

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860400

研究課題名(和文) サイトゾルにおける膜透過性ペプチド(CPP)のリアルタイムイメージング

研究課題名(英文) Real-time imaging of cell penetrating peptide (CPP) in the cytosol

研究代表者

奥田 明子(田所明子)(Okuda, Akiko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60454584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜透過ペプチドは、細胞内へと様々な分子を導入することができる。しかし、それらの主な細胞内移行経路はエンドサイトーシスであり、導入物質の多くはエンドソーム内に留まる。本研究では、HEK293細胞のサイトゾルへ緑色蛍光物質(EGFP)および抗体(IgG)を移行させることができるペプチド配列を見出した。更に、このサイトゾルへの移行にはエンドサイトーシスが関与していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Cell-penetrating peptides (CPPs) can enter cells with cargo. However, endocytosis plays a major role in their uptake and keep most of CPP-cargo trapped in endosomes. In this study, I designed peptides which could green fluorescent protein (EGFP) and immunoglobulin (IgG) into cytosol of HEK293. Furthermore, it was indicated that cellular uptake of CPP-EGFP and cytosolic delivery occur via endocytosis.

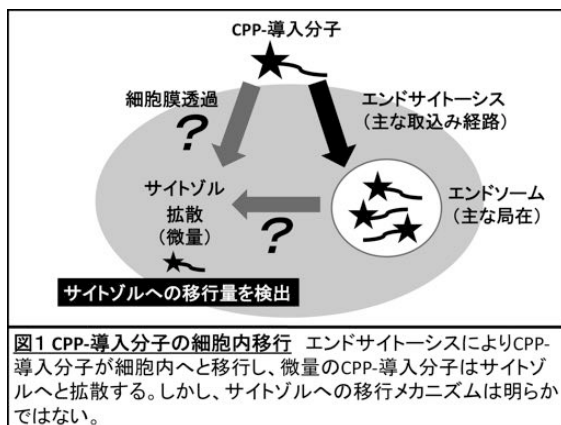
研究分野：分子生物学

キーワード：膜透過ペプチド ドラッグデリバリー エンドサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

細胞内へと高分子を導入するツールとして CPP (cell penetrating peptide) が知られている。CPP にはアルギニンやリジンなどの塩基性アミノ酸に富んだ HIV-1 Tat 由来の Tat ペプチドや、オリゴアルギニンなどが挙げられる。培養細胞レベルでは、CPP とのコンジュゲーションにより、数分程度でほぼ 100% の細胞に目的物質を導入する事ができる。これら CPP による導入分子は、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)。

蛍光物質でラベルされた CPP 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、蛍光を発する無数のドットが細胞内に点在している様子がみられる。顕微鏡レベルでは、このエンドソーム内のペプチドに由来するドット状の蛍光が強い為、サイトゾルへの拡散の有無は判断できない。しかし、CPP を生理活性物質へコンジュゲートしてから細胞に加えると、実際に生理活性反応が見られる。直接細胞膜を透過している可能性も考えられるが、エンドサイトーシスで取り込まれた場合でも、エンドソーム小胞を透過せずにその機能や薬効を示すことはない。よって、CPP により細胞内へと導入された物質は、非常に低い割合ではあるが確かにサイトゾルへと拡散しているはずであった (図 1)。研究開始当初は、この微量なサイトゾル移行をリアルタイムで捕えることを目的としていた。



2. 研究の目的

タンパク質など高分子化合物の細胞内導入方法は、生体へのドラッグデリバリーを行う際に非常に重要な技術であると言える。しかし、その導入方法については様々な性質を持つ高分子に対してマルチに対応できる方法はもとより、イメージングに汎用される GFP など分子量 2~3 万程度の蛍光タンパク質の導入法でさえ未だ模索段階である。そこで本研究では、細胞内移行ベクターとして塩基性に富んだオリゴアルギニンからなる膜透過性ペプチド (CPP) を使い、細胞内への効果的な化合物の導入方法について検討を行

う。当初の目的ではサイトゾルに移行した分子のみを検出して評価し、サイトゾルの移行効率を上げる為の検討を行うはずであった。しかし、本研究で見出した改良型膜透過ペプチド mCPP (modified CPP) は、非常に効率良くサイトゾルへと導入物質を拡散させることができることが分かった (mCPP の配列は、現在論文投稿中の為公開しない)。そこで、このペプチドの導入メカニズム及び導入物質に対する検討を行うことを目的とした。

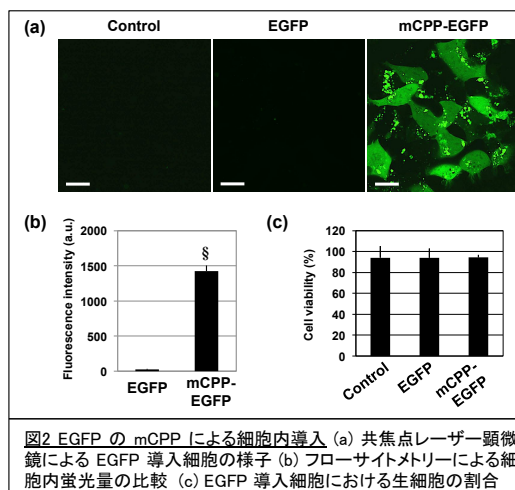
3. 研究の方法

20 μM mCPP と 15 μM EGFP を混合し、室温にて 1 時間静置した。この混合液を HEK293 細胞 (Human embryonic kidney cells) に添加し、37℃ で 45 分間培養を行った。その後 DMEM (10% 牛胎児血清を含む) 培地を加え、3 時間から 16 時間培養を行い、生細胞について共焦点レーザー顕微鏡観察またはフローサイトメトリーによる解析を行った。抗体の導入は 4 μM mCPP と 0.3 μM IgG (蛍光標識化された抗 mouse IgG 抗体または抗 Giantin 抗体) を混合し、室温にて 1 時間インキュベートを行い mCPP/IgG の複合体を形成させた。低温または阻害剤による前処理は 30 分間行い、その後、mCPP/EGFP の複合体を細胞に加えた。細胞生存率の測定には Realtime-Glo MT cell viability assay (Promega) を用いた。

4. 研究成果

(1) 改良型膜透過ペプチド (mCPP) による EGFP の導入

HEK293 細胞における mCPP-EGFP の細胞内における挙動について、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。EGFP 単独では、ほとんど細胞内に蛍光は見られなかったが、mCPP と混合した EGFP を加えた細胞では約 3 割から 5 割程度の細胞のサイトゾルおよび核に EGFP が拡散していることが分かった (図 2a)。また、フローサイトメトリー解析により EGFP の細胞内への導入量を調べたところ、EGFP 単独に比べ、mCPP と混合した EGFP を加えた場合には約 60 倍の細胞内蛍光量の増加が見られた (図 2b)。また、細胞生存率測定により



生細胞の割合を比較したところ、コントロール細胞とほぼ同等の細胞生存率を示した(図2c)。以上の結果より、mCPP-EGFPは細胞にダメージを与えることなく、サイトゾルへとEGFPを導入できることが分かった。

(2) 導入メカニズムについての解析

mCPPによるEGFPのサイトゾルへの移行経路について解析を行った。まず、細胞のエネルギー依存的な挙動をアジ化ナトリウムで前処理することで阻害し、細胞へmCPP-EGFP混合液を加えた。共焦点レーザー顕微鏡観察から、細胞の内部あるいは外部かは判別困難であったがドット状の蛍光が観察された。しかし、サイトゾルへの拡散は見られなかった。同様に低温条件下におけるmCPPによるEGFPの細胞内導入についても検討を行ったが、細胞外あるいは細胞内におけるEGFP由来の蛍光は確認されなかった。よって、mCPPによるEGFPのサイトゾルへの拡散は、細胞のエネルギー依存的な挙動を必要とすることが示され、エンドサイトーシスによる細胞内移行を示唆する結果を得た。また、アクチン細胞骨格はエンドサイトーシスにおいて重要な役割を果たしている。そこで、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシンDで前処理を行った細胞へとmCPP-EGFPを加えたところ、細胞内への移行およびサイトゾルへの拡散は観察されなかった。よって、mCPPによるEGFPの細胞内導入にはエンドサイトーシスが大きく関与しており、更にサイトゾル拡散の為に、アクチン細胞骨格が必要であることが分かった。

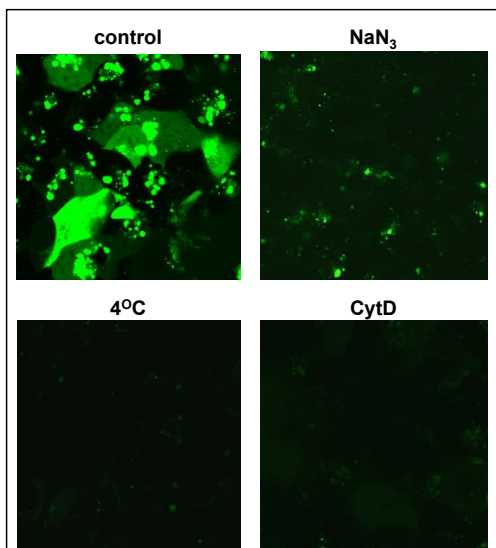


図3 mCPPによるEGFPの導入にエンドサイトーシス阻害条件が与える影響 それぞれの条件下で前処理後、mCPP-EGFPを加えて培養し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

(3) 抗体の導入

HEK293細胞において、mCPPによりEGFPがサイトゾルへと導入されることが分かった。そこで、EGFP以外的高分子にも有効であるかを調べる為に、蛍光ラベルで修飾された抗体

の導入を行った。まず、抗 mouse IgG 抗体を導入したところ、サイトゾルへと拡散している細胞が観察された(図4)。EGFPとは異なり、核への移行量は少ないようであった。これは、IgGの分子量が15万であり、核膜孔を自然拡散により通過するには大きすぎる可能性が考えられた。更に、抗 Giantin 抗体を同様に細胞へと加えた。Giantinはゴルジに存在する分子量37万のタンパク質である。共焦点レーザー顕微鏡により観察を行うと、いくつかの細胞内では導入した抗 Giantin 抗体とゴルジマーカーが共局在している様子が観察された(図5)。以上から、mCPPによるIgG抗体を細胞内へと導入することができ、抗 Giantin 抗体はゴルジマーカーと共局在したことから、細胞内でGiantinを認識し、特異的に結合できたのではないかと考えられる。今後、抗 Giantin 抗体導入後の細胞溶解液を用いた免疫沈降による証明など、細胞内における抗原に対する特異的認識の証明

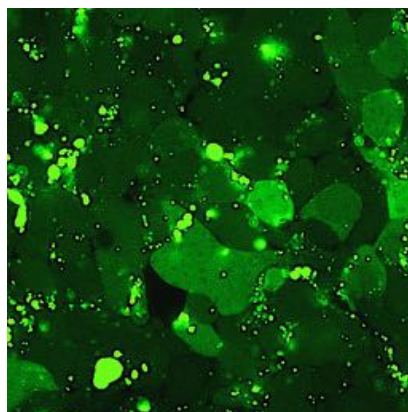


図4 mCPPによるIgGの細胞内導入 サイトゾルへ拡散している様子が観察された。

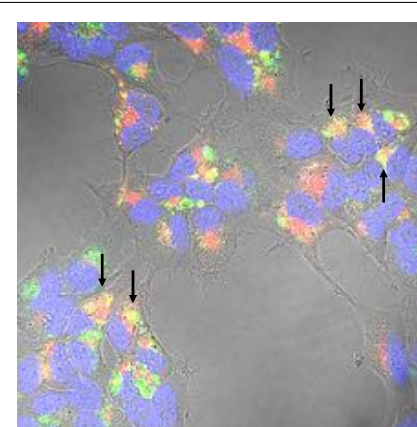


図5 mCPPによる抗 Giantin 抗体の細胞内導入 抗 Giantin 抗体(緑)、ゴルジマーカー(赤)、核(青) 矢印は抗 Giantinとゴルジマーカーが共局在している部位(黄)

には更なる検証が必要である。

本研究において、HEK293 細胞のサイトゾルへと EGFP や抗体などを導入することができる mCPP を見出すことができた。今後の展開として生体へ応用した場合、組織細胞のサイトゾルへと導入分子を確実に移行させることができるというツールは、非常に効果的であると考えられる。よって、更に様々な細胞種および生体における効果について検討を重ねることで、より効果的なドラッグデリバリーツールの一つとして期待することができるのではないかと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Akiko Okuda A new method to detect interactions between CPP-delivered protein and intracellular target protein. Institute for chemical research international symposium 2016 平成28年3月7日 (京都府・宇治市)
- ② 奥田明子 膜透過ペプチドを用いた導入タンパク質の相互作用検出方法 日本薬学会 第135年会 平成27年3月28日 (兵庫県・神戸市)

6. 研究組織

研究代表者

奥田 明子 (田所 明子) (OKUDA, Akiko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：60454584