

ペプチドを用いた細胞内デリバリー

Intracellular Delivery Using Peptide Vectors

二木史朗

京都大学化学研究所

S. Futaki

Institute for Chemical Research, Kyoto University

Intracellular delivery using membrane-permeable peptide vectors is a recently developed methodology that has been employed to transport various bioactive molecules into cells. The efficient delivery of proteins, drugs, and nano-particles including liposomes has been accomplished using this methodology by conjugation of a peptide vector with the cargo molecules. Arginine-rich peptides, including a basic peptide segment derived from the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Tat protein, are categorized into one of the most frequently used peptide vectors, and the significant involvement of endocytosis in the cellular uptake of these peptides has been demonstrated. The structural features of these peptide vectors and the current understandings of their internalization mechanisms are summarized.

1. はじめに

今、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ます (図 1) [1]. 細胞内に導入したいタンパク質に膜透過ペプチドを細胞内導入ベクターとして化学的に結合させるか、あるいは遺伝子工学的にベクターと目的タンパク質の融合タンパク質を調製し、単に細胞培養液に混合するだけで、効率よく細胞内に目的分子が導入されます. タンパク質に限らず、薬物や、オリゴ核酸、ナノ粒子 (リポソームや微小磁石) など、様々な物質がこの方法を用いて細胞内に導入されたことが報告されており、細胞生化学的な基礎的研究のみならず、臨床的応用も視野に入れて研究が進められています. 本稿では、この方法を用いた細胞内導入法に関して紹介します.

2. 従来のタンパク質細胞内導入法とペプチドベクターを用いる導入法

タンパク質の細胞内での働きを調べるためには、目的タンパク質に対応する遺伝子を細胞内に導入し、発現させる方法が現在最も一般的に行われています. 実験室レベルでの細胞内への遺伝子の導入には、カチオン性リポソームや合成ポリマーなどの導入補助剤を使用する方法が最も一般的に行われていますが、通常、たかだか数十%の細胞に目的タンパク質が導入されるに過ぎず、特に、神経細胞など分裂しにくい細胞への導入効率の悪さが問題になっています. また、これらの導入補助剤の細胞毒性の高さも問題になります. 遺伝子治療は治療効果を持つ生理活性タンパク質を細胞内に発現させることをねらって行われます. この際、遺伝子の導入効率を高めるため、ウイルス粒子をベクターとして遺伝子導入することも多いのですが、感染性や抗原性などの問題が解決されていません.

ペプチドベクターを用いる方法では、あらかじめ、目的タンパク質とペプチドベクターとの化学的架橋

体あるいは遺伝子工学的に調製した融合タンパク質を作製する必要がありますが、上手く行けば、ほぼ全ての細胞に数分から数十分程度の短時間で目的タンパク質を導入できます (図2)。遺伝子導入の際には、多くの場合、血清存在下で導入効率が低下しますが、ペプチドベクターを用いる方法では血清は細胞内移行効率にさほど影響しないことが言われています。また後述の Tat ベクターなどにおいては、カチオン性リポソームなどと比べて毒性は低く、数十 μ M 程度の濃度で細胞を処理しても顕著な毒性はみられません。

ペプチドベクターを用いる方法のもう一つの利点は、天然アミノ酸からなるタンパク質以外の様々な分子や原子団を細胞内に導入できることです。これは化学的に合成・修飾した分子を導入することができることを意味し、たとえば、親水性が高すぎるためにそのままでは細胞膜を透過できない薬物、細胞内での活性強化のために D-アミノ酸や非天然アミノ酸を組み込んだペプチド・タンパク質、細胞内可視化のための蛍光物質やこれらでラベルしたタンパク質などの導入も可能となります。ペプチドベクターを用いる方法の限界は当然ありますが、上記の利点は細胞導入への新しい可能性を示すものといえます。

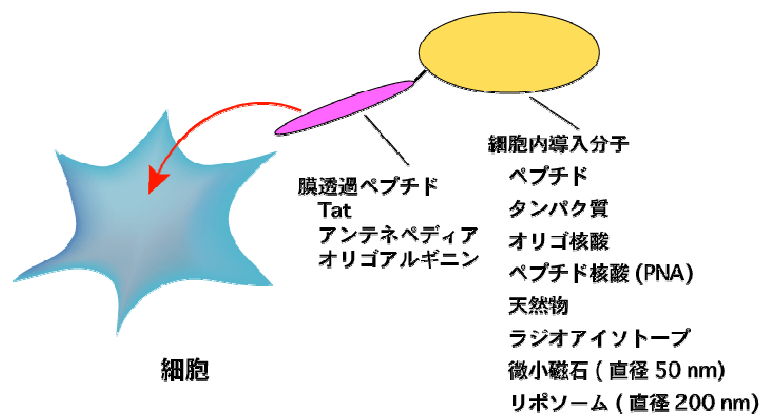


図1 膜透過ペプチドベクターを用いた細胞導入

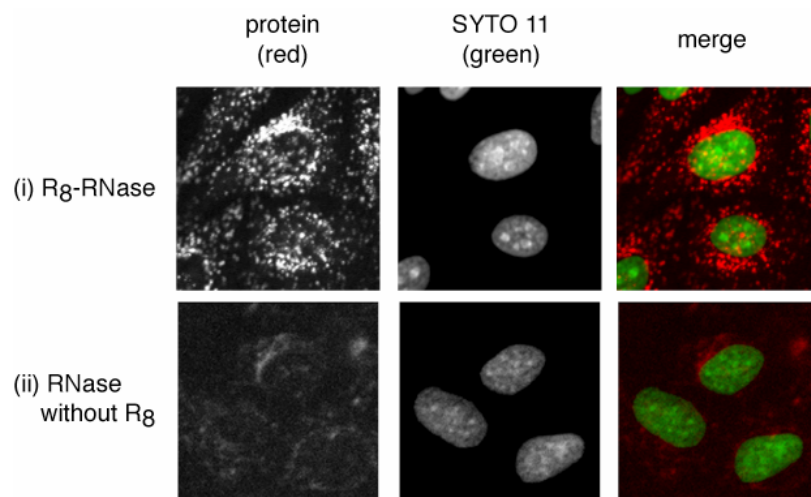


図2 膜透過ペプチドによるリボヌクレアーゼ S (RNase S) 複合体の細胞内導入 [2]

膜透過ペプチド(R8)を付加した RNase 複合体 (上段, 赤) は細胞内に効率よく導入されているのに対し, R8 を付加していない RNase 複合体 (下段, 赤) はほとんど細胞に取り込まれていないことが分かります。緑色は核 (SYTO 11 で染色)。

3. 膜透過ペプチドベクター

導入ベクターは、cell-penetrating peptide (CPP) あるいはprotein transduction domain (PTD) とも呼ばれることもあります。実際に用いられている代表的なものとして、(1) アルギニンなどの塩基性アミノ酸に富むもの：HIV-1 Tat 蛋白質のアミノ酸配列 48-60 位に対応するペプチド配列 (Tat ペプチド) やオリゴアルギニンなど、(2) 塩基性部分と疎水性部分を有する両親媒性ペプチド：Drosophila の Antennapedia 蛋白質由来ペプチド (penetratin) など、(3) 疎水性配列に若干の塩基性配列を含むペプチド：神経ペプチド galanin とハチ毒 mastoparan のキメラペプチドである transportan、(4) 疎水性ペプチド：膜タンパク質のシグナルペプチド由来ペプチド MTS などがあげられます (表1)。Tat、オリゴアルギニンあるいは Antennapedia 由来ペプチドは、これらの中でももっとも頻繁に使われており、以下、特に断らない限りは、(1) の Tat あるいはオリゴアルギニンをを用いた導入法に関して解説します。

表1 代表的な膜透過性ペプチドベクター

ペプチド	特徴と由来	アミノ酸配列
HIV-1 Tat (48-60)	塩基性 (RNA 結合ペプチド)	GRKKRRQRRRPPQ
Antennapedia (43-58) (penetratin)	塩基性/疎水性 (DNA 結合ペプチド)	RQIKIWFQNRRMKWKK
Transportan	キメラ (ガラニン/マストパラン)	GWTLNSAGYLLGK- INLKALAALAKKIL
Membrane translocating sequence peptide (MTS)	疎水性 (分泌シグナル)	AAVALLPAVLLALLP

4. 細胞内導入への応用例

Tat あるいはオリゴアルギニンをベクターとして、培養細胞へ生理活性タンパク質を導入することにより、たとえば、p53 タンパク質などの送達によるガン抑制[3]や、Bcl-2 ファミリーのタンパク質、Bcl-xL の送達による虚血性脳損傷における神経細胞死の軽減[4]など様々な細胞機能が調節・制御できたことが報告されています[1]。また、タンパク質以外にも、小分子薬物やリポソーム、微小磁石、ファージといった種々の物質が細胞内に導入されたことが報告されています (図1)。ペプチドベクターを用いて細胞機能を制御したことを報告する論文数の増加には目をみはるものがあり、過去5年で200報以上の論文が発表されており、細胞導入のための新しい手技として定着しつつあると言えます。

上述のように、導入の際には導入物質とペプチドベクターが共有結合的に連結されることが重要で、通常、ベクターと目的物を単に混合するだけでは効率的な導入は行われません。また、ペプチドベクターは様々な物質の導入に有効ですが、遺伝子 (プラスミド) の導入には向いていないように思います。プラスミドの分子量が数百万と非常に大きいことや、負電荷を帯びたプラスミドと正電荷を帯びたペプチドベクターが不溶性の凝集体を形成したり、細胞内移行に重要な働きを示すベクターのグアニジノ基と細胞表層の相互作用が損なわれたりすることが、その理由と考えられています。この問題を回避出来るものとして、遺伝子を内包するリポソームの表面をアルギニン修飾するアプローチが最近紹介されました[5]。

5. アルギニンペプチドの細胞内移行機序

Tat ペプチドの細胞内移行に関しては、当初、エンドサイトーシス(細胞の飲食作用)を介さない未知の経路によりペプチドベクターが細胞内に移行し、核へ局在化すると考えられていました。初期の段階では、細胞の顕微鏡観察の際に、パラホルムアルデヒドなどを用いて細胞を固定し観察する手法が一般的に行われていましたが、その後、この固定処理によりベクターの細胞内局在が大きく変わることが指摘され、導入機序と細胞内局在の見直しがなされています[6]。実際、ペプチドベクターと細胞をインキュベートし、細胞を固定することなく生きたままの状態を観察すると、エンドソーム様の細胞内粒子が主として観察されます。核への局在もほとんど見られません。低温にするとエンドサイトーシスは抑制されますが、それに伴い細胞内への取り込みも大きく減少することが分かってきました。これらの結果から、Tat などのアルギニンペプチドベクターの細胞内移行には、エンドサイトーシスが深く関与すると考えられるに至りました。これに関して、マクロピノサイトーシスと呼ばれる特殊なエンドサイトーシス(図3)が主な取り込み経路の一つとして働くことが指摘されています[7,8]。マクロピノサイトーシスは、細胞膜が細胞内に陥没する形でエンドソームが形成される一般的なエンドサイトーシスと様式を異にしており、細胞膜周辺のアクチンフィラメントが重合することにより細胞外へ膜が突き出し、細胞外液の細胞内への取り込みが起きます。通常のエンドソームの直径がたかだか 100nm 程度であるのに対して、マクロピノサイトーシスの場合はしばしば 1 μ m を越すエンドソーム(マクロピノソーム)が形成されると言われています。この大きさだと直径 200nm を越す Tat 修飾リポソームやファージが細胞内に取り込まれることも説明可能です。マクロピノサイトーシスを支持する結果として、アルギニンペプチドや Tat-Cre の融合蛋白質の細胞取り込みがアミロリドと呼ばれるマクロピノサイトーシス阻害剤で効果的に阻害されることや、アクチン重合を阻害剤(サイトカラシンD)によって取り込みが抑制されることが報告されています。ただ、たとえ上記のようにエンドサイトーシスでペプチドが細胞内に取り込まれたとしても、Tat などのアルギニンペプチドの細胞内移行を評価する際には、ペプチドがエンドソームを抜け出てサイトゾルに移行することなしには細胞内での機能を発揮できないことに留意する必要があります。ところが、実際どのようにしてエンドソーム膜を通過し、ペプチドが細胞質に至るのかについての詳細は分かっていません。

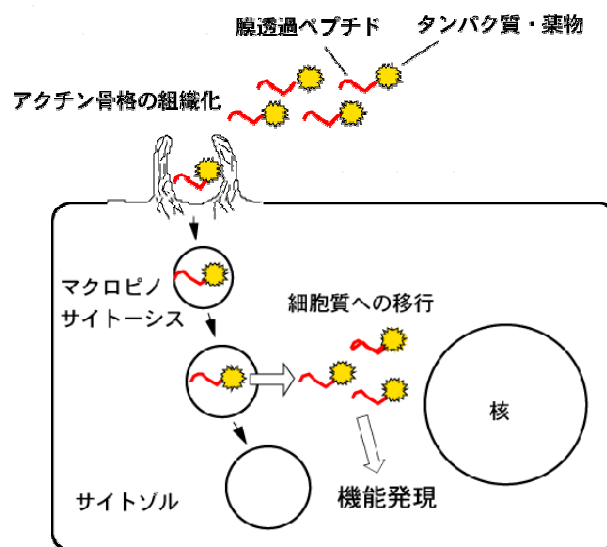


図3 膜透過ペプチドの細胞移行とマクロピノサイトーシス

最近、膜透過におけるアルギニンのグアニジノ基とカルボキシル基、リン酸基、硫酸基との間に 2 個の水素結合を介して相互作用することが重要であることが示唆されました[9,10] (図 4)。細胞への取り込みにおいて、アミノ基を有するリジンよりもグアニジノ基を有するアルギニンがより本質的な役割を果たすという知見とこの結果は一致します。細胞表層のヘパラン硫酸などの硫酸化された糖鎖が Tat やアルギニンペプチドの取り込みに重要な役割を果たすことも示唆されており、負電荷を帯びた硫酸化糖との静電的相互作用により、アルギニンなどの正電荷を帯びたペプチドが細胞表層に濃縮され、ついで細胞内に取り込まれることが機序として考えられます。実際、ヘパラン硫酸などを欠損する細胞へのアルギニンペプチドの取り込みは、これらを有する細胞への取り込みに比べて有意に少ないことが示されています。この際にもグアニジノ基が硫酸基と 2 個の水素結合を介して効果的に相互作用しうることが考えられます。また、細胞内は細胞外と比べて通常-60mV 程度の負の電位となっていますが、この膜電位が取り込みに重要であることも同時に示唆されました[9]。

6. 終わりに

Tat やオリゴアルギニンペプチドをはじめとした膜透過ペプチドベクターを用いて様々な物質が細胞内に移送できることが示されてきました。導入の成功例が次々と報告される一方、ペプチドベクターを用いても上手くいかなかった例も多いのではないかと思います。現時点では、ともすれば単にペプチドを導入すれば簡単に細胞内に入ることのみが強調されていますが、ペプチドベクターの種類や導入する物質の物性を含めた導入条件、ならびに、これにより得られた結果を詳細に分析することにより、最適な導入条件が導かれるのではないかと思います。膜透過ペプチドを用いた細胞内導入法は、かならずしもオールマイティの系ではないとは思いますが、従来にない新しい概念による細胞内物質移送の手段であることには違いありません。移送機序や投与条件、応用面に関しての検討を進めることで、いっそう効率的で効果的な細胞移送系の合理的設計が可能になるのではないかと筆者は期待しています。

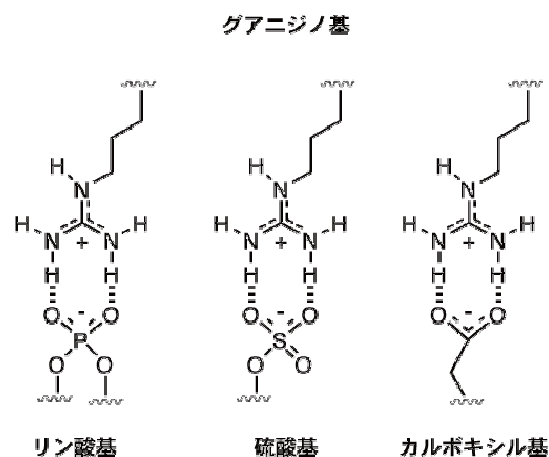


図4 グアニジノ基との水素結合形成

参考文献

- [1] 最近の総説として, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 特集号: Protein- and peptide-mediated transduction: mechanisms and implications for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 487-665 (2005); 二木史朗: *化学と生物*, **43**, 649 (2005)などを参照してください。
- [2] Futaki, S., Nakase, I., Suzuki, T., Nameki, D., Kodama, E., Matsuoka, M., Sugiura, Y.: *J. Mol. Recognit.*, **18**, 169-174 (2005).
- [3] Noguchi, H., Matsushita, M., Okitsu, T., Moriwaki, A., Tomizawa, K., Kang, S., Li, S. T., Kobayashi, N., Matsumoto, S., Tanaka, K., Tanaka, N., Matsui, H.: *Nat. Med.*, **10**, 305 (2004).
- [4] Asoh, S., Ohsawa, I., Mori, T., Katsura, K., Hiraide, T., Katayama, Y., Kimura, M., Ozaki, D., Yamagata, K. Ohta S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 17107 (2002).
- [5] Kogure, K., Moriguchi, R., Sasaki, K., Ueno, M., Futaki, S., Harashima, H.: *J. Control. Release*, **98**, 317 (2004).
- [6] Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chemomordik, L. V., Lebleu, B.: *J. Biol. Chem.*, **278**, 585 (2003).
- [7] Wadia, J. S., Stan, R. V., Dowdy, S. F.: *Nat. Med.*, **10**, 310 (2004).
- [8] Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J. C., Jones, A. T., Sugiura Y., Futaki, S.: *Mol. Ther.*, **10**, 1011 (2004).
- [9] Rothbard, J. B., Jessop, T. C., Lewis, R. S., Murray, B. A., Wender, P. A.: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 9506 (2004).
- [10] Perret, F., Nishihara, M., Takeuchi, T., Futaki, S., Lazar, A. N., Coleman, A. W., Sakai, N., Matile, S.: *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1114 (2005).



二木史朗 (Shiroh FUTAKI) 京都大学化学研究所生体機能化学研究系 教授
経歴 1987年京都大学大学院薬学研究科博士後期課程中退, 同年徳島大学薬学部助手, 93年同助教授, 97年京都大学化学研究所助教授を経て2005年より現職。
研究テーマと抱負 細胞機能を制御する生理活性蛋白質の創製. 細胞膜透過性ペプチドベクターの開発とメカニズム. 環境応答型機能性ペプチドのデザイン。