Jones AT, Futaki S. Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug. Chem.*, 2008, 19, 656-64.

[学会発表] (計 9 件) (すべて招待講演)

- ① Futaki S. Cellular dynamics involved in the internalization of arginine-rich cell penetrating peptides, 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium, 2009.11.10, Jeju, Korea
- ② Futaki S. Chemical and Biological Factors that Affect the Internalization of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides, Fifth Peptide Engineering Meeting (PEM5), 2009.10.27, Barcelona, Spain
- ③ 二木 史朗. アルギニンペプチドと細胞膜との相互作用, 第 82 回日本生化学会大会, 2009.10.22, 神戸
- ④ Futaki S. Chemical and Biological Factors that Affect the Internalization of Arginine-Rich Cell-Penetrating Peptides, PepVec2009 Meeting on "Intracellular Delivery of Therapeutic Molecules: From Bench to Bedside", 2009.9.1, Montpellier, France

- ⑤ 二木 史朗. アルギニンペプチドを用いた蛋白質の細胞内導入, 第 15 回日本遺伝子治療学会, 2009.7.9, 大阪大学
- ⑥ Futaki S. Arginine-rich peptides as a vector of intracellular delivery, 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 2008.9.12, Zurich, Switzerland
- ⑦ Futaki S. Cellular dynamics of cell penetrating peptides, 2nd International Symposium "Cellular Delivery of Therapeutic Macromolecules 2008", 2008.6.24, Cardiff, UK
- ⑧ 二木 史朗. アルギニンペプチドの細胞内移行のダイナミクス, 第 14 回日本遺伝子治療学会学術集会, 2008.6.14, 札幌
- ⑨ Futaki S. Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms, Biochemical Society Focused Meeting, 2007. 5. 10, Telford, UK

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

研究室ホームページ:

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

新聞掲載

知の最前線 13・京大附置研究所センターの人々 (読売新聞平成 20 年 2 月 29 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二木 史朗 (FUTAKI SHIROH)

京都大学・化学研究所・教授

研究者番号: 50199402

(2) 研究分担者

中瀬 生彦 (NAKASE IKUHIKO)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号: 40432322