

膜傷害性ペプチド変異体を用いた
タンパク質の細胞内導入

2018

秋柴 美沙穂

目次

序論	3
第一章	
クモ毒由来膜傷害性ペプチドの改変と生理活性タンパク質の細胞内導入	7
第一節 M-lycotoxin 変異体のデザインと合成 一膜傷害性ペプチドの配列改変による膜傷害性の低減化	8
第二節 M-lycotoxin 変異体を用いた高分子の細胞内導入	10
第三節 L17E ペプチドを用いた機能性タンパク質の細胞内導入	12
第四節 導入抗体による細胞内の標的認識と細胞機能制御	13
第五節 ペプチドの物性と高分子の導入機構に関する考察	14
第六節 L17E による細胞内への外来高分子の取込促進	17
第一章の考察	18
第二章	
L17E ペプチドが介する高分子のサイトゾル移行機序の検討	19
第一節 L17E ペプチドによる速い細胞内導入	20
第二節 エンドソームの成熟化の寄与の検討	22
第三節 L17E によるマクロピノサイトーシス誘導	23
第四節 サイトゾル送達におけるマクロピノサイトーシスの寄与の検討	25
第五節 L17E による細胞膜のスクランブリング	26
第二章の考察	27
総括	31
実験の部	33
引用文献	46
謝辞	55

略号表

ANTS	8-aminonaphthalene-1,2,3-trisulfonic acid
CD	円二色性
CytoD	Cytochalasin D
Dex	デキサメタゾン
Dex10-Alexa	Alexa Fluor 488 標識 10 kDa デキストラン
DPX	<i>p</i> -xylene-bis(pyridinium) bromide
EIPA	5-(<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -isopropyl)amiloride
GR	グルココルチコイド受容体
LDH	乳酸脱水素酵素
MES	2-(<i>N</i> -morpholino)ethanesulfonic acid
MT1E	メタロチオネイン 1 E
PIP ₂	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
PS	phosphatidylserine

序論

近年、バイオ高分子医薬品の開発が急速に進んでいる。中でも抗体は、その高い標的特異性から分子標的薬として積極的な応用が図られている^{1,2}。しかしながら抗体医薬の標的は細胞外の因子に限られる。これは、抗体を細胞内に送達する手法が存在しないことに起因する。抗体を細胞に効率よく導入できれば、今後の抗体医薬の適用範囲は大幅に拡大すると期待できる。抗体をはじめとする外来のタンパク質を細胞内に導入し、所望の活性を発揮させるためには、細胞を傷害せずサイトゾルへと効率よく移行させる必要がある。タンパク質のサイトゾルへの導入のために、様々なアプローチが検討されてきた^{3,4}。

サイトゾルへの導入のためには、直接細胞膜を透過させることが最も効率的である (Figure 0-1、左)。一方、親水性のタンパク質は通常は脂質二重層を透過できない。1990年代に HIV-1 TAT タンパク質に含まれる TAT ペプチドや Antennapedia 内部の Penetratin ペプチドの細胞膜透過能が報告されてから、ペプチドの膜透過機序に関して研究されてきた⁵⁻⁸。それと伴い、ペプチドの細胞膜透過能を利用したタンパク質の細胞内導入が検討されてきたが、応用は限定的である^{7,9}。また、タンパク質を透過させるためには細胞膜上の小孔や膜構造の攪乱が必要であることから、直接細胞膜を透過させることは細胞へのダメージが大きく容易ではない。

一方、カチオン性のタンパク質やペプチドには、細胞の外液取り込み機構 (エンドサイトーシス) によって細胞内に移行しやすいという性質を持つものがある (Figure 0-1、右)¹⁰⁻¹³。これを応用して、遺伝子工学的手法や化学的手法を用いてタンパク質を改変することで、その細胞内移行性を向上させることができる。例えば、ポリアルギニンや HIV-1 TAT ペプチドなどのアルギニンに富む細胞内移行性ペプチドモチーフを付加することによってタンパク質の細胞内移行性を向上させることができる^{4,14,15}。これらのペプチド配列を付加されたタンパク質は、エンドソームに効率よく移行し、一部がエンドソームから漏出することで活性を発揮すると考えられている。また、タンパク質に変異を入れて分子表面

を正に帯電させた **supercharged protein** を用いたタンパク質の細胞内導入も報告されている^{13,16,17}。このような改変タンパク質も、前者と同様にエンドソームに移行したタンパク質の一部がサイトゾルへ漏出することで活性を発揮する¹³。

サイトゾルへのタンパク質の送達には、直接膜を透過させるよりも、細胞のエンドサイトーシスを利用して、エンドソームから放出させることでサイトゾルへ輸送する経路が一般的である^{18,19}。しかしながら、この経路では、エンドソームからサイトゾルへの放出が十分ではなく、エンドソームに滞留して分解系に移行することが問題であった。そこで、エンドソームに滞留した分子をサイトゾルに放出するために、エンドソームを不安定化することが試みられる²⁰⁻²⁵。エンドソームの成熟化に伴って、エンドソーム膜上に提示されるプロトンポンプの働きによってエンドソーム内の pH が低下する²⁶。エンドソーム不安定化分子の多くは、この pH 変化に呼応して膜親和性を高めてエンドソーム不安定化を誘起する性質を持つ。

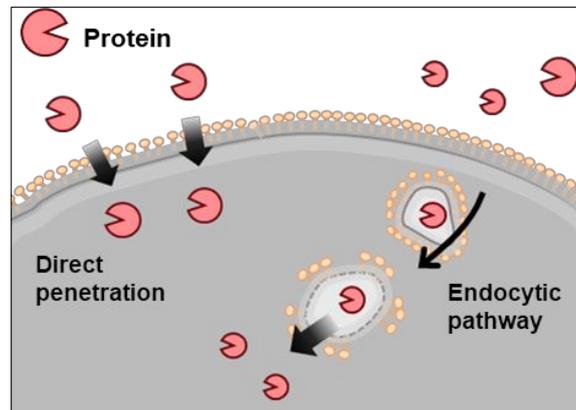


Figure 0-1. Two major cell entry routes for the cytosolic delivery: the direct cell membrane penetration and the endosomal pathway requiring first the endocytic entry followed by endosomal escape.

エンドソームの不安定化のためには、強いエンドソーム膜傷害性をもつ一方で、細胞を傷害性せずに効率よくエンドソームへと移行する分子が理想的である。インフルエンザウイルスのヘマグルチニンタンパク質に含まれるペプチド配列 HA2 は、低 pH 環境で膜融合を引き起こす^{27,28}。HA2 ペプチドやその類縁体と細胞内移行性を持つペプチドや高分子を組み合わせることによって、エンドソームを不安定化して高分子のサイトゾル導入が可能である²⁹⁻³²。また、人工的なアミノ酸配列の GALA ペプチドは、pH に応答して膜傷害性を発揮する³³。4 残基おきにグルタミン酸残基を含むこのペプチドは、低 pH 環境下でプロトン化され、疎水性の向上やヘリックス構造の安定化と両親媒性の向上といった変化によってより膜と相互作用しやすくなる。このペプチドも HA2 と同様に細胞内移行性のある分子を併用することでエンドソームからの放出を促進することが報告されている^{21,34}。しかし、臨床応用には今のところ至っていない。これは、細胞内には効率よく取り込まれるものの、その後のサイトゾルへの送達が十分でないことが原因と考えられ、エンドソーム脱出効率の一層の向上が望まれる^{35,36}。

生体高分子をサイトゾルへ送達する手法の確立に向けて、本研究ではクモ毒由来の強膜傷害性ペプチドを利用するアプローチについて検討した。第一章では、エンドソームを不安定化するペプチドの開発を目的に、クモ毒由来の溶血ペプチドの配列を改変した。さらに、得られた変異体を用いて、抗体などのタンパク質を導入できることを示した。第二章では、開発したペプチドが従来のエンドソーム作用性分子とは異なる性質を持つことに着目し、細胞内導入機構について検討を加えた。

第一章 クモ毒由来膜傷害性ペプチドの改変と 生理活性タンパク質の細胞内導入

タンパク質などの細胞内送達には、取り込まれたタンパク質がエンドソームから効率的に漏出することが重要である。そのために、効果的にエンドソーム膜を不安定化できる物質が必要となる。天然には、強い膜傷害性のペプチドが存在する^{37,38}。強い膜傷害性ペプチドを利用すれば、より強力にエンドソーム膜を不安定化できると考えられる。しかしながら、溶血ペプチドは細胞膜傷害性も高く、そのままでは細胞を傷害してしまう。

本研究は、溶血ペプチドを改変して、エンドソーム内包物をサイトゾルに放出するペプチドを開発することを目的とした。エンドソーム内で効果的に膜を傷害するために、天然の強い膜傷害性ペプチドを鋳型に採用し、酸性アミノ酸を導入することで弱毒化と pH 応答性の付加を目指した。

第一節：M-lycotoxin 変異体のデザインと合成—膜傷害性ペプチドの配列改変による膜傷害性の低減化

天然のカチオン性毒素ペプチドの膜傷害活性をエンドソーム膜選択的に発揮させるために、配列中の疎水性残基の一部を酸性アミノ酸に置換した。真核生物の細胞膜に対する傷害性には、ペプチドの疎水性が重要であると言われている³⁹⁻⁴¹。疎水性残基を酸性アミノ酸に置換することによって、ペプチドの細胞膜への侵入・破壊活性が緩和されて細胞毒性が低減することを期待した。さらに、エンドソームの成熟化に伴う pH の低下によって、酸性アミノ酸側鎖の負電荷が失われ、膜傷害活性が回復すると考えた (Figure 1-1)。

このような目的のモデルとして、強い細胞傷害性とリポソーム傷害性を持つコモリグモ毒由来の M-lycotoxin (IWLTKALKFLGKHAALKHLAKQQLSKL-amide) の配列を鋳型とした。M-lycotoxin は、膜中で α ヘリックス構造を形成し、4、5 残基おきに位置する塩基性アミノ酸 (リジン) が親水面となる両親媒性を持っており、強い膜傷害性を示す⁴²。このペプチドの疎水面に酸性アミノ酸 (グルタミン酸) を導入した一置換体 5 種類、および二置換体 4 種類を合成した (Table 1-1)。各変異体の細胞毒性を、血清非存在下ペプチドで 1 時間処理した細胞の生存率によって評価した。これら変異体のすべてが、野生型 M-lycotoxin (WT) (50% 傷害濃度 (EC₅₀) = 1.36 μ M) に比べて小さな細胞毒性を示した (Table 1-1)。Q21E (EC₅₀ = 3.54 μ M) を除き、高濃度 (40 μ M) 条件でも顕著な細胞毒性は示さなかった (細胞生存率 > 85%)。この結果から、M-lycotoxin の疎水面へのグルタミン酸の導入によって、細胞膜への侵入・破壊活性が緩和されることが示唆された。

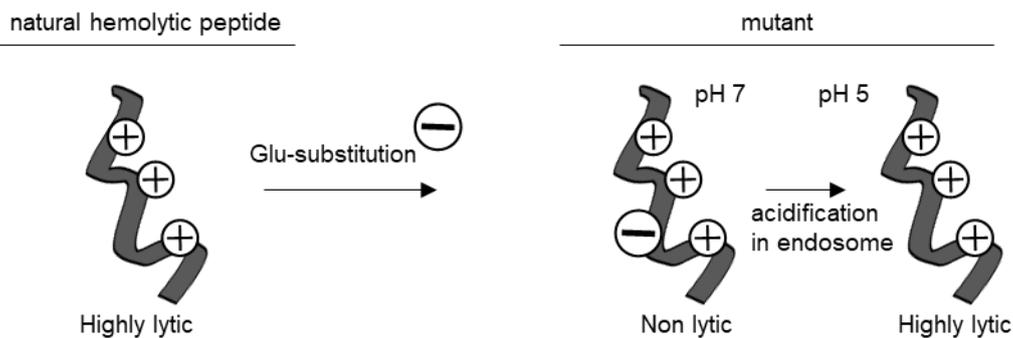


Figure 1-1. Design strategy of endosomolytic peptides. A cationic, amphiphilic peptide with a strong membrane lytic activity was attenuated by the insertion of negatively charged Glu residue(s) into the hydrophobic face. Endosome acidification is expected to make Glu more protonated and less hydrophilic, and increase peptide-membrane interaction.

Table 1-1. M-lycotoxin analogues and its 50% effective concentration (EC_{50})

Peptide	Sequence	EC_{50} (μ M)
		WST-1
M-lycotoxin (WT)	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-amide	1.36 \pm 0.11
L6E	IWLTAEKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-amide	>40
L9E	IWLTALKFEGKHAAKHLAKQQLSKL-amide	>40
A13E	IWLTALKFLGKHEAKHLAKQQLSKL-amide	>40
L17E	IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQLSKL-amide	>40
Q21E	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQELSKL-amide	3.54 \pm 0.35
L6EG10E	IWLTAEKFLEKHAAKHLAKQQLSKL-amide	>40
L9EA13E	IWLTALKFEGKHEAKHLAKQQLSKL-amide	>40
A13EL17E	IWLTALKFLGKHEAKHEAKQQLSKL-amide	>40
L17EQ21E	IWLTALKFLGKHAAKHEAKQELSKL-amide	>40

第二節：M-lycotoxin 変異体を用いた高分子の細胞内導入

グルタミン酸残基を導入した M-lycotoxin 変異体が高分子の細胞内送達に有効かどうかを調べるために、蛍光標識した 10 kDa デキストラン (Dex10-Alexa) と共に変異体を HeLa 細胞に投与した。共焦点顕微鏡により観察された Dex10-Alexa のシグナルは、ペプチド非添加時には細胞内にドット状に点在していたが、ペプチド処理細胞では細胞全体に広がって (拡散して) 存在していた。特に 17 位のロイシンをグルタミン酸に置換した L17E (IWLTKALKFLGKHAACKHEAKQQLSKL-amide) がもっとも効果的であり、L17E で処理した細胞の約 50% で Dex10-Alexa のシグナルの拡散が認められた (Figure 1-1a)。

この拡散にエンドサイトーシスが関与しているのかどうかについて、エンドサイトーシス阻害剤 (NaN_3 、5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA)) を用いて検討した。エンドサイトーシス阻害条件の下で、L17E とともに Dex10-Alexa を細胞に投与したところ、拡散が観察される細胞の割合がエンドサイトーシス阻害剤非存在下に比べて、有意に低下した (Figure 1-2b)。従って、L17E 存在下での Dex10-Alexa のサイトゾル送達はエネルギー依存的であり、エンドサイトーシスを介する可能性が示唆された。以上の結果は、通常はエンドソームに捕捉される分子が、ペプチドの作用によってサイトゾルへ放出されることを示唆している。また、EIPA は代表的なマクロピノサイトーシス阻害剤と知られており、L17E による Dex10-Alexa の細胞内送達にはマクロピノサイトーシスが関わっている可能性が示唆された。

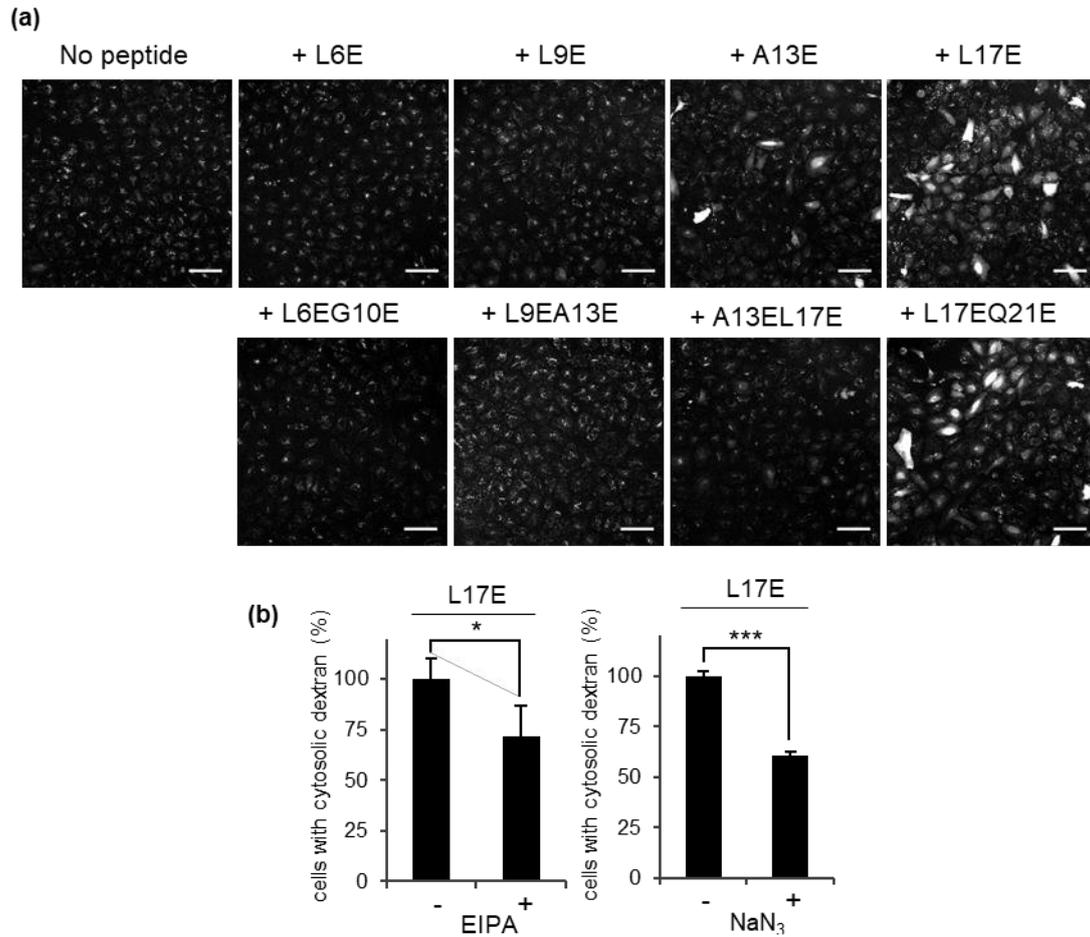


Figure 1-2. (a) Confocal microscopic observation of HeLa cells treated with peptides (40 μ M) and Dex10-Alexa (250 μ g/ml) for 1 h. Scale bars, 100 μ m. (b) The effect of endocytosis inhibitors on L17E-mediated cytosolic delivery of dextran. The data are represented as the means \pm standard error of the means (s.e.m.) (n = 3). ***, $p < 0.001$, *, $p < 0.05$ (Student's t-test).

第三節：L17E ペプチドを用いた機能性タンパク質の細胞内導入

開発したペプチドを用いた機能性タンパク質の細胞内導入による細胞機能の制御の可能性について検討するために、外来の組換え酵素 Cre (分子量: 38 kDa) を用いた細胞内での遺伝子組換え実験を行った (Figure 1-3a)。組換え酵素 Cre は、loxP 配列と呼ばれる特異的な部位で DNA の組換えを起こす⁴³。loxP-DsRed-loxP-EGFP 遺伝子を発現する細胞は、DsRed 直後に挿入した終止コドンのために、赤色蛍光タンパク質 DsRed のみを発現し、EGFP の発現は抑制されている。しかし、Cre が細胞内に導入されると、loxP 部位での組換えが起こって、EGFP が発現する。

loxP-DsRed-loxP-EGFP 配列を持つ loxP-レポータープラスミドを導入して DsRed を発現した HeLa 細胞に、L17E 存在下で細胞外から組換え酵素 Cre を投与し、24 時間後の細胞を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。その結果、細胞内での標的遺伝子の組換えによる EGFP の発現が確認できた (Figure 1-3b)。このことから、L17E 存在下で送達された外来タンパク質により、細胞機能を制御できることが確認された。

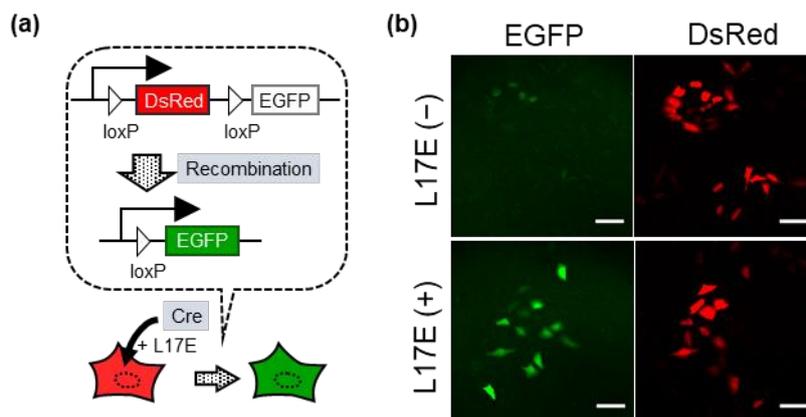


Figure 1-3. (a) Schematic representation of the Cre recombination assay system. (b) EGFP expression induced by exogenous Cre recombinase delivered by L17E. Scale bars, 100 μ m.

第四節：導入抗体による細胞内の標的認識と細胞機能制御

次に、L17E が介在する高分子の細胞内送達を抗体へも応用可能かどうかを検討した。蛍光標識したヒト血清由来免疫グロブリン G (IgG) (分子量：150 kDa) を L17E とともに HeLa 細胞に投与し、その局在を共焦点顕微鏡で観察した。抗体は、デキストランの投与時と同様に、ペプチド非添加時はドット状に分布していた。一方、L17E 処理細胞中では拡散した IgG のシグナルが認められた (Figure 1-4a)。さらに、His タグを融合した膜局在蛍光タンパク質を発現させた細胞に L17E と蛍光標識した抗 His タグ抗体を投与したところ、標的タンパク質と抗体の共局在が認められた (Figure 1-4b)。このことは、L17E 存在下に細胞内に送達された外因性の抗体が、細胞内で構造を維持し、標的タンパク質を認識できることを示唆している。

さらに、細胞内に導入された抗体が細胞内タンパク質を認識して結合することによって、その機能を抑制できるかどうかを調べた。グルココルチコイド受容体 (glucocorticoid receptor、GR) は、通常はサイトゾルに存在し、リガンドの刺激を受けると核内に移行して様々な遺伝子の転写を制御する核内受容体である。あらかじめ L17E を用いて抗 GR 抗体を導入した HeLa 細胞に、デキサメタゾン (DEX) 刺激を与えた。未処理の細胞、あるいは抗 GR 抗体の代わりにヒト血清由来の非特異的な抗体を導入した場合には、DEX 刺激によってメタロチオネイン 1E (MT1E) 遺伝子の転写が誘導された。一方、抗 GR 抗体を導入した細胞では、DEX 刺激による MT1E 遺伝子の転写が有意に抑制された (Figure 1-4c)。導入した抗体の標的タンパク質に関わる転写が抑制されたことから、サイトゾルで抗体が標的を認識し、GR の核内移行を阻害したと考えられる。この結果から、L17E によって導入した抗体によって、細胞内タンパク質の機能を制御できる可能性が示された。

第五節：ペプチドの物性と高分子の導入機構に関する考察

グルタミン酸置換によって得た L17E が、pH 依存的な膜傷害能を有するのかどうかについて、リポソームからの蛍光色素の漏出試験（リーケージアッセイ）を用いて検討した⁴⁴。蛍光色素 ANTS (= 8-aminonaphthalene-1,2,3-trisulfonic acid) とその消光剤 DPX (= *p*-xylene-bis(pyridinium) bromide) を内包したリポソームを、ペプチド存在下で 1 時間インキュベートした。リポソーム内で消光されている ANTS の蛍光は、リポソームが崩壊し内包物が放出されると回復するため、ペプチドの膜傷害性を ANTS の蛍光強度として評価できる。L17E は中性脂質で構成されたリポソーム（中性リポソーム）に比べて、負に帯電した脂質で構成されたリポソーム（負電荷リポソーム）に対して強いリーケージ活性を示し、pH 5.0 と pH 7.4 において同程度のリーケージ活性を示した（Figure 1-5a）。一方、野生型ペプチド（WT）は L17E と同様に負電荷リポソームへの選択的なリーケージ活性を示したが、それぞれのリポソームに対して、pH 5.0 に比べて pH 7.4 において強いリーケージ活性を示した（Figure 1-5b）。また、リーケージ活性はすべての条件下で WT よりも L17E の方が低かった。

リーケージアッセイの結果から、グルタミン酸残基の導入は、全体の膜傷害性を低減させ、特に中性 pH における膜傷害性を大きく低減させる効果があることが分かった。また、エンドソーム膜は形質膜に比べて負電荷脂質を多く含むことが知られている⁴⁵。このことから、L17E はエンドソーム膜のような負に帯電した膜に対して高い膜傷害性を持つと考えられる。L17E は、エンドソームへの移行に伴って、pH ではなく脂質組成の変化に主に応答したエンドソーム不安定化効果を発揮する可能性が示唆された。

続いて、WT と L17E ペプチドが脂質二重層上でとりうる二次構造について評価するために、負電荷リポソーム存在下でペプチドの円二色性 (CD) スペクトルを測定した (Figure 1-5c)。WT の CD スペクトルでは、208 nm と 222 nm 付近に α ヘリックス特有の負のコットン効果に基づく極大が見られたことから、WT はリポソーム存在下で α ヘリックス構造を形成しているといえる。222 nm におけるモル楕円率 (θ_{222}) からヘリックス含有率を算出して⁴⁶比較したところ、pH 5.0 では 43%、pH 7.4 では 80%であり、pH 7.4 におけるヘリックス含有量は pH 5.0 に比べて大きかった。一方、L17E のスペクトルはヘリックス構造の特徴をほとんど示さず、スペクトル形状は pH 5.0 と pH 7.4 においてほぼ同じであった。この結果から、グルタミン酸残基の導入は、全体のヘリックス含有量を減少させ、その影響は特に中性 pH において大きいことが示唆された。この傾向はリーケージアッセイと一致しており、ヘリックス構造の取りやすさが膜傷害性と関連していると考えられる。

WT は pH 7.4 において pH 5.0 よりも強いリーケージ活性と大きいヘリックス含有率を示した。これは、配列中に含まれる二つのヒスチジン残基の側鎖 ($pK_a = 6.5$ ⁴⁷) が、pH 5.0 においてプロトン化され、ペプチドの疎水性が減少して脂質二重層の相互作用が小さくなったことが理由だと考えられる。したがって、pH に応答した膜傷害性を得るためには、グルタミン酸を導入する方策と併せて、ヒスチジンを除去することも有効だと考えられる。

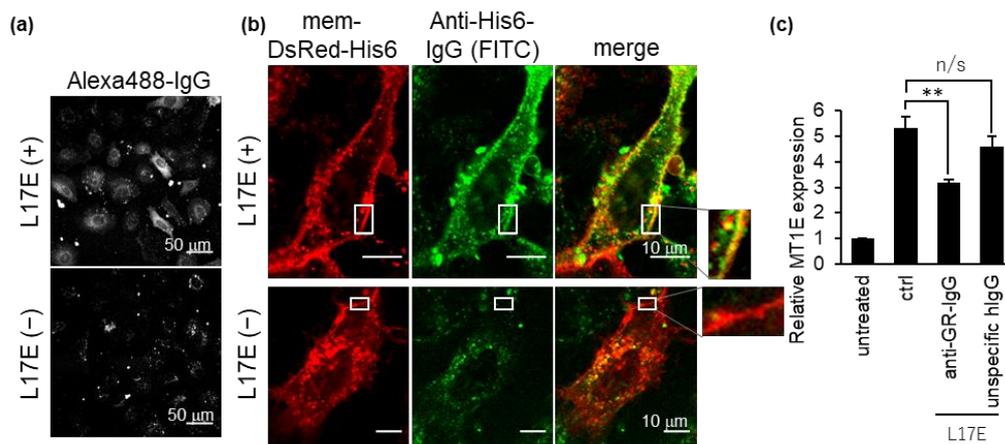


Figure 1-4. (a) Cytosolic delivery of fluorescently labeled IgG mediated by L17E. (b) Recognition of target protein by exogenous antibody. (c) Suppression of translational activity of MT1E in the cells treated with anti-GR-IgG in the presence of L17E. The amount of MT1E expression was normalized to cells untreated with Dex. The data are represented as the means \pm s.e.m. (n = 9). **, p < 0.01 (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test).

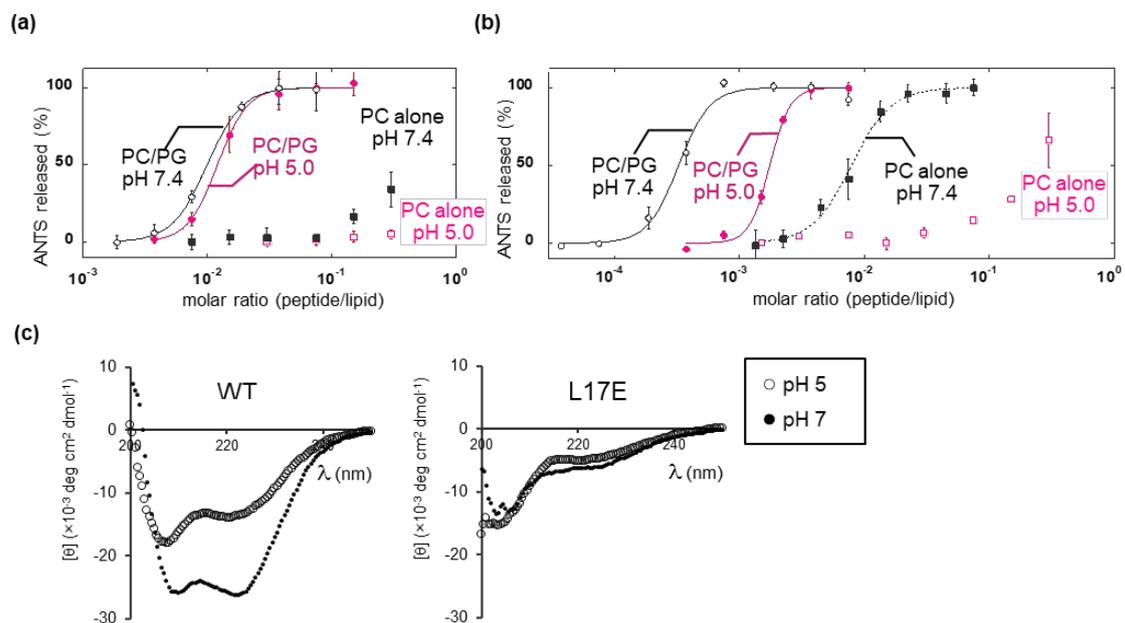


Figure 1-5. (a, b) The membrane-perturbation ability of L17E (a) and WT (b) against LUVs containing ANTS and DPX. [POPC/POPG (3:1) LUVs at pH 7.4 (open circles), POPC/POPG (3:1) LUVs at pH 5.0 (filled circles), POPC LUVs at pH 7.4 (filled squares) and POPC LUVs at pH 5.0 (open squares)] (c) CD spectra of WT and L17E in MES buffer in the presence of 2.67 mM POPC/POPG (3:1) LUVs at pH 5.0 and 7.4.

第六節：L17E による細胞内への外来高分子の取込促進

第二節において、L17E 存在下で Dex10-Alexa を投与した際に、サイトゾルへのシグナルの拡散が観察されたと同時に、ドット状のシグナルが増強していることも観察された (Figure 1)。これを定量的に確認するために、L17E 存在下で Dex10-Alexa を 1 時間処理した細胞の蛍光強度をフローサイトメーターによって測定した。20 μM の L17E で処理すると 1.2 倍、40 μM で処理すると 1.5 倍の Dex10-Alexa の細胞内移行が観察された。この結果から、L17E 処理によって、サイトゾルへの放出に加えて、細胞内に移行する高分子の量も増加することが明らかになった。

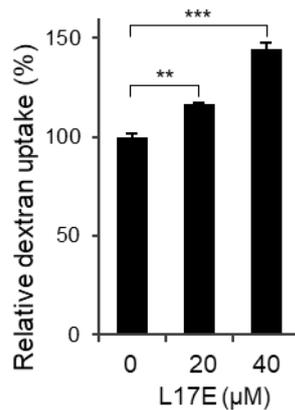


Figure 1-4. Increase in dextran uptake by the treatment of L17E. HeLa cells were treated with 20 μM or 10 μM L17E in the presence of Dex10-Alexa for 1 h. Cells were analyzed by flow cytometry. The amount of dextran uptake was normalized to cells untreated with L17E. The data are represented as the means \pm s.e.m. (n = 3). **, p < 0.01, ***, p < 0.001 (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test).

第一章の考察

本章では、強いエンドソーム膜傷害性を持つエンドソーム不安定化ペプチドを創出するために、溶血ペプチドを改変するアプローチについて検討した。鋳型として用いた M-lycotoxin ペプチドの 17 番目のロイシンをグルタミン酸に置換した変異体 L17E が、エンドソーム内包物をサイトゾルに放出する活性があることが明らかになった。L17E を用いて、高分子量デキストラン、組換え酵素 Cre、および抗体を細胞内に導入することができた。

溶血ペプチドの配列中にグルタミン酸残基を導入することで、ペプチドに pH 応答性の膜傷害活性を付与することを狙ったが、得られた L17E ペプチドは pH に応答する明白な構造および膜傷害性の変化を与えなかった。この結果から、L17E は従来のエンドソーム不安定化分子と異なる機序でエンドソームを不安定化すると考えられる。一方、L17E ペプチドは、負電荷脂質を含有するリポソームに対して選択的に作用した。エンドソーム内には、成熟の進行に伴って負電荷脂質が濃縮することが知られている⁴⁵。このことから、L17E は細胞内移行に伴う脂質組成の変化を認識できる可能性がある。したがって、L17E による高分子の導入機序に関するより詳細な検討が必要である。

さらに、L17E は外来高分子の細胞内への移行を促進する可能性が示唆された。すなわち、L17E はサイトゾルへの放出を促進することに加えて、高分子薬物のエンドソームへの取り込み効率を高めることで、効果的な細胞内導入を実現している可能性がある。L17E の活性をさらに向上させるために、膜傷害活性という観点だけでなく、細胞外液中のタンパク質の取り込み亢進活性を向上させるアプローチも有効であると期待できる。

本研究において、サイトゾルへの送達に膜傷害性ペプチドを利用するアプローチの有用性が示された。開発したペプチドは、これまでに報告されているエンドソームで作用する分子には見られないユニークな特性を有しており、細胞移送の新しい概念を提供するものといえる。

第二章：L17E ペプチドが介する高分子の サイトゾル移行機序の検討

第一章で、膜傷害性ペプチドの配列にグルタミン酸を置換した変異体が、高分子の細胞内導入に効果的であることを明らかにした。また、改変して得たペプチドは、リーケージアッセイにおいて負に帯電した膜を選択的に傷害しており、これまでに報告されているエンドソーム作動性の分子には見られない特徴を持っていた。さらに、高分子の細胞への取り込みを促進する効果も見られた。このL17Eを用いたサイトゾルへの導入過程を明らかにすることによって、導入効率を向上させるための知見が得られると期待できる。さらに、新たなサイトゾルへの送達法の開発にもつながると考えられる。本章では、L17Eが媒介する高分子のサイトゾル移行機序の理解を目的として研究を行った。

第一節：L17E ペプチドによる速い細胞内導入

まず、L17E がエンドソームの成熟のどの段階でサイトゾルへの高分子の放出を行うのかに関して検討した。エンドソームの成熟が進行するにつれてデキストランのサイトゾル移行が増大すると予想して、まずパルスチェイス実験を行った⁴⁸。細胞を L17E と Dex10-Alexa で 5 分間処理してエンドソームに取り込ませた後、細胞を洗浄して細胞外のペプチドと Dex10-Alexa を除去した。その後、血清存在下で 5 分、15 分、30 分、60 分間インキュベートし、Dex10-Alexa の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Dex10-Alexa は、サイトゾルに移行すると核膜を透過する⁴⁹。核まで Dex10-Alexa のシグナルが広がっている状態をサイトゾルまでデキストランが送達されたと判断してその割合を算出した。パルス後 5 分の時点で約 4 割の細胞でサイトゾル送達認められた (Figure 2-1a, b)。ただし、予想に反して、サイトゾル送達の見られた細胞の割合は時間経過とともに変化しなかった。この結果は、L17E 存在下でのデキストランのサイトゾル送達にとって、エンドソームの成熟は必ずしも重要でない可能性を示唆している。

L17E は膜傷害活性を持つ溶血ペプチド由来であるため、5 分間のペプチド処理によるサイトゾルへのデキストランの送達が、細胞膜を傷害して起こった可能性が考えられた。そこで、まず細胞の自発的な取り込み機構であるエンドサイトーシスの寄与を確認するため、細胞を低温条件または ATP 欠乏条件下に置き、細胞のエネルギー代謝を停止させた状態^{50,51}で L17E の活性を調べた。各条件下で、L17E による 5 分間でのデキストランのサイトゾル送達が効果的に抑制された (Figure 2-1c, d)。この結果から、5 分間でのデキストランのサイトゾル送達にもエンドサイトーシスが関与することが示唆される。さらに、細胞膜に大きな傷害を与えていないことを、サイトゾルの酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) の培地中への放出量を評価 (LDH assay) した。5 分または 60 分間細胞を L17E で処理した培地には、ペプチド非存在下での放出量と同程度の LDH が検出された。一方、20 μ M の野生型 M-lycotoxin で処理した場合には、培地中への LDH の放

出が認められた (Figure 2-2)。この結果から、L17E 処理によって、細胞膜が顕著な損傷を受けないことが確認された。

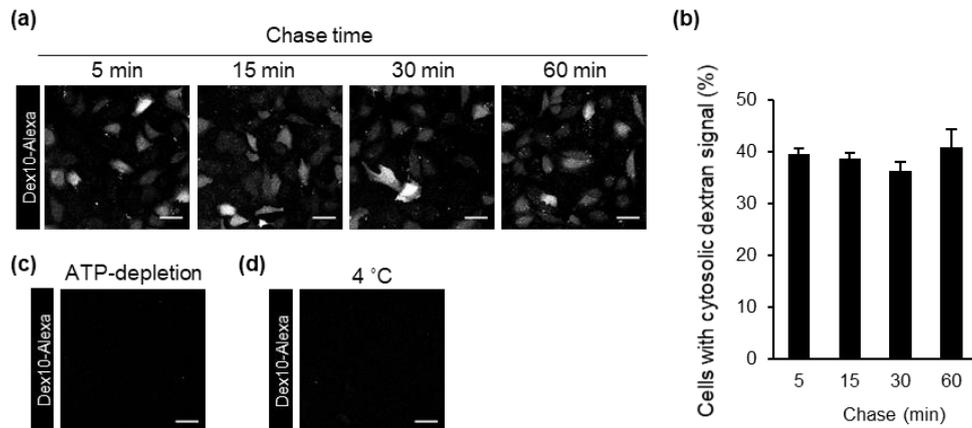


Figure 2-1. L17E mediates immediate cytosolic translocation of biomacromolecules in 5 min. (a) Pulse chase experiment. HeLa cells were treated with 40 μM L17E in the presence of 200 μg/ml Dex10-Alexa for 5 min. After washout of L17E and Dex10-Alexa, cells were incubated in a fresh α-MEM(+) for 5, 15, 30 and 60 min prior to confocal microscopic observation. Scale bars, 50 μm. (b) Percentage of cells bearing cytosolic Dex10-Alexa distribution in (a). The data represent the means ± s.e.m. (n = 4). One-way ANOVA showed no significant difference. (c, d) In ATP-depleted condition (c) or at 4 °C (d), cytosolic Dex10-Alexa distribution was suppressed. Scale bars, 50 μm.

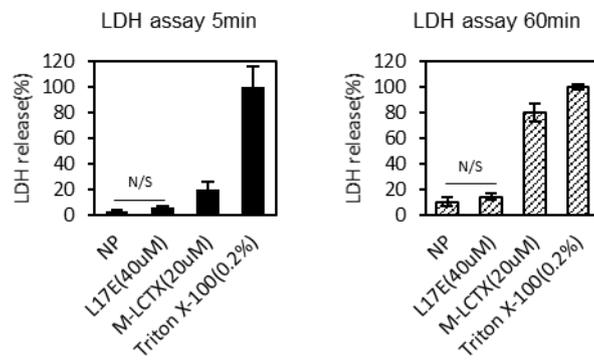


Figure 2-2. LDH assay. Cellular LDH in culture supernatant indicates the damage of cell membranes. No marked release of LDH from cells was detected by the treatment of 40 μM L17E for 5 and 60 min. Wild type M-lycotoxin (M-LCTX) was used as a control for strong hemolytic peptides. The sample treated with Triton X-100 were used as 100 % release. The data represent the means ± s.e.m. (n = 3). N/S means of no statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test).

第二節：エンドソームの成熟化の寄与の検討

エンドソームの成熟の寄与についてより詳細に検討するため、初期エンドソーム関連タンパク質である Rab5 のドミナントネガティブ発現細胞におけるサイトゾル送達を評価した。Rab5 は初期エンドソームの形成に関わっており、その常時不活性型 S34N 変異体の過剰発現は、初期エンドソームの形成を阻害し、常時活性型 Q79L 変異体の過剰発現は、後期エンドソームの形成を阻害することが知られる (Figure 2-3a) ^{48,52,53}。Rab5 変異体の過剰発現細胞を、L17E と Dex10-Alexa で 5 分間処理して、Dex10-Alexa のサイトゾル送達を評価した。Rab5 の変異型に関わらず、40%程度の細胞で Dex10-Alexa のサイトゾル送達が認められた (Figure 2-3b, c)。野生型 Rab5 を過剰発現した場合に比べて、常時不活性型 S34N を過剰発現した場合、Dex10-Alexa のサイトゾル送達が認められた細胞の割合が有意に減少したがその差はわずかであった。また、Dex10-Alexa の顕微鏡観察において両者に顕著な違いは見られなかった。したがって、ほとんどのデキストランは、初期エンドソーム形成が阻害されている S34N 変異体発現細胞においてもサイトゾルに送達されたと考えられる。この結果は、L17E を用いた Dex10-Alexa のサイトゾル送達の大部分が初期エンドソームに移行する前に起こる可能性を示唆し、第一節で述べた、L17E 存在下でのデキストランのサイトゾル送達にエンドソームの成熟は必ずしも重要でないという可能性を支持している。

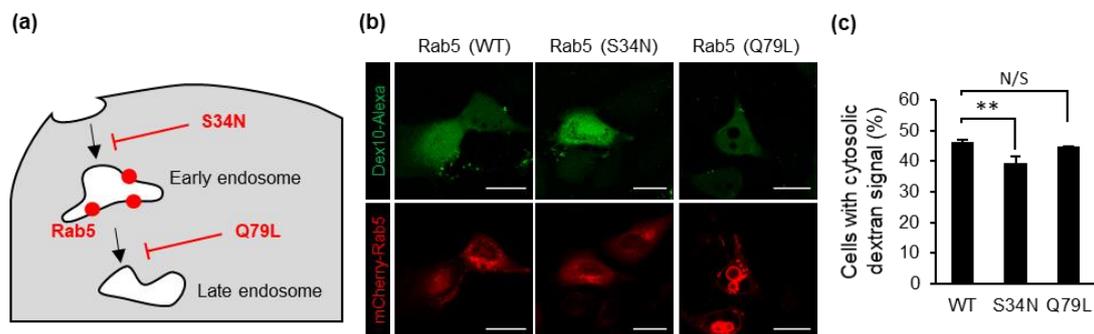


Figure 2-3. (a) Schematic representation of the effect of Rab5 mutants on the formation of early endosome. (b) Cells expressing Rab5 (WT) and its mutants were treated with 40 μ M L17E in the presence of 200 μ g/ml Dex10-Alexa for 5 min. Scale bars, 25 μ m. (c) Percentage of cells bearing cytosolic Dex10-Alexa distribution in (a). The data represent the means \pm s.e.m. (n = 4). **, p < 0.01, N/S means of no statistically significant difference (one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test).

第三節：L17E によるマクロピノサイトーシス誘導

第一章において、L17E 処理によって 10 kDa のデキストランの細胞内取り込み量が増大し、さらにデキストランのサイトゾル送達が増大し、マクロピノサイトーシス阻害剤 (EIPA) の存在下で低下した。これらの結果から、L17E による刺激はマクロピノサイトーシスの誘導を伴うと予想した。

マクロピノサイトーシスは、細胞膜直下でアクチンが伸長して膜を波打たせ (ラッフリング)、この波が外液を巻き込んで小胞を形成することによって起こる^{50,54}。まず、L17E の処理でアクチンのラッフリングが起こるかどうかを調べた。生細胞中のアクチン骨格の動きを可視化するために、ライフアクトアクチン結合モチーフ⁵⁵を融合した蛍光タンパク質 (Lifeact-mCherry) を用いた。Lifeact-mCherry を発現させた HeLa 細胞に L17E を投与し、投与前後 10 分間のアクチンの動きを観察した (Figure 2-4a)。投与後 2 分程度でアクチンのラッフリングが観察された。この結果は、L17E がマクロピノサイトーシスを誘導する可能性を支持している。

70 kDa のデキストランは、マクロピノサイトーシスのマーカーとして用いられる。アクチンの再構成が観察された 5 分間でマクロピノサイトーシスが誘起されるのかどうかを、テトラメチルローダミン標識された 70 kDa のデキストラン (Dex70-TMR) の細胞内移行量を測定することによって評価した。L17E 存在下で Dex70-TMR を 5 分間細胞に投与したところ、取り込み量が 3.5 倍上昇した (Figure 2-4b)。L17E によってマクロピノサイトーシスが誘導されることが示唆された。また同様の条件で細胞を処理し、Dex70-TMR の局在を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、ドット状のシグナルの増加と共に、細胞全体に拡散したシグナルが見られた (Figure 2-4c)。この結果から、マクロピノサイトーシスの非常に早い段階で 70 kDa のデキストランがサイトゾルに移行する可能性が考えられた。

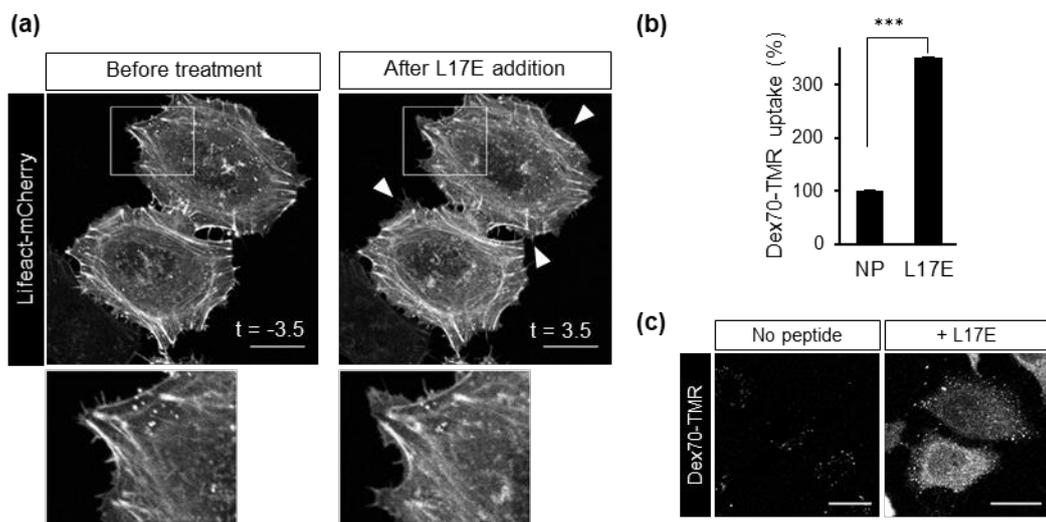


Figure 2-4. (a) Microscopic observation of actin cytoskeleton (visualized using Lifect-mCherry). Cells were observed 3.5 min before and after addition of L17E. Scale bars, 25 μ m. Arrows indicate the areas yielding lamellipodia. The lower panel in each picture represents a magnified view of the boxed area. (b) Total cellular uptake of Dex70-TMR (macropinocytosis marker) for 5 min was increased by the treatment of L17E. The amount of dextran uptake was normalized to cells untreated with L17E. The data represent the means \pm s.e.m. (n = 3). ***, $p < 0.005$ (Student's t-test). (c) Cytosolic distribution of Dex70-TMR as well as the dot-like signal was observed in the cells treated with Dex70-TMR in the presence of L17E for 5 min. Scale bars, 25 μ m.

第四節：サイトゾル送達におけるマクロピノサイトーシスの寄与の検討

L17E による 5 分での 10 kDa デキストランのサイトゾル送達に、マクロピノサイトーシスが寄与しているかに関して、代表的なマクロピノサイトーシス阻害剤を用いて検討を行った。Cytochalasin D (CytoD)、5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA)、wortmannin それぞれの存在下で L17E と Dex10-Alexa で 5 分間細胞を処理して、Dex10-Alexa のサイトゾルへの送達を評価した。CytoD、EIPA 処理によってサイトゾルへの送達が抑制されたのに対して、wortmannin 処理では抑制されなかった (Figure 2-5b-d)。CytoD、EIPA はアクチンの重合とそれに伴うラッフリングを阻害し、それに対して wortmannin は、ラッフリング自体は阻害せず、ラッフリングの細胞膜への融合、すなわちマクロピノソーム形成の終結を阻害することが知られている⁵⁶⁻⁵⁸。したがって、アクチン重合に伴うラッフリング形成が、L17E によるサイトゾルへの送達に必要な可能性が示唆された。

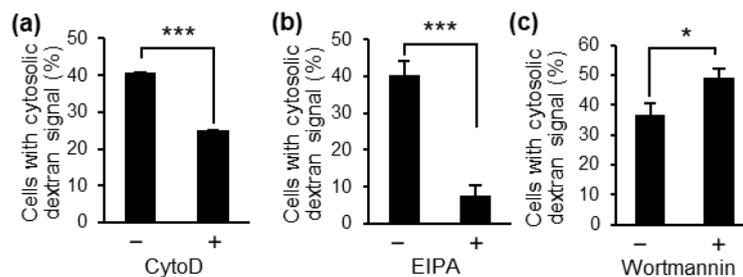


Figure 2-5. The effect of macropinocytosis inhibitors on L17E-mediated cytosolic delivery of dextran. Cells were pretreated in the presence of CytoD (a), EIPA (b) or wortmannin (c) for 30 min and then incubated with 40 μ M L17E and 200 μ g/ml Dex10-Alexa in the presence of corresponding inhibitor for 5 min. The data represent the means \pm s.e.m. [n = 4 (b) and n = 6 (a, c)]. *, p < 0.05, ***, p < 0.005 (Student's t-test).

第五節：L17E による細胞膜のスクランブリング

L17E が細胞膜に作用して高分子の膜透過を促進する可能性について検討するため、細胞膜内葉特異的に存在する脂質の細胞膜表面への露出を評価した^{59,60}。膜貫通小孔の形成などによって脂質二重層が攪乱されると、構成脂質が双方向に反転（スクランブル）する^{61,62}。ここでは、主要な細胞膜の構成脂質である phosphatidylserine (PS) とラフリング状態の膜に集積する phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂)^{63,64} に関して評価した。これらの脂質は細胞の恒常性維持機構によって細胞膜の内側に非対称に存在している。L17E で 5 分間処理した細胞を回収し、細胞表面の PS および PIP₂ 量を Annexin V^{60,65} あるいは免疫染色法⁶⁶ によって評価した。L17E 処理により、細胞表面に露出する PS と PIP₂ の量は共に増大した (Figure 2-6)。さらに、ATP 枯渇条件下で L17E 処理をした場合と比較することによって、細胞自体の活動が必要なのかどうかを検討したところ、ATP 枯渇条件下では PS および PIP₂ の露出は見られなかった (Figure 2-6)。以上の結果から、L17E によって細胞膜の脂質スクランブリングが引き起こされることが示唆され、それには細胞の運動が必要であることが示唆された。

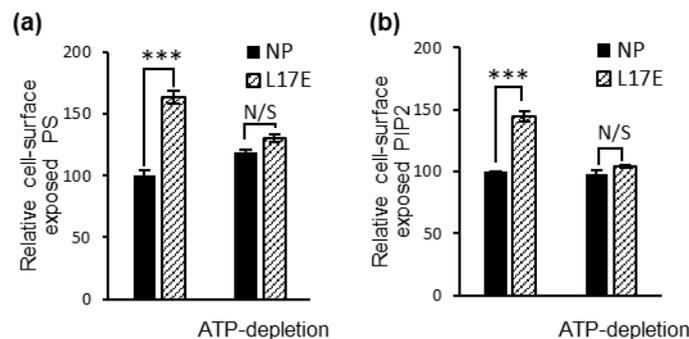


Figure 2-6. Surface phospholipid level was quantified by flow cytometry using lipid-specific fluorescence molecules, Annexin V (a) and immunostaining (b). The amount of surface exposed lipids was normalized to cells untreated with L17E. The results are presented as the means \pm s.e.m. (n=3). ***, $p < 0.001$ (one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's *post hoc* test).

第二章の考察

本章ではまず、エンドソームの成熟のどの段階で L17E がサイトゾルへの高分子の放出を行うのかに関して検討した。第一に、L17E を用いて 5 分間という比較的短い時間でデキストランをサイトゾルに送達できることが明らかになった。第二に、パルスチェイス実験と初期エンドソーム関連タンパク質のドミナントネガティブ体を用いた実験から、5 分間でのデキストランのサイトゾル送達にはエンドソームの成熟が必ずしも必要でない可能性が示された。また、エンドサイトーシス経路の初期段階以前で、L17E が高分子をサイトゾルに放出する可能性が示唆された。したがって、L17E 存在下で高分子がサイトゾルに移行する機序として、細胞膜を直接透過する経路と、Rab5 がリクルートされる以前のエンドソームから放出される経路の 2 つが推測される。本章では、第三節以降の結果をもとに、細胞膜を透過する可能性に関して議論する。

第三節では、L17E 処理によって細胞膜でラッフリングが誘導され、それに続くマクロピノサイトーシスによる取り込みが増大することを明らかにした。さらに第四節で、L17E によるサイトゾルへの送達におけるマクロピノサイトーシスの寄与について阻害剤を用いて検討した。

マクロピノサイトーシスは、アクチンが重合して細胞膜ラッフリングが誘導され、さらにラッフリング膜が細胞膜に融合してマクロピノソームが形成されるという段階的な誘導過程をたどる^{57,58}。Cytochalasin D (CytoD) は膜のラッフリングに重要なアクチン重合の阻害剤であり、マクロピノサイトーシスの阻害剤として用いられる⁵⁸。それに加えて、Na⁺/H⁺交換輸送体の阻害剤である EIPA は、マクロピノサイトーシスの阻害剤として最もよく用いられる。EIPA の作用機序の一つとして、EIPA の作用によって細胞膜近傍の局所的な pH が低下することで、間接的にラッフリングの形成が抑制されることが報告されている⁶⁷。CytoD、EIPA で L17E によるサイトゾル送達が増加したことから、L17E によるサイトゾル送達にはアクチン重合によるラッフリングの誘導が必要である可能性が示唆された。しかしながら、サイトゾル送達が見られた細胞の割合は

CytoD 処理によって 40%程度しか減少しなかったことから、アクチン重合には依存しない経路の存在も示唆された。

一方 wortmannin は、ラッフリング自体は阻害せず、ラッフリングの細胞膜への融合、すなわちマクロピノソームの形成を阻害することが知られている⁵⁶。wortmannin 処理によって、わずかではあるが有意にサイトゾルへの送達が増加した。これは、ラッフリング状態の延長によって、L17E の効果が促進されたためであると推測される。以上を総合すると、ラッフリング状態の細胞膜に対して L17E が作用し、細胞外分子のサイトゾルへの流入を促進する可能性が考えられる。

L17E 存在下で高分子が細胞膜を透過する場合、小孔の形成などによって細胞膜が攪乱されている可能性がある。第五節において、細胞膜内葉脂質の細胞表面への露出を評価することで、L17E によって細胞膜がスクランブルされる可能性に関して検討した。その結果、L17E で処理した細胞膜上で細胞膜内葉脂質の露出量が増大し、一方 ATP 枯渇条件下で L17E を処理した場合は、細胞膜内葉脂質の露出量は変化しなかった。この結果から、L17E は細胞膜をスクランブルすることが示唆され、それがエネルギー依存的であることが示唆された。したがって、L17E は単純なペプチド-膜間の相互作用のみで細胞膜に作用するというよりも、むしろ L17E が細胞に与えた刺激により変化した細胞膜に対して、L17E が作用する可能性が考えられる。一つの可能性として、L17E の刺激によってラッフリングが誘導され、それによって伸展した細胞膜に対して、L17E が小孔を形成するなどして膜構造を攪乱し、高分子が透過できるようになることが考えられる (Figure 2-7)。

本章は L17E による 5 分間でのサイトゾル送達に注目したため、10 kDa のデキストランを用いた検討に留まっている。第一章で示した L17E を用いた機能性タンパク質 (Cre、抗体) のサイトゾル送達に同様のメカニズムが関与する可能性は十分に考えられるが、これについてはより詳細な検討が必要である。

一方で、L17E によるマクロピノサイトーシス誘導の分子メカニズムに関しては明らかになっていない。一般に、成長因子などによるマクロピノサイトーシス

の誘導には、細胞を飢餓状態に置く必要がある⁶⁸。しかし、L17Eは飢餓状態でない細胞に対してもマクロピノサイトーシスを誘導することができることから、成長因子によるマクロピノサイトーシス誘導とは異なるメカニズムによるものである可能性が高い。L17Eの機能発揮にはマクロピノサイトーシスの誘導が必要であり、阻害剤実験からラッフリング状態の延長によって活性が向上する可能性が示唆されたことから、L17Eの活性向上にはマクロピノサイトーシスの誘導活性を向上させる方策も有効と考えられる。このメカニズム解明が進むことにより、より効果的な細胞内送達法の開発につながることを期待される。

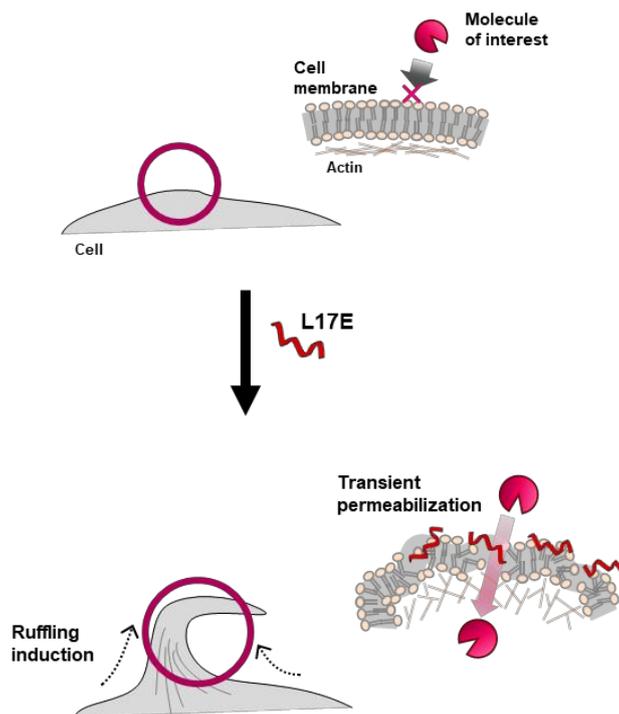


Figure 2-7. Proposed mechanism of inducing membrane ruffling and transient permeabilization in the presence of L17E. L17E interacts with cell surface leading to organization of actin cytoskeleton and membrane ruffling. On the ruffled membrane, membrane interaction of L17E is enhanced and pore formation accompanied by lipid scrambling takes place, resulting in transient permeabilization.

以上より、L17Eによるサイトゾル送達にエンドソームの成熟化が必ずしも必要ではないことが明らかになった。エンドサイトーシスの早い段階でサイトゾルに目的分子を放出するため、エンドソームに取り込まれた分子の分解系への移行を回避できるという利点がある。さらに、L17Eが膜のラッフリングおよびマクロピノサイトーシスを誘導することが見出された。また、L17Eが細胞膜のスクランブリングを誘起することにより、細胞膜の透過性を向上させてサイトゾル送達を行う可能性が示唆された。L17Eによる膜のスクランブリングはエネルギー依存的なものであったため、ラッフリングが誘導された細胞膜上でのみペプチドによる小孔形成が生じ、細胞外分子を透過させることができる可能性が考えられる。また、細胞膜表面だけでなくごく初期のエンドソームでL17Eが作用し、高分子をサイトゾルに放出する可能性も十分に想定でき、L17Eによるサイトゾル送達には、両方の経路が関与している可能性が考えられる。

本研究は細胞膜ラッフリングを利用したサイトゾルへの送達法の可能性を示唆しており、細胞内送達法の開発に新たな概念を与えるものだと期待できる。本章で検討したメカニズムは、これまでに報告されてきた直接膜透過やエンドソームを経由する細胞内送達経路とは全く異なるものであった。最近では典型的な経路(直接膜透過やエンドサイトーシス)でないメカニズムで細胞内に移行すると考えられるキャリアも報告されている⁶⁹⁻⁷³。本研究をはじめとする様々な高分子の細胞内移行メカニズムの研究は、新規の、あるいはこれまで見逃されてきた経路の理解や利用法の開発につながるといえる。

総括

ペプチド製剤や抗体医薬品の創薬における重要性が高まるにしたがって、タンパク質などの親水性の高分子をサイトゾル内に送達する技術の必要性が高まっている。生体高分子をサイトゾルへ送達する手法の確立に向けて、本研究では、生体膜と相互作用するペプチドを利用するアプローチに関して検討を行った。第一章では、膜傷害性ペプチドを改変した L17E ペプチドを開発し、それを用いて抗体を細胞内に導入できることを示した。第二章では、L17E ペプチドのユニークな性質に着目し、その作用機序を検討することで、エンドサイトーシスのごく初期段階でのサイトゾル送達およびラッフリングを利用したサイトゾルへの物質送達の可能性を見出した。これらのアプローチは、より効率的なサイトゾルへの送達法の開発につながると期待される。さらに、本研究成果は、細胞内送達法に関する研究に、ラッフリングを利用した導入経路という新しい視点を提供する。

本研究で検討した膜傷害性ペプチドを起点としたサイトゾルへの送達法は、今後は、生体内での細胞内ターゲティングに応用していくことが期待される。しかしながら、今回の検討では、ペプチドと目的分子を混合して投与する手法を用いたため、投与量の多くが利用されていない。生体組織での利用には、より効率よく目的分子をサイトゾルに送達することが必要となる。今後は、本手法を薬物送達ベクター（リポソーム、ナノ粒子等）などの既存の手法と組み合わせることによって、より効果的な細胞内薬物送達システムの確立につながることが期待される。

実験の部

第一章の実験

ペプチドの合成

ペプチドの合成は、TGS-RAM 樹脂（島津製作所）を用い、PSSM-8 ペプチド固相合成機（島津製作所）で行った。その後 trifluoroacetic acid-ethandithiol (95:5) で室温 3 時間処理し、樹脂からの切り出しと脱保護を行った。次いで、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）でペプチドの精製を行い、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-TOFMS）により、正しい質量であることを確認した。合成したペプチドの配列と質量分析結果は下表の通りである。

Peptide	Sequence	実測値 <i>m/z</i>	理論値 [M+H] ⁺
WT	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-CONH ₂	2842.5	2842.7
L6E	IWLTAEKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-CONH ₂	2858.6	2858.7
L9E	IWLTALKFEGKHAAKHLAKQQLSKL-CONH ₂	2859.1	2858.7
A13E	IWLTALKFLGKHEAKHLAKQQLSKL-CONH ₂	2901.1	2900.7
L17E	IWLTALKFLGKHAAKHEAKQQLSKL-CONH ₂	2859.0	2843.7
Q21E	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQELSKL-CONH ₂	2843.8	2843.7
L6EG10E	IWLTAEKFLEKHAAKHLAKQQLSKL-CONH ₂	2930.8	2930.7
L9EA13E	IWLTALKFEGKHEAKHLAKQQLSKL-CONH ₂	2917.3	2916.7
A13EL17E	IWLTALKFLGKHEAKHEAKQQLSKL-CONH ₂	2917.4	2916.7
L17EQ21E	IWLTALKFLGKHAAKHEAKQELSKL-CONH ₂	2860.4	2859.7

細胞培養

ヒト子宮頸癌由来細胞（HeLa 細胞）（Riken BRC Cell Bank）は 10%（v/v）非働化ウシ血清（Invitrogen）を含むアルファ最小必須培地（ α -MEM(+)）中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、3-4 日ごとに継代を行った。

細胞生存試験

細胞の生存率は、細胞増殖試薬 WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) (Roche) を用いて、推奨の方法に準拠して測定した。HeLa 細胞を 96 ウェルマイクロプレートに播種し、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、ペプチドを含むアルファ最小必須培地（ α -MEM(-)、Wako）（100 μ l）中で、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間培養した。ここに WST-1 試薬を 10 μ l 添加し、さらに 1 時間培養後、吸光度（A_{450nm} - A_{600nm}）を測定した。50%有効濃度（EC₅₀）の値は、データ解析ソフトウェアカレイダグラフ (Synergy Software, version 4.5 for Windows) 上で、各ペプチド濃度での細胞生存率にシグモイド曲線をフィッティングすることで求めた。

10 kDa デキストランの細胞内局在観察

HeLa 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、 α -MEM(-) で 2 回洗浄後、40 μ M のペプチドと 250 μ g/ml の Alexa Fluor 488 で標識したデキストラン (10kDa) (Dex10-Alexa, Molecular Probes) を含む α -MEM(-) (200 μ l) を投与した。37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間培養後、 α -MEM(+) で 2 回洗浄し、さらに 3 時間培養した。細胞を洗浄後、デキストランの細胞内局在を共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察した。

エンドサイトーシス阻害実験に関しては、まず 10 mM NaN₃ を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS(-)) に 1 mM MgCl₂、1 mM CaCl₂ を添加した培地 (PBS(+)) で 15 分間培養後、40 μ M の L17E、200 μ g/ml の Dex10-Alexa、および 10 mM NaN₃ を含む PBS(+) に交換し、30 分間培養した。あるいは 100 μ M の EIPA を含む α -

MEM(-)で30分間培養後、40 μ M の L17E、200 μ g/ml の Dex10-Alexa、および 100 μ M の EIPA を含む MEM(-)で60分間培養した。それぞれ PBS(-)で二回洗浄後、Hoechst 33342 (10 μ g/ml、5 min) 処理により核を染色し、デキストランの細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察した。

その他の阻害剤に関しては、各阻害剤 [Cytochalasin D (CytoD、5 μ M)、5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA、100 μ M)、wortmannin (wort、500 nM)] を含む α -MEM(-)で30分間培養後、40 μ M の L17E、200 μ g/ml の Dex10-Alexa、および各阻害剤を含む α -MEM(-)に交換し、5分間培養した。それぞれ PBS(-)で二回洗浄後、Hoechst 33342 (10 μ g/ml、5 min) 処理により核を染色し、デキストランの細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察した。

Cre/loxP 組換え実験

loxP-DsRed-loxP-EGFP-N1 プラスミド (loxP-レポータープラスミド) の作製には、pMSCV-loxp-dsRed-loxp-eGFP-Puro-WPRE (plasmid 32702、Addgene) から loxP-DsRed-loxP 配列の DNA 断片を増幅したものを、EGFP-N1 (Clontech) の *SacI* と *EcoRI* サイトへサブクローニングして目的のものを得た。プライマーとして forward: 5' -GCGGCGCGAGCTCACTAGTCCAGTGTGGTGG-3' と reverse: 5' -GGTGGCGTAGTCGAATTCGTTAACCTCGAGAG-3' のオリゴ DNA を用いた。

Cre-His6-pET42b(+)プラスミドの作製には、pCAG-Cre (plasmid 13775、Addgene) から Cre 配列の DNA 断片を増幅したものを、pET42(b) (Novagen) の *NdeI* と *EcoRI* サイトへサブクローニングして目的のものを得た。プライマーとして forward: 5' -GCCGGGCGCCCATATGGCCAATTTACTGACCGTACACC-3' と reverse: 5' -CGGCGCCGCGCAATTCGTTCAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTG-3' のオリゴ DNA を用いた。

作製した Cre-His6-pET42b(+)プラスミドを用いて BL21 (DE3) 株大腸菌を塩化カルシウム法で形質転換した後、1 mM isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 存在下で 18 $^{\circ}$ C で 12 時間培養した。回収した細胞ペレットを、溶解バッファー

(10 mM Tris、100 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、10 mM imidazole、pH 7.4) で懸濁した。細胞を超音波により破碎し、超遠心 (18,000 r.p.m、30 min) 後に得た可溶性画分を、HisTrap FF カラム (GE Healthcare) に加えた。カラムを 10 mM Tris、100 mM NaH₂PO₄、300 mM NaCl、20 mM imidazole、pH 7.4 で洗浄し、タンパク質を 20-250 mM imidazole の濃度勾配をかけて溶出した。50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) 500 mM NaCl 含有 (pH 7.4) で平衡化した PD-10 脱塩カラム (GE healthcare) を用いてバッファー交換を行った。

HeLa 細胞を 60 mm ディッシュ (Iwaki) に播種し、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞が 90%コンフルエントの状態では loxP レポータープラスミドを Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて導入し、24 時間後、35 mm ガラスボトムディッシュに播種し、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、 α -MEM(-)で 2 回洗浄後、40 μ M のペプチドと 5 μ M の Cre-His6 タンパク質を含む α -MEM(-) (200 μ l) を投与した。37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間培養後、 α -MEM(+)で 2 回洗浄し、さらに 24 時間培養した。 α -MEM(+) で 2 回洗浄した後、新しい培地を添加して、共焦点顕微鏡により細胞内の DsRed と EGFP の発現を観察した。

免疫グロブリン G の蛍光標識と細胞内局在観察

ヒト血清由来の免疫グロブリン G (IgG) (Wako) の PBS(-)溶液 (9.4 mg/ml、100 μ l) に 1 M の NaHCO₃ と、dimethylsulfoxide (DMSO) に溶解した Alexa Fluor 488 5-sulfodichlorophenol ester (Molecular Probes) (10 mg/ml、10 μ l) を添加し、全量 500 μ l となるよう PBS(-)を加えて室温で 1 時間攪拌した。反応溶液を、あらかじめ PBS(-)で平衡化した PD-10 脱塩カラムを用いたサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。精製した溶液を、Vivaspin 10,000 MWCO (GE Healthcare) を用いて限外ろ過により濃縮した。抗体の濃度は、280 nm の紫外吸光度から算出した (モル吸光係数 21×10^5)⁷⁴。

35 mm グラスボトムディッシュに播種し、コンフルエントの状態まで培養した HeLa 細胞に、40 μ M のペプチドと 1 mg/ml の蛍光標識 IgG を含む α -MEM(-) を投与し、37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間培養後、 α -MEM(+) で 2 回洗浄し、さらに 30 分間 α -MEM(+) 中で培養した後に IgG の細胞内局在を共焦点顕微鏡で観察した。

生細胞に導入された抗 His6 抗体による膜局在 DsRed-His6 タンパク質の認識

DsRed-His6-pCI と mem-DsRed-His6-pCI の作製

まず、*XhoI* と *XmaI* サイトを含む His6 配列の DNA 断片を、プライマー (forward: 5' -TCGAGGACACCATCACCATCATCACTAGC-3' と reverse: 5'-CCGGGCTAGTGATGATGGTGATGGTGTC-3') をアニーリングすることで得た。

これを pDsRed-Monomer-C1 (Clontech) にサブクローニングした。ここから、DsRed-His6 配列の DNA 断片を増幅し、pCI (Promega) の *EcoRI* と *XmaI* サイトにサブクローニングし、DsRed-His6-pCI を得た。さらに、*NheI* と *EcoRI* サイトを含む、翻訳後のパルミトイル化により膜に挿入される neuromodulin の N 末端アミノ酸配列 (mem、LCCMRRTKQVEKNDEDQKI) を、プライマー (forward: 5'

CTAGCATGCTGTGCTGTATGAGAAGAACCAAACAGGTTGAAAAGAATGATGAGGACCAAAGATCG-3' と reverse: 5' -

AATTCGATCTTTTGGTCCTCATCATTCTTTTCAACCTGTTTGGTTCTTCTCATAACAGCACAGCATG-3') をアニーリングすることで得た。これを、*NheI/EcoRI* で切断した DsRed-His6-pCI に挿入することによって mem-DsRed-His6-pCI を得た。

HeLa 細胞を 35 mm グラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞が 90%コンフルエントの状態、DsRed-His6-pCI と mem-DsRed-His6-pCI を Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて導入し、46 時間後、500 μ g/ml の anti-6x His tag antibody (FITC) (ab1206、Abcam) と 40 μ M の L17 を含む α -MEM(-) 中で 1 時間処理した。細胞を洗浄後、 α -MEM(+) 中で 30

分間培養し、FITC 標識された抗体と DsRed の局在を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。

生細胞に導入された抗グルココルチコイド受容体 (GR) 抗体による転写抑制

HeLa 細胞を 24 ウェルマイクロプレート (Iwaki) に播種し、CO₂ インキュベーター内で培養した。培地は、10% charcoal stripped fetal bovine serum (Wako) を添加した、フェノールレッドを含まない D-MEM (Wako) を用いた。細胞が 90% コンフルエントの状態、PBS(-) で 2 回洗浄後、300 µg/ml の anti-glucocorticoid receptor antibody [BuGR2] (Invitrogen) と 40 µM の L17E を含む PBS(+) (200 µl) を投与した。37°C、5% CO₂ 条件下で 1 時間培養後、PBS(-) で 2 回洗浄し、100 nM のデキサメタゾン (TCI) を含むフェノールレッドを含まない D-MEM (Wako) (200 µl) 中で 1 時間培養した。細胞を洗浄後、さらに 2 時間インキュベーションし、PBS(-) で 2 回洗浄後、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて細胞を溶解し、全 RNA を抽出した。得られた全 RNA を鋳型に PrimeScript RT reagent kit (Takara) を用いて cDNA を合成した。PowerUp SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いた 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) による定量 PCR により、活性化 GR により誘導される MT1E 遺伝子の相対転写量を測定した。ハウスキーピング遺伝子として GAPDH を用いた。MT1E 遺伝子のプライマーは Qiagen から購入し、GAPDH のプライマーは forward 5' - CTGCACCACCAACTGCTTAG -3'、reverse 5' - TTCAGCTCAGGGATGACCTT -3' の合成オリゴ DNA を購入した。

単層リポソーム (large unilamellar vesicle (LUV)) の調製

リン脂質としては、1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) (NOF) と 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoglycerol, sodium salt (POPG-Na) (NOF) を用いた。中性の膜として 100% POPC の LUV、および負に帯電した膜として POPC/POPG (75:25 mol%) の LUVs を用いた。それぞれのリン脂質組成のクロロホルム溶液を調製し、ナス型フラスコとロータリーエバポレータを用

いてフラスコの底面に脂質の薄膜を形成させた。溶出活性試験には、真空乾燥の
のち、蛍光色素 ANTS (=8-aminonaphthalene-1,2,3-trisulfonic acid) とその消光剤
DPX (=p-xylene-bis(pyridinium) bromide) を含むバッファー (12.5 mM ANTS、45.0
mM DPX、10mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES)、70 mM NaCl (pH
7.4 ないし 5.0) を加え水和させたものを用いた。脂質懸濁液を回収して凍結融
解を5回繰り返した後、Liposofast extrusion system (Avestin) を用いて、100 nm
の直径の孔の polycarbonate filters (Avanti Polar Lipids) 2枚に11回通過させ、均
一な直径のリポソームを調製した。CD測定には、脂質薄膜を真空乾燥したのち、
MES バッファー (10 mM MES、150 mM NaCl 含有 (pH 7.4 ないし pH 5.0)) を加
え水和させたものを用いた。脂質懸濁液を 100 nm の直径の孔の polycarbonate
filters 2枚に11回通過させ、均一な直径のリポソームを調製した。調製後の LUV
濃度は、LabAssay リン脂質キット (Wako) を用いて、コリンオキシダーゼ・DAOS
法⁷⁵により脂質の濃度として求めた。

蛍光色素内包 LUV からの溶出活性測定

ペプチドの膜傷害活性は、ANTS/DPX 内包 LUV から漏出した蛍光色素 ANTS
の蛍光強度を測定することで評価した。ペプチドを 134 μ M の LUV と共に MES
バッファー中で 37 °C 条件下で1時間インキュベーションした。波長 535 nm の
蛍光強度 (F_{obs}) を、Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (Perkin Elmer) (励起
波長 485 nm) で測定した。界面活性剤 (TritonX-100、最終濃度 0.1% (v/v)) を
加えた時の蛍光強度 (F_{max}) を 100%として、以下の式でペプチドの溶出活性を
評価した。(F₀はペプチドを加えないときの蛍光強度を示す。)

$$\% \text{ANTS released} = 100 \times [(F_{\text{max}} - F_0) / (F_{\text{obs}} - F_0)]$$

円二色性 (circular dichroism、CD) スペクトルの測定

CD スペクトルは、JASCO J-820 spectropolarimeter により、光路長 1 mm のセル
を用いて 24 °C 条件下で測定した。2.67 mM リポソーム存在において、濃度 40

μM (ペプチド: 脂質モル比 (P/L) = 1.5×10^3) のペプチドのスペクトルを測定した。100 nm/min の速度でスキャンを 6 回行い、その平均を Figure に示している。

222 nm におけるモル楕円率 [θ_{222}] から、以下の式でヘリックス含有量 [f_H] を算出した⁴⁶。

$$f_H = (\theta_{222} - \theta_C) / (\theta_H - \theta_C)$$

$$\theta_C = 2220 - 53T$$

$$\theta_H = (-44000 + 250T)(1 - 3/N_r)$$

ここで、 T は摂氏温度、 N_r はペプチド鎖長である。

10 kDa デキストランの細胞内移行量測定

HeLa 細胞を 24 well マイクロプレート (Iwaki) に播種し、CO₂ インキュベーター内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、PBS(-) で 2 回洗浄後、20 μM 、または 40 μM のペプチドと 100 $\mu\text{g/ml}$ の Dex10-Alexa を含む α -MEM(-) (200 μl) を投与し、60 分間培養した。PBS(-) で 2 回洗浄し、0.01% のトリプシンで 10 分間処理してプレートから剥離した細胞をチューブに回収した。これを遠心し (800 \times g、5 min)、ペレット状になった細胞を PBS(-) で懸濁した。これを 2 回繰り返して細胞を洗浄した。得られた細胞サンプルを最終的に PBS(-) に希釈して Attune NxT (Applied Biosystems) により各サンプル当たり 1 万個の細胞の蛍光量を測定した。

第二章の実験

細胞培養

ヒト子宮頸癌由来細胞 (HeLa 細胞) (European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)、93021013) は 10% (v/v) 非働化ウシ血清 (Invitrogen) を含むアルファ最小必須培地 (α -MEM(+)) 中、37°C、5% CO₂ 条件下で培養し、3-4 日ごとに継代を行った。

10 kDa デキストランの細胞内局在観察

パルスチェイス実験

HeLa 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し (2.0×10^5 cells)、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、PBS(-) で 2 回洗浄後、40 μ M の L17E と 200 μ g/ml の Alexa Fluor 488 で標識したデキストラン (10 kDa) (Dextran, Alexa Fluor 488; 10,000 MW, Molecular Probes) (Dex10-Alexa) を含む α -MEM(-) (200 μ l) を投与した。37°C、5% CO₂ 条件下で 5 分培養後、PBS(-) で 2 回洗浄し、さらに 5、15、30、60 分培養した。細胞を洗浄後、デキストランの細胞内局在を共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus) を用いて観察した。

エンドサイトーシス阻害実験

10 mM NaN₃、20mM deoxy-D-glucose 含有 PBS(+) で 15 分間培養後、培地を 40 μ M の L17E と 200 μ g/ml の Dex10-Alexa を含む、10 mM NaN₃、20mM deoxy-D-glucose 含有 PBS(+) に交換し、5 分間培養した。低温 (4°C) での実験においては、細胞を PBS(-) で 2 回洗浄したのち、 α -MEM(-) を加え、30 分間 4°C に置いた。その後培地を 40 μ M の L17E と 200 μ g/ml の Dex10-Alexa を含む α -MEM(-) に交換し、さらに 5 分間 4°C 下で培養した。

その他の阻害剤に関しては、各阻害剤 [Cytochalasin D (CytoD, 5 μ M)、5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA, 100 μ M)、wortmannin (wort, 500 nM)] を含む α -MEM(-) で 30 分間培養後、40 μ M の L17E、200 μ g/ml の Dex10-Alexa、および各阻害剤を含む α -MEM(-) に交換し、5 分間培養した。それぞれ PBS(-) で二回

洗浄後、Hoechst 33342 (10 µg/ml、5 min) 処理により核を染色し、デキストランの細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察した。

乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出試験

HeLa 細胞を 96 well マイクロプレート (Iwaki) に播種し (1.0×10^4 cells)、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、PBS(-)で2回洗浄後、40 µM の L17E を含む α -MEM(-)を投与した。37°C、5% CO₂ 条件下で5ないし60分培養後、その培養液を採取し、検出試薬 (LDH-Cytotoxic Test Wako) と混合した。室温にて30分間インキュベートしたのち、吸光度 (A492 nm) を測定した。培地中に放出された LDH 量は、界面活性剤 (Triton X-100、0.2% (w/v)) を細胞に添加したときの LDH 放出量を 100%として算出した。

Rab5 タンパク質のドミナントネガティブ実験

mCherry-Rab5 (WT) プラスミドの作製には、EGFP-Rab5 から Rab5 配列の DNA 断片を増幅したもの (プライマーとして、forward: 5' - AGATCTCGAGCTCAAATGGCTAGTCGAGGCGCAAC -3' と reverse: 5' - TCCGGTGGATCCCGGGTACCGTCGACTGCAGTTAGTTACTAC -3' を用いた) と、直線化した pmCherry-C1 vector (Clontech) (プライマーとして、forward: 5' - TTGAGCTCGAGATCTGAGTCCGG -3' と reverse: 5' - CCGGGATCCACCGGATCTAGA -3' を用いた) を Gibson assembly System (New England Biolabs) を用いて接合することで目的のものを得た。

変異型 Rab5 (S34N、Q79L) は、mCherry-Rab5 (WT) プラスミドにポイントミューテーションを施すことで得た。変異箇所を含むプライマーで5'側と3'側をそれぞれ増幅して得た2本のフラグメントを、再度PCRすることで1本のフラグメントにしたのち、変異型 Rab5 配列を、mCherry-Rab5 (WT) の *XhoI* と *BamHI* サイトへサブクローニングした。Rab5 (S34N) フラグメントを得るためのプライマーとして、forward: 5' - GTTGGACATCACCTCCCACAACGAG -3'

(mCherry-C1-F) と reverse: 5' - GCACTAGGCTATTTTTGCCAACAG -3'、forward: 5' - TTGGCAAAAATAGCCTAGTGC -3' と reverse: 5' - CCTCTACAAATGTGGTATGG -3' (SV40pA-R) を用いた。Rab5 (Q79L) フラグメントを得るためのプライマーとして、forward: mCherry-C1-F と reverse: 5' - TGGTATCGTTCAAGACCAGCTGT -3'、forward: 5' - ACAGCTGGTCTTGAACGATACCA -3' と reverse: SV40pA-R を用いた。それぞれについて得られた 2 本のフラグメントを forward: mCherry-C1-F と reverse: SV40pA-R のプライマーを用いて増幅し、1 本のフラグメントを得た。

ラップリング観察実験

HeLa 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し (1.5×10^5 cells)、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞が 90%コンフルエントの状態、Lifeact-mCherry を Lipofectamine LTX (Invitrogen) を用いて導入し、24 時間後、PBS(-) で 2 回洗浄し、 α -MEM(-) (100 μ l) で細胞を浸し、MI-IBC マイクロチャンバ (37°C、5% CO₂) をセットした共焦点レーザー顕微鏡のステージで 10 分間静置してから 20 秒ごとの経時的な画像取得を始めた。ペプチド添加前の一連の経時観察画像を取得したのち、60 μ M の L17E を含む α -MEM(-) (50 μ l) を添加し、直ちに経時的な画像取得を開始した。

70 kDa デキストランの細胞内移行量測定

HeLa 細胞を 24 well マイクロプレート (Iwaki) に播種し (8.0×10^4 cells)、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態、培地を除き、PBS(-) で 2 回洗浄後、20 μ M または 40 μ M のペプチドと 1 mg/ml の tetramethylrhodamine (TMR)-labeled dextran (70 kDa) (Invitrogen) (Dex70-TMR) を含む α -MEM(-) (200 μ l) を投与し、5 分間培養した。PBS(-) で 2 回洗浄し、0.01% のトリプシンで 10 分間処理してプレートから剥離した細胞をチューブに回収した。これを遠心し (800 \times g、5 min)、ペレット状になった細胞を PBS(-) で懸濁した。これを 2 回繰り返して細胞を洗浄した。得られた細胞サンプルを

最終的に PBS(-)に希釈して、各サンプル当たり 1 万個の細胞の蛍光量を Attune NxT (Applied Biosystems) により測定した。

70 kDa デキストランの細胞内局在観察

HeLa 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し (2.0×10^5 cells)、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、PBS(-)で2回洗浄後、40 μ M の L17E と 1 mg/ml の Dex70-TMR を含む α -MEM(-) (200 μ l) を投与した。37°C、5% CO₂ 条件下で 5 分培養し、細胞を洗浄後、デキストランの細胞内局在を共焦点顕微鏡 (FV1000、Olympus) を用いて観察した。

細胞表面の脂質露出量の測定

HeLa 細胞を 24 well マイクロプレート (Iwaki) に播種し (8.0×10^4 cells)、CO₂ インキュベータ内で培養した。細胞がコンフルエントの状態では培地を除き、PBS(-)で2回洗浄後、40 μ M の L17E を含む PBS(+)を投与し、5 分間培養した。阻害剤処理細胞については、10 mM NaN₃、20mM deoxy-D-glucose 含有 PBS(+) で 30 分間培養後、培地を 40 μ M の L17E を含む 10 mM NaN₃、20mM deoxy-D-glucose 含有 PBS(+) に交換し、5 分間培養した。PBS(-)で2回洗浄後、0.01%のトリプシンで10分間処理してプレートから剥離した細胞をチューブに回収した。これを遠心し (800 \times g、5 min)、ペレット状になった細胞を PBS(-)で懸濁した。これを再度繰り返して細胞を洗浄した。細胞表面の PIP₂ の標識については、50 μ l の PBS (1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1% NaN₃) の細胞懸濁液に、10 μ l の抗 PIP₂ 抗体 (abcam) (1/10 希釈) を含んだ PBS (1% BSA、0.1% NaN₃) を加えた。30 分間室温で静置したのち、遠心し (800 \times g、5 min)、一度細胞を PBS(-)で洗浄した。二次抗体 (蛍光標識抗マウス IgM 抗体) も同様に処理し、得られた細胞サンプルを最終的に PBS(-)に希釈して、各サンプル当たり 1 万個の細胞の蛍光量を Attune NxT により測定した。細胞表面の PS の標識については、100 μ l の細胞懸濁液に Annexin V 試薬 (Invitrogen) を添加して 15 分間遮光下室温で

反応させた。染色後、Annexin Binding Buffer で希釈した細胞サンプルについて、各サンプル当たり 1 万個の細胞の蛍光量を Attune NxT により測定した。

引用文献

1. Elvin, J. G.; Couston, R. G.; van der Walle, C. F. Therapeutic antibodies: market considerations, disease targets and bioprocessing. *Int. J. Pharm.* **2013**, *440*, 83-98.
2. Beck, A.; Goetsch, L.; Dumontet, C.; Corvaia, N. Strategies and challenges for the next generation of antibody-drug conjugates. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 315-337.
3. Yin, H.; Kauffman, K. J.; Anderson, D. G. Delivery technologies for genome editing. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2017**, *16*, 387-399.
4. Dinca, A.; Chien, W. M.; Chin, M. T. Intracellular delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 263.
5. Vives, E.; Brodin, P.; Lebleu, B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16010-16017.
6. Derossi, D.; Joliot, A. H.; Chassaing, G.; Prochiantz, A. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 10444-10450.
7. Takeuchi, T.; Kosuge, M.; Tadokoro, A.; Sugiura, Y.; Nishi, M.; Kawata, M.; Sakai, N.; Matile, S.; Futaki, S. Direct and rapid cytosolic delivery using cell-penetrating peptides mediated by pyrenebutyrate. *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 299-303.
8. Takeuchi, T.; Futaki, S. Current understanding of direct translocation of arginine-rich cell-penetrating peptides and its internalization mechanisms. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2016**, *64*, 1431-1437.
9. Inomata, K.; Ohno, A.; Tochio, H.; Isogai, S.; Tenno, T.; Nakase, I.; Takeuchi, T.; Futaki, S.; Ito, Y.; Hiroaki, H.; Shirakawa, M. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature* **2009**, *458*, 106-109.
10. Milletti, F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discovery Today* **2012**, *17*, 850-860.

11. Wu, X.; Gehring, W. Cellular uptake of the Antennapedia homeodomain polypeptide by macropinocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *443*, 1136-1140.
12. Smith, B. A.; Daniels, D. S.; Coplin, A. E.; Jordan, G. E.; McGregor, L. M.; Schepartz, A. Minimally cationic cell-permeable miniature proteins via alpha-helical arginine display. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2948-2949.
13. Thompson, D. B.; Villasenor, R.; Dorr, B. M.; Zerial, M.; Liu, D. R. Cellular uptake mechanisms and endosomal trafficking of supercharged proteins. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 831-843.
14. Fawell, S.; Seery, J.; Daikh, Y.; Moore, C.; Chen, L. L.; Pepinsky, B.; Barsoum, J. Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1994**, *91*, 664-668.
15. Torchilin, V. P. Tat peptide-mediated intracellular delivery of pharmaceutical nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *60*, 548-558.
16. Cronican, J. J.; Thompson, D. B.; Beier, K. T.; McNaughton, B. R.; Cepko, C. L.; Liu, D. R. Potent delivery of functional proteins into Mammalian cells in vitro and in vivo using a supercharged protein. *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 747-752.
17. Cronican, J. J.; Beier, K. T.; Davis, T. N.; Tseng, J. C.; Li, W.; Thompson, D. B.; Shih, A. F.; May, E. M.; Cepko, C. L.; Kung, A. L.; Zhou, Q.; Liu, D. R. A class of human proteins that deliver functional proteins into mammalian cells in vitro and in vivo. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 833-838.
18. Varkouhi, A. K.; Scholte, M.; Storm, G.; Haisma, H. J. Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* **2011**, *151*, 220-228.
19. Raagel, H.; Saalik, P.; Pooga, M. Peptide-mediated protein delivery-which pathways are penetrable? *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1798*, 2240-2248.
20. Li, W.; Nicol, F.; Szoka, F. C. Jr. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 967-985.

21. Kobayashi, S.; Nakase, I.; Kawabata, N.; Yu, H. H.; Pujals, S.; Imanishi, M.; Giralt, E.; Futaki, S. Cytosolic targeting of macromolecules using a pH-dependent fusogenic peptide in combination with cationic liposomes. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20*, 953-959.
22. Kyriakides, T. R.; Cheung, C. Y.; Murthy, N.; Bornstein, P.; Stayton, P. S.; Hoffman, A. S. pH-sensitive polymers that enhance intracellular drug delivery in vivo. *J. Control. Release* **2002**, *78*, 295-303.
23. Meyer, M.; Philipp, A.; Oskuee, R.; Schmidt, C.; Wagner, E. Breathing life into polycations: functionalization with pH-responsive endosomolytic peptides and polyethylene glycol enables siRNA delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 3272-3273.
24. Boussif, O.; Lezoualc'h, F.; Zanta, M. A.; Mergny, M. D.; Scherman, D.; Demeneix, B.; Behr, J. P. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 7297-7301.
25. Motion, J. P.; Nguyen, J.; Szoka, F. C. Phosphatase-triggered fusogenic liposomes for cytoplasmic delivery of cell-impermeable compounds. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2012**, *51*, 9047-9051.
26. Mellman, I.; Fuchs, R.; Helenius, A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 663-700.
27. Murata, M.; Takahashi, S.; Kagiwada, S.; Suzuki, A.; Ohnishi, S. pH-dependent membrane fusion and vesiculation of phospholipid large unilamellar vesicles induced by amphiphilic anionic and cationic peptides. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1986-1992.
28. Murata, M.; Sugahara, Y.; Takahashi, S.; Ohnishi, S. pH-dependent membrane fusion activity of a synthetic twenty amino acid peptide with the same sequence as that of the hydrophobic segment of influenza virus hemagglutinin. *J. Biochem.* **1987**, *102*, 957-962.

29. Plank, C.; Oberhauser, B.; Mechtler, K.; Koch, C.; Wagner, E. The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 12918-12924.
30. Lee, Y. J.; Erazo-Oliveras, A.; Pellois, J. P. Delivery of macromolecules into live cells by simple co-incubation with a peptide. *Chembiochem* **2010**, *11*, 325-330.
31. Lee, Y. J.; Johnson, G.; Pellois, J. P. Modeling of the endosomolytic activity of HA2-TAT peptides with red blood cells and ghosts. *Biochemistry* **2010**, *49*, 7854-7866.
32. Erazo-Oliveras, A.; Muthukrishnan, N.; Baker, R.; Wang, T. Y.; Pellois, J. P. Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges. *Pharmaceuticals (Basel)* **2012**, *5*, 1177-1209.
33. Parente, R. A.; Nadasdi, L.; Subbarao, N. K.; Szoka, F. C. Jr. Association of a pH-sensitive peptide with membrane vesicles: role of amino acid sequence. *Biochemistry* **1990**, *29*, 8713-8719.
34. Kakudo, T.; Chaki, S.; Futaki, S.; Nakase, I.; Akaji, K.; Kawakami, T.; Maruyama, K.; Kamiya, H.; Harashima, H. Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry* **2004**, *43*, 5618-5628.
35. Chou, L. Y.; Ming, K.; Chan, W. C. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 233-245.
36. Smith, S. A.; Selby, L. I.; Johnston, A. P. R.; Such, G. K. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Towards More Efficient Cellular Delivery. *Bioconjug. Chem.* **2018**.
37. Sitaram, N.; Nagaraj, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: structural and charge requirements for activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 29-54.
38. Sato, H.; Feix, J. B. Peptide-membrane interactions and mechanisms of membrane destruction by amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **2006**, *1758*, 1245-1256.

39. Yin, L. M.; Edwards, M. A.; Li, J.; Yip, C. M.; Deber, C. M. Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide-membrane interactions. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 7738-7745.
40. Dathe, M.; Schumann, M.; Wieprecht, T.; Winkler, A.; Beyermann, M.; Krause, E.; Matsuzaki, K.; Murase, O.; Bienert, M. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12612-12622.
41. Dathe, M.; Wieprecht, T. Structural features of helical antimicrobial peptides: their potential to modulate activity on model membranes and biological cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 71-87.
42. Yan, L.; Adams, M. E. Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2059-2066.
43. Araki, K.; Araki, M.; Miyazaki, J.; Vassalli, P. Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1995**, *92*, 160-164.
44. Ellens, H.; Bentz, J.; Szoka, F. C. pH-induced destabilization of phosphatidylethanolamine-containing liposomes: role of bilayer contact. *Biochemistry* **1984**, *23*, 1532-1538.
45. van Meer, G.; Voelker, D. R.; Feigenson, G. W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112-124.
46. Rohl, C. A.; Baldwin, R. L. Comparison of NH exchange and circular dichroism as techniques for measuring the parameters of the helix-coil transition in peptides. *Biochemistry* **1997**, *36*, 8435-8442.
47. Thurlkill, R. L.; Grimsley, G. R.; Scholtz, J. M.; Pace, C. N. pK values of the ionizable groups of proteins. *Protein Sci.* **2006**, *15*, 1214-1218.
48. Erazo-Oliveras, A.; Najjar, K.; Truong, D.; Wang, T. Y.; Brock, D. J.; Prater, A. R.; Pellois, J. P. The late endosome and its lipid BMP act as gateways for efficient cytosolic access of the delivery agent dTAT and its macromolecular cargos. *Cell. Chem. Biol.* **2016**, *23*, 598-607.

49. Gorlich, D.; Kutay, U. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1999**, *15*, 607-660.
50. 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. Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol. Ther.* **2004**, *10*, 1011-1022.
51. Clarke, B. L.; Weigel, P. H. Recycling of the asialoglycoprotein receptor in isolated rat hepatocytes. ATP depletion blocks receptor recycling but not a single round of endocytosis. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 128-133.
52. Appelbaum, J. S.; LaRoche, J. R.; Smith, B. A.; Balkin, D. M.; Holub, J. M.; Schepartz, A. Arginine topology controls escape of minimally cationic proteins from early endosomes to the cytoplasm. *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 819-830.
53. Rink, J.; Ghigo, E.; Kalaidzidis, Y.; Zerial, M. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* **2005**, *122*, 735-749.
54. Swanson, J. A.; Watts, C. Macropinocytosis. *Trends Cell Biol.* **1995**, *5*, 424-428.
55. Riedl, J.; Crevenna, A. H.; Kessenbrock, K.; Yu, J. H.; Neukirchen, D.; Bista, M.; Bradke, F.; Jenne, D.; Holak, T. A.; Werb, Z.; Sixt, M.; Wedlich-Soldner, R. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* **2008**, *5*, 605-607.
56. Araki, N.; Johnson, M. T.; Swanson, J. A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J. Cell Biol.* **1996**, *135*, 1249-1260.
57. El-Sayed, A.; Harashima, H. Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 1118-1130.
58. West, M. A.; Bretscher, M. S.; Watts, C. Distinct endocytotic pathways in epidermal growth factor-stimulated human carcinoma A431 cells. *J. Cell Biol.* **1989**, *109*, 2731-2739.
59. Hirose, H.; Takeuchi, T.; Osakada, H.; Pujals, S.; Katayama, S.; Nakase, I.; Kobayashi, S.; Haraguchi, T.; Futaki, S. Transient focal membrane deformation induced by

- arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells. *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 984-993.
60. Metkar, S. S.; Wang, B.; Catalan, E.; Anderluh, G.; Gilbert, R. J.; Pardo, J.; Froelich, C. J. Perforin rapidly induces plasma membrane phospholipid flip-flop. *PLoS One* **2011**, *6*, e24286.
61. Fattal, E.; Nir, S.; Parente, R. A.; Szoka, F. C. Jr. Pore-forming peptides induce rapid phospholipid flip-flop in membranes. *Biochemistry* **1994**, *33*, 6721-6731.
62. Anglin, T. C.; Brown, K. L.; Conboy, J. C. Phospholipid flip-flop modulated by transmembrane peptides WALP and melittin. *J. Struct. Biol.* **2009**, *168*, 37-52.
63. Maekawa, M.; Terasaka, S.; Mochizuki, Y.; Kawai, K.; Ikeda, Y.; Araki, N.; Skolnik, E. Y.; Taguchi, T.; Arai, H. Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, E978-87.
64. Yoshida, S.; Hoppe, A. D.; Araki, N.; Swanson, J. A. Sequential signaling in plasma-membrane domains during macropinosome formation in macrophages. *J. Cell. Sci.* **2009**, *122*, 3250-3261.
65. Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H.; Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* **1995**, *184*, 39-51.
66. Gulshan, K.; Brubaker, G.; Conger, H.; Wang, S.; Zhang, R.; Hazen, S. L.; Smith, J. D. PI(4,5)P₂ is translocated by ABCA1 to the cell surface where it mediates apolipoprotein A1 binding and nascent HDL assembly. *Circ. Res.* **2016**, *119*, 827-838.
67. Koivusalo, M.; Welch, C.; Hayashi, H.; Scott, C. C.; Kim, M.; Alexander, T.; Touret, N.; Hahn, K. M.; Grinstein, S. Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **2010**, *188*, 547-563.

68. Desai, A. S.; Hunter, M. R.; Kapustin, A. N. Using macropinocytosis for intracellular delivery of therapeutic nucleic acids to tumour cells. *Phil. Trans. R. Soc. B.* **2019**, *374*, 20180156.
69. Medina, S. H.; Miller, S. E.; Keim, A. I.; Gorka, A. P.; Schnermann, M. J.; Schneider, J. P. An intrinsically disordered peptide facilitates non-endosomal cell entry. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2016**, *55*, 3369-3372.
70. Derivery, E.; Bartolami, E.; Matile, S.; Gonzalez-Gaitan, M. Efficient delivery of quantum dots into the cytosol of cells using cell-penetrating poly(disulfide)s. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 10172-10175.
71. Mix, K. A.; Lomax, J. E.; Raines, R. T. Cytosolic delivery of proteins by bioreversible esterification. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 14396-14398.
72. Chyan, W.; Kilgore, H. R.; Raines, R. T. Cytosolic uptake of large monofunctionalized dextrans. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 1942-1949.
73. Meng, X.; Li, T.; Zhao, Y.; Wu, C. CXC-mediated cellular uptake of miniproteins: forsaking "Arginine Magic". *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 3078-3086.
74. Absolom, D. R. Basic methods for the study of phagocytosis. *Methods Enzymol.* **1986**, *132*, 95-180.
75. Takayama, M.; Itoh, S.; Nagasaki, T.; Tanimizu, I. A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta* **1977**, *79*, 93-98.

謝辞

終わりに臨み、終始ご懇篤なるご指導ならびにご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。

数々のご指導、ご助言をいただきました今西 未来 博士（京都大学化学研究所講師）、河野 健一 博士（京都大学化学研究所 助教）、武内 敏秀 博士（大阪大学大学院医学研究科寄付講座 講師）、中瀬 生彦 博士（大阪府立大学理学研究所 准教授）に深く感謝致します。

第二章のデータ解析に関してご指導、ご助言をいただきました中瀬（高谷）朋夏 准教授（武庫川女子大学薬学部）に深く感謝致します。研究に加えて、折に触れご助言やご激励をいただきました奥 彰彦 博士（アストラゼネカ株式会社）、川口 祥正 博士（塩野義製薬株式会社）、辻 将吾 博士（国立長寿医療研究センター）、村山 知 博士（警察庁）そして、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ご心より感謝致します。

また、本研究の一部は、日本学術振興会 DC1 の援助によるものであり、感謝致します。

最後に、私の研究活動を温かく見守り支えて下さった家族に、深く感謝申し上げます。