

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	廣瀬 久昭
論文題目	効率的細胞内移行を可能とするアルギニンペプチドとその移行様式に関する研究		
(論文内容の要旨)			
序論			
<p>近年、HIV-1 Tat ペプチドやオリゴアルギニンといった、アルギニン残基を豊富に含む細胞膜透過性を有するペプチド (アルギニンペプチド) を細胞内導入キャリアとして用いて、タンパク質や核酸といった生理活性物質を細胞内へ送達する技術が注目を集めている。これまでに膜透過性を有する数多くのアルギニンペプチドが報告され、それらの移行機序の検討および効率的細胞内導入に向けた応用が数多くなされてきた。しかしながら、さまざまなアルギニンペプチド間での定量的な移行量の比較検討はあまり行われてこなかった。そこで本研究では、さまざまなアルギニンペプチドの移行量比較を行うことで、効率よく細胞内へ移行するペプチドと、それが高効率に移行できる要因を明らかとすることを目的とした。さらに、アルギニンペプチドの移行の主な経路の一つとしてマクロピノサイトーシスが考えられているが、これ以外に、細胞膜を直接透過する経路をとり得ることが報告されている。この経路を解明することで直接サイトゾルへ生理活性物質を送達することができれば非常に有用であると考えられる。そこで本研究では直接膜透過経路にも焦点を当て、アルギニンペプチドの移行様式を詳細に検討することで、以下に示す有用な知見を得た。</p>			
第一章 フロックハウスウイルス (FHV) 由来ペプチドの効率的細胞内移行			
<p>当研究室ではアルギニンを豊富に含む種々の DNA または RNA 結合タンパク質由来ペプチドが細胞膜透過性を示すことを見出しているが、蛍光標識したペプチドを用いてチャイニーズハムスター卵巣細胞内への移行量をフローサイトメトリーにより定量した。その結果、フロックハウスウイルスのコートタンパク質由来ペプチド (FHV coat (35-49)、以下 FHV ペプチド) が、汎用されている Tat ペプチドよりも 20 倍程度効率よく細胞内へと移行することを見出した。</p>			
<p>次に、この FHV ペプチドがなぜ高効率に細胞内へ移行できるのかに関して、Tat ペプチドと比較検討することでその理由の解明を試みた。その結果、FHV ペプチドは Tat ペプチドに比べて (1) 細胞表面への集積性が非常に高く、(2) より低濃度でマクロピノサイトーシスを誘起できることから、より効率的に細胞内に移行できることが考えられた。また、ある閾値濃度以上では、FHV ペプチドの直接膜透過による細胞内への拡散が、投与後数分の時点で観察された。</p>			

## 第二章 アルギニンペプチドの直接膜透過様式

FHV ペプチドや1 2個のアルギニンを連ねた R12 ペプチドを蛍光標識し、その細胞内移行を共焦点顕微鏡により経時的に観察すると、投与2～3分後にペプチドの局所的なサイトゾルへの流入が観察された。また、流入開始とほぼ同時に、細胞表面に粒状の特異構造物が形成されることが微分干渉像により観察された。アルギニンペプチドの直接膜透過様式を明らかとすることをねらい、この粒状構造物形成を詳細に検討した。

まず粒状構造物の形成条件を検討したところ、ペプチドにある程度疎水性を持たせることで粒状構造物形成を伴う直接膜透過をより効率的に促進できることが示唆された。また、粒状構造物形成およびペプチド流入は、マクロピノサイトーシス阻害剤存在下および4℃でも阻害されず、膜電位に強く依存することが明らかとなった。さらに、共焦点顕微鏡観察により、通常細胞膜内膜に存在するホスファチジルセリンが粒状構造物外膜にも存在すること、ラフトに多く含まれるスフィンゴミエリンが集積していることが明らかとなった。さらに、電子顕微鏡観察により粒状構造物が多重膜構造となっていることも示された。

以上のことから粒状構造物は、膜電位に伴うアルギニンペプチドの細胞への流入とほぼ同時に形成され、膜の反転を含むダイナミックな変化を伴って多重膜構造をとり、ラフト様の特殊な領域を形成することが示唆された。

さらに、この粒状構造物形成の細胞内導入技術という観点からの意義を検討するために、粒状構造物形成を促進するペプチドと膜透過性のない蛍光標識 R4 ペプチドとともに細胞に投与した結果、R4 ペプチドの膜透過によるサイトゾルへの移行が観察された。

以上の研究結果は、アルギニンペプチドが効率的に細胞内移行を達成する要因や直接膜透過様式の詳細を明らかにしたものであり、新たな細胞内導入ペプチドベクターを開発する上で重要な情報を提供するとともに、細胞生物学的にも興味深い知見を与えるものである。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

アルギニン残基を豊富に含む細胞膜透過性を有するペプチド(アルギニンペプチド)を細胞内導入キャリアとして用いる生理活性物質の細胞内送達技術に関連して、申請者は、アルギニンペプチドの移行量の比較に基づきその細胞内への効率移行を可能とする要因を明らかとするとともに、アルギニンペプチドの直接膜透過経路に焦点を当て、この移行様式を詳細に検討した。

第一章では、申請者は、フロックハウスウイルスのコートタンパク質由来ペプチド(FHV coat (35-49)、FHV ペプチド)が、汎用されている Tat ペプチドよりも 20 倍程度効率よく細胞内へと移行することを見出し、この理由として FHV ペプチドは Tat ペプチドに比べて細胞表面への集積性が非常に高く、より低濃度でマクロピノサイトーシスを誘起できること、さらに、ある閾値濃度以上で、FHV ペプチドの直接膜透過による細胞内への効率的拡散が誘起されることを指摘した。

第二章では、アルギニンペプチドの直接膜透過が細胞膜からのペプチドの局所的流入により開始され、流入開始とほぼ同時に細胞表面に粒状の特異構造物が形成されることに関して、申請者はペプチドにある程度疎水性を持たせることで粒状構造物形成を伴う直接膜透過をより効率的に促進できることを指摘した。また、粒状構造物形成およびペプチド流入において、通常細胞膜内膜に存在するホスファチジルセリンが粒状構造物外膜に露出すること、この流入が 4℃でも阻害されないこと、粒状構造物が多重膜構造をとっていることに加え、ラフトに多く含まれるスフィンゴミエリンが粒状構造物に集積していることを明らかとした。また、ペプチドの流入と粒状構造物の形成は、マクロピノサイトーシス阻害剤存在下でも阻害されないものの、膜電位に強く依存することを見いだした。以上のことから粒状構造物は膜電位に伴うアルギニンペプチドの細胞への流入とほぼ同時に形成され、膜の反転を含むダイナミックな変化を伴って多重膜構造をとり、ラフト様の特殊な領域を形成することが示唆された。

以上、本論文は、アルギニンペプチドが効率的に細胞内移行を達成する要因や直接膜透過様式の詳細を明らかにしたものであり、新たな細胞内導入ペプチドベクターを開発する上で重要な情報を提供するとともに、細胞生物学的にも興味深い知見を与えるものと考えられる。

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 24 年 2 月 23 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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降