

両親媒性ペプチドによる細胞膜との  
相互作用を介した細胞機能制御

2019

益田 俊博



# 目次

序論	3
第一章	
膜張力の変化を介する細胞の運動と形態の制御	4
第1節 M2[45-62]により誘起されるラメリポディア形成	7
第2節 膜張力に対する M2[45-62]の影響	11
第3節 M2[45-62]の脂質膜との結合性の検討	13
第4節 M2[45-62]により誘起されるラメリポディア形成における FBP17 の寄与	16
第5節 M2[45-62]の機能増強を目指した変異体の検討	18
第6節 M2[45-62]および M2-R の細胞運動に対する影響	22
第7節 M2[45-62]が神経細胞形態に及ぼす影響	24
第一章の考察	27
第二章	
細胞膜曲率の誘起を介するエンドサイトーシス制御の試み	29
第1節 R6W3 の細胞膜変形活性	31
第2節 R6W3 のエンドサイトーシス誘起能	33
第3節 R6W3 の両親媒性構造の重要性	35
第二章の考察	39
総括	40
実験の部	41
引用文献	53
謝辞	59

略号表

Amp-YFP	amphiphysin-enhanced yellow fluorescent protein
ATP	adenosine triphosphate
BAR ドメイン	Bin, amphiphysin, Rvs ドメイン
Chol	cholesterol
Dex10-AF594	AlexaFluor 594 標識 10 kDa デキストラン
DMF	dimethylformamide
F-アクチン	filamentous actin
EGFP-FBP17	enhanced green fluorescent protein-FBP17
GUV	giant unilamellar vesicle
LUV	large unilamellar vesicle
mRFP-actin	monomeric red fluorescent protein-actin
NBD	nitrobenzoxadiazole
Nle	norleucine
POPC	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholine
POPG	1-palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphoglycerol
RP-HPLC	reverse-phase high-performance liquid chromatography
TRITC-R6W3	R6W3 の N 末端側に $\gamma$ -aminobutyric acid(GABA)を介して Tetramethylrhodamine を導入した蛍光標識ペプチド
WT	wild type

## 序論

細胞機能の制御にはリガンドと細胞膜受容体の結合によるシグナル伝達だけではなく、細胞膜の物理的な性質(物性)も重要な役割を担っていることが明らかになってきた[1,2]。しかしながら、細胞膜の物性に注目して細胞機能を制御しようとする試みに関する報告はほとんどない。そこで本研究では、細胞膜の物性(膜張力および膜曲率)を変化させることで細胞機能を制御する新規ツールの開発を目指した。新規ツールの候補として、細胞膜と相互作用することが期待される両親媒性ペプチドに注目した[3]。両親媒性ペプチドが細胞膜と相互作用することで細胞膜の物性を変化させ、物性の変化に応じた細胞機能に影響を与えると考えた。

本研究ではまず、インフルエンザウイルスのM2タンパク質に存在する両親媒性領域由来のペプチド M2[45-62]による膜張力の変化を介した細胞運動・細胞形態への影響を検討した(第一章)。次いで、ArgとTrpから構成される人工的に設計された両親媒性ペプチド R6W3 による膜曲率の誘導に伴うエンドサイトーシス誘起について調べた(第二章)。

## 第一章

### 膜張力の変化を介する細胞の運動と形態の制御

膜にかかる張力(膜張力)は、膜の断面において働く単位長さあたりの力で定義される[4,5]。細胞における膜張力は、脂質二重層にかかる in-plane membrane tension に加えて、細胞膜と細胞皮質(アクチン等が多く存在する細胞膜の裏打ち構造)の間の接着(membrane-to-cortex attachment)の寄与を加味したものとなる[1]。細胞の膜張力の測定方法としては、マイクロピペット吸引法、原子間力顕微鏡、光ピンセットなどがある[1,4]。マイクロピペット吸引法による細胞の膜張力測定は浮遊細胞にのみ適用可能であるため、接着細胞にも適用可能な原子間力顕微鏡や光ピンセットを用いた膜張力の測定が、細胞の膜張力測定方法として広く用いられている[4]。原子間力顕微鏡および光ピンセットは細胞から細長い管状構造を形成させることが可能であり、その管状構造を形成させるために必要な力( $F_{\text{tether}}$ )から、細胞の膜張力を求めることができる(膜張力 =  $F_{\text{tether}}/4R_t\pi$ )( $R_t$ : Radius of tether)[1,4]。

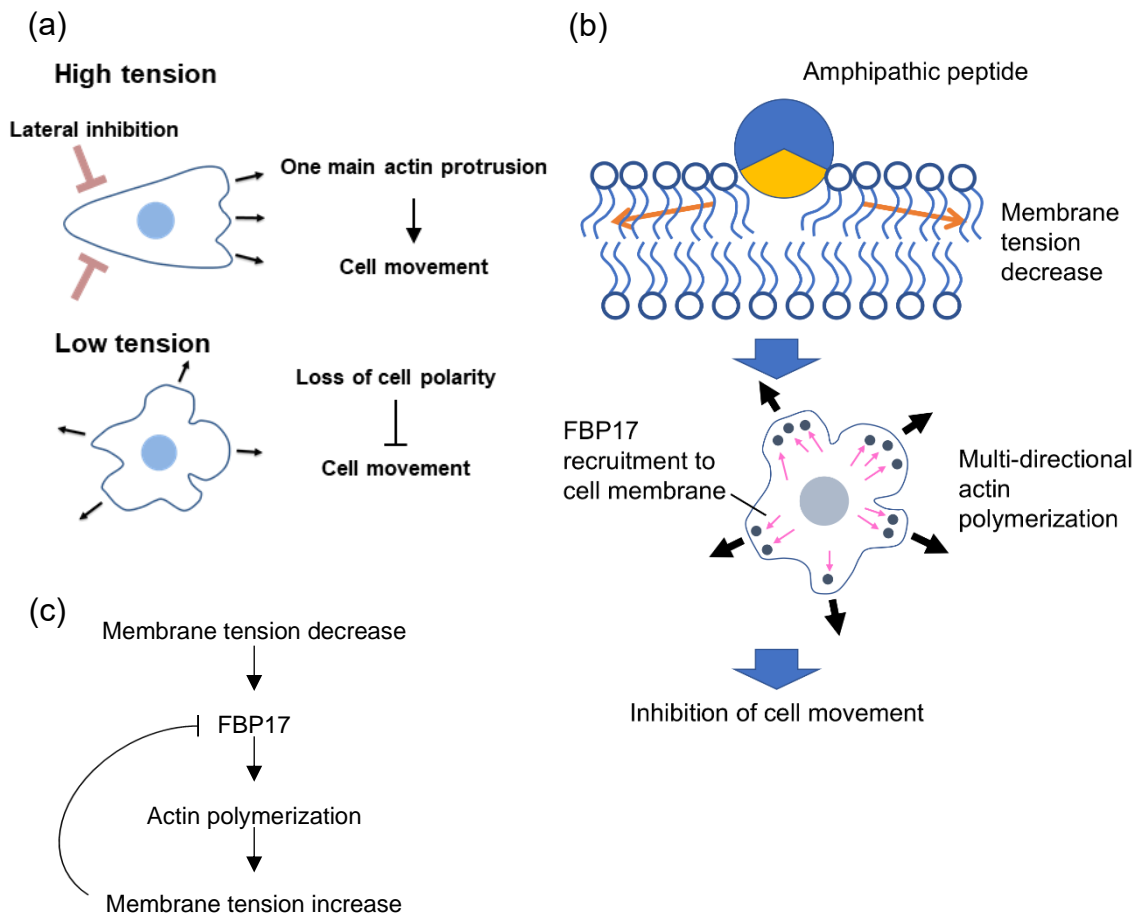
細胞の膜張力は、細胞が自身の細胞膜を変形させる際の障害となり、様々な細胞現象に関わることが明らかになってきた[1]。特に、細胞運動や細胞形態は、膜張力によって制御される例の一つである。細胞運動や細胞形態の適切な制御は、免疫細胞の異物に対する細胞移動、神経系形成時の神経突起の伸張などの様々な生命現象にとって不可欠である。そのため、これらを制御する機構の破綻は炎症反応や神経発達障害を引き起こすことから、細胞運動・細胞形態を制御するツールの開発は重要である。

膜張力による細胞運動や細胞形態の制御機構として、細胞極性の制御を介するものが知られている[6]。細胞膜の膜張力は細胞骨格タンパク質であるアクチンの重合に伴う細胞膜の進展を阻害し[6-9]、細胞極性に影響を与える[10-13]。すなわち、膜張力の低下は無作為な方向性のアクチン重合の活性化を引き起こし、運動性を低下させる。また、膜張力の増大は進行方向以外のアクチン重合の活性化を抑制し、細胞の運動性を亢進させる[11-13](Figure 1-1a)。

このように、膜張力が細胞運動や細胞形態の制御において重要な役割を果たすこ

とが明らかになってきた一方で、膜張力に注目してこれらを制御しようとする試みに関する報告はほとんどない。これまでにない膜張力という新たな観点からの細胞運動、細胞形態の制御法の開発は、これらの制御機構の破綻に伴う疾患に対して新規の有効な治療法の開発につながることも期待される。そこで本研究では、膜張力を変化させることで、細胞運動や細胞形態を制御する新規ツールの開発を目指した。

新規ツールの候補として、細胞内において膜変形活性を有するタンパク質に存在する両親媒性領域に注目した。両親媒性領域は、タンパク質が膜変形活性を示す際に膜に挿入されることが知られている。一方、デオキシコール酸などの両親媒性化合物は、膜に挿入されることによって膜張力を低下させることが報告されている[14]。そこで、両親媒性領域由来のペプチドを用いることによって、細胞膜への挿入を介して膜張力を低下させることができると考えた(Figure 1-1b)。これに関連して、F-BAR ドメインを有するタンパク質である FBP17 は、膜張力のセンサーとして機能し、膜張力の低下を感知することで細胞極性に影響を与えることが報告されている[10]。また、FBP17 は膜張力の低下を感知することによって膜近傍に移行して、アクチン重合を引き起こす(Figure 1-1c)。このことから、膜張力を低下させる両親媒性ペプチドは、膜張力のセンサータンパク質である FBP17 を介して無作為な方向性のアクチン重合を引き起こし、細胞形態に影響を与え、細胞運動を抑制するのではないかと考えた (Figure 1-1b)。



**Figure 1-1.** a, Tension in the plasma membrane as a master regulator of cell shape. Lateral protrusions are suppressed at high tension in favor of one main protrusion, pointing in the direction of migration, therefore increasing the efficiency of movement. A reduction in plasma membrane tension allows lamellipodia to form in multiple directions, reducing the polarity and movement of the cell. b, Working hypothesis of cell movement inhibition by amphipathic peptides. The amphipathic peptide is inserted into the membrane to expand the surface area of the plasma membrane, and thereby decreases membrane tension. The decrease in plasma membrane tension leads to lamellipodium formation in multiple directions, resulting in inhibition of cell movement via FBP17. c, Feedback regulation of plasma membrane tension by FBP17. FBP17 is recruited to the plasma membrane by sensing a reduction in membrane tension, thereby promoting actin polymerization. This leads to an increase in plasma membrane tension, which releases FBP17 from the plasma membrane and suppresses FBP17 from stimulating actin polymerization. Thus, FBP17 may play an important role in sensing and translating plasma membrane tension into cell movement and defining front-rear polarity in moving cells.



## 第1節:M2[45-62]により誘起されるラメリポディア形成

膜張力を変化させる候補ペプチドとして、膜変形活性を有するタンパク質の両親媒性領域から7種類を選択し、Fmoc固相合成法により合成した(Table 1-1)。選択した両親両親媒性領域は、いずれもタンパク質と細胞膜との相互作用において重要な役割を果たしていることが知られている[15-21]。これらの両親媒性領域由来のペプチドが細胞膜と相互作用することで膜張力を変化させることを期待した。ペプチドを合成する際に、配列中にメチオニンを含むペプチドに関しては、その酸化を防ぐためにノルロイシン(Nle)への置換を行った。

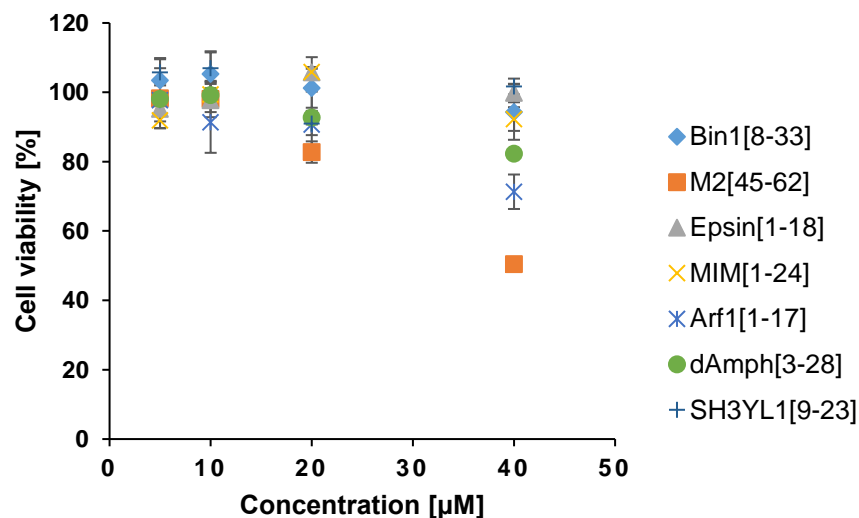
**Table 1-1.** Sequences of amphipathic peptides derived from membrane remodeling proteins.

Peptide	Sequence <sup>a)</sup>
<b>Bin1[8-33]</b>	GVTAGKIASNVQKKLTRAQEKVLQKL
<b>M2[45-62]</b>	RLFFKCIYRRFKYGLKRG
<b>Epsin[1-18]</b>	XSTSSLRRQXKNIVHNYS
<b>MIM[1-24]</b>	XEAVIEKECSALGGLFQTIISDXK
<b>Arf1[1-17]</b>	XGNIFANLFGKLFQKKE
<b>dAmph[3-28]</b>	ENKGIXLAKSVQKHAGRAKEKILQNL
<b>SH3YL1[9-23]</b>	LKSEAKKAAILREF

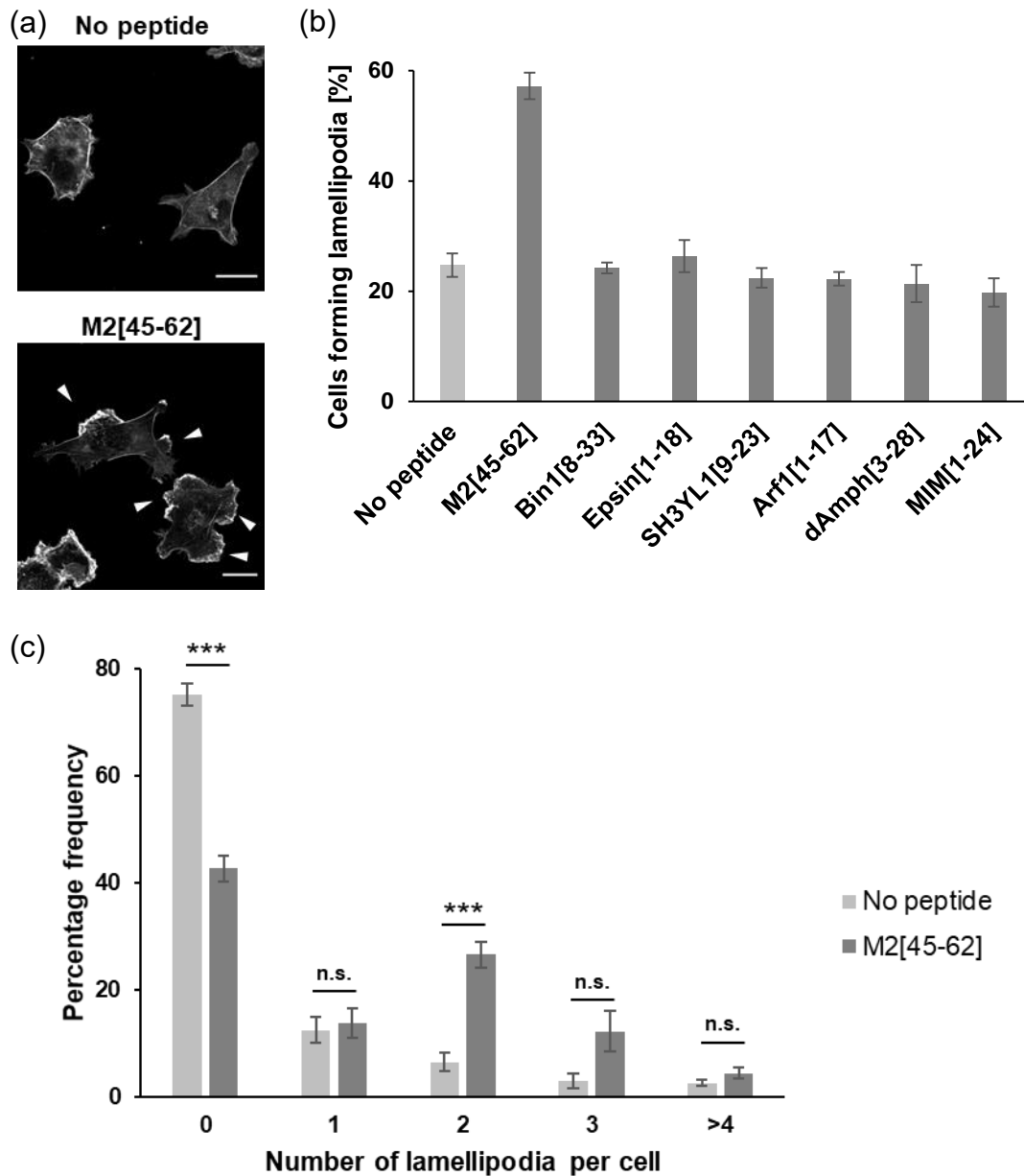
a) All of the peptides synthesized in this study had an amide structure at the C-termini. X=Nle.

次に、合成した両親媒性ペプチドによる F-アクチン分布に対する影響について検討を行った。膜張力の変化は、F-アクチン分布に影響を与えることが報告されていることから[10]、両親媒性ペプチドが膜張力に影響を与えるのであれば、F-アクチン分布に影響を与えると考えた。まず、合成した両親媒性ペプチドの細胞毒性を、等張液(20 mM HEPES at pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM glucose)に希釈した各両親媒性ペプチドを 30 分間処理した際の細胞の生存率によって評価した(Figure 1-2)。そして、各両親媒性ペプチドについて、細胞生存率が 90 %以上となる濃度を用いて、F-アクチン分布に対する影響を観察した(M2[45-62], 10  $\mu$ M; Arf1[1-17] and dAmph[3-28], 20  $\mu$ M; other peptides, 40  $\mu$ M)。細胞を各両親媒性ペプ

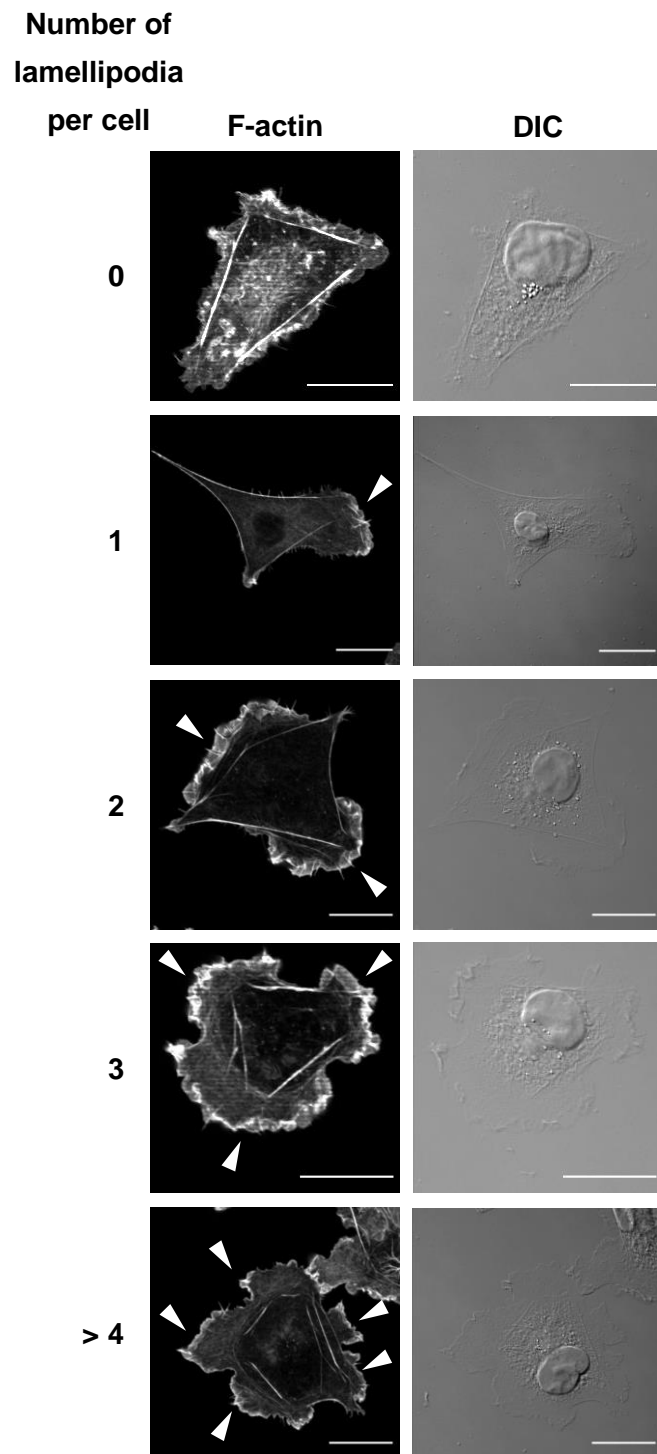
チドで 15 分間処理したのち、F-アクチンを染色して共焦点顕微鏡で観察した。その結果、インフルエンザウイルスの出芽過程に関わる M2 タンパク質由来のペプチドである M2[45-62]に関して、F-アクチンの細胞辺縁部への集積、すなわち、ラメリポディアの形成が多方向に生じることが観察された (Figure 1-3a)。Figure 1-3a のように、F-アクチンが細胞辺縁部において帯状に分布している細胞がラメリポディアを形成していると判断し、ラメリポディア形成細胞を数えることによって、両親媒性ペプチドによるラメリポディア形成能の傾向を評価した。その結果、ペプチド無添加時に比べて、M2[45-62] 処理によるラメリポディア形成の増大が確認された (Figure 1-3b)。さらに、M2[45-62] 処理により形成される 1 細胞当たりのラメリポディア数に対する影響の傾向を評価した (Figure 1-3c)。各数のラメリポディアを形成する代表的な細胞の顕微鏡画像を Figure 1-4 に示した。その結果、ペプチド未処理の場合と比較して、M2[45-62] 処理によりラメリポディアが多方向に形成されることが確認された。以上のことから、膜変形活性を有するタンパク質由来の両親媒性領域に注目することで、ラメリポディアを多方向に形成させる能力を有するペプチド M2[45-62]を見出すことができた。観察されたラメリポディアの多方向への形成は、膜張力の低下に伴う現象と考えられることから [13]、M2[45-62]は膜への挿入により膜張力を低下させる可能性が示唆された。



**Figure 1-2.** Evaluation of the cytotoxic effects of the amphipathic peptides (WST-1 assay). COS-1 cells were treated with the peptides for 30 min and then subjected to the WST-1 assay. Results are presented as means  $\pm$  SE (n = 3).



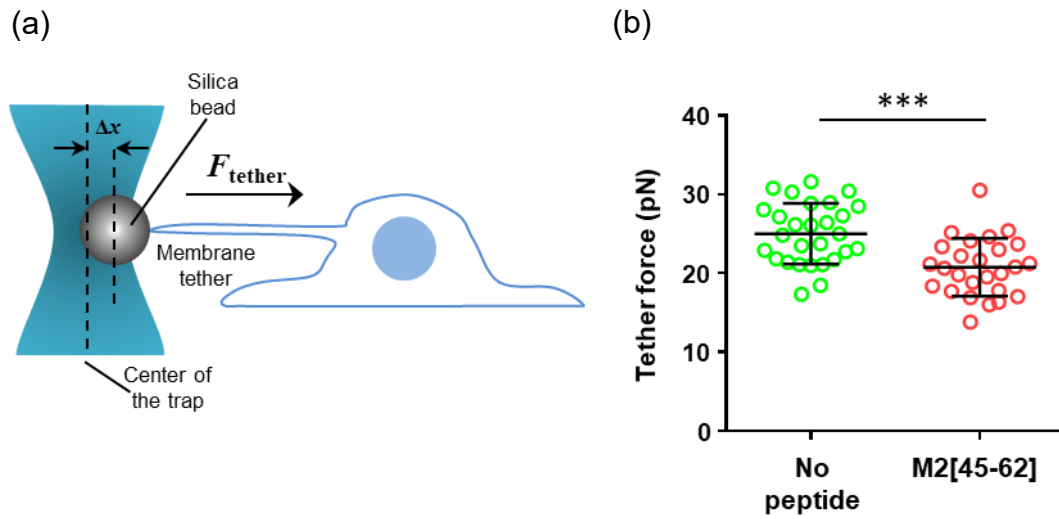
**Figure 1-3.** M2[45-62] induces lamellipodium formation in COS-1 cells. a, Confocal laser scanning microscopy (CLSM) images of F-actin (stained with rhodamine-phalloidin) in COS-1 cells treated with or without M2[45-62] (10  $\mu$ M) for 15 min. Arrowheads indicate lamellipodia. Lamellipodium were formed in multiple directions was predominantly in M2[45-62]-treated cells. Scale bar, 20  $\mu$ m. b, Quantification of lamellipodium formation in COS-1 cells treated with amphipathic peptides (M2[45-62], 10  $\mu$ M; Arf1[1-17] and dAmph[3-28], 20  $\mu$ M; other peptides, 40  $\mu$ M). The means  $\pm$  SE were derived from  $\sim$ 200 cells pooled from four independent experiments. c, Distribution of the number of lamellipodia per cell after treatment with M2[45-62]. No peptide denotes cells treated with buffer without M2[45-62]. The means  $\pm$  SE were derived from  $\sim$ 200 cells pooled from four independent experiments. The number of cell populations bearing more than one lamellipodium per cell increased in response to the M2[45-62] treatment. \*\*\* $P$  < 0.001, One-way ANOVA followed by Turkey-Kramer's *post hoc* test.



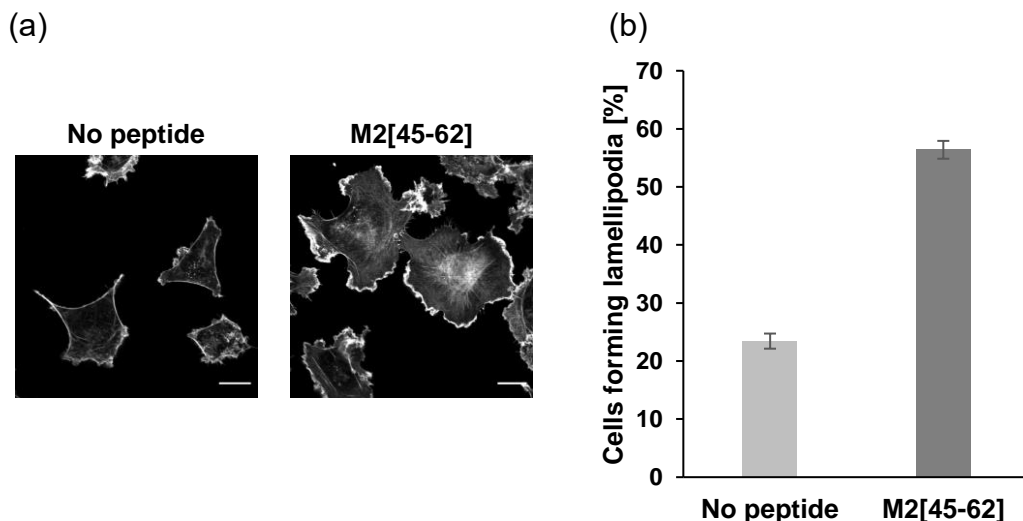
**Figure 1-4.** Representative images of M2[45-62]-treated cells bearing different numbers of lamellipodia (scale bars, 20  $\mu\text{m}$ ).

## 第2節:膜張力に対する M2[45-62]の影響

ラメリポディア形成の多方向への誘導能が確認された M2[45-62]に関して、実際に膜張力を低下させるのかどうかについて検討するために、光ピンセットを用いた膜張力測定を行った。前述のように、光ピンセットは細胞膜を引っ張ることで細長い管状構造を形成させることが可能であり、管状構造を形成するために必要な tether force ( $F_{\text{tether}}$ )を測定することができる(Figure 1-5a)。この  $F_{\text{tether}}$  が膜張力と相関することから(膜張力 =  $F_{\text{tether}}/4R_t\pi$ )( $R_t$ : Radius of tether)[22,23]、M2[45-62]処理細胞の  $F_{\text{tether}}$  を測定することで M2[45-62]による膜張力への影響を評価した。光ピンセットを用いた実験は、血清含有培地中にて行った。血清タンパク質に M2[45-62]がトラップされる可能性があることから、20  $\mu\text{M}$  の M2[45-62]を用いて実験を行った。Figure 1-3 と同様に、この条件において M2[45-62]によるラメリポディア形成が確認された(Figure 1-6a,b)。また、血清含有培地中で 20  $\mu\text{M}$  の M2[45-62]処理した場合に、顕微鏡観察による細胞毒性は見られなかった。光ピンセットを用いた膜張力への影響の評価の結果、M2[45-62]で処理した細胞では、ペプチド未処理の場合と比較して  $F_{\text{tether}}$  の有意な低下、すなわち、膜張力の低下が確認された(Figure 1-5b)。これらの結果から、M2[45-62]が膜張力を低下させることが確認された。



**Figure 1-5.** M2[45-62] reduces membrane tension. a, Schematic representation of membrane tension measurements using optical tweezers. A membrane tether was generated by pulling a coated bead away from the cell surface using optical tweezers. The force needed to form the membrane tether (tether force,  $F_{\text{tether}}$ ) was measured from displacement of the bead from the center of the trap ( $\Delta x$ ). b, Measurement of the tether force in COS-1 cells. The tether force of identical cells was measured after treatment with phosphate buffered saline (PBS) or M2[45-62] (20  $\mu\text{M}$ ). The mean  $\pm$  SD were derived from data pooled from three independent experiments. In total, 28 events (no peptide = PBS treatment) and 26 events (M2[45-62] treatment) were analyzed. \*\*\* $P < 0.001$ , Student's t-test.



**Figure 1-6.** M2[45-62] induces lamellipodium formation in the presence of serum. a, Confocal laser scanning microscopy images of F-actin (stained with rhodamine-phalloidin) in COS-1 cells treated with or without M2[45-62] (20  $\mu\text{M}$ ) for 15 min in the presence of serum. Scale bars, 20  $\mu\text{m}$ . b, Quantification of lamellipodium formation induced by M2[45-62] (20  $\mu\text{M}$ ) in the presence of serum. The means  $\pm$  SE were derived from  $\sim 200$  cells pooled from three independent experiments.

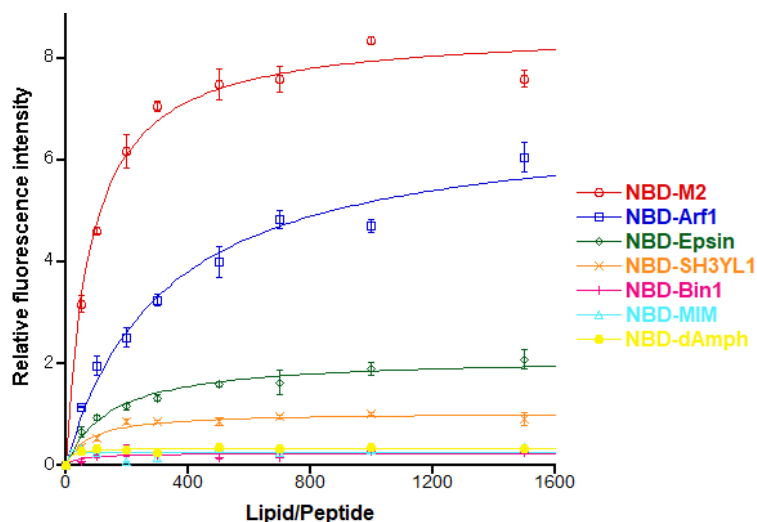
### 第 3 節:M2[45-62]の脂質膜との結合性の検討

F-アクチン分布に対する影響を検討した両親媒性ペプチドに関して、脂質膜への結合性について検討するために、nitrobenzoxadiazole (NBD)標識したペプチドを用いてリポソームとの結合性を評価した。NBD は環境応答性の蛍光プローブであり、親水性環境下においては弱い蛍光しか示さないが、脂質膜などの疎水性環境下においては強い蛍光を発することがわかっている[24]。この性質を利用して、NBD 標識したペプチドがリポソームと相互作用した際の蛍光強度の増大を指標として、各ペプチドのリポソームに対する結合性を評価した[25]。

リポソーム非存在下での NBD の蛍光強度を基準として、リポソーム濃度の増加に伴う蛍光強度の相対的な変化を評価した。その際のリポソームの脂質組成に関しては、人工膜を用いた M2[45-62] の実験で用いられている 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glysero-3-phosphocholine (POPC)/1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glysero-3-phosphoglycerol (POPG)/Cholesterol (Chol) (4:1:2)を採用した[16]。その結果、NBD 標識 M2[45-62](NBD-M2)が最も顕著な蛍光強度の増大を示すことが明らかになった(Figure 1-7)。Bin1[8-33]、MIM[1-24]、dAmph[3-28]の NBD 標識体に関しては、脂質濃度の上昇に伴う蛍光強度の増大をほとんど示さず、全てのペプチドが脂質膜に結合したことを示唆する NBD の蛍光強度( $F_{\max}$ )の値も小さかったことから( $F_{\max} = 0.25 \pm 0.03, 0.30 \pm 0.05, 0.34 \pm 0.02$ )、脂質膜との相互作用をほとんど示さないと考えられた。SH3YL1[9-23]の NBD 標識体に関しては、 $F_{\max}$  の半分の蛍光強度を示すために必要な脂質濃度( $[L]_{1/2}$ )は、NBD-M2 と同程度であったが(NBD-SH3YL1:  $39.0 \pm 0.7 \mu\text{M}$ , NBD-M2:  $40.2 \pm 1.2 \mu\text{M}$ )、 $F_{\max}$  の値は NBD-M2 と比べて小さかった(NBD-SH3YL1:  $1.04 \pm 0.08$ , NBD-M2:  $8.58 \pm 0.24$ )。一方、Arf1[1-17]および Epsin[1-18]の NBD 標識体に関しては、 $[L]_{1/2}$  の値は、NBD-M2 よりも大きく(NBD-Arf1:  $162.9 \pm 28.6 \mu\text{M}$ , NBD-Epsin:  $75.7 \pm 12.4 \mu\text{M}$ )、 $F_{\max}$  の値は NBD-M2 よりも小さかった(NBD-Arf1:  $6.95 \pm 0.84$ , NBD-Epsin:  $2.16 \pm 0.28$ )(Figure 1-7, Table 1-2)。以上の結果から、F-アクチン分布への影響を検討した 7 種類の両親媒性ペプチドのうちで、ラメリポディアの形成を誘起した M2[45-62]が最も強い脂質膜との相互作用を示すと考えられた。し

たがって、両親媒性ペプチドにより誘起されるラメリポディアの形成は、ペプチドの脂質膜との相互作用と高い相関があると考えられる。

次に、NBD-M2の細胞膜との相互作用について検討した。細胞をNBD-M2で処理して15分後に、共焦点顕微鏡でNBD由来の蛍光を観察した。ただし、10  $\mu\text{M}$ のNBD-M2で処理すると細胞毒性が見られたため、5  $\mu\text{M}$ のNBD-M2で細胞を処理した。その結果、NBD-M2処理によってNBD由来の蛍光が細胞辺縁部に観察されたことから、NBD-M2が細胞膜と相互作用することが示唆された。この際に、脂質膜を透過しない消光剤であるジチオナイト[26]で細胞を処理すると、NBD由来の蛍光が消失したことから(Figure 1-8a)、NBD-M2が細胞膜の外葉と相互作用していることが示唆された。一方、Figure 1-7の実験においてNBD-M2の次に大きな蛍光強度の増大を示したNBD-Arf1で処理した細胞では、辺縁部にNBD由来の蛍光シグナルが観察されなかった(Figure 1-8b)。したがって、このような条件下では、NBD-Arf1は細胞膜とは顕著な相互作用を示さないと考えられる。このような結果から、リポソームとの相互作用がNBD-Arf1よりも弱いペプチドに関しても、細胞膜との相互作用はM2[45-62]と比べて低いと予想される。したがって、他の両親媒性ペプチドと比べてM2[45-62]の膜相互作用の強さが膜張力の低下に大きく寄与すると考えられるが、これが膜との相互作用の強さのみに起因するものなのか、あるいはM2[45-62]の特定の構造要因がさらに重要となるのかに関しては、今後さらなる検討が必要である。



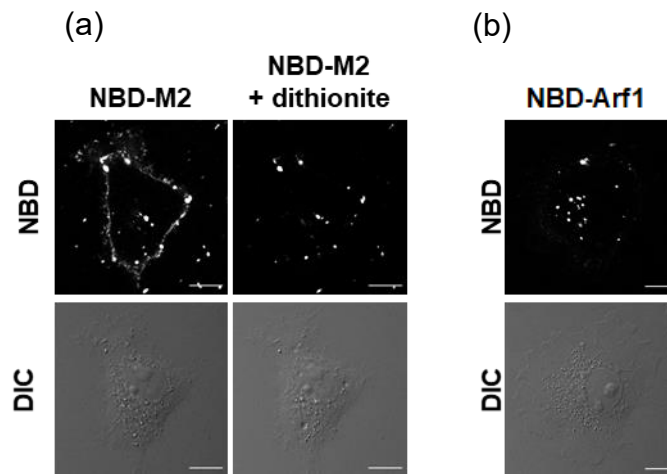
**Figure 1-7.** Increased fluorescence of NBD-labelled peptides upon titration with liposomes. NBD-labelled peptides (0.5  $\mu\text{M}$ ) were titrated with liposomes (POPC:POPG:Chol = 4:1:2) with an excitation wavelength of 485 nm and emission wavelength of 535 nm. Results are presented as means  $\pm$  SE (n = 3). Experimental data were fitted using KaleidaGraph 4.1 as described in the experimental section.



**Table 1-2.** Determined  $F_{\max}$  and  $[L]_{1/2}$  ( $F_{\max}$ : the saturating fluorescence intensity at high lipid concentrations.  $[L]_{1/2}$ : the lipid concentration that corresponds to binding half-saturation at  $F = F_{\max}/2$ ) for the interaction of NBD-labelled peptides with liposomes (POPC:POPG:Chol = 4:1:2) by using KaleidaGraph 4.1 as described in the experimental section. Results are presented as means  $\pm$  SE (n = 3).

	$F_{\max}$	$[L]_{1/2}$ ( $\mu\text{M}$ )
NBD-M2	$8.58 \pm 0.24$	$40.2 \pm 1.2$
NBD-Arf1	$6.95 \pm 0.84$	$162.6 \pm 28.6$
NBD-Epsin	$2.16 \pm 0.28$	$75.7 \pm 12.4$
NBD-SH3YL1	$1.04 \pm 0.08$	$39.0 \pm 0.7$
NBD-Bin1 <sup>a)</sup>	$0.25 \pm 0.03$	$39.4 \pm 25.7$
NBD-MIM <sup>a)</sup>	$0.30 \pm 0.05$	$42.1 \pm 42.9$
NBD-dAmph <sup>a)</sup>	$0.34 \pm 0.02$	$6.6 \pm 0.7$

a) Determined  $R^2$  value is less than 0.95.



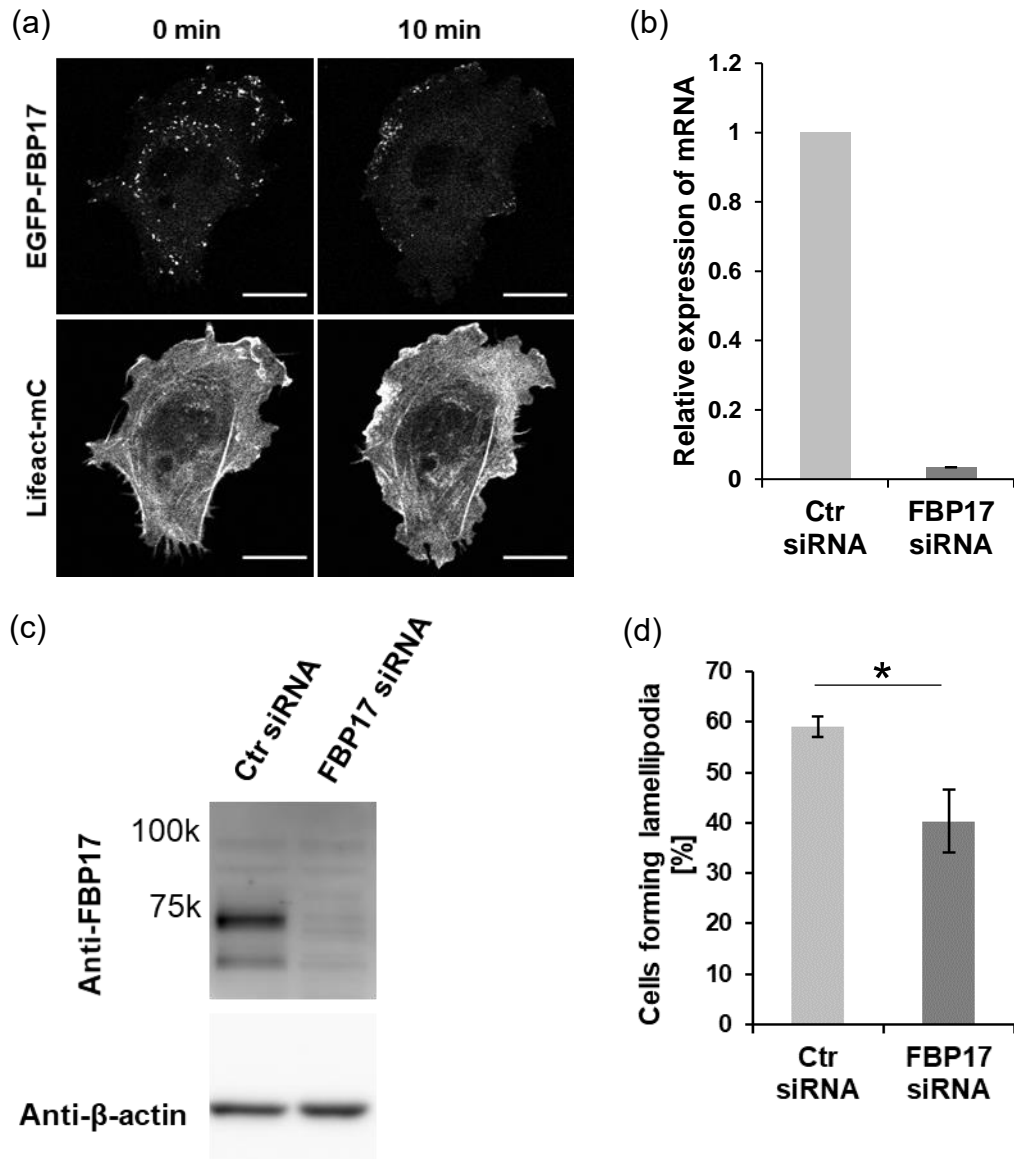
**Figure 1-8.** a, CLSM images of NBD fluorescence in COS-1 cells treated with NBD-M2 (5  $\mu\text{M}$ ) for 15 min. After the NBD-M2 treatment, dithionite (20  $\mu\text{M}$ ) was added, and the samples were observed by CLSM 1 min later. Disappearance of the NBD-M2 signal along the perimeters of the cells suggested cell surface localization of the peptide. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ . b, CLSM images of NBD fluorescence in COS-1 cells similarly treated with NBD-Arf1 (5  $\mu\text{M}$ ) (scale bars, 10  $\mu\text{m}$ ).

#### 第 4 節:M2[45-62]により誘起されるラメリポディア形成における FBP17 の寄与

M2[45-62]によるラメリポディアの形成が膜張力の変化によるものなのかについて検討するため、膜張力センサータンパク質 FBP17 の寄与について検討した。FBP17 は膜張力の低下を感知し、細胞膜近傍でアクチン重合を誘起することが報告されている (Figure 1-1c) [10,13]。M2[45-62]によるラメリポディアの形成が膜張力の変化によるものであれば、FBP17 が関与していると予想した。

まず、M2[45-62]で処理した細胞における FBP17 と F-アクチンの細胞内局在について検討した。生細胞における FBP17 と F-アクチンの細胞内局在を観察するため、FBP17 に EGFP を融合した EGFP-FBP17 および Lifeact アクチン結合モチーフ[27]に mCherry を融合した Lifeact-mCherry を細胞に共発現させ、M2[45-62]で処理した際の細胞内分布の変化を観察した。M2[45-62]添加直後には細胞全体にわたって分布していた EGFP-FBP17 のシグナルが、M2[45-62]処理後には細胞辺縁部へ移行する様子が観察された。さらに、EGFP-FBP17 が移行した細胞辺縁部では、M2[45-62]処理に伴うアクチンの再構成が観察された (Figure 1-9a)。これらの結果から、M2[45-62]により誘起される F-アクチン分布には FBP17 が関与している可能性が示唆された。

FBP17 の寄与についてさらに検討するために、siRNA を用いて FBP17 をノックダウンしたときの M2[45-62]によるラメリポディア形成能を評価した。FBP17 siRNA により内在の FBP17 の発現レベルは mRNA およびタンパク質レベルで 90%以上低下した (Figure 1-9b,c)。FBP17 をノックダウンした細胞では、M2[45-62]により誘起されるラメリポディアの形成が有意に低下することが確認された (Figure 1-9d)。これらの結果から、M2[45-62]による F-アクチン分布の変化には、膜張力センサータンパク質の FBP17 が寄与する可能性が裏付けられた。しかし、FBP17 のノックダウンによってタンパク質レベルは十分に低下しているにも関わらず (Figure 1-9c)、M2[45-62]によるラメリポディア形成能は完全には消失しなかった。FBP17 のファミリータンパク質である Toca-1 や CIP4 の関与や、膜張力変化以外のメカニズムも考えられる。したがって、M2[45-62]処理によるラメリポディア形成の機構については、今後さらなる検討が必要である。

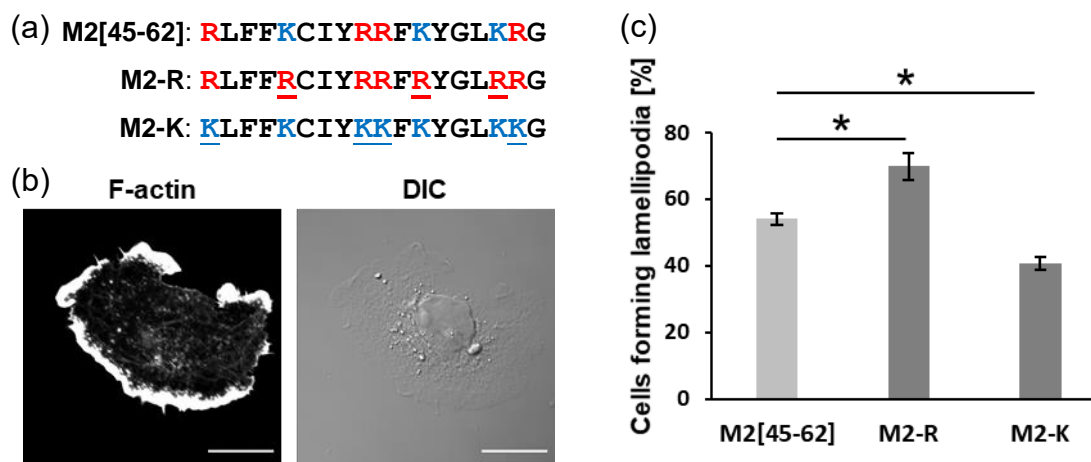


**Figure 1-9.** FBP17 plays an important role in M2[45-62]-driven lamellipodium formation. a, Time lapse images of COS-1 cells co-expressing EGFP-FBP17 and Lifeact-mCherry (Lifeact-mC) after addition of M2[45-62] (10  $\mu$ M). Scale bar, 20  $\mu$ m. FBP17 mRNA (b) and protein (c) levels in COS-1 cells transfected with control (Ctr) siRNA and FBP17 siRNA were analyzed by reverse transcription PCR and western blotting using a specific antibody against FBP17, respectively. d, Quantification of the M2[45-62]-driven lamellipodia formed after siRNA treatment. The mean  $\pm$  SE were derived from  $\sim$ 250 cells pooled from three independent experiments. \*P < 0.05, Student's t-test.

## 第 5 節:M2[45-62]の機能増強を目指した変異体の検討

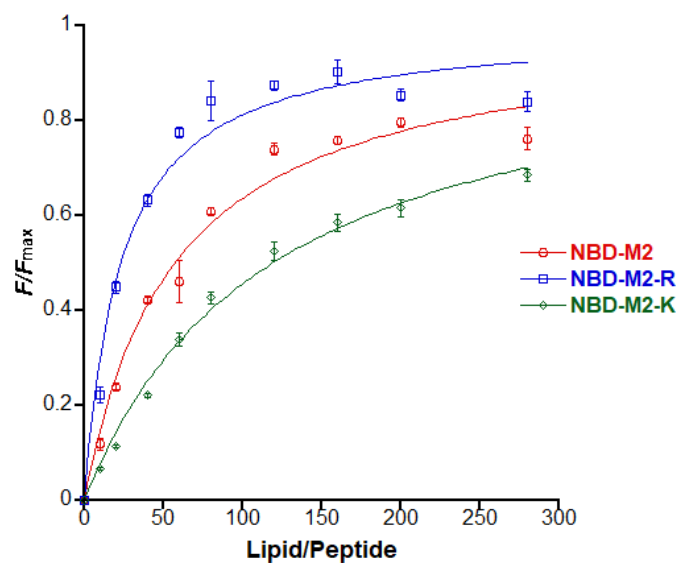
塩基性アミノ酸である Arg および Lys は、ペプチドと脂質膜の相互作用において重要な役割を果たすことが知られている[28]。そこで、M2[45-62]配列中に含まれる 4 つの Arg 残基および 3 つの Lys 残基をそれぞれ Lys 残基および Arg 残基に置換することによって、M2[45-62]によるラメリポディア形成能に変化があるのではないかと考えた。そこで、M2[45-62]配列中のすべての Lys 残基を Arg 残基に置換した M2-R、すべての Arg 残基を Lys 残基に置換した M2-K を合成した(Figure 1-10a)。

合成した M2[45-62]誘導体に関して、これまでと同様にラメリポディア形成能の評価を行った。その結果、もとの M2[45-62]と比較して、M2-R 置換体ではラメリポディア形成能が増大したのに対して、M2-K 置換体ではラメリポディア形成能が低下した(Figure 1-10b,c)。このように、M2[45-62]を鋳型として、ラメリポディア形成能が増強された M2-R ペプチドを見出すことができるとともに、M2[45-62]により誘起されるラメリポディア形成には、Lys 残基よりも Arg 残基の寄与が大きい可能性が示唆された。



**Figure 1-10.** Arginine residues in M2[45-62] are more important for lamellipodium formation than lysine residues. a, Sequences of M2[45-62] and the M2-derivatives, M2-R and M2-K. b, CLSM image of F-actin (stained with rhodamine-phalloidin) in COS-1 cells treated with 10  $\mu$ M M2-R for 15 min. Scale bar, 20  $\mu$ m. c, Quantification of lamellipodium formation after treatment with M2[45-62] and the M2-derivatives (10  $\mu$ M each). The mean  $\pm$  SE were derived from  $\sim$ 300 cells pooled from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test.

次に、NBD を標識した M2[45-62]、M2-R および M2-K を合成し、リポソーム濃度の上昇に伴う蛍光強度の変化を指標にして、脂質膜との結合性について評価した。その結果、最も高いラメリポディア形成能を示した M2-R ( $[L]_{1/2} = 11.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$ ) が最も強い脂質膜への結合性を示し、ラメリポディア形成能が最も低かった M2-K ( $[L]_{1/2} = 60.7 \pm 5.5 \mu\text{M}$ ) は脂質膜への結合性が最も弱いことが明らかになった (Figure 1-11, Table 1-3)。すなわち、ペプチドの脂質膜への結合性は、ラメリポディア形成能と高い相関があった。Arg 残基の側鎖のグアニジド基は、Lys 残基の側鎖のアミノ基よりも脂質のリン酸基に対して強固に結合するために、脂質膜との結合性が增強された可能性が考えられる [29]。これらの結果から、Lys 残基の Arg 残基への置換により脂質膜との相互作用が增強され、M2-R は M2[45-62] よりも高いラメリポディア形成能を示すと考えられる。一方、 $F_{\text{max}}$  の値に関しては、M2-R ( $F_{\text{max}} = 14.9 \pm 0.4$ ) が最も小さく、M2-K ( $F_{\text{max}} = 24.8 \pm 2.0$ ) は M2[45-62] ( $F_{\text{max}} = 24.3 \pm 0.7$ ) と同程度であった (Table 1-3)。ペプチドが脂質膜に深くに挿入されると、NBD がより大きな蛍光強度を示すと考えられることから、M2[45-62]、M2-R、M2-K によるラメリポディア形成能の違いに、脂質膜への挿入の深さは寄与しない可能性が考えられる。

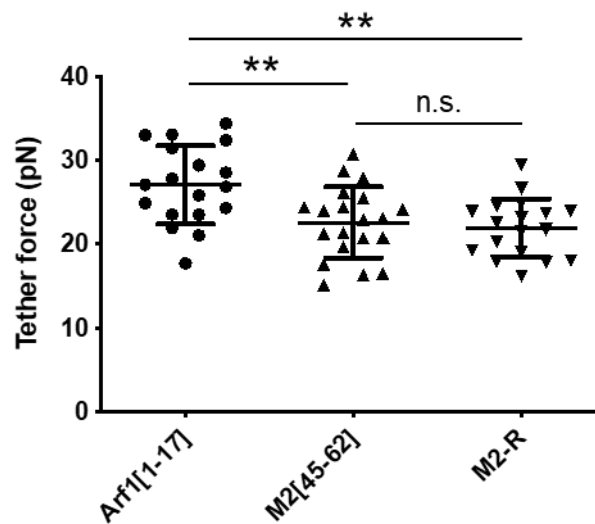


**Figure 1-11. a,** Increased fluorescence of NBD-labelled peptides upon titration with liposomes. NBD-labelled peptides (0.5  $\mu\text{M}$ ) were titrated with liposomes (POPC:POPG:Chol = 4:1:2) with an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 530 nm. Results are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).  $F$  is the fluorescence intensity at a given lipid concentration, and  $F_{\text{max}}$  is the saturating fluorescence intensity at high lipid concentrations. Experimental data were fitted using KaleidaGraph 4.1 as described in the experimental section.

**Table 1-3.** Determined  $F_{\text{max}}$  and  $[L]_{1/2}$  for the interaction of NBD labelled peptides with liposomes (POPC:POPG:Chol = 4:1:2) by using KaleidaGraph 4.1 as described in the experimental section. Results are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

	$F_{\text{max}}$	$[L]_{1/2}$ ( $\mu\text{M}$ )
NBD-M2	$24.3 \pm 0.7$	$29.1 \pm 3.6$
NBD-M2-R	$14.9 \pm 0.4$	$11.6 \pm 0.5$
NBD-M2-K	$24.8 \pm 2.0$	$60.7 \pm 5.5$

次に、両親媒性ペプチドによるラメリポディア形成能と膜張力の変化の関係について検討するために、ラメリポディア形成能を示さなかった Arf1[1-17]、ラメリポディア形成能を示した M2[45-62]、ラメリポディア形成能が増強された M2-R で処理した細胞に関して、光ピンセットを用いて膜張力を測定した。その結果、M2[45-62]と M2-R は、Arf1[1-17]と比較して、 $F_{\text{tether}}$  の減少、すなわち Arf1[1-17]よりも膜張力の低下を引き起こすことが確認された。一方、M2[45-62]よりも高いラメリポディア形成能を示した M2-R に関しては、M2[45-62]と比較して  $F_{\text{tether}}$ 、すなわち膜張力に有意な差は見られなかった(Figure 1-12)。しかし、このような膜張力に対する影響の違いは、光ピンセット法では感知できない可能性も考えられる。両親媒性ペプチドによる膜張力の低下とラメリポディア形成能との関連については、今後さらなる検討が必要である。



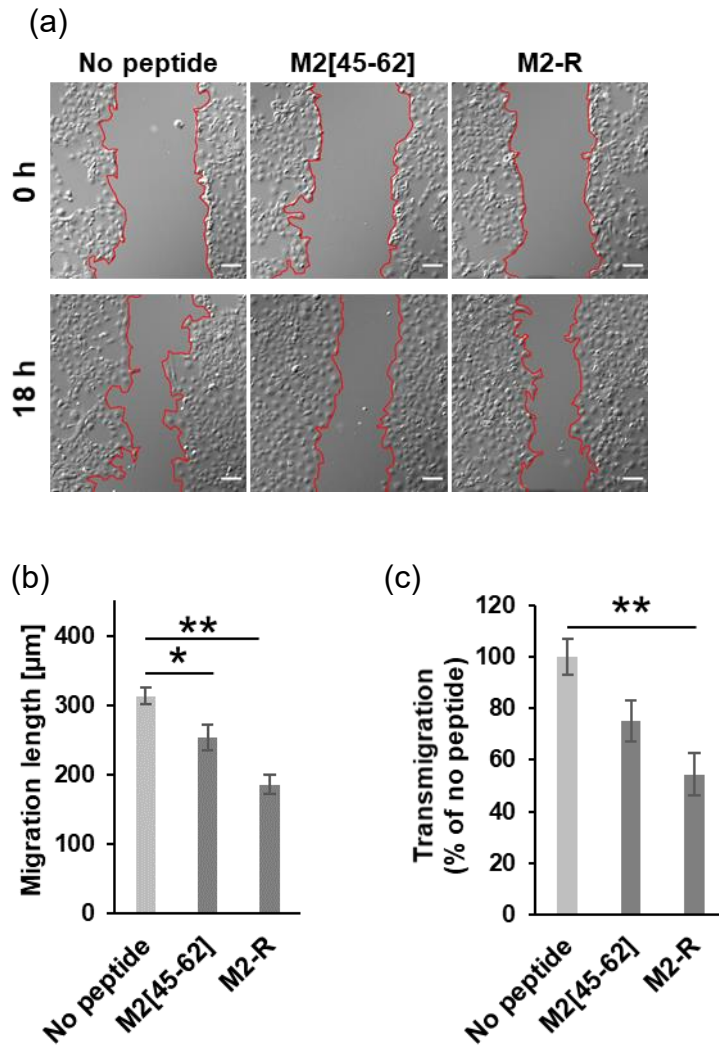
**Figure 1-12.** Measurement of the tether force in COS-1 cells. The tether force of identical cells was measured after treatment with each peptide (20  $\mu$ M). The mean  $\pm$  SD were derived from data pooled from three independent experiments. In total, 18 cells (Arf1[1-17] and M2-R) and 20 cells (M2[45-62] treatment) were analyzed. \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA Tukey's test.

## 第 6 節: M2[45-62]および M2-R の細胞運動に対する影響

これまでの検討において、M2[45-62]と M2-R は、ラメリポディア形成を多方向に誘起することが確認された。次に、M2[45-62]と M2-R が細胞運動能に対して実際に影響を及ぼすのかどうかについて検討するために、Wound healing assay による評価を行った。Wound healing assay とは、細胞単層にチップで傷をつけ、その傷が埋まる速度を基にして細胞運動能を評価する方法である[30]。細胞単層に傷をつけたのちに M2[45-62]または M2-R で処理し、細胞の平均移動距離(実験の部参照)を尺度として、18 時間後の傷の埋まり具合を評価した。その結果、M2[45-62]または M2-R で処理すると、細胞の移動度、すなわち細胞運動能が低下することが確認された (Figure 1-13a,b)。この結果から、M2[45-62]と M2-R は細胞運動を阻害することが示唆された。

M2[45-62]と M2-R の細胞運動に対する影響についてさらに検討するために、Transwell migration assay による細胞運動能の評価を行った。Transwell migration assay とは、上側のチャンバーに細胞を播種した後、下のプレートに移動した細胞数を計測することにより細胞運動能を評価する方法である[31]。Transwell 上の細胞を M2[45-62]または M2-R で処理し、6 時間後に下側のプレートに移動した細胞数を計測した。この際に、浮遊細胞を 10  $\mu$ M の M2[45-62]で処理すると細胞毒性が見られたことから、細胞毒性がみられなかった 1  $\mu$ M の条件で検討を行った。その結果、Wound healing assay の場合と同様に、M2[45-62]または M2-R で処理すると、下側のプレートに移行した細胞数が減少、すなわち細胞運動の阻害が確認された (Figure 1-13c)。これらの結果は、膜張力の低下によりラメリポディア形成が無作為に誘起され、細胞極性が失われることによって細胞運動能が低下するというこれまでの報告と一致する [11-13]。



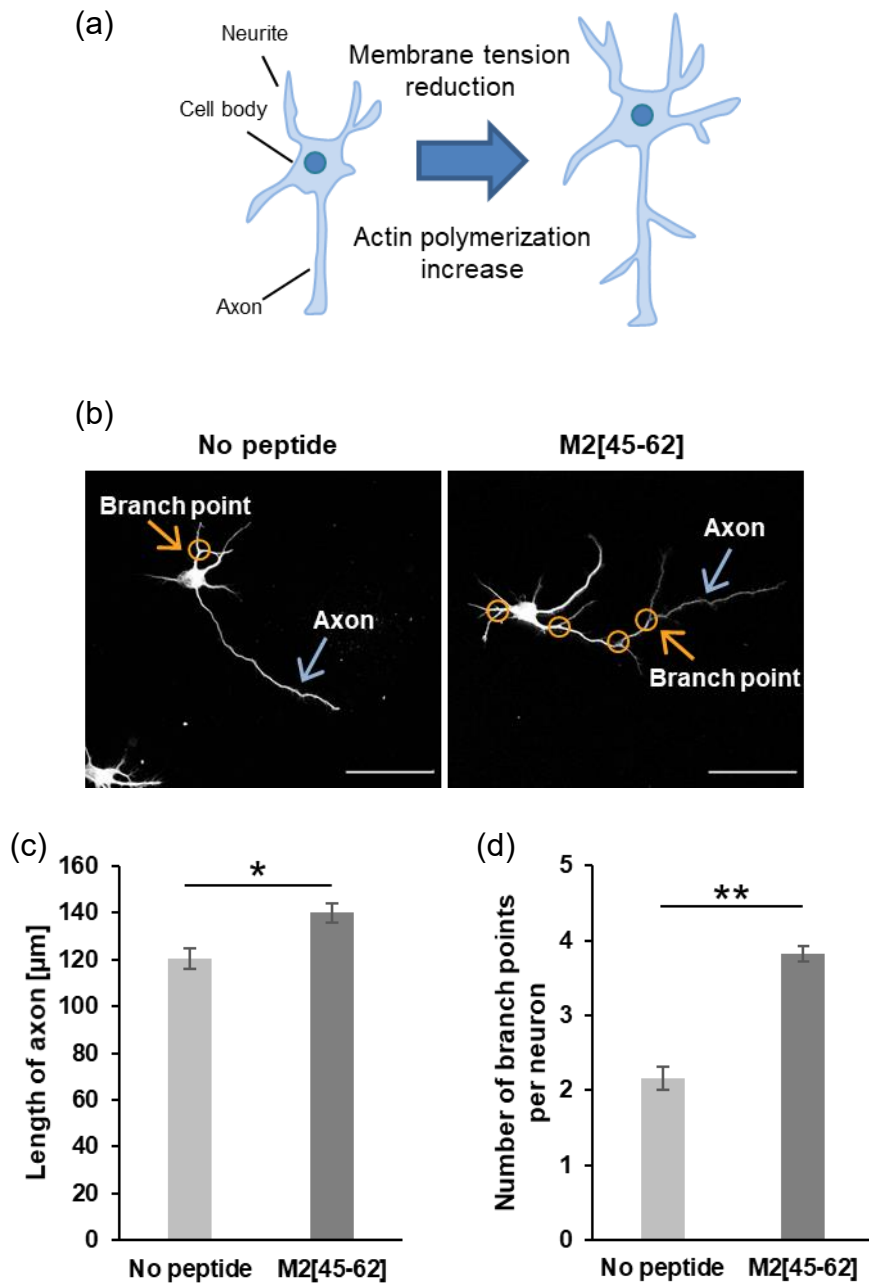


**Figure 1-13.** M2[45-62] and M2-R decreases cell migration. a, Migration of COS-1 cells treated with M2[45-62] or M2-R (10  $\mu\text{M}$  each) for 18 h at 37°C. The borders of cell monolayers and the gaps are shown in red lines. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . b, Average migration length of COS-1 cells treated with M2[45-62] or M2-R (10  $\mu\text{M}$  each) in serum-free medium for 18 h at 37°C under 5%  $\text{CO}_2$ , as described in the experimental section. The average migration length during peptide treatment was calculated by comparing the lengths of the gaps between 0 and 18 h after peptides treatment. The results are the mean  $\pm$  SE (n = 4). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test. c, Relative transmigration of HeLa cells treated with M2[45-62] or M2-R (1  $\mu\text{M}$  each) in serum-free medium for 6 h at 37°C under 5%  $\text{CO}_2$ , as described in the experimental section. The cells that migrated to the lower chamber were stained with 3',6'-di(*O*-acetyl)-4',5'-bis[*N,N*-bis(carboxymethyl)aminomethyl]fluorescein, tetraacetoxymethyl ester (Calcein-AM). Relative signal intensities were calculated by comparing the fluorescence intensities of the peptide-treated and untreated cells. The fluorescence intensity was normalized to that of cells without peptide treatment. The results are the mean  $\pm$  SE (n = 4). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test.

## 第7節：M2[45-62]が神経細胞形態に及ぼす影響

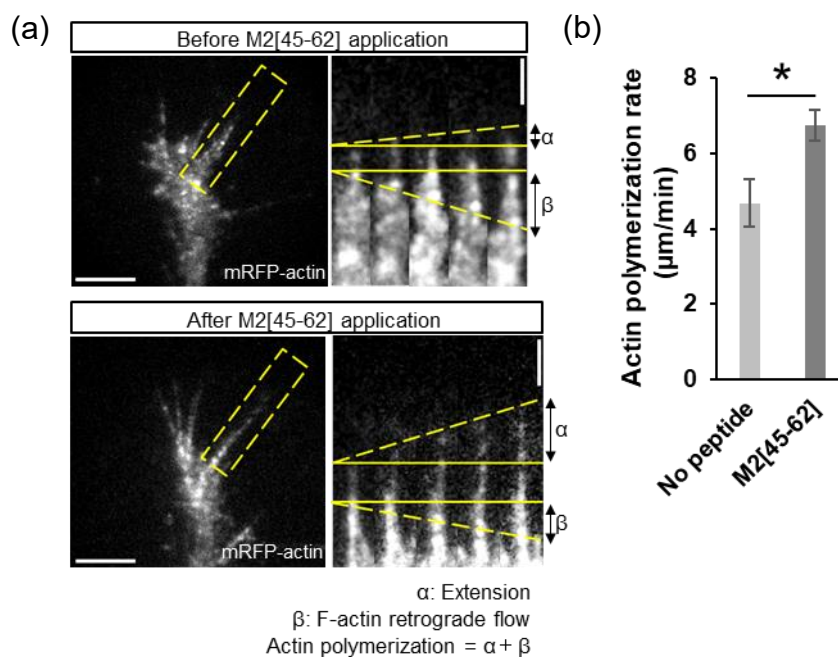
神経細胞の形態は脳の機能において重要であり[32]、その特徴的な神経細胞形態の形成にはアクチンの再構成が重要な役割を果たしている。膜張力の変化はアクチンの再構成を誘起することで細胞形態を変化させることから、M2[45-62]が神経細胞の形態にも影響を及ぼすのではないかと考えた(Figure 1-14a)。

M2[45-62]の神経細胞形態に対する影響について検討するために、ラット脳海馬由来の初代培養神経細胞を、M2[45-62]の存在下で48時間培養した。その後、固定した細胞を、神経細胞の細胞形態観察に用いられるTuj1 (Neuronal-specific Class III  $\beta$ -Tubulin)に対する抗体を用いて染色して顕微鏡観察した(Figure 1-14b)。10  $\mu$ MのM2[45-62]で処理した場合には神経細胞への毒性が見られたことから、2  $\mu$ MのM2[45-62]で検討を行った。その結果、M2[45-62]処理によって、最も長い神経突起である軸索長の伸長(Figure 1-14b,c)、および神経突起からの分岐数の増加(Figure 1-14b,d)が観察された。これらの結果から、M2[45-62]が初代培養神経細胞の形態に対して影響を及ぼすことが示された。



**Figure 1-14.** M2[45-62] increases neurite outgrowth in cultured neurons. a, Possible effects of cell membrane tension on neuronal morphology. b, CLSM image of neuronal morphology (stained with anti-Tuj1 antibody) after treatment with 2  $\mu\text{M}$  M2[45-62]. Scale bar, 50  $\mu\text{m}$ . c, Quantification of the average length of the axons of the control and 2  $\mu\text{M}$  M2[45-62]-treated neurons. The mean  $\pm$  SE were derived from  $\sim$ 150 neurons pooled from three independent experiments. \* $P < 0.05$ , Student's t-test. d, Quantification of the average number of branch points per neuron of the control and 2  $\mu\text{M}$  M2[45-62]-treated neurons. The mean  $\pm$  SE were derived from  $\sim$ 150 neurons pooled from three independent experiments. \*\* $P < 0.01$ , Student's t-test.

これまでの結果から、M2[45-62]が神経突起の伸長や分岐を誘起することが確認された。次に、神経細胞の形態変化が膜張力の低下に伴うアクチン重合の促進によるものではないかと考え、M2[45-62]のアクチン重合に対する影響について検討した。mRFP-アクチンを発現させた神経細胞を M2[45-62]で処理し、成長円錐における mRFP-アクチンシグナルを蛍光スペckル顕微鏡法により解析した[33](Figure 1-15a)。mRFP-アクチンシグナルの伸展および後退の速度の合計が成長円錐におけるアクチンの重合速度を反映することから、M2[45-62]添加前後の mRFP-アクチンシグナルの伸展および後退の速度を解析することで、M2[45-62]のアクチン重合速度への影響を評価した。その結果、M2[45-62]処理によって、成長円錐におけるアクチン重合速度が増大することが示された(Figure 1-15b)。これらの結果から、M2[45-62]は初代培養神経細胞において、アクチン重合の促進と神経突起の伸長を誘起することが示唆された。



**Figure 1-15.** a, Fluorescent speckle microscopy images of mRFP-actin in a growth cone in cultured neurons before and after 2  $\mu\text{M}$  M2[45-62] administration (scale bar, 5  $\mu\text{m}$ ). Kymographs (space-time plots displaying intensity values along a predefined path over time) of the flow of fluorescent features of mRFP-actin in filopodia at 5-s intervals are shown (scale bar, 2  $\mu\text{m}$ ). F-actin extension and retrograde flow are indicated by dashed yellow lines. The sum of F-actin extension and retrograde flow ( $a + b$ ) indicates the rate of mRFP-actin turnover, which reflects the rate of actin polymerization [42]. b, The rate of actin polymerization in a growth cone of neurons before and after applying 2  $\mu\text{M}$  M2[45-62]. In total, 27 cells (no peptide = PBS treatment) and 26 cells (M2[45-62] treatment) were analyzed. \* $P < 0.05$ , Student's t-test.

## 第一章の考察

本研究において、膜変形活性を有するタンパク質の両親媒性領域に注目することで、ラメリポディア形成を多方向に誘起するペプチド M2[45-62]を得た。得られた M2[45-62]は膜張力を低下させることが確認され、細胞運動や神経細胞の形態に影響を及ぼすことが示された。

膜張力が細胞機能の制御において重要な役割を果たすことが明らかになる一方で [1]、膜張力を変化させるツールを用いることで膜張力が制御する細胞機能を制御しようとする試みに関する報告はほとんどない。本研究では、両親媒性ペプチドにより膜張力を変化させることによる細胞機能の制御を初めて試みた。また、膜張力の変化というアプローチで神経細胞の形態に影響を与えたのは今回が初めての報告である。両親媒性ペプチドを用いることで膜張力の変化を介して細胞運動や細胞形態を操作可能であるという知見は、今後の細胞操作技術の開発に新たな視点を与えることが期待される。

しかし、M2[45-62]が細胞膜と相互作用することが確認されたのに対して、M2[45-62]以外の両親媒性ペプチドと細胞膜との相互作用は確認できなかった。また、M2[45-62]よりも高いラメリポディア形成能を示した M2-R は、脂質膜への結合性も増大していた。このことから、今回の検討においては両親媒性ペプチドが膜張力を低下させる機構として、脂質膜への結合性以外の要因を明らかにできていない。細胞膜と相互作用する両親媒性ペプチドである細胞膜透過ペプチドや強い毒性を有する膜傷害性ペプチドなどと比較して、M2[45-62]のどのような構造的要因が膜張力の低下にとって重要であるのかについてはさらなる検討が必要である。同程度の細胞膜への結合性を示しながら、膜張力を低下させないペプチドと比較することによって、膜張力低下の要因を明らかにすることが期待される。また、今回の検討において M2-R は M2[45-62]より強いラメリポディア形成能を示したのに対して、光ピンセットを用いた膜張力の測定においては、M2[45-62]との差は見られなかった。光ピンセットによる膜張力の測定では、M2[45-62]と M2-R 間の膜張力に及ぼす影響の差を感知できない可能性も考えられる。近年、蛍光寿命イメージング顕微鏡 (FLIM) を用いることで膜張力を測定可能な蛍光プローブの開発が報告された [34]。この蛍光プローブを用いること

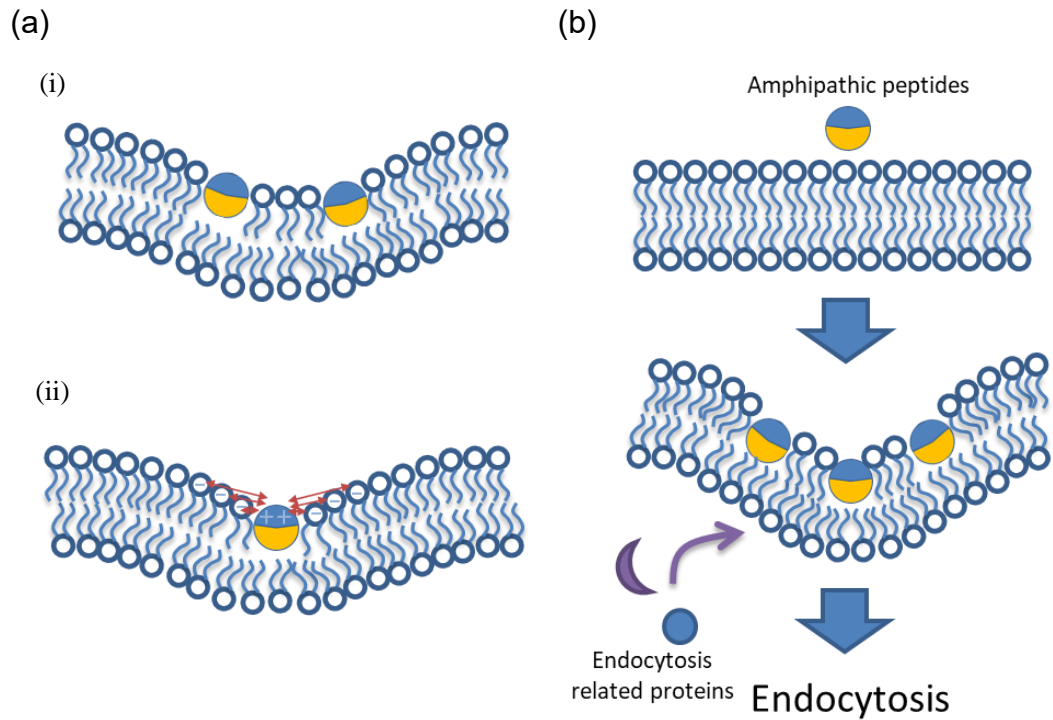
によって、より定量的かつ局所的な膜張力の測定が可能となり、膜張力を変化させる両親媒性ペプチドの構造要因の理解につながることを期待される。

## 第二章

### 細胞膜曲率の誘起を介するエンドサイトーシス制御の試み

細胞の分裂や運動、分化、細胞内小胞輸送などの様々な細胞現象の達成には細胞膜の変形が伴う。このような変化の過程において、細胞膜が湾曲した状態、すなわち細胞膜が曲率を有する状態が生じる。この細胞膜の曲率は、細胞機能の制御において重要な役割を果たすことが明らかになってきた[35]。そのため、細胞膜の曲率を制御するツールは、曲率による制御を受ける細胞現象を操作するうえで有用であると考えた。細胞膜の変形を制御するツールとして両親媒性ペプチドに注目した。このようなペプチドには、脂質膜への挿入や負電荷脂質との相互作用による electrostatic wrapping 機構を介して脂質膜の変形を誘起するものが知られている(Figure 2-1a) [36-38]。そこで、膜の変形を誘起する両親媒性ペプチドを用いることによって、細胞膜の変形が寄与する生命現象を制御できるのではないかと考えた。

細胞膜の変形を誘起する両親媒性ペプチドのうちで、人工的に設計された Arg と Trp から成る R6W3 (RRWRRWRR-amide)に着目した[39]。R6W3 は、Giant Unilamellar Vesicle(GUV)に膜の陥入構造を誘起することが報告されている[40]。細胞が細胞外分子や細胞膜タンパク質を取り込む細胞現象であるエンドサイトーシスには、細胞膜の湾曲形成が重要であると考えられることから[2,41]、脂質膜の変形を誘起する両親媒性ペプチド R6W3 を用いることによって、エンドサイトーシスを制御できるのではないかと考えた(Figure 2-1b)。



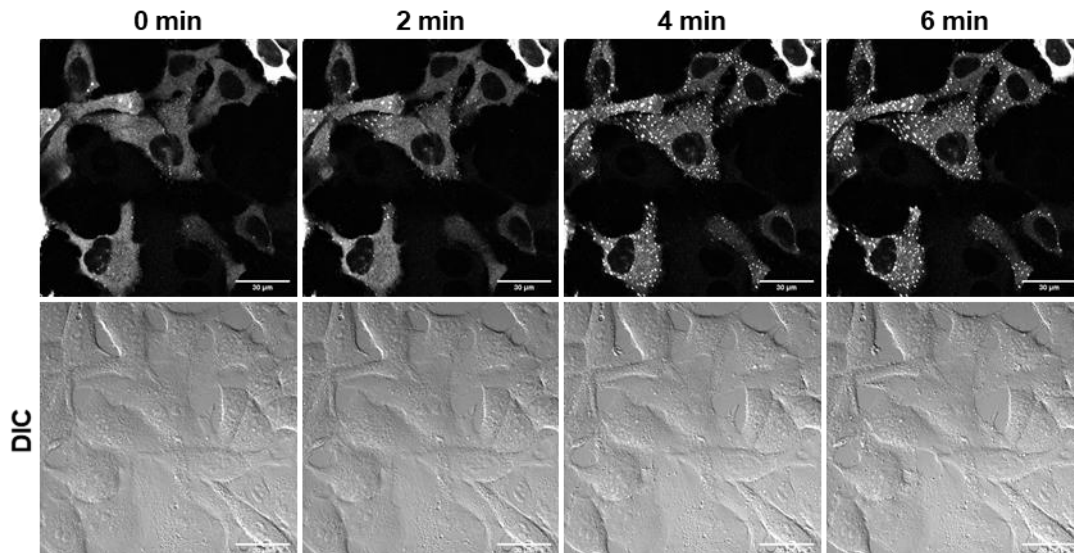
**Figure 2-1.** a, Mechanistic models of amphipathic peptide-induced membrane invagination. (i) Membrane insertion of amphipathic peptides induces negative curvature. (ii) Negative curvature induced by electrostatic wrapping mechanism. The red arrows represent electrostatic interactions. b, Working hypothesis of endocytosis induction by amphipathic peptides. The amphipathic peptide induces membrane invagination by peptide insertion or electrostatic wrapping. The resulting membrane deformation promotes the recruitment of endocytosis-related proteins to proceed following process of endocytosis.



## 第1節:R6W3の細胞膜変形活性

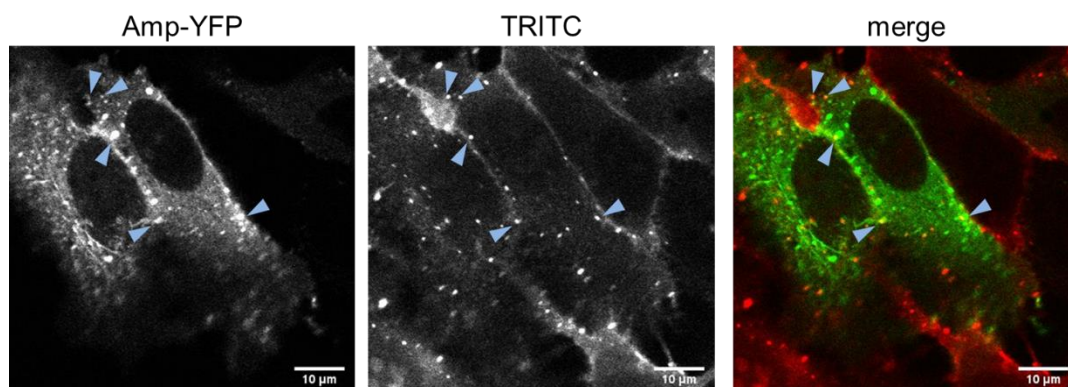
R6W3による細胞膜変形活性を評価するために、N-BARドメインを有し、細胞膜の変形を感知するタンパク質であるAmphiphysinを利用した。人工的に細胞膜の陥入構造を生じさせた部位にAmphiphysinが動員されることから、Amphiphysinは膜の陥入構造を感知することが報告されている[35]。そこで、Amphiphysinの細胞内局在に対するR6W3の影響を調べることによって、R6W3による細胞膜の変形能を評価できると考えた。

R6W3処理がAmp-YFPの細胞内局在へ及ぼす影響について共焦点顕微鏡により観察した。Amp-YFPを強制発現した細胞にR6W3を加え、その経時変化を観察したところ、R6W3処理後の時間の経過に伴って、Amp-YFPのドット状のシグナルが増加することが確認された(Figure 2-2)。人工的に細胞膜の陥入構造を生じさせた場合にも同様のドット状のシグナルが観察されることが報告されていることから[35]、R6W3は細胞膜の陥入を誘起している可能性が示唆された。



**Figure 2-2.** Time-lapse images of HeLa cells expressing Amp-YFP after the addition of R6W3 (20  $\mu$ M). Time 0 (zero) denotes immediately after peptide addition. Scale bar, 30  $\mu$ m.

次に、Amp-YFP が感知する細胞膜の陥入を R6W3 が実際に誘起しているのかどうかについて検討するため、R6W3 の N 末端に  $\gamma$ -アミノ酪酸を介して TRITC を結合した TRITC-R6W3 を合成し、Amp-YFP 発現細胞をこの TRITC-R6W3 で処理して 5 分後の Amp-YFP および TRITC-R6W3 の分布を共焦点顕微鏡にて観察した。2  $\mu$ M の TRITC-R6W3 で処理した場合に、20  $\mu$ M の R6W3 で処理した場合と同様に、Amp-YFP のドット状のシグナルの増加が観察され、さらにそのドット状シグナルの一部と TRITC-R6W3 の共局在が観察された (Figure 2-3、矢尻)。Amp-YFP と TRITC-R6W3 が完全に共局在するわけではなかった要因として、TRITC-R6W3 の集積が十分ではない可能性、TRITC-R6W3 が Amp-YFP が感知できない曲率を誘起している可能性、TRITC-R6W3 が凝集している可能性などが考えられる。R6W3 の細胞膜変形活性に関しては、原子間力顕微鏡を用いた直接的な細胞膜の形態観察などによる検討が必要である。

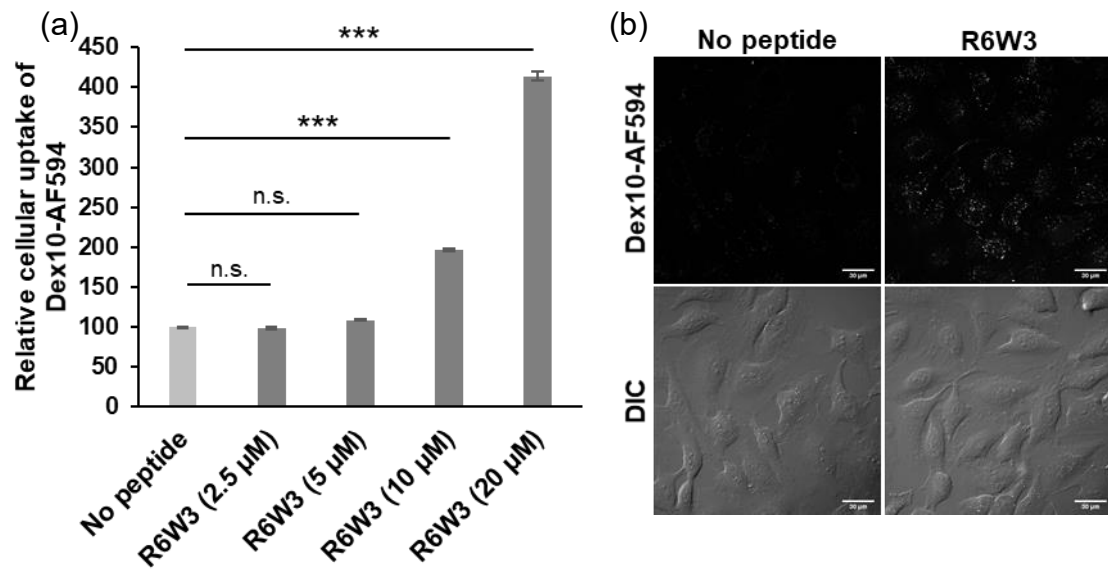


**Figure 2-3.** Partial colocalization of Amp-YFP and TRITC-R6W3 signals. Confocal laser scanning micrographs were captured 5 min after addition of TRITC-R6W3 (2  $\mu$ M). Arrowheads indicate colocalization sites of punctate signals of Amp-YFP with TRITC-R6W3 signals. Scale bar, 10  $\mu$ m.

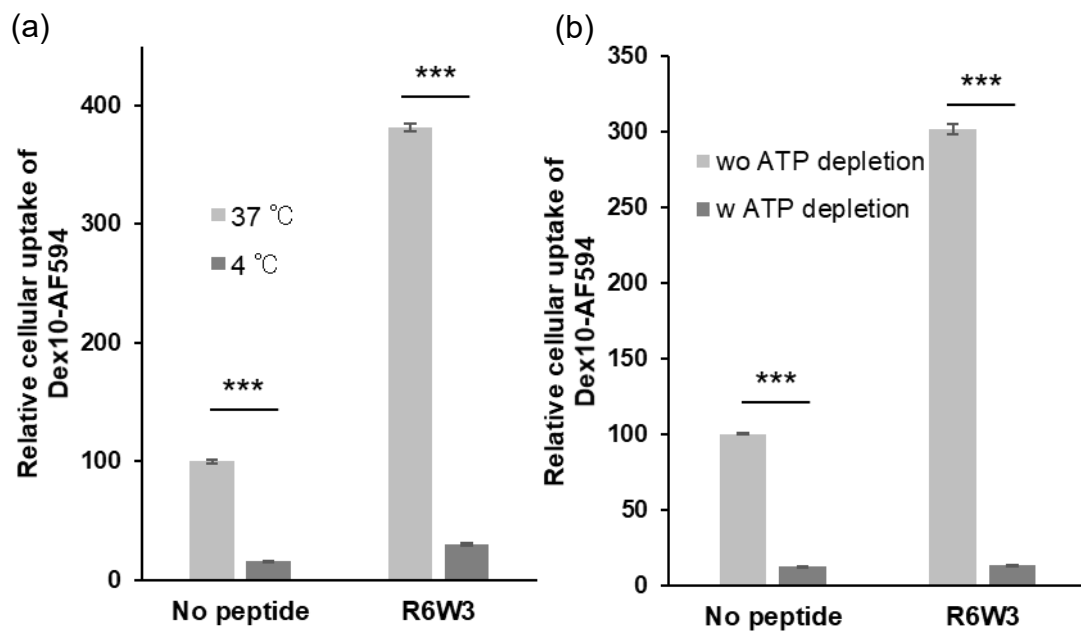
## 第 2 節:R6W3 のエンドサイトーシス誘起能

第 1 節の結果から、R6W3 は細胞膜を変形させる能力を有することが示唆された。次に、R6W3 が細胞膜の変形を誘起することでエンドサイトーシスを亢進させる可能性を考えて、R6W3 によるエンドサイトーシス誘起能について検討した。エンドサイトーシス経路としては、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、あるいはこれらには依存しないさまざまなエンドサイトーシス(ピノサイトーシスなど)が知られている[42]。本研究では、液相エンドサイトーシスにより細胞に非特異的に取り込まれる AlexaFluor 594 で蛍光標識された 10 kDa デキストラン (Dex10-AF594) の細胞内取り込み量を R6W3 で処理した細胞と未処理の細胞で比較することによって、R6W3 によるエンドサイトーシス経路への影響を評価した。細胞内取り込みの定量は、フローサイトメトリーを用いて行った。その結果、R6W3 の濃度依存的に Dex10-AF594 の細胞内取り込み量が増大することが確認された。20  $\mu$ M の R6W3 で処理した場合の Dex10-AF594 の取り込み量は、未処理細胞と比較して約 4 倍であった(Figure 2-4a)。さらに、Dex10-AF594 の細胞内分布を共焦点顕微鏡により観察したところ、R6W3 で処理した細胞では、未処理の細胞と比較して強い Dex10-AF594 のシグナルが観察された(Figure 2-4b)。これらの結果から、R6W3 はエンドサイトーシスを誘起する可能性が示唆された。

次に R6W3 により誘起されるエンドサイトーシスのエネルギー依存性について検討した。エネルギー依存的な細胞現象が阻害される条件である 4°C 条件および ATP 枯渇条件[43,44]にて R6W3 による Dex10-AF594 の細胞内取り込み量をフローサイトメトリーにより評価した。エネルギー依存的な細胞過程が阻害される 4°C 条件下、および ATP 枯渇条件下のどちらにおいても、R6W3 による Dex10-AF594 の細胞内取り込み量が、未処理の場合と同程度にまで低下することが確認された(Figure 2-5a,b)。このことから、R6W3 はエネルギー依存的にエンドサイトーシスを誘起することが示された。



**Figure 2-4.** R6W3 induced endocytic events. a, Uptake of Dex10-AF594 in HeLa cells treated with R6W3 in  $\alpha$ -MEM(-) for 30 min, analyzed by flow cytometry. The results are the mean  $\pm$  SE (n = 3). b, Confocal laser scanning micrographs of Dex10-AF594 in HeLa cells treated with R6W3 (20  $\mu$ M) in  $\alpha$ -MEM(-) for 30 min. Scale bars, 30  $\mu$ m. \*\*\*P < 0.001, One-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test.



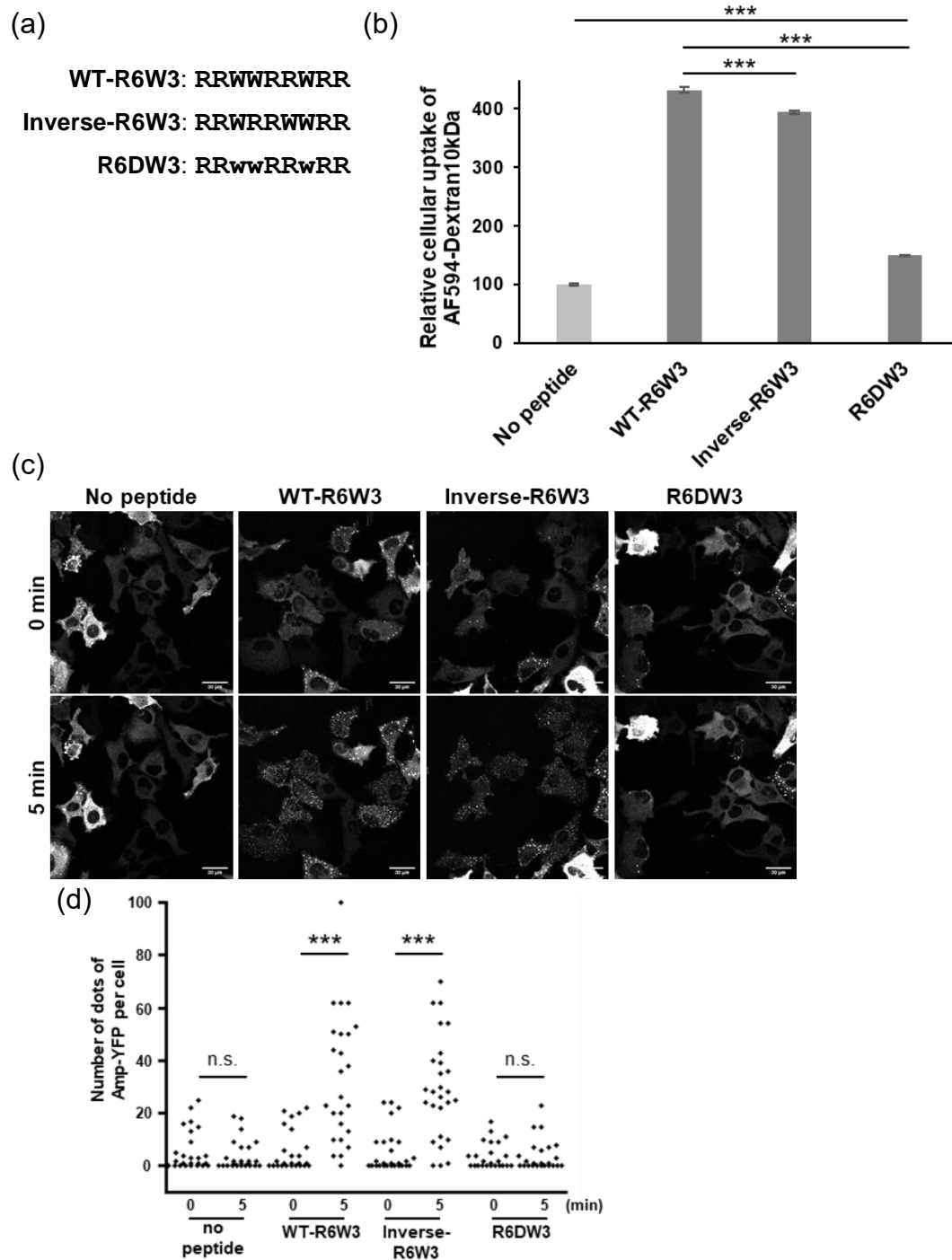
**Figure 2-5.** Uptake of Dex10-AF594 in HeLa cells treated with R6W3 (20  $\mu$ M) for 30 min at 4 °C (a) and under ATP-depleted conditions (b), analyzed by flow cytometry. The results are the mean  $\pm$  SE (n = 3). \*\*\*P < 0.001, One-way ANOVA followed by Turkey-Kramer's *post hoc* test.

### 第3節:R6W3の両親媒性構造の重要性

R6W3によるエンドサイトーシス誘起に、このペプチドの両親媒性構造が重要な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで、R6W3の逆配列を有するInverse-R6W3、およびR6W3のTrp残基をD-アミノ酸に置換したR6DW3を合成した(Figure 2-8a)。逆配列体はもとのR6W3と同様に両親媒性構造を有するのに対して、配列中央にD-アミノ酸を導入したペプチドはもとの配列が持つ二次構造を失うことが知られている[45,46]。したがって、R6W3の両親媒性構造が重要であるのならば、Inverse-R6W3はR6W3と同程度の活性を有するのに対して、R6DW3はその活性が失われると予想した。

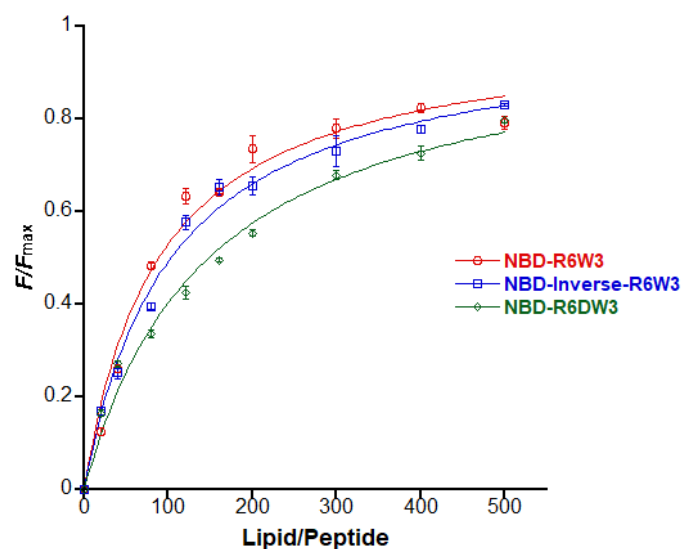
まず、R6W3、およびその誘導体について、Dex10-AF594の細胞内取り込み誘起能について調べた。Inverse-R6W3処理によって、R6W3処理にほぼ相当するDex10-AF594の細胞内取り込みが見られた(R6W3、約4.3倍、Inverse-R6W3: 約3.9倍)。それに対して、R6DW3処理による取り込み量は、未処理の場合と比べて増加していたものの、R6W3処理に比べて有意に少なかった(R6DW3、約1.5倍)(Figure 2-6b)。これらの結果から、R6W3の両親媒性構造がR6W3によるエンドサイトーシス誘起能において重要な役割を果たすことが示唆された。

次に、Amp-YFPの細胞内局在への影響を調べることによって、R6W3の有する両親媒性構造が細胞膜の変形誘起能のにとって重要であるのかどうかを評価した。ペプチド処理5分後のAmp-YFPのドット状シグナルの数は、WT-R6W3およびInverse-R6W3処理細胞において顕著に増大したのに対して、R6DW3処理細胞ではほとんど変化せず、未処理細胞と同程度であった(Figure 2-6c,d)。これらの結果から、R6W3の有する両親媒性構造が細胞膜変形において重要な役割を果たしていることが示唆された。



**Figure 2-6.** Amphipathic structure is important for R6W3-mediated endocytosis induction and membrane remodeling. a, Sequences of R6W3 and the R6W3-derivatives inverse-R6W3 and R6DW3. Lowercase letters represent D-amino acids. b, Uptake of Dex10-AF594 in HeLa cells treated with R6W3, inverse-R6W3, and R6DW3 (20  $\mu$ M each) in  $\alpha$ -MEM(-) for 30 min, analyzed by flow cytometry. The results are the mean  $\pm$  SE (n = 3). \*\*\*P < 0.001, One-way ANOVA followed by Turkey-Kramer's *post hoc* test. c, Time-lapse images of HeLa cells expressing Amp-YFP after the addition of R6W3, inverse-R6W3, and R6DW3 (20  $\mu$ M). Scale bar, 30  $\mu$ m. d, Quantitative data of (c). The number of Amp-YFP dot signals per cell was analyzed. The data were derived from n = 25 (no peptide), n = 25 (WT-R6W3), n = 27 (inverse-R6W3), and n = 24 (R6DW3) cells pooled across three independent experiments. \*\*\*P < 0.001, One-way ANOVA followed by Turkey-Kramer's *post hoc* test.

次に、合成した N 末端 NBD 標識ペプチド(NBD-R6W3、NBD-Inverse-R6W3、NBD-R6DW3)を用いて、第一章と同様にしてリポソームとの結合性を評価した。R6W3 と Inverse-R6W3 の $[L]_{1/2}$ はそれぞれ  $44.1 \pm 0.21$ 、 $52.0 \pm 3.7 \mu\text{M}$ であったのに対して、R6DW3に関しては  $74.0 \pm 2.0 \mu\text{M}$ であったことから、二次構造が失われていると予想される R6DW3 の脂質膜への結合性が弱いことが確認された。(Figure 2-7, Table 2-1)。さらに、 $F_{\text{max}}$ の値についても、R6DW3 の値( $F_{\text{max}} = 12.5 \pm 1.2$ )は R6W3 ( $F_{\text{max}} = 22.7 \pm 0.6$ )よりも小さいことから、R6DW3 は R6W3 よりも脂質膜へ挿入の深さが浅いと考えられた(Table 2-1)。これらの結果から、R6W3 の両親媒性の二次構造が脂質膜との相互作用において重要であることが示された。しかし、R6DW3 の $[L]_{1/2}$ は R6W3 の2倍程度でしかなかったことから、R6DW3 の脂質膜との相互作用は R6W3 と比較して完全には失われていないことがわかった。この傾向は、等温滴定カロリメトリー (ITC)を用いた R6W3 と R6DW3 のリポソームとの相互作用の検討結果 [47]と一致した。したがって、R6W3 が脂質膜と相互作用してヘリックス構造を形成し、両親媒性構造を形成することが、R6W3 による蛍光標識デキストランの細胞内取り込みおよび Amp-YFP のドット状のシグナルの増大にとって重要である可能性もある。ここで、Inverse-R6W3 の  $F_{\text{max}}$  値( $12.5 \pm 1.2$ )が R6W3 ( $F_{\text{max}} = 22.7 \pm 0.6$ )よりも小さかった (Table 2-1)理由として、R6W3 の N 末端側の連続する2つの Trp 残基がヘリックスを形成することによって脂質膜により深く挿入されることや、ヘリックスの N 末端側が C 末端側よりも脂質膜に深く挿入されているためである可能性が考えられる。



**Figure 2-7. a.** Increased fluorescence of NBD-labelled peptides upon titration with liposomes. NBD-labelled peptides ( $0.5 \mu\text{M}$ ) were titrated with liposomes (POPC:POPG = 9:1) with an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 530 nm. Results are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).  $F$  is the fluorescence intensity at a given lipid concentration, and  $F_{\text{max}}$  is the saturating fluorescence intensity at high lipid concentrations. Experimental data were fitted using KaleidaGraph 4.1 as described in the experimental section.

**Table 2-1.** Determined  $F_{\text{max}}$  and  $[L]_{1/2}$  for the interaction of NBD labelled peptides with liposomes (POPC:POPG:Chol = 4:1:2) by using KaleidaGraph 4.1 as described in the experimental section. Results are presented as means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

	$F_{\text{max}}$	$[L]_{1/2} (\mu\text{M})$
NBD-R6W3	$22.7 \pm 1.6$	$44.1 \pm 0.21$
NBD-Inverse-R6W3	$12.5 \pm 1.2$	$52.0 \pm 3.7$
NBD-R6DW3	$14.2 \pm 0.57$	$74.0 \pm 2.0$



## 第二章の考察

本研究において、人工膜に対する変形活性が報告されている R6W3 が、細胞膜の変形を感知する Amp-YFP のドット状のシグナルを増加させ、エンドサイトーシスを亢進させることが示された。エンドサイトーシスの亢進の理由として、R6W3 により誘起される細胞膜の曲率を検知した BAR ドメインファミリータンパク質などがリクルートされ、取り込みを促進する可能性が考えられる[35,41]。

人工膜の変形活性を有する両親媒性ペプチドは報告されているが[16,17]、両親媒性ペプチドによる細胞膜の変形について検討した報告はほとんどない。R6W3 による膜変形機構に関してはさらに検討が必要であるが、細胞膜の曲率を操作することによってエンドサイトーシスを制御可能であるという知見は、膜曲率に関連する生命現象の理解に貢献することが期待される。

また、本研究は細胞膜透過ペプチドの細胞内移行機構に関して新たな知見をもたらす可能性もある。細胞膜透過ペプチドの細胞内移行に関しては、エンドサイトーシス経路と直接膜透過経路の 2 つの機構が報告されているが[48]、その関連については未だ明らかではない。例えば、代表的な両親媒性細胞膜透過ペプチドである Penetratin は膜曲率誘導能を有することが報告されている[40]。エンドサイトーシス経路と直接膜透過経路はいずれも細胞膜の変形を伴う現象であることから、細胞膜の変形能の違いが細胞内移行機構と関連がある可能性が考えられる。

一方で、今回の検討においては R6W3 による細胞膜の変形を Amp-YFP を用いることでしか検討できていない。ナノメートルオーダーの細胞膜の変形を可視化することができる原子間力顕微鏡などを用いることによって、R6W3 により誘起されるエンドサイトーシスを経時的に可視化して細胞膜変形活性を明らかにする必要がある。

R6W3 により誘起されるエンドサイトーシスの機構に関して詳細な解析を行うことによって、細胞膜の曲率を検知するタンパク質の関与を検討する必要がある。これらのことを明らかにしたうえで、R6W3 を鋳型とする誘導体の細胞膜変形活性を評価することで、細胞膜を変形させる構造要因が明らかになることが期待される。

## 総括

本研究では、細胞膜の物性と細胞機能の関連に注目し、両親媒性ペプチドの細胞膜との相互作用による細胞膜の物性の変化を介する細胞機能制御に取り組んだ。第一章では、インフルエンザウイルス M2 タンパク質由来の両親媒性ペプチド M2[45-62] が細胞膜への挿入を介して膜張力を低下させ、細胞運動や神経細胞の形態に影響を及ぼすことを見出した。第二章では、人工的にデザインされた Arg と Trp から成る両親媒性ペプチド (R6W3) が、細胞膜の曲率の誘導を介してエンドサイトーシスを誘起可能であることを明らかにした。そして、両親媒性ペプチドが細胞膜の物性の操作を介して細胞機能を制御する有用なツールとなる可能性を示した。

## 実験の部

### 第一章

#### ペプチドの合成

ペプチドの合成に用いた Fmoc アミノ酸、*N*-hydroxybenzotriazole (HOBt)、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。ペプチドは全て C 末端アミド型とし、TGS-RAM 樹脂(島津製作所)を用いて PSSM-8 ペプチド固相合成機(島津製作所)によって自動合成した。NBD 標識体については、N 末端無修飾のペプチド樹脂に対して 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) (同仁化学研究所)を DMF 中で 24 時間反応させて合成した。樹脂からの切り出しと脱保護は、trifluoroacetic acid-ethanedithiol (95:5)で室温(～22 °C)下 3 時間処理することで行った。精製は、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)で行い、カラムは、ナカライテスク社の COSMOSIL <sub>5</sub>C<sub>18</sub>AR-II ならびに COSMOSIL <sub>5</sub>C<sub>4</sub>-AR-300 (10×250 mm)を用いた。

#### ペプチドの同定

精製したペプチドは、凍結乾燥後、マトリッ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)で質量を測定し、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、質量分析の結果は以下の通りである。

Bin1[8-33]: GVTAGKIASNVQKKLTRAQEKVLQKL-amide

MALDI-TOFMS: 2808.1 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2807.7]

M2[45-62]: RLFFKCIYRRFKYGLKRG-amide

MALDI-TOFMS: 2350.7 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2350.3]

Epsin[1-18]: XSTSSLRRQXKNIVHNYS-amide (X = Nle)

MALDI-TOFMS: 2115.5 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2115.2]

MIM[1-24]: XEAVIEKECSALGGLFQTIISDXK-amide (X = Nle)

MALDI-TOFMS: 2576.8 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2576.4]  
Arf1[1-17]: XGNIFANLFKGLFGKKE-amide (X = Nle)  
MALDI-TOFMS: 1895.2 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1895.1]  
dAmph[3-28]: ENKGIXLAKSVQKHAGRAKEKILQNL-amide  
MALDI-TOFMS: 2885.7 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2885.7]  
SH3YL1[9-23]: LKSEAKKAAKILREF-amide  
MALDI-TOFMS: 1731.3 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1731.0]  
M2-R: RLFFRCIYRRFRYGLRRG-amide  
MALDI-TOFMS: 2433.9 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2434.4]  
M2-K: KLFFKCIYKKFKYGLKKG-amide  
MALDI-TOFMS: 2237.9 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2238.3]  
NBD-Bin1: NBD-GVTAGKIASNVQKKLTRAQEKVLQKL -amide  
MALDI-TOFMS: 2970.4 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2970.7]  
NBD-M2: NBD-RLFFKCIYRRFKYGLKRG -amide  
MALDI-TOFMS: 2513.1 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2513.3]  
NBD-Epsin: NBD- XSTSSLRRQXKNIVHNYS-amide (X = Nle)  
MALDI-TOFMS: 2278.1 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2278.2]  
NBD-MIM: NBD- XEAVIEKECSALGGLFQTIISDXK-amide (X = Nle)  
MALDI-TOFMS: 2738.4 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2739.4]  
NBD-Arf1: NBD- XGNIFANLFKGLFGKKE-amide (X = Nle)  
MALDI-TOFMS: 2058.0 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2058.0]  
NBD-dAmph: NBD- ENKGIXLAKSVQKHAGRAKEKILQNL-amide  
MALDI-TOFMS: 3048.7 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 3048.7]  
NBD-SHYL1: NBD- LKSEAKKAAKILREF-amide  
MALDI-TOFMS: 1894.0 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1894.0]  
NBD-M2-R: NBD- RLFFRCIYRRFRYGLRRG-amide  
MALDI-TOFMS: 2596.9 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2597.4]  
NBD-M2-K: NBD- KLFFKCIYKKFKYGLKKG-amide  
MALDI-TOFMS: 2401.0 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2401.3]

## 細胞培養

アフリカミドリザル腎由来細胞の COS-1 細胞は 10% (v/v) 非働化ウシ胎児血清 (Invitrogen) 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。ヒト子宮頸部癌由来の HeLa 細胞は、10% (v/v) 非働化ウシ血清 (Invitrogen) を含むアルファ最小必須培地 ( $\alpha$ -MEM、和光純薬) 中で培養した。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ぐに継代を行った。

## 細胞生存率試験

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。COS-1 細胞を 96well マイクロプレート (Iwaki) に播種し ( $1.0 \times 10^4$  cells)、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 24 時間培養した。細胞がコンフルエントな状態で培地を除き、ペプチドを含む等張液 (100  $\mu$ L) 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 30 分間インキュベートした。ここに WST-1 試薬を 10  $\mu$ L 添加し、さらに 1 時間培養後、吸光度 ( $A_{450 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}$ ) を測定した。ペプチドを処理していない well の細胞生存率を 100 % として、各ペプチド濃度にて処理した際の細胞生存率を求めた。

## アクチン分布観察

COS-1 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し ( $3.0 \times 10^5$  cells)、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 4.5 時間培養した。次に、等張液にて希釈したペプチド溶液を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 15 分処理したのち、4% パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。0.1% TritonX-100 含有 phosphate buffered saline (-) (PBS(-): 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) により膜透過処理後、ローダミン・ファロイジン (Thermo Fisher Scientific) を用いて F-アクチンを特異的に染色し、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。

### Large unilamellar vesicle (LUV)の調製

ガラスバイアルに POPC/POPG/Chol = 4:1:2 のクロロホルム溶液を調製し、ロータリーエバポレーターで 30 分かけてバイアルの底面に脂質の薄膜を形成させた。一晚真空乾燥した後、PBS(-)を加えて 1 時間ほどかけて水和させ、凍結融解を 5 回繰り返した後、100 nm のポア径のポリカーボネートフィルター (Whatman) に脂質溶液を 21 回ずつ extrusion して調製した。Extrusion は、Avestin 製の Liposofast extrusion system を用いた。LUV の濃度は、LabAssay Phospholipid kit (和光純薬) を用いてコリン定量により推定した。

### NBD 標識ペプチドを用いたリポソームとの結合性の評価

96well アッセイプレート (Iwaki) に PBS(-) 中に 500 nM の NBD 標識ペプチドと各濃度の LUV を加えた。室温にて 15 分間インキュベートしたのち、NBD 由来の蛍光強度を測定した。Figure 1-7 については、波長 535 nm の蛍光強度を Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (Perkin Elmer) (励起波長 485 nm) で測定した。リポソーム非存在下における NBD 標識ペプチドの蛍光強度を基準として、LUV 存在下における蛍光強度を算出した。Figure 1-10 については、波長 530 nm の蛍光強度を VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader (Perkin Elmer) (励起波長 480 nm) で測定した。得られたデータについては、以下に示す Langmuir-type isotherm に Kaleida-Graph 4.1 を用いてフィッティングした。得られた  $F_{max}$  を基準として各脂質濃度における蛍光強度の相対値を求めた。

$F = F_{max}([L]/[L]_{1/2} + [L])$  ( $F$ : fluorescence intensity at a given added lipid concentration,  $F_{max}$ : the saturating intensity at high lipid concentrations,  $[L]$ : the lipid concentration,  $[L]_{1/2}$ : the lipid concentration that corresponds to binding half-saturation at  $F = F_{max}/2$ ) [49].

### NBD-M2、NBD-Arf1 の細胞膜との相互作用観察

COS-1 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュ (Iwaki) に播種し、( $3.0 \times 10^5$  cells)、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 4.5 時間培養した。培地を除去し、等張液で細胞を 2 回洗浄した後、細胞に等張液にて希釈したペプチド溶液を加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 15 分間処

理した。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、観察を行った。NBD-M2 を処理したサンプルについては、さらに最終濃度がジチオナイト(20  $\mu\text{M}$ )となるように等張液にて希釈したジチオナイト溶液(50  $\mu\text{L}$ )を加え、1 分間インキュベートしたのち、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。

### EGFP-FBP17、Lifeact-mCherry 共発現細胞における経時変化観察

COS-1 細胞を 35 mm ディッシュ(Iwaki)に播種し( $2.5 \times 10^5$  cells)、24 時間の培養後に、Lipofectamine LTX Reagent (Thermo Fisher Scientific)により、EGFP-FBP17、Lifeact-mCherry 発現ベクター (神戸大学 伊藤 俊樹 博士より供与)をトランスフェクションし、さらに 24 時間培養した。24 時間の培養後に COS-1 細胞を回収し、再度 35 mm ガラスボトムディッシュ(Iwaki)に播種し、4.5 時間培養した。培地を除去し、等張液で細胞を 2 回洗浄した後、細胞を等張液(150  $\mu\text{L}$ )で浸した。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化したと思われる 5 分後に、等張液で希釈したペプチド溶液(50  $\mu\text{L}$ )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 $\times$ , NA 1.35, oil)を用いた。

### FBP17 ノックダウン細胞のアクチン分布観察

COS-1 細胞を 35 mm ディッシュ(Iwaki)に播種し( $1.0 \times 10^5$  cells)、24 時間の培養後に、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific)により、20 nM の siRNA (GE Healthcare) (Ctr siRNA, D-001810-10; FBP17 siRNA, L-026214-02)を細胞に導入し、さらに 72 時間培養した。72 時間の培養後に COS-1 細胞を回収し、再度 35 mm ガラスボトムディッシュ(Iwaki)に播種し、4.5 時間培養した。次に、等張液にて希釈したペプチド溶液を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下で 15 分処理したのち、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。0.1% TritonX-100 含有 PBS(-)により膜透過処理後、ロー

ダミン・ファロイジン(Thermo Fisher Scientific)を用いて F-アクチンを特異的に染色し、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×、NA 1.35、oil)を用いた。

### Western Blot

COS-1 細胞を 35 mm ディッシュ (Iwaki) に播種し ( $1.0 \times 10^5$  cells)、24 時間の培養後に、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) により、20 nM の siRNA (GE Healthcare) (Ctr siRNA, D-001810-10; FBP17 siRNA, L-026214-02) を細胞に導入し、さらに 72 時間培養した。PBS(-) で 2 度洗浄した後、0.25% トリプシンで処理して、細胞を回収した。上清を遠心除去し、1% TritonX-100 含有 Tris Buffered Saline (TBS) により可溶化し、4°C、17000×g で 10 分遠心し、その上清を回収した。得られた細胞溶解液に 2×SDS sample buffer を等量加え、95°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(5-20% ポリアクリルアミドグラジエントゲル) で展開した後、セミドライ式ブロッティング法により polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に転写した。転写された PVDF 膜を 5% スキムミルク含有 0.1% Tween-20 含有 TBS (TBS-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% スキムミルク含有 TBS-T 中に抗 FBP17 抗体 (Santa Cruz) (1:200) 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。その後、horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Beckman Coulter) (1:5000) を 5% スキムミルク含有 TBS-T 中で反応させ、ECL Prime (GE Healthcare) で処理したのち、LAS-3000 (FUJIFILM) により化学発光を検出した。

### Real-Time PCR

COS-1 細胞を 35 mm ディッシュ (Iwaki) に播種し ( $1.5 \times 10^5$  cells)、24 時間の培養後に、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) により、20 nM の siRNA (GE Healthcare) (Ctr siRNA, D-001810-10; FBP17 siRNA, L-026214-02) を細胞に導入し、さらに 48 時間培養した。トータル RNA を RNeasy mini kit (Qiagen) により回収した。2 µg 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 PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific)により 7300 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)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。

### 光ピンセットによる膜張力測定

COS-1 細胞の膜張力測定は optical tweezers system (NanoTrackerTM2, JPK Instruments)を用いて行われた。シリカビーズ(1.5  $\mu\text{m}$ , Polysciences)に細胞膜を接着させたのち、5  $\mu\text{m}$  の長さになるように membrane tether を形成させた。Membrane tether を形成させるために必要な力、Tether force ( $F_{\text{tether}}$ )は Trap 中央部からのビーズの距離 ( $\Delta x$ )から以下の式を用いて求めた。

Hooke's law:  $F_{\text{tether}} = k\Delta x$  (k: trap stiffness,  $\Delta x$ : the displacement of the bead from the center of the trap). Trap stiffness (k, typically  $\sim 0.15$  pN/nm)は毎回の実験ごとに power spectrum analysis [50]による補正を行って求めた。

### Wound healing assay

COS-1 細胞を 35 mm ガラスボトムディッシュディッシュ (Iwaki) に播種し ( $4.0 \times 10^5$  cells)、24 時間の培養後に、培地を血清非含有 DMEM に交換し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 6 時間インキュベートした。10  $\mu\text{L}$  チップを使って、80-100%コンフルエントな細胞単層に創傷を与えたのち、細胞を血清非含有 DMEM で洗浄し、培地を除去した。その後、血清非含有 DMEM にて希釈したペプチド (M2[45-62]および M2-R)をそれぞれ加え、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 18 時間インキュベートした。共焦点顕微鏡 (FV1000, Olympus) によって、ペプチド添加直後と 18 時間後の細胞を観察し、顕微鏡画像から創傷部位を手動で囲ったのち、創傷の面積を ImageJ 1.47 (NIH)を用いて求めた。得られた創傷の面積を画像の縦幅で割ることによりペプチド添加直後と 18 時間後のそれぞれの創傷幅 ( $W_0$ ,  $W$ )を算出し、Migration length =  $(W_0 - W)/2$  となるように Migration length を算出した。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 (10×、NA 0.40、dry)を用いた。

#### Transwell migration assay

24well マイクロプレート(Iwaki)の各 well に  $\alpha$ -MEM(+)を加えた。 $\alpha$ -MEM(+)を加えた 24well マイクロプレートに Transwell filter (Coster, 8- $\mu$ m pore size)を設置した。M2[45-62]を含む  $\alpha$ -MEM(-)に 3 時間の starvation を行った HeLa 細胞を懸濁し( $2 \times 10^4$  cells)、Transwell filter に播種後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 6 時間インキュベートした。6 時間後に 24 well マイクロプレートに移行した細胞数を生細胞のエステラーゼによって分解を受けることで蛍光を発する calcein AM (Dojindo)を用いることで測定した。ペプチドを処理していない well における蛍光強度を 100%として、ペプチドにて処理した well の細胞数の割合を推定した。Calcein AM 由来の蛍光強度は波長 535 nm の蛍光強度を、Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (Perkin Elmer) (励起波長 485 nm)で測定した。

#### 初代培養神経細胞の細胞形態観察

胎生 18 日のラット脳海馬由来の初代培養神経細胞 ( $2 \times 10^4$  cells)を、カバーガラス (Matsunami)を設置した 24well マイクロプレートに播種し、10% ウシ胎児血清含有 Neurobasal medium (Thermo Fisher Scientific)中にて 3 時間培養したのち、M2[45-62]を含む B27 supplement 添加 Neurobasal medium 中で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 48 時間インキュベートした。その後、4%パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した。0.1% TritonX-100 含有 PBS(-)により膜透過処理後、神経細胞形態観察のため Tuj1 (Covance)を免疫染色したのち、観察を行った。軸索長については、細胞体から派生した最も長い神経突起を軸索としてその長さを測定した。神経突起からの分岐については、5  $\mu$ m よりも長い突起を有する箇所を神経突起からの分岐と定義し、1 つの神経細胞に存在する分岐数をカウントした。

## 第二章

### ペプチドの合成

ペプチドの合成に用いた Fmoc アミノ酸、*N*-hydroxybenzotriazole (HOBt)、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。ペプチドは全て C 末端アミド型とし、TGS-RAM 樹脂 (島津製作所)を用いて PSSM-8 ペプチド固相合成機 (島津製作所)によって自動合成した。TRITC 標識体については、N 末端無修飾のペプチド樹脂に対して *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA)存在下、TRITC (Thermo Fisher Scientific)を DMF 中で終夜反応させて合成した。NBD 標識体については、N 末端無修飾のペプチド樹脂に対して 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) (同仁化学研究所)を DMF 中で 24 時間反応させて合成した。得られたペプチドの樹脂からの切り出しと脱保護は、trifluoroacetic acid-ethanedithiol (95:5)で室温 (~22 °C) 下 3 時間処理することで行った。精製は、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC)で行い、カラムは、ナカライテスク社の COSMOSIL <sub>5</sub>C<sub>18</sub>AR-II、ならびに COSMOSIL <sub>5</sub>C<sub>4</sub>-AR-300 (10×250 mm)を用いた。

### ペプチドの同定

精製したペプチドは、凍結乾燥後、MALDI-TOF MS で質量を測定し、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、質量分析の結果は次の通りである。

#### R6W3: RRWWRRWRR-amide

MALDI-TOFMS: 1513.1 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1512.9]

#### Inverse-R6W3: RRWRRWRR-amide

MALDI-TOFMS: 1513.0 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1512.9]

#### R6DW3: RRwwRRwRR-amide

MALDI-TOFMS: 1512.9 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1512.9]

#### TRITC-R6W3: TRITC-GABA-RRWWRRWRR-amide

MALDI-TOFMS: 2040.7 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 2040.1]

#### NBD-R6W3: NBD-RRWRRWRR-amide

MALDI-TOFMS: 1675.8 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1675.9]

#### NBD-Inverse-R6W3: NBD-RRWRRWRR-amide

MALDI-TOFMS: 1676.0 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1675.9]

#### NBD-R6DW3: NBD-RRwwRRwRR-amide

MALDI-TOFMS: 1676.0 [calcd. for (M+H)<sup>+</sup>: 1675.9]

### 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 (Thermo Fisher Scientific)を含むアルファ最小必須培地 ( $\alpha$ -MEM、和光純薬)中で培養した。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。2-3 日ごとに継代を行った。

### 蛍光標識デキストランの細胞内移行量測定

HeLa 細胞を 24well マイクロプレート (Iwaki) に播種し ( $8.0 \times 10^4$  cells)、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。細胞が 80-90%コンフルエントの状態です。培地を除き、血清を含まない  $\alpha$ -MEM ( $\alpha$ -MEM(-)) で細胞を洗浄後、R6W3 と 50  $\mu$ g/mL の Alexa Fluor594-labeled dextran 10 kDa (Dex10-AF594) (Thermo Fisher Scientific) を含む  $\alpha$ -MEM(-) (200  $\mu$ L) を投与し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 30 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 (4°C、5 min、800 $\times$ g) し、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。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 (Thermo Fisher Scientific) により測定した。

### エネルギー枯渇条件における蛍光標識デキストランの細胞内移行量測定

HeLa 細胞を 24well マイクロプレート (Iwaki) に播種し ( $8.0 \times 10^4$  cells)、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。ATP 枯渇条件においては、細胞が 80-90%コンフルエントの状態です。培地を除き、PBS(-) に 1 mM CaCl<sub>2</sub> および 1 mM MgCl<sub>2</sub> を添加した溶液 (PBS(+))

で細胞を洗浄後、10 mM NaN<sub>3</sub>、10 mM デオキシ-D-グルコース含有 PBS(+)にて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で 15-25 分培養した。その後、培地を 20 μM の R6W3 と 50 μg/mL の Dex10-AF594 を含む、10 mM NaN<sub>3</sub>、20 mM デオキシ-D-グルコース含有 PBS(+) に交換し、さらに 30 分間培養した。低温 (4°C) での実験においては、細胞を α-MEM(-)で洗浄したのち、α-MEM(-)を加え、30 分間 4°C に置いた。その後、培地を 20 μM の R6W3 と 50 μg/mL の Dex10-AF594 を含む α-MEM(-)に交換し、さらに 30 分間 4°C 下で培養した。その後、上記と同様の方法にて細胞を回収し、各サンプル当たり 1 万個の細胞の蛍光量を Attune NxT (Thermo Fisher Scientific)により測定した。

#### 蛍光標識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 ( $2.5 \times 10^5$  cells)、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。細胞が 80-90%コンフルエントの状態では培地を除き、α-MEM(-)で洗浄後、20 μM の R6W3 と 100 μg/mL の Dex10-AF594 を含む α-MEM(-) (200 μL) を投与した。37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で 30 分間培養し、細胞を洗浄後、デキストランの細胞内局在観察を行った。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×、NA 1.35、oil) を用いた。

#### Amp-YFP 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 ( $2.0 \times 10^5$  cells)、CO<sub>2</sub> インキュベータ内で培養した。細胞が 70-80%コンフルエントの状態では、Lipofectamine LTX Reagent (Thermo Fisher Scientific) により、Amp-YFP 発現ベクター (Münster 大学 Milos Galic 博士より供与) を導入した。トランスフェクション後、24 時間後に α-MEM(-) で洗浄し、α-MEM(-) (150 μL) で細胞を浸し、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) 内に移した。細胞及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、最終濃度がそれぞれ R6W3、Inverse-R6W3、R6DW3 (20 μM) もしくは TRITC-R6W3 (2 μM) となるように α-MEM(-) にて希釈したペプチド溶液 (50 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。1 細胞当たりの Amp-YFP のドット状のシグナルの数の定量は Fiji/ImageJ 1.52 (NIH) を用いて Background のシグナルを除いたのち、Particle Analysis を行うことで測定した。

### Large unilamellar vesicle (LUV) の調製

ガラスバイアルに POPC/POPG = 9:1 のクロロホルム溶液を調製し、ロータリーエバポレーターで 30 分かけてバイアルの底面に脂質の薄膜を形成させた。一晩真空乾燥した後、PBS(-) を加えて 1 時間ほどかけて水和させ、凍結融解を 5 回繰り返した後、100 nm のポア径のポリカーボネートフィルター (Whatman) に脂質溶液を 21 回ずつ extrusion して調製した。Extrusion は、Avestin 製の Liposofast extrusion system を用いた。LUV の濃度は、LabAssay Phospholipid kit (和光純薬) を用いてコリン定量により推定した。

### NBD 標識ペプチドを用いたリポソームとの結合性の評価

96well アッセイプレート (Iwaki) に PBS(-) 中に 500 nM の NBD 標識ペプチドと各濃度の LUV を加えた。室温にて 15 分間インキュベートしたのち、波長 530 nm の蛍光強度を VICTOR Nivo Multimode Microplate Reader (Perkin Elmer) (励起波長 480 nm) で測定した。得られたデータについては、以下に示す Langmuir-type isotherm に Kaleida-Graph 4.1 を用いてフィッティングした。得られた  $F_{\max}$  を基準として各脂質濃度における蛍光強度の相対値を求めた。

$F = F_{\max}([L]/[L]_{1/2} + [L])$  ( $F$ : fluorescence intensity at a given added lipid concentration,  $F_{\max}$ : the saturating intensity at high lipid concentrations,  $[L]$ : the lipid concentration,  $[L]_{1/2}$ : the lipid concentration that corresponds to binding half-saturation at  $F = F_{\max}/2$ ) [49].

## 引用文献

1. Diz-Muñoz, A., Fletcher, D. A., and Weiner, O. D. Use the force: Membrane tension as an organizer of cell shape and motility. (2013) *Trends Cell Biol.* 23, 47–53.
2. McMahon, H. T., and Gallop, J. L. (2005) Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature* 438, 590–596.
3. Drin, G., and Antonny, B. (2010) Amphipathic helices and membrane curvature. *FEBS Lett.* 584, 1840–1847.
4. Pontes, B., Monzo, P., and Gauthier, N. C. (2017) Membrane tension: A challenging but universal physical parameter in cell biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* 71, 30–41.
5. Helfrich, W. (1973) Elastic properties of lipid bilayers: theory and possible experiments. *Z. Naturforsch C* 28, 693–703.
6. Keren, K., Pincus, Z., Allen, G. M., Barnhart, E. L., Marriott, G., Mogilner, A., and Theriot, J. A. (2008) Mechanism of shape determination in motile cells. *Nature* 453, 475–480.
7. Gauthier, N. C., Fardin, M. A., Roca-Cusachs, P., and Sheetz, M. P. (2011) Temporary increase in plasma membrane tension coordinates the activation of exocytosis and contraction during cell spreading. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 108, 14467–14472.
8. Boulant, S., Kural, C., Zeeh, J. C., Ubelmann, F., and Kirchhausen, T. (2011) Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* 13, 1124–1132.
9. Mogilner, A., and Oster, G. (1996) Cell motility driven by actin polymerization. *Biophys. J.* 71, 303–3045.
10. Tsujita, K., Takenawa, T., and Itoh, T. (2015) Feedback regulation between plasma membrane tension and membrane-bending proteins organizes cell polarity during leading edge formation. *Nat. Cell Biol.* 17, 749–758.
11. Batchelder, E. L., Hollopeter, G., Campillo, C., Mezanges, X., Jorgensen, E. M., Nassoy, P., Sens, P., and Plastino, J. (2011) Membrane tension regulates motility by controlling lamellipodium organization. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 108, 11429–11434.
12. Houk, A. R., Jilkine, A., Mejean, C. O., Boltyanskiy, R., Dufresne, E. R., Angenent, S. B., Altschuler, S. J., Wu, L. F., and Weiner, O. D. (2012) Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell* 148, 175–188.

13. Zegers, M. M., and Friedl, P. Translating membrane tension into cytoskeletal action by FBP17. (2015) *Dev. Cell* 33, 628–630.
14. Raucher, D., and Sheetz, M. P. (2000) Cell spreading and lamellipodial extension rate is regulated by membrane tension. *J. Cell Biol.* 148, 127–136.
15. Löw, C., Weininger, U., Lee, H., Schweimer, K., Neundorff, I., Beck-Sickinger, A. G., Pastor, R. W., and Balbach, J. (2008) Structure and dynamics of helix-0 of the N-BAR domain in lipid micelles and bilayers. *Biophys. J.* 95, 4315–4323.
16. Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P., and Lamb, R. A. (2010) Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell* 142, 902–913.
17. Pujals, S., Miyamae, H., Afonin, S., Murayama, T., Hirose, H., Nakase, I., Taniuchi, K., Umeda, M., Sakamoto, K., Ulrich, A. S., and Futaki, S. (2013) Curvature engineering: Positive membrane curvature induced by epsin N-terminal peptide boosts internalization of octaarginine. *ACS Chem. Biol.* 8, 1894–1899.
18. Saarikangas, J., Zhao, H., Pykäläinen, A., Laurinmäki, P., Mattila, P. K., Kinnunen, P. K., Butcher, S. J., and Lappalainen, P. (2009) Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr. Biol.* 19, 95–107.
19. Pasqualato, S., Renault, L., and Cherfils, J. (2002) Arf, Arl, Arp and Sar proteins: A family of GTP-binding proteins with a structural device for ‘front-back’ communication. *EMBO Rep.* 3, 1035–1041.
20. Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R., and McMahon H. T. (2004) BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495–499.
21. Hasegawa, J., Tokuda, E., Tenno, T., Tsujita, K., Sawai, H., Hiroaki, H., Takenawa, T., and Itoh, T. (2011) SH3YL1 regulates dorsal ruffle formation by a novel phosphoinositide-binding domain. *J. Cell Biol.* 193, 901–916.
22. Dai, J., and Sheetz, M. P. (1999) Membrane tether formation from blebbing cells. *Biophys. J.* 77, 3363–3370.
23. Hochmuth, R. M., Shao, J. Y., Dai, J., and Sheetz, M. P. (1996) Deformation and flow of membrane into tethers extracted from neuronal growth cones. *Biophys. J.* 70, 358–369.
24. Kenner, R. A., and Aboderin, A. A. (1971) New fluorescent probe for protein and nucleoprotein conformation. Binding of 7-(p-methoxybenzylamino)-4-nitrobenzoxadiazole to bovine trypsinogen and bacterial ribosomes. *Biochemistry* 10, 4433–4440.



25. Strahilevitz, J., Mor, A., Nicolas, P., and Shai Y. (1994) Spectrum of antimicrobial activity and assembly of dermaseptin-b and its precursor form in phospholipid membranes. *Biochemistry* 33, 10951-10960.
26. Yano, Y., and Matsuzaki, K. (2012) Membrane insertion and dissociation processes of a model transmembrane helix. *Biochemistry* 41, 12407–12413.
27. 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., and Wedlich-Soldner, R. (2008) Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat. Methods* 5, 605-607.
28. Futaki, S., and Nakase, I. (2017) Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization. *Acc. Chem. Res.* 50, 2449–2456.
29. Futaki, S., and Nakase, I. (2017) Cell-Surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization. *Acc. Chem. Res.* 50, 2449–2456.
30. Kramer, N., Walzl, A., Unger, C., Rosner, M., Krupitza, G., Hengstschläger, M., and Dolznig, H. (2013) In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat. Res.* 752, 10–24.
31. Katoh, H., Hiramoto, K., and Negishi, M. (2006) Activation of Rac1 by RhoG regulates cell migration. *J. Cell Sci.* 119, 56–65.
32. Parekh, R., and Ascoli, G. A. (2013) Neuronal morphology goes digital: a research hub for cellular and system neuroscience. *Neuron* 77, 1017–1038.
33. Katsuno, H., Toriyama, M., Hosokawa, Y., Mizuno, K., Ikeda, K., Sakumura, Y., and Inagaki, N. (2015) Actin migration driven by directional assembly and disassembly of membrane-anchored actin filaments. *Cell Rep.* 12, 648–660.
34. Colom, A., Derivery, E., Soleimanpour, S., Tomba, C., Molin M. D., Sakai, N., González-Gaitán, M., Matile, S., and Roux, A. (2018) A fluorescent membrane tension probe. *Nat. Chem.* 10, 1118–1125.
35. Galic, M., Jeong, S., Tsai, F. C., Joubert, L. M., Wu, Y. I., Hahn, K. M., Cui, Y., and Meyer, T. (2012) External push and internal pull forces recruit curvature-sensing N-BAR domain proteins to the plasma membrane. *Nat. Cell. Biol.* 14, 874–881.
36. Bassereau, P., Jin, R., Baumgart, T., Deserno, M., Dimova, R., Frolov, V. A., Bashkirov, P. V., Grubmüller, H., Jahn, R., Risselada, H. J., Johannes, L., Kozlov, M. M., Lipowsky, R., Pucadyil, T. J., Zeno, W. F., Stachowiak, J. C., Stamou, D., Breuer, A., Lauritsen, L., Simon, C., Sykes, C., Voth, G. A., and Weikl, T. R. (2018) The 2018 biomembrane curvature and remodeling roadmap. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 51, 343001.

37. Campelo, F., McMahon, H. T., and Kozlov, M. M. (2008) The hydrophobic insertion mechanism of membrane curvature generation by proteins. *Biophys. J.* 95, 2325–2339.
38. Harries, D., Ben-Shaul, A., and Szleifeo, I. (2004) Enveloping of charged proteins by lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* 108, 1491–149.
39. Delaroche, D., Aussedat, B., Aubry, S., Chassaing, G., Burlina, F., Clodic, G., Bolbach, G., Lavielle, S., and Sagan, S. (2007) Tracking a new cell-penetrating (W/R) nonapeptide, through an enzyme-stable mass spectrometry reporter tag. *Anal. Chem.* 79, 1932–1938.
40. Lamazière, A., Burlina, F., Wolf, C., Chassaing, G., Trugnan, G., and Ayala-Sanmartin, J. (2007) Non-metabolic membrane tubulation and permeability induced by bioactive peptides. *PLoS One* 2, e201.
41. Zhao, W., Hanson, L., Lou, H. Y., Akamatsu, M., Chowdary, P. D., Santoro, F., Marks, J. R., Grassart, A., Drubin, D. G., Cui, Y., and Cui, B. (2017) Nanoscale manipulation of membrane curvature for probing endocytosis in live cells. *Nat. Nanotechnol.* 12, 750–756.
42. Doherty, G. J., and McMahon, H. T. (2009) Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 78, 857–902.
43. Clarke, B. L., and Weigel, P. H. (1985) Recycling of the asialoglycoprotein receptor in isolated rat hepatocytes. Dissociation of internalized ligand from receptor occurs in two kinetically and thermally distinguishable compartments. *J. Biol. Chem.* 260, 128–133.
44. 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.
45. Derossi, D., Calvet, S., Trembleau, A., Brunissen, A., Chassaing, G., and Prochiantz A. (1996) Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271, 18188–18193.
46. Rothmund, S., Beyermann, M., Krause, E., Krause, G., Bienert, M., Hodges, R. S., Sykes, B. D., and Sönnichsen, F. D. (1995) Structure effects of double D-amino acid replacements: a nuclear magnetic resonance and circular dichroism study using amphipathic model helices. *Biochemistry* 34, 12954–12962.
47. Walrant, A., Bauzá, A., Girardet, C., Alves, I. D., Lecomte, S., Illien, F., Cardon, S., Chaianantakul, N., Pallerla, M., Burlina, F., Frontera, A., and Sagan, S. (2019)

- Ionpair- $\pi$  interactions favor cell penetration of arginine/tryptophan-rich cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1862, 183098.
48. Takeuchi, T., and Futaki, S. (2016) Current understanding of direct translocation of arginine-rich cell-penetrating peptides and its internalization mechanisms. *Chem. Pharm. Bull.* 64, 1431–1437.
  49. Qin, S., Pande, A. H., Nemeč, K. N., and Tatulian, S. A. (2004) The N-terminal alpha-helix of pancreatic phospholipase A2 determines productive-mode orientation of the enzyme at the membrane surface. *J. Mol. Biol.* 344, 71–89.
  50. Berg-Sørensen, K., and Flyvbjerg, H. (2004) Power spectrum analysis for optical tweezers. *Rev. Sci. Instrum.* 75, 594–612.



## 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 准教授)、廣瀬 久昭 博士(京都大学化学研究所 特定准教授)、武内 敏秀 博士(大阪大学医学研究科寄付講座 講師)に深く感謝致します。

第一章にて使用したプラスミドのご供与および膜張力測定にご協力いただきました伊藤 俊樹 博士(神戸大学バイオシグナル総合研究センター 教授)、辻田 和也 博士(神戸大学バイオシグナル総合研究センター 講師)、第一章の神経細胞形態観察にご協力いただきました稲垣 直之 博士(奈良先端科学技術大学院大学 教授)、馬場 健太郎 博士(奈良先端科学技術大学院大学 助教)、第一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 博士(武庫川女子大学薬学部 准教授)、第二章にて使用したプラスミドをご供与いただきました Milos Galic 博士(Münster 大学 Group Leader)に深く感謝致します。

また、本研究の実験に関して種々ご助言を賜りました川口 祥正 博士(現 塩野義製薬株式会社)、辻 将吾 博士(現 国立長寿医療研究センター)、村山 知 博士(現 警察庁)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(現 アストラゼネカ株式会社)、秋柴 美沙穂 博士(現 Helmholtz Zentrum München)、篠田 昂樹 博士(現 日本新薬株式会社)、博士論文のリバイスの実験にご協力いただきました西村 元希 君(修士 2 年)、許 惟媛 さん(修士 2 年)、そして、京都大学化学研究所 生体機能設計化学領域の皆様にご心より感謝致します。

また、本研究は、日本薬学会長井記念薬学研究奨励支援およびサントリー生命科学財団の援助によるものであり、改めて感謝致します。

最後に、私の研究活動を温かく見守り、支えて下さった方々に、心より深く感謝申し上げます。