

令和 3 年 10 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07771

研究課題名(和文) ヒスチジンリッチペプチド/タンパク質の細胞内取り込み機構の統合的解明

研究課題名(英文) Analysis for cell-penetrating mechanism of histidine-rich peptide/proteins

研究代表者

岩崎 崇 (Iwasaki, Takashi)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：30585584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでにヒスチジンリッチな人工ペプチド/タンパク質が細胞内に効率的に取り込まれることを発見した。そこで本研究では、天然のヒスチジンリッチペプチド/タンパク質であるピロリ菌HpnとマラリアHRP2に着目した。ピロリ菌Hpnは、アミロイド様繊維を形成することが知られているが、本研究においてヒト胃上皮癌細胞に対してトランスサイトーシスを示したことから、胃から血中に移行する可能性が示唆された。一方で、マラリアHRP2は様々なヒト細胞に取り込まれた後に、細胞毒性を示したことから、毒性因子であると推測された。すなわち、ピロリ菌HpnとマラリアHRP2は病原性因子として機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ピロリ菌HpnとマラリアHRP2が細胞内に取り込まれた後に、病原性因子として機能する可能性を明らかにした。これらのヒスチジンリッチペプチド/タンパク質を標的分子として考えることで、ピロリ菌やマラリア原虫感染症に対する新たな治療方針を開拓することができる。また、ピロリ菌HpnやマラリアHRP2以外の天然のヒスチジンリッチペプチド/タンパク質についても、同様に細胞内に取り込まれる可能性を示唆することができた。今後は、他種のヒスチジンリッチペプチド/タンパク質についてさらなる調査をすることで、新たな現象の発見につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, we found that synthesized histidine-rich peptide/proteins are efficiently internalized into mammalian cells. This finding suggests the possibility that natural histidine-rich peptide/proteins also show cellular uptake.

In this study, we focused on histidine-rich peptide (Hpn) and histidine-rich protein (HRP2) derived from *Helicobacter pylori* and *Plasmodium falciparum*, respectively. The Hpn has been known to form amyloid-like oligomer and thought as a pathogenicity factor for Alzheimer's disease. Interestingly, here, the Hpn showed cellular uptake and transcytosis in the human gastric epithelial tumor cells. On the other hand, the HRP2 also showed cellular uptake in various human cell lines and cytotoxic effects on human fibrosarcoma. These findings suggest a possibility that the Hpn and HRP2 play as a pathogenic factor in the human body.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ヒスチジン 細胞膜透過 トランスサイトーシス 細胞毒性 病原性因子 ピロリ菌 マラリア



#### (4) ヒスチジンリッチペプチド/タンパク質の細胞内取り込みの解析

哺乳動物細胞を 0.05% トリプシン (0.53 mM EDTA 含有) 処理にて剥離させ、適した培地に懸濁することで細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を  $2.0 \times 10^4$  cells/mL となるように細胞密度を調整し、24 well マルチプレート (TrueLine) に  $1.0 \times 10^4$  cells/well となるように播種し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。次いで、各 well の細胞を滅菌 PBS で 2 回洗浄し、新しい培地に交換した。蛍光修飾したピロリ菌 Hpn、マラリア HRP2、BSA を終濃度 0.1~1.0 μM になるよう添加し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 3~24 時間培養した。任意時間のインキュベーション後に、各 well の培地を除去し、滅菌 PBS で 2 回洗浄した後に、0.05% トリプシン (0.53 mM EDTA 含有) を 500 μL/well 添加し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 5 分間インキュベーションした。剥離した細胞を懸濁し、あらかじめ調製しておいた 1 mL の FACS buffer (2% FBS 含有 PBS) と混合し、遠心分離 (4°C、500×g、5 min) にて細胞を回収した。上清を除去し、細胞を 500 μL の FACS buffer で懸濁した後に、BD FACScanto II フローサイトメーター (日本ベクトン・ディッキンソン) にて、細胞内の蛍光量、すなわち細胞内に取り込まれたペプチド・タンパク質量を定量した。

さらに、上記のフローサイトメーター解析に加え、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV10i-LIV: OLYMPUS) を用いて細胞内取り込みを観察した。細胞懸濁液を  $2.0 \times 10^4$  cells/100 μL/well となるように 35 mm glass bottom dish (松浪硝子工業株式会社) に播種し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。その後、新しい培地に交換し、蛍光修飾したピロリ菌 Hpn、マラリア HRP2、BSA を終濃度 1.0 μM になるよう添加し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。その後、Hoechst33342 (同仁化学) を終濃度 1 μg/well となるように添加し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 1 時間培養し、細胞の核を染色した。各 well の培地を除去し、滅菌 PBS で 2 回洗浄した後に、新しい培地に添加した細胞を共焦点レーザー走査型顕微鏡にて観察した。

#### (5) ヒスチジンリッチペプチド/タンパク質の細胞毒性の評価

哺乳動物細胞を 0.05% トリプシン (0.53 mM EDTA 含有) 処理にて剥離させ、適した培地に懸濁することで細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を  $1.0 \times 10^4$  cells/well となるように、96well マルチプレート (TrueLine) に播種し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 24 時間培養した。その後、新しい培地に交換し、ピロリ菌 Hpn、マラリア HRP2、BSA を終濃度 0.5~5.0 μM となるように添加してから、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で 3~24 時間インキュベーションした。その後、細胞の培地を除去し、新しい培地と Cell Counting Kit-8 (Wako) を 9:1 の割合で混合したものを各 well に 100 μL ずつ添加し、37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間インキュベーションした。その後、マイクロプレートリーダー (Infinite 200 pro: TECAN) にて 450 nm の吸光度を測定することで、細胞生存率を測定した。

#### (6) ピロリ菌 Hpn の細胞外分泌の解析

HGC-27 細胞を 0.05% トリプシン (0.53 mM EDTA 含有) 処理にて剥離させ、MEM 培地に懸濁することで細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を  $5.0 \times 10^5$  cells/well となるように 6 well マルチプレート (TrueLine) に播種した後、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で 24 時間培養した。その後、新しい培地に交換し、蛍光修飾したピロリ菌 Hpn と BSA を終濃度 1.0 μM となるように添加してから、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で 24 時間インキュベーションした。滅菌 PBS 1 mL で細胞を 2 回洗浄した後、新しい培地 500 μL に交換し、再び 5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で 24 時間インキュベーションした。その後、培地をサンプルチューブに回収し、遠心分離 (500×g、15 min) にて培養上清を回収した。培地上清をスピン・エックス 0.22 μm (Corning International, Inc.) を用いて遠心 (12,000×g、10 min) し、不溶物や細胞の破片を除去した。培養上清を FRD-51 (IWAKI) にて凍結乾燥させた。凍結乾燥物を RIPA Buffer { 50 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.1% SDS、1% TritonX-100、1% Sodium deoxycholate } 150 μL に溶解し、96 well black plate に分注した後、蛍光マイクロプレートリーダー (Infinite 200 pro: TECAN) にて緑色蛍光強度を測定した。この操作により、細胞に取り込まれた後に細胞外分泌されたペプチド/タンパク質を検出・定量した。

#### (7) マラリア HRP2 の細胞毒性メカニズムの解析

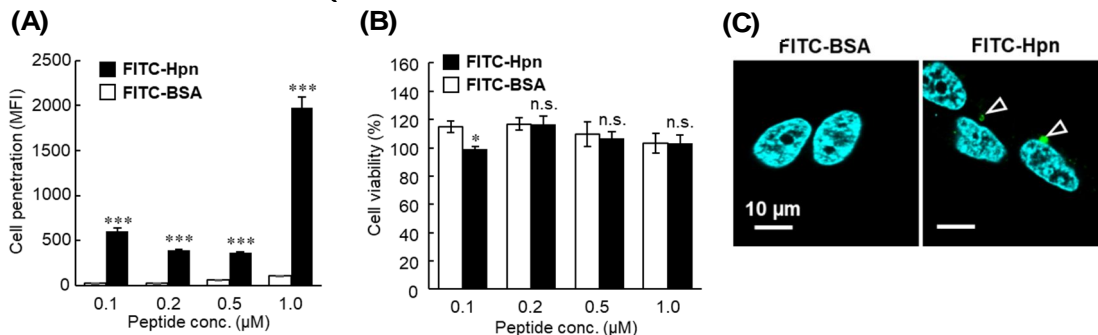
HT1080 細胞を 0.05% トリプシン (0.53 mM EDTA 含有) 処理にて剥離させ、MEM 培地に懸濁することで細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液を  $5.0 \times 10^4$  cells/well となるように 24 well マルチプレート (TrueLine) に播種した後、5.0% CO<sub>2</sub>、37°C の条件で 24 時間培養した。その後、細胞の培地を新しい培地に交換し、マラリア HRP2 を終濃度 1.0 μM となるように添加した。37°C、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 12~60 時間培養した。マラリア HRP2 処理を行った細胞に対して、1×SDS-PAGE サンプルバッファーを 300 μL/well 添加し、10 分間静置することで細胞を溶解した。細胞溶解液を、熱湯中で 3 分間熱処理し、12% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE に供した。次いで、PVDF 膜に転写させた後に、抗 p62 抗体および抗 GAPDH 抗体を用いた Western blotting を実施した。p62 (Sequestosome1) は細胞内のオートファジーマーカー物質である一方、GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) は恒常的に発現しているハウスキーピングタンパク質である。ゆえに、GAPDH タンパク質量に対して、p62 タンパク質量の相対的变化を調べることで、細胞内のオートファジー活性の増減を評価することができる。本研究では、上記手法により、マラリア HRP2 が細胞内オートファジー活性に与える影響を調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) ピロリ菌 Hpn の細胞内取り込みと細胞外分泌

本研究では、自然界に存在するヒスチジンリッチペプチドとして、ピロリ菌が産生する Hpn に着目し、細胞内取り込みとその後の細胞外分泌の解明を試みた。

ピロリ菌 Hpn は、胃の中でピロリ菌から分泌され、胃上皮細胞と接触することから、ヒト胃上皮癌細胞株である HGC-27 細胞を使用して、ピロリ菌 Hpn の細胞内取り込みを調べた。蛍光標識したピロリ菌 Hpn を HGC-27 細胞に添加し、フローサイトメーターにて細胞内蛍光を測定したところ、ピロリ菌 Hpn 終濃度 1.0 μM 処理細胞において、細胞内蛍光強度の上昇が確認された (図 2A)。一方で、コントロールとして使用した蛍光標識 BSA では、細胞内蛍光強度の上昇は認められなかったことから、ピロリ菌 Hpn は HGC-27 細胞に取り込まれることが示唆された。この際、ピロリ菌 Hpn は終濃度 0.1~1.0 μM の濃度領域において、HGC-27 細胞に対して細胞毒性は一切示さなかったことから、ピロリ菌 Hpn の細胞内取り込みは細胞傷害に起因するものではないことが確認された (図 2B)。さらに、共焦点レーザー走査型顕微鏡観察においても、ピロリ菌 Hpn は細胞内に取り込まれていることが確認された (図 2C)。



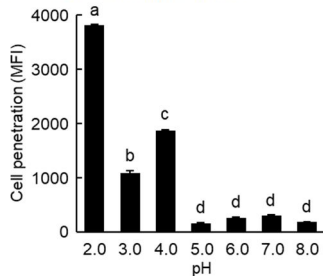
#### 図 2. ピロリ菌 Hpn の細胞内取り込み

ヒト胃上皮癌細胞 HGC-27 に対して、蛍光修飾した FITC-Hpn と FITC-BSA を終濃度 0.1~1.0 μM で 24 時間処理した際の (A) 細胞内取り込みと (B) 細胞生存率を示す。三反復測定 of 平均値を表す (±S.D.)。FITC-Hpn と FITC-BSA 間の有意差検定を Student's *t*-test により行なった (\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , n.s.: not significant)。 (C) FITC-Hpn および FITC-BSA を終濃度 1.0 μM、24 時間処理した際の HGC-27 細胞の共焦点レーザー走査型顕微鏡写真を示す。青色蛍光は核、緑色蛍光 (矢頭) は FITC-Hpn を示す。

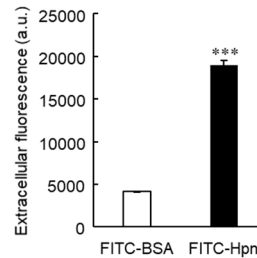
ピロリ菌が常在している胃の中は、胃液により強酸性の環境が形成されていることから、ピロリ菌 Hpn の細胞内取り込みが pH 条件によってどのような影響を受けるのか、特に酸性条件下ではどのように変化するかを調べた。その結果、酸性（低 pH）条件であるほど、ピロリ菌 Hpn は効率的に HGC-27 細胞内に取り込まれることが確認された（**図 3**）。すなわち、胃内環境において、ピロリ菌 Hpn はよく細胞内に取り込まれている可能性が強く示唆された。

一度、HGC-27 細胞内に取り込まれたピロリ菌 Hpn が、再び細胞外に分泌される可能性を明らかにするために、ピロリ菌 Hpn の細胞外分泌量を測定した。ピロリ菌 Hpn を HGC-27 細胞内に取り込ませた後、細胞を洗浄し、新しい培地に交換し、培養上清に分泌されたピロリ菌 Hpn の蛍光検出を試みた。その結果、蛍光標識した BSA (FITC-BSA) を添加した細胞と比較して、蛍光標識したピロリ菌 Hpn (FITC-Hpn) を添加した細胞の培養上清において、蛍光強度の有意な上昇が確認された（**図 4**）。このことから、ピロリ菌 Hpn は HGC-27 細胞に取り込まれた後に、細胞外へ分泌されることが確認された。

以上の解析より、胃の中で分泌されたピロリ菌 Hpn は、胃の上皮細胞に取り込まれ、さらに細胞外へと分泌されている可能性が示唆された。このことは、体外（体表）のピロリ菌 Hpn が体内（血中）へと取り込まれる可能性を示唆するものである。本発見より、『ピロリ菌が産生した Hpn が体内に移行して、脳内でアミロイド様線維を形成することでアルツハイマー病が誘導される』という従来の仮説が真実味を帯びてきた。今後の展望として、ピロリ菌 Hpn が血液脳関門を透過するかを明らかにすることで、ピロリ菌 Hpn を原因物質としたアルツハイマー病発症メカニズムの解明につながることを期待される。



**図 3 . 低 pH 条件におけるピロリ菌 Hpn 細胞内取り込みの促進**  
ヒト胃上皮癌細胞 HGC-27 に対して、蛍光修飾したピロリ菌 Hpn (FITC-Hpn) を終濃度 1.0  $\mu$ M、pH2.0~7.0 の条件において、24 時間処理した際の細胞内取り込みを示す。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$ S.D.)。Tukey's test により有意差検定を行った。異符号間は 5%水準で有意差を示す。



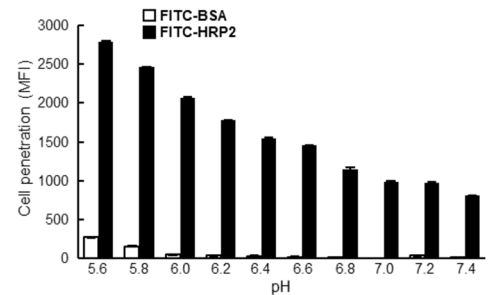
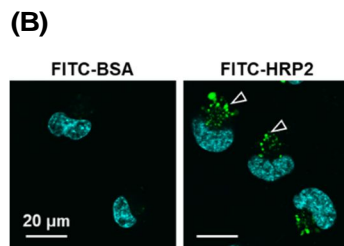
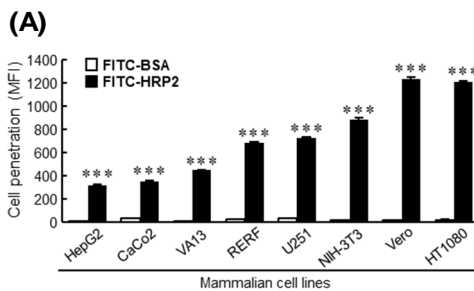
**図 4 . ピロリ菌 Hpn の細胞内取り込み後の細胞外分泌**  
ヒト胃上皮癌細胞 HGC-27 に対して、蛍光修飾したピロリ菌 Hpn (FITC-Hpn) を終濃度 1.0  $\mu$ M、24 時間処理した。その後、細胞を洗浄し、新しい培地中で 24 時間培養した際の培養上清の蛍光強度を示す。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$ S.D.)。FITC-Hpn と FITC-BSA 間の有意差検定を Student's t-test により行った (\*\*\*)。p<0.001。

## (2) マラリア HRP2 の細胞内取り込みと細胞毒性

本研究では、自然界に存在するヒスチジンリッチタンパク質として、熱帯熱マラリア原虫が産生する HRP2 にも着目し、細胞内取り込みとその後の細胞に与える影響の解析を試みた。

マラリア HRP2 は、熱帯熱マラリア原虫がヒト赤血球に感染した際に、ヒト血中に多量に放出されるタンパク質である。ゆえに、様々な組織の細胞と接触する可能性が考えられたため、哺乳動物の様々な組織由来細胞株を使用して、マラリア HRP2 の細胞内取り込みを検証した。その結果、マラリア HRP2 はヒト線維肉腫細胞 HT1080 やサル腎臓癌細胞 Vero に効率的に取り込まれることが明らかになった（**図 5A**）。この際の細胞内取り込みは、3 時間という比較的短い時間で起きる現象であることを確認した。さらに、共焦点レーザー走査型顕微鏡観察においても、マラリア HRP2 は HT1080 細胞内に取り込まれていることが確認された（**図 5B**）。そこで、以降の解析では、ヒト由来の HT1080 細胞株を標準細胞株として使用した。

次いで、マラリア HRP2 の細胞内取り込みメカニズムの解析を試みた。その結果、低 pH 条件ほどマラリア HRP2 は HT1080 細胞に効率的に取り込まれることが明らかになった（**図 6**）。マラリア HRP2 はヒスチジン残基を豊富に含んでおり、このヒスチジン残基は低 pH 条件下（特に pH6.0 以下）で正電荷を帯びる。ゆえに、マラリア HRP2 の細胞内取り込みには正電荷が重要であることが示唆された。さらに、血清存在下においては、マラリア HRP2 の細胞内取り込みは阻害されることが明らかになった（**図 7A**）。この理由を明らかにするため、マラリア HRP2 と血清の相互作用を調べたところ、マラリア HRP2 は血清タンパク質と結合することが確認された（**図 7B**）。よって、マラリア HRP2 の細胞内取り込み、血中の pH 条件や血清濃度に影響を受けることが確認された。



**図 5 . マラリア HRP2 の細胞内取り込み**

(A) 8 種の哺乳動物細胞に対して、FITC-HRP2 および FITC-BSA を終濃度 1.0  $\mu$ M、3 時間処理し、その後フローサイトメーターを用いて細胞内取り込みを測定した。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$ S.D.)。FITC-Hpn と FITC-BSA 間の有意差検定を Student's t-test により行った (\*\*\*)。p<0.001。HepG2: ヒト肝臓癌細胞、CaCo-2: ヒト大腸癌細胞、VA13: ヒト肺癌細胞、RERF: ヒト肺扁平上皮癌細胞、U251: ヒト神経膠腫細胞、NIH-3T3: マウス線維芽細胞、Vero: サル腎臓癌細胞、HT1080: ヒト線維肉腫細胞。(B) FITC-HRP2 および FITC-BSA を終濃度 1.0  $\mu$ M、3 時間処理した際の HT1080 細胞の共焦点レーザー走査型顕微鏡写真を示す。青色蛍光は核、緑色蛍光 (矢頭) は FITC-HRP2 を示す。

**図 6 . 低 pH 条件におけるマラリア HRP2 細胞内取り込みの促進**

pH5.6~7.4 の異なる pH 条件下にて、HT1080 細胞に対して、FITC-HRP2 および FITC-BSA を終濃度 1.0  $\mu$ M、3 時間処理し、その後フローサイトメーターを用いて細胞内取り込みを測定した。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$ S.D.)。

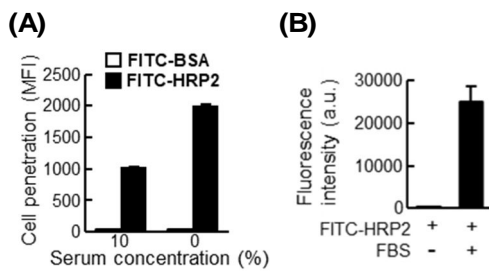
また興味深いことに、0.5~5.0  $\mu$ M の濃度領域においてマラリア HRP2 の細胞内取り込みをフローサイトメーターにて調べたところ、3.5  $\mu$ M 以上の濃度条件において死細胞が過剰に発生してしまい、細胞内取り込みを調べることができなかった（**図 8A&B**）。この結果から、マラリア HRP2 は細胞内に取り込まれると同時に、または取り込まれた後に細胞毒性を示している可能性が示唆された。

そこで、マラリア HRP2 の終濃度を 1.0  $\mu$ M (3 時間では問題なく細胞内取り込みが確認される濃度) に固定し、HT1080 細胞に対して 3~24 時間処理した後に細胞生存率を測定した。その結果、マラリア HRP2 を 12 時間以上処理した HT1080 細胞において細胞毒性が確認された（**図 9A**）。このことから、マラリア HRP2 は細胞内に取り込まれた後に細胞毒性を示すことが明らかになった。さらに、実際に熱帯熱マラリア原虫が感染したヒト血中のマラリア HRP2 濃度 (30~100 nM) と同じ濃度領域においてマラリア HRP2 の細胞毒性を評価した。その結果、終濃度 90~100 nM のマラリア HRP2 で 5 日間処理した HT1080 細胞において、細胞毒性が確認されたことから、マラリア HRP2 はヒト血中内の濃度においても細胞毒性を示すことが明らかになった（**図 9B**）。これらの結果から、マラリア HRP2 は熱帯熱マラリアの新たな毒性因子であることが確認された。

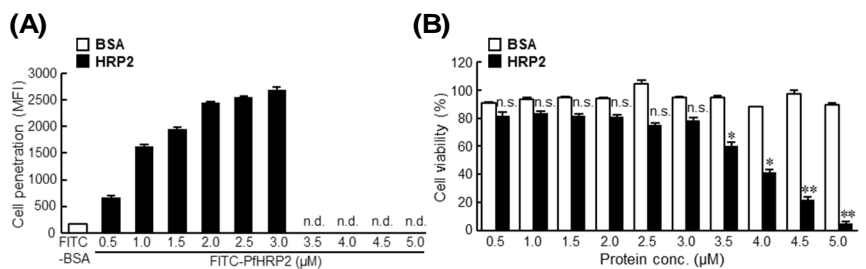
さらに、血清非存在下においてマラリア HRP2 は非常に強い細胞毒性を示すことも確認された (図 10)。この結果は、例えば栄養失調状態のような、ヒト血中の血清タンパク質濃度が低下した状態では、マラリア HRP2 の危険性が高まることを示唆しており、実際に栄養失調状態ではマラリア感染による致死率が高まるという事実と一致する。以上の発見から、マラリア HRP2 は熱帯熱マラリアの病原性に関与しているタンパク質であることが推測される。

マラリア HRP2 の細胞毒性メカニズムを明らかにするために、マラリア HRP2 が細胞毒性を示す条件 (終濃度: 1.0  $\mu$ M、処理時間: 24 時間) において、HT1080 細胞の形態を観察した。しかしながら、未処理細胞と比較して、マラリア HRP2 処理をした HT1080 細胞では明確な形態変化が観察されなかった (図 11A)。このことから、マラリア HRP2 は形態変化を伴う細胞死 (アポトーシスやネクローシス) を誘導しているわけではなく、細胞増殖の阻害または遅延を誘導している可能性が示唆された。そこで、マラリア HRP2 の HT1080 細胞の細胞内局在を観察したところ、細胞内のリソソームに集積していることが確認された (図 11B)。リソソームは細胞内の老廃物の分解を担う細胞小器官であり、細胞内のオートファジーに密接に関与していることが知られている。このことから、マラリア HRP2 が細胞内リソソームに集積し、オートファジーに影響を与えることで細胞毒性を示している可能性が示唆された。そこで、オートファジーマーカーである p62 タンパク質量を指標として、マラリア HRP2 を処理した HT1080 細胞におけるオートファジー活性を調べた結果、マラリア HRP2 はオートファジーを阻害していることが明らかになった (図 11C)。細胞の恒常性を維持するために、正常時においてもオートファジーは起きていることが知られており、マラリア HRP2 はこの基底状態のオートファジーを阻害することで、細胞毒性を示している可能性が示唆された。

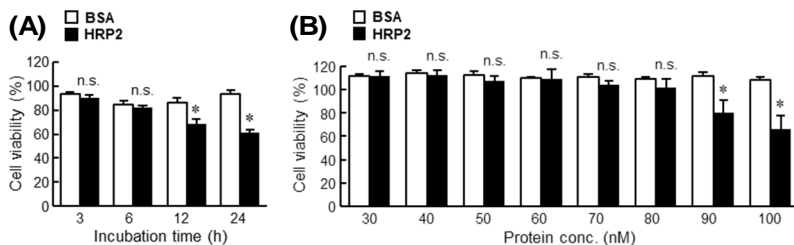
以上の解析より、熱帯熱マラリアが産生する HRP2 は、細胞に取り込まれた後にオートファジーを阻害することで細胞毒性を示すことが明らかとなった。また、血清タンパク質濃度の減少によってマラリア HRP2 の細胞毒性は増強することも明らかになった。本研究結果は、熱帯熱マラリアの病原性にマラリア HRP2 が関与している可能性を強く示唆するものである。マラリア HRP2 のさらなる研究を進めることで、熱帯熱マラリアの新たな治療法開発に貢献できると期待される。



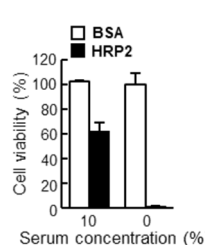
**図 7 . 血清非存在下におけるマラリア HRP2 細胞内取り込みの促進**  
(A) 血清存在下・非存在下において、HT1080 細胞に対して、FITC-HRP2 および FITC-BSA を終濃度 1.0  $\mu$ M、3 時間処理し、その後フローサイトメーターにて細胞内取り込みを測定した。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$  S.D.)。 (B) FITC-HRP2 とウシ胎児血清 (FBS) を混合し、限外濾過フィルターにて 100 kDa の分子量でカットオフした際の蛍光強度を示す。



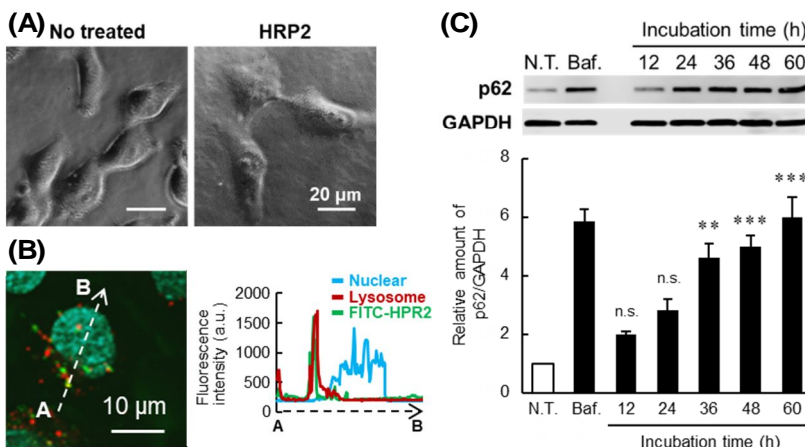
**図 8 . マラリア HRP2 の細胞内取り込みと細胞毒性**  
(A) HT1080 細胞に対して、FITC-HRP2 を終濃度 0.5 ~ 5.0  $\mu$ M、3 時間処理し、その後フローサイトメーターを用いて細胞内取り込みを測定した。n.d. (not determined) は、細胞毒性の発生により測定できなかった処理群を示す。 (B) HT1080 細胞に対して、HRP2 および BSA を終濃度 0.5 ~ 5.0  $\mu$ M、3 時間処理し、細胞生存率を測定した。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$  S.D.)。 Tukey's test により有意差検定を行った (\*:  $p < 0.05$ , n.s.: not significant)。



**図 9 . マラリア HRP2 の時間依存的な細胞毒性**  
(A) HT1080 細胞に対して、HRP2 および BSA を終濃度 1.0  $\mu$ M、3 ~ 24 時間処理した際の細胞毒性を示す。 (B) HT1080 細胞に対して、HRP2 および BSA を終濃度 30 ~ 100 nM、5 日間処理した際の細胞毒性を示す。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$  S.D.)。 Tukey's test により有意差検定を行った (\*:  $p < 0.05$ , n.s.: not significant)。



**図 10 . 血清非存在下におけるマラリア HRP2 細胞毒性の増強**  
血清存在下・非存在下において、HT1080 細胞に対して、HRP2 および BSA を終濃度 1.0  $\mu$ M、24 時間処理し、細胞毒性を測定した。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$  S.D.)。



**図 11 . マラリア HRP2 のオートファジー阻害**  
(A) HRP2 を終濃度 1.0  $\mu$ M、24 時間処理した際の HT1080 細胞の共焦点レーザー走査型顕微鏡写真 (位相差) を示す。 (B) FITC-HRP2 を終濃度 1.0  $\mu$ M、24 時間処理した際の HT1080 細胞の共焦点レーザー走査型顕微鏡写真を示す。青色蛍光は核 (Hoechst33342 染色)、赤色蛍光はリソソーム (LysoTracker-Red 染色)、緑色蛍光は FITC-HRP2 を示す。破線矢印部分の蛍光分布 (FITC-HRP2 とリソソームの共局在) を定量化したグラフを示す。 (C) HT1080 細胞に対して、HRP2 を終濃度 1.0  $\mu$ M、12 ~ 60 時間処理し、細胞内の GAPDH と p62 のタンパク質量を Western Blotting により定性解析した。N.T. は未処理細胞、Baf. は Bafilomycin A1 (オートファジー阻害剤) で処理した細胞を意味する。また、Western Blotting により検出されたバンドを Image J にて定量化し、GAPDH タンパク質量に対する相対的な p62 タンパク質量をグラフ化した。三反復測定の実験値を表す ( $\pm$  S.D.)。 Tukey's test により有意差検定を行った (\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ , n.s.: not significant)。

< 引用文献 >

[1] Iwasaki T. et al. 2015, *J. Control. Release*, 210, [2] Gilbert JV. et al. 1995, *Infect. Immun.*, 63, [3] Doulberis M. et al. 2018, *Helicobacter*, 23, [4] Ge R. et al. 2011, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1813, [5] Dondorp AM. et al. 2005, *PLoS Med.*, 2

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 T. Hayashi, R. Okamoto, T. Kawano, T. Iwasaki	4. 巻 24
2. 論文標題 Development of Organelle Replacement Therapy Using a Stearyl-Polyhistidine Peptide against Lysosomal Storage Disease Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2995
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules24162995	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 T. Hayashi, M. Shinagawa, T. Kawano, T. Iwasaki	4. 巻 501
2. 論文標題 Drug delivery using polyhistidine peptide-modified liposomes that target endogenous lysosome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 648-653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.05.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Y. Matsunaga, T. Matsukawa, T. Iwasaki, K. Nagata, T. Kawano	4. 巻 82
2. 論文標題 Comparison of physiological functions of antagonistic insulin-like peptides, INS-23 and INS-18, in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biosci. Biotechnol. Biochem.	6. 最初と最後の頁 90-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/09168451.2017.1415749	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 M. Shimoda, T. Kawano, T. Iwasaki
2. 発表標題 Histidine-rich protein: a new pathogenic factor of <i>Plasmodium falciparum</i> malaria
3. 学会等名 AFELiSA 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Inui, T. Kawano, T. Iwasaki
2. 発表標題 Transcytosis of histidine-rich peptide derived from Helicobacter pylori in gastric epithelial cells
3. 学会等名 第56回ペプチド討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下田麻由、河野 強、岩崎 崇
2. 発表標題 マラリア原虫ヒスチジンリッチタンパク質 (PfHRP2) の細胞膜透過と細胞毒性に関する研究
3. 学会等名 2019年度日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Shimoda, T. Kawano, T. Iwasaki
2. 発表標題 Malaria Histidine-Rich Protein Shows Cell Penetration and Cytotoxicity
3. 学会等名 AFELiSA 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 T. Iwasaki
2. 発表標題 Development of Cell-Penetrating Peptides as Molecular Delivery Carriers for Human Health and Plant Breeding
3. 学会等名 AFELiSA 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩崎 崇
2. 発表標題 細胞膜透過ペプチド『ポリヒスチジン』の発見と動物・植物細胞に対する応用研究
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 第26回若手研究者シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------