

氏 名	たけ うち とし ひで 武 内 敏 秀
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 652 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	アルギニンペプチドの細胞内移行における直接膜透過経路

論文調査委員 (主査) 教授 二木史朗 教授 松崎勝巳 教授 高倉喜信

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 序論

HIV-1 Tat-(48-60) やオリゴアルギニン (Rn) などのアルギニン残基に富むペプチド (アルギニンペプチド) を用い、タンパク質や薬物といった生体機能物質を細胞内に導入する手法が知られている。これらのアルギニンペプチドは、マクロピノサイトーシスなどのエンドサイトーシス経路を介して細胞内に移行することが示唆されているが、その大部分がエンドソーム内にとどまってしまうため、より効率的な次世代の細胞内導入法として、サイトゾルをターゲットとした手法の開発が必要である。なかでもエンドサイトーシスを經由せずに、直接細胞膜を通過させることでサイトゾルに迅速に導入する手法の開発は、リソソーム酵素の分解を受けない、全く新たな送達法につながり、非常に高い有用性を示すことが期待できる。本研究では、アルギニンペプチドを非エンドサイトーシ的にサイトゾルに直接導入する手法として、(1) カウンターイオンを用いる手法、(2) 濃度依存的な手法、の2種類の手法を見出し、それぞれの細胞内移行機序について詳細に検討を行うことで、以下に示す多くの有益な知見を得た。

### 第一章 疎水性対アニオンを用いたアルギニンペプチドの細胞内直接送達法の開発

そもそもアルギニンペプチドは非常に高い親水性を持つため、それ単独では脂溶性の細胞膜を直接通過することはまず不可能である。しかしながら、アルギニンペプチドとペアになるカウンターイオン (高い疎水性を持つ対アニオン分子) を用いることにより、これらのペプチドが水相から有機相に移行できるようになることが知られている。本章では、この知見を細胞膜透過に適用可能であるかについて検討を行った。

培養細胞に Tat や R8 などのアルギニンペプチドを投与すると、通常は主にエンドソーム様のドット状の蛍光が観察されるのに対し、対アニオンを前投与すると、わずか数分でほぼすべての細胞においてペプチドがサイトゾルや核へ効果的に拡散する様子が観察された。この現象は、低温条件やエンドサイトーシス阻害剤によっても抑制されないが、膜電位を消失させた場合において著しく抑制されることから、正電荷に富むアルギニンペプチドが対アニオンと静電的に相互作用することで一時的に疎水度を高め、膜電位に依存して直接サイトゾル内に移行している可能性が示唆された。この手法は、i) 様々な細胞種において適用可能であり、ii) アルギニンペプチドをコンジュゲートさせた緑色蛍光タンパク質 (GFP) の細胞内導入にも有効であることが確認された。

### 第二章 細胞外濃度に依存したアルギニンペプチドの直接膜透過経路

アルギニンペプチドの細胞内移行は、温度や膜電位、種々の薬剤といった人為的に操作可能な細胞外環境に依存して大きく影響を受けることが知られており、これらに関する検討から移行機序に関する新たな知見が得られた例が少なくない。本章では、これまで詳細な検討があまり行われていなかった培地中の血清に注目し、血清の有無がアルギニンペプチドの細胞内移行にどのような影響を与えるかについて検討を行った。

蛍光ラベルした4種のオリゴアルギニンペプチド (Rn, n=4, 8, 12, 16) について検討を行ったところ、血清を含む培地

中で、R4以外のペプチドを処理した細胞中にはエンドソーム様のドット状の蛍光シグナルが観察された。一方、血清を含まない培地やPBSを用いると、R8では血清存在下と同様であったのに対し、R12やR16ではペプチドのサイトゾルへの顕著な拡散が認められた。また細胞内移行量も血清存在下に比べて6～8倍程度増大した。R12の投与濃度と細胞内移行様式との関係についてさらに検討を行った結果、血清非存在下では、ペプチド濃度が2 $\mu$ M程度を超えると細胞内に取り込まれるペプチド量がシグモイド様に急激に増加することがわかった。また、低濃度域ではドット状に観察されたペプチドは、高濃度領域ではそれに加えてサイトゾルに拡散する形で観察された。これらの結果から、(1) アルギニンペプチドの細胞内移行様式には、エンドサイトーシスと直接膜透過の二面性があり、(2) ペプチド濃度がある閾値を超えると後者の移行様式が顕著に現れることが示唆された。また、血清存在下でも10 $\mu$ M程度から取り込みが急速に増加しており、同様の濃度依存性と二面性が認められた。血清存在下においてR12の大部分が血清タンパク質に吸着していることから考えると、血清の存在が、ペプチドの細胞内移行における濃度閾値を高濃度側に変化させていることが示唆された。

### 第三章 アルギニンペプチドの直接膜透過機序に関する検討

第一章および第二章において示されたアルギニンペプチドの直接膜透過様式に関して更なる検討を行った。どちらの手法を用いた場合も、ペプチドのサイトゾルへの拡散に関しては、細胞膜全体から起こるのではなく、細胞膜上のある特定の部位からペプチドが流入し、それがサイトゾル全体に広がっていくことが明らかになった。また、微分干渉顕微鏡における観察により、この流入ポイントに相当する細胞膜上に、直径1mm程度の粒状構造物が、ペプチドの流入と時期を合わせるように一時的に形成されていることが確認された。さらに、この流入ポイントでは、通常は主に細胞膜の内側に存在するホスファチジルセリンが、ペプチドの流入とともに外側でも検出された。血清非存在下におけるR12のサイトゾルへの拡散においては、この流入ポイントに細胞膜上のヘパラン硫酸（プロテオグリカンの一種）やガングリオシドGM1（糖脂質の一種）の集積が見られることから、正電荷に富むアルギニンペプチドが細胞膜表面上の負電荷を帯びた分子を特定の部位に集積し、粒状の構造物を形成して、膜の反転を伴って細胞内へと直接流入している可能性が示唆された。

以上の研究成果により、これまで細胞内移行経路として、主にエンドサイトーシスしか知られていなかったアルギニンペプチドに対し、(1) 直接サイトゾルに導入できること、また、(2) 直接膜を透過する経路が存在することの2点を明らかにした。これに加えて、その膜透過様式に関する詳細な検討を行い、サイトゾルをターゲットとした次世代の細胞内導入キャリア開発に価値ある知見を与えた。

## 論文審査の結果の要旨

近年、TATやオリゴアルギニンなどの様々なアルギニンペプチドをキャリアとして用いた生理活性分子の細胞内導入が報告され、注目を集めている。最近の研究により、これらのペプチドは、主にエンドサイトーシス経路で細胞内に移行し、その大部分がエンドソーム内に取り込まれることが明らかとなっている。そのため、細胞内に移行させた生理活性分子の機能発現を期待するには、エンドソーム内にとどまらず、より効率的にサイトゾルに送達させる技術の開発が必要不可欠である。申請者は本論文において、アルギニンペプチドをサイトゾルに直接送達する技術の開発を目指して先駆的かつ独創的な研究を行い、以下に示すような価値ある知見を得ている。

まず、第一章において、高い疎水性を持つカウンターイオン分子を用いたアルギニンペプチドの直接送達法の開発を行っている。すなわち、カウンターイオン（ピレンブチレート）を前投与することで、アルギニンペプチドを数分間でサイトゾルに直接送達可能であることを見出している。この手法は、アポトーシス誘導ペプチドや緑色蛍光タンパク質の細胞内導入にも適用できることが示されており、非常に有用性が高いと考えられる。他の様々なタンパク質への応用や、血清培地中でも同様に送達可能な手法の開発など、今後検討及び改善すべき課題は多いが、本研究はアルギニンペプチドをサイトゾルに直接送達する手法としての初めての報告であり、非常に重要な成果といえる。

次に、第二章において、培地中の血清がアルギニンペプチドの細胞内移行に及ぼす影響について検討を行っている。申請者は特定のアルギニンペプチドの細胞内拡散が、血清非含有培地において観察されることを見出したことから、血清中のタンパク質とペプチドとの相互作用について定性的・定量的に検討を重ね、最終的に培地中の遊離ペプチド濃度依存的にペプチドの細胞内拡散が起こることを示している。本研究では、これまでほとんど検討されることのなかった培地中の血清成分

とアルギニンペプチドとの相互作用に注目するとともに、アルギニンペプチドが直接膜を透過することを明らかとした。

第三章では、第一章及び第二章で申請者が見出したアルギニンペプチドの直接膜透過現象について、顕微鏡による細胞内移行観察を中心に非常に詳細に検討を行っている。その結果、この現象では細胞のある特定の部位からペプチドが細胞内へと流入し、細胞全体に拡散することや、この流入スポットに相当する細胞膜表面に粒状構造物の形成が観察されること、膜の反転が関わっている可能性があることなどを見出している。また、第一章及び第二章で見出された二通りのペプチドの直接膜透過現象を比較・検討することで、これらが共通の機序により誘起されている可能性があることを明らかにしている。これらの結果は、アルギニンペプチドの直接膜透過現象のメカニズム解明に向けて、多くの有益な知見を提供していると考えられる。

以上、本論文は、アルギニンペプチドの細胞内移行における直接膜透過経路に関して、非常に多くの有益な知見を提供している。また、アルギニンペプチドを用いた核やサイトゾルへの細胞内導入法の開発が可能であることを示し、次世代のキャリア分子の創製に向けた今後の研究に大きな影響を与えたと考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月21日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。