

氏 名	なか せ いく ひこ 中 瀬 生 彦
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 570 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	塩基性キャリアペプチドの細胞内移行メカニズムとキャリアペプチドを用いた生理活性物質の細胞内導入に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 杉 浦 幸 雄 教 授 松 崎 勝 巳 教 授 高 倉 喜 信

論 文 内 容 の 要 旨

序論 細胞内へタンパク質や核酸、リボソーム等を導入する手法として、塩基性ペプチドを細胞内導入キャリアとして応用した例が数多く報告されている。代表的な塩基性ペプチドとして、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1TatおよびRevタンパク質由来のペプチド[それぞれ Tat (48-60), Rev (34-50)], さらに8残基のアルギニンからなるペプチド(R8)が知られている。近年、細胞固定による影響や、ペプチドが細胞表面に非常に強く吸着しやすいといった原因で、Tatペプチドの細胞内移行機序に関して誤った判断がなされていたことが指摘されるようになった。しかし、一方では塩基性ペプチドをキャリアとして用いることで、様々な生理活性物質を細胞内へ導入させることが可能であり、細胞内でそれらの活性上昇を確認した研究が、*in vitro* および *in vivo* の実験で数多く報告されている。そこで、塩基性ペプチドを用いた細胞内導入法のより広い分野での応用を目指し、塩基性ペプチドの細胞内移行メカニズムに関する基礎的な知見を得ることを目的として、生細胞を用いて以下の実験を行った。

第一章 生細胞を用いた塩基性キャリアペプチドの細胞内移行機序の検討

Fluorescein ラベルした L 体および D 体の R8 (それぞれ R8-fl, ρ R8-fl) について、それらの細胞内移行量を 37°C とエンドサイトーシスが阻害される 4°C の条件で比較した。HeLa 細胞にて FACS を用いて検討した結果、37°C の条件に比べて、4°C では R8-fl, ρ R8-fl の細胞内移行量が、それぞれ 39%, 31% 低下し、これらのペプチドの細胞内移行におけるエンドサイトーシスの関与が示唆された。マクロピノサイトーシス阻害剤の 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amirolide (EIPA) を用いて R8 の細胞内移行への影響について調べた結果、R8 は EIPA 処理によって 31% の移行量低下が認められた。エンドサイトーシスで細胞に取り込まれるトランスフェリンの場合は、EIPA による影響はほとんど無いことが確認された。マクロピノサイトーシスが生じるとき、細胞形質膜がアクチンの動きに伴い波打ち構造を呈することが報告されていることから、R8 の細胞への投与によるアクチン骨格への影響を調べた結果、葉状仮足様の変化が多くの細胞で観察された。16残基のアルギニンからなるペプチド(R16)の細胞内移行についても検討した結果、EIPA 処理により 54% の移行量低下が認められ、また葉状仮足様のアクチン骨格が R8 の場合と比較してより多くの細胞で確認された。

第二章 塩基性キャリアペプチドを用いた非共有結合複合体の細胞内導入と生理活性の検討

RNase S は、非共有結合的な複合体を形成する二つのサブユニット (S-peptide と S-protein) で構成されるタンパク質であり、S-peptide と S-protein が複合体を形成することで RNase 活性を示すことが知られている。そこで、塩基性キャリアペプチドと S-peptide を架橋し、それらと S-protein との複合体が細胞内へ移行するか検討した。本実験では塩基性キャリアペプチドとして、R8, ρ R8, Tat (48-60) のならびに Rev (34-50) を用いた。S-peptide とローダミンラベルした S-protein の複合体について細胞内移行を検討した結果、塩基性ペプチドを架橋していない RNase S は移行効率が低いものに対して、塩基性ペプチドを架橋した RNase S は細胞核周辺への集積が点状の蛍光シグナルとして観察された。Rev ペプチドは RNA 結合ペプチドとしても知られており、*in vitro* の実験で Rev ペプチドを架橋した RNase S が、HIV-1 由来

の RNA (Revresponse element) を認識し、切断することも報告されている。また、Tat や 9 残基のアルギニンからなるペプチドも HIV-1 由来の RNA (trans-activation responsive region) を特異的に認識することも報告されている。そこで、これらの RNase S について抗 HIV 活性を検討した。HeLaCD4-LTR/ β -gal を用いた MAGI アッセイで抗 HIV 活性を調べた結果、EC₅₀ (ウイルスの複製が 50% 抑制される濃度) は 1 μ M 程度であるが、確実にウイルス増殖を抑制し、また time-of-drug-addition assay でこれらの作用点が、ウイルスの細胞への吸着と、ウイルス RNA の逆転写の間にあることを確認した。塩基性ペプチドと架橋していない RNase S は、100 μ M において抗 HIV 活性をほとんど確認できなかった。これらの結果から、RNase S に塩基性ペプチドを導入することで、非共有結合的な複合体の構造を維持したまま細胞質へ移行し、抗 HIV 活性を示していることが示唆された。

第三章 塩基性キャリアペプチドによる Ni (II) 錯体を介したヒスチジンタグ融合ペプチド・タンパク質の細胞内導入に関する検討

遺伝子組み換えタンパク質の精製に利用される約 6 残基のヒスチジン (His-tag) と Ni (II) カラムとの錯体形成に着目し、この原理を利用した塩基性キャリアペプチドと His-tag を有するアポトーシス誘導ペプチド (pro-apoptotic domain, PAD) ならびに緑色蛍光タンパク質 (EGFP) との非共有結合複合体の細胞内導入について検討した。C 末端に N-(5-amino-1-carboxypentyl)-iminodiacetic acid を導入した R8 に Ni (II) を加えた後、His-tag を有する PAD を加えて複合体の細胞内移行とアポトーシス活性について検討した結果、塩基性キャリアペプチドと Ni (II) 錯体を介することでアポトーシス活性が上昇する結果が得られた。また同様の手法により EGFP も細胞内に効率的に導入できた。

本研究の結果は、塩基性キャリアペプチドの詳細な細胞内移行機序についての知見を提供し、様々な生理活性物質・薬物の細胞内導入法の開発に有益な情報となりうると考えられる。

論文審査の結果の要旨

細胞内へタンパク質や核酸、リポソーム等を導入する手法として、ヒト免疫不全ウイルス (HIV)-1 Tat および Rev タンパク質由来のペプチド、Antennapedia 由来の penetratin ペプチド、さらに 8 残基のアルギニンからなるペプチド (R8) といった塩基性ペプチドを、細胞内導入キャリアとして応用した例が数多く報告されている。本研究では、細胞固定を行わず生きてきたままの細胞を用いて、塩基性ペプチドの細胞内移行機序の詳細な再検討を行い、細胞に塩基性ペプチドを投与することで、ペプチドがどの様に細胞内へ取り込まれ、細胞内を輸送されるのかに関して実験を行った。また、塩基性ペプチドを用いて非共有結合複合体を細胞内へ導入できるか検討した。

R8 ペプチドの細胞内移行経路について検討した結果、エンドサイトーシスで細胞内へ取り込まれ、微小管を介して細胞内をトラフィックしていることが明らかとなった。マクロピノサイトーシス阻害剤を用いて、ペプチドの細胞内移行への影響について調べた結果、R8 ペプチドの細胞内移行量は阻害剤処理によって 31% の低下が認められた。また、R8 ペプチドを細胞に投与することにより、葉状仮足様の細胞形態変化が多く細胞で観察された。以上の結果より、R8 ペプチドがマクロピノサイトーシス経路で細胞内に取り込まれ、またアクチン骨格へも影響を与えているといった新しい知見が得られた。Penetratin ペプチドについて細胞内移行を検討した結果、R8 ペプチドの場合とは異なり、マクロピノサイトーシス阻害剤では細胞内移行に影響を与えないことが明らかとなったことから、塩基性キャリアペプチドの種類によって、それぞれ細胞内移行経路が異なることが示唆された。

RNase S は、非共有結合的な複合体を形成する二つのサブユニット (S-peptide と S-protein) で構成されるタンパク質であり、塩基性ペプチド [Tat(48-60), Rev(34-50), R8] と S-peptide を架橋し、それらと S-protein との複合体に関して細胞内移行について検討した結果、いずれの RNase S も細胞内移行量が増大した。Rev および Tat ペプチドは、HIV-1 由来の RNA を認識することが報告されている。そこで、これらの RNase S について、抗 HIV 活性を HeLa CD4-LTR/ β -gal を用いた MAGI アッセイで調べた結果、EC₅₀ は 1 μ M 程度であるが確実にウイルス増殖を抑制し、これらの作用点が、ウイルスの細胞への吸着と、ウイルス RNA の逆転写の間にあることを確認した。

Ni(II) と錯体を形成する R8 ペプチドをデザインし、このペプチド誘導体と His-tag 融合タンパク質との複合体について、細胞内への導入効率を調べた。His-tag 融合緑色蛍光タンパク質 (EGFP) およびアポトーシス誘導ペプチド (PAD) を用

いて検討した結果、EGFPの細胞内移行量の増加およびPADのアポトーシス活性の上昇が確認された。

以上、本研究は、塩基性キャリアペプチドの細胞内移行機序に関して、新たなメカニズムを解明し、非共有結合複合体も塩基性ペプチドを用いて構造を保持させたまま細胞内へ導入できることを明らかにした。キャリアペプチドの特性を考慮することで、より有用かつ効率的な細胞内導入法の開発が期待でき、本研究結果はこれらに対する有益な知見を示したと考えられる。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成17年3月1日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。