

京都大学	博士（薬学）	氏名	片山 沙綾香
論文題目	アルギニンペプチドの細胞膜集積化と膜透過促進		
（論文内容の要旨） アルギニンを多く含む膜透過性ペプチド（アルギニンペプチド）は、細胞内への物質送達におけるツールとして利用されてきているが、このような正電荷に富む分子が生細胞内へ効率良く取り込まれる機序に関しては不明の点が多い。アルギニンペプチドの細胞内への取込には、エンドサイトーシスを介する経路と、細胞膜（形質膜）の直接透過の二つが主に考えられるが、いずれの経路においても、アルギニンペプチドに連結された細胞内導入物質は、最終的には膜を透過し、サイトゾルに至る必要がある。本研究では、第一に、アルギニンペプチドへの疎水性基の付加による細胞膜透過の効率の向上について検討を行った。第二に、直接膜透過に寄与する膜側の要因やペプチドとの相互作用様式について、モデル膜と分光学的手法を用いて検討した。			
第一章 疎水性基の導入によるアルギニンペプチドの膜集積性の向上 これまでの研究において、アルギニンペプチドが細胞膜上に高効率で集積することが、膜透過を可能とする要因の一つであることが分かっている。本章では、細胞膜との親和性をさらに高める観点から、N末端を様々な長さの直鎖飽和型脂肪酸で修飾したオクタアルギニン（R8）の細胞内移行効率の比較を行った。その結果、炭素数6のヘキサン酸で修飾したR8（Hexanoyl-R8）を細胞へ投与すると、顕著な細胞毒性を示す事なく速やかにサイトゾル内へ拡散することが分かった。炭素数4の酪酸で修飾した場合はペプチドの効率的なサイトゾル移行が見られず、炭素数10、14、18の脂肪酸で修飾した場合は溶解性や細胞毒性などの問題が生じたことから、膜傷害性を低く保ちつつ高い膜透過性を達成するためには、適度の疎水性をアルギニンペプチドに付与することが重要であることが示唆された。本ペプチドは、より生体内条件に近い血清存在下でもその効力を発揮でき、また、細胞膜非透過性の蛍光小分子化合物に加え、比較的小型のタンパク質のサイトゾル送達へも応用可能であることがわかった。また、エンドサイトーシスとともに直接膜透過により細胞内移行が行われることが示唆された。			
第二章 アルギニンペプチドの直接膜透過に寄与する相互作用様式の検討 本章では、アルギニンペプチドの膜への集積と直接透過に寄与する細胞膜側の要因やペプチドとの相互作用様式について、モデル膜（Large Unilamellar Vesicle (LUV)、Giant Unilamellar Vesicle (GUV)）と分光学的手法を用いて検討した。細胞膜においては、脂質ラフトなどの流動性の低い領域と、それ以外の流動性の高い領域との共存が示唆されていることを考慮し、Liquid disordered phase (Ld相) とLiquid ordered phase (Lo相) の共存する状態を模したGUVの共焦点顕微鏡観			

察を行ったところ、Hexanoyl-R8は、酸性脂質DOPSを含むLd相に優先的な吸着を示した。また、その吸着速度はR8に比べて有意に大きかった。さらに、Hexanoyl基の導入によりR8のGUV内移行も促進されたことから、Hexanoyl-R8の直接膜透過が、脂質膜の流動性の高いLd相で優先的に行われる可能性が示唆された。生細胞でのアルギニンペプチドの直接膜透過による細胞内流入は細胞膜全体で起こるのではなく局所的に起こる事が観察されていることから、より流動性の高い膜領域における局所的なペプチド濃度の上昇と膜不安定化が、ペプチドの直接膜透過に寄与している可能性がある。

脂肪酸修飾と同じくR8の直接膜透過を促進する手法として、疎水性対アニオンであるピレンブチレート (PyB) を添加する手法が報告されている。PyBによりアルギニンペプチドの膜集積性が向上するかどうかに関して同様の検討を行ったところ、PyB存在下、R8はDOPSを含むLd相へ優先的に集積することが分かった。また、PyBによりR8のGUV内への移行が加速されることも明らかとなり、PyB存在下においても、DOPSを含むLd相への集積が、膜透過に寄与する可能性が示唆された。そこで、R8の膜集積と膜透過に関するPyBの役割に関して更に検討を行った。

PyBは界面活性作用を持ちうるが、PyBの添加によるGUVにおける相分離の解消は認められなかった。また、LUV膜に組み込まれたDPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) の蛍光偏光測定や、LUVからのcarboxyfluoresceinの漏出試験から、PyBは顕著な膜の流動性の変化や膜傷害を誘起しないことが示唆された。一方、BODIPY FL修飾したR8の蛍光異方性解析を行ったところ、酸性LUVの添加とPyB添加によって顕著な異方性の増大が見られた。これは、負電荷を帯びた膜表面においてR8とPyBの相互作用がより効率良く起こった可能性を示している。また、励起状態PyB分子の近接を示すエキシマー蛍光がLUV添加により観察されたが、LUV存在下R8をさらに添加してもエキシマーの増大は認められなかった。このことから、膜中でPyBがカルボキシル基のクラスターを形成することにより、アルギニンペプチドの膜集積を促進し、膜透過が促進される可能性が示唆された。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、アルギニンを多く含む膜透過性ペプチド(アルギニンペプチド)の直接膜透過を促進する手段として、細胞膜(形質膜)表面へのペプチド集積化に着目し、ペプチドの疎水性基による修飾がその細胞内移行にもたらす効果を検討すると共に、直接膜透過に寄与する脂質膜とペプチドとの相互作用様式について、モデル膜と分光学的手法を用いて検討した。

第一章においては、オクタアルギニン(R8)のN末端を直鎖飽和型脂肪酸で修飾し、親水性の高いアルギニンペプチドと細胞膜との親和性を高め、ペプチドの膜集積化、さらには、膜透過の促進を図った。その結果、炭素数6のヘキサン酸で修飾したR8(Hexanoyl-R8)が、生体内条件に近い血清存在下でも、顕著な細胞毒性を示すことなく、速やかにサイトゾル内へ拡散することを見出すとともに、その機序として細胞膜直接透過が関わっていることを示した。また、Hexanoyl-R8が細胞膜非透過性分子の細胞内送達ツールとして応用可能であることを見出した。

第二章では、Giant Unilamellar Vesicle(GUV)を用いた検討から、Hexanoyl-R8が酸性脂質DOPSを含むLiquid disordered phase(Ld)相へ優先的に効率良く吸着し、これに伴いペプチドのGUV内移行も促進されることを示し、Hexanoyl-R8の直接膜透過が、脂質膜の流動性の高いLd相へ局所的に集積化することにより促進される可能性を指摘した。

次に、疎水性対アニオンであるピレンブチレート(PyB)を添加する系について検討を行い、GUV観察とLarge Unilamellar Vesicle(LUV)存在下のR8の蛍光異方性解析より、PyBによるR8の膜集積化には脂質膜中の負電荷を帯びた脂質と共存することが重要であることを示した。また、PyBそのものにはGUV膜でのポア形成能や強い膜傷害性は認められないものの、PyB添加によってGUV膜の相分離状態が解消されことを指摘した。また、LUVの脂質膜流動性の検討により、PyBがコレステロールなどを含む負電荷を帯びた膜の流動性を上昇させる能力があることを指摘した。さらに、PyB分子のエキシマー蛍光の観察から、脂質膜中に濃縮されたPyBがR8の集積に寄与する可能性を示した。

以上、本論文は、アルギニンペプチドの直接膜透過を促進する手法と、これに関わる因子を明らかにしたものであり、細胞内への効率的な分子導入において重要な知見を提供しうるものと考えられる。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成25年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

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

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降