

平成22年 6月 9日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790404

研究課題名（和文）効果的な薬物送達を目指した塩基性ペプチドによる
細胞質内移行メカニズムの解明研究課題名（英文）The investigation of cytosolic uptake mechanisms for basic
amino acid-rich peptides to the effective drug delivery

研究代表者

奥田 明子（田所 明子）(OKUDA AKIKO)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号：60454584

研究成果の概要（和文）：HIV-1 Tat やオリゴアルギニンなどの塩基性ペプチドは、主に通常物質取り込み経路であるエンドサイトーシスにより細胞内へ導入されることが既に知られている。しかし、細胞質への移行をリアルタイムで示した例はない。そこで本課題では、細胞質内に移行したペプチドを検出する為に、蛍光タンパク質クサビラグリーンの再構成系を応用した。導入から約 5～8 時間後に、クサビラグリンによる蛍光が細胞全体に拡散する様子を共焦点顕微鏡で捉えることに成功した。

研究成果の概要（英文）：The endocytic pathways has recently been demonstrated in the major cellular uptake of the basic amino acids-rich peptides, including HIV-1 Tat and oligoarginine. But the cellular uptake into the cytosol has not been demonstrated by real time monitoring. In this study, I established the detection system of the peptides into the cytosol using a split Kusabira Green complementation assay. The fluorescence derived from the Kusabira Green could be observed by confocal laser scanning microscopy in whole cell by adding the oligoarginine-Kusabira Green fragment to the cell culture media for 5-8 hours.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：境界医学・ドラッグデリバリー

キーワード：ドラッグデリバリー、塩基性ペプチド

1. 研究開始当初の背景

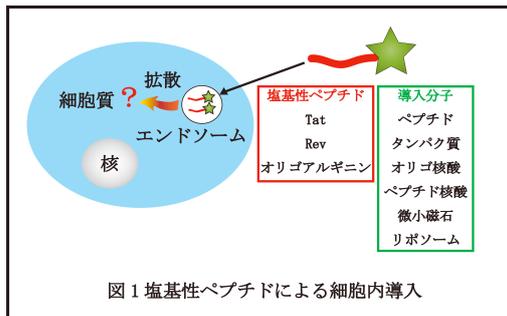
HIV-1 Tat タンパク質の 48-60 位 (Tat ペプチド、GRKKRRQRRRPPQ) やオリゴアルギニンなどの塩基性ペプチドはペプチド

単独でも、あるいは他の物質にコンジュゲーションさせても細胞内へ移行できることが知られている。その導入経路としてエンドサイトーシスが知られていたが、生理活性物質

を導入すると細胞内で活性がみられることから、細胞質へ移行する経路の存在が示唆されていた。しかし、これまでにペプチドや導入物質の細胞質内への拡散を、生細胞でリアルタイム観察した例は存在しない。一方、ペプチドを蛍光ラベルにより修飾し、細胞内への移行量をFACS解析などにより求めた場合、エンドソーム内に留まったままのペプチドと細胞質へ移行したペプチドの総和を細胞内移行量として測定する為、両者を区別することができない。細胞質内に拡散した塩基性ペプチドのみを検出することができれば、高効率で移行するペプチド配列や導入条件を検討し、「より効果的な薬物送達」を目指すことができる。

2. 研究の目的

薬物治療において、必要な量の薬物を必要な時間、効果的に患部に送達させることは、薬効を高めるのみならず、患部以外の部位に薬物が送達されることで生じる副作用や毒性の軽減にもつながる。故に、これらを可能とする薬物送達システムの開発が盛んに行われている。近年、膜透過性を有するペプチドを用いて、細胞内にタンパク質を導入する手法が注目されている。用いられるペプチドベクターとして、アルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸に富んだ塩基性ペプチドがある。代表的なものとしては、HIV-1 Tat タンパク質の48-60位 (Tat ペプチド, GRKKRRQRRRPPQ) や、オリゴアルギニンなどが挙げられる。塩基性ペプチドとのコンジュゲーションにより、培養細胞レベルでは数分程度でほぼ100%の細胞に目的物質を導入でき、低毒性で、様々な膜非透過性の分子を細胞内に導入可能であることが示されてきた。これら塩基性ペプチド及び導入分子は、主に通常物質の取り込み経路であるエンドサイトーシスにより細胞内へ導入される (図1)。しかし、それら導入分子の細胞質拡散に関する知見はほとんど存在しない。実際に、蛍光物質でラベルされた塩基性ペプチドを細胞に投与して、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行うと、エンドソーム内に多くのペプチドが局在し、ドット状の蛍光がみられる。顕微鏡レベルでは、このドット状の蛍光が強い為、細胞質への拡散の有無は判断できない。しかし、細胞内へ導入さ

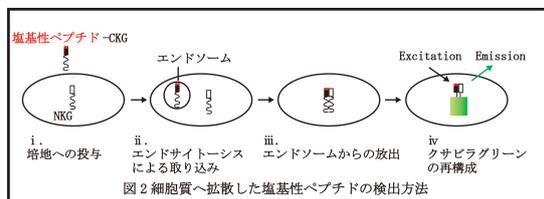


れた生理活性物質は、実際に活性を示すことが調べられている (Nakase, I., *et al. J. Mol. Recognit.* 18, 169-174 (2005))。エンドサイトーシスで取り込まれたとしても、膜を透過せずにその機能や薬効を示すことはない。よって、塩基性ペプチドは細胞質へと拡散しているはずである。しかし、現在までに、細胞質への拡散を生細胞で観察した例はない。

そこで本課題では、細胞質に拡散したペプチドを検出する方法の確立を目的とした。細胞質内に放出されたペプチドを証明する為に、タンパク質相互作用検出システムとして開発されたクサビラグリーン緑色蛍光タンパク質を用いた protein complementation assay 法を応用する。これにより、今まで未解明であった「細胞質内への移行メカニズム」を明らかにする。このメカニズムの解明は、塩基性ペプチドを薬物送達ツールとして用いる際、細胞質への拡散効率を向上させる為に大変有益な情報となる。

3. 研究の方法

細胞質内に拡散した塩基性ペプチドの検出方法の開発を行う。その為には、外から加えたペプチドがエンドソームから放出されて、細胞質内で蛍光を発するような系が望まれる。そこで、protein complementation assay 法を用いる。まず、蛍光タンパク質であるクサビラグリーンタンパク質を、N末端側断片とC末端側断片に分断する。相互作用を持ったドメインを、それぞれのクサビラグリーン断片に



融合させる。二つの断片の距離が近づくと、相互作用ドメイン同士が結合し、クサビラグリーンが再構成されて蛍光が観察される。今回は相互作用ドメインとして、NF- κ B 転写因子のDNA結合サブユニットであるp65とp50をそれぞれN末端断片とC末端断片に配置して結合ドメインとした。まず、N末端断片 (p65結合ドメインを含む) を細胞内で発現させる。次に、塩基性ペプチドを付加したC末端断片 (p50結合ドメインを含む) を調製して、細胞培養液に添加する (図2-i)。この断片がエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれ (図2-ii)、エンドソームまたは細胞膜を透過して細胞質に放出される (2-iii)。細胞質内のN末端断片と出会い、クサビラグリーンが再構成され蛍光が観察される (図2-iv)。この再構成したクサビラグリーンに由来する蛍光は、塩基性ペプチドがエンドソームまたは細胞膜を透過しなければ発せられることはない。よ

って、この蛍光を観察し、FACS 解析により定量化することで細胞質内に拡散した塩基性ペプチドの存在を証明することができる。

4. 研究成果

主な成果

(1) 共発現させたクサビラグリーン断片の再構成

CoralHue Fluo chase Kit (Amalgaam) の CoralHue monomeric Kusabira Green はイシサンゴに属するヒラタクサビライシから単離された、蛍光タンパク質 Kusabira Orange の変異体で、励起ピーク波長 494nm、蛍光ピーク波長 506nm を示し、緑色の明るい蛍光を発する。NF- κ B 転写因子の DNA 結合サブユニットである p65 と p50 をそれぞれ N 末端断片と C 末端断片に配置して結合ドメインとした。ヒト腎臓細胞由来の HEK293 細胞内で二つの遺伝子をコードするプラスミドを導入して共発現させたところ、N 末端と C 末端断片の再構成による緑色蛍光が共焦点顕微鏡により確認された (図 3 左)。また、同様に C 末端側にオリゴアルギニン (R8:RRRRRRR) を付加させた断片でも同様に再構成できることが分かった。(図 3 右) この再構成は、遺伝子導入の約 6 時間後から観察された。

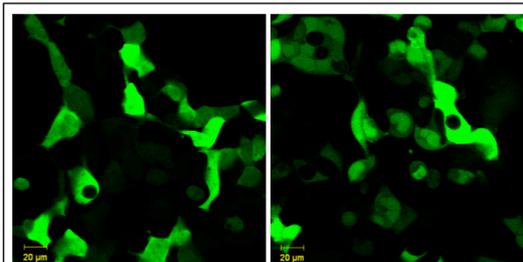


図3 N末端断片とC末端断片の共発現 HEK293細胞にN末端とC末端断片の発現プラスミドを導入 (左)、HEK293細胞にN末端とC末端断片-オリゴアルギニン (R8) の発現プラスミドを導入 (右)、37°Cでインキュベート16時間

(2) 塩基性ペプチドによる導入断片の再構成

次に、実際に細胞の外側から塩基性ペプチドを付加させた断片を加える為に、C 末端断片に精製用のヒスチジンタグと R8 を融合し、大腸菌で発現させて精製を行った (図 4 レーン中央)。また、N 末端断片を恒常的に発現する細胞を、HEK293 細胞をもとに作製し (KGN21)、精製タンパク質を培地に添加して導入を試みた (図 5)。インキュベート時間 (30 分から一晩) や培地組成 (血清の有無、PBS 緩衝液) を変化させて様々な導入条件の検討を試みたが、再構成による蛍光を検出することができなかった。原因の一つとして考えられたのは、タンパク質の精製度の低さであった。塩基性ペプチドを大腸菌内で発現後、精製を行うと、非特異的な大腸菌由来のタンパク質がみられた (図 4 中央レーン)。C 末端の

みのタンパク質にはこのような非特異的結合がほとんどみられなかった (図 4 左レーン) ことから、これらの非特異的結合は、塩基性ペプチドとの間に生じている可能性が高いことが示唆された。塩基性ペプチドが非特異的結合によりマスキングされてしまうと、細胞表面の糖鎖との結合の割合が低下し、導入量が低下した可能性が考えられた。そこで、この非特異的結合を除去する為に、溶出緩衝液の塩濃度の調整や大量のアルギニンを共存させるなど精製条件の検討を行ったが、非特異的結合を除去することができなかった。また、不溶性画分から調製も試みた。尿素で不溶性画分を溶解し、尿素の存在下で精製することができたが (図 4 右レーン)、尿素を除去するとタンパク質が溶解しきれずに析出した。よって、非変性条件下での精製度を上昇させることは困難であることが分かった。

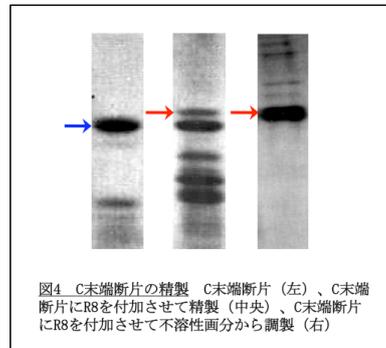


図4 C末端断片の精製 C末端断片 (左)、C末端断片にR8を付加させて精製 (中央)、C末端断片にR8を付加させて不溶性画分から調製 (右)

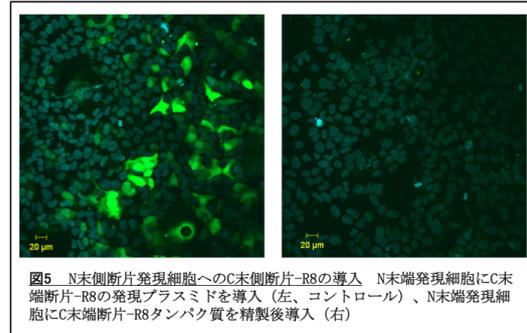


図5 N末端断片発現細胞へのC末端断片-R8の導入 N末端発現細胞にC末端断片-R8の発現プラスミドを導入 (左、コントロール)、N末端発現細胞にC末端断片-R8タンパク質を精製後導入 (右)

(3) 塩基性ペプチドによる導入断片の再構成 (精製後にペプチドを付加させた場合)

そこで、予め塩基性ペプチドを除いた C 末端領域のみを大腸菌で発現させて精製し、後から塩基性ペプチドを付加させた。このとき、塩基性ペプチドの付加には CellVader (GEヘルスケア) を用いた。CellVader は、精製したタンパク質に試験管内で塩基性ペプチドと疎水性に富んだ領域からなる 30mer のポリペプチドを疎水的に結合させることができる。このように後から塩基性ペプチドを付加

させることで、非特異的なタンパク質の結合を防ぐことができる。この方法で調製したタンパク質を用いて細胞導入を行うと、細胞内での再構成が検出された。予備実験として、細胞へ導入される C 末端断片の量を $0.3 \mu\text{M}$ ~ $30 \mu\text{M}$ まで検討したところ、 $20 \mu\text{M}$ が至適濃度であることが分かった。また、導入から 4 時間までは蛍光は検出できず、5 時間後にはわずかな蛍光が観察され、8 時間後には細胞内ではっきりと蛍光を発しているのが確認された (図 6)。また、FACS 解析により細胞内に導入されて再構成されたクサビラグリンの量を測定した (図 7)。この結果から、細胞内の蛍光強度が N 末端側のみ発現している細胞に比べて 1 細胞当たりの蛍光強度の割合が約 4 倍増加していることが分かった。

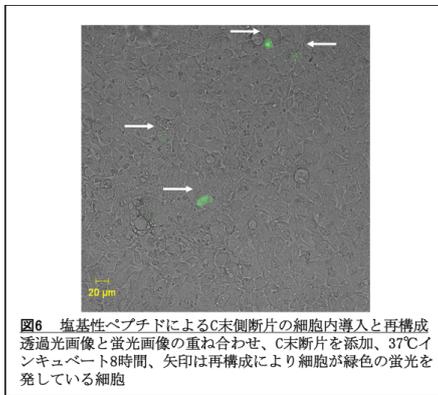


図6 塩基性ペプチドによるC末端断片の細胞内導入と再構成透過光画像と蛍光画像の重ね合わせ、C末端断片を添加、37°Cインキュベート8時間、矢印は再構成により細胞が緑色の蛍光を発している細胞

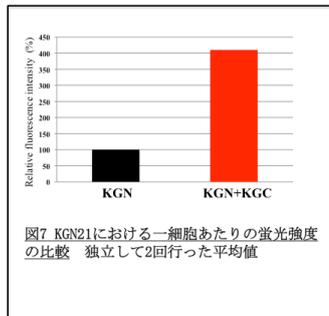


図7 KGN21における一細胞あたりの蛍光強度の比較 独立して2回行った平均値

(4) 神経幹細胞への導入

マウス胎児 (胎生 13.5 日) の線条体から神経幹細胞を分離培養した。神経幹細胞は遺伝子導入試薬による遺伝子導入の効率が低い為、Neon Transfection System (Invitrogen) によりエレクトロポレーションを行い、N 末端断片を発現するプラスミドを導入した。1 時間後に CellVader と C 末端断片の複合体を細胞に加え、37°Cで一晩培養を行った。その後、FACS 解析により細胞内の蛍光強度の比較を行った (図 8)。この結果か

ら、細胞内の蛍光強度が約 1.2 倍増加していることが示された。よって神経幹細胞においても、塩基性ペプチドを付加した C 末端断片が細胞内で N 末端断片と出会いクサビラグリンを再構成させ、1 細胞あたりの蛍光強度の割合が上昇したと考えられる。神経幹細胞において、塩基性ペプチドによるタンパク質導入の例はほとんど報告されていない。よって、この結果を基に今後更なる導入効率の上昇を目指す。

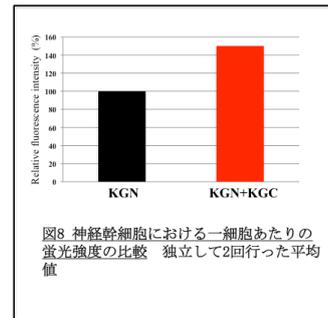


図8 神経幹細胞における一細胞あたりの蛍光強度の比較 独立して2回行った平均値

得られた成果の国内外における位置づけと今後の展望

これまでに、細胞質内へ拡散した塩基性ペプチドをリアルタイムで観察した例は存在しない。本研究では、塩基性ペプチドによって細胞内に導入されたタンパク質が、細胞質内へ移行していることをリアルタイム観察により証明することができた。また、神経幹細胞への導入も微量ではあるが確認することができた。今後更なる検討を重ねて導入効率の向上を図ることができれば、遺伝子導入に代わる強力なツールとして選択されることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ikuhiko Nakase et al. (7 人中 4 番目) Cell-surface accumulation of flock house virus-derived peptide leads to efficient internalization via macropinocytosis. *Mol. Ther.* 査読有、Vol. 17, No.11, 2009, 1868-1876
- ② Kentaro Takayama et al. (6 人中 2 番目) Novel system to achieve one-pot modification of cargo molecules with oligoarginine vectors for intracellular delivery. *Bioconjug. Chem.* 査読有、Vol. 20, No. 2, 2009, 249-257

[学会発表] (計 1 件)

奥田 明子 神経幹細胞における PARP

阻害剤の影響 日本薬学会 第130年会
2010年3月30日(岡山)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥田 明子(田所 明子)(OKUDA AKIKO)

大阪大谷大学・薬学部・助教

研究者番号: 60454584

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし