

光架橋法によるオクタアルギニンの細胞内取り込み

受容体の同定と細胞内移行経路の解明

2015

川口 祥正



# 目 次

序論	3
第一章	
光架橋法によるオクタアルギニンの相互作用タンパク質の同定	5
第一節 光架橋法による R8 と相互作用する細胞質タンパク質としての LanCL1 の同定	6
第二節 同定したタンパク質 LanCL1 の R8 の細胞内移行への寄与	10
第一章の考察	11
第二章	
オクタアルギニンのクラスリン依存性エンドサイトーシス受容体の同定	12
第一節 オクタアルギニンの相互作用タンパク質同定のための切断性光反応性オクタアルギニンの設計	13
第二節 光架橋法による R8 と相互作用する膜タンパク質の同定	18
第三節 R8 の細胞内移行における Syndecan-4 (SDC4)の寄与	21
第四節 R8 の SDC4 を介した細胞内移行経路の検討	27
第五節 R8 との融合タンパク質の細胞内送達における SDC4 の寄与	33
第六節 R8 との融合タンパク質のクラスリン依存性エンドサイトーシスにおける SDC4 の寄与	36
第二章の考察	38
総括	39
実験の部	41
引用文献	56
謝辞	61



## 序 論

Tat ペプチドやオリゴアルギニンペプチドに代表されるアルギニンに富む細胞膜透過性ペプチド (AR-CPPs)は、化学的架橋や複合体形成によって、タンパク質やペプチド、核酸、リポソームなどの生理活性高分子を効率よく、低毒性で細胞内に導入できるため、臨床応用も期待されている[1]。さらに、近年では、オリゴアルギニンペプチドによって、CRISPR-Cas9 (約 160 kDa) [2]や TALEN (約 100 kDa) [3]のような大きなタンパク質や高分子複合体を細胞内に導入することによって、ゲノム編集が達成されている。

また、AR-CPPs の細胞内移行経路についても広く研究されており、クラスリン依存性エンドサイトーシス[4]、カベオラ依存性エンドサイトーシス[5]およびマクロピノサイトーシス[6, 7]などのエンドサイトーシスを介する経路と、直接膜透過するエネルギー非依存的な経路[8]の2つが報告されている。AR-CPPs の細胞内への取り込みは、ペプチドの濃度により主経路が変化することが知られている。ペプチド濃度が比較的高い (典型的な場合は目安として 10  $\mu$ M 以上) ときには直接的な形質膜透過が主にみられるのに対して、ペプチド濃度が低い (目安として 5  $\mu$ M 以下) ときには、エンドサイトーシスが主経路となる[9, 10]。また、細胞内に導入する物質の分子量が大きくなると、エンドサイトーシスの寄与が大きくなり、タンパク質送達にはエンドサイトーシスが主経路となると考えられている。しかし、AR-CPPs のエンドサイトーシスに関わる受容体は不明である。AR-CPPs のエンドサイトーシスによる取り込みに特異的な受容体が存在すれば、その受容体との親和性を高めることによって、より効果的な細胞内への取り込みが可能となる。エンドサイトーシスで取り込まれた AR-CPPs、および細胞内への送達を目的とするカーゴは、リソソームに至る前にエンドソームから脱出して細胞質に移行するようになることが、期待する生理活性を得る上で重要である。受容体の同定によって、この分子をマーカーとした、AR-CPPs の細胞内輸送やこれを効率化するための知見が得られると考えられる。また、細胞特異的な受容体が得られれば、AR-CPPs の特定の細胞への標的化が可能になるかもしれない[11]。

光架橋法は、リガンド-受容体やタンパク質-タンパク質間相互作用の解析において強力なツールである[12, 13]。光反応基としてジアジリン、ベンゾフェノンやアジドが報告されているが[14, 15]、ジアジリンは反応性が非常に高く、短時

間の UV 照射で近傍に存在する分子と反応して、未反応の活性化体は水によりクエンチされることから、生細胞における架橋に有効である[16]。また、筆者の所属研究室では、光反応基ジアジリンを導入した AR-CPPs のドデカアルギニン (R12)を用いた検討によって、R12の細胞内取り込みに C-X-C chemokine receptor 4 (CXCR4)が受容体として関与することを報告している[17]。しかし、R8の細胞内移行には CXCR4の関与は認められず、別の受容体の関与が示唆された[17]。そこで、本研究では、より一般的に用いられているオクタアルギニン (R8)の細胞内取り込みに関わる受容体の同定を目的に光架橋法を用いて検討を行った。

第一章では、R12の受容体を同定した際と同様の方法でR8の受容体の同定を行った。予想に反して、光架橋により得られたタンパク質は細胞質に存在する LanCL1であるが、このタンパク質がR8の細胞内取り込みを促進する効果を有するという興味ある知見が得られた。

第二章では、非特異的なタンパク質の混入が目的の受容体の同定を妨げていることを考慮して、切断リンカーとしてジアゾベンゼンを導入した光反応性R8を設計して、合成するとともに、膜画分に存在するタンパク質を中心に解析し、R8と相互作用する膜タンパク質としてSyndecan-4を同定し、これを介する細胞内移行経路について検討を行った。

# 第一章

## 光架橋法によるオクタアルギニン(R8)と相互作用する細胞質タンパク質の同定

前述のように、R8 は生理活性物質の効率的な細胞内導入を達成できる送達キャリアとして広く用いられており[18]、その細胞内移行経路としてクラスリン依存性エンドサイトーシス[19]やマクロピノサイトーシスが示唆されている[20]。また、その移行過程において、プロテオグリカンを介するペプチドの細胞表面への集積の重要性が示唆されている[20]。その一方で、R8 の効率的な取り込みに寄与する受容体に関しては、未だ同定されていない。そこで、ジアジリンを導入した光反応性 R8 により R8 の受容体の同定を試みた (Figure 1-1)。

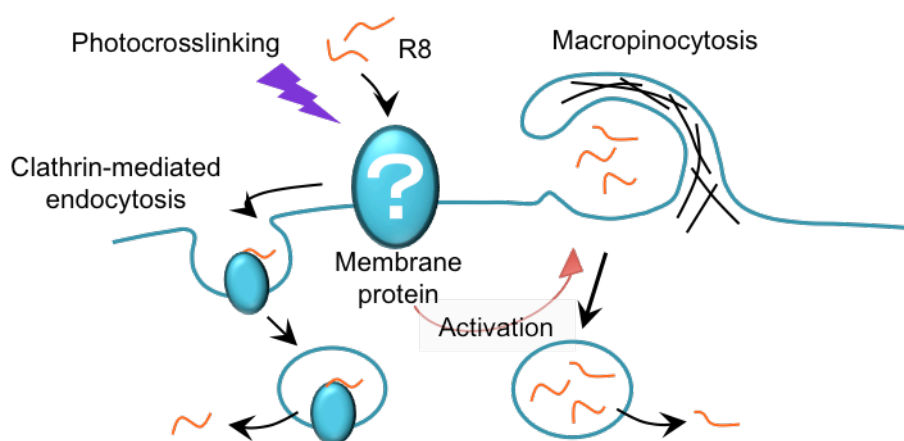


Figure 1-1. Identification of the receptor for the endocytic uptake of octaarginine (R8).

## 第一節 光架橋法による R8 と相互作用する細胞質タンパク質としての LanCL1 の同定

光架橋法はタンパク質の相互作用解析において有用な方法であり、光反応基としてアジド、ベンゾフェノンやジアジリンが知られている[21]。これらのうちで、ジアジリンは反応性が非常に高く短時間で反応し、未反応の活性種は水によりクエンチされる[22]。この特性を活かすことによって、生細胞における AR-CPPs の受容体探索が可能であると考えられる。ジアジリンは、UV 照射により窒素脱離を引き起こして、カルベンを生成し、近傍のタンパク質と共有結合を形成する。筆者の所属研究室では、光反応基を導入した R12 を用いて、R12 と相互作用するタンパク質として Myosin-9 を同定した。さらに、Myosin-9 と相互作用するケモカイン受容体 CXCR4 に R12 が結合することによって、マクロピノサイトーシスによる R12 の細胞内取り込みが誘導されることを報告している[17]。しかし、より一般的に用いられる AR-CPPs である R8 と CXCR4 との相互作用による R8 の取り込みやマクロピノサイトーシスの誘導は認められなかった。そこで、本研究では、先行研究で用いた R12 の代わりに R8 を相互作用プローブとして導入した Biotin-Photo-R8 によって、R8 の受容体を同定することを試みた。

光架橋基としては、ペプチド合成への導入が容易で R12 受容体同定の際にも用いられた trifluoromethyl diazirine phenylalanine [(Tmd)Phe] [23]を使用した (Figure 1-2)。相互作用タンパク質と架橋するための(Tmd)Phe を、グリシンをスペーサーにして、R8 の N 末端に導入した。また、C 末端は負電荷をなくすためにアミドにした。さらに、架橋したタンパク質をストレプトアビジンビーズで精製するためのタグをとして、 $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)を介して biotinamido hexanoic acid を(Tmd)Phe-R8-amide の N 末端に導入した。Biotin-Photo-R8 は先行論文で用いた方法[17]に順じて Fmoc 固相合成法により合成した。

Biotin-Photo-R8 を用いた相互作用タンパク質の同定手順を Figure 1-3 に示す。Biotin-Photo-R8 を細胞に添加して、インキュベートした後、UV 照射によって光架橋を行った。細胞を可溶化し、架橋タンパク質をストレプトアビジンビーズで精製して濃縮し、SDS サンプルバッファーにより溶出した。溶出されたタンパク質を SDS-PAGE で展開し、ゲルを染色後、検出されたバンドを切り出し、トリプシン消化した。得られたペプチド断片を MALDI-TOF MS により解析し、



質量分析の結果をタンパク質を同定するためのデータベースである MASCOT で照合することによって、タンパク質の同定を行った。

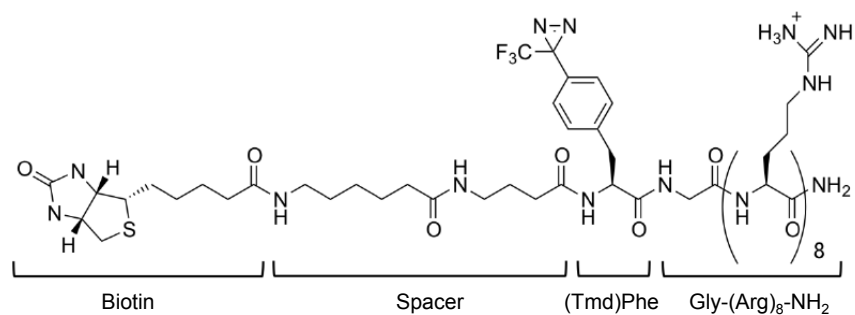


Figure 1-2. Structure of Biotin-Photo-R8.

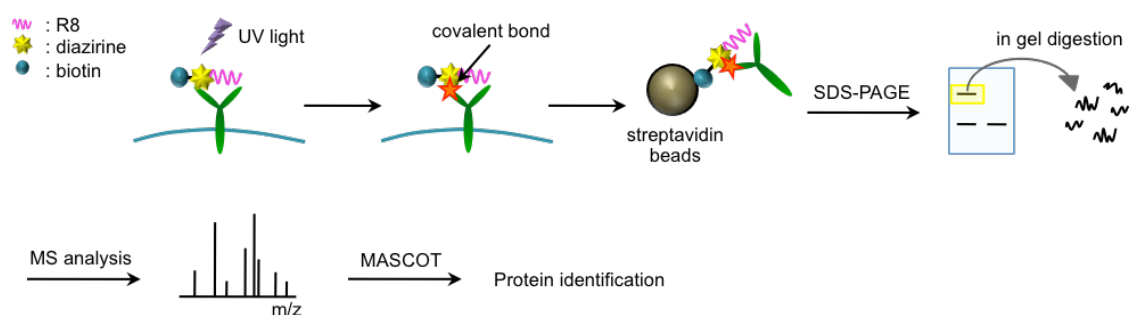


Figure 1-3. (B) The procedure for identification of proteins interacted with Biotin-Photo-R8. Cells are treated with Biotin-Photo-R8 and irradiated with UV. Cells are lysed, followed by isolation with streptavidin-coated beads. Crosslinked proteins are subjected to gel-electrophoresis. Protein bands are trypsinized, followed by MALDI-TOF MS analysis. Protein identification is performed on MASCOT.

前述のように、R8 の細胞内移行経路は R8 の濃度依存的に変化する。所属研究室での先行研究において、R8 が比較的低濃度 (目安として 5  $\mu\text{M}$  以下) の場合には、エンドサイトーシスが主経路になることが確認されている[24]。本研究では、エンドサイトーシスの受容体を探索するために、Biotin-Photo-R8 の細胞投与時の濃度を 2.5  $\mu\text{M}$  に設定した。低濃度においても、直接膜透過の経路が一部示唆されていることを考慮して[10]、細胞膜の直接透過の駆動力となる膜電位を解消する効果をもつ  $\text{K}^+$ -rich buffer [24] を細胞外液として用いた。 $\text{K}^+$ -rich buffer 中で、HEK293T 細胞を 2.5  $\mu\text{M}$  Biotin-Photo-R8 で 37°C、30 秒間処理し、その後 365 nm の UV を 5 分間照射した。照射後細胞を 0.5 mg/mL ヘパリン含有  $\text{K}^+$ -rich buffer (+) で洗浄し、RIPA buffer により細胞溶解液を調製した。架橋タンパク質をstreptavidinビーズで精製して濃縮し、SDS サンプルバッファーで煮沸してを溶出させた後、SDS-PAGE を行って、ウェスタンブロットにより検出した。その結果、ペプチド添加時に抗ビオチン抗体によって、特異的なバンドが 40 kDa の位置に検出された (Figure 1-4A)。このバンドが示すタンパク質を銀染色での検出を試みた。ウェスタンブロットと同様の反応条件で、HEK293T 細胞をペプチドと処理して銀染色を行った。その結果、ウェスタンブロットで検出したバンドに対応する位置にバンドを検出した (Figure 1-4B)。

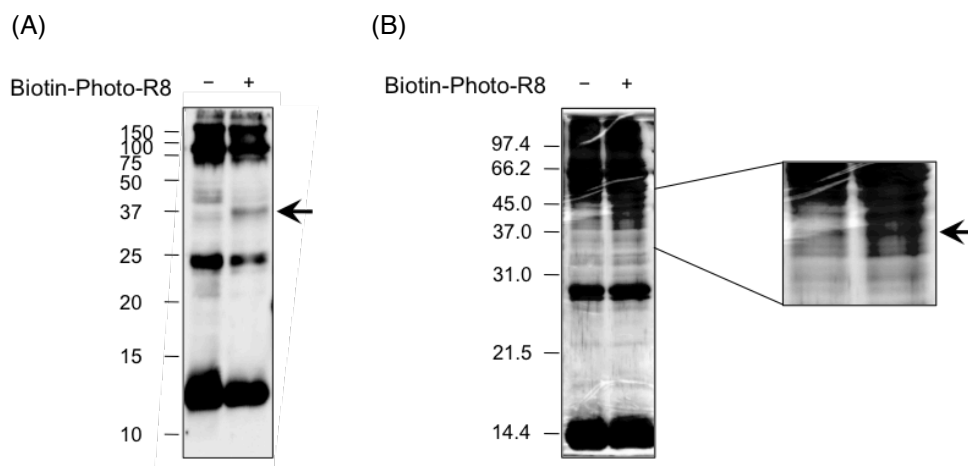


Figure 1-4. Western blot (A) and silver-stain SDS-PAGE (B) analysis of HEK293T lysates photo-crosslinked with Biotin-Photo-R8. Arrows indicate the presence of a band at ~37 kDa, which is specific to Biotin-Photo-R8-treated cells.

銀染色により検出したバンドを切り出し、トリプシンによりゲル内消化して、得られたペプチド断片を MALDI-TOF MS により測定し、質量分析の結果をタンパク質同定のためのデータベースである MASCOT で照合することによって同定を試みた。その結果、Lanthionine synthetase component C-like protein 1 (LanCL1) (45 kDa)を同定した[25]。LanCL1 は膜近傍に局在するタンパク質である。LanCL1 は Src-homology 3 ドメインを有し、上皮増殖因子受容体系の一部として機能している Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8 (EPS8)と相互作用し、複合体を形成する可能性が示唆される。この複合体形成を通して、上皮増殖因子などの増殖因子の受容体シグナル伝達に関与する可能性が報告されている[25]。

## 第二節 同定したタンパク質 LanCL1 の R8 の細胞内移行への寄与

同定した LanCL1 が実際に R8 ペプチドの細胞内取り込みに関与しているのかについて調べるために、LanCL1 を強制発現させた細胞での細胞内取り込みの評価を行った。まず、HeLa 細胞に発現ベクターとして別途作製した LanCL1\_pCI を導入して、LanCL1 を強制発現させた。また、pCI を導入した HeLa 細胞をコントロール細胞とした。LanCL1 の発現はウェスタンブロットによって確認した (Figure 1-5A)。そして、トランスフェクションした細胞を、無血清培地 ( $\alpha$ -MEM(-), 200  $\mu$ L) で最終濃度 1  $\mu$ M に調製した R8-Alexa488 とインキュベートし、R8-Alexa488 の細胞内への取り込み量をフローサイトメトリーで評価した。その結果、LanCL1 を強制発現した細胞において、R8-Alexa488 の細胞内取り込みの約 25% の上昇が確認された (Figure 1-5B)。この結果から、今回同定した LanCL1 は R8 ペプチドの細胞内取り込みに関与している可能性が示された。

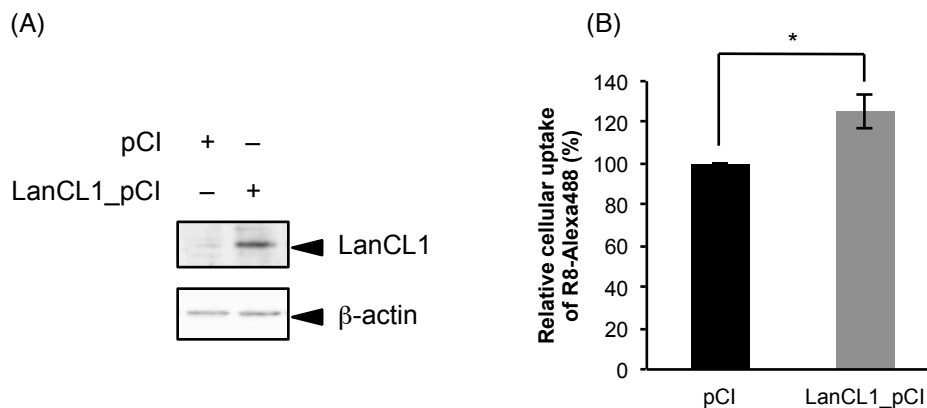


Figure 1-5. Cellular uptake of R8 increases in LanCL1-overexpressing cells. (A) Western blot analysis of cells transfected with pCI or LanCL1\_pCI. (B) Overexpression of LanCL1 led to promotion of cellular uptake of R8-Alexa488. HeLa cells were transfected with pCI or LanCL1\_pCI, and then treated with 1  $\mu$ M R8-Alexa488 for 30 min at 37°C. R8 uptake was analyzed by flow cytometry. The amounts of cellular uptake of R8-Alexa488 were normalized to pCI-transfected cells. Means  $\pm$  standard deviation (SD) of three independent experiments are shown.

## 第一章の考察

光反応基であるジアジリンと R8 とのコンジュゲートを用いることによって、R8 と相互作用するタンパク質として膜表在性の細胞質タンパク質の LanCL1 が同定された。LanCL1 を強制発現させることによって、蛍光標識した R8 の細胞内移行量が増加したことから、LanCL1 は R8 の細胞内移行に関わることが示唆された。LanCL1 と EPS8 の複合体は増殖因子の受容体シグナル伝達系に関与することから、マクロピノサイトーシスの誘導に関与している可能性が考えられた。

また、以前の研究においても、R12 にジアジリンを導入することによって、Myosin-9 が同定されたことから、光反応基としてジアジリンを用いた光架橋法はオリゴアルギニンの相互作用タンパク質を同定する上で有用であると考えられる。しかしながら、Myosin-9 も LanCL1 も細胞質に局在するタンパク質であることから、光架橋産物として膜タンパク質を効果的に単離するための手法の改良が必要と考えられる。

## 第二章

### オクタアルギニンのクラスリン依存性エンドサイトーシス 受容体の同定

R8 の細胞内移行に寄与する受容体を同定することによって、その受容体を介する細胞内移行経路やエンドソームからの脱出機構の解明につながり、機能性分子の細胞内送達の効率を上げるための知見が得られると期待される。さらに、同定された受容体をターゲットとすることによって細胞種特異的な細胞内送達が可能になると考えられる。

第一章において、光架橋法により R8 の相互作用タンパク質の同定に成功したが、R8 の細胞内移行に直接的に関わる細胞表面の受容体は得られなかった。その原因として、(1)細胞由来タンパク質の非選択的なストレプトアビジンビーズへの結合と溶出、および(2)膜タンパク質以外のタンパク質の混入が考えられた。そこで、第二章では、上記の二点を解決する新たな手法の開発と、これを用いた R8 の細胞内移行に関わる受容体の同定を目的として研究を行った。さらに、その受容体を介する細胞内移行経路についても詳細に検討した。

## 第一節 オクタアルギニンの相互作用タンパク質同定のための切断性光反応性 オクタアルギニンの設計

ビオチン化R8と光架橋された微量のR8相互作用タンパク質は、ストレプトアビジンビーズを用いれば原理的には効率良く単離濃縮できるはずである。しかし、目的タンパク質のビーズからの溶出の際には、強力な変性条件でビオチン-ストレプトアビジン相互作用を解消しなければならず、相互作用したタンパク質に対して大過剰に存在する内在性のビオチン化タンパク質や、ビーズに非特異的に吸着したタンパク質の混入が微量タンパク質の単離を困難にしている[26]。第一章においても、溶出後のゲル染色において、プローブ添加の有無にかかわらず高いバックグラウンドが検出された。ビーズと標的タンパク質の間の結合を選択的に切断できれば、標的タンパク質をバックグラウンドタンパク質の混入なく単離可能と考えられる[27]。

そこで本章では、R8と相互作用する膜タンパク質を同定するために、ストレプトアビジンビーズから架橋タンパク質を選択的に溶出できるビオチン修飾光反応性R8 (PhotoR8CL)の設計を行った (Figure 2-1A)。光反応基としては、UV照射によりプローブと結合タンパク質の間に共有結合を形成するジアジリンを使用し、R8のN末端に4-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoic acid [(Tmd)BA]を用いて導入した。架橋タンパク質を選択的に溶出するための切断リンカーとしては、還元剤である亜ジチオン酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )で切断可能なジアゾベンゼンリンカー[28]を、R8のC末端に導入した。ジアゾベンゼンリンカーについては、リガンド結合タンパク質のアフィニティー精製における有用性は確認されているが、光架橋産物の単離に応用された例は報告されていない。さらに、C末端リシンの側鎖に、ストレプトアビジンビーズにより精製するためのビオチンタグを導入した。PhotoR8CLを用いた相互作用タンパク質の同定手順はFigure 2-1Bに示すように計画した。

PhotoR8CLの合成は以下のように行った (Scheme 2-1)。4-[5-(*N*-fluorenylmethyloxycarbonyl-2-amino-ethyl)-2-hydroxy-phenylazo]-benzoic acid (Fmoc-Azo)を以前報告された方法により合成した[28]。それを用いて、Fmoc-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Azo-Lys(Mtt)-resinをFmoc固相合成法により合成した。N末端のFmocをpiperidineにより脱保護し、(Tmd)BAを縮合反応によりN末端に導入し、(Tmd)BA-[Arg](Pbf)]<sub>8</sub>-Azo-Lys(Mtt)-resinを合成した。リシン残基のMtt

(4-methyltrityl)基をHFIP/DCM (1:4)の脱保護カクテルで選択的に脱保護した[29]。次いで、biotinamido hexanoic acid N-hydroxysuccinimide etherと反応させることで、リシン側鎖のεアミノ基をbiotinで修飾した。TFA/EDT (95:5)を用いてペプチドの最終脱保護と樹脂からの切り出しを行った後、RP-HPLCで精製して目的のPhotoR8CLを得た。

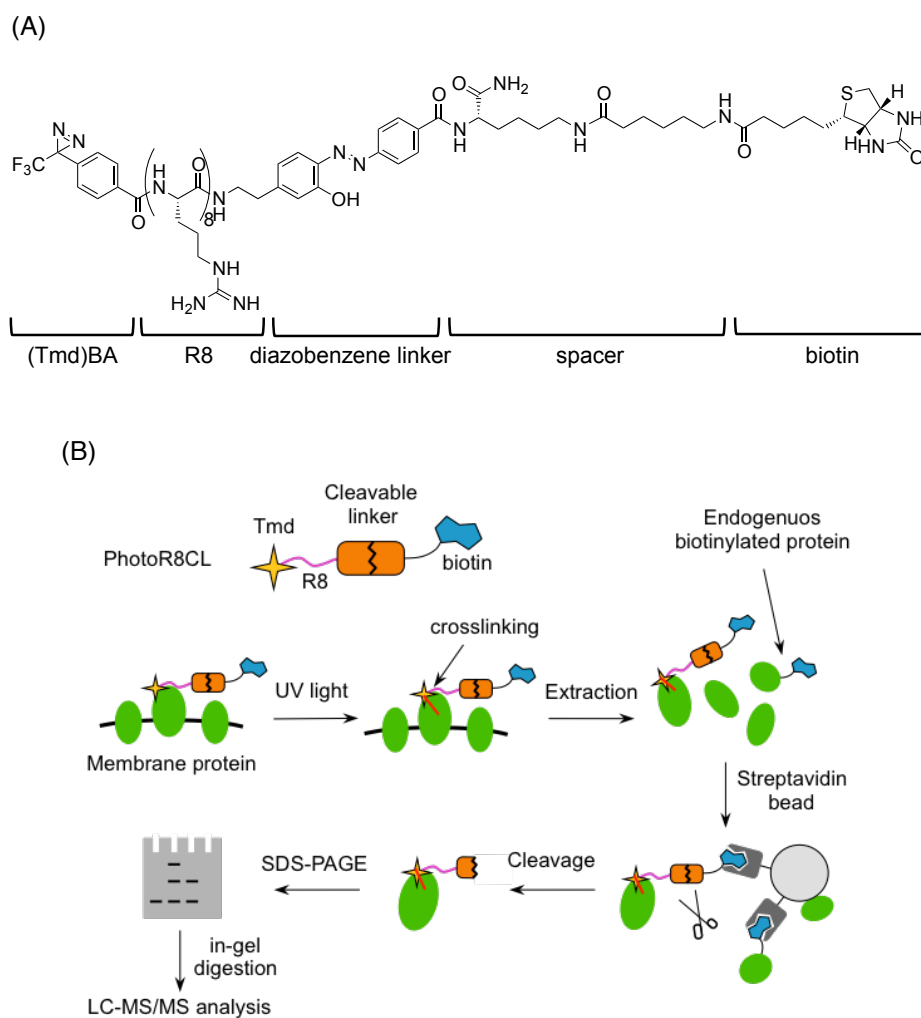
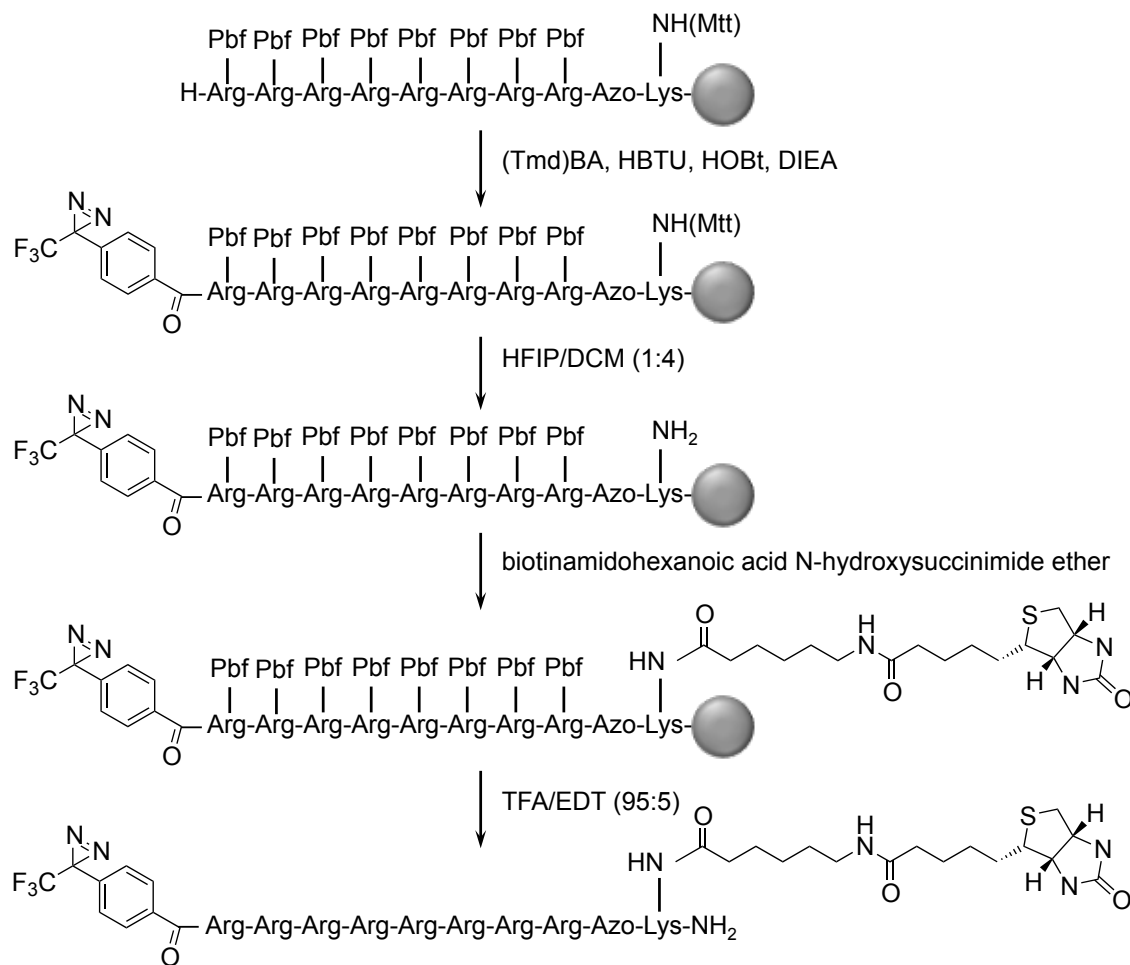


Figure 2-1. Combination system of photocrosslinker and cleavable linker for identification of R8 receptors. (A) Structure of PhotoR8CL, the photoaffinity probe for the identification of R8-interacting proteins. (B) The procedures for identification of proteins interacted with PhotoR8CL. Cells are treated with PhotoR8CL and irradiated with UV. Cells are lysed, and then isolated using streptavidin-coated beads. Crosslinked proteins are detected by reductant from beads prior to gel-electrophoresis. Protein bands are trypsinized and the crosslinked proteins are identified by LC-MS/MS analysis.





Scheme 2-1. Synthesis scheme for PhotoR8CL.

プローブがデザイン通りに光反応性と $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ による切断可能性を併せ持つかたちで機能するのかどうかに関して、反応をHPLCとMSによりモニターすることで検証をした。まず、未反応のPhotoR8CLをHPLCにより分析したところ、22分にピークが検出された (Figure 2-2A, left)。得られたピークに対応するサンプルをMALDI-TOF MSで分析した結果、質量2213.36と2185.73に対応する2つのピークが検出された (Figure 2-2A, right)。2213.36のピークはPhotoR8CLの未変化体であり、2185.73に対応するピークは、MALDI-TOF MSのレーザー照射によりジアジリンが熱分解されて窒素が脱離したものと考えられた[13]。次に、PhotoR8CLに365 nmの紫外線を5分間照射してHPLCで分析したところ、21分付近にブロードなピークを検出した (Figure 2-2B)。このピークのサンプルをMALDI-TOF MSで測定すると、2203.1に対応するピークが得られた。このピークは、以前の報告にあるように、UV照射によりジアジリンが水と反応したものに对应すると考えられた[22]。次に、UV照射後に、亜ジチオン酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )によりジアゾベンゼンリンカーが切断され、報告通りアニリンのフラグメントが検出されるのかどうかを検討した。PhotoR8CLを5分間UV照射し、次いで25 mMの $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ で15分間処理した。そのサンプルをHPLCで分析したところ、新たに11.2分にピークが、16分付近にブロードなピークが検出された。これらのピークについてMALDI-TOF MSで測定したところ、604.14、1602.25というピークがそれぞれ検出され、期待通りに還元剤によって分解物された2つのアニリンが生成されたことが確認された (Figure 2-2C)。以上の結果から、UV照射後においても、ジアゾベンゼンリンカーは $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ により切断されることが示された。

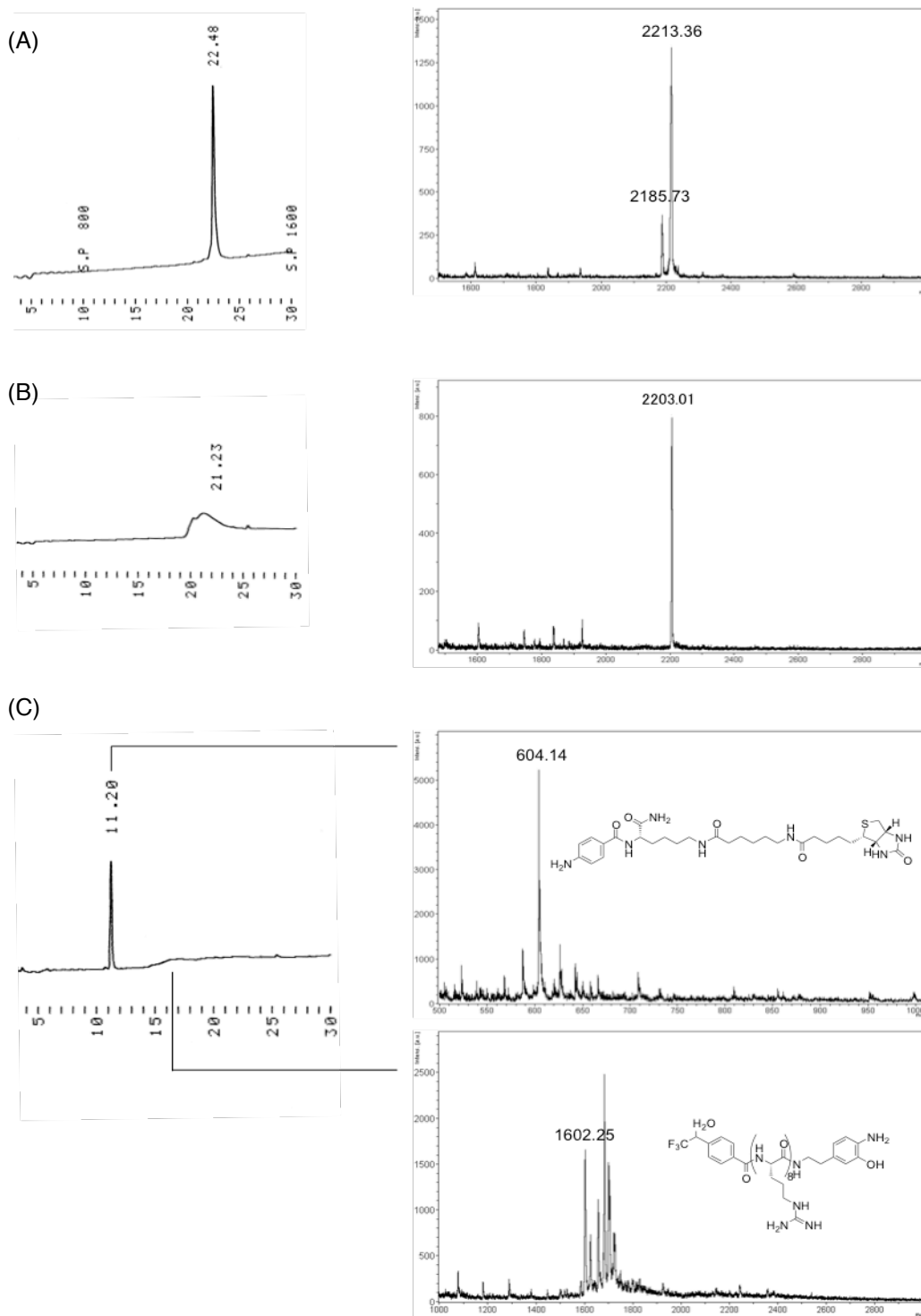


Figure 2-2. Reduction cleavage of PhotoR8CL. (A) HPLC chromatogram and MALDI-TOF MS spectrum of PhotoR8CL. (B) HPLC chromatogram and MALDI-TOF MS spectrum of PhotoR8CL irradiated with 365 nm light for 10 min. PhotoR8CL reacted with H<sub>2</sub>O. (C) HPLC chromatogram and MALDI-TOF MS spectrum of PhotoR8CL incubated with 25 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> for 15 min after UV irradiation.

## 第二節 光架橋法によるR8と相互作用する膜タンパク質の同定

R8のエンドサイトーシスによる取り込みに関与する細胞表面タンパク質 (受容体)を同定するために、エンドサイトーシスによる取り込みを抑制する低温条件下で、第一章第一節と同様に直接膜透過による細胞質への移行を防ぐために $K^+$ -rich buffer [24]を外液として用いて光架橋を行った。HeLa細胞を $K^+$ -rich buffer中で1  $\mu$ M PhotoR8CLで4°C、5分間処理し、その後10分間、365 nmのUVを照射した。細胞をPBSで洗浄後に破碎した。次いで、相互作用タンパク質として膜タンパク質を効果的に同定するために、超遠心によって膜タンパク質画分を得た。目的タンパク質をストレプトアビジンビーズで精製して濃縮し、 $Na_2S_2O_4$ によりビーズから溶出させた。その後、溶出されたタンパク質をSDS-PAGEで展開し、銀染色によって検出した (Figure 2-3A, B)。その結果、PhotoR8CLを添加したサンプルでは、PhotoR8CLを添加していないサンプルと比較して7本の特異的なバンドが検出された (arrows in Figure 2A)。また、 $Na_2S_2O_4$ 処理により溶出を行った後のストレプトアビジンビーズをSDSサンプルバッファー中で煮沸し、残存するタンパク質を溶出させて溶出したサンプルを SDS-PAGEを行ったところ、PhotoR8CLの添加の有無にかかわらず、ビーズに対して非特異的に吸着したタンパク質や、内在性のビオチン化タンパク質と思われるバンドが検出された (Figure 2-3B)。

次に、 $Na_2S_2O_4$ 処理によって得られたバンドを切り出し、ゲル内消化した後にLC-MS/MSにより解析することによって、17種類の膜タンパク質が同定された (Table. 2-1)。同定されたタンパク質には、いくつかのプロテオグリカンが含まれていた。これらのタンパク質のR8との相互作用は硫酸化多糖とアルギニンのグアニジノ基との高い親和性 (~10 nM)によるものと考えられた[30]。

このような結果は、ジアゾベンゼンリンカーの $Na_2S_2O_4$ による切断によって、ストレプトアビジンビーズに非特異的に吸着されたタンパク質の混入を大幅に低減した形で、架橋タンパク質が優先的に溶出された可能性を示唆する。

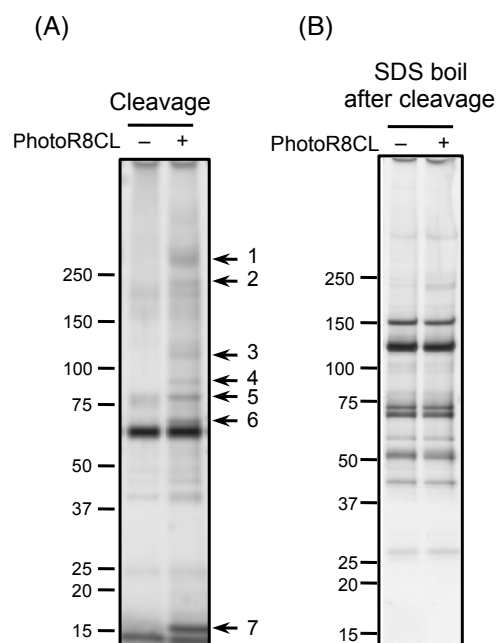


Figure 2-3. Combination of (i) use of membrane fraction and (ii)  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -cleavable azobenzene linker may reduce contamination of non-specific proteins bound to streptavidin beads. (A) SDS-PAGE of proteins liberated from streptavidin-coated beads and cleaved by the  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -treatment. HeLa cells were treated with  $1 \mu\text{M}$  PhotoR8CL at  $4^\circ\text{C}$  for 5 min and were irradiated with 365 nm UV light for 10 min. The cells were lysed and membrane fractions were collected. The crosslinked proteins were liberated from streptavidin beads by the cleavage with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ . The proteins were analyzed with SDS-PAGE and visualized by silver staining. (B) SDS-PAGE of proteins remaining on the streptavidin beads after  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  cleavage.

Table 2-1. Identified proteins by photocrosslinking experiments

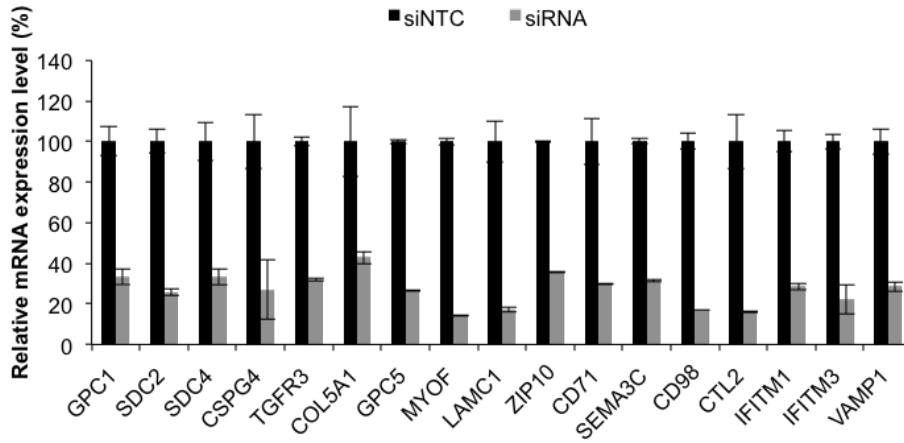
<b>Band No.</b>	<b>Protein</b>
1	Glypican-1 (GPC1)
	Syndecan-2 (SDC2)
	Syndecan-4 (SDC4)
	Chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4)
	Transforming growth factor beta receptor type 3 (TGFR3)
	Collagen alpha-1(V) chain (COL5A1)
2	Glypican-5 (GPC5)
	Myoferlin (MYOF)
	Laminin subunit gamma-1 (LAMC1)
3	Zinc transporter ZIP10 (ZIP10)
4	Transferrin receptor protein 1 (CD71)
	Semaphorin-3C) (SEMA3C)
5	4F2 cell-surface antigen heavy chain (CD98)
6	Choline transporter-like protein 2 (CTL2)
7	Interferon-induced transmembrane protein 1 (IFITM1)
	Interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3)
	Vesicle-associated membrane protein 1 (VAMP1)

### 第三節 R8の細胞内移行におけるSyndecan-4 (SDC4)の寄与

同定したタンパク質の中に、R8の細胞内移行に関与するタンパク質があるかどうかについて検討するために、同定したタンパク質を対応するsiRNAによりノックダウンし (Figure 2-4A)、その細胞におけるR8-Alexa488の細胞内移行量をフローサイトメータにより測定した。その結果、SDC4をノックダウンした細胞において、R8-Alexa488の取り込みが約30%低下することが明らかになった (Figure 2-4B)。そこで、SDC4を標的とする別の配列のsiRNA (siSDC4-2)でノックダウンした (Figure 2-5A)ところ、R8の細胞内への取り込みが同様に低下したことから (Figure 2-5B)、R8の細胞内移行におけるSDC4の寄与の可能性が示唆された。

SDC4ノックダウンによるR8-Alexa488の取り込みの低下は共焦点顕微鏡観察によっても確認された。Figure 2-4のsiRNAを用いたSDC4ノックダウン細胞を1  $\mu$ M R8-Alexa488とインキュベートし、共焦点顕微鏡により観察したところ、SDC4ノックダウンした細胞では、コントロールの細胞に比べてドット様の蛍光シグナルの減少がみられた (Figure 2-6)。粒状シグナルは主にエンドソーム内に保持されたR8-Alexa488のシグナルであると考えられ、SDC4のノックダウンによってエンドサイトーシスによるR8-Alexa488の細胞内取り込みが低下したことが示唆される。これらの結果を総合して、SDC4はR8のエンドサイトーシスによる細胞内取り込みに関与することが示唆された。

(A)



(B)

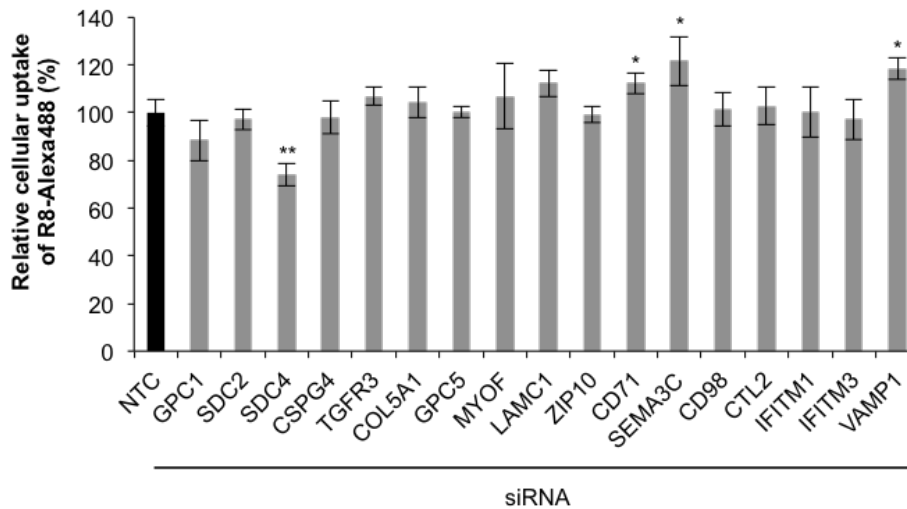


Figure 2-4. Possible involvement of SDC4 onto the cellular uptake of R8. (A) Quantitative real-time PCR measurement of mRNA of proteins in siRNA-transfected cells. The mRNA levels of proteins identified by photocrosslinking (Table 2-1) were analyzed. All data were normalized for the expression of  $\beta$ -actin. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. (B) Effect of downregulation of proteins in (A) on cellular uptake of R8-Alexa 488. HeLa cells were transfected with siRNAs for specific proteins or non-targeting sequence (siNTC), and then treated with 1  $\mu$ M R8-Alexa488 at 37°C for 30 min. Uptake of R8-Alexa488 was analyzed by flow cytometry. The amounts of cellular uptake of R8-Alexa488 were normalized to the siNTC-transfected cells. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown.



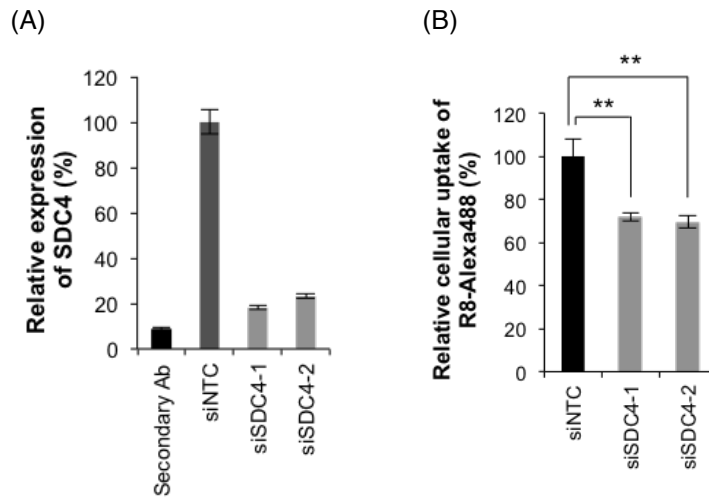


Figure 2-5. Decrease in cellular uptake of R8 by the SDC4 knockdown. (A) SDC4 expression levels on cell surfaces. HeLa cells transfected with siSDC4-1, siSDC4-2 or siNTC were treated with anti-SDC4 antibody and then labeled with anti-mouse IgG conjugated with Alexa488. Cells were analyzed by flow cytometry and the values were normalized to those of the siNTC-transfected cells. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. (B) Involvement of SDC4 in cellular uptake of R8-Alexa488 is confirmed by using distinct siSDC4. HeLa cells transfected with siSDC4-1, siSDC4-2 or siNTC were treated with 1  $\mu$ M R8-Alexa488 and incubated at 37°C for 30 min. Cellular uptake of R8-Alexa488 was analyzed by flow cytometry. The amounts of uptake of R8-Alexa488 were normalized to the siNTC-transfected cells. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. siSDC4-1 is identical with that employed for Figure 2-4.

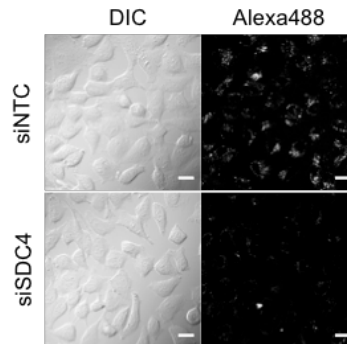


Figure 2-6. Decrease in endocytic uptake of R8-Alexa488 by SDC4-knockdown cells. HeLa cells were transfected with siNTC or siSDC4, and then treated with 1  $\mu$ M R8-Alexa488 for 30 min at 37°C. Cells were imaged by confocal microscopy. Scale bar: 20  $\mu$ m.

細胞を固定することによって、蛍光標識したAR-CPPsはエンドソームから抜けて細胞質へと拡散するため、正しい局在が観察できなくなることが報告されている[31]。そこで、R8処理によってSDC4が内在化するかに関してantibody feeding assayを行って、生細胞で評価した (Figure 2-7A) [32]。この方法は、細胞外ドメインを抗原とする抗体を用いて細胞膜上の受容体を標識することで、リガンドによる受容体の細胞表面から細胞内への移行を評価するものである。細胞表面のSDC4を抗SDC4抗体で標識し、さらにAlexa488ラベルされた2次抗体で標識した。その細胞をtetramethylrhodamine (TAMRA)標識されたR8 (R8-TAMRA)で処理し、30分後に共焦点顕微鏡で細胞の観察を行った。その結果、SDC4とR8がドット状のシグナルとして細胞内で共局在していることが観察された(Figure 2-7B)。したがって、30分のR8処理によって、SDC4はR8と共に内在化することが示唆された。

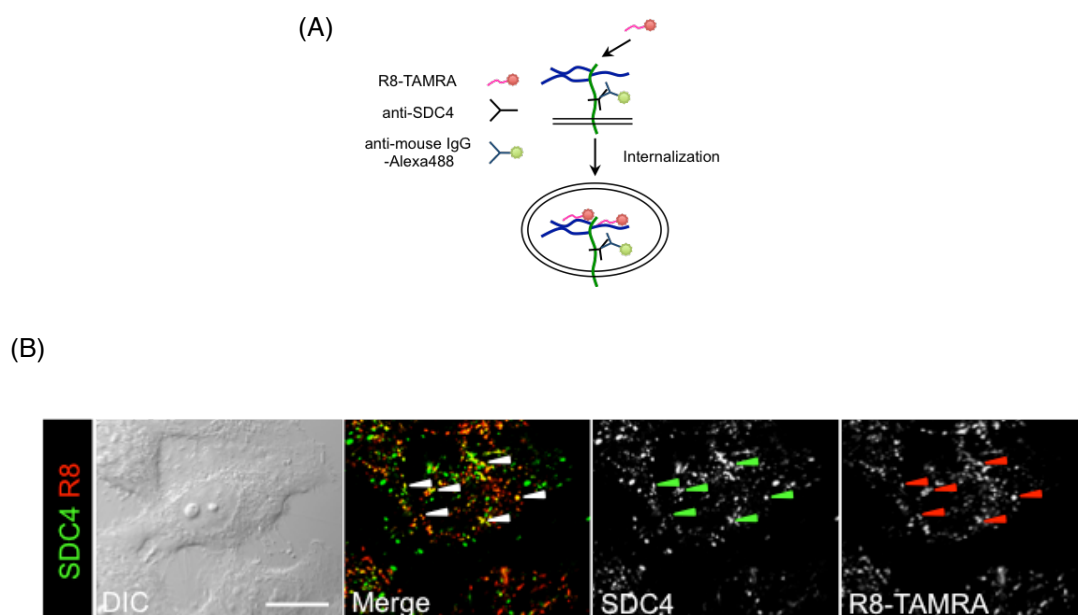


Figure 2-7. (A) Schematic diagram of the antibody feeding assay. Cell-surface SDC4 were labeled with anti-SDC4 antibody together with Alexa488-labeled secondary antibody. Colocalization with TAMRA-labeled R8 was then analyzed. (B) Punctate signals of R8-TAMRA colocalizing with SDC4. Cells were treated with SDC4 antibody, followed by treatment of Alexa-labeled secondary antibody and the cells were subjected to 30 min incubation with 1  $\mu$ M R8-TAMRA at 37°C. Cells were analyzed by confocal microscopy. Scale bar: 20  $\mu$ m.

SDC4をはじめとするSDCファミリーを強制発現させた細胞を5  $\mu$ MのR8で処理すると、マクロピノサイトーシスが誘導され、R8が細胞内に取り込まれると報告されている[33, 34]。さらに、R8によって、グリコサミノグリカン (GAG) 依存的なマクロピノサイトーシスが誘導されることも報告されている[20, 35]。そこで、5  $\mu$ M、10  $\mu$ Mの各濃度のR8の細胞内取り込みにおけるSDC4の寄与について検討した。SDC4ノックダウン細胞における各濃度のR8の取り込みをフローサイトメトリーと共焦点顕微鏡により評価した。その結果、5  $\mu$ Mおよび10  $\mu$ Mでは、SDC4ノックダウンのR8の細胞内取り込みへの有意な影響は確認されなかった (Figure 2-8A-C)。したがって、細胞外のR8濃度が高くなることで、内在性のSDC4の寄与は低下し、GAGを保持するような別の受容体を介する細胞内取り込み機構が作動する可能性が考えられた。また、R8が比較的低濃度 (1  $\mu$ M) のときには、内在性のSDC4の細胞内移行への寄与が大きいことが示唆された。

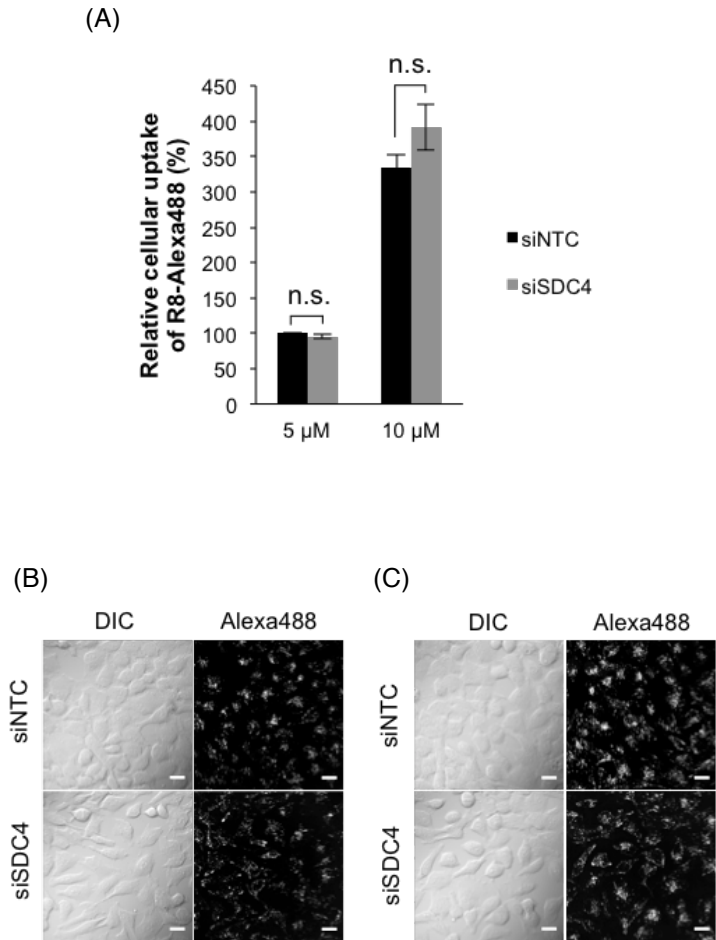


Figure 2-8. Decrease in contribution of SDC4 to cellular uptake of R8 at more than 5  $\mu$ M. (A) Downregulation of SDC4 expression has no significant effect on cellular uptake of R8-Alexa488 at 5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. HeLa cells transfected with siNTC or siSDC4 were treated with 5  $\mu$ M or 10  $\mu$ M R8-Alexa488 and incubated for 30 min at 37°C. Cells were analyzed by flow cytometry. The amounts of cellular uptake of R8-Alexa488 were normalized to the siNTC-transfected cells. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown. Confocal microscopic imaging of the cell treated with 5  $\mu$ M (B), or 10  $\mu$ M (C) for 30 min at 37°C.

#### 第四節 R8のSDC4を介した細胞内移行経路の検討

R8は複数のエンドサイトーシス経路により細胞内移行することが報告されている。そこで、今回の条件でR8がどのエンドサイトーシス経路によって細胞内に移行しているのかに関して、エンドサイトーシス阻害剤を用いた検討を行った。クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシスをそれぞれ阻害する薬剤を用いた。クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害するために、クラスリン被覆小胞の形成を阻害するスクロース [36]とmonodansylcadaverine (MDC) [37]を、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤として、カベオラ構造を壊すfilipin [38]およびnystatin [39]を用いた。また、マクロピノサイトーシスを阻害するために、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE)阻害剤の5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amiloride (EIPA) [40]、PAK1阻害剤のIPA-3 [41]、PKC阻害剤のGö6983 [42]、PI3K阻害剤のwortmannin [43]を用いた。これらを阻害することは、間接的にマクロピノサイトーシスを阻害することにつながる[41, 44]。HeLa細胞をこれらの阻害剤で処理し、1 μMのR8-Alexa488で30分インキュベートしたときの取り込み量をフローサイトメトリーで測定した。その結果、クラスリン依存性エンドサイトーシス、またはマクロピノサイトーシスを阻害したときにR8-Alexa488の細胞内取り込みの低下がみられた。一方、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤のfilipinで処理した場合には、取り込み量の変化はみられず、nystatinで処理した場合には取り込みの増大がみられた (Figure 2-9)。これらの結果から、R8は1 μMの濃度ではクラスリン依存性エンドサイトーシス、およびマクロピノサイトーシスによって取り込まれている可能性が示唆された。nystatinにより増加がみられた理由としては、nystatinは膜透過性をあげる性質があるために直接膜透過が促進された可能性が考えられる[45]。

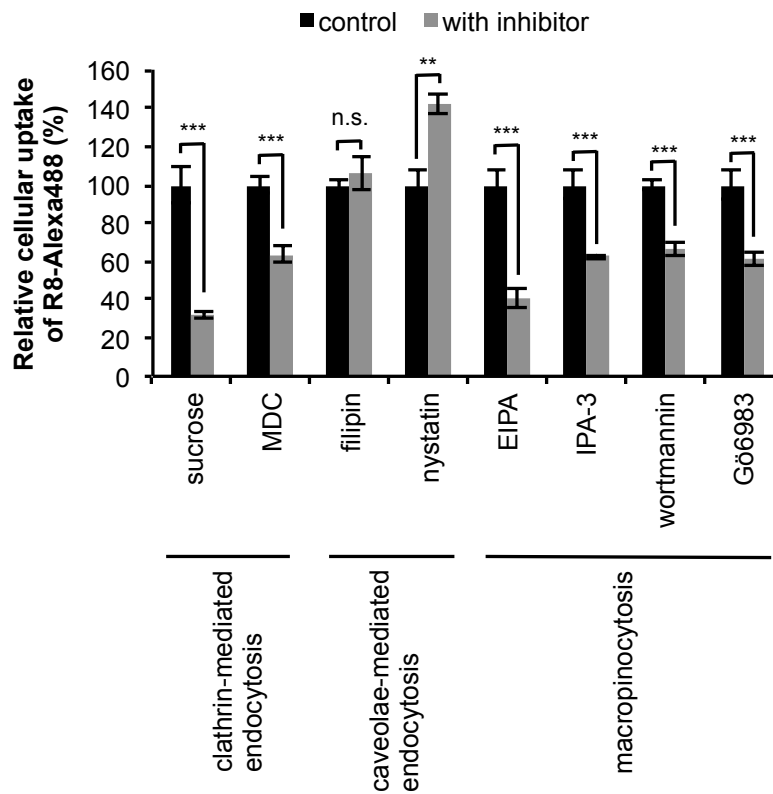


Figure 2-9. The effects of endocytosis inhibitors on the R8-Alexa488 uptake. HeLa cells were pretreated with respective inhibitors (or DMSO using as a control), and then incubated with 1  $\mu$ M R8-Alexa488 at 37°C for 30 min. R8-Alexa488 uptake was analyzed by flow cytometry. The amounts of cellular uptake of R8-Alexa488 were normalized to the control. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown.

次に、R8がSDC4を介してどのエンドサイトーシス経路により取り込まれているのかに関して、R8のエンドサイトーシスを阻害した状態で、SDC4ノックダウンの影響について検討した。もしも、エンドサイトーシス阻害剤で処理した細胞におけるR8の細胞内取り込み量と、阻害剤処理に加えて、SDC4をノックダウンした細胞のR8の取り込み量に変化がみられない場合には、SDC4を介するR8のエンドサイトーシスによる取り込みは、阻害剤で阻害した経路と同じものである可能性が示唆される。一方、阻害剤処理のみの時よりも、SDC4ノックダウンによってR8の取り込みがさらに低下する場合には、SDC4は阻害したエンドサイトーシス経路以外によるR8の取り込みに関与している可能性が示唆される。そこで、前述のエンドサイトーシス阻害剤で阻害し、SDC4ノックダウンの影響を検討したところ、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤で処理した場合には、SDC4ノックダウンによるR8の取り込みの有意な程低下はみられなかった (Figure 2-10A, B)。一方、マクロピノサイトーシス阻害剤で処理した場合には、SDC4ノックダウンによるR8の取り込みの低下がみられた (Figure 2-10C-F)。したがって、SDC4はR8のクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与していると考えられた。

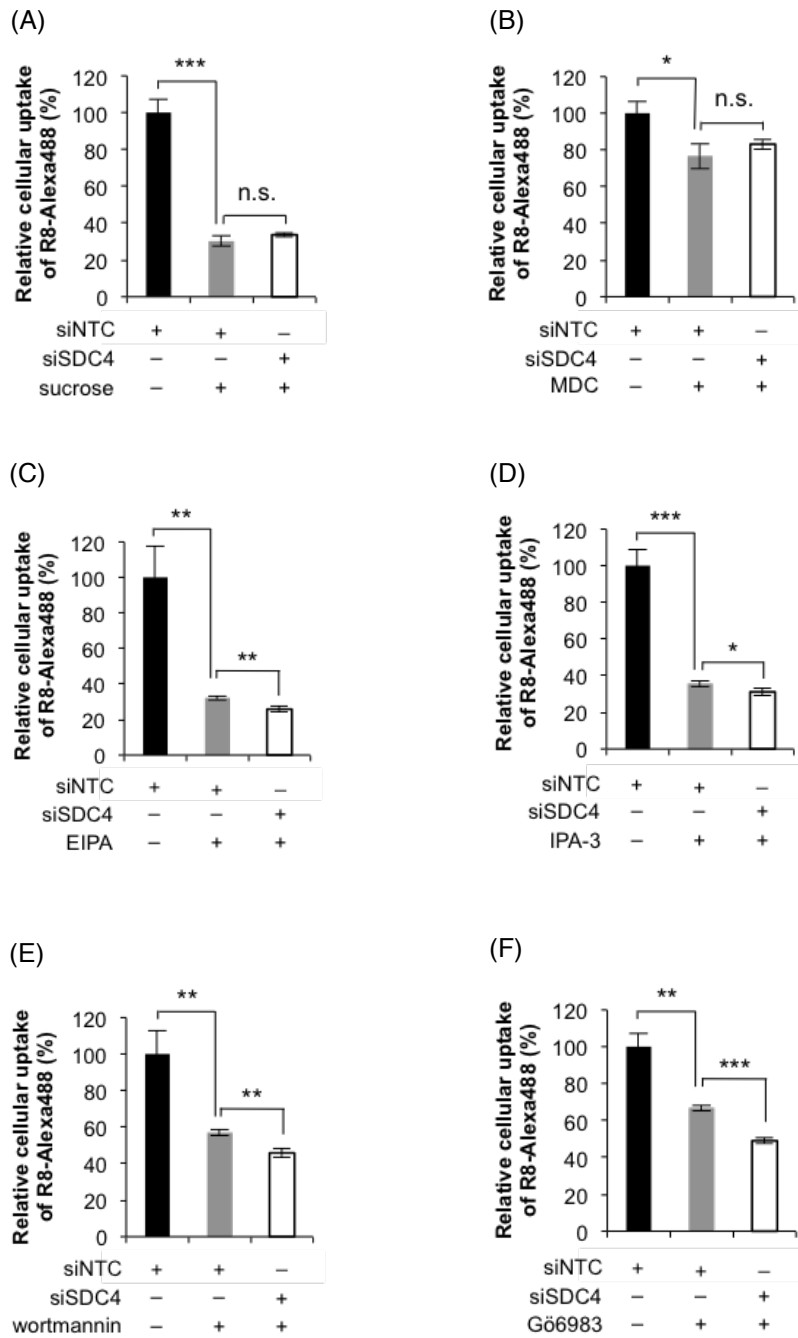


Figure 2-10. Effect of downregulation of SDC4 on cellular uptake of R8-Alexa488 in cells treated with endocytosis inhibitors. (A-F) HeLa cells were transfected with siNTC or siSDC4 for 48 hr prior to pretreatment with endocytosis inhibitors (or DMSO as a control). Cells were incubated with 1  $\mu$ M R8-Alexa488 at 37°C for 30 min. R8-Alexa488 uptake was analyzed by flow cytometry. The amounts of cellular uptake of R8-Alexa488 were normalized to the siNTC-transfected cells. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown.



SDC4はクラスリン非依存性エンドサイトーシスで細胞内に移行することが報告されている[46]。近年、SDC4がクラスリン依存性エンドサイトーシスにより内在化することも報告されたが[47]、SDC4を介するクラスリン経路はほとんどわかっていない。そこで、R8のクラスリン依存性エンドサイトーシスによる細胞内取り込みにSDC4が関与しているのかどうかを調べるために、Figure 2-9と同様のantibody feeding assayを行った。細胞表面のSDC4を抗SDC4抗体により標識された細胞をMDCで前処理し、1  $\mu$ M R8-TAMRAを含有する培地で30分間インキュベートして共焦点顕微鏡で観察した。その結果、阻害剤処理なしではSDC4とR8の顕著な共局在が観察されたのに対して、MDC処理によって細胞内でのSDC4とR8の共局在の減少が観察された (Figure 2-11A)。SDC4とR8の共局在を定量的に評価するために、これらの画像のピアソン係数を計算すると、MDC処理によって係数が有意に小さくなった (Figure 2-11B)。よって、SDC4とR8の細胞内移行には、クラスリン依存性エンドサイトーシスが重要な役割を担っていることが示唆された。

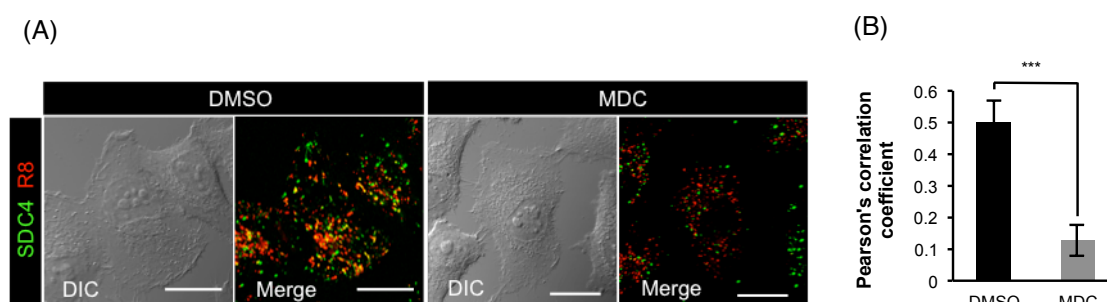


Figure 2-11. R8 and SDC4 are internalized by clathrin-mediated endocytosis. (A) Colocalization of R8-TAMRA with antibody-labeled SDC4 decreased by treatment with a clathrin-mediated endocytosis inhibitor (MDC). Cell-surface SDC4 was labeled by sequential pretreatment of HeLa cells with anti-SDC4 antibody for 30 min and with Alexa488-conjugated anti-mouse IgG as secondary antibody for 30 min in serum-free a-MEM containing 0.5% (w/v) bovine serum albumin. After pretreatment, cells were treated with MDC for 30 min and were treated with 1  $\mu$ M of R8-TAMRA for 30 min at 37°C, and were subjected to microscopic analysis. Cellular localization of these signals were analyzed by confocal microscopy. (B) Pearson's correlation coefficients were obtained for the quantification of colocalization between R8-TAMRA and SDC4 in eight cells. Scale bars: 20  $\mu$ m.

R8がSDC4との相互作用を保ったままクラスリン依存性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれるかどうかを検討するために、time-lapse imagingを行った。細胞表面のSDC4をAlexa405ラベルされた抗体で標識し、R8-TAMRAとクラスリン依存性エンドサイトーシスマーカーであるAlexa488ラベルされたトランスフェリン (Tf-Alexa488)を添加して、SDC4、R8、およびTfの局在について共焦点顕微鏡を用いて観察した。その結果、SDC4とR8の蛍光シグナルに加え、クラスリン依存性エンドサイトーシスマーカーであるTfが共局在して細胞内に移行することが観察された (Figure 2-12)。この結果は、SDC4はR8のクラスリン依存性エンドサイトーシスの受容体であることを支持するものである。

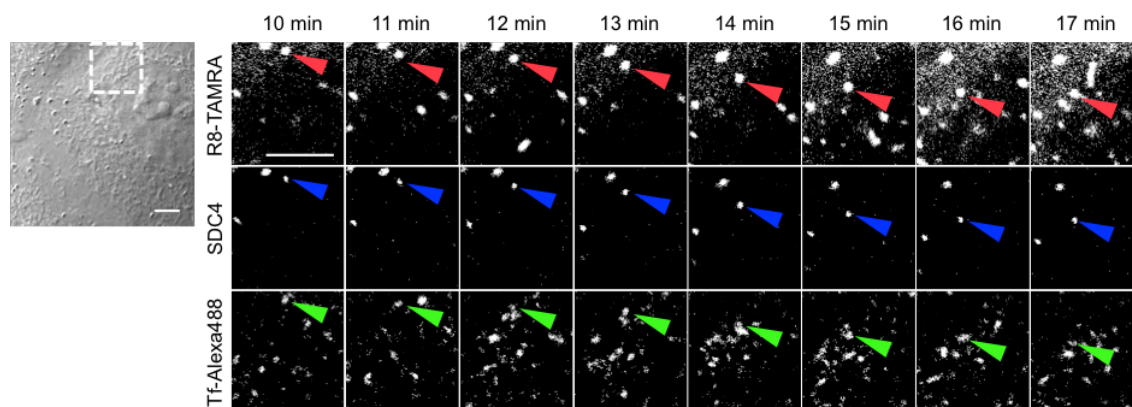


Figure 2-12. Colocalization of R8 signals with those of SDC4 and transferrin in endosomes. Cell-surface SDC4 was labeled by sequential pretreatment of HeLa cells with anti-SDC4 antibody for 30 min and with Alexa405-conjugated anti-mouse IgG as secondary antibody for 30 min in serum-free a-MEM containing 0.5% (w/v) bovine serum albumin. After pretreatment, Cells were then incubated with 1  $\mu$ M R8-TAMRA and 25  $\mu$ g/mL transferrin-Alexa488 and observed by time-lapse imaging. Arrows indicate vesicles containing SDC4, transferrin and R8. Scale bar: 5  $\mu$ m.

## 第五節 R8との融合タンパク質の細胞内送達におけるSDC4の寄与

AR-CPPsのタンパク質送達能の評価方法の一つとして、Cre-loxPシステムが用いられている[48]。Creリコンビナーゼは細胞膜を透過できないので、loxP配列の組み換えは起こらない。しかし、CPPをコンジュゲートするとCreリコンビナーゼが細胞内に導入されて組み換えが起こるので、その割合を算出することによってCPPsのタンパク質送達能を評価することができる。本研究においても、R8によるタンパク質の細胞内送達を評価するために、loxP-DsRed-loxP-EGFPをコードするDNAをゲノムに挿入したFlp-In loxP 293細胞を常法に従って樹立した。Flp-In loxP 293細胞は、Creリコンビナーゼによる組み換えが起きていない場合にはEGFPを発現しておらず、DsRedを発現している。しかし、Creリコンビナーゼが細胞内に導入されると、loxP同士の間で組み換えが起きてEGFPが発現する (Figure 2-13A)。CreR8は、CreのC末端側から核移行シグナル (NLS)、R8、大腸菌からsingle-stepで精製するためのHis-tagを含んでいる。R8を持たないCreをコントロールとして用いた (Figure 2-13B)。CreおよびCreR8は大腸菌発現系を用いて調製し、純度はSDS-PAGEにより確認した (Figure 2-13B)。EGFPが発現した細胞の割合によってCreR8の細胞内送達を評価した (Figure 2-13D)。

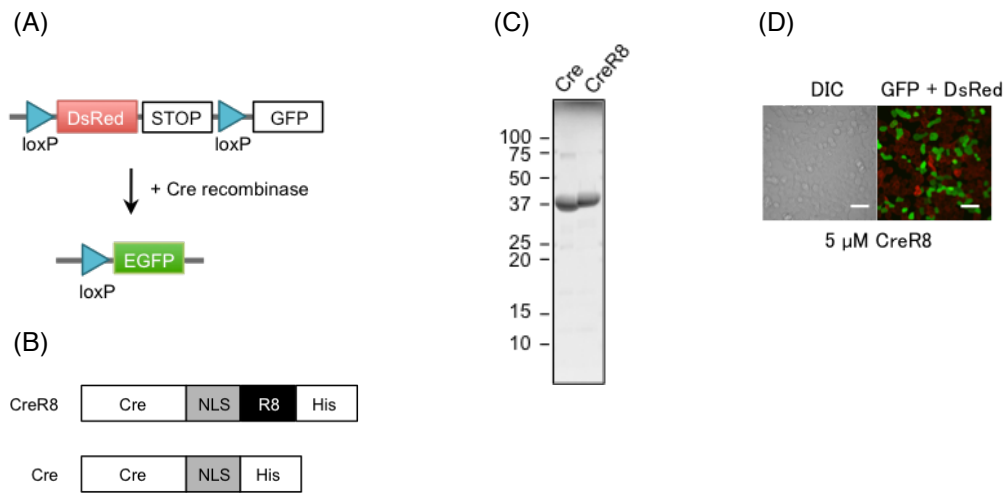


Figure 2-13. (A) Schematic representation of the reporter gene construct of Flp-In loxP HEK293 stable cell line. Cre deletes the loxP-flanked DsRed segment, thereby activating EGFP gene. (B) Design of expression cassettes of Cre fusion proteins. Both constructs encode Cre recombinase and a His-tag as represented by white boxes. Black boxes represent R8. The gray box represents a nuclear localization signal (NLS) (myc; EQKLISEEDL) to facilitate translocation of Cre proteins into nucleus and promote gene rearrangement. (C) SDS-PAGE analysis of the purified Cre or CreR8 through Ni(II)-affinity chromatography. (D) Internalization of CreR8 lead to gene rearrangement and expression of EGFP in the cells.

CreR8の細胞内導入にSDC4が寄与するのかどうかについて検討するために、SDC4をノックダウンしたFlp-In loxP 293細胞を用いて、CreおよびCreR8による遺伝子組み換え効率を評価した。siRNAを導入した細胞において、5  $\mu$ MのCreまたはCreR8を添加して30分間インキュベートし、さらに24時間培養してEGFPの発現を評価した。Creを添加した細胞においては、SDC4のノックダウンの有無にかかわらず、EGFPの発現はほとんどみられなかった。これに対して、CreR8を添加した細胞では、siNTCでトランスフェクションしたコントロールの細胞と比べて、SDC4をノックダウンすることによって、CreR8による組み換え効率が約30%低下した (Figure 2-14)。これらの結果から、組み換え酵素CreリコンビナーゼをR8によって細胞内導入することができ、この細胞内導入の過程にSDC4が関与していることが示唆された。

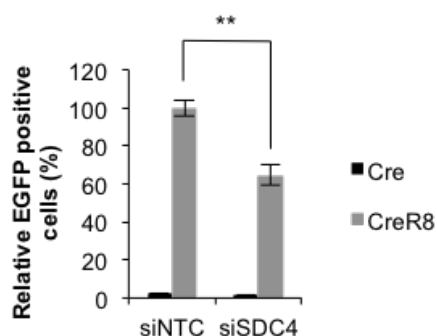


Figure 2-14. Decrease in gene rearrangement by CreR8 in SDC4-knockdown cells. Flp-In loxP HEK293 cells transfected with siNTC or siSDC4 were incubated for 30 min in medium containing 5  $\mu$ M Cre or CreR8. After incubation, cells were washed, trypsinized, replated, and incubated for 24 hr. EGFP expressing cells were analyzed by flow cytometry and the values were normalized to siNTC-transfected cells treated with CreR8. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown.

## 第六節 R8との融合タンパク質のクラスリン依存性エンドサイトーシスにおけるSDC4の寄与

次に、R8によるCreタンパク質導入において、R8ペプチドと同様に、クラスリン依存性エンドサイトーシス、および、マクロピノサイトーシスが寄与しているかに関して、それぞれの阻害剤を用いて検討を行った。クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤のスクロース、またはマクロピノサイトーシス阻害剤のEIPAで処理し、CreR8による組み換え効率を評価した。その結果、スクロースおよびEIPAで処理することによって各エンドサイトーシスを阻害することで、EGFPが発現した細胞の割合が減少した (Figure 2-15A, B)。したがって、R8によるCreの細胞内送達にもクラスリン依存性エンドサイトーシス、およびマクロピノサイトーシスが関与していることが示唆された。

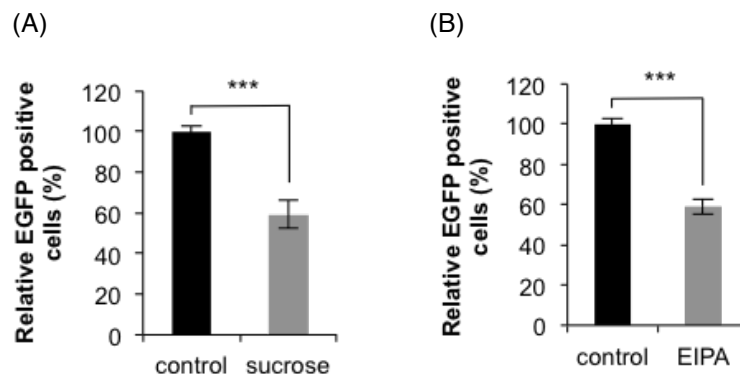


Figure 2-15. The effect of endocytosis inhibitors on CreR8 transduction. Flp-In loxP HEK293 loxP cells were pretreated in the presence and absence of (A) sucrose, (B) EIPA, and then incubated with 1  $\mu$ M R8-Alexa488 at 37°C for 30 min. After incubation, cells were washed, trypsinized, replated, and incubated for 24 hr. EGFP expressing cells were analyzed by flow cytometry and the EGFP expressing cells were normalized to the control (DMSO-treated cells). Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown.

次に、SDC4がCreR8のクラスリン依存性エンドサイトーシス、または、マクロピノサイトーシスにおいて何らかの貢献をしているのかに関して、Figure 2-10と同様の方法で検討した。その結果、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤で処理した場合にはSDC4ノックダウンによる組み換えの低下がおきないのに対して (Figure 2-16A)、マクロピノサイトーシスの阻害剤で処理した場合には、SDC4ノックダウンによる組み替え効率の低下がみられた (Figure 2-16B)。したがって、CreR8のクラスリン依存性エンドサイトーシスによる細胞内移行においてもSDC4の関与が示唆された。

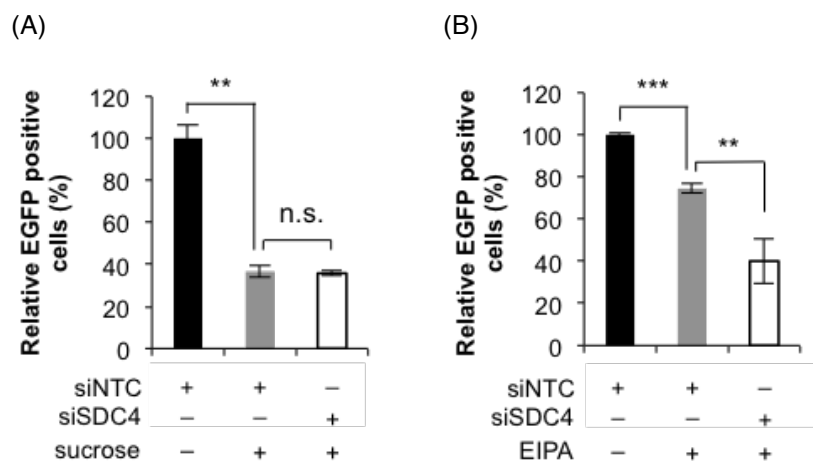


Figure 2-16. Effect of downregulation of SDC4 on CreR8 transduction into cells with inhibitor treatment. Flp-In loxP HEK293 cells were transfected with siNTC or siSDC4, followed by 48 hr incubation. Transfected cells were pretreated with or without (A) sucrose, and (B) EIPA, and then incubated with 5  $\mu$ M CreR8 at 37°C for 30 min. After incubation, cells were washed, trypsinized, replated, and incubated for 24 hr. EGFP expressing cells were analyzed with a flow cytometer and the values were normalized to siNTC-transfected cells without inhibitor treatment. Means  $\pm$  SD of three independent experiments are shown.

## 第二章の考察

本章では、切断リンカーと光反応基を組み合わせ、光架橋後の細胞溶解液の膜画分を解析することによって、非特異的吸着によるバックグラウンドが低減され、R8と相互作用する膜タンパク質を効果的に同定することが可能となった。この方法によって、R8の細胞内移行に関わる膜タンパク質としてSDC4が同定された。さらに、SDC4はR8のクラスリン依存性エンドサイトーシスの受容体であることが初めて明らかになった。SDC4を受容体とするクラスリン依存性エンドサイトーシスは、R8との融合タンパク質CreR8の細胞内送達にも関与することがわかった。近年、hepatitis B virusのX-proteinのN末端由来のペプチドであるXentryは細胞内移行性を示し、SDC4のクラスリン依存性エンドサイトーシスを介して細胞内移行すると報告されており[49]、SDC4を受容体とするクラスリン依存性エンドサイトーシスの細胞内送達への関与が示唆される。したがって、SDC4をターゲットとすることによって、エンドソームからの脱出など細胞内導入に関わるより詳細な知見が得られ、タンパク質送達の効率改善につながることを期待される。また、SDC4はがん細胞において過剰に発現しており[50, 51]、がん組織を標的とする細胞内送達にも適用可能かもしれない。



## 総 括

本研究では、新規細胞内送達キャリア創製のための知見を得るために、効率よく細胞内にタンパク質を送達することに用いられているオクタアルギニン(R8)に着目し、光架橋法により R8 の細胞内移行に関わるタンパク質の同定およびその細胞内移行経路の検討を行った。

第一章では、光反応基であるジアジリンを R8 に導入した光反応性 R8 (Biotin-Photo-R8)を合成し、これを用いて R8 の相互作用タンパク質の探索を行い、LanCL1 を同定した。さらに、LanCL1 を強制発現することで R8 の細胞内取り込み量が増加することから、LanCL1 が R8 の細胞内取り込みに関与している可能性を示した。その一方で、R8 の細胞内取り込みにかかわる細胞膜受容体の同定には、光架橋法に改善が必要であることが示された。

第二章では、第一章で明らかになった光架橋法の問題点である(1) ストレプトアビジンビーズに非特異的に吸着したタンパク質の混入によるゲル染色時の高いバックグラウンド、および(2) 細胞質タンパク質の混入を解決するような光架橋法について検討した。(1)については、切断リンカーとしてジアゾベンゼンを導入することによってビーズからの選択的溶出を可能にした。一方、(2)については、タンパク質を抽出する際にまず膜画分を抽出し、ビーズによる精製を行うことによって、細胞質タンパク質の混入を防いだ。これらによって、R8 と相互作用する膜タンパク質を効果的に単離して同定することに成功し、さらに、同定したタンパク質のうちで SDC4 が R8 の細胞内移行に寄与していることを明らかにした。

阻害剤によりエンドサイトーシスを阻害して、さらに SDC4 ノックダウンすることによって、SDC4 を介する R8 の細胞内移行経路について検討したところ、SDC4 は R8 のクラスリン依存性エンドサイトーシスに関与する可能性が示唆された。また、SDC4 と R8 の共局在がクラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害によって低下することや、R8 と SDC4 がトランスフェリンと共局在して細胞内に移行していることから、SDC4 は R8 のクラスリン依存性エンドサイトーシスの受容体として寄与していることが初めて示唆された。さらに、R8 と Cre リコンビナーゼの融合タンパク質の細胞内送達に関しても、R8 と同様に SDC4 のクラスリン依存性エンドサイトーシスが関与していることが示された。今後、さらなる受容体探索を行うことによって、アルギニンペプチドの細胞内移行機

構の解明が進むことにより、より効率的な細胞内送達キャリアの創製につながる  
ことが期待される。

以上より、切断リンカーを導入した光反応性アルギニンペプチドを用いた光  
架橋法と膜画分の抽出の組み合わせは、アルギニンペプチドの受容体の同定に  
おいて有用な手法になりうると考えられる。さらに、SDC4を介するクラスリン  
依存性エンドサイトーシスは、R8ペプチドだけでなく、R8を用いたタンパク質  
の細胞内送達においても有用であり、今後は細胞種選択的な細胞内タンパク質  
送達やより効率的な送達キャリアの創製に向けて有用な情報を提供すると期待  
される。

## 実験の部

### 第一章に関する実験

#### ペプチドの合成

ペプチド樹脂の合成：

ペプチドの合成に用いた Fmoc-Arg (Pbf)、Fmoc-Gly、Fmoc-Cys (Trt)、*N*-hydroxybenzotriazole (HOBt)、および 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU)は、ペプチド研究所から購入した。Fmoc- $\gamma$ -Abu (GABA)は Novabiochem から購入した。biotinamidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ether は Sigma-Aldrich から購入した。Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub>-maleimide sodium salt は Invitrogen から購入した。Fmoc-(Tmd)Phe [23]は富山大学薬学部畑中先生より提供された。その他の試薬は和光純薬から購入した。ペプチドはすべて C 末端アミド型であり、シンプロペップ TGS-RAM 樹脂 (島津製作所)を用いて合成した。GABA-Tmd(Phe)-Gly-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-resin および [Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Gly-Cys(Trt)-resin を PSSM-8 ペプチド固相合成機 (島津製作所)により自動合成した。GABA-Tmd(Phe)-Gly-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-resin への biotin の導入は、3 当量の biotinamidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ether を用いて *N,N*-dimethylformamide (DMF)中、3 時間室温で回転混和して行った。

最終脱保護、樹脂からの切り出し、および精製：

最終脱保護および樹脂からの切り出しは、trifluoroacetic acid (TFA)-ethanedithiol (EDT) (95 : 5)で室温 3 時間処理することにより行った。脱保護したペプチドは、逆相 HPLC によって精製し、カラムにはナカライテスク社の Cosmosil 5C18-AR-II (10 × 250 mm)、ペプチドの分析には Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm) を用いた。

ペプチドの蛍光標識：

蛍光標識は C 末端のシステイン側鎖のチオール基に Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub>-maleimide を DMF-methanol (1:1)溶液中で 1.5 時間反応させて行い、反応物を逆相 HPLC によって精製した [20]。

ペプチドの同定：

逆相 HPLC により精製したペプチドは、凍結乾燥後、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS)により質量を測定し、理論値との一致を確認した。合成した各ペプチドのアミノ酸配列および質量分析の結果を以下に示す。

**Biotin-Photo-R8: biotin-GABA-Tmd(Phe)-Gly-(Arg)<sub>8</sub>-amide**

保持時間: 25.5 分 [カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm); 溶出液: A = 0.1% TFA 水溶液, B = 0.1% TFA CH<sub>3</sub>CN 溶液; %B 勾配: 5-85% 80 分; 流速: 1 mL/min; 検出波長: 220 nm]

MALDI-TOF MS: 2003.5 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2003.1]

**R8-Alexa488: H-(Arg)<sub>8</sub>-Gly-Cys(Alexa)-amide**

保持時間: 17.5 分 [カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm); 溶出液: A = 0.1% TFA 水溶液, B = 0.1% TFA CH<sub>3</sub>CN 溶液; %B 勾配: 5-85% 80 分; 流速: 1 mL/min; 検出波長: 220 nm]

MALDI-TOF MS: 2126.5 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2126.2]

## 細胞培養

ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 (HEK293T 細胞)は、10% (v/v)非働化ウシ胎児血清 (Gibco)を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、ニッスイ)中で培養した。ヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞は、10% (v/v) 非働化ウシ血清 (Gibco)を含むアルファ最小必須培地 ( $\alpha$ -MEM、Gibco)中で培養した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、80-90%コンフルエントの状態ですべて3-4 日ごとに継代を行った。

## 光架橋実験

$1.0 \times 10^6$  cells の HEK293T 細胞を 100 mm 培養ディッシュに播種し、48 時間培養した後に使用した。膜電位を消失させるために、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>を含む高濃度カリウムイオンを含む緩衝液 (K<sup>+</sup>-rich buffer (+) [100 mM L-glutamic acid monopotassium salt monohydrate, 43 mM KCl, 20 mM HEPES (pH7.4), 5 mM glucose])を用いた。培地を除去し、K<sup>+</sup>-rich buffer (+)で細胞を 3 回洗浄した後、最終濃度が 2.5  $\mu$ M になるように K<sup>+</sup>-rich buffer (+)に溶解した Biotin-Photo-R8 を加

え、37°C で 30 秒間処理後、4°C で 3 分間 UV 照射 (波長 : 365 nm、エネルギー : 7 mW/cm<sup>2</sup>、高さ : 5 cm)を行った。照射後、細胞を 0.5 mg/mL ヘパリン含有 K<sup>+</sup>-rich buffer (+)で洗浄し、Complete Mini, EDTA-free プロテアーゼ阻害剤 (Roche)を加えた RIPA buffer (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 0.1% SDS, 1 % NP-40, 1 % deoxycholate, 5 mM EDTA)で可溶化した。BCA Protein Assay Kit (Pierce)によりタンパク質濃度を測定し、タンパク質濃度 2.5 mg/600 μL の細胞溶解液を調製した。1 % 牛血清アルブミン (BSA) 含有 RIPA buffer で洗浄した streptavidin magneshere (Promega, 300 μL)を細胞溶解液に加え、4°C で 1 時間、回転混和した。その後、マグネットスタンドを用いて、1 % BSA 含有 RIPA buffer で 3 回、RIPA buffer で 3 回ビーズの洗浄を行い、ビオチン化タンパク質 (Biotin-Photo-R8 との光架橋体)を精製した。精製したビーズに 2 × SDS サンプルバッファーを 20 μL 加え、85°C の熱変性を 5 分間行い、電気泳動サンプルとした。これを SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル)で展開した後、セミドライ式ブロットィング法により polyvinylidene difluoride (PVDF)膜 (GE Healthcare)に転写した。転写された PVDF 膜を、5% BSA 含有 0.1% Tween-20 含有 phosphate buffered saline (PBS-T)に浸し、1 時間室温で振とうしてブロッキングを行った。その後、溶液を除き、5%BSA 含有 PBS-T 中に抗 biotin 抗体 (Bethyl Laboratories) (1:1000)を希釈した溶液を 1 次抗体として添加し、室温で 1 時間反応させた。PVDF 膜の PBS-T による 5 分間の洗浄を 3 回繰り返し、horseradish peroxidase (HRP)標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) (1:2000)と 5% BSA 含有 PBS-T 中で 1 時間反応させた。さらに、PVDF 膜の PBS-T による 5 分間の洗浄を 3 回繰り返し、ECL Plus (GE Healthcare)により化学発光を検出した。また、調製した光架橋複合体サンプルを SDS-PAGE (15%アクリルアミドゲル)で展開した後、銀染色を行った。

### タンパク質同定

銀染色により検出されたバンドを切り出し、1.5 mL チューブに回収した。30 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]-100 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1:1)を加えて 2 分間静置して脱染した。100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> でゲル片を洗浄して上清を取り除き、還元剤 (10 mM dithiothreitol, 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)を加え、60°C で 1 時間反応させた。上清を取り除き、アルキル化剤 (55 mM iodoacetamide, 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>)を加え、室温遮光下で 30 分間振とうした。Methanol-H<sub>2</sub>O-acetic acid (5:4:1, v/v/v)によりゲル片を洗浄し、上清を取り除き、Speedvac で減圧遠心濃縮した。その後、sequencing grade modified trypsin

(Promega)によりゲル内消化を終夜行い、得られたペプチド断片についてMALDI-TOF MSを用いて質量を測定し、データベース (MASCOT) で照合することによってタンパク質を同定した。

### プラスミド作製

HeLa 細胞より total RNA を抽出した。RNA から cDNA への逆転写反応は High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems)を用いて行い、cDNA ライブラリーを作製した。LanCL1 遺伝子は、cDNA ライブラリーより polymerase chain reaction により作製した。LanCL1 遺伝子を Nhe1/Sal1 サイトにより pCI Mammalian Expression Vector (pCI) (Promega) にサブクローニングした (LanCL1\_pCI)。

### タンパク質発現の確認

$5.0 \times 10^4$  cellsのHeLa細胞を24ウェルプレートに播種し、24時間培養した。その後、pCI-LanCL1をLipofectamine2000 (Invitrogen)によりトランスフェクションし、さらに24時間培養した。PBS (-)で2度洗浄した後に、0.01%トリプシンで5分処理して、細胞を回収した。上清を遠心除去し、RIPA bufferにより可溶化し、4°C、17000 × gで30分間遠心し、その上清を回収した。BCA Protein Assay Kit (Pierce)によりタンパク質濃度を測定し、10 µg/wellになるようにアプライしてSDS-PAGE で展開し、光架橋実験と同様にPVDF膜に転写した。転写されたPVDF膜を、5%BSA含有PBS-Tに浸し、1時間室温で振とうしてブロッキングを行った。その後、溶液を除き、5% BSA含有PBS-T中に抗LanCL1抗体 (Gene Tex) (1:1000) または抗actin抗体 (Invitrogen) (1:10000)を希釈した溶液を1次抗体として添加し、4°Cで終夜反応させた。PVDF膜のPBS-Tによる5分間の洗浄を3回繰り返し、それぞれHRP標識抗ラビットIgG抗体 (Cell Signaling Technology) (1:2000)、HRP標識抗マウスIgG抗体 (Invitrogen) (1:20000)と5%BSA含有PBS-T中で1時間反応させた。さらに、PVDF膜のPBS-Tによる5分間の洗浄を3回繰り返し、ECL Plus (GE Healthcare)により化学発光を検出した。

### R8-Alexa488 ペプチドの細胞内移行量の評価

$5.0 \times 10^4$  cells の HeLa 細胞を 24 ウェルプレートに播種し、24 時間培養した。タンパク質発現量の評価の際と同様にトランスフェクションし、さらに 24 時間

培養した。培地を除去し、血清を含まない $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -MEM (-))で細胞を2度洗浄した後、1  $\mu$ M の R8-Alexa488 を含む  $\alpha$ -MEM (-) 溶液で細胞を30分間インキュベートした (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。0.5 mg/mL のヘパリンを含む PBS (-) で3度洗浄し、0.01%トリプシンを加えて10分間培養後、細胞を1.5 mL チューブに回収した。これを遠心し、ペレット状になった細胞を PBS に懸濁して2回洗浄した後、最終的に PBS で希釈して、FACScalibur (BD Bioscience) (励起波長：488 nm、吸収フィルター：515-545 nm)により各サンプルあたり1万個の細胞の蛍光量を測定した。

## 第二章に関する実験

### ペプチドの合成

ペプチド樹脂の合成：

ペプチドの合成に用いた Fmoc-Arg (Pbf)、Fmoc-Gly、Fmoc-Cys (Trt)、*N*-hydroxybenzotriazole (HOBt)、および 2-(1*H*-benzotriazole-1-yl)-1, 1, 3, 3-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU)は、ペプチド研究所から購入した。Fmoc-Lys (Mtt)は渡辺化学工業から購入した。biotinamidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ether は Sigma-Aldrich から購入した。Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub>-maleimide sodium salt および tetramethylrhodamine-5-maleimide は Invitrogen から購入した。4-[3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]benzoic acid [(Tmd)BA]は富山大学薬学部畑中先生より提供された。4-[5-(*N*-fluorenylmethyloxycarbonyl-2-amino-ethyl)-2-hydroxy-phenylazo]-benzoic acid (Fmoc-Azo)は文献 [28]に従って合成した。その他の試薬は和光純薬から購入した。レジンは TGS-RAM (島津製作所)を用い、ペプチドはすべて C 末端アミド型である。レジンとして *N,N*-dimethylformamide (DMF)で膨潤し、3 当量の Fmoc-Lys(Mtt)、3 当量の HBTU、3 当量の HOBt、6 当量の DIEA を含む DMF 溶液を加え、3 時間室温で回転混和することによって Fmoc-Lys(Mtt)の導入を行った。Fmoc の脱保護は、20% piperidine/DMF 中で 20 分間室温にて回転混和することによって行った。レジンを DMF で洗浄後、3 当量の Fmoc-Azo、3 当量の HBTU、3 当量の HOBt、6 当量の DIEA を含む DMF 溶液を加え、3 時間室温で回転混和することによって Fmoc-Azo を導入した。Fmoc の脱保護は、20% piperidine/DMF 中で 20 分間室温にて回転混和することによって行った。8 残基分の Arg(Pbf)を

同様にペプチド鎖へ導入し、H-[Arg(Pbf)]<sub>8</sub>-Azo-Lys(Mtt)-resin を得た。さらに、3 当量の(Tmd)BA、3 当量の HBTU、3 当量の HOBt、6 当量の DIEA を含む DMF 溶液を加え、3 時間室温で回転混和することによって N 末端への(Tmd)BA の導入を行った。Mtt (4-methyltrityl)基の脱保護は、1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP)-dichloromethane (DCM) (1:4)の脱保護カクテルを加え、室温で3時間回転混和して行った。次いで、3 当量の biotinamidohexanoic acid *N*-hydroxysuccinimide ether の DMF 溶液を加え、3 時間室温で回転混和して biotin 修飾を行った。

最終脱保護、樹脂からの切り出しおよび精製：

最終脱保護及び樹脂からの切り出しは、trifluoroacetic acid (TFA)-ethanedithiol (EDT) (95 : 5)で室温3時間処理することにより行った。脱保護したペプチドは、逆相 HPLC によって精製し、最終脱保護及び樹脂からの切り出しは TFA-EDT (95 : 5)で室温3時間処理することによって行った。脱保護したペプチドは、逆相 HPLC によって精製し、カラムにはナカライテスク社の Cosmosil 5C18-AR-II (10 × 250 mm) 、もしくはメルク社の Chlomolith Performance RP-18e (4.6 × 100 mm)を用いた。ペプチドの分析には、Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm)を用いた。

ペプチドの蛍光標識：

蛍光標識は C 末端のシステイン側鎖のチオール基に Alexa Fluor 488 C<sub>5</sub>-maleimide または tetramethylrhodamine-5-maleimide を DMF-methanol (1:1)溶液中で 1.5 時間反応させて行い、反応物を逆相 HPLC によって精製した [20]。

ペプチドの同定：

逆相 HPLC により精製したペプチドは、凍結乾燥後、マトリクス支援レーザー脱離イオン化法-飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS)により質量を測定し、理論値との一致を確認した。合成したそれぞれのペプチドのアミノ酸配列および質量分析の結果を以下に示す。

PhotoR8CL: (Tmd)BA-(Arg)<sub>8</sub>-Azo-Lys(biotin)-amide

保持時間: 27.5 分 [カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm); 溶出液: A = 0.1% TFA 水溶液, B = 0.1% TFA CH<sub>3</sub>CN 溶液; %B 勾配: 5-85% 80 分; 流速: 1 mL/min;



検出波長: 220 nm]

MALDI-TOF MS: 2214.6 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2214.6]

R8-Alexa488: H-(Arg)<sub>8</sub>-Gly-Cys(Alexa488)-amide

保持時間: 17.2 分 [カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm); 溶出液: A = 0.1% TFA 水溶液, B = 0.1% TFA CH<sub>3</sub>CN 溶液; %B 勾配: 5-85% 80 分; 流速: 1 mL/min; 検出波長: 220 nm]

MALDI-TOF MS: 2126.5 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2126.2]

R8-TAMRA: H-(Arg)<sub>8</sub>-Gly-Cys(TAMRA)-amide

保持時間: 23.5 分 [カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm); 溶出液: A = 0.1% TFA 水溶液, B = 0.1% TFA CH<sub>3</sub>CN 溶液; %B 勾配: 5-85% 80 分; 流速: 1 mL/min; 検出波長: 220 nm]

MALDI-TOF MS: 1908.1 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1908.0]

### PhotoR8CLの切断実験

PBS (pH 7.4)に溶解したPhotoR8CL (5 nmol/10 μL) を4°Cで10分間UV照射 (波長: 365 nm、エネルギー: 7 mW/cm<sup>2</sup>、高さ: 5 cm)後、反応液を、ただちに逆相HPLCで分析することで、PhotoR8CLのUV照射による光反応性の確認を行った。4°Cで10分間UV照射 (波長: 365 nm、エネルギー: 7 mW/cm<sup>2</sup>、高さ: 5 cm)したPhotoR8CL (5 nmol/10 μL)と50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 含有PBS (10 μL)を混合し、15分間インキュベートして、反応液を、ただちに逆相HPLCで分析することでジアゾベンゼンリンカーのUV照射後の切断の確認を行った。それぞれ得られたピークをMALDI-TOF MSにより測定した。逆相HPLCの条件は以下に示す通りである。[カラム: Cosmosil 5C18-AR-II (4.6 × 150 mm); 溶出液 A= 0.1% TFA水溶液、B=0.1% TFA CH<sub>3</sub>CN溶液; %B 勾配: 10-40% 30分; 検出波長: 220 nm]。

### 細胞培養

ヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞は、10% (v/v) 非働化ウシ血清 (Gibco)を含むアルファ最小必須培地 (α-MEM、Gibco)中で培養した。Flp-In loxP 293 細胞は10% (v/v)非働化ウシ胎児血清 (Gibco)と 100 μg/mL hygromycin B を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM、和光純薬)中で培養した。実験を行う前は、抗生物質を抜いて培養した。細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養し、80-90%コンフルエ

ントの状態です。3-4日ごとに継代を行った。

### 光架橋実験

$1.0 \times 10^6$  cellsのHeLa細胞を100 mm培養ディッシュに播種し、48時間培養した後使用した。膜電位を消失させるための緩衝液として、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ を含む高濃度カリウムイオンを含む緩衝液 ( $\text{K}^+$ -rich buffer (+) [100 mM L-glutamic acid monopotassium salt monohydrate, 43 mM KCl, 20 mM HEPES (pH7.4), 5 mM glucose])を用いた。培地を除去し、 $\text{K}^+$ -rich buffer (+)で細胞を3回洗浄した後、最終濃度が $1 \mu\text{M}$ になるように $\text{K}^+$ -rich buffer (+)で調製したPhotoR8CLを加え、 $4^\circ\text{C}$ で5分間処理後、 $4^\circ\text{C}$ で10分間UV照射 (波長: 365 nm、エネルギー:  $7 \text{ mW}/\text{cm}^2$ 、高さ: 5 cm)を行った。照射後、細胞を $0.5 \text{ mg}/\text{mL}$ ヘパリン含有冷 $\text{K}^+$ -rich buffer (+)で洗浄し、Complete, Mini, EDTA-freeプロテアーゼ阻害剤 (Roche)を含んだ低張電解質溶液 [10 mM Tris-HCl (pH7.4), 4 mM EDTA] (1 mL/dish)中に細胞を懸濁し、25Gした。10分間、 $4^\circ\text{C}$ 、 $1000 \times g$ で遠心し、核や未破碎細胞を除去し、上清を10分間、 $4^\circ\text{C}$ 、 $17000 \times g$ で遠心することで、ミトコンドリア画分を除去した。その上清を12 mL超遠心チューブ (Beckman)に入れ、SW 40 Ti rotorを用いて1時間 $4^\circ\text{C}$  $100000 \times g$ で超遠心 (Beckman)を行い、上清を除去した。得られたペレットを、プロテアーゼ阻害剤としてComplete, Mini, EDTA-free (Roche)を添加したRIPA buffer [25 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 1% deoxycholate, and 1mM EDTA] (500  $\mu\text{L}$ )により可溶化し、30分間 $4^\circ\text{C}$ 、 $17000 \times g$ で遠心し、上清を回収した。BCA Protein Assay Kit (Pierce)によりタンパク質濃度を測定し、タンパク質濃度 $450 \mu\text{g}/450 \mu\text{L}$ の溶解液を作製した。1%BSA含有 RIPA bufferにより洗浄した $500 \mu\text{g}/50 \mu\text{L}$ のDynabeads MyOne Streptavidin T1 (Invitrogen)を溶解液に添加し、 $4^\circ\text{C}$ で1時間、回転混和した。その後、マグネットスタンドを用いて、RIPA bufferで3回洗浄を行い、25 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 含有100 mMリン酸緩衝液 (pH 7.4)を $7.5 \mu\text{L}$ 添加し、15分間室温でインキュベートして、上清を回収した。この溶出作業を2回行った。回収した上清と $4 \times \text{SDS}$ サンプルバッファーを混合し、 $95^\circ\text{C}$ の熱変性を5分間行った。また、処理後のビーズをRIPA bufferにより洗浄し、上清を除去して、 $2 \times \text{SDS}$ サンプルバッファーを $20 \mu\text{L}$ 加え、 $95^\circ\text{C}$ の熱変性を5分間行い、電気泳動サンプルとした。これらのサンプルをそれぞれSDS-PAGE (5-20%アクリルアミドゲル、和光純薬)で展開し、銀染色 (和光純薬)により検出した。

## プロテオミクス解析

銀染色により検出されたバンドを切り出し、1.5 mL チューブに回収した。30 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ -100 mM  $Na_2S_2O_3$  (1:1)を加え 2 分間静置し、脱染した。100 mM  $NH_4HCO_3$  でゲル片を洗浄し、上清を取り除き、還元剤 (10 mM dithiothreitol, 100 mM  $NH_4HCO_3$ )を加え、60°C で 1 時間反応させた。上清を取り除き、アルキル化剤 (55 mM iodoacetamide, 100 mM  $NH_4HCO_3$ )を加え、室温遮光下で 30 分間振とうした。Methanol- $H_2O$ -acetic acid (5:4:1, v/v/v)によりゲル片を洗浄し、上清を取り除き、Speedvac で遠心濃縮した。その後、Trypsin Gold (Promega)によりゲル内消化をオーバーナイトで行い、上清を回収した。それを、LC-MS/MS により解析し、タンパク質同定データベースである MASCOT と照合し、タンパク質を同定した。LC-MS/MS システムには、Eksigent Ekspert nano-LC 400 HPLC system (AB SCIEX)をつなげた quadrupole time-of-flight (QqTOF) TripleTOF 5600+ mass spectrometer (AB SCIEX)を用いた。

## リアルタイム定量PCRによる mRNA ノックダウン効率の測定

$5.0 \times 10^4$  cellsのHeLa細胞を24ウェルプレート (Iwaki)に播種し、24時間培養した。siRNAはSigma-AldrichおよびSanta Cruzより購入した。Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて10 nMのsiRNAを細胞に導入し、4時間後に培地交換し、さらに24時間培養した。トータルRNAをRNeasy Mini Kit (Qiagen)により、回収した。500 ngのトータルRNAをPrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser (TaKaRa)によりcDNAに逆転写した。定量PCRはSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)により7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて測定を行った。熱サイクリングは10分 (95°C)、[15秒 (95°C)と1分 (60°C)]を40サイクル繰り返す条件で行った。反応後、95°Cまで温度を上昇させ、そこから60°Cまで徐々に温度を下げることで、融解温度を測定し、プライマーダイマーやその他の副産物がないことを確認した。それぞれの遺伝子に特異的なプライマーセットは以下に示す。

Protein name	Forward primer	Reverse primer
Glypican-1	5'-CTTCCGGGACCTGTACTCAG-3'	5'-CAGGTAGTCATCAGGCAGCA-3'
Syndecan-2	5'-GAGTGTATCCTATTGATGACGATGACTAC-3'	5'-CTCTGGACTCTCTACATCCTCATCAG-3'
Syndecan-4	5'-GTCTGGCTCTGGAGATCTGG-3'	5'-CACCAAGGGATGGACAACCTT-3'
Chondroitin sulfate proteoglycan 4	5'-CACACAGAGGAACCCTCGAT-3'	5'-CTTCAGCGAGAGGAGCACTT-3'
Transforming growth factor beta receptor type 3	5'-ACA TGG ATA AGA AGC GAT TCA GC-3'	5'-AAC GCA ATG CCC ATC ACG GTT AG-3'
Collagen alpha-1(V) chain	5'-GCATTGTCTGTGGTGTGACC-3'	5'-ATGACTGAACGGCTTGGAAAC-3'
Glypican-5	5'-GGTCGTTGGAAGAACTCTCG-3'	5'-GCGGCCACAAATCCTATTTA-3'
Myoferlin	5'-GGCTTGCTCTCACATCCTC-3'	5'-GGAAAACATCCACCCACATC-3'
Laminin subunit gamma-1	5'-CAGGCTCCATGAAGCAACAGA-3'	5'-GCACCTCTCTCACTGTATGTCCAC-3'
Zinc transporter ZIP10	5'-TCCTTGCTAGGCGTGATCTT-3'	5'-TGATCATGTCCACCCTGAGA-3'
Transferrin receptor protein 1	5'-TCCCAGCAGTTTCTTTCTGTTTT-3'	5'-CTCAATCAGTTCTTATAGGTGTCCA-3'
Semaphorin-3C	5'-ATC GCA GCG CTG AGA TTC CTT TAC-3'	5'-GATGCGCTTGTGTCTCCAGTCC-3'
4F2 cell-surface antigen heavy chain	5'-CAGTTTCGGGACATAGAGA-3'	5'-GAGTTAGTCCCGCAATCAA-3'
Choline transporter-like protein 2	5'-CTGTGGGATACGTCATGTGC-3'	5'-TGGACAGGAAGACAGCAGTG-3'
Interferon-induced transmembrane protein 1	5'-ACTAGTAGCCGCCATAGCC-3'	5'-GCACGTGCACCTTATTGAATG-3'
Interferon-induced transmembrane protein 3	5'-CAAGGAGGAGCAGCAGG-3'	5'-TTGAACAGGGACCAGACG-3'
Vesicle-associated membrane protein 1	5'-CTCCTCCTTGCTAATGCAG-3'	5'-GGACAGAAACCCAGGAATGA-3'

## プラスミド作製

loxP-DsRed-loxP-EGFP-N1 をコードしたプラスミドは loxP-DsRed-loxP 配列を Sac1/EcoR1 サイトにより EGFP-N1 (Clontech) に挿入することで作製した。loxP-Ds-Red-loxP-EGFP-N1\_pcDNA5/FRT は loxP-DsRed-loxP-EGFP-N1 の 5'末端、3'末端に pcDNA5/FRT の Nhe1、BamH1 の制限酵素サイトと同様の配列をつなげた DNA フラグメントを PCR 法により増幅し、この断片と制限酵素 Sac1/EcoR1 により切断した pcDNA5/FRT を Gibson Assembly (New England Biolabs) によりライゲーションすることで作製した。Cre-His\_pET-42b(+) および Cre-R8-His\_pET-42b(+) は Cre-His または Cre-R8-His をコードする DNA 断片を Nde1/EcoR1 サイトにより pET-42b(+) (Novagen) に挿入することで作製した。

### ノックダウン細胞におけるR8-Alexa488ペプチド移行量の測定

$5.0 \times 10^4$  cellsのHeLa細胞を24ウェルプレート (Iwaki)に播種し、24時間培養した。Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて10 nMのsiRNAを細胞に導入し、4時間後に培地交換し、さらに48時間培養した。培地を除去し、血清を含まない $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -MEM (-))で細胞を2度洗浄した後、1  $\mu$ MのR8-Alexa488を含む $\alpha$ -MEM (-) 溶液で細胞を30分間インキュベートした (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。0.5 mg/mLのヘパリンを含むPBS (-)で3度洗浄し、0.01%トリプシンを加えて10分間培養後、細胞を1.5 mLチューブに回収した。これを遠心し、ペレット状になった細胞を冷PBS (-)で懸濁させて、2回洗浄した後、最終的にPBSで希釈して、FACScalibur (BD Bioscience) (励起波長：488 nm、吸収フィルター：515-545 nm)により各サンプルあたり1万個の細胞の蛍光量を測定した。

### R8-Alexa488の細胞内分布の観察

$1.5 \times 10^5$  cellsのHeLa細胞を35 mmガラスボトムディッシュ (Iwaki)に24ウェルプレートに播種し、24時間培養した。Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて10 nMのsiRNAを細胞に導入し、4時間後に培地交換し、さらに48時間培養した。培地を除去し、 $\alpha$ -MEM (-)で細胞を2度洗浄した後、 $\alpha$ -MEM (-)で希釈したR8-Alexa488を細胞に投与し、30分間インキュベートした (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。その後、0.5 mg/mLのヘパリンを含むPBS (-)で3度洗浄し、血清含有培地( $\alpha$ -MEM (+))を1 mLをディッシュに入れ、細胞固定は行わずに観察を行った。顕微鏡観察は、蛍光顕微鏡 IX-81 (Olympus)に共焦点ユニットFV-1000Dを搭載した共焦点レーザー顕微鏡を用い、対物レンズとして UPlanSApo (60 $\times$ , NA 1.35, oil)を用いた。

### 細胞表面タンパク質の発現量の評価

$5.0 \times 10^4$  cellsのHeLa細胞を24ウェルプレート (Iwaki)に播種し、24時間培養した。Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて10 nMのsiRNAを細胞に導入し、4時間後に培地交換し、さらに48時間培養した。1 mM EDTA/PBSで15分間インキュベートし、細胞をプレートより剥がし、1.5 mLチューブに回収した。細胞を遠心し、上清を除去し、0.5% (w/v)BSAを含んだ冷やしたPBS (冷BSA-PBS)で洗浄し、ブロッキングした。遠心により上清を除去し、PBSで希釈した抗シンデカン4抗体 (5G9) (Santa Cruze) (1:50)で1時間、4°Cでインキュベートした。遠心により上清を除去し、冷BSA-PBSで3回洗浄し、2次抗体として、PBSで希釈したAlexa488

標識抗マウスIgG抗体 (1:400)を添加し、1時間、4°Cでインキュベートした。遠心により上清を除去した後、冷BSA-PBSで3回洗浄し、最終的にPBSで希釈して、FACScalibur (BD Bioscience) (励起波長：488 nm、吸収フィルター：515-545 nm)により各サンプルあたり1万個の細胞の蛍光量を測定した。

#### タンパク質強制発現細胞におけるR8-Alexa488ペプチド移行量の測定

$8.0 \times 10^4$  cellsのHeLa細胞を24ウェルプレート (Iwaki)に播種し、24時間培養した。LipofectamineLTX (Invitrogen)を用いてプラスミドDNAを細胞に導入し、4時間後に培地交換し、さらに24時間培養した。培地を除去し、 $\alpha$ -MEM (-)で細胞を2度洗浄した後、1  $\mu$ MのR8-Alexa488を含む $\alpha$ -MEM (-) 溶液で細胞を30分間インキュベートした (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。0.5 mg/mLのヘパリンを含むPBS (-)で3度洗浄し、0.01%トリプシンを加えて10分間培養後、細胞を1.5 mLチューブに回収した。これを遠心し、ペレット状になった細胞を冷PBS (-)で懸濁させて、2回洗浄した後、最終的にPBSで希釈して、FACScalibur (BD Bioscience) (励起波長：488 nm、吸収フィルター：515-545 nm)により各サンプルあたり1万個の細胞の蛍光量を測定した。

#### ペプチド添加によるsyndecan-4の局在変化の観察

$2.0 \times 10^5$  cellsのHeLa細胞を35 mmガラスボトムディッシュ (Iwaki)に24ウェルプレートに播種し、24時間培養した。培地を除去し、 $\alpha$ -MEM (-)で細胞を2度洗浄した後、0.5% (w/v)BSAを含んだ $\alpha$ -MEM (-)で希釈した抗シンデカン4抗体 (5G9) (Santa Cruze) (1:50)で30分間、37°Cでインキュベートした。上清を除去した後、PBSで3回洗浄し、0.5% (w/v)BSAを含んだ $\alpha$ -MEM (-)で希釈したAlexa488標識抗マウスIgG抗体 (Invitrogen) (1:200)を添加し、30分間、37°Cでインキュベートした。上清を除去した後、PBSで3回洗浄し、 $\alpha$ -MEM (-)で希釈したR8-TAMRA (1  $\mu$ M)を細胞に投与し、30分間インキュベートした (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。阻害剤 (50  $\mu$ M MDC)を用いる場合はペプチド添加前に、30分間、37°Cで阻害剤処理し、ペプチド添加時も同量の阻害剤を添加した。その後、0.5 mg/mLのヘパリンを含むPBS (-)で3度洗浄し、血清含有培地 ( $\alpha$ -MEM (+))を1 mLをディッシュに入れ、細胞固定は行わずに、共焦点レーザー顕微鏡により、syndecan-4およびペプチドの局在を観察した。顕微鏡観察は、蛍光顕微鏡 IX-81 (Olympus)に共焦点ユニットFV-1000Dを搭載した共焦点レーザー顕微鏡を用い、対物レンズとし

て UPlanSApo (60 ×, NA 1.35, oil)を用いた。画像処理はFiji software (ImageJ; NIH)を用いた。共局在については、Fijiに入っているColoc 2 plug-inを用いて、ピアソン相関係数を算出し評価した。

### 阻害剤処理

細胞を血清非含有培地で2回洗浄した後、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるmonodansylcadaverine (MDC, 50 μM) (Sigma)、sucrose (0.45 mM)、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤であるfilipin (1 μg/mL) (Sigma)、nystatin (50 μM) (Sigma)、マクロピノサイトーシス阻害剤である5-(N-ethyl-isopropyl)amiloride (EIPA, 100 μM) (Sigma)、IPA-3 (20 μM) (Sigma)、wortmannine (500 nM) (Sigma)、Gö6983 (2 μM) (Sigma)をそれぞれ37°Cにて30分間前処理し、各種阻害剤存在化でペプチドまたはタンパク質を処理した。その後、ペプチドの取り込み、または、組み換え効率をFACScalibur (BD Bioscience)により測定した。

### Syndeca-4、transferrinおよびR8の細胞内挙動の観察

$2.0 \times 10^5$  cellsのHeLa細胞を35 mmガラスボトムディッシュ (Iwaki)に24ウェルプレートに播種し、24時間培養した。培地を除去し、 $\alpha$ -MEM (-)で細胞を2度洗浄した後、0.5% (w/v)BSAを含んだ $\alpha$ -MEM (-)で希釈した抗シンデカン4抗体 (5G9) (Santa Cruze) (1:50)で30分間、37°Cでインキュベートした。上清を除去した後、PBSで3回洗浄し、0.5% (w/v)BSAを含んだ $\alpha$ -MEM (-)で希釈したAlexa405標識抗マウスIgG抗体 (Invitrogen) (1:200)を添加し、30分間、37°Cでインキュベートした。上清を除去した後、PBSで3回洗浄し、 $\alpha$ -MEM (-) (100 μL)で細胞を浸した。ディッシュを顕微鏡ステージ上に設置したインキュベータMI-IBC (Olympus)内に移し、細胞およびインキュベータ内の環境が安定したと思われる5分後に、 $\alpha$ -MEM (-)で希釈したtransferrin-Alexa488 (25 μg/mL)およびR8-TAMRA (1 μM) (100 μL、全量で200 μL)を細胞に投与し、観察を開始した。顕微鏡観察は、蛍光顕微鏡 IX-81 (Olympus)に共焦点ユニットFV-1000Dおよび超高感度ディテクタ(GaAsP PMT)を搭載した共焦点レーザー顕微鏡を用い、対物レンズとしてUPlanSApo (60 ×, NA 1.35, oil)を用いた。

### Flp-in loxP HEK293細胞の作製

$2.0 \times 10^5$  cellsのFlp-In 293細胞を35 mmディッシュ (Iwaki)に播種し、24時間培養した。Lipofectamine3000 (Invitrogen)を用いて loxP-DsRed-loxP-EGFP-N1\_pcDNA5/FRTとpOG44 (1:4)を同時に細胞に導入し、さらに48時間培養した。増殖した細胞を5分の1に希釈し、100 mmディッシュ (Iwaki)に播き直し、400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  hygromycin B含有DMEM (+)中で、10日間培養し、形成したコロニーをチップで回収し、96ウェルプレート (Iwaki)に移し、培養後、24ウェルプレート (Iwaki)に移した。増やした細胞におけるDsRedの発現量をFACScalibur (BD Bioscience) (励起波長：488 nm、吸収フィルター：546-606 nm)により測定し、定常発現細胞であることを確認した細胞について、さらに培養し、実験に使用した。

### Cre recombinaseの精製

Cre-His\_pET-42b(+)またはCre-R8-His\_pET-42b(+)をBL21 (DE3)株大腸菌に形質転換した後、OD<sub>600</sub>が0.6になるまで、37°Cで振とう培養した後、0.5 mM IPTGを添加し、37°Cで4時間振とう培養した。遠心により集菌し、Complete, Mini, EDTA-freeプロテアーゼ阻害剤、リゾチーム (和光純薬)、DNase I (和光純薬)およびRNase A (和光純薬)を添加したBuffer A [10 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 10 mM imidazole]で懸濁し、超音波破碎後、遠心により可溶化画分を回収し、Akta Start (GE Healthcare)を用いてHis-trap FFカラム (GE Healthcare)にて精製した [binding buffer: Buffer A; elution buffer: 10 mM Tris (pH 8.0), 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole]。DMEM-HEPES buffer [20 mM HEPES (pH 7.4), 1 M NaCl] (1:1) を用いて4°Cで終夜、透析を行い、SDS-PAGEで純度を確認した。濃度はBCA Protein Assay Kit (Pierce)により測定した。

### Syndecan-4ノックダウン細胞におけるCreリコンビナーゼによるタンパク質送達効率の評価

$6.0 \times 10^4$  cellsの Flp-In loxP 293細胞をBioCoat Poly-D-lysine 24ウェルプレート (Corning)に播種し、24時間培養した。Lipofectamine2000 (Invitrogen)を用いて10 nMのsiRNAを細胞に導入し、さらに48時間培養した。培地を除去し、DMEM (-)で細胞を2度洗浄した後、DMEM (-)で希釈したCreまたはCreR8を細胞に添加し、



30分間インキュベートした (37°C、5% CO<sub>2</sub>)。その後、0.5 mg/mLのヘパリンを含むPBS (-)で3度洗浄し、0.01%トリプシンを加えて10分間培養後、細胞を1.5 mLチューブに回収した。これを遠心し、ペレット状になった細胞をPBS (-)で懸濁させて、2回洗浄した後、DMEM (+)に懸濁し、24ウェルプレートに播き直した。37°Cで24時間培養後、細胞をトリプシンにより回収し、FACScalibur (BD Bioscience) (励起波長：488 nm、吸収フィルター：515-545 nm)により各サンプルあたり1万個の細胞の蛍光量を測定した。

## 引用文献

1. Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., and Futaki, S. (2008). Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Del. Rev.* 60, 598-607.
2. Ramakrishna, S., Kwaku Dad, A. B., Beloor, J., Gopalappa, R., Lee, S. K., and Kim, H. (2014) Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res.* 24, 1020-1027.
3. Liu, J., Gaj, T., Patterson, J. T., Sirk, S. J., and Barbas, C. F. III. (2014). Cell-penetrating peptide-mediated delivery of TALEN proteins via bioconjugation for genome engineering. *PLoS One.* 9, e85755.
4. Richard, J. P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., and Chernomordik, L. (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J. Biol. Chem.* 280, 15300-15306.
5. Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M., and Beltram, F. (2003). Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Mol. Ther.* 8, 284-294.
6. 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., and Futaki, S. (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* 10, 1011-1022.
7. Wadia, J. S., Stan, R. V., Dowdy, S. F. (2004). Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat. Med.* 10, 310-315.
8. Hirose, H., Takeuchi, T., Osakada, H., Pujals, S., Katayama, S., Nakase, I., Kobayashi, S., Haraguchi, T., and Futaki, S. (2012). Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells. *Mol. Ther.* 20, 984-993.
9. Ziegler, A., and Seelig, J. (2011). Contributions of glycosaminoglycan binding and clustering to the biological uptake of the nonamphipathic cell-penetrating peptide WR9. *Biochemistry* 50, 4650-4664.
10. Brock, R. (2014). The uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides: putting the

- puzzle together. *Bioconjug. Chem.*, 25, 863-868.
11. Vivès, E., Schmidt, J., and Pèlegri, A. (2008). Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta.* 1786, 126-138.
  12. Park, D., O'Doherty, I., Somvanshi, R. K., Bethke, A., Schroeder, F. C., Kumar, U., Riddle, D. L. (2012). Interaction of structure-specific and promiscuous G-protein-coupled receptors mediates small-molecule signaling in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 9917-22.
  13. Hashimoto, M., and Hatanaka, Y., (2008). Recent Progress in Diazirine-Based Photoaffinity Labeling. *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 2513–2523.
  14. Dubinsky, L., Krom, B. P., and Meijler, M. M. (2012). Diazirine based photoaffinity labeling. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 554-570.
  15. Tomohiro, T., Morimoto, S., Shima, T., Chiba, J., Hatanaka, Y. (2014). An isotope-coded fluorogenic cross-linker for high-performance target identification based on photoaffinity labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 13502-13505.
  16. Wang, J., Kubicki, J., Gustafson, T. L., and Platz, M. S. (2008). The dynamics of carbene solvation: an ultrafast study of p-biphenyltrifluoromethylcarbene. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 2304-2313.
  17. Tanaka, G., Nakase, I., Fukuda, Y., Masuda, R., Oishi, S., Shimura, K., Kawaguchi, Y., Takatani-Nakase, T., Langel, U., Gräslund, A., Okawa, K., Matsuoka, M., Fujii, N., Hatanaka, Y., and Futaki, S. (2012). CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem. Biol.* 19, 1437-1446.
  18. Futaki, S. (2006). Oligoarginine vectors for intracellular delivery: design and cellular-uptake mechanisms. *Biopolymers* 84, 241-249.
  19. Al Soraj, M., He, L., Peynshaert, K., Coussaert, J., Vercauteren, D., Braeckmans, K., De Smedt, S. C., and Jones, A. T. (2012). siRNA and pharmacological inhibition of endocytic pathways to characterize the differential role of macropinocytosis and the actin cytoskeleton on cellular uptake of dextran and cationic cell penetrating peptides octaarginine (R8) and HIV-Tat. *J. Control. Release* 161, 132-141.
  20. Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., and Futaki, S. (2007). Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. *Biochemistry* 46, 492-501.

21. Dubinsky, L., Krom, B. P., and Meijler, M. M. (2012). Diazirine based photoaffinity labeling. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 554-570.
22. Kotzyba-Hibert, F., Kapfer, I., and Goeldner, M. (1995). Recent Trends in Photoaffinity Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 34, 1296- 1312.
23. Nakashima, H., Hashimoto, M., Sadakane, Y., Tomohiro, T., Hatanaka, Y. (2006). Simple and versatile method for tagging phenyldiazirine photophores. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 15092-15093.
24. Katayama, S., Hirose, H., Takayama, K., Nakase, I., Futaki, S. (2011). Acylation of octaarginine: Implication to the use of intracellular delivery vectors. *J. Control. Release* 149, 29-35.
25. Zhang, W., Wang, L., Liu, Y., Xu, J., Zhu, G., Cang, H., Li, X., Bartlam, M., Hensley, K., Li, G., Rao, Z., and Zhang, X. C. (2009). Structure of human lanthionine synthetase C-like protein 1 and its interaction with Eps8 and glutathione. *Genes Dev.* 23, 1387-1392.
26. van der Veken, P., Dirksen, E. H., Ruijter, E., Elgersma, R. C., Heck, A. J., Rijkers, D. T., Slijper, M., and Liskamp, R. M. (2005). Development of a novel chemical probe for the selective enrichment of phosphorylated serine- and threonine-containing peptides. *ChemBioChem* 6, 2271-80.
27. Leriche, G., Chisholm, L., and Wagner, A. (2012). Cleavable linkers in chemical biology. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 571-582.
28. Verhelst, S. H., Fonović, M., and Bogoyo, M. (2007). A mild chemically cleavable linker system for functional proteomic applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46, 1284-1286.
29. Futaki, S., Kiwada, T., and Sugiura, Y. (2004). Control of peptide structure and recognition by Fe(III)-induced helix destabilization. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 15762-15769.
30. Bechara, C., Pallerla, M., Zaltsman, Y., Burlina, F., Alves, I. D., Lequin, O., and Sagan, S. (2013). Tryptophan within basic peptide sequences triggers glycosaminoglycan-dependent endocytosis. *FASEB J.* 27, 738-749.
31. Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V., and Lebleu, B. (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J. Biol. Chem.* 278, 585-590.
32. Kennedy, M. J., Davison, I. G., Robinson, C. G., and Ehlers, M. D. (2010).

- Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. *Cell* 141, 524-535.
33. Nakase, I., Osaki, K., Tanaka, G., Utani, A., and Futaki, S. (2014). Molecular interplays involved in the cellular uptake of octaarginine on cell surfaces and the importance of syndecan-4 cytoplasmic V domain for the activation of protein kinase C $\alpha$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446, 857-862.
  34. Letoha, T., Keller-Pintér, A., Kusz, E., Kolozsi, C., Bozsó, Z., Tóth, G., Vizler, C., Oláh, Z., and Szilák, L. (2010). Cell-penetrating peptide exploited syndecans. *Biochim. Biophys. Acta.* 1798, 2258-2265.
  35. Gerbal-Chaloin, S., Gondeau, C., Aldrian-Herrada, G., Heitz, F., Gauthier-Rouvière, C., and Divita, G. (2007). First step of the cell-penetrating peptide mechanism involves Rac1 GTPase-dependent actin-network remodelling. *Biol. Cell.* 99, 223-238.
  36. Hansen, S. H., Sandvig, K., and van Deurs, B. (1993). Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J. Cell Biol.* 121, 61-72.
  37. Phonphok, Y., and Rosenthal, K. S. (1991). Stabilization of clathrin coated vesicles by amantadine, tromantadine and other hydrophobic amines. *FEBS Lett.* 281, 188-190.
  38. Schnitzer, J. E., Oh, P., Pinney, E., and Allard, J. (1994). Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127, 1217-1232.
  39. Brezis, M., Rosen, S., Silva, P., Spokes, K., and Epstein, F. H. (1984). Polyene toxicity in renal medulla: injury mediated by transport activity. *Science* 224, 66-68.
  40. Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C. C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K. M., and Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* 188, 547-563.
  41. Deacon, S. W., Beeser, A., Fukui, J. A., Rennefahrt, U. E., Myers, C., Chernoff, J., and Peterson, J. R. (2008). An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chem. Biol.* 15, 322-331.
  42. Gschwendt, M., Dieterich, S., Rennecke, J., Kittstein, W., Mueller, H. J., and

- Johannes, F. J. (1996). Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* 392, 77-80.
43. Araki, N., Johnson, M. T., and Swanson, J. A. (1996). A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* 135, 1249-1260.
  44. Mercer, J., and Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531-535.
  45. Veldhoen, S., Laufer, S. D., Trampe, A., and Restle, T. (2006). Cellular delivery of small interfering RNA by a non-covalently attached cell-penetrating peptide: quantitative analysis of uptake and biological effect. *Nucleic Acids Res.* 34, 6561-6573.
  46. Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R. V., and Simons, M. (2004). Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. *J. Cell Sci.* 117, 3189-3199.
  47. Ohkawara, B., Glinka, A., and Niehrs, C. (2011). Rspo3 binds syndecan 4 and induces Wnt/PCP signaling via clathrin-mediated endocytosis to promote morphogenesis. *Dev. Cell* 20, 303-314.
  48. Gump, J. M., June, R. K., and Dowdy, S. F. (2010). Revised role of glycosaminoglycans in TAT protein transduction domain-mediated cellular transduction. *J. Biol. Chem.* 285, 1500-1507.
  49. Montrose, K., Yang, Y., Sun, X., Wiles, S., and Krissansen, G. W. (2013). Xentry, a new class of cell-penetrating peptide uniquely equipped for delivery of drugs. *Sci. Rep.* 3; 1661.
  50. Baba, F., Swartz, K., van Buren, R., Eickhoff, J., Zhang, Y., Wolberg, W., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. *Breast Cancer Res. Treat.* 98, 91-98.
  51. Labropoulou, V. T., Skandalis, S. S., Ravazoula, P., Perimenis, P., Karamanos, N. K., Kalofonos, H. P., and Theocharis, A. D. (2013). Expression of syndecan-4 and correlation with metastatic potential in testicular germ cell tumours. *Biomed Res. Int.* 2013, 214864.

## 謝 辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 二木 史朗 教授に謹んで感謝の意を表します。

数々の御指導、御助言を頂きました 今西 未来 博士(京都大学化学研究所 講師)、武内 敏秀 博士(京都大学化学研究所 助教)、中瀬 生彦 博士(大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター 特別講師)に深く感謝致します。

本研究の質量分析法によるタンパク質同定についてご尽力いただきました 桑田 啓子 博士(名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 特任助教)に心より感謝申し上げます。

本研究の化学合成に関して、御討議ならびに御指導頂きました 川端 猛夫 博士(京都大学化学研究所 教授)、吉村 智之 博士(京都大学化学研究所 助教、現 金沢大学薬学部 准教授)、京都大学化学研究所 精密有機合成化学研究領域の皆様にも心より御礼申し上げます。

本研究の一部を行うにあたって、大変御世話になりました 田中 弦 博士(杏林大学医学部 助教)に厚く御礼申し上げます。

折にふれ、活発な御討議を戴き、研究以外の面でも大変御世話になりました 東 佑翼 博士(スイス連邦工科大学 チューリッヒ校)、能代 大輔 博士(金沢大学理工研究域)、広瀬 久昭 博士(東京大学理学系研究科)、Yu Hao-Hsin 博士(ScinoPharm Taiwan)、片山 沙綾香 博士(旭化成)及び京都大学化学研究所 生体機能設計化学研究領域の皆様にも心より感謝致します。

本研究の一部は日本学術振興会の援助によるものであり、あらためて感謝致します。

最後に、私が研究の道に進むことを理解し、惜しみないご支援を下された父母、兄、祖父母、親族の方々、友人達に、この場をお借りして心から感謝致します。