

バイオ高分子の細胞内取り込みに影響を与える
細胞因子に関する研究

2024

栗山 理志

目 次

略語表.....	1
緒言.....	3
第 1 章 EGF 誘導型 MPC における Piezo1 の寄与.....	5
序論.....	5
第 1 節 Yoda1 による Piezo1 活性化による MPC 阻害	6
第 2 節 ラッフリングと Rac1 活性に対する Piezo1 活性化の影響.....	12
第 3 節 Piezo1 活性化による MPC 阻害に対する細胞外 Ca^{2+} の影響	17
第 4 節 Piezo1 活性化による MPC 阻害に対する KCa3.1 の影響	19
討論と展望.....	22
第 2 章 L17E による細胞内送達における KCa3.1 の寄与	24
序論.....	24
第 1 節 L17E によるサイトゾル送達の主要経路の検討	25
第 2 節 異なる細胞株における L17E によるサイトゾル送達活性の評価.....	28
第 3 節 L17E 活性の決定因子としての KCa3.1 の同定.....	30
第 4 節 L17E によるサイトゾル送達への膜電位の関与	37
第 5 節 L17E によるサイトゾル送達への細胞内 Ca^{2+} の関与.....	41
第 6 節 生物活性バイオ高分子の細胞内送達への KCa3.1 の影響	46
討論と展望.....	48
第 3 章 L17E による細胞内送達における ANXA2 の寄与	50
序論.....	50
第 1 節 同一細胞株内における L17E 活性の多様性の確認.....	51
第 2 節 L17E 活性の負の制御因子としての ANXA2 の同定	52
第 3 節 CPP のサイトゾル移行に対する膜電位および膜修復の関与.....	57
討論と展望.....	63
総括.....	65
実験の部.....	66
第 1 章の実験.....	66
第 2 章の実験.....	73
第 3 章の実験.....	83
発表論文.....	91
参考文献.....	92
謝辞.....	103

略語表

AF488	Alexa Fluor 488
AF568	Alexa Fluor 568
ANXA1	Annexin A1
ANXA2	Annexin A2
ANXA4	Annexin A4
ANXA5	Annexin A5
BS	bovine serum
CaM	calmodulin
CCL	Cancer Cell Line Encyclopedia
CHC	clathrin heavy chain
CLSM	confocal laser scanning microscope
CME	clathrin-mediated endocytosis
CPP	cell-penetrating peptide
CPZ	chlorpromazine
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DDS	drug delivery system
dex10	dextran (10 kDa)
dex70	dextran (70 kDa)
DIC	differential interference contrast
DIEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMSO	dimethyl sulfoxide
Dox	doxycycline
EDT	1,2-ethanedithiol
EGF	epidermal growth factor
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EIPA	5-(<i>N</i> -ethyl- <i>N</i> -isopropyl)amiloride
ESCRT	endosomal sorting complex required for transport
FITC	fluorescein isothiocyanate
F-actin	filamentous actin
HBSS	Hanks' balanced salt solution
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography

IgG	immunoglobulin G
KCNN4	potassium calcium-activated channel subfamily N member 4
KD	knockdown
KO	knockout
MALDI-TOF-MS	matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry
MPC	macropinocytosis
NHE	Na ⁺ /H ⁺ exchanger
NPC	nuclear pore complex
OE	overexpression
PBS	phosphate buffered saline
Pen	penetratin
PI	propidium iodide
PIPs	phosphoinositides
Puro	puromycin
PVDF	polyvinylidene difluoride
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SE	standard error
sgRNA	single guide RNA
siRNA	small interfering RNA
TFA	trifluoroacetic acid
Tfn	transferrin
Tg	thapsigargin
TMR	tetramethylrhodamine
TPM	transcripts per million
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
WT	wild type
α-MEM	α-minimum essential medium

緒 言

抗体は分子認識力が高く、特定のターゲットに対して高い特異性を示すことから、創薬モダリティとして近年注目を集めている^{1,2}。しかし、抗体は分子量が大きく、親水性の高い物理化学的特性を有するため、細胞膜を透過することが困難であり、現時点で認可されている抗体医薬品の標的は主に細胞外分子に限られている^{3,4}。一方で、細胞内には潜在的な薬のターゲットが多く存在する^{5,6}。抗体をはじめとするバイオ高分子の標的を細胞内にまで拡張することを目的として、抗体を含むタンパク質・ペプチドや遺伝子・mRNA・医薬品核酸、さらにはこれらの生物活性バイオ高分子を内包するナノ粒子の細胞内への導入方法が広く研究されてきた⁷⁻¹¹。

細胞内送達の手法は、大きくエンドサイトーシスを利用する経路と、細胞膜を介してサイトゾルに直接移行する経路の二つに分類される (Figure 0)。エンドサイトーシスを利用する経路では、細胞外物質が非選択的または積極的にエンドサイトーシスによって取り込まれ、エンドソームへと移行した後に、その一部がエンドソームから漏出するプロセス (エンドソーム脱出) を経てサイトゾルへと到達する¹²⁻¹⁵。この経路では、エンドサイトーシスによる取り込みの効率とエンドソーム脱出の効率が、薬物の細胞内送達量を制限する主要因となる^{16,17}。クラスリン依存性やカベオラ依存性のエンドサイトーシスにより形成されるエンドソームは直径約 100 nm と小さく、取り込むことのできるカーゴ量に限界がある。このため、近年ではマクロピノサイトーシス (MPC) というエンドサイトーシス経路が注目されている。MPC は通常のエンドサイトーシスと比較して大規模であり、形成されるエンドソーム (マクロピノソーム) の直径は数 μm に及ぶ場合もある¹⁸。これまでに、様々な細胞内送達システムに MPC が関与していることが報告されており¹⁹⁻²²、MPC を人為的に誘導して液相取り込みを促進することで生物活性バイオ高分子を細胞内に導入する試みも行われている²³。

細胞膜を介してサイトゾルに直接移行する経路では、薬物がエンドソームを介さずにサイトゾルへと到達することで、速やかに生物活性を発揮できる。この経路を利用する手法として、エレクトロポレーションによる細胞膜上での一時的な孔の形成や^{24,25}、タンパク質のエステル化による膜透過性の向上²⁶などの方法がある。中でも、細胞膜透過ペプチド (CPP) の利用は広く研究されており、HIV-1 Tat タンパク質由来のペプチド (TAT: GRKKRRQRRRPPQ)²⁷、オリゴアルギニン (R8: RRRRRRRR など)^{28,29}、およびショウジョウバエ *Antennapedia* 由来の Penetratin (Pen: RQIKIWFQNRRMKWKK)³⁰などが CPP として機能することが報告されている。CPP は化学的修飾や複合体形成によってタンパク質やペプチドなどを細胞内へと導入できる。また、筆者の所属研究室では、溶血性ペプチドの細胞毒性を低減させることで、細胞膜を介したサイトゾルへの直接移行による細胞内送達を可能とする新規ペプチド L17E を開発し、抗体の短時間かつ簡便なサイトゾル送達を実現している³¹。

このように、生物活性バイオ高分子の細胞内送達を実現するために多くの手法が研究されてきたが、既存の送達手法を臨床応用するためには、送達効率や特異性の低さなど、依然として多くの課題が残されている^{32,33}。その要因の一つとして、それぞれの送達手法のメカニズムが十分に解明されていないことが挙げられる。特に、細胞内送達に影響する細胞側の特性についての理解が

不十分であることが課題となっている。したがって、より有用な送達手法の開発に向けて、これらの細胞内送達経路の分子基盤を解明することが必要不可欠である。

本研究では、上皮成長因子（EGF）によって誘導される MPC と、筆者の所属研究室で開発された細胞内送達ペプチド L17E を用いた細胞内送達法に着目し、これらの系を利用した細胞外物質の取り込みに影響を与える細胞因子の特定を目指した。第 1 章では、機械受容チャネル Piezo1 を活性化させることで EGF 誘導型 MPC が抑制されることを発見した。第 2 章では、カルシウム活性化カリウムチャネル KCa3.1 が L17E による細胞内送達に重要な役割を果たすことを明らかにした。第 3 章では、膜修復タンパク質である ANXA2 が L17E 活性を抑制的に制御することを見出した。

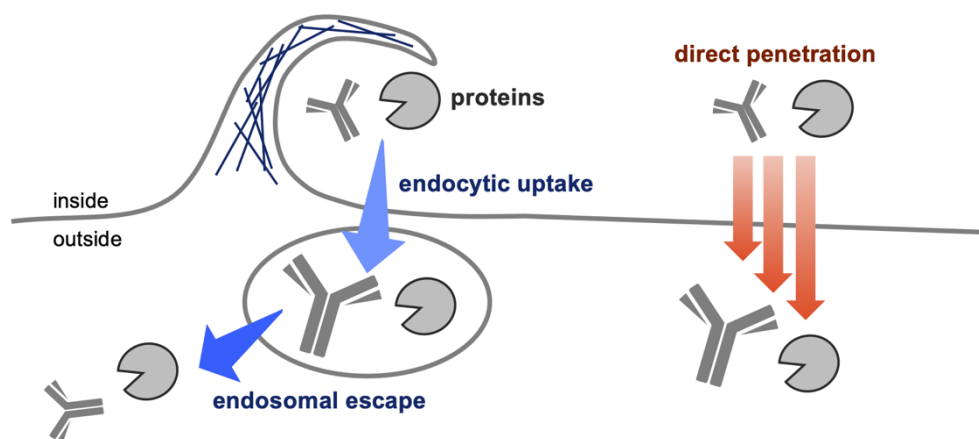


Figure 0. Two major pathways for intracellular delivery of macromolecules. Endocytic uptake (e.g., clathrin- or caveolae-mediated endocytosis and macropinocytosis) internalizes extracellular cargo, with endosomal escape releasing them into the cytosol. Direct penetration allows cargos to bypass endosomes and directly enter the cytosol.

第1章

EGF 誘導型マクロピノサイトーシスにおける Piezo1 の寄与

序論

マクロピノサイトーシス (MPC) は、エンドサイトーシスの一種であり、アクチンの再構成によって引き起こされる細胞膜の波状の動き (膜ラッフル) と、それに続くラッフルの閉鎖による小胞 (マクロピノソーム) の形成を介して細胞外物質を非選択的に取り込む経路である³⁴⁻³⁶。マクロピノソーム (直径0.2~10 μm) は、他のエンドサイトーシス経路で形成されるエンドソーム (直径約100 nm) に比べて著しく大きいため、アミノ酸やタンパク質を含む細胞外液を大量に取り込むことが可能である^{18,36}。近年、細胞内薬物送達の観点から、MPCは抗体やタンパク質、核酸類などの生物活性バイオ高分子、あるいはこれらを内包する種々のナノ粒子を効率よく取り込む経路として注目されており、MPCを人為的に制御する研究が進められてきた^{17,22}。したがって、MPCの作動原理を理解することは、分子生物学的な意義を持つだけでなく、薬物送達技術の発展にも寄与することが期待される。しかし、MPCに特異的に機能するタンパク質や脂質は十分に特定されておらず、有用なMPC阻害剤はほとんど存在しない³⁷。そのため、MPCの新たな制御方法の発見と開発が求められている。

MPC は、例えば上皮成長因子 (EGF) の刺激によって誘導される。EGF 刺激は、EGF 受容体 (EGFR) を介してホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) や低分子量 GTPase である Rac1 を活性化し、これによってアクチンの再構築とホスホイノシチド (PIPs) の段階的な変換が引き起こされる。これらのプロセスによって、膜ラッフルの誘導、ラッフルの閉鎖、そしてマクロピノソームの形成が促進される³⁸。このように、MPC はアクチン重合や大規模な膜変形を伴うことが知られているが、細胞膜に生じる機械的な力を感知する機械受容チャネル^{39,40}や、細胞内シグナル伝達における重要なセカンドメッセンジャーである Ca^{2+} が MPC に与える影響については、これまでほとんど報告されていない⁴¹。そこで、第1章では、代表的な機械受容応答性カルシウムチャネルである Piezo1^{42,43}に着目し、Piezo1 の活性化が MPC に与える影響について調べた。

Piezo1 アゴニスト Yoda1⁴⁴ の存在下で、A431 細胞における EGF 誘導型 MPC が強力に阻害されることを確認した。Piezo1 ノックアウト (KO) A431 細胞においては、Yoda1 存在下でも MPC 阻害が見られず、さらに野生型 A431 細胞と比較して MPC 活性が約 30% 増加していた。次に、Yoda1 による Piezo1 活性化が MPC におけるラッフル形成に及ぼす影響を検討したところ、Yoda1 存在下では EGF によって誘導されるラッフルリングやこれに先立つ Rac1 の活性化が抑制されることが明らかとなった。また、Yoda1 による MPC 阻害には細胞外 Ca^{2+} が必須であったことから、Piezo1 を介した Ca^{2+} 流入によって MPC が阻害されることが示された。Piezo1 の下流で機能する分子として KCa3.1 チャネル⁴⁵に着目したところ、KCa3.1 の阻害剤処理によって Yoda1 によるラッフルリング抑制が解除されることが確認された。

第 1 節 Yoda1 による Piezo1 活性化による MPC 阻害

本研究では、上皮成長因子受容体 (EGFR) を高発現し、EGF刺激によってマクロピノサイトーシス (MPC) を誘導可能なヒト表皮癌細胞株A431を使用した。A431細胞におけるEGF誘導型MPCの活性は、マクロピノソームマーカーであるTMR標識70 kDaデキストラン (TMR-dex70) の細胞内取り込み量を指標として、フローサイトメトリーおよび顕微鏡観察により評価することができる⁴⁶。A431細胞をTMR-dex70と共にインキュベートしたところ、EGF存在下では、EGF非存在下と比較して、TMR-dex70の細胞内取り込みが顕著に増加した (Figures 1-1A, B)。Piezo1の活性化がEGF誘導型MPCに及ぼす影響を評価するため、Piezo1アゴニストであるYoda1をEGFおよびTMR-dex70と共処理したところ、Yoda1は濃度依存的にEGFによるTMR-dex70取り込みを抑制し、1.5 μ Mの濃度ではTMR-dex70取り込みがほぼ完全に抑制されることが確認された (Figures 1-1A, B)。次に、Yoda1がMPCを特異的に抑制しているかを確認するために、クラスリン依存性エンドサイトーシス (CME) 経路によって取り込まれるトランスフェリン (Tfn) の取り込みへのYoda1の影響を検討した。Yoda1は、A431細胞へのAlexa Fluor 568標識Tfnの取り込みを有意に抑制したが、その低下割合は10%程度であり、CMEに対するYoda1の影響は限定的であることが示された (Figures 1-1C, D)。さらに、MPCはEGF刺激によって誘導されるもの以外にも、変異Rasによって恒常的に誘導されているものも知られているため、N-Ras変異を有するHT1080細胞におけるMPC⁴⁷に対するYoda1の影響を調べた。その結果、HT1080細胞におけるTMR-dex70取り込みは、Yoda1によって濃度依存的に抑制されることが確認された (Figures 1-1E, F)。以上の結果から、Yoda1はCMEにはほとんど影響せずに、MPCをEGF誘導型またはRas変異誘導型に限らず阻害することが示された。以下ではA431細胞におけるEGF誘導型MPCに絞って検討を行った。

続いて、A431細胞におけるYoda1の細胞毒性を確認するために、WST-8アッセイによる細胞生存率試験を行った。血清飢餓状態にしたA431細胞にYoda1 (1.5 μ M) を30分間処理しても有意な細胞毒性は認められなかった (Figure 1-2A)。より高濃度のYoda1 (3 μ M) を30分間処理した場合は、細胞生存率がわずかに低下した (細胞生存率約90%、Figure 1-2A)。また、Yoda1 (1.5 μ M) の処理時間を4時間に延ばした場合は、血清飢餓状態のA431細胞でわずかながら有意な細胞毒性を引き起こした (細胞生存率約80%、Figure 1-2B)。対照的に、非血清飢餓状態のA431細胞においては、Yoda1 (1.5 μ M) で4時間処理しても、有意な細胞毒性は観察されなかった (Figure 1-2C)。これらの結果から、本研究の実験条件 (Yoda1 1.5 μ M、10分間処理) では、A431細胞に対するYoda1の細胞毒性は無視できる程度であることが確認された。まとめると、以上の結果から、Piezo1アゴニストであるYoda1によって、EGF誘導型MPCを細胞毒性なく強力に阻害することが示された。

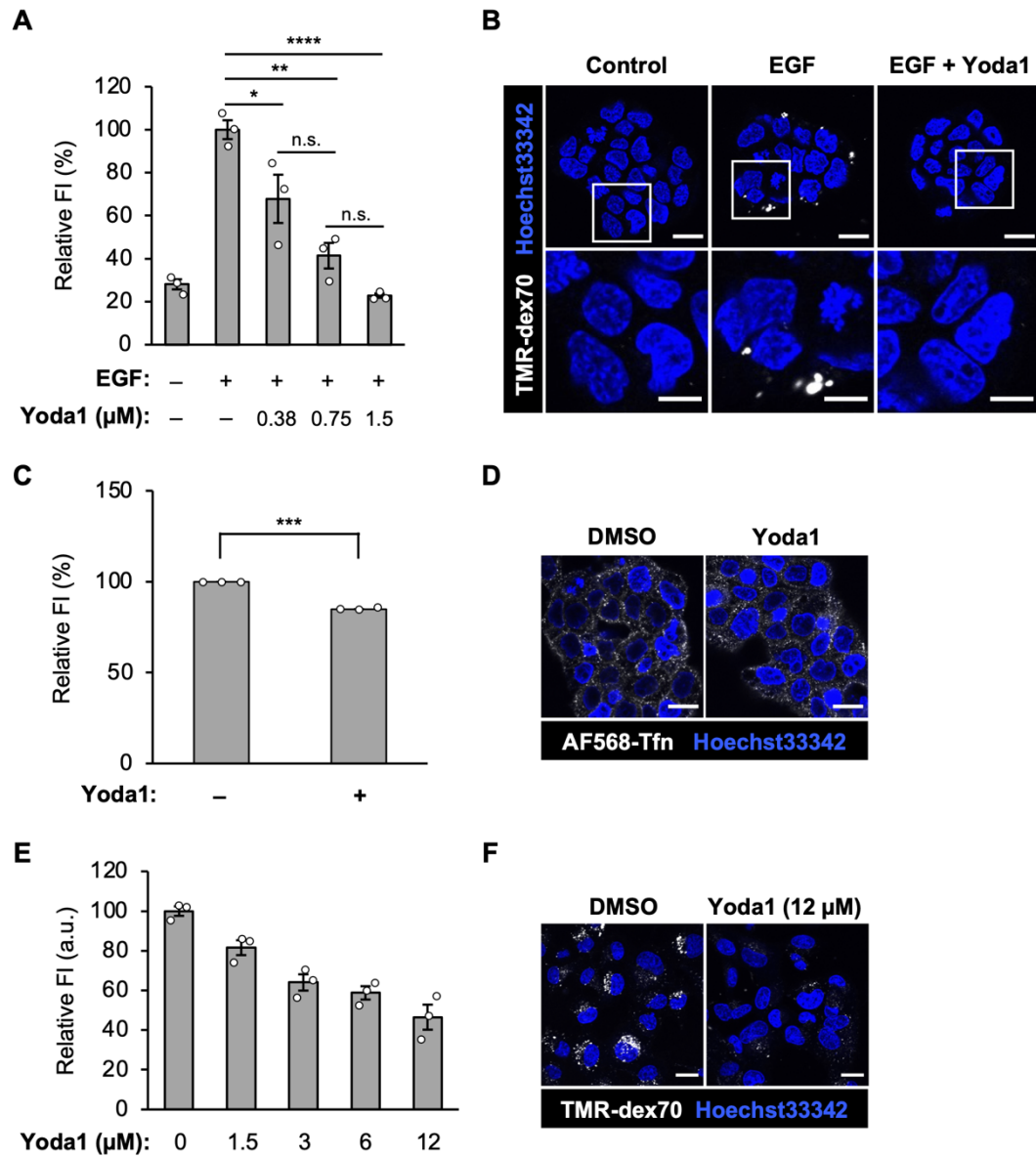


Figure 1-1. Piezo1 agonist Yoda1 inhibits macropinocytosis. (A) Flow cytometry analysis of EGF-stimulated TMR-dex70 uptake into A431 cells with the indicated concentration of Yoda1 for 10 min. (B) Confocal microscopy observation of EGF-stimulated TMR-dex70 uptake into A431 cells in the absence or presence of Yoda1 (1.5 μ M) for 10 min. The bottom images show enlarged views of the areas outlined by the white squares in the top images. (C) Flow cytometry analysis of AF568-Tfn uptake into A431 cells in the absence or presence of Yoda1 (1.5 μ M) for 10 min. (D) Confocal microscopy observation of AF568-Tfn uptake into A431 cells treated as in (C). (E) Flow cytometry analysis of TMR-dex70 uptake into HT1080 cells with the indicated concentration of Yoda1 for 30 min. (F) Confocal microscopy observation of TMR-dex70 uptake into HT1080 cells in the absence or presence of Yoda1 (12 μ M) for 30 min. Scale bars, 10 μ m (B bottom); 20 μ m (B top, D, F). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A); Student's t-test (C).

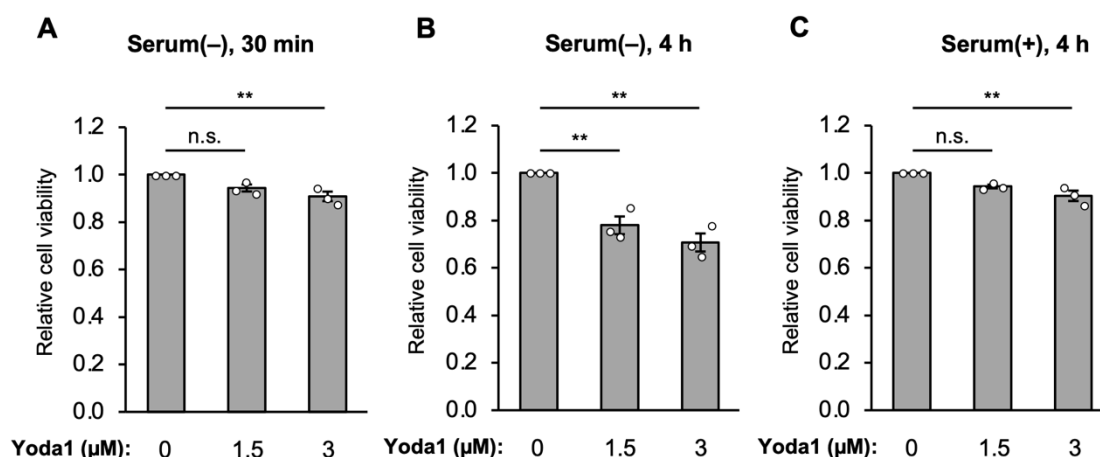


Figure 1-2. Cell viability of A431 cells treated with Yoda1 (A) Serum-starved A431 cells were treated with Yoda1 at the indicated concentration for 30 min in D-MEM(-). (B) Serum-starved A431 cells were treated with Yoda1 at the indicated concentrations for 4 h in D-MEM(-). (C) A431 cells were treated with Yoda1 at the indicated concentration for 30 min in D-MEM(+). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

EGF 誘導型 MPC における Piezo1 の寄与をさらに検討するため、CRISPR/Cas9 システム⁴⁸を用いて Piezo1 ノックアウト (KO) A431 細胞を作製し、2 つのシングルセル KO クローン (クローン#1 および#2) を取得した。Piezo1 は Yoda1 刺激に応答して Ca^{2+} 流入を引き起こすことから、WT A431 細胞および Piezo1 KO クローン#1、#2 における Yoda1 添加時の細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を評価した。遺伝子コード型カルシウムプローブである GCaMP6s⁴⁹を各細胞に発現させ、GCaMP6s の蛍光強度を指標として、細胞内 Ca^{2+} 濃度をモニタリングしたところ、Yoda1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加がこれら 2 つの KO クローンでは完全に消失していることが確認された (Figure 1-3A)。 Ca^{2+} イオノフォアであるイオノマイシンによって細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させた場合では、野生型 (WT) A431 および Piezo1 KO A431 細胞の両方で GCaMP6s の蛍光強度が増加することを確認した (Figure 1-3A)。続いて、ゲノム DNA への変異の導入を調べるためにゲノム DNA のシーケンス解析を行ったところ、検出されたすべてのアレルにおいて変異が認められた (Figure 1-3B)。しかし、両クローンにおいて、フレームシフト変異を伴わないアレル (33 および 9 塩基対の欠失により、それぞれ Piezo1 タンパク質の 11 および 3 アミノ酸が欠失する $\Delta 946-956$ および $\Delta 944-946$ 変異) が存在することが確認された。これらの欠失変異体が Piezo1 の機能を喪失しているかを確認するため、両変異体を、IRES2 配列を介して蛍光タンパク質 mCherry を同時発現するベクターにクローニングし、HEK293T 細胞において強制発現させた (Figure 1-3C)。クローン#1 に見られる $\Delta 946-956$ 変異体は、わずかに Yoda1 依存的な Ca^{2+} 流入を生じたものの、クローン#2 に見られる $\Delta 944-946$ 変異体では Yoda1 応答性が完全に消失していることが確認された (Figure 1-3C)。以上の結果より、以降の実験では、KO クローン#2 を Piezo1 KO A431 細胞として使用することとした。さらに、リアルタイム定量 PCR (qPCR) により、Piezo1 KO A431 細胞では、WT A431 細胞と比較して Piezo1 mRNA レベルが 90%以上減少しており、KO 細胞において変異型 Piezo1 はほとんど発現していないことが確認された (Figure 1-3D)。

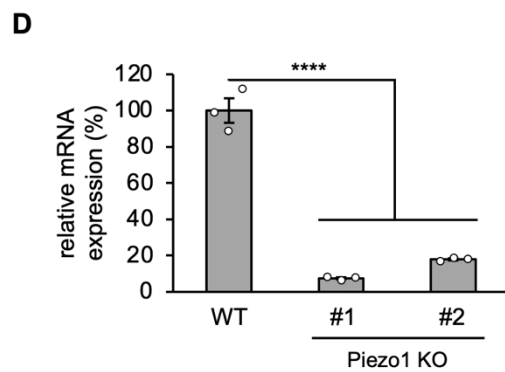
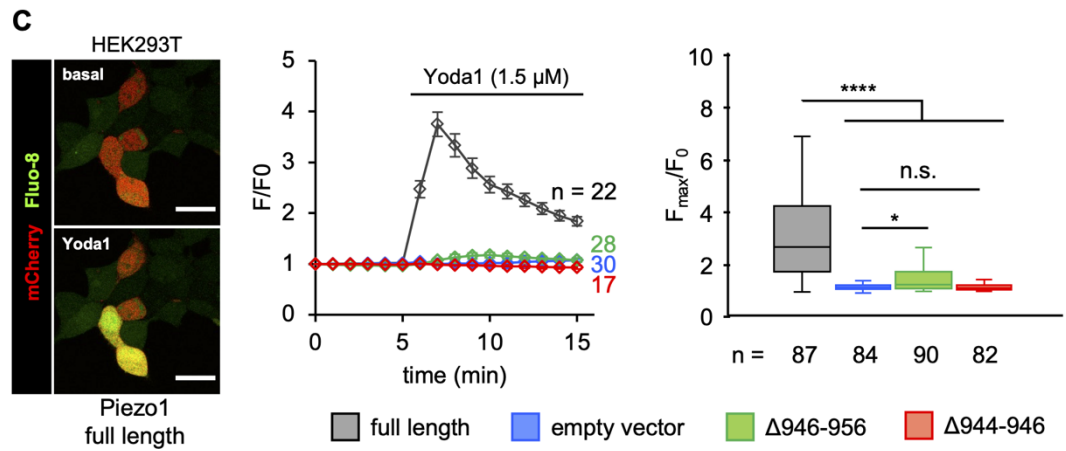
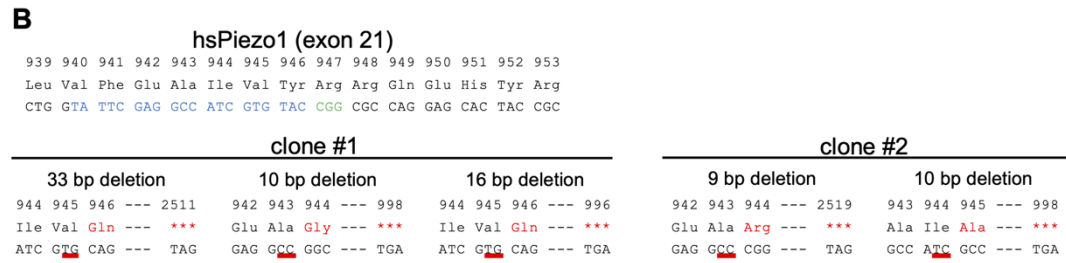
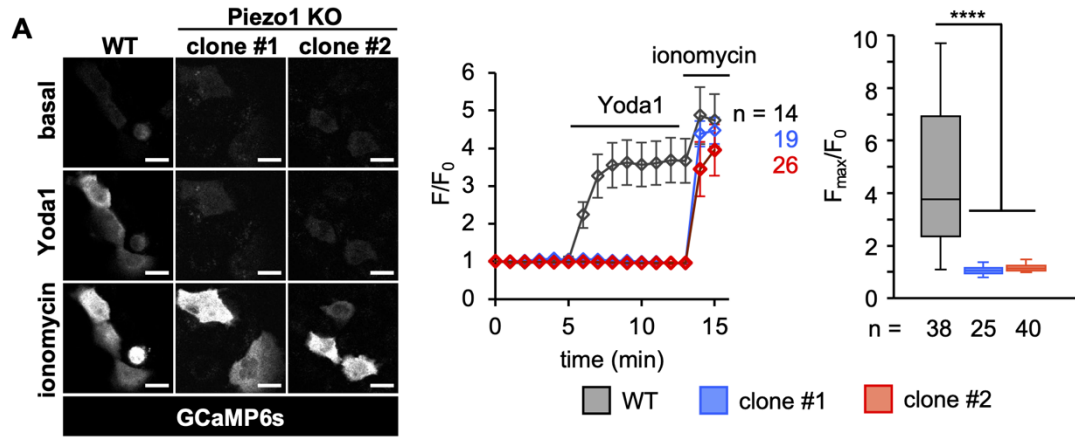


Figure 1-3. Characterization of Piezo1 knockout A431 cells. (A) GCaMP6s fluorescence intensity in WT, Piezo1 KO clone #1, and clone #2 cells were recorded every 1 min. Yoda1 (1.5 μ M) and ionomycin (5 μ M) were added at 5 and 13 min after the start of time-lapse imaging, respectively. Left: Representative images of GCaMP6s-expressing cells before and after addition of Yoda1 and ionomycin. Middle: Representative time-course of relative fluorescence intensity of GCaMP6s. Right: Quantification of maximum Yoda1-induced GCaMP6s intensity increase. (B) CRISPR/Cas9 target site of the Piezo1 gene. The guide sequence and the protospacer adjacent motif are shown in blue and green, respectively. CRISPR/Cas9-mediated deletions are shown in red. (C) HEK293T cells were transfected with the indicated vector, loaded with Fluo-8 AM (5 μ M) and then Fluo-8 fluorescence intensity was recorded every 1 min. Transient gene expression was confirmed by IRES2-dependent co-expression of mCherry. Yoda1 (1.5 μ M) was added 5 min after the start of time-lapse imaging. Left: Representative images before and after Yoda1 addition. Middle: Representative time-course of relative fluorescence intensity of Fluo-8 AM. Data represent mean $\pm$ SEM. Right: Quantification of maximum Yoda1-induced GCaMP6s intensity increase. (D) Expression of Piezo1 in A431 cells (WT, KO clone #1, #2). Piezo1 mRNA expression level was determined by qPCR. *GAPDH* shows relative mRNA expression level of Piezo1 in each condition. Data are presented in box plot of cells pooled from two independent experiments (A). Data are presented in box plot of cells pooled from three independent experiments (C). Data represent the mean $\pm$ SD of triplicate samples from one of two independent experiments (D). ****, $P < 0.0001$ (one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test). Scale bars, 20 μ m (A); 25 μ m (C). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A, C); one-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test (D).

Piezo1 KO A431 細胞における MPC 活性を評価するため、TMR-dex70 取り込み量を測定したところ、Yoda1 の有無にかかわらず、Piezo1 KO A431 細胞において EGF 依存的な TMR-dex70 取り込みが誘導されることが確認された (Figures 1-4A,B)。この結果は、Piezo1 自体は MPC に必須ではないことを示す一方で、Yoda1 による EGF 誘導型 MPC 阻害が Piezo1 依存的であることが示している。さらに、EGF 刺激誘導型 MPC によるデキストラン取り込み量は、Piezo1 KO A431 細胞にでは WTA431 細胞と比べて約 30%増加していることが確認された (Figure 1-4C)。この結果は、MPC のプロセスにおいて Piezo1 が活性化され、それによって MPC が負に制御される可能性を示唆している。

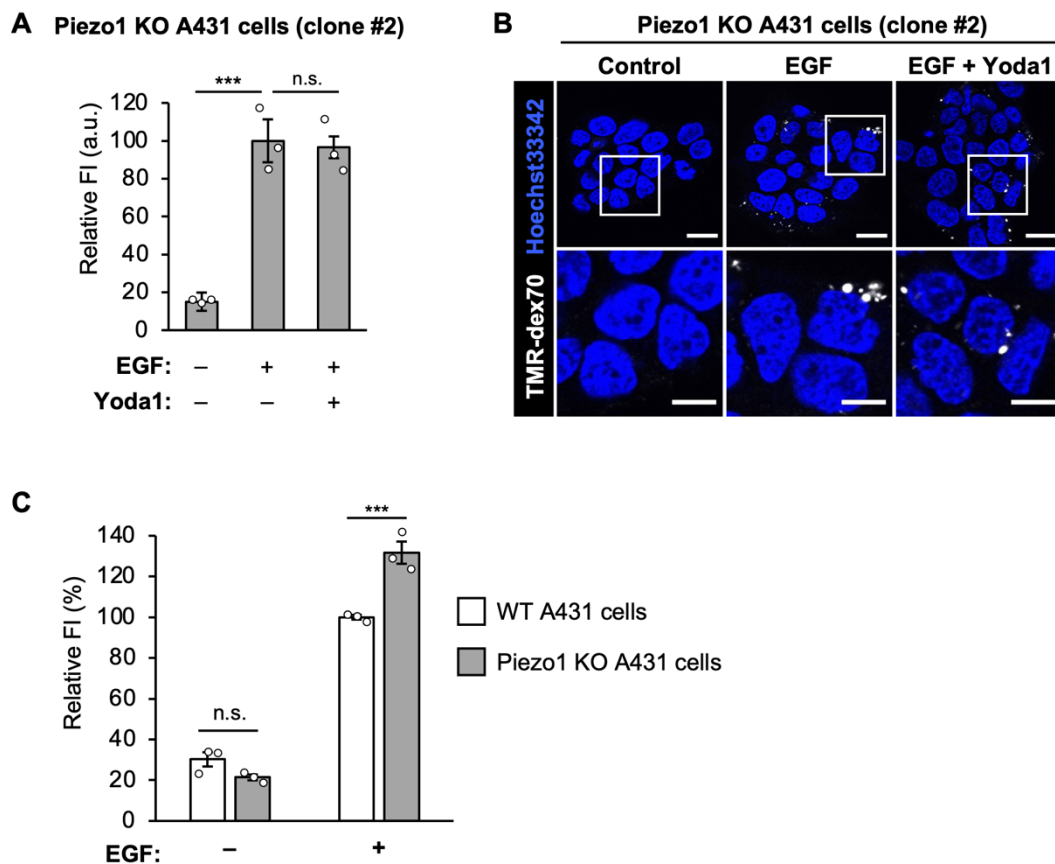


Figure 1-4. EGF-stimulated macropinocytosis in Piezo1 knockout A431 cells. (A) Flow cytometry analysis of EGF-stimulated TMR-dex70 uptake into Piezo1 KO A431 cells (clone #2) in the absence or presence of Yoda1 (1.5 μ M) for 10 min. (B) Observation of EGF-stimulated TMR-dex70 uptake into Piezo1 KO A431 cells treated as in (A). The bottom images show enlarged views of the areas outlined by the white squares in the top images. (C) Flow cytometry analysis of EGF-stimulated TMR-dex70 uptake into WT and Piezo1 KO A431 cells for 10 min. Scale bars, 10 μ m (B bottom); 20 μ m (B top). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. ***, $p < 0.001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A, C).

第 2 節 ラッフリングと Rac1 活性に対する Piezo1 活性化の影響

MPC には、アクチン再構築によって誘導される膜ラッフルの形成と、形成されたラッフル膜同士との融合によるマクロピノソームの形成という二つのステップが関与することが知られている⁵⁰。Yoda1 がどのステップを阻害するのかを明らかにするため、タイムラプスイメージングによって EGF 刺激後の辺縁ラッフルの形成の様子を観察した。辺縁ラッフルは、アクチンに富むシート状の膜の突出である⁵¹。Yoda1 の非存在下では、EGF 添加後 6 分以内に A431 細胞のコロニー辺縁の細胞膜がシート状に伸長し、その後再び折り返す様子が観察された (Figure 1-5A EGF)。対して、Yoda1 存在下では、膜の伸長は観察されなかった (Figure 1-5A EGF + Yoda1)。さらに、走査型電子顕微鏡観察によっても、Yoda1 が EGF 誘導による周辺ラッフルの形成を強力に阻害することが確認された (Figure 1-5B)。また、ファロイジンを用いた F-actin (フィラメント状に重合したアクチン) の染色により、Yoda1 がラッフル形成時のアクチン重合に及ぼす影響を検討した。ローダミン標識したファロイジンを用いて F-actin を染色したところ、Yoda1 非存在下では約 25% の細胞において F-actin 陽性な辺縁ラッフルの形成が EGF 刺激依存的に確認された (Figure 1-5C)。対して、Yoda1 を EGF と共処理した場合では、辺縁ラッフルを形成した細胞の割合が有意に減少し、F-actin 陽性な辺縁ラッフルが見られた細胞は約 5% であった (Figure 1-5C)。以上の結果から、Yoda1 による Piezo1 活性化によって、F-actin の集積および辺縁ラッフルの形成が阻害されることが確認された。

MPC におけるラッフル形成には、低分子量 GTPase である Rac1 が関与することが知られている⁵²。そこで、Yoda1 存在下および非存在下における EGF 刺激時の Rac1 活性を、活性化 Rac1 (Rac1-GTP) のプルダウンアッセイにより評価した。EGF を処理した場合では、既報の通りに⁵³、細胞内 Rac1-GTP 量が増加することが確認された (Figure 1-6A)。一方、Yoda1 を EGF と共処理した場合、Rac1-GTP 量の増加はほぼ完全に抑制された (Figure 1-6A)。この結果より、Yoda1 が Rac1 の活性化を抑制することで、F-actin 再構成とそれに続くラッフル形成を抑制していることが示唆された。MPC への Rac1 の寄与を確認するため、Rac1 阻害剤である NSC23766 の MPC 阻害効果を評価した。NSC23766 処理によって、EGF 刺激時の TMR-dex70 取り込みが、Yoda1 を処理した場合と同程度に阻害されたことから (Figures 1-6B, C)、Rac1 の活性化が EGF 誘導型 MPC に必要であり、Yoda1 による Rac1 阻害によって MPC が抑制され得ることが裏付けられた。

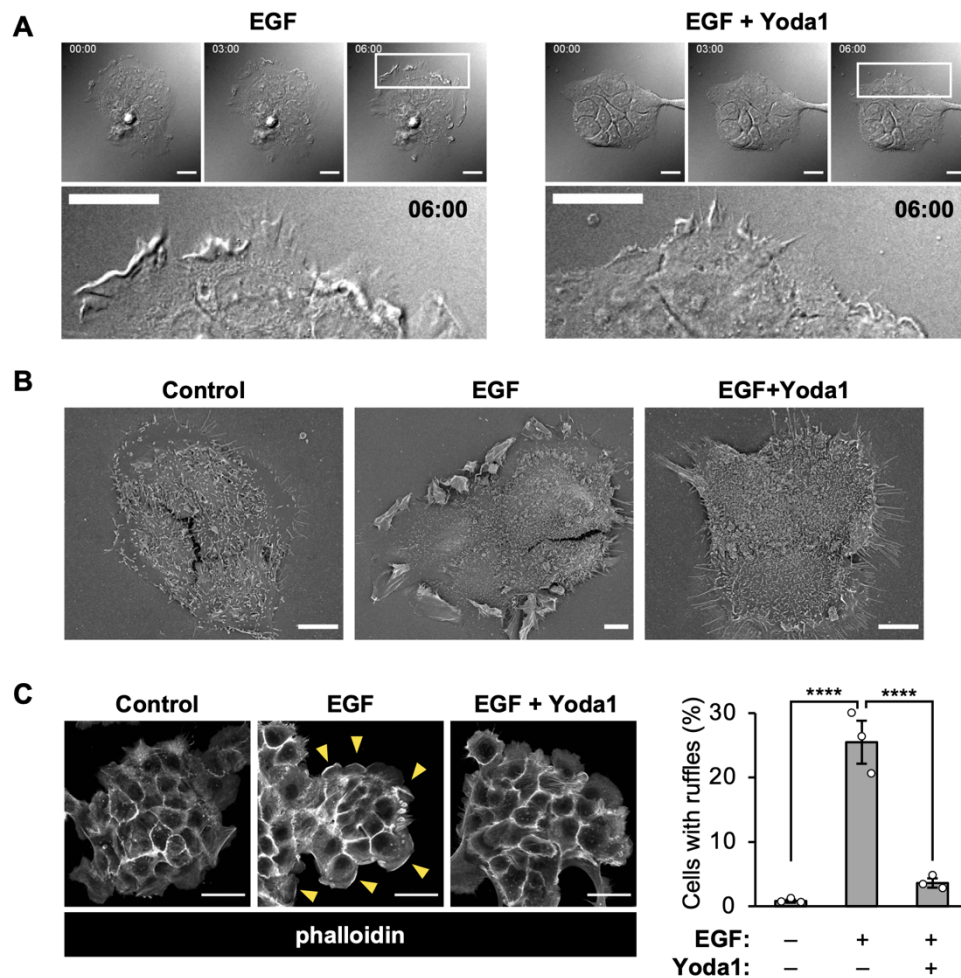


Figure 1-5. Piezo1 activation inhibits peripheral ruffle formation. (A) Live cell imaging of EGF-induced membrane ruffles in A431 cells. The cells were stimulated with EGF in the absence or presence of Yoda1 (1.5 μ M). Live cell imaging was started immediately after adding EGF and Yoda1. DIC images at the indicated time points (0, 3, and 6 min) are shown. The bottom images show enlarged views of the areas outlined by the white squares in the images at 6 min. (B) Scanning electron microscopy images of A431 cells stimulated with EGF in the absence or presence of Yoda1 (1.5 μ M) for 5 min. (C) F-actin staining with phalloidin. Left: Representative confocal images are shown. Yellow arrowheads indicate peripheral membrane ruffling areas. Right: Quantification of cells with peripheral ruffles. Scale bars, 10 μ m (B); 20 μ m (A); 50 μ m (C). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. (C). ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (C).

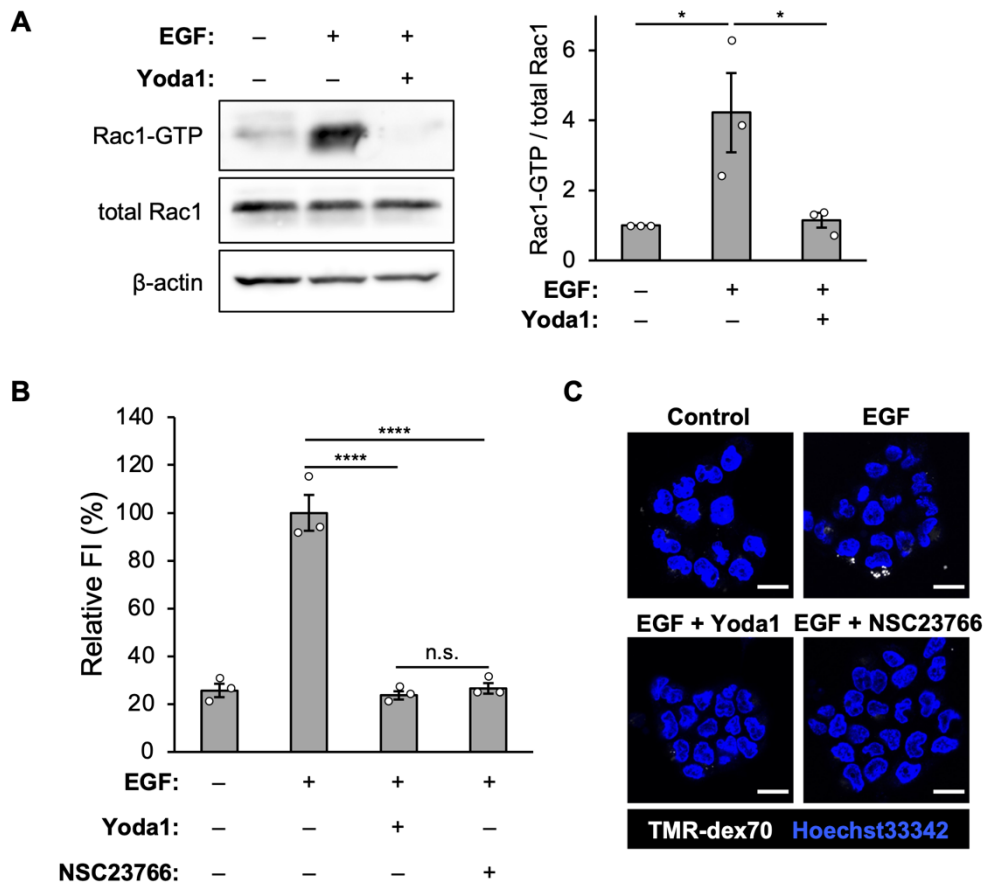


Figure 1-6. Piezo1 activation inhibits Rac1 activation. (A) Rac1 activation pull-down assay. Representative western blot images (left) and densitometric analysis of Rac1-GTP levels normalized to total Rac1 (right) are shown. (B) Flow cytometry analysis of EGF-stimulated TMR-dex70 uptake into A431 cells for 10 min in the presence of Yoda1 (1.5 μ M) or a Rac1 inhibitor NSC23766 (100 μ M). (C) Confocal microscopy observation of TMR-dex70 uptake in A431 cells treated as in (B). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (A, B). *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A, B).

次に、Yoda1 が Rac1 を阻害する機序について、三つの可能性を検討した。初めに、細胞内コレステロール分布への影響を検討した。膜ラッフルおよび MPC の誘導においては、Rac1 の局在を調節するために膜コレステロールが必要であることが知られる⁵⁴。さらに、Piezo1 の活性もコレステロールによって調節されることが知られる⁵⁵。コレステロールを検出するために、遺伝子コード型コレステロールプローブである mCherry-D4H⁵⁶ を用い、Yoda1 処理による細胞内コレステロール局在の変化を解析した。共焦点顕微鏡を用いたタイムラプスイメージングの結果、Yoda1 は細胞内のコレステロール分布に影響を及ぼさないことが確認され (Figure 1-7)、Yoda1 による MPC の阻害がコレステロール局在の変化によるものではないことが示された。次に、Yoda1 が細胞内 pH を低下させる可能性について検討した。代表的な MPC 阻害剤であるアミロライドは、Na⁺/H⁺ 交換輸送体 (NHE) を阻害することで細胞内 pH を低下させ、それによって Rac1 活性化を阻害し、結果として MPC を抑制することが知られている⁵³。Yoda1 処理時の細胞内 pH の変化を調べるため、SNARF-5F を用いた二色蛍光法 (645/585 nm) により、細胞内 pH を既報に従って測定した⁵³。A431 細胞を Yoda1、または MPC 阻害剤として広く用いられているアミロライド誘導体である EIPA で処理し、細胞内 pH を比較したところ、EIPA 処理時には細胞内 pH が有意に低下したが、Yoda1 処理時には細胞内 pH の変化は認められなかった (Figure 1-8)。このことから、Yoda1 は細胞内 pH に影響を及ぼすことなく、代表的な MPC 阻害剤である EIPA とは異なる機序により MPC を阻害していることが示された。最後に、Yoda1 が Rac1 活性化につながる EGF シグナル伝達経路を阻害している可能性を検討した。ウェスタンブロットにより、EGF 刺激による EGFR および Vav2 のリン酸化への Yoda1 の影響を検討した。その結果、Yoda1 はこれらのリン酸化を阻害しないことが確認された (Figure 1-9)。Yoda1 処理によって Rac1 の活性化が阻害されるメカニズムを明らかにするためには更なる研究が必要であるが、以上の結果から、Yoda1 が従来とは異なる機序によって Rac1 活性化を阻害する可能性が示唆された。

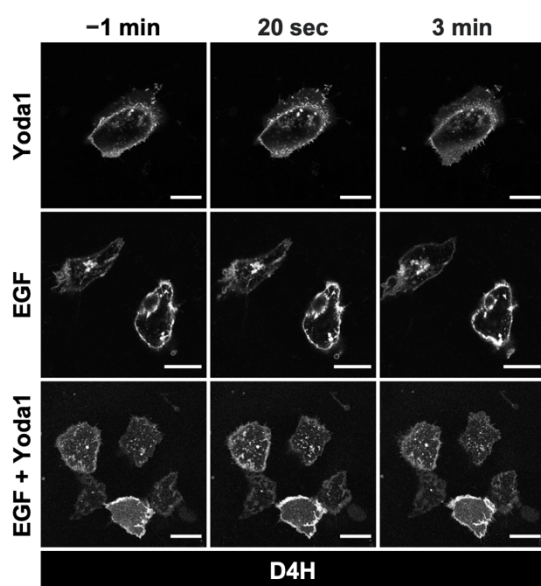


Figure 1-7. Yoda1 does not affect cholesterol localization. A431 cells were transfected with mCherry-tagged D4H, a specific probe for cholesterol, serum-starved for 4 h, and then mCherry-D4H fluorescence images were acquired every 20 sec. The time of EGF (20 nM) and Yoda1 (1.5 μ M) addition was defined as time = 0. Images at the indicated time points (1 min before reagent addition, and 20 sec and 3 min after addition) are shown. Scale bars, 20 μ m.

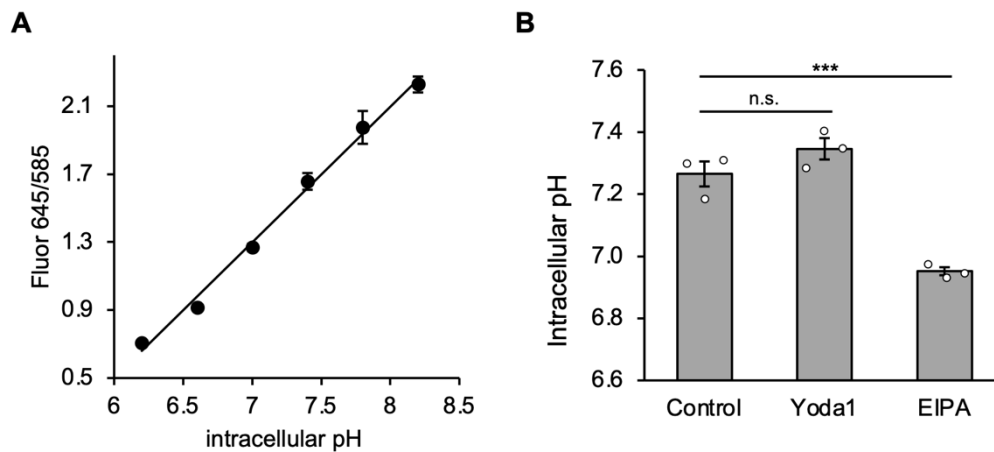


Figure 1-8. Yoda1 does not change intracellular pH. (A) Relationship between fluorescence intensity ratio (645/585 nm) of SNARF-5F AM and intracellular pH. The fluorescence intensity ratio (645/585 nm) of SNARF-5F AM was plotted against the respective pH, and linear regression analysis was performed to obtain the calibration curve. Data represent mean $\pm$ s.e.m. ($n = 150$ cells for each condition from three independent experiments). (B) Intracellular pH measurement using SNARF-5F AM in starved A431 cells treated either with Yoda1 ($1.5 \mu\text{M}$) for 10 min or EIPA ($25 \mu\text{M}$) for 30 min in D-MEM(-). EIPA was used as a positive control to reduce intracellular pH. The intracellular pH value was obtained from the calibration curve in (A). Data represent the mean $\pm$ SE ($n = 150$ cells for each condition from three independent experiments). ***, $p < 0.001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test.

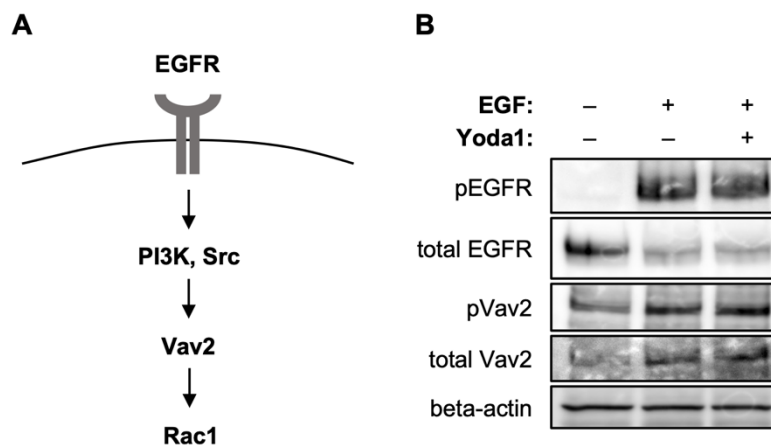


Figure 1-9. Yoda1 does not inhibit phosphorylation of EGFR and Vav2. (A) Schematic diagram showing the pathway of Rac1 activation by EGF. (B) Western blot analysis. A431 cells were treated with EGF (20 nM) and Yoda1 ($1.5 \mu\text{M}$) for 5 min, and total cell lysates were analyzed by SDS-PAGE followed by western blotting. Experiments were performed at least twice with similar results.

第3節 Piezo1 活性化による MPC 阻害に対する細胞外 Ca^{2+} の影響

Piezo1 が活性化して開口することにより、細胞外 Ca^{2+} が細胞内へと流入することが知られているため⁴²、Yoda1 による MPC 阻害に細胞外 Ca^{2+} 流入が関与するかを検討した。まず、A431 細胞における Yoda1 による Ca^{2+} 流入を確認するため、GCaMP6s を用いたタイムラプスカルシウムイメージングを実施したところ、Yoda1 を添加した直後に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが確認された (Figure 1-10A)。Piezo1 や他の機械受容チャネルは、溶液添加時の刺激によっても活性化を受ける可能性があるが^{57,58}、コントロールとして DMSO を含む溶液を添加した場合では GCaMP6s の蛍光強度の増加は認められなかったことから (Figure 1-10A)、溶液の添加による機械刺激ではなく、Yoda1 による Piezo1 活性化によって細胞内 Ca^{2+} 濃度が増加していることが確認された。また、 Ca^{2+} を含まない HBSS を使用した場合には、Yoda1 による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は認められなかった (Figure 1-10A)。これらの結果から、A431 細胞において、Yoda1 添加によって細胞外 Ca^{2+} が流入し、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが示された。

次に、Yoda1 による MPC 阻害における Ca^{2+} 流入の寄与を調べるため、 Ca^{2+} を含まない培地を用いた検討を行った。 Ca^{2+} を含まない培地中での TMR-dex70 取り込みを評価したところ、細胞外 Ca^{2+} を含まない条件下では、Yoda1 は EGF 刺激依存的な TMR-dex70 の取り込みを阻害しないことが確認された (Figures 1-10B, C)。これは、Yoda1 による Piezo1 を介した細胞外 Ca^{2+} 流入が、MPC 阻害に重要であることを示唆している。また、 Ca^{2+} を含まない培地中では、Yoda1 を添加しない場合でも、TMR-dex70 の取り込みが Ca^{2+} を含む培地を用いた場合と比較して約 40% 減少した (Figures 1-10B, C)。A431 細胞における EGF 刺激誘導型 MPC は、細胞外 Ca^{2+} に依存しないことが既に報告されているが⁴¹、細胞外 Ca^{2+} の影響は実験条件や評価系の違いにより異なる可能性がある。細胞外 Ca^{2+} 自体の EGF 誘導型 MPC への影響については議論の余地があるものの、この結果は、Yoda1 による Piezo1 活性化が細胞外 Ca^{2+} 流入依存的に EGF 誘導型 MPC を阻害することを示している。

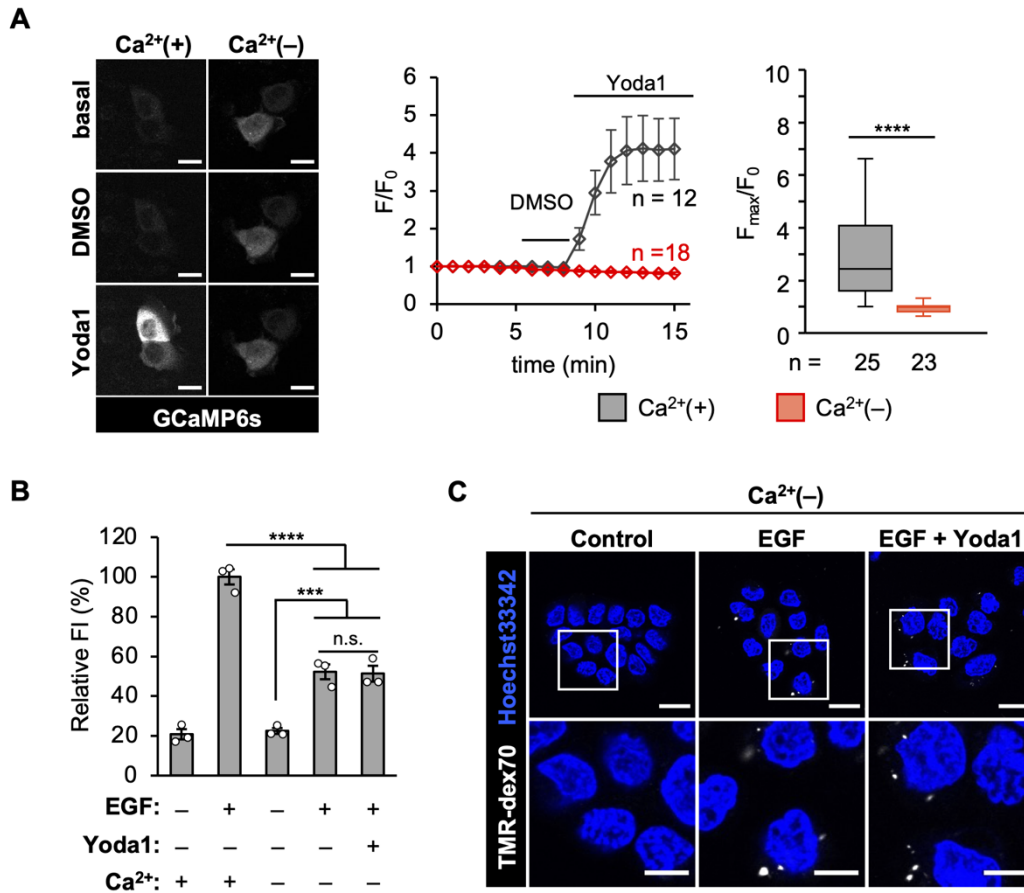


Figure 1-10. Macropinocytosis inhibition by Yoda1 requires extracellular Ca²⁺ influx. (A) GCaMP6s fluorescence intensity was recorded every 1 min. DMSO and Yoda1 (1.5 μ M) were added at 5 and 8 min after the start of time-lapse imaging, respectively. Left: Representative images of the GCaMP6s-expressing cells treated with DMSO and Yoda1 in the absence or presence of Ca²⁺. Middle: Representative time-course of relative fluorescence intensity of GCaMP6s. Right: Quantification of maximum Yoda1-induced GCaMP6s intensity increase. (B) Flow cytometry analysis of EGF-stimulated TMR-dex70 uptake into A431 cells in Ca²⁺-containing or Ca²⁺-free conditions in the absence or presence of Yoda1 (1.5 μ M). (C) Observation of TMR-dex70 uptake in Ca²⁺-free condition. The cells were treated as in (B). The bottom images show enlarged views of the areas outlined by the white squares in the top images. Scale bars, 10 μ m (C bottom); 20 μ m (A, C top). Data represent in box plot of cells pooled from two independent experiments (A). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. (B). *** p < 0.001; ****, p < 0.0001; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A, B).

第4節 Piezo1 活性化による MPC 阻害に対する KCa3.1 の影響

Piezo1 を介した Ca^{2+} シグナル伝達の下流で MPC の抑制に関連する分子を特定することを目指し、Piezo1 下流で機能する分子として、KCa3.1 に注目した。KCa3.1 はカルシウム活性化カリウムチャネルであり、Piezo1 を介した Ca^{2+} 流入によって活性化されることで、赤血球の細胞容積を減少させることが報告されている⁴⁵。また、KCa3.1 は、EGF 誘導型 MPC においても重要な役割を担うことが報告されている⁴⁶。MPC の過程では、ホスホイノシチド (PIPs) の段階的な脱リン酸化 ($\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3 \rightarrow \text{PI}(3,4)\text{P}_2 \rightarrow \text{PI}(3)\text{P} \rightarrow \text{PI}$) が必要である⁵⁹。KCa3.1 は $\text{PI}(3)\text{P}$ によって活性化されることが報告されており、MPC カップの形成にも重要である^{46,60}。したがって、MPC 後期における適切なタイミングでの KCa3.1 の活性化が、MPC プロセスの完了に必要であると考えられる。そこで、Yoda1 による Ca^{2+} 流入によって KCa3.1 が急速に活性化され、その不適切なタイミングでの活性化がラッフル形成を抑制することで MPC が阻害されると仮定した。KCa3.1 の阻害時にはマクロピノソームの形成が阻害されるが、ラッフル形成には影響がないことが知られているため⁴⁶、Yoda1 によるマクロピノサイトーシス阻害への KCa3.1 の関与を、膜ラッフル形成を評価することで検証した。A431 細胞を選択的 KCa3.1 阻害剤である TRAM-34^{61,62} で前処理し、その後、EGF と Yoda1 を TRAM-34 の存在下で処理した。タイムラプスイメージングおよびファロイジンによる F-actin 染色の結果、TRAM-34 を処理時には、Yoda1 の存在下であっても EGF による周辺ラッフル

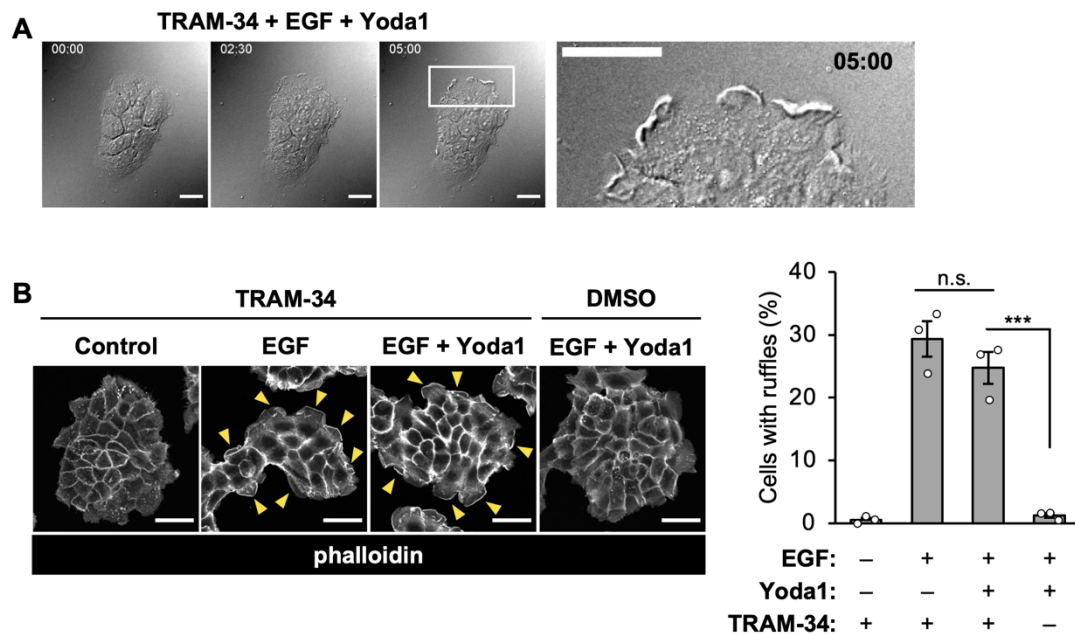


Figure 1-11. KCa3.1 inhibition rescues Yoda1-induced suppression of ruffle formation. (A) Live cell imaging of EGF-induced membrane ruffles in A431 cells. The cells were pretreated with a KCa3.1 inhibitor TRAM-34 for 5 min and then stimulated with EGF in the presence of Yoda1 (1.5 μM). Live cell imaging was started immediately after adding EGF and Yoda1. DIC images at the indicated time points (0, 2.5, and 5 min) are shown. The right image shows an enlarged view of the area outlined by the white square in the image at 5 min. (B) F-actin staining with phalloidin. Left: Representative images of A431 cells pretreated with TRAM-34 for 5 min and then stimulated with EGF in the absence or presence of Yoda1 (1.5 μM) for 5 min. Right: Quantification of cells with peripheral ruffles. Scale bars, 20 μm (A); 50 μm (B). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (B). *** $p < 0.001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (B).

形成および F-actin の集積が回復することが確認された (Figures 1-11A, B)。

さらに、Yoda1 と Ca^{2+} イオノフォアである ionomycin の MPC 阻害効果を比較した。Ionomycin 処理は細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させることで、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ をジアシルグリセロール (DAG) およびイノシトール-3-リン酸 (IP_3) に加水分解し、ホスホリパーゼ C (PLC) を活性化することが報告されている⁶³。 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ の段階的なリン酸化および脱リン酸化が MPC に必要であるため、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ が急速に分解されると MPC が抑制されると考えられる。そこで、細胞内 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ の量を、遺伝子コード型バイオセンサーである GFP-PLC δ -PH⁶⁴ を用いて評価した。タイムラプスイメージングの結果、ionomycin 処理によって $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ バイオセンサーが膜から細胞質へと拡散する様子が観察された (Figure 1-12A)。対して、Yoda1 処理によってはバイオセンサーの細胞内局在は変化しなかった (Figure 1-12A)。これは、Yoda1 は細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させるものの、ionomycin とは異なり、 $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ を分解しないことを示している。さらに、ionomycin 処理を行った場合では、Yoda1 処理の場合とは異なり、TRAM-34 による膜ラッフル形成の回復は確認されなかった (Figure 1-12B)。これらの結果から、Yoda1 は ionomycin とは異なる機序で MPC を阻害しており、Yoda1 による EGF 誘導型 MPC の抑制は、Piezo1 活性化を介した Ca^{2+} 濃度の増加による KCa3.1 活性化を必要とすることが示唆された。

KCa3.1 の活性化が MPC の抑制に関与していることをさらに確認するため、KCa3.1 活性化剤である SKA-31⁶⁵ を用いて KCa3.1 を薬理的に活性化し、EGF により誘導される膜ラッフル形成および MPC による取り込みが抑制されるかを検討した。SKA-31 の効果を膜ラッフル形成の定量により評価したところ、SKA-31 は、Yoda1 ほど強力ではないものの、EGF による膜ラッフル形成割合を有意に低下させることが確認された (Figure 1-13A)。続いて、SKA-31 処理時の TMR-dex70 取

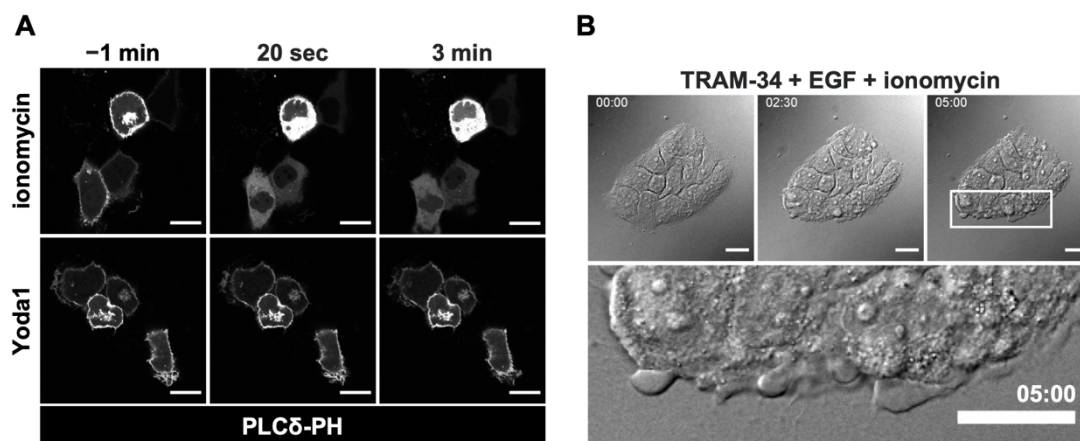


Figure 1-12. Yoda1 does not induce $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ depletion. (A) A431 cells were transfected with GFP-tagged PLC δ -PH, a specific probe for $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$, and then GFP-PLC-PH fluorescence images were acquired every 20 s. The time of ionomycin (5 μM) or Yoda1 (1.5 μM) addition was defined as time = 0. Images at the indicated time points (1 min before adding reagents, 20 s and 3 min after addition) are shown. (B) Live imaging shows that ionomycin inhibits EGF-induced ruffle also in the presence of TRAM-34. A431 cells were pretreated with a KCa3.1 inhibitor TRAM-34 (10 μM) for 5 min and then stimulated with EGF (20 nM) in the presence of ionomycin (5 μM). Time-lapse imaging was started immediately after adding EGF and ionomycin. DIC images at the indicated time points (0 min, 2.5 min, and 5 min) are shown. The bottom image shows an enlarged view of the area outlined by the white square in the image at 5 min. Scale bars, 20 μm (A, B).

り込みを評価したところ、SKA-31 によって EGF 依存的な TMR-dex70 取り込みが有意に抑制されることが確認された (Figures 1-13B,C)。以上の結果から、KCa3.1 を人為的に活性化することで、EGF 誘導型 MPC を抑制できることが示された。

本章の結果を総合すると、Yoda1 は特異的に Piezo1 を活性化し、これにより急速な KCa3.1 が急速に活性化され、Rac1 活性化が阻害されることでアクチン再構築が抑制されることが示唆される (Figure 1-14)。

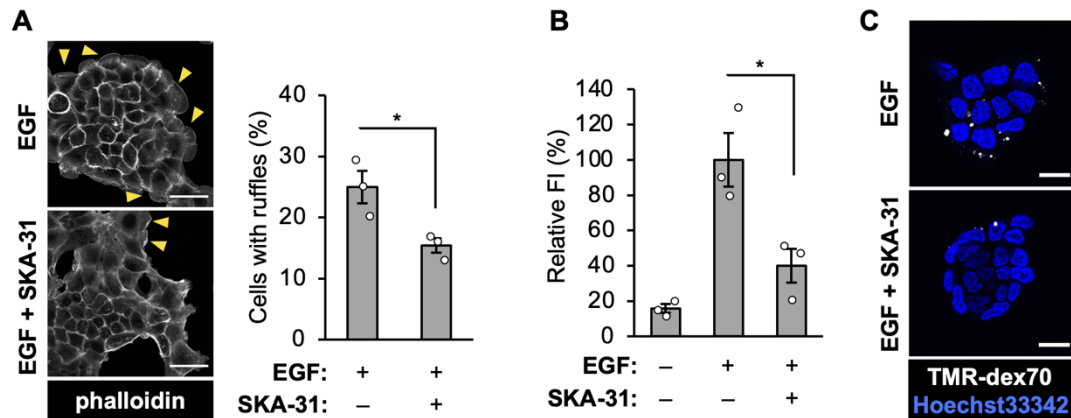


Figure 1-13. Pharmacological activation of KCa3.1 inhibits EGF-induced macropinocytosis. (A) F-actin staining with phalloidin. Left: Representative images of A431 cells pretreated with the KCa3.1 activator SKA-31 for 5 min and then stimulated with EGF for 5 min. Right: Quantification of cells with peripheral ruffles. (B) Flow cytometry analysis of TMR-dex70 uptake. The cells were pretreated with the KCa3.1 activator SKA-31 for 5 min and then stimulated with EGF for the uptake of TMR-dex70 for 10 min. (C) Observation of TMR-dex70 uptake. The cells were treated as in (B). Scale bars, 20 μ m (C); 50 μ m (A). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. (A, B). * $p < 0.05$. Student's t-test (A); One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (B).

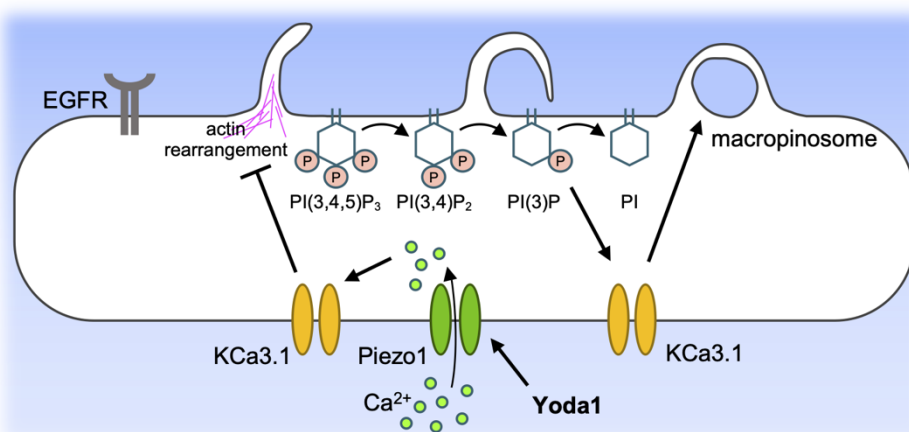


Figure 1-14. Working hypothesis of macropinocytosis inhibition using Yoda1. Yoda1-induced, Piezo1-dependent extracellular Ca²⁺ influx causes non-proper activation of KCa3.1, which inhibits Rac1 activation followed by ruffle formation.

討論と展望

第 1 章では、Yoda1 を用いて Piezo1 を活性化することで、A431 細胞における EGF 誘導型 MPC を強力に阻害できることを見出した。Yoda1 による Piezo1 活性化に伴い、細胞外 Ca^{2+} が流入し、Rac1 の活性化が抑制され、それに伴うアクチン重合および膜ラッフルの誘導が阻害されることが確認された (Figure 1-14)。また、Piezo1 活性化による MPC 阻害は、Piezo1 を介したカルシウムシグナルの下流で機能するカリウムチャネル KCa3.1 に依存していた。

本研究で使用した A431 細胞においては、Piezo1 をノックアウト (KO) しても、EGF 誘導型 MPC による TMR-dex70 の取り込みは抑制されず、むしろその取り込み量は WT A431 細胞と比較して約 30%増加していた (Figure 1-4)。この結果から、Piezo1 自体は MPC に必須の分子ではないものの、その活性が MPC を負に制御している可能性が示唆された。また、細胞骨格や PIPs などの膜脂質が Piezo1 の活性に関与していることが報告されている⁶⁶⁻⁶⁸。MPC の過程では、PIPs の段階的な変換や、アクチン再構築によるダイナミックな膜変形が生じることから、Piezo1 は MPC において特定のタイミングおよび領域で活性化される可能性が考えられる。本章では、アゴニストである Yoda1 を用いて Piezo1 を薬理的に活性化した際の MPC への影響を検討するにとどまっており、Piezo1 が MPC の調節に果たす生理的役割を調べることは、今後の重要な研究テーマの一つであると言える。また、Piezo1 以外の機械受容分子 (メカノセンサー) や膜張力変化自体の MPC への影響についても本研究では検討できていない。メカノセンサーと MPC との関連については、近年、膜張力の急激な低下がホスホリパーゼ D2 (PLD2) の活性化を介して MPC を誘導することや⁶⁹、ヒドラにおける膜張力の増加が stretch-activated チャネルを介した Ca^{2+} 流入によって MPC を抑制すること⁷⁰が報告されている。

Yoda1 処理により Rac1 の活性化が抑制されるメカニズムも、今後の重要な研究課題である。本章では、Yoda1 による Piezo1 活性化によって Rac1 活性化が抑制される機序として、三つの可能性を検討したが、いずれも該当しなかった。この結果から、Piezo1 活性化によって、これまでに報告されているものとは異なる機序によって Rac1 活性化が抑制されていると考えられる。Piezo1 と Rac1 の関連については、胃がん細胞を用いた研究において Piezo1 ノックダウンが Rac1 活性化を引き起こすことが報告されており、⁷¹、Piezo1 の活性化が Rac1 を抑制する可能性が示唆されている一方で、その詳細なメカニズムは未解明のままである。さらに、反対に Piezo1 活性化によって Rac1 が活性化されるという報告もあり⁷²、Piezo1 シグナルによる Rac1 への影響は状況に依存して多様であると言える。

また、本章で、Yoda1 による MPC 抑制効果が Piezo1 を介した細胞外 Ca^{2+} の流入に依存していることを示したことは、刺激誘導型 MPC と Ca^{2+} の関連についての初めての知見を提供するという点で重要な意義を持つ。これまで、MPC と Ca^{2+} との関連については、マクロファージにおける恒常型 MPC が、カルシウム感知受容体 (CaSR) および細胞外 Ca^{2+} に依存することが報告されているのみであった。特に、EGF 誘導型 MPC については細胞外 Ca^{2+} 非依存的であるとされていたが、これは本章において Ca^{2+} を含まない培地中で MPC 活性が低下したこととは一致しない。さらに、筆者の所属研究室から、 Ca^{2+} と MPC の関連についての続報として、 Ca^{2+} を細胞外へと排出するカルシウムポンプである ATP2B4 が MPC 活性に必要であり、ATP2B4 の Ca^{2+} ポンプ活性がマクロフィソー

ム形成段階の制御に重要であることを報告している⁷³。ATP2B4 KO A431 において MPC 中のカルシウムオシレーションの程度が低下することから、MPC 中に適切な細胞内 Ca^{2+} 濃度変化が生じることが重要である可能性が示唆される⁷³。今後も Ca^{2+} と MPC との関連についてさらなる研究を進めることで、MPC 特異的な新規の制御機構の解明につながると期待される。

KCa3.1 を阻害することで、Yoda1 の存在下であっても EGF 刺激による膜ラッフル形成を回復させることができた (Figure 1-11)。MPC と KCa3.1 の関連については、KCa3.1 の活性化が MPC の後期段階であるラッフル閉鎖とマクロピノソームの形成に必要であることがこれまでに報告されている⁴⁶。一方、本章では、活性化剤を用いた人為的な KCa3.1 の活性化によっても MPC が阻害されることを新たに発見した。MPC の過程では、PIPs の段階的な変換 ($\text{PI}(3,4,5)\text{P}_3 \rightarrow \text{PI}(3,4)\text{P}_2 \rightarrow \text{PI}(3)\text{P} \rightarrow \text{PI}$) が生じ、KCa3.1 はこのうち $\text{PI}(3)\text{P}$ によって活性化されることが知られている。これらの知見から、KCa3.1 は MPC の過程で $\text{PI}(3)\text{P}$ が生じる適切なタイミングで活性化されることが、MPC を制御していると予想される。さらに、KCa3.1 は Piezo1 による Ca^{2+} 流入によっても活性化を受けることが報告されており、Yoda1 による Piezo1 の活性化によって、KCa3.1 が $\text{PI}(3)\text{P}$ が生じる以前の不適切なタイミングで活性化を受けることが、MPC 阻害に繋がっている可能性がある。これは、Piezo1 が活性化されても KCa3.1 が阻害されていれば EGF 刺激によるアクチン再構築とラッフル形成の段階までは抑制されないことを示した本章の結果によっても支持される。

MPC の薬物送達経路としての可能性については序論で述べた通りであるが、病理学的な観点からも、MPC は近年がん代謝との関連で大きな注目を集めている⁷⁴⁻⁷⁶。MPC は、細胞外タンパク質や栄養素を非選択的に効率よく取り込むことで、がん細胞における栄養供給経路として重要な役割を果たし、がん細胞の生存を促進することが報告されている。このため、MPC 阻害剤の開発ががん治療に応用できる可能性が示唆されている^{74,77-79}。この点においても、MPC の分子機構の解明や、MPC を制御するための特異的な薬理学的ツールの開発は極めて重要な意味を持つ⁸⁰。従来の代表的な MPC 阻害剤としては、cytochalasin D、wortmannin、EIPA などが挙げられるが、これらは MPC 以外のエンドサイトーシス経路にも影響を及ぼす。例えば、最も頻用される MPC 阻害剤である EIPA は、NHE を阻害することで MPC を阻害するが、TRPP3 も阻害するほか⁸¹、筆者の経験では CME に対しても顕著な阻害効果を示し、細胞毒性も無視できない。一方で、Yoda1 は Piezo1 の特異的なアゴニストであり、CME にほとんど影響を与えず、MPC を特異的に阻害することが示された。この結果は、MPC に対する選択的かつ強力な阻害剤としての Yoda1 の可能性を示唆するものである。本研究では、A431 細胞における EGF 誘導型 MPC に対する Yoda1 の阻害効果に加え、HT1080 細胞における変異 Ras による恒常型 MPC に対する阻害効果も確認した。Ras 変異がん細胞における MPC に対する Piezo1 の寄与や、それによるがん細胞増殖抑制の可能性は、今後の重要な検討課題であると言える。

第2章

L17E による細胞内送達における KCa3.1 の寄与

序論

生物活性バイオ高分子を細胞内へ導入することを目的として、リポソームやナノ粒子、ペプチドなど様々な手法が開発されてきた⁷⁻¹¹。しかし、細胞内送達手法の開発に関する報告は数多い一方で、それらの送達機序に関する詳細な研究は限られている⁸²⁻⁸⁵。これらの機構を解明することで、既存の送達手法の改良や、新規デリバリー概念の創出に寄与することが期待される。さらに、送達効率に影響を与える生物学的因子を特定できれば、細胞選択性の高い送達手法の開発や、*in vivo* 応用時の標的組織における送達効率の予測バイオマーカーとしての活用も期待される⁸⁶⁻⁹¹。

筆者の所属研究室では、抗体 (IgG) やその他の機能性タンパク質をサイトゾルへ導入可能なペプチド L17E を開発した³¹。L17E は、クモ毒由来の溶血性ペプチドである M-lycotoxin の疎水性面に位置するロイシン (Leu, L) の一つを、負電化を持つグルタミン酸 (Glu, E) に置換した弱毒型カチオン性ペプチドである。この変異により、ペプチドと細胞膜の疎水性相互作用が減弱し、細胞毒性が低減した。その一方で、適度な膜傷害活性を維持したことで、L17E は細胞に添加すると細胞膜の透過性を一過的に高め、抗体をはじめとする生物活性高分子を短時間 (5 分未満) でサイトゾルへ導入することが可能である⁹²。しかし、L17E を培養細胞に添加した際、100%の細胞にサイトゾル送達が行われる訳ではなく、細胞株ごとにその割合は異なるものの、一定割合の細胞のみにしか送達が行われず、送達効率 (何%の細胞に送達できるか) は十分とは言えない。L17E の詳細な作用機序には未解明の部分が多く、サイトゾル送達の分子基盤を解明することで、より高効率なサイトゾル送達法の開発につながる可能性がある。第2章では、L17E の作用機構の解明、中でもサイトゾル送達効率に影響する細胞特性の解明を目指した。

L17Eによる細胞内送達が、一過的かつ部分的な膜透過の促進によって生じることを確認した。L17Eによる細胞内送達には、CMEやMPCといった代表的なエンドサイトーシス経路はほとんど関与していなかった。L17Eによる細胞内送達効率が細胞株ごとに異なる点に着目し、細胞株ごとの送達効率の違いがそれぞれの細胞株における特定のタンパク質発現量の違いに起因すると仮定した。データベースから取得した遺伝子発現データとL17Eによる送達効率の相関係数を11種類のがん細胞株を用いて計算したところ、カルシウム活性化カリウムチャネルであるKCa3.1チャネルをコードする遺伝子*KCNN4*の発現量がL17Eの送達効率と高い相関を示すことを見出した。*KCNN4*のKOによりL17Eの送達効率が減少し、反対に、*KCNN4*の過剰発現によりL17Eの送達効率が上昇した。さらに、KCa3.1の阻害剤または活性化剤を添加すると、L17Eの送達効率はそれぞれ低下または上昇した。L17Eの送達効率が膜電位依存的であることを確認するとともに、L17E処理時に見られる細胞外からのCa²⁺流入がL17Eによる高効率な細胞内送達に必須であることを見出した。

第1節 L17Eによるサイトゾル送達の主要経路の検討

本研究では、L17Eによるサイトゾル送達効率を評価するために、L17Eによってサイトゾルへ送達されるモデルカーゴとして、ヨウ化プロピジウム (PI) を用いた。PIは主に死細胞の染色に使用される低分子化合物であり、モデルカーゴとして頻用される蛍光標識デキストランや蛍光タンパク質に比べて分子量が小さい。一方で、膜透過性がない核酸染色色素であることから、細胞質や核に到達してRNAを含む核酸に結合した際にのみ蛍光が増強する⁹³。この特徴により、エンドソーム内に捕捉されたPIを除外し、サイトゾルに到達したPIのみを検出可能であると考えた。L17E存在下でのPIの送達効率を評価するために、PI陽性細胞の割合を、フローサイトメトリーを用いて測定した。U2OS細胞にPIとL17Eを同時に添加すると、PI陽性細胞の割合が顕著に増加することが確認された (Figures 2-1A, B, D)。一方、L17Eのみを添加後にPBS洗浄を行い、細胞からL17Eを除去した後にPIのみを添加した場合は、PI陽性細胞の顕著な増加は認められず、PIのサイトゾル送達がL17E存在下でのみ生じることが確認された。(Figures 2-1C, D)。この結果は、L17Eによるサイトゾル送達活性がL17Eの添加後に一時的に発揮されることを示唆しており、また、L17E処理による細胞毒性が無視できるレベルであることを示している。さらに、PIをモデルカーゴとして、フローサイトメトリー解析によってL17Eのサイトゾル送達活性を定量的に評価する手法の妥当性が確認された。

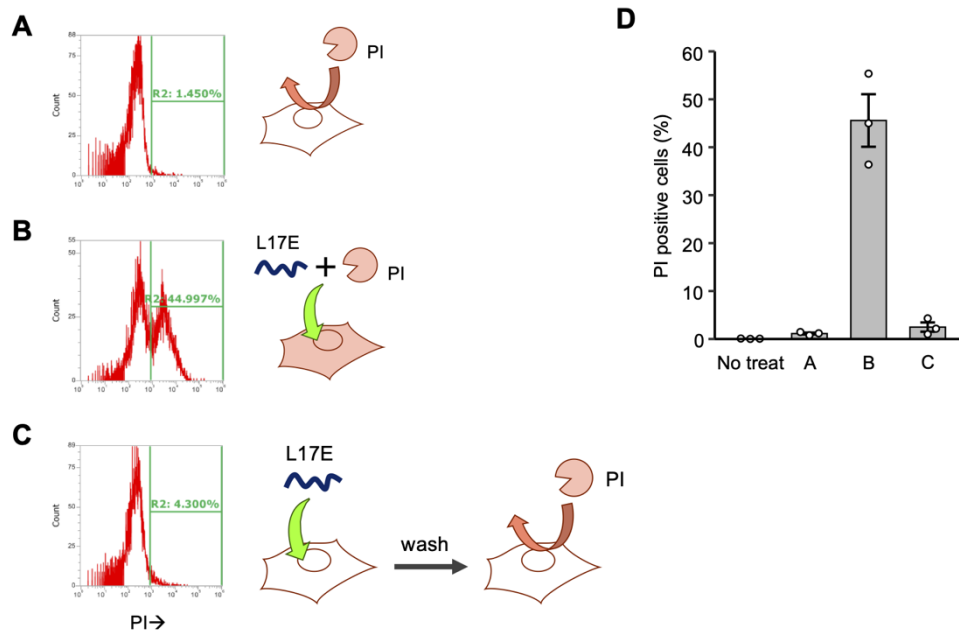


Figure 2-1. Cytosolic translocation of PI occurs only in the presence of L17E. Flow cytometry analysis of cells treated with PI in the absence of L17E (A) and in the presence of L17E (B), and cells treated with L17E in the absence of PI followed by washout of L17E and incubation with PI (C). U2OS cells were treated with PI (50 μ g/mL) and L17E (40 μ M) in D-MEM(-) for 5 min. Washout of L17E was done with PBS twice and then PI was immediately added followed by 5 min incubation in the absence of L17E. (D) Quantification of PI positive cells in (A–C). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates.

次に、L17E によるサイトゾル送達の様式を明らかにするため、共焦点顕微鏡を用いたタイムラプス観察により、L17E による PI のサイトゾル送達を解析した。膜修復関連タンパク質である ANXA4⁹⁴ に蛍光タンパク質である EGFP を付加した融合タンパク質 (ANXA4-EGFP) を U2OS 細胞に一過性発現させ、この細胞に L17E と PI を添加した様子を観察したところ、L17E を添加してから約 120 秒後に、PI が細胞内に流入し始めることが確認された。PI のサイトゾル移行は、細胞膜の表面全体に均一に生じるのではなく、細胞膜の限られた領域のみで局所的に観察された (Figure 2-2 顕微鏡画像 2 段目)。PI の流入後、流入点における PI の蛍光強度は徐々に減少していったことから、PI は流入後即座にサイトゾル全体に拡散したと考えられる。この結果は、TAT やオリゴアルギニンなどの細胞膜透過ペプチド (CPP) が、細胞膜の一部の領域から細胞内に移行することを示した以前の報告と一致する⁹⁵⁻⁹⁷。PI の流入点において、同時に ANXA4-EGFP の集積も観察された (Figure 2-2 顕微鏡画像 1 段目)。PI がサイトゾル全体に拡散した後、PI 流入点における ANXA4-EGFP の集積は消失した。この結果から、L17E によるサイトゾル送達は、一過的かつ局所的な細胞膜の損傷を伴うサイトゾルへの直接移行経路の促進によるものであると考えられる。また、L17E によるサイトゾル送達後には、細胞内に備わる膜修復関連タンパク質の働きによって膜損傷が修復され、細胞死が回避されることが示唆される。

次に、L17E がエンドサイトーシスを介してサイトゾル送達を行う可能性を検討した。これまでに報告されているサイトゾル送達手法の多くは、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれた後、エンドソームから脱出することで、サイトゾルへの送達を行う^{14,16,98,99}。L17E によるサイトゾル送達に対するエンドサイトーシス経路の関与を検討するため、各エンドサイトーシス経路を特異的に阻害する阻害剤を用いた。クラスリン依存性エンドサイトーシス (CME) 阻害剤である CPZ、ダイナミン阻害剤である Dyno-4A、カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤である Nystatin、マクロピノサイトーシス (MPC) 阻害剤である EIPA を U2OS 細胞に前処理し、その後、各阻害剤の存在下で L17E を投与した。その結果、CPZ または EIPA を処理した条件では L17E による PI のサイトゾル送達が部分的に抑制された (Figure 2-3A)。そこで、L17E の作用に対する CME と MPC の関与をより詳細に検討するため、CME に必要なクラスリン重鎖 (CHC)^{100,101} または MPC に必要な Rac1^{38,100} を、siRNA を用いてノックダウンした (Figures 2-3B, D)。しかし、CHC または Rac1 をノックダウンした状態でも、L17E による PI のサイトゾル送達効率は低下し

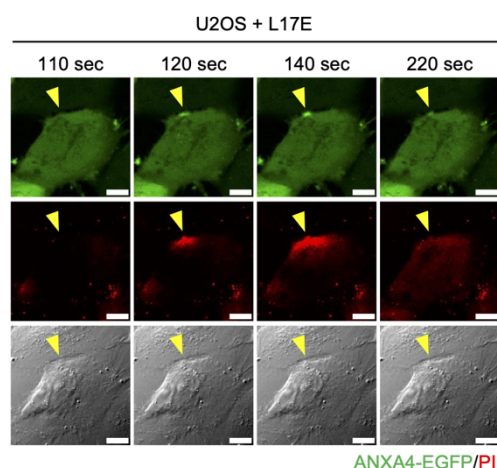


Figure 2-2. Endocytosis is not the major pathway for cytosolic delivery by L17E. Time-lapse imaging of intracellular delivery of propidium iodide (PI) in U2OS cells expressing EGFP-tagged Annexin A4 (ANXA4-EGFP, a membrane repair-related protein) in the presence of L17E (40 μ M). Time after L17E addition is shown above the images. Yellow arrowheads indicate a PI influx point.

なかった (Figures 2-3C,E)。これは、L17E によるサイトゾル送達に、CME や MPC が必要ないことを示唆している。CPZ および EIPA 存在下では、これら阻害剤のオフターゲット効果によって L17E 活性が低下したと考えられる。以上の結果より、L17E によるサイトゾル送達は、エンドソームからの脱出を介さず、主に局所的かつ一時的な細胞膜透過性の向上によるサイトゾルへの直接移行によって起こると考えられる。

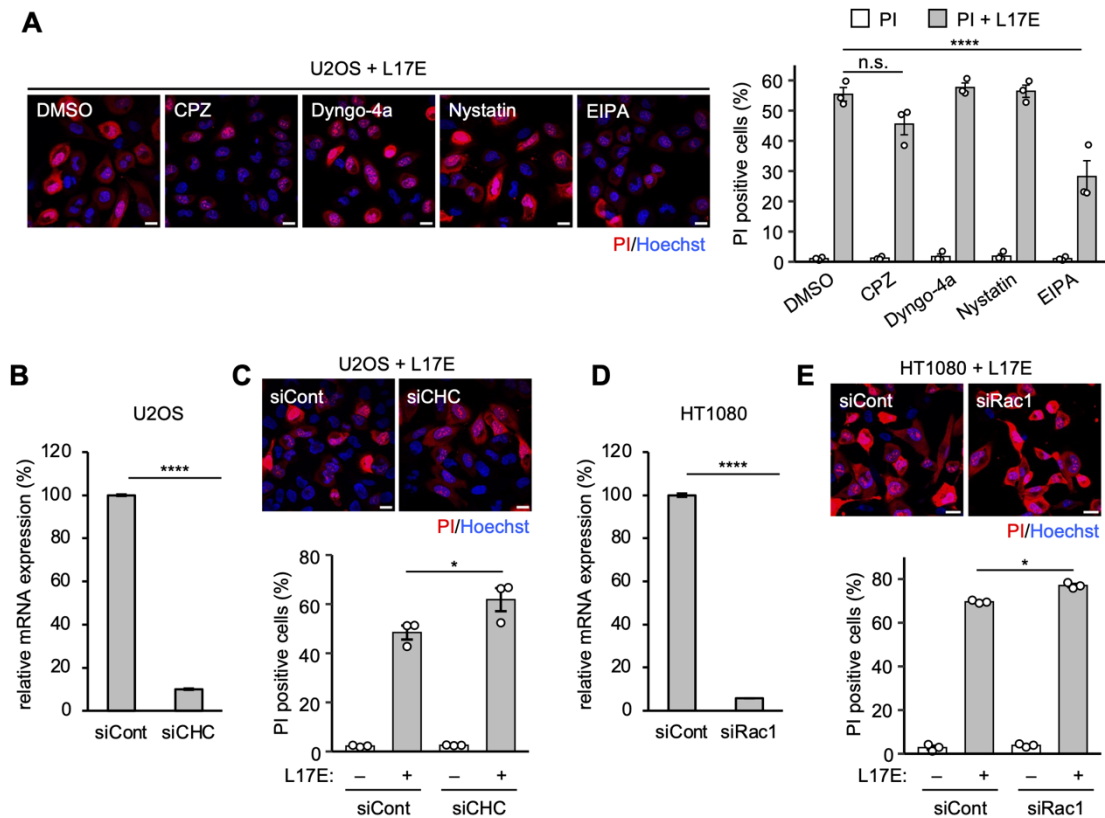


Figure 2-3. Endocytosis is not the major pathway for cytosolic delivery by L17E. (A) U2OS cells were pretreated with CPZ (20 μ M), Dyngo-4a (10 μ M), nystatin (50 μ M), or EIPA (40 μ M) in D-MEM(+) for 30 min and then treated with PI and each inhibitor in the presence or absence of L17E (40 μ M) for 5 min. Representative confocal images (left) and flow cytometry analysis (right) of PI internalized cells. (B) Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis for mRNA levels of clathrin heavy chain (CHC) in U2OS cells. mRNA expression levels were determined by the standard curve method using *GAPDH* as a reference gene. (C) PI delivery by L17E in CHC knockdown (KD) U2OS cells. Cells were transfected either with control siRNA (siCont) or clathrin heavy chain siRNA (siCHC) and treated with PI and L17E (40 μ M). Representative confocal images (top) and results of flow cytometry analysis (bottom) of the cells attaining L17E-mediated internalization of PI are shown. (D) qPCR analysis for mRNA levels of Rac1 in HT1080 cells. mRNA expression level was determined by the standard curve method using *GAPDH* as a reference gene. (E) PI delivery by L17E in Rac1 KD HT1080 cells. Cells were transfected either with control siRNA (siCont) or Rac1 siRNA (siRac1) and treated with PI and L17E (40 μ M). Scale bars, 20 μ m (A, C, E). Data represent the mean $\pm$ SD of triplicate samples from one of two independent experiments (B, D) and the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (A, C, E). *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A, C, E); Student's t-test (B, D).

第2節 異なる細胞株における L17E によるサイトゾル送達活性の評価

上記の検討を進める中で、L17E によるサイトゾル送達の効率が細胞株ごとに大きく異なることが明らかとなった。例えば、U2OS 細胞では、40 μ M の L17E 処理により約 50%の細胞に PI が送達されたが (Figure 2-3C)、HT1080 細胞では同条件で 70%の送達効率が達成された (Figure 2-3E)。所属研究室の先行研究において、HeLa 細胞では 40 μ M の L17E 処理により 30~50%の送達効率が得られることが示されている^{31,102}。これらの結果を踏まえ、異なる細胞株での L17E の活性をさらに評価することとした。

11 種類のがん細胞株を用いて、それぞれの細胞株における L17E 依存的な PI のサイトゾル送達効率をフローサイトメトリー解析により定量的に評価した。その結果、PI 送達効率は細胞株ごとに大きく異なっており、5%未満から 70%以上の範囲で分布していた (Figure 2-4 下のグラフ)。共焦点顕微鏡観察によっても、細胞密度が同等であるにもかかわらず、細胞株間で送達効率が異なることが確認された (Figure 2-4 上の画像)。Ras 変異を持ち、高い MPC 活性を持つことが報告されている HT1080 細胞⁴⁷および MIA PaCa-2 細胞⁷⁴は、調べた細胞株の中で最も高い送達効率を示した (Figure 2-4、ともに約 70%)。一方、同じく Ras 変異を持ち、MPC を恒常的に誘導する T24 細胞^{103,104}では、L17E に対しする感受性が極めて低かった (Figure 2-4、約 5%)。この結果は、MPC を介した取り込みが必ずしも L17E 活性に関連していないことを改めて強調している。また、注目すべきことに、骨肉腫由来細胞株である U2OS 細胞 (Figure 2-4、送達効率約 50%) と SJSA1 細胞 (Figure 2-4、約 5%)、ならびに乳がん由来細胞株である MDA-MB-231 細胞 (Figure 2-4、約 60%) と MCF7 細胞 (Figure 2-4、約 15%) は、それぞれ同じ系統であるにもかかわらず、2 種類の細胞株における送達効率は顕著に異なっていた。これらの結果は、L17E によるサイトゾル送達効率が細胞株の由来や系統のみで決定されるのではなく、個々の細胞株が持つ特性に大きく依存すること示唆している。

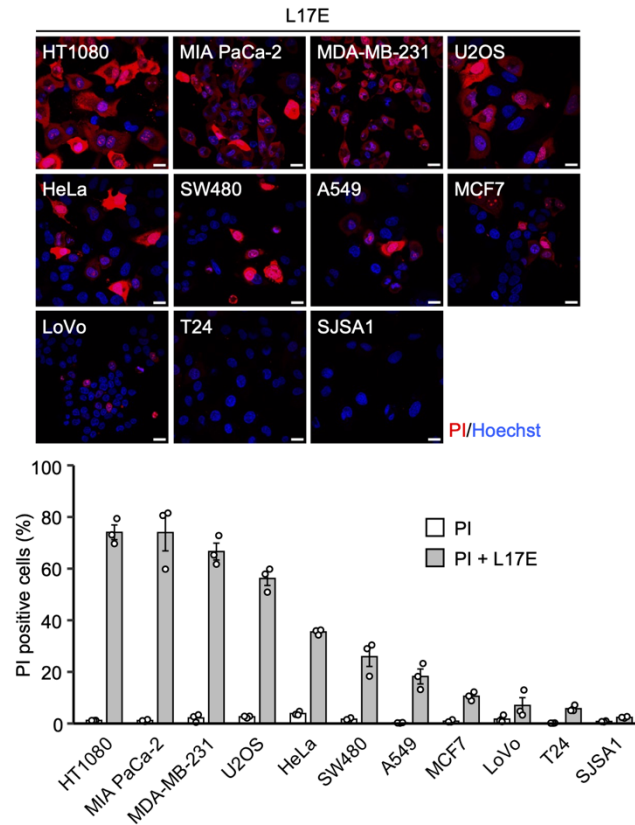


Figure 2-4. Cytosolic delivery efficiency by L17E in different cell lines. PI delivery by L17E in 11 different cell lines. Cells were treated with PI and L17E (40 μ M). Representative confocal images (top) and results of flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells are shown. Scale bars, 20 μ m. Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates.

第3節 L17E 活性の決定因子としての KCa3.1 の同定

上述したような L17E の細胞株選択性の原因を解明することは、L17E によるサイトゾル送達メカニズムの解明につながる可能性がある。そこで、細胞株間での送達効率の違いを決定する L17E 活性の潜在的な調節因子を特定することを目的とし、特定のタンパク質の細胞株間での発現レベルの違いが各細胞株における L17E による送達効率に寄与していると仮定した。この仮説を検証するために、前節で送達効率を評価した 11 種類の細胞株における L17E 活性と遺伝子発現量の相関を解析した。がん細胞株の遺伝子発現データベースである Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE)¹⁰⁵ から約 16,000 個の遺伝子に関する発現量データを取得し、それぞれの遺伝子について、発現レベルと L17E 活性との相関係数を算出した (Figure 2-5A)。L17E によるサイトゾル送達が細胞膜を介したものであると考えられることから、膜タンパク質をコードする遺伝子に着目したところ、解析した遺伝子の中で 3 番目に高い相関係数を示した *KCNN4* が特定された (Figures 2-5A, B)。*RPL13AP20* および *UCN* は *KCNN4* より高い相関係数を示したが (Figure 2-5A, Table 2-1)、*RPL13AP20* は偽遺伝子であり¹⁰⁶、*UCN* は哺乳類のストレス応答に関与するペプチドである Urocortin をコードしており¹⁰⁷、細胞膜と L17E の相互作用における調節因子としての重要性は低いと考えた。

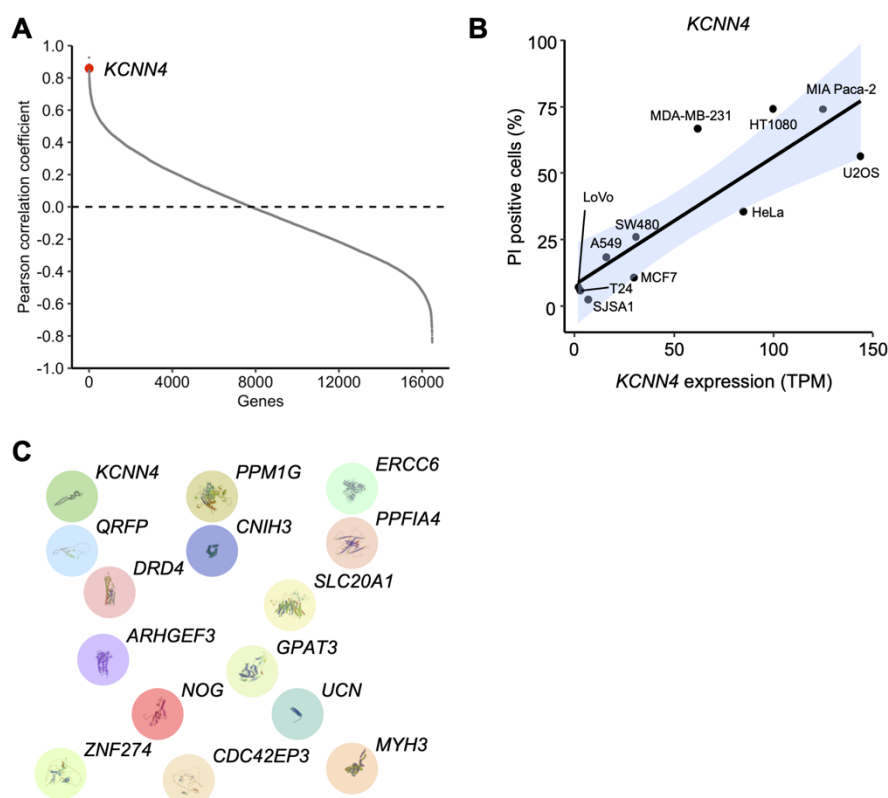


Figure 2-5. Correlative gene expression analysis identifies *KCNN4*. (A) Correlation analysis between PI delivery efficiency analyzed in Figure 4 and expression level of about 16,000 genes. (B) Correlation coefficient between *KCNN4* mRNA level and PI delivery efficiency in the 11 cell lines. (C) Protein functional interaction network analyzed by STRING.

Table 2-1. List of genes with high correlation.

Gene	Function	R
RPL13AP20	ribosomal protein L13a pseudogene 20	0.926
UCN	Urocortin is involved in the mammalian stress response	0.884
KCNN4	potassium calcium-activated channel subfamily N member 4	0.859
PPFIA4	PTPRF interacting protein alpha 4	0.847
NOG	Noggin is an inhibitor of several bone morphogenetic proteins (BMPs)	0.842
LINC01715	long intergenic non-protein coding RNA 1715	0.842
DRD4	The dopamine receptor D4 is a dopamine D2-like G protein-coupled receptor	0.841
ZNF274	Zinc finger protein 274 has been suggested to be a transcriptional repressor	0.833
ERCC6	DNA excision repair protein	0.821
MYH3	Myosin-3	0.819
LINC01275	long intergenic non-protein coding RNA 1275	0.806
ENSG00000244313	Ribosomal Protein S10 (RPS10) Pseudogene	0.801
CNIH3	Cornichon Family AMPA Receptor Auxiliary Protein 3	0.801
EEF1E1P1	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Epsilon 1 Pseudogene 1	0.801
ARHGEF3	Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) 3	0.800
ENSG00000267939	an RNA Gene, and is affiliated with the lncRNA class	0.791
CDC42EP3	act as effectors of CDC42 function	0.790
QRFP	Pyroglutamylated RFamide Peptide is the RFamide family of neuropeptides	0.782
ENSG00000213293	a Pseudogene	0.781
ENSG00000267317	an RNA Gene, and is affiliated with the lncRNA class	0.775
ENSG00000272236	an RNA Gene, and is affiliated with the lncRNA class	0.772
ENSG00000251194	an RNA Gene, and is affiliated with the lncRNA class	0.769
GPAT3	catalyze the initial step of de novo triacylglycerol (TAG) synthesis	0.768
CD44-AS1	CD44 Antisense RNA 1	0.768
SLC20A1	Sodium-phosphate symporter	0.767
PPM1G	the PP2C family of Ser/Thr protein phosphatases	0.766
ENSG00000254639	an RNA Gene, and is affiliated with the lncRNA class	0.764
SNORD73B	an RNA Gene, and is affiliated with the snoRNA class	0.762
ENSG00000279144	an Uncategorized gene	0.760
PRDX6-AS1	an RNA Gene, and is affiliated with the lncRNA class	0.759

KCNN4 は、細胞容積調節¹⁰⁸、がん細胞の増殖や移動^{109,110}、免疫機能の調節¹¹¹ など、さまざまな生理的過程で重要な役割を果たしていることが知られる。細胞膜とペプチドの相互作用に関しては、最近の Trofimenko らの研究によって、*KCNQ5*、*KCNN4*、および *KCNK5* によってコードされるカリウムチャネルが、TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆（代表的な CPP である TAT と p120 RasGAP の SH3 ドメイン由来のペプチド配列との融合ペプチド）の細胞内移行を、膜電位の調節を介して促進することが報告されている¹¹²。そこで、*KCNN4* 以外にもカリウムチャネルをコードする遺伝子が同定されている可能性を考え、*KCNN4* と関連する遺伝子を STRING 解析¹¹³ によって探索したが、相関解析で特定された候補遺伝子の中では、他のカリウムチャネルをコードする遺伝子および *KCNN4* と機能的に関連する遺伝子は特定されなかった (Figure 2-5C)。しかし、カリウムチャネルとカチオン性 CPP の細胞内移行の関係が報告されていることを踏まえ、*KCNN4* が L17E 活性の決定因子である可能性を検証することとした。

L17E は、従来の CPP とは異なり、生物活性高分子化合物をエンドサイトーシス経路に依存せず、かつ送達したい目的分子との結合を必要とせずにサイトゾルに送達できるため、その作用メカニズムも他の CPP とは異なると予想される。しかし、L17E もカチオン性ペプチドであるため、L17E と細胞膜の相互作用が *KCNN4* 依存的な膜電位の調節によって影響されると仮定した。そこで初めに、リアルタイム定量 PCR によって、相関解析に使用した 11 種類の細胞株における *KCNN4* 発現量を評価した。これらの細胞株における相対的な mRNA レベルは、CCLE から得られた発現量データと概ね一致しており (Figures 2-6A, B)、*KCNN4* が L17E 活性の調節において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

KCNN4 が L17E によるサイトゾル送達に関与しているかどうかを調べるため、*KCNN4* を高レベルで発現する骨肉腫細胞株 U2OS 細胞 (Figures 2-6A, B) を選択し、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集によって *KCNN4* をノックアウト (KO) した。*KCNN4* KO U2OS 細胞において、検出された全アレルにフレームシフト変異が導入されていることを確認した (Figure 2-7A)。さらに、定量 PCR の結果、野生型 (WT) と比較して *KCNN4* mRNA レベルが 90%以上減少していることが明らかとなった (Figure 2-7B)。これらの結果から、*KCNN4* KO U2OS 細胞において、*KCNN4* の発現が十分に欠損できているとみなした。

KCNN4 KO U2OS 細胞における L17E 活性を評価したところ、*KCNN4* KO U2OS 細胞では、L17E による PI 送達効率が WT U2OS 細胞と比較して著しく低下していることが明らかになった (Figure 2-7C)。さらに、L17E ペプチド自体の細胞内局在を観察するために、FITC 標識した L17E (L17E(FITC)) を WT および *KCNN4* KO U2OS 細胞に添加したところ、WT U2OS 細胞においては L17E(FITC)がサイトゾル中に拡散する様子が観察されたが、*KCNN4* KO U2OS 細胞においてはサイトゾル内へ拡散した L17E(FITC)のシグナルはほとんど認められなかった (Figure 2-7D)。WT U2OS 細胞においては、L17E(FITC)は同時にサイトゾルへと移行した PI と同様の局在を示しており、L17E 自体のサイトゾル移行も *KCNN4* 依存的に生じることが確認された (Figure 2-7D)。*KCNN4* KO U2OS 細胞に FLAG タグ付き *KCNN4* (FLAG-KCa3.1) を発現させたところ、L17E による PI 送達効率が WT U2OS 細胞とほぼ同レベルまで回復したことから、ゲノム編集によるオフターゲット効果の影響の可能性はないと考えられる (Figures 2-7E, F)。また、siRNA を用いた *KCNN4* のノ

ックダウン (KD) を行うことによって、HeLa 細胞および HT1080 細胞においても、L17E による PI 送達効率が低下することを確認した (Figure 2-8A, B)。以上の結果から、*KCNN4* の欠損により、L17E によるサイトゾル送達が著しく抑制されること、すなわち *KCNN4* の発現が L17E による高効率なサイトゾル送達に必要なことが示された。

KCNN4 の発現レベルと L17E によるサイトゾル送達の間をさらに検討するため、*KCNN4* の発現レベルが低い膀胱がん細胞株 T24 細胞、骨肉腫細胞株 SJSA1 細胞、および非がん性の胚性腎細胞株 HEK293T 細胞を選択し (Figures 2-6A, B, C)、FLAG タグ付き *KCNN4* (FLAG-KCa3.1) を過剰発現させた (Figure 2-9A)。 *KCNN4* を過剰発現させた場合には、空ベクターをトランスフェクションしたコントロール群と比較して、L17E によるサイトゾル送達効率が有意に増加した (Figure 2-9B)。これらの結果から、がん細胞および非がん細胞の両方において、L17E によるサイトゾル送達には、*KCNN4* の発現が必要かつ十分であることが示された。

次に、*KCNN4* によってコードされるカリウムチャンネル KCa3.1 のチャンネル活性が L17E によるサイトゾル送達に与える影響を検討した。U2OS 細胞および HeLa 細胞を、選択的 KCa3.1 阻害剤である TRAM-34^{61,62} または KCa3.1 活性化剤である SKA-31⁶⁵ で処理したところ、TRAM-34 によって L17E 活性が有意に低下し、反対に SKA-31 によって L17E 活性が有意に増加した (Figure 2-10)。このことから、KCa3.1 チャンネル活性を薬理的に変化させることで、L17E によるサイトゾル送達効率を調節できることが示された。以上の結果から、*KCNN4* の発現と KCa3.1 のカリウムチャンネル活性が各細胞株における L17E によるサイトゾル送達の効率を調節しており、*KCNN4* の発現量の違いが細胞株間における L17E に対する感受性の違いを生じさせる要因の一つであることが示された。

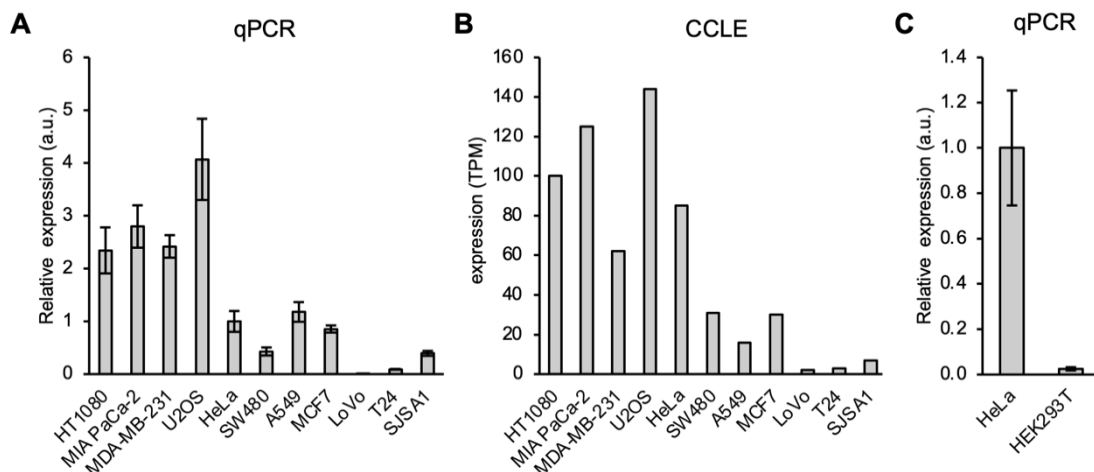


Figure 2-6. *KCNN4* expression in 11 cancer cell lines and HEK293T cells. (A) qPCR analysis for mRNA levels of *KCNN4* in the indicated 11 cell lines. *KCNN4* expression was quantified by comparative CT method using *GAPDH* as a reference gene. (B) *KCNN4* expression data obtained from the Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE). (C) qPCR analysis for mRNA levels of *KCNN4* in HeLa and HEK293T cells. *KCNN4* expression was quantified by the comparative CT method using *GAPDH* as a reference gene. Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (A, C).

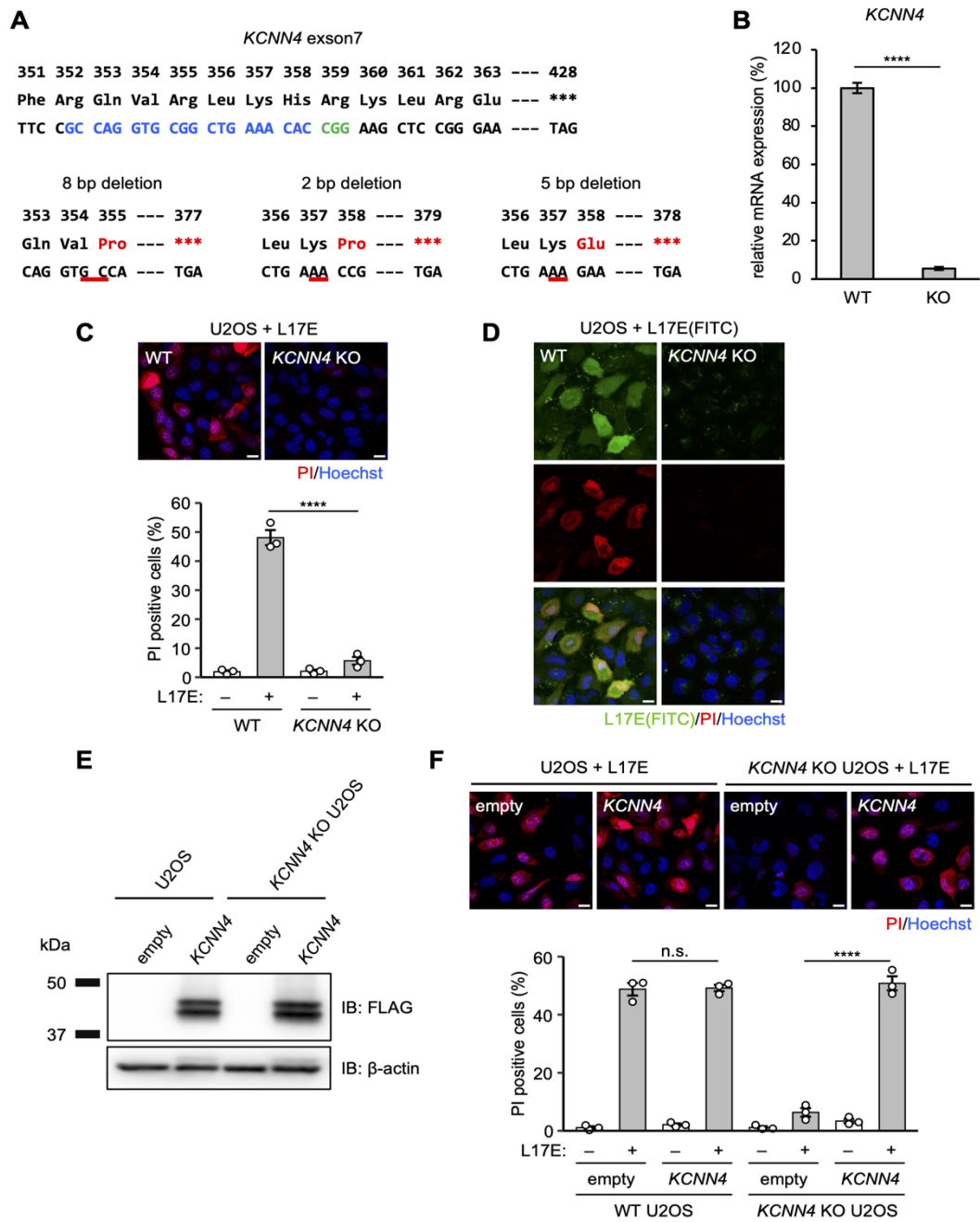


Figure 2-7. *KCNN4* KO inhibits L17E activity in U2OS cells. (A) CRISPR-Cas9 target site in the *KCNN4* gene. The guide sequence and the protospacer adjacent motif (PAM) are shown in blue and green characters, respectively. CRISPR-Cas9-mediated deletions and insertions are shown in red characters. (B) qPCR analysis for mRNA levels of *KCNN4* in WT and *KCNN4* KO U2OS cells. The mRNA expression level was determined by the standard curve method using *GAPDH* as a reference gene. (C) PI delivery by L17E in *KCNN4* KO U2OS cells. WT or *KCNN4* KO U2OS cells were treated with PI and L17E (40 μ M). Representative confocal images (top) and flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. (D) Confocal images of FITC-labeled L17E (L17E(FITC)) and PI. WT U2OS cells and *KCNN4* KO U2OS cells were treated with L17E(FITC) (20 μ M) and PI for 5 min. (E) Western blot analysis for FLAG-KCa3.1 expression in WT and *KCNN4* KO U2OS cells transfected with an empty vector or FLAG-KCa3.1 (*KCNN4*). (F) PI delivery by L17E in WT and *KCNN4* KO U2OS cells. Cells were transfected with either empty vector or FLAG-KCa3.1 (*KCNN4*) vector and treated with PI in the presence or absence of L17E (40 μ M) for 5 min. Representative confocal images (top) and flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. Scale bars, 20 μ m (C, E). Data represent the mean $\pm$ SD of triplicate samples from one of two independent experiments (B) and the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (C, F). ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. Student's t-test (B); one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (C, F).

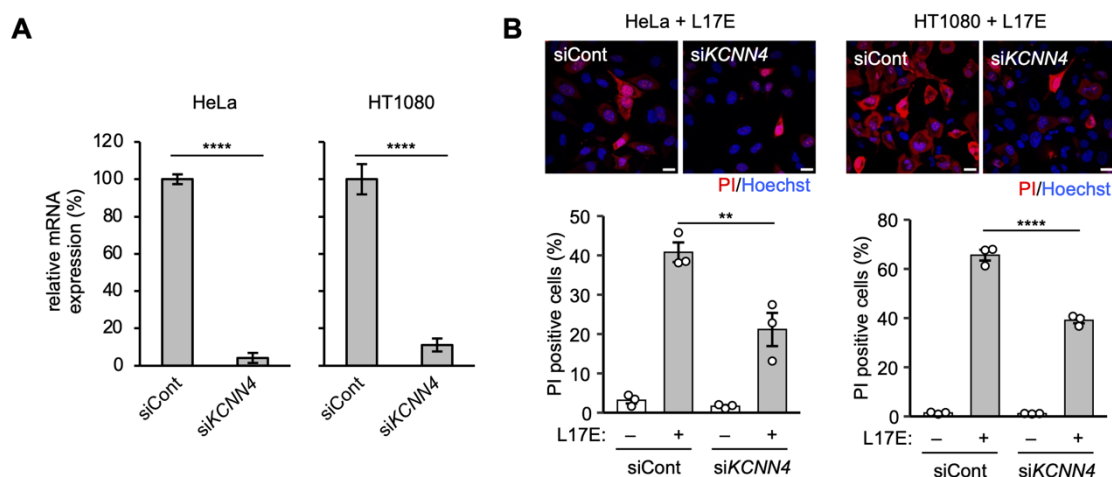


Figure 2-8. *KCNN4* KD inhibits L17E activity in HeLa and HT1080 cells. (A) qPCR analysis for mRNA levels of *KCNN4* in HeLa or HT1080 cells. The mRNA expression level was determined by the standard curve method using *GAPDH* as a reference gene. (B) PI delivery by L17E in *KCNN4* KD HeLa or HT1080 cells. Cells were transfected with either control siRNA (siCont) or *KCNN4* siRNA (siKCNN4) and treated with PI in the presence or absence of L17E (40 μ M) for 5 min. Representative confocal images (top) and flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. Scale bars, 20 μ m (B). Data represent the mean $\pm$ SD of triplicate samples from one of two independent experiments (A) and the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (B). **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$. Student's t test (A); one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (B).

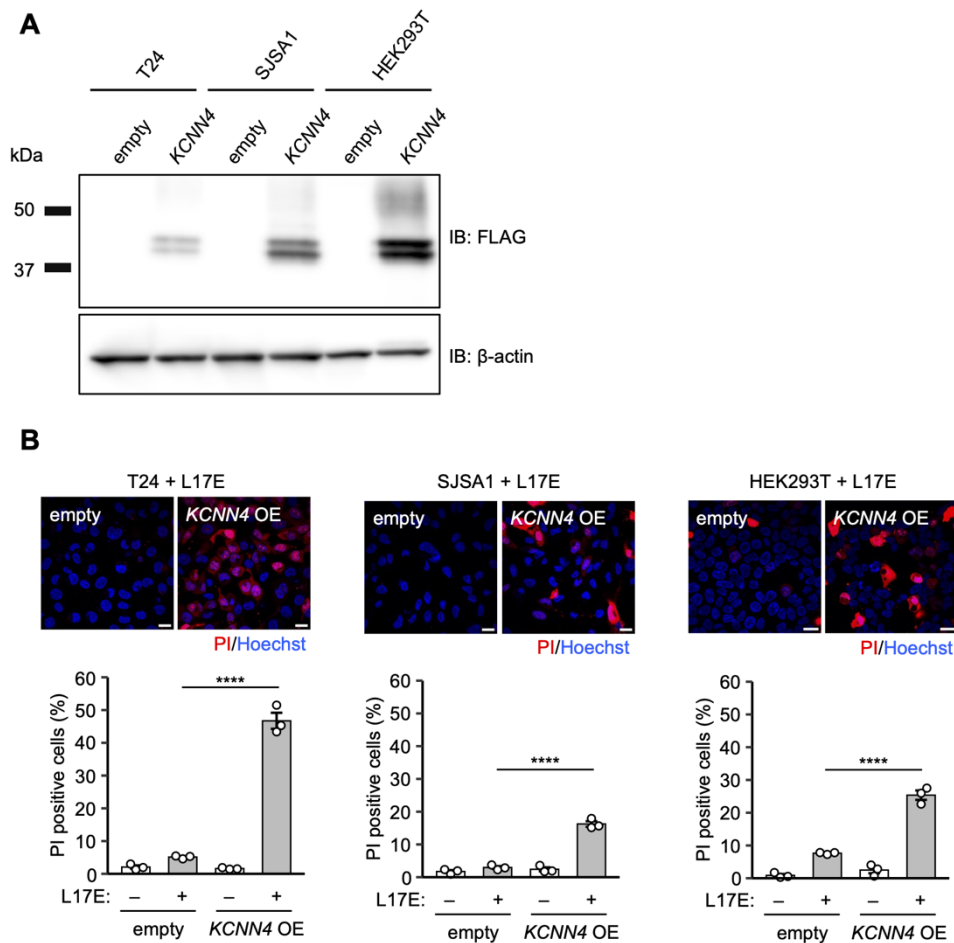


Figure 2-9. *KCNN4* KD inhibits L17E activity in HeLa and HT1080 cells. (A) Western blot analysis for FLAG-KCa3.1 expression in T24, SJSA1, and HEK293T cells transfected with empty vector or FLAG-KCa3.1 (*KCNN4*). (B) PI delivery by L17E in *KCNN4* overexpressing T24, SJSA1 and HEK293T cells. Cells were transfected with either empty vector or FLAG-KCa3.1 vector (*KCNN4* OE) and treated with PI in the presence or absence of L17E (40 μ M) for 5 min. Representative confocal images (top) and flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (B). ****, $p < 0.0001$. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (B).

第4節 L17Eによるサイトゾル送達への膜電位の関与

CPPの一つであるTATペプチドの細胞内移行に複数のカリウムチャンネルが関与していることを示唆した先行研究¹¹²を踏まえ、L17E活性にKCa3.1以外のカリウムチャンネルが関与する可能性を検討した。他のカリウムチャンネルをコードする遺伝子として、*KCNN1*、*KCNT1*、*KCNJ2*を選択した。*KCNN1*はカルシウム依存性カリウムチャンネルKCa2.1^{114,115}を、*KCNT1*はナトリウム依存性カリウムチャンネルKCa4.1^{116,117}を、*KCNJ2*は内向き整流性カリウムチャンネルKir2.1¹¹⁸をそれぞれコードしている。FLAGタグを付加したこれらのカリウムチャンネルをT24細胞に過剰発現させ (Figures 2-11A, B)、L17Eによるサイトゾル送達活性を評価した。その結果、*KCNN1*、*KCNT1*、または*KCNJ2*のいずれを過剰発現させた場合でも、L17Eによるサイトゾル送達効率が增加することが確認された (Figure 2-11C)。そこで、これら3つのカリウムチャンネルの内因性発現量をCCLEによって調べたところ、今回用いた11種類の細胞株では、どのチャンネルもほとんど発現していないことが確認された (Figure 2-11D)。そのため、CCLEを用いた相関解析によっては、*KCNN4*以外のカリウムチャンネル遺伝子がヒットしなかったと考えられる。以上から、これら11種類の細胞株においては、*KCNN4*がL17E活性の違いを決定する主要因子であるものの、L17E活性に必要な要因は、各チャンネルに固有の機能ではなく、これらのカリウムチャンネルに共通する一般的な機能であると考えられる。

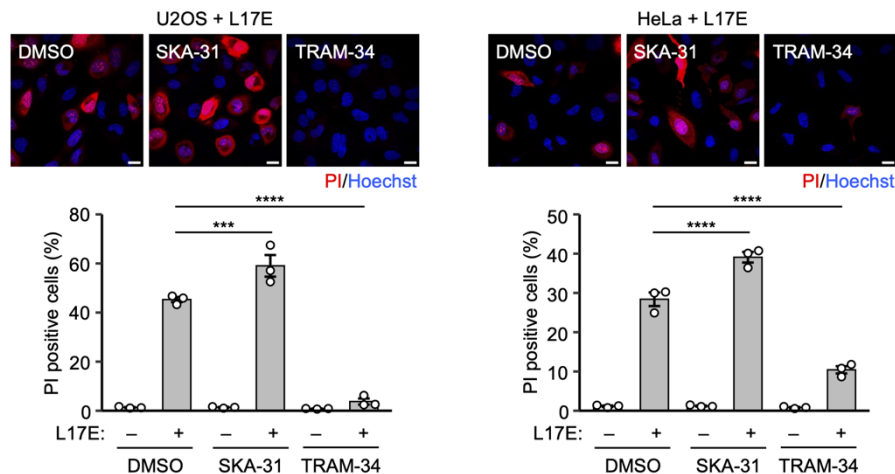


Figure 2-10. Inhibitor and activator of KCa3.1 modulate L17E activity in U2OS and HeLa cells. PI delivery by L17E in U2OS or HeLa cells treated with KCa3.1 activator (SKA-31) or inhibitor (TRAM-34). Cells were pretreated with DMSO as vehicle control, SKA-31 (10 μ M) or TRAM-34 (10 μ M) for 5 min, and then treated with PI in the presence or absence of L17E (40 μ M) with either DMSO, SKA-31 or TRAM-34 for 5 min. Representative confocal images (top) and flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. Scale bars, 20 μ m. Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test.

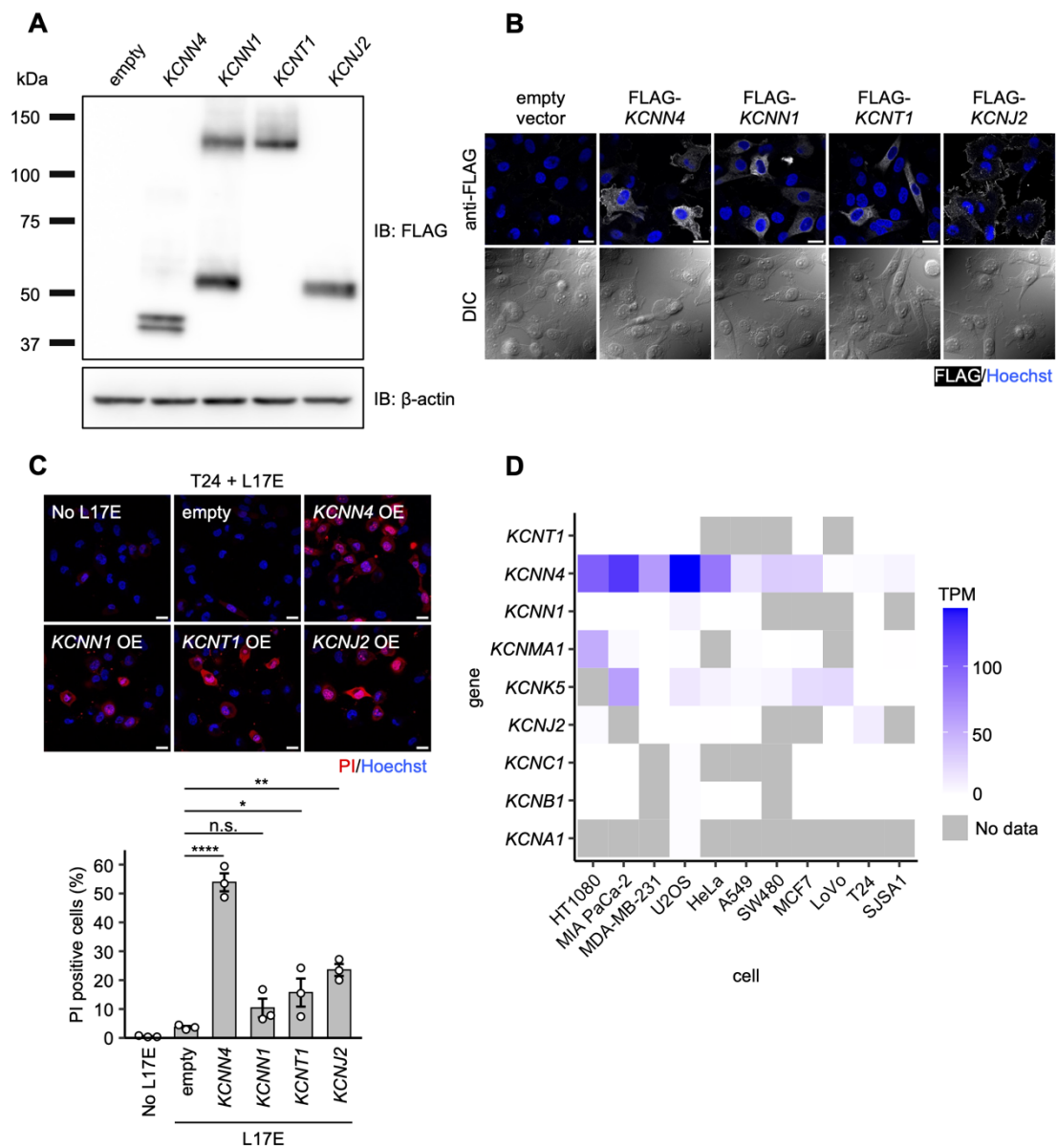


Figure 2-11. The potential ability of various potassium channels to stimulate the L17E-mediated delivery. (A) Western blot analysis for FLAG-tagged potassium channels in T24 cells transfected with either empty vector, FLAG-KCa3.1 (*KCNN4*), FLAG-KCa2.1 (*KCNN1*), FLAG-KCa4.1 (*KCNT1*) or FLAG-Kir2.1 (*KCNJ2*) vector. (B) Immunostaining analysis for FLAG-tagged potassium channels in T24 cells treated as (A). (C) PI delivery by L17E in T24 cells overexpressing different potassium channels as (A). Cells were transfected with each vector and treated with PI and L17E (40 μ M). Representative confocal images (top) and results of flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. (D) Expression data of the indicated genes in each cell line. Scale bars, 20 μ m (B, C). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (C). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (C).

カリウムチャネルは細胞膜電位の維持に重要な役割を担っており、また、膜傷害性ペプチドの作用には適切な膜電位形成が不可欠であることが報告されている^{119,120}。また、CPPの細胞内移行についても膜電位の重要性が多く議論されてきている^{96,112,121-124}。これらの報告を踏まえ、各細胞株における *KCNN4* の発現レベルが静止膜電位を決定し、それによって L17E 活性が影響を受ける可能性を検討した。第3節での相関解析に使用した 11 種類の細胞株における静止膜電位を測定し、L17E によるサイトゾル送達活性との相関を解析した。その結果、予想に反し、静止膜電位と L17E 活性の間にはほとんど相関が認められなかった (Figures 2-12A, B)。このことから、*KCNN4* 発現レベルの違いのみに応じてそれぞれの細胞株での静止膜電位が決定されているわけではないと言える。*KCNN4* の発現と静止膜電位の関係についてさらに検討するため、*KCNN4* を欠損させた場合および、KCa3.1 チャネル活性を阻害した場合の膜電位を調べた。U2OS 細胞および HeLa 細胞において、SKA-31 を用いて KCa3.1 を活性化すると、膜電位が大きく過分極（すなわち、膜電位がより負になる）する一方、TRAM-34 で KCa3.1 を阻害した場合には、膜電位はほとんど変化しなかった (Figures 2-12C, D)。さらに、KO もしくは KD によって *KCNN4* の発現を欠失させた場合でも、膜電位にはほとんど影響がなかった (Figures 2-12C, D)。これらの結果は、*KCNN4* の

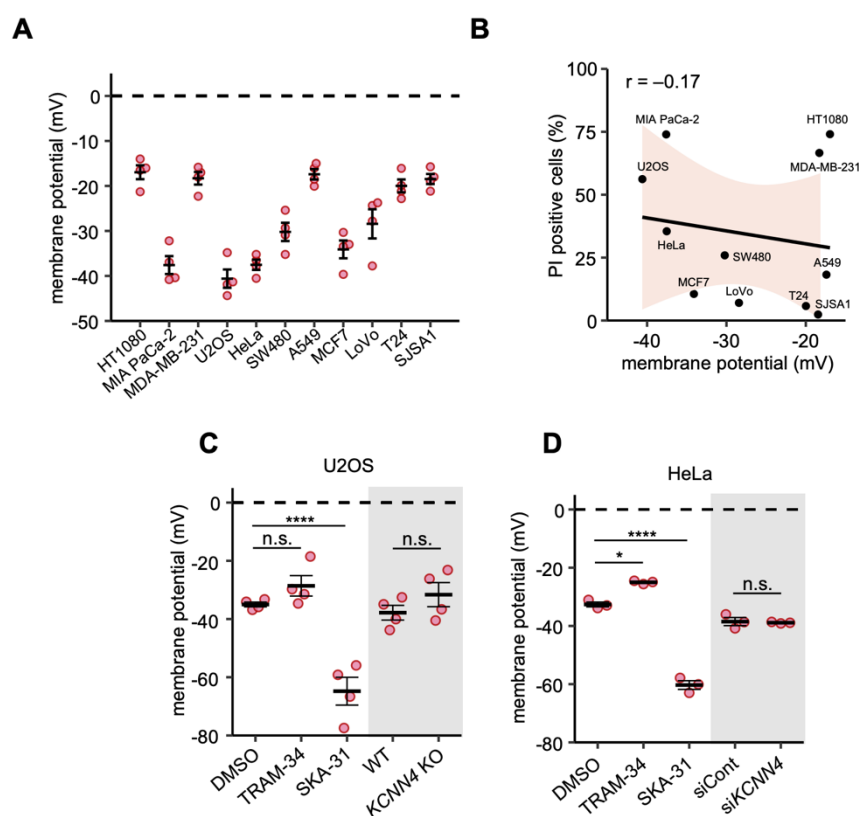


Figure 2-12. Resting membrane potential is not decided by KCa3.1. (A) Resting membrane potential measurement in 11 cell lines. Resting membrane potential of indicated cell lines were measured using DiBAC₄(3). (B) Correlation between resting membrane potential evaluated in A and PI delivery efficiency in 11 cell lines assessed in Figure 4. (C) Membrane potential measurement in WT U2OS cells treated either with DMSO, TRAM-34 or SKA-31 and *KCNN4* KO U2OS cells. (D) Membrane potential measurement in HeLa cells. Data represent the mean $\pm$ SE of three (D) or four (A, C) independent biological replicates. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey–Kramer’s post hoc test (C, D).

過剰発現¹²⁵やカルシウム依存性カリウムチャネル *KCNMA1* の機能不全¹²⁶ によっては、静止膜電位は変化しないという過去の報告と一致する。以上の結果より、*KCNN4* の発現は静止膜電位に大きな影響を与えず、別の要因を介して L17E の活性を制御していると結論づけた。

次に、L17E 処理中の膜電位変化が、L17E によるサイトゾル送達の駆動力として機能する可能性を検討した。まず、膜電位を人為的に変化させた時の L17E 活性を調べるため、細胞外の Na^+ を K^+ に置き換えることで膜電位を調節した¹²⁷。異なる濃度のカリウム (5.4、10、20、および 140 mM KCl) を含む HEPES 緩衝液を使用して HeLa 細胞の膜電位を調節し (Figure 2-13A)、それぞれの膜電位条件における L17E 活性を評価した。その結果、膜電位が脱分極するにつれて、L17E によるサイトゾル送達効率が段階的に低下することが確認された (Figure 2-13B)。対照的に、カリウム選択性イオノフォアである valinomycin¹²⁸ によって T24 細胞を処理すると、膜電位は過分極し (Figure 2-13C)、この条件において、T24 細胞における L17E によるサイトゾル送達活性は増加した (Figure 2-13D)。以上の結果は、静止膜電位そのものよりも、膜電位を過分極方向へ変化させることが、L17E 活性の増強にとって重要である可能性を示唆している。

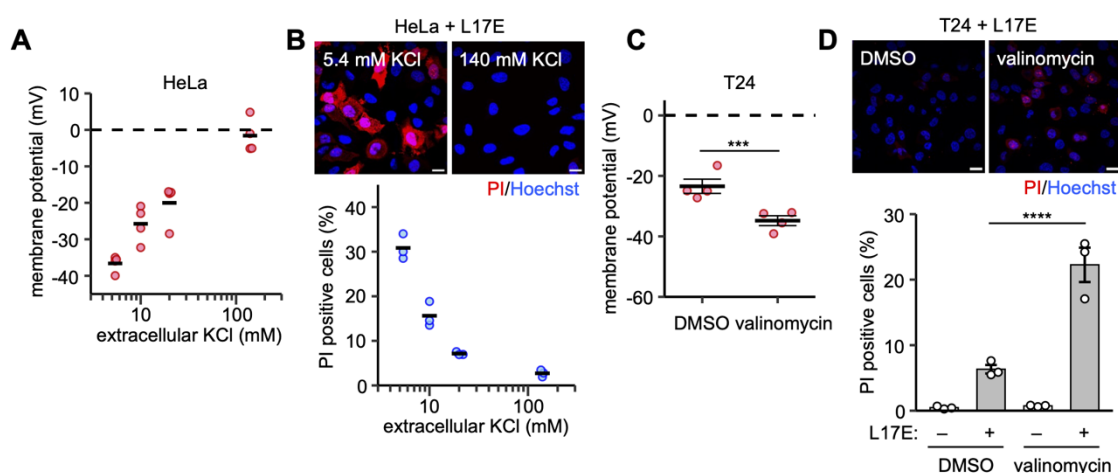


Figure 2-13. Membrane potential modulation affects L17E-mediated delivery. (A) Evaluation of the membrane potential elimination by the incubation with high concentration of extracellular K^+ in HeLa cells. Cells were incubated in HEPES buffers containing different concentration of KCl (5.4, 10, 20, 140 mM KCl) and membrane potential was measured using DiBAC₄(3). (B) PI delivery by L17E in HeLa cells with reduced membrane potential. Cells were incubated in HEPES buffers as E and then treated with PI in the presence or absence of L17E in each HEPES buffer. (C) The effect of valinomycin on the membrane potential of T24 cells. Cells were treated with valinomycin, and membrane potential was measured using DiBAC₄(3). (D) PI delivery by L17E in T24 cells treated with valinomycin. Cells were pretreated with DMSO or valinomycin and then treated with PI and L17E (40 μM) either with DMSO or valinomycin. Scale bars, 20 μm (B, D). Data represent the mean $\pm$ SE of three (B, D) or four (A, C) independent biological replicates. ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Student's t test (C); One-way ANOVA followed by Tukey–Kramer's post hoc test (B, D).

第5節 L17Eによるサイトゾル送達への細胞内 Ca^{2+} の関与

以上の結果を踏まえ、L17E 処理中に KCa3.1 チャンネルが細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加によって活性化を受け、それが L17E 活性を増強している可能性を検討した。KCa3.1 チャンネルは細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加によって活性化されることが報告されている^{129,130}。KCa3.1 チャンネルの細胞内 C 末端にはカルモジュリン (CaM) が恒常的に結合しており、 Ca^{2+} が CaM に結合することでチャンネル構造が変化し、チャンネル開口が誘導されることが報告されている^{131,132}。そこで、L17E によるサイトゾル送達における細胞内 Ca^{2+} の寄与を検討した。はじめに、細胞膜に局在化する遺伝子コード型カルシウムプローブ GCaMP8s-CAAX^{133,134} を用いて、U2OS 細胞における L17E 処理中の細胞内 Ca^{2+} 濃度をモニターした。その結果、L17E 添加によって GCaMP8s の蛍光強度が増強し、L17E 添加直後に細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇することが確認された (Figure 2-14A)。L17E による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が KCa3.1 の活性化および L17E によるサイトゾル送達に重要であるかを検証するために、細胞膜透過性の細胞内カルシウムキレート剤である BAPTA-AM¹³⁵ を用いた。BAPTA-AM を用いることで、L17E により生じる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加をほぼ完全に抑制できることを確認した (Figure 2-14A)。興味深いことに、BAPTA-AM を処理することで、U2OS 細胞および HeLa 細胞において L17E のサイトゾル送達活性が大幅に低下した (Figure 2-14B)。さらに、BAPTA-AM 処理後に SKA-31 を用いて KCa3.1 を活性化したところ、 Ca^{2+} 濃度の増加を回復させることなく (Figure 2-14A)、L17E によるサイトゾル送達活性のみを回復させることができた (Figure 2-14B)。これらの結果は、L17E によって誘導される細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加とそれに続く KCa3.1 の活性化が、L17E によるサイトゾル送達にとって重要であることを示唆している。

次に、L17E によって引き起こされる細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が、細胞内 Ca^{2+} ストアからの放出によるものか、細胞外 Ca^{2+} の流入によるものかを検討した。細胞内 Ca^{2+} ストアを枯渇させるために、小胞体 Ca^{2+} ATPase の阻害剤である thapsigargin (Tg)¹³⁶ を使用した。Tg 処理によっては、L17E による細胞内 Ca^{2+} の増加や PI の送達は抑制されなかった (Figure 2-14C)。一方、膜透過性を持たないカルシウムキレート剤である EGTA を用いて細胞外 Ca^{2+} を枯渇させた場合では、L17E による細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加および PI のサイトゾル送達の両方が著しく抑制された (Figures 2-14C, D)。

さらに、L17E による細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が L17E の膜傷害活性に関連しているかを確認するため、膜傷害性およびサイトゾル送達活性を持たない変異ペプチド L9E をネガティブコントロールとして用いた (Figure 2-15A)。その結果、L9E を添加しても Ca^{2+} 濃度の顕著な増加は観察されなかった (Figure 2-15B)。以上の結果は、L17E が細胞膜と相互作用することで細胞外から Ca^{2+} が流入し、これが KCa3.1 の活性化を引き起こす可能性を示唆している。

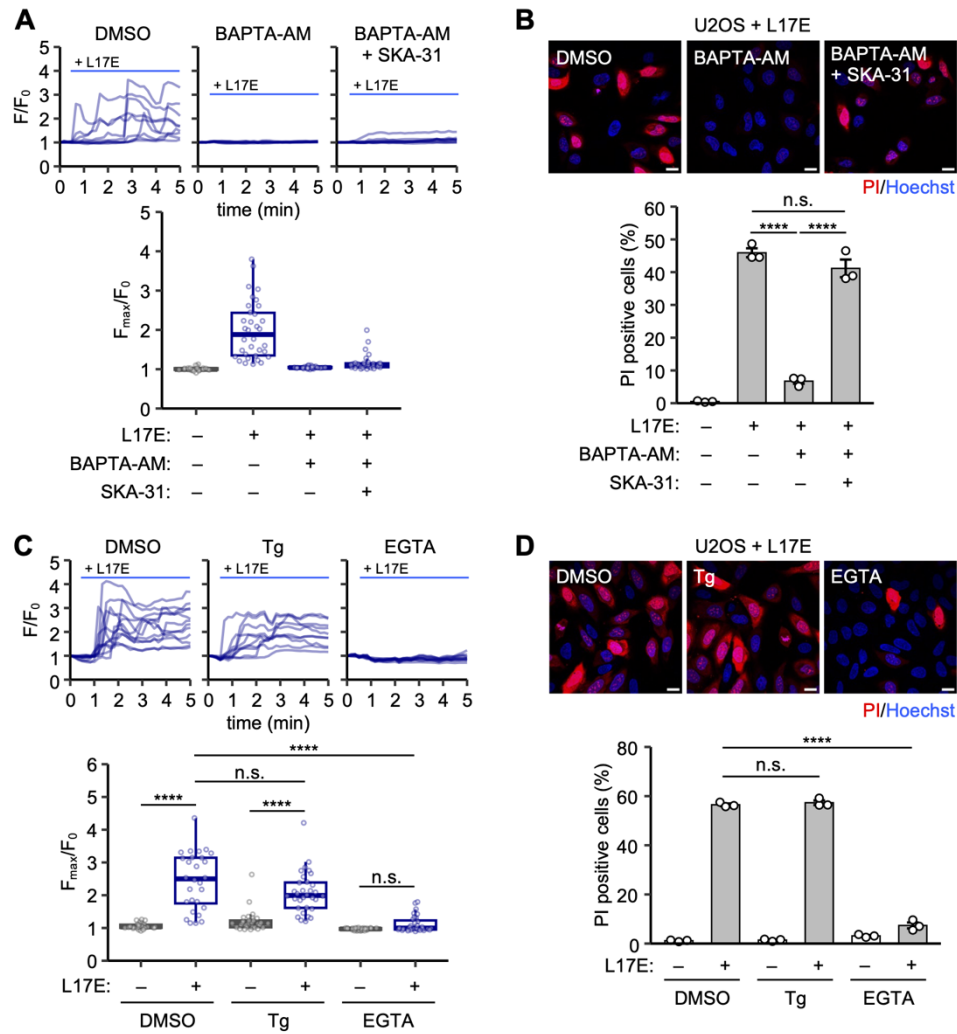


Figure 2-14. Extracellular Ca^{2+} influx is necessary for cytosolic delivery by L17E. (A) Assessment of intracellular Ca^{2+} concentration using transiently expressed membrane localized Ca^{2+} sensor GCaMP8s-CAAX. U2OS cells were pretreated with DMSO, BAPTA-AM and SKA-31 before recording fluorescence intensity of GCaMP8s-CAAX. DMSO or L17E (40 μ M) was applied at 30 sec. Representative time-course of relative fluorescence intensity of GCaMP8s-CAAX (top) and quantification of maximum L17E-induced GCaMP8s-CAAX intensity increase (bottom). (B) Effect of intracellular Ca^{2+} elimination by BAPTA-AM on PI delivery by L17E. U2OS cells were pretreated with DMSO, BAPTA-AM and SKA-31 and treated with PI and L17E (40 μ M). Representative confocal images (top) and results of flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. (C) Assessment of intracellular Ca^{2+} concentration using GCaMP8s-CAAX in the Ca^{2+} depleted conditions. U2OS cells were pretreated either with DMSO or thapsigargin (Tg). DMSO or L17E (40 μ M) was applied at 30 sec in the presence or absence of EGTA. (D) Effect of elimination of ER Ca^{2+} store or extracellular Ca^{2+} on PI delivery by L17E. U2OS cells were pretreated either with DMSO or Tg and treated with L17E in the presence or absence of EGTA. Scale bars, 20 μ m (B, D). Data from three independent biological replicates are shown in box and dot plots (A, C). Data represents mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (B, D). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass test (A, C); One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (B, D).

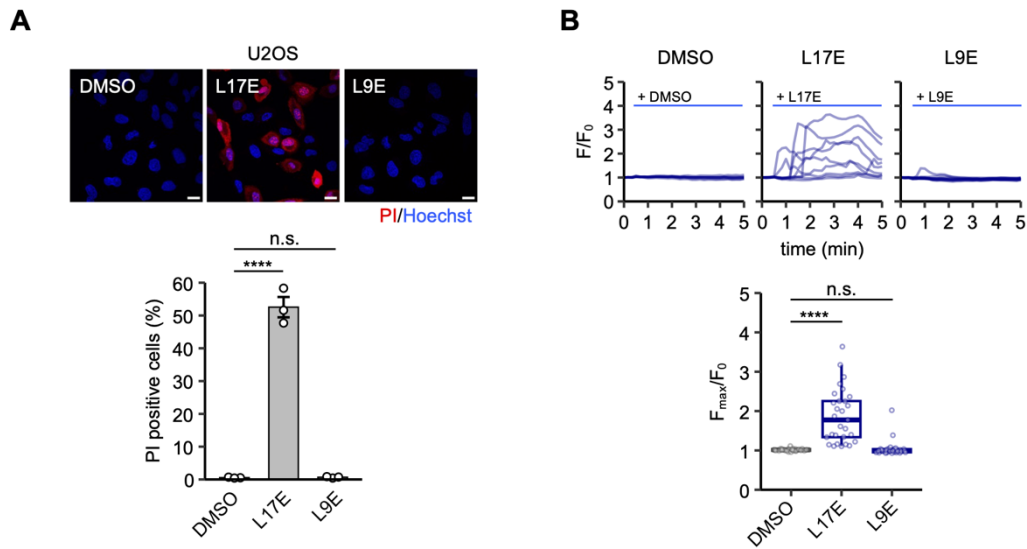


Figure 2-15. L9E does not induce either Ca^{2+} influx or cytosolic delivery, related to Figure 4. (A) PI delivery by L17E or L9E in U2OS cells. Cells were treated with PI in the presence of DMSO as vehicle control, L17E (40 μM) or L9E (40 μM) for 5 min. Representative confocal images (top) and flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. (B) Ca^{2+} influx by L17E or L9E in U2OS cells. GCaMP8s-CAAX fluorescence intensity in U2OS cells was recorded every 10 sec. DMSO as vehicle control, L17E (40 μM) or L9E (40 μM) was added at 30 sec. Representative time course of relative fluorescence intensity of GCaMP8s-CAAX (top) and quantification of the maximum L17E-induced GCaMP8s-CAAX intensity increase. Scale bars, 20 μm (A). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (A). Data from three independent biological replicates are shown in box and dot plots (B). ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey–Kramer’s post hoc test (A); Kruskal–Wallis test followed by Steel–Dwass test (B).

続いて、*KCNN4* の発現レベルが低く、L17E 感受性が低い細胞株における Ca^{2+} 流入を調べた。*KCNN4* KO U2OS、T24、SJSA1 および HEK293T 細胞に GCaMP8s-CAAX をトランスフェクションし、L17E の添加による GCaMP8s の蛍光量の変化を記録した (Figure 2-16A)。*KCNN4* KO U2OS 細胞では、L17E 添加直後に細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が見られたが、 Ca^{2+} レベルは約 1 分で元のレベルに戻り、その持続時間は WT U2OS 細胞と比較して短かった (Figure 2-16A)。T24 細胞においても *KCNN4* KO U2OS 細胞と同様の傾向が見られた (Figure 2-16A)。したがって、*KCNN4* が遺伝的に欠失している細胞や、その発現がほとんど検出されない程低い細胞においても、L17E による一過性の Ca^{2+} 流入が生じることが確認された。この現象を説明する仮説の一つとして、L17E が U2OS 細胞などの L17E 感受性細胞と相互作用することで小規模な膜傷害生じ、それに伴って最初の細胞内 Ca^{2+} 流入が発生し、KCa3.1 チャンネルが活性化される可能性がある。これに続いて KCa3.1 チャンネル依存的な膜電位の脱分極によって L17E の膜傷害性が一過的に向上することで比較的大規模な膜傷害が生じ、生物活性高分子の送達とそれに付随する Ca^{2+} の二次的な流入が引き起こされることが考えられる。*KCNN4* KO U2OS および T24 細胞の場合、最初の Ca^{2+} 流入は観察されたが、KCa3.1 チャンネルの機能がないために、二次的な Ca^{2+} 流入は誘導されなかったと考えられる。一方で、SJSA1 および HEK293T 細胞では、最初の Ca^{2+} 流入は *KCNN4* KO U2OS 細胞や T24 細胞と比較して小さかった (Figure 2-16A)。これらの細胞株において L17E 添加時の最初の Ca^{2+} 流入が見られない原因を分析することにより、今後 L17E を介した送達のメカニズムをより詳細に解明するための手がかりが得られる可能性がある。

L17E と *KCNN4* に依存したサイトゾル送達効率に対する Ca^{2+} 流入の影響を詳細に解析するため、EGFP タグ付き *KCNN4* (EGFP-KCa3.1) を過剰発現させ、これらの L17E 感受性の低い細胞におけるサイトゾルに送達された TMR 標識デキストランシグナル陽性な細胞の割合を、顕微鏡観察画像をもとに定量的に解析した。*KCNN4* KO U2OS 細胞および T24 細胞では、EGFP-KCa3.1 を発現する細胞の約 80% にサイトゾルに拡散したデキストランのシグナルが観察されたが、SJSA1 細胞および HEK293T 細胞では、サイトゾルに送達されたデキストランが見られる細胞はおよそ 20-30% にとどまった (Figure 2-16B)。この結果は、L17E によって誘導された Ca^{2+} 流入、すなわち Figure 2-16A における *KCNN4* KO U2OS 細胞および T24 細胞で観察されたパルス状の初期 Ca^{2+} 流入が、KCa3.1 を活性化するのに十分であることを示唆している。

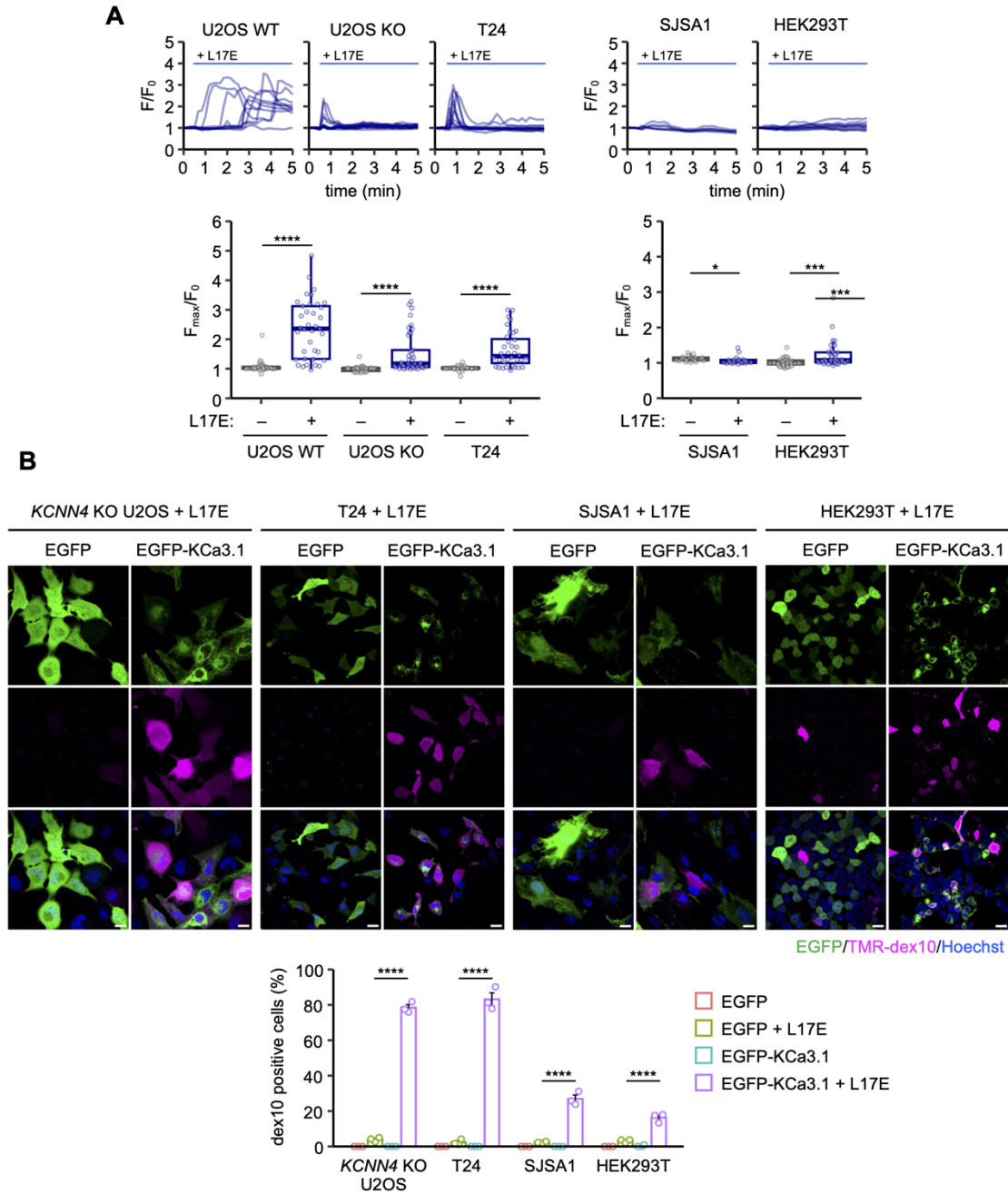


Figure 2-16. Ca^{2+} influx and TMR-dex10 delivery in different cell lines. (A) Assessment of intracellular Ca^{2+} concentration during L17E treatment in different cell lines. GCaMP8s-CAAX fluorescence intensity in WT U2OS (U2OS WT), KCNN4 KO U2OS (U2OS KO), T24, SJSA1 and HEK293T cells was recorded every 10 sec. L17E was added at 30 sec. Representative time course of relative fluorescence intensity of GCaMP8s-CAAX (top) and quantification of maximum L17E-induced GCaMP8s-CAAX intensity increase (bottom). (B) Delivery of TMR-dex10 by L17E in different cell lines. KCNN4 KO U2OS, T24, SJSA1 and HEK293T cells were transfected with either EGFP vector or EGFP-KCa3.1 vector and treated with TMR-dextran 10 kDa (TMR-dex10) in the presence or absence of L17E (40 μM). Representative confocal images (top). Delivery efficiency was calculated by counting cells with cytosolic TMR-dex10/EGFP signals over the total EGFP positive cells (bottom). Scale bars, 20 μm (B). Data from three independent biological replicates are shown in box and dot plots (A). Data represents mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (B). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass test (A); one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (B).

第6節 生物活性バイオ高分子の細胞内送達への KCa3.1 の影響

これまでの結果から KCa3.1 チャンネルの機能が L17E によるサイトゾル送達活性を正に制御することが示されたため、生物活性バイオ高分子である抗体のサイトゾル送達に対する KCa3.1 チャンネルの影響を検証した。WT U2OS 細胞および *KCNN4* KO U2OS 細胞に対して、Alexa Fluor 488 で標識したヒト免疫グロブリン G (IgG-AF488) を添加し、L17E 存在下でのサイトゾル送達を評価した。その結果、その結果、WT U2OS 細胞では約 40%の細胞において IgG-AF488 がサイトゾルに送達されたのに対し、*KCNN4* KO U2OS 細胞では IgG-AF488 の送達はほとんど観察されなかった (Figure 2-17A)。

続いて、サイトゾルに送達された抗体が抗原認識能を保持しているかを確認するために、Alexa Fluor 488 で標識した抗核膜孔複合体抗体 (anti-NPC IgG-AF488) を L17E によりサイトゾルへ送達した。WT U2OS 細胞においては、Hoechst 33342 で染色された細胞核の周囲に AF488 のシグナル

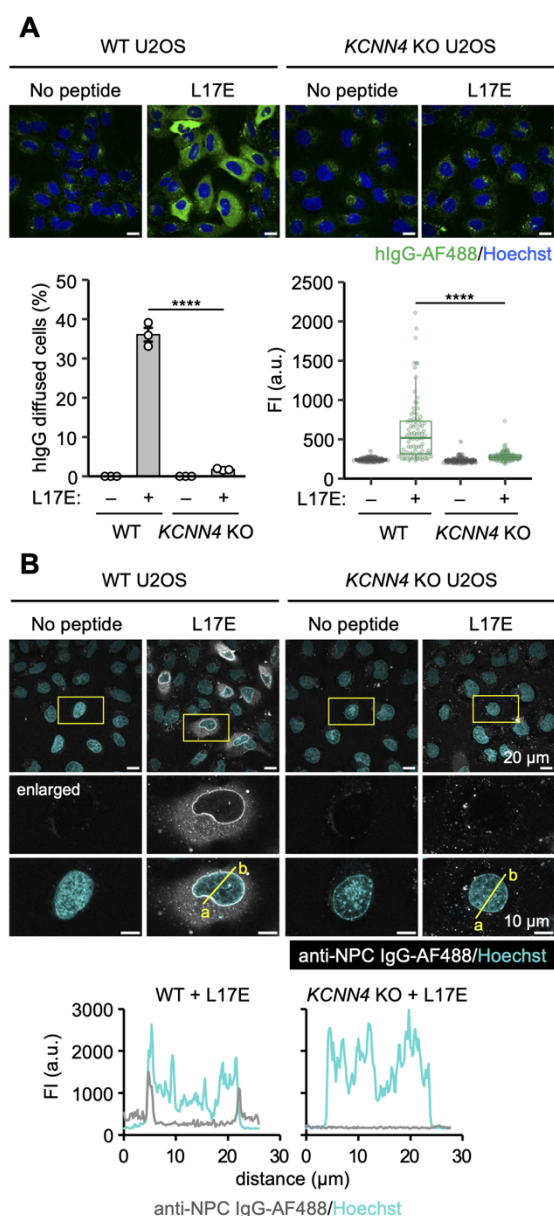


Figure 2-17. *KCNN4*-dependent cytosolic delivery of IgG by L17E. (A) Delivery of Alexa Fluor 488-labeled human IgG (hIgG-AF488) by L17E. WT U2OS and *KCNN4* KO U2OS cells were treated with hIgG-AF488 (1 mg/mL) and L17E (40 μM) for 5 min. Representative confocal images (top), proportion of the cells with cytosolic diffused hIgG-AF488 signals from three biologically independent replicates (bottom left), and representative quantification of cytosolic fluorescence intensity of hIgG-AF488 from one experiment (bottom right). (B) Localization of Alexa Fluor 488-labeled antinuclear pore complex IgG (anti-NPC IgG-AF488) delivered by L17E at the nuclear border. WT U2OS and *KCNN4* KO U2OS cells were treated with anti-NPC IgG-AF488 (0.34 mg/mL) and L17E (40 μM) for 5 min. Representative confocal images (top) and the line intensity profile of nuclear signal and anti-NPC IgG-AF488 signal from a to b in the confocal images (bottom). Scale bars, 20 μm (A, B (the first row)); 10 μm (B (the third row)). Data represents mean ± SE of three independent biological replicates (A, bottom left). Data from representative one of three experiments are shown in box and dot plots (A, bottom right). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A (bottom left)); Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass test (A (bottom right)).

が観察された。一方、*KCNN4* KO U2OS 細胞においては同様のシグナルは検出されなかった (Figure 2-17B)。以上の結果より、生物活性バイオ高分子である抗体の効率的なサイトゾル送達には、*KCNN4* の発現が必須であることが確認された。

総合すると、以上の研究は、*KCNN4* の発現と KCa3.1 の活性化の両方が L17E を介したサイトゾル送達にとって不可欠であることを示している (Figure 2-18)。

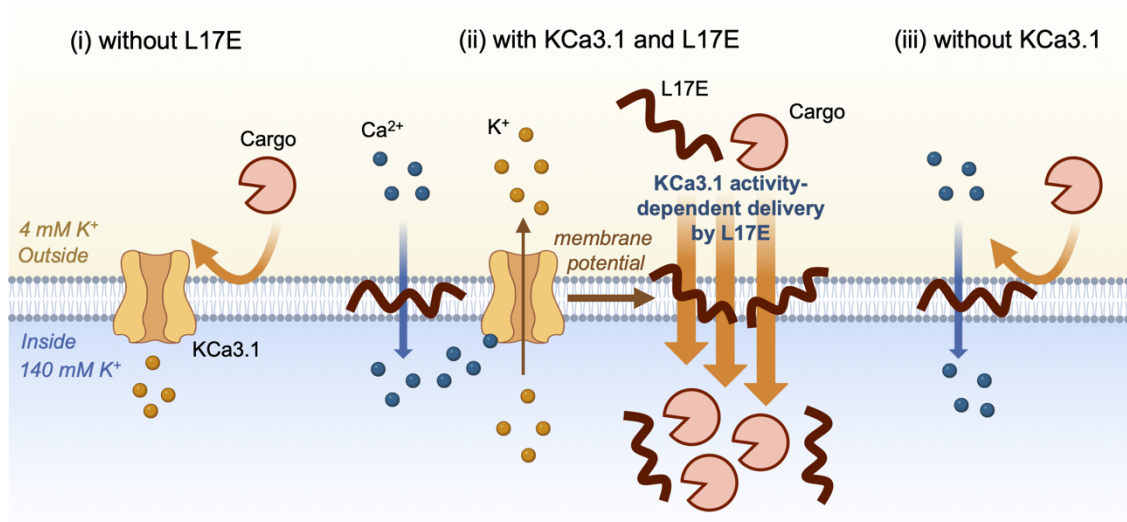


Figure 2-18. Proposed mechanism of action of KCa3.1-related cytosolic delivery by L17E. (i) In the absence of L17E, cargos do not enter cells due to their high molecular weight. (ii) In the presence of L17E, cargos are internalized in a KCa3.1-dependent manner. Ca²⁺ influx induced by L17E addition and subsequent KCa3.1 channel activation followed by membrane potential modulation is a putative mechanism underlying L17E-mediated cytosolic delivery. (iii) In cells with low or deficient KCa3.1 expression, L17E induces Ca²⁺ influx but does not lead to internalization of high molecular weight cargos.

討論と展望

第2章では、*KCNN4*によってコードされるカルシウム依存性カリウムチャネル *KCa3.1* が、L17E によるサイトゾル送達を正に制御する因子であることを明らかにした。L17E によって誘発される細胞外 Ca^{2+} 流入が *KCa3.1* の活性化を引き起こし、これによって L17E による膜透過性が向上することで、局所的かつ一時的な直接膜透過を介したサイトゾル送達が達成されるという、サイトゾル送達ペプチドの新規の作用メカニズムが提示された (Figure 2-18)。

ペプチドを用いたサイトゾル送達技術に関するこれまでの研究では、ペプチドの構造や修飾などペプチド自体の化学的特性に焦点を当てることが多く、標的細胞の特性や機能に関しては、十分に考慮されてこなかった。本章の結果は、同じ送達メカニズムを用いた場合でも、細胞株間で送達効率に大きな差が生じうることを強調している。このような細胞株間のペプチド感受性の違いに焦点を当てることで、*KCa3.1* チャネルの発現レベルが L17E ペプチドによるサイトゾル送達効率を調節することを見出した。*KCa3.1* のチャネル活性は活性化剤や阻害剤によって調節できるため、L17E ペプチドによる送達効率を細胞機能の調節によって容易に変化させることができる可能性がある。

いくつかの CPP の細胞内移行や膜傷害性ペプチドの作用における膜電位の重要性についてはこれまでに多く報告されているが、これらのペプチド活性に対する特定のカリウムチャネルの発現量や細胞内 Ca^{2+} 動態の影響について検討した報告はほとんどない¹³⁷。本研究では、L17E の活性調節因子として *KCa3.1* を見出すことで、膜電位の重要性を再度強調するとともに、細胞外からの Ca^{2+} 流入の重要性を新たに提示した。しかし、 Ca^{2+} 流入に続いて、*KCa3.1* チャネルの機能がどのようにして L17E 活性を調節しているのか、その完全なメカニズムを明らかにすることはできなかった。*KCNN4* 発現量と静止膜電位の間にはほとんど相関がなかったことから、L17E 投与時に *KCa3.1* が活性化することで過分極が誘導され、これが L17E の膜傷害活性を一過的に高めていると考えられる。現段階では、L17E 添加直後に生じる Ca^{2+} 流入が *KCa3.1* の活性依存的なサイトゾル送達に重要であることを確認するに留まっており (Figure 2-14)、L17E 添加後の膜電位の変化やカリウム電流の有無については結論を出せていない。筆者は膜電位感受性蛍光プローブである DiBAC₄(3) や遺伝的にコードされた膜電位センサー *rEstus* の蛍光量を指標としたタイムラプス観察による膜電位変化の評価を試みたが、L17E 添加時の膜電位変化を検出することはできなかった (データ未提示)。L17E 添加によって *KCa3.1* が活性化していたとしても、その後すぐに L17E による膜傷害が生じて細胞膜のバリア機能が損なわれるため、膜電位はすぐに脱分極方向に動くと考えられる。そのため、L17E 添加時に *KCa3.1* によって過分極が生じていたとしても、それは極めて瞬間的なものである可能性が高い。このような微細な継時変化を捉えることは、上記の膜電位プローブを用いたイメージングの系では時間分解能の点から難しいことが予想される。パッチクランプにより直接的な膜電位の評価を行うことで、L17E 処理時の膜電位変化について理解が深まる可能性がある。

L17E による Ca^{2+} 流入の発生メカニズムの解明は、今後の重要な研究課題の一つである。L17E によるサイトゾル送達は細胞膜の一過的な傷害を介したものであることから、L17E の送達活性が発揮される際には、 Ca^{2+} を含む細胞外物質が非選択的にサイトゾルへと流入する。そのため、L17E

添加時に見られる Ca^{2+} 流入が、L17E による送達の駆動力となるものなのか、それとも送達が行われた結果として生じるものなのか、両者を区別して議論することは難しい。L17E 感受性の高い U2OS 細胞においては、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が L17E 処理後、観察した 5 分間に渡って継続したのに対し、L17E 感受性の低い *KCNN4* KO U2OS 細胞と T24 細胞においては、添加直後の瞬間的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加が観察されるのみであった (Figure 2-16A)。これは、L17E 処理時に、二段階の Ca^{2+} 流入、すなわち、KCa3.1 非依存的に生じる初期の Ca^{2+} 流入と、KCa3.1 依存的に生じる細胞内送達の結果としての Ca^{2+} 流入があることを示唆する。*KCNN4* の発現レベルが低い細胞株である T24 細胞、SJSA1 細胞、および HEK293T 細胞の中で、T24 細胞においては *KCNN4* の過剰発現によって L17E による送達効率が大きく増加したが、SJSA1 細胞および HEK293T 細胞ではそれほど顕著な効果は見られなかった (Figure 2-16B)。これら 2 つの細胞株タイプの違いは、L17E 添加直後に観察されるパルス状の Ca^{2+} 流入の程度の違いにあると考えられる。このことから、L17E の細胞膜への作用による Ca^{2+} 流入の発生しやすさを決定する別の生物学的調節因子が存在することが示唆される。一つの可能性として、膜脂質組成や細胞内シグナル伝達経路などの未知の要因が、L17E による Ca^{2+} 流入や KCa3.1 の活性に影響を与えていることが考えられる。ペプチドの膜への作用と膜脂質組成の関連については、コレステロールが CPP の一つである transportan とモデル脂質膜との相互作用を抑制することや¹³⁸、細胞膜内葉の $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ が別の CPP である penetratin の膜透過を促進することが報告されている¹³⁹。脂質によるチャネル活性の制御という観点からは、KCa3.1 が $\text{PI}(3)\text{P}$ によって活性化されることや⁶⁰、同じくカルシウム依存性カリウムチャネル KCa1.1 が膜コレステロールによって制御されることが知られている¹⁴⁰。所属研究室の先行研究において L17E が脂質応答性を持つことを既に見出していることも踏まえ³¹、細胞株間の膜脂質組成の違いをリポドミクスによって網羅的に調べることで、L17E 活性に影響する膜脂質を同定できる可能性がある。

本章では、L17E とカーゴを結合させず、それぞれを単独で共投与した場合のカーゴの送達効率について評価しており、ペプチドとカーゴの結合体や他の CPP の膜透過様式については検討できていない。ペプチドに結合されたカーゴ (抗体、タンパク質、ペプチド、核酸など) は、内在化メカニズムに影響を与える可能性があるため、この点を評価するためにはさらなる研究が必要である。また、L17E は他の CPP とは異なり、送達に目的カーゴとの結合を必要とせず、一般的な CPP に比べてより大きなカーゴの送達が可能であることから、他の CPP の膜透過には本章で明らかにされたものとは異なる送達メカニズムが関与している可能性がある。TAT、R9、penetratin などの CPP の膜透過に、カリウムチャネルや膜電位そのものが関与することが既に報告されている¹¹²。しかし、これらの一般的な CPP の膜透過における Ca^{2+} の役割はほとんど解明されていない。これらの種々の CPP の作用メカニズムを Ca^{2+} の寄与の観点から明らかにすることで、ペプチドを用いた細胞内送達の理解をさらに深めることができると考えられる。

第3章

L17E による細胞内送達における ANXA2 の寄与

序論

第3章では、第2章に引き続き、細胞内送達活性を持つペプチドである L17E の活性に影響を与える細胞因子について検討を行った。第2章において、細胞株間での L17E 活性の違いに着目することで L17E 活性の制御因子として KCa3.1 を同定した。しかし、KCa3.1 の発現量が比較的高く、L17E より効率よく細胞内送達が生じる細胞株であっても、その送達効率は 100%には到達しない（例：HT1080 細胞：>70%、MIA PaCa-2 細胞：>70%）。このことから、同一細胞株内であっても、個々の細胞ごとに L17E 感受性が異なっていることが予想される。そこで、第3章では、単一細胞株内における L17E 感受性の違いを決定する因子の同定を試みた。

L17E の存在下で蛍光標識デキストランを HeLa 細胞に添加し、サイトゾル送達を受けた細胞（positive HeLa cells; pHeLa）と送達を受けなかった細胞（negative HeLa cells; nHeLa）をセルソーターを用いて分離し、それぞれ培養した。pHeLa および nHeLa における L17E のサイトゾル送達効率を蛍光標識デキストランおよび PI を用いてさらに評価した結果、pHeLa では nHeLa と比較して 5~10%高い送達効率が確認された。プロテオーム解析により、pHeLa と nHeLa のタンパク質量を比較したところ、膜画分において、膜修復タンパク質である Annexin A2（ANXA2）が nHeLa で pHeLa の約 1.4 倍多く存在していることが明らかになった。ANXA2 と EGFP を融合させたタンパク質（ANXA2-EGFP）を HeLa 細胞に発現させ、L17E 処理時の細胞内局在を観察したところ、L17E 添加後に ANXA2-EGFP が細胞膜へ移行する様子が確認された。この結果から、L17E による細胞内送達の過程で ANXA2 依存的な膜修復機構が誘導される可能性が示唆された。さらに、siRNA を用いて HeLa 細胞および T24 細胞で ANXA2 をノックダウン（KD）したところ、L17E によるサイトゾル送達効率が有意に増加した。以上の結果から、ANXA2 による膜修復活性が L17E の活性を負に制御しており、細胞間での ANXA2 発現量の違いが同一細胞株内での L17E 感受性の多様性を生み出す要因となる可能性が示唆された。さらに、別の膜修復関連因子である ESCRT 複合体が、細胞膜透過性ペプチド（CPP）のサイトゾル移行の抑制に関与することが示唆された。

第1節 同一細胞株内における L17E 活性の多様性の確認

本章では、モデル細胞として、最も一般的に使用される細胞株のひとつである HeLa 細胞を用いた。細胞株内での L17E 活性の違いがあるかを検討するために、セルソーターを用いた細胞の分離を行った (Figure 3-1A)。第2章においては L17E によって送達されるモデルカーゴとして PI を用いていたが、PI は核酸に結合するため、送達後に長期間の培養を行った場合、細胞に悪影響を及ぼす可能性があると考えた。そこで、ソーティング実験においては、PI の代わりに AF488 による蛍光標識がされた 10 kDa デキストラン (AF488-dex10) を用いた。HeLa 細胞に AF488-dex10 を L17E とともに添加し、AF488-dex10 が送達された細胞 (dextran positive HeLa cells) と送達されなかった細胞 (dextran negative HeLa cells) を、AF488 の蛍光を指標としてセルソーターにより分離した (Figure 3-1B、左)。ソーティング直後の細胞を共焦点顕微鏡により観察することで、AF488 の蛍光量が高い細胞群においてはサイトゾル中への AF488-dex10 の拡散が起こっており、対して、AF488 の蛍光量が高い細胞群においてはサイトゾル中への AF488-dex10 の拡散が見られないことを確認した (Figure 3-1B、右)。分離後の細胞を4日程度培養して増殖させ、それぞれ pHeLa (dextran Positive HeLa cells 由来の細胞) と nHeLa (dextran Negative HeLa cells 由来の細胞) と名付けた (Figure 3-1A)。元の HeLa 細胞、pHeLa、および nHeLa それぞれにおける L17E 活性を、L17E 存在下で AF488-dex10 が送達された細胞の割合 (送達効率) として評価した。その結果、nHeLa においては元の HeLa 細胞とほとんど送達効率に変化がなかったものの、pHeLa においては nHeLa および元の HeLa と比較して送達効率が 5~10%高くなっていることが確認された (Figure 3-1C)。第2章と同様に、PI の送達割合をフローサイトメトリーを用いた系により評価した場合でも、pHeLa においては、他の二種類の細胞群と比較して有意に高い送達効率が見られた (Figure 3-1D)。以上の結果から、HeLa 細胞の中で L17E による送達を受けたものを分離・培養することで、L17E に対する感受性の高い細胞群を選別できることが示された。これらの結果より、同一の HeLa 細胞株内においても、個々の細胞ごとに L17E 感受性が異なり、その感受性の違いは、少なくとも一定期間保持されるものであることが示唆された。

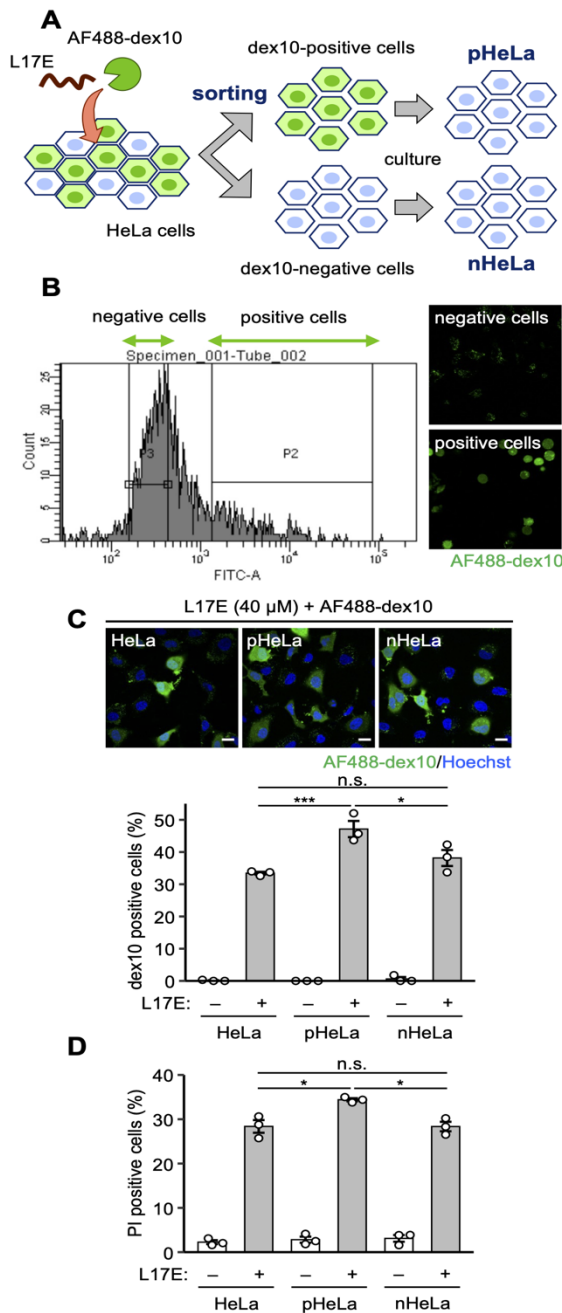


Figure 3-1. Isolation of cells undergoing intracellular delivery by L17E via cell sorting. (A) Experimental overview. HeLa cells treated with AF488-labeled dextran 10 kDa (AF488-dex10) in the presence of L17E were separated into AF488-dex10 positive and negative populations using cell sorter. The collected cells were cultured and named pHeLa (cells derived from AF488-dex10 positive HeLa cells) and nHeLa (cells derived from AF488-dex10 negative HeLa cells), respectively. (B) Selection of cells based on AF488-dex10 fluorescence by cell sorter (left). Confocal microscopy observation of cells immediately after sorting (right). (C) Delivery of AF488-dex10 by L17E in HeLa, pHeLa, and nHeLa cells. Cells were treated with AF488-dex10 and L17E (40 μ M) for 5 min. Representative confocal images (top), proportion of the cells with cytosolic diffused AF488-dex10 signals (bottom). (D) PI delivery by L17E in HeLa, pHeLa, and nHeLa cells. Cells were treated with PI and L17E (40 μ M) for 5 min. Representative confocal images (top) and flow cytometry analysis (bottom) of PI internalized cells. Scale bars, 20 μ m (C). Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (C, D). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey–Kramer’s post hoc test (C, D).

第2節 L17E 活性の負の制御因子としての ANXA2 の同定

pHeLa と nHeLa における L17E による送達効率の差は、両者のタンパク質量の違いに起因すると仮定した。初めに、第2章において細胞株間での L17E 活性の決定因子として同定された KCa3.1 発現量の違いについて検討した。pHeLa と nHeLa 間での *KCNN4* mRNA レベルを qPCR により評価したところ、ソーティングを行っていない元の HeLa 細胞、pHeLa、および nHeLa の間で *KCNN4* mRNA レベルに大きな差は認められなかった (Figure 3-2A)。pHeLa および nHeLa における KCa3.1 のタンパク質レベルでの発現量については、KCa3.1 に対する有用な抗体を得ることができなかったために評価することができなかった。KCa3.1 以外にも L17E 活性を決定する細胞因子が存在すると仮定し、pHeLa と nHeLa 間のタンパク質量の差を網羅的に調べるために、プロテオーム解析を実施した。具体的には、L17E 存在下で AF488-dex10 を処理した HeLa 細胞をセルソーターにより分離し、3 または 4 日間培養した後、pHeLa と nHeLa それぞれから膜面分およびサイトゾル画分のタンパク質を抽出した (Figure 3-2B)。膜面分およびサイトゾル画分のタンパク質量について解析を行ったところ、pHeLa と nHeLa の間で複数のタンパク質に存在量の違いが認められた (Figure 3-2B)。本解析においては KCa3.1 が同定されなかったため、pHeLa と nHeLa の間での KCa3.1 の発現量の違いについては評価することができなかった。同定されたタンパク質の中で、膜修復タンパク質である Annexin A2 (ANXA2)¹⁴¹⁻¹⁴³ に着目した (Figure 3-2C)。ANXA2 は nHeLa

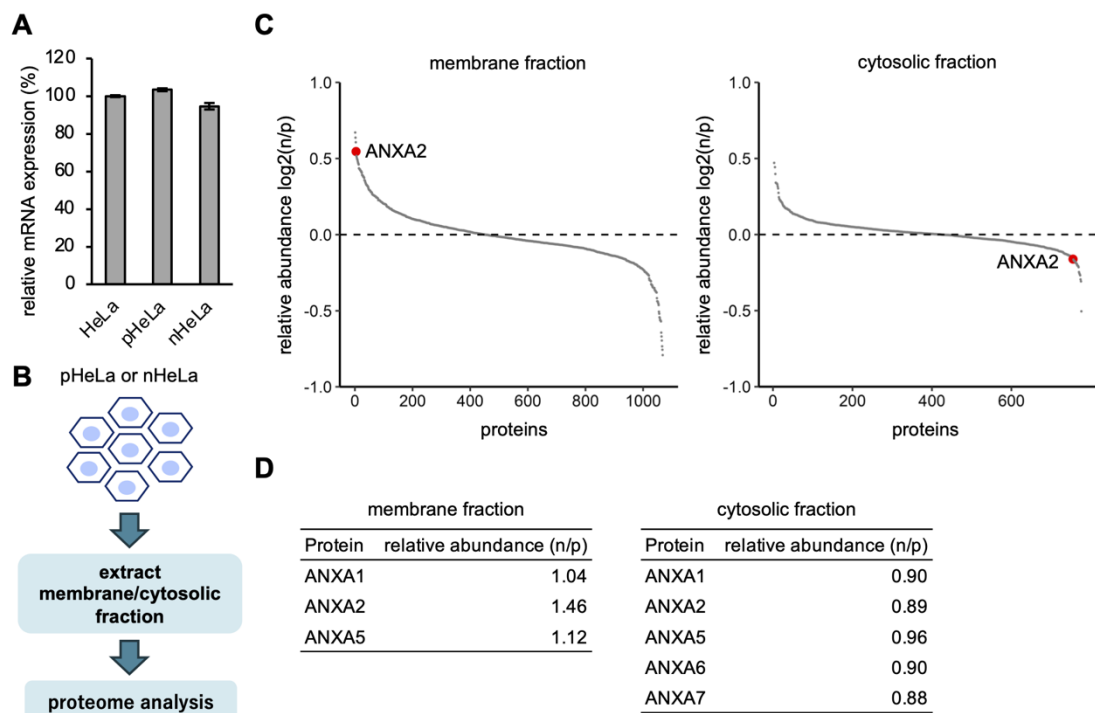


Figure 3-2. Proteome comparison between pHeLa and nHeLa. (A) qPCR analysis for mRNA levels of *KCNN4* in HeLa, pHeLa, and nHeLa cells. The mRNA expression level was determined by the standard curve method using *GAPDH* as a reference gene. (B) Experimental overview. (C) Proteome comparison between pHeLa and nHeLa in the membrane fraction (left) and cytosolic fraction (right). The abundance of each protein is plotted as the log₂ value of the nHeLa/pHeLa ratio. (D) nHeLa/pHeLa ratio of ANXA family protein level identified in the membrane fraction (left) and cytosolic fraction (right). Data represent mean $\pm$ SD of triplicate samples from one of two independent experiments (A). Data from two independent biological replicates (D membrane fraction) or one experiment (C, D cytosolic fraction).

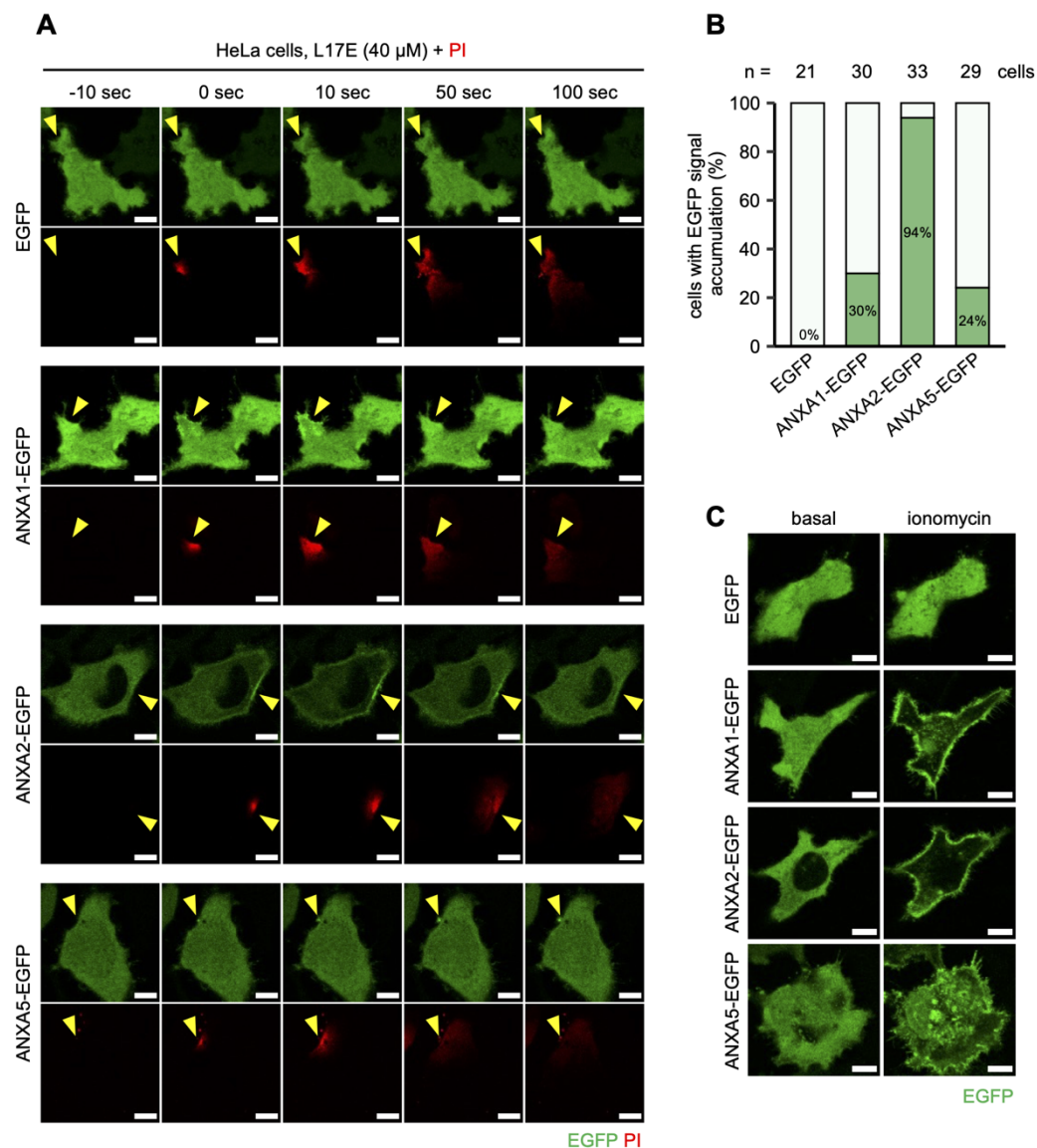


Figure 3-3. Intracellular localization changes of ANXA2-EGFP during L17E treatment. (A) Confocal time-lapse imaging of HeLa cells transiently expressing EGFP, ANXA1-EGFP, ANXA2-EGFP, or ANXA5-EGFP. Cells were treated with PI and L17E (40 μ M). Yellow arrowheads indicate PI influx points. The time elapsed after the start of PI influx is shown above the images. (B) Proportion of cells showing EGFP signal accumulation among those with observed PI influx. (C) Confocal time-lapse imaging of HeLa cells transiently expressing EGFP, ANXA1-EGFP, ANXA2-EGFP, or ANXA5-EGFP. Cells were treated with ionomycin (5 μ M). Images show the cells before and after treatment with ionomycin. Scale bars, 10 μ m (A, C). Cells from three independent experiments were analyzed (B).

において pHeLa よりも膜画分における存在量が約 1.4 倍多かったが、サイトゾル画分における ANXA2 存在量は両者の間でほとんど差がないことが確認された (Figures 3-2C, D)。この結果から、ANXA2 の膜近傍での存在量の違いが細胞ごとの膜修復活性に影響し、L17E による一過的な膜傷害を介したサイトゾル送達の効率に差が生じる可能性が示唆された。

ANXA2 は膜表面タンパク質であり、他の膜修復タンパク質と同様に、サイトゾル中の Ca^{2+} 濃度の増加に応じて負電荷性脂質への結合性が高まり、膜へと移行することが知られている^{144,145}。プロテオーム解析によって同定された ANXA ファミリーのうち、ANXA2 と同様に膜修復に関連

することが知られる ANXA1^{141,146} および ANXA5^{147,148} については、膜画分において pHeLa と nHeLa 間で顕著なタンパク質量の違いは認められなかった。そこで、今回同定された ANXA1、ANXA2、ANXA5 が L17E 処理時の膜修復に関与するかを検討するため、各タンパク質の EGFP 融合体 (ANXA1-EGFP、ANXA2-EGFP、および ANXA5-EGFP) を HeLa 細胞に一過性に発現させ、L17E 処理時の細胞内局在を共焦点顕微鏡によるタイムラプスイメージングで観察した。コントロールとして EGFP のみを発現させた場合では、L17E 処理後に細胞内の EGFP の局在変化は観察されなかった (Figure 3-3A, EGFP)。一方、ANXA2-EGFP を発現させた場合では、L17E 添加後に PI のサイトゾル流入に伴って ANXA2-EGFP が細胞膜に移行し、PI の流入点において特に強い集積を示した (Figure 3-3A, ANXA2-EGFP)。同様に、ANXA1-EGFP、ANXA5-EGFP についても L17E 処理後に PI 流入点での蛍光シグナルの集積が観察された (Figure 3-3A, ANXA1-EGFP and ANXA5-EGFP)。PI の流入が観察された細胞の中で、EGFP シグナルの細胞膜への集積が見られる細胞の割合を評価したところ、ANXA2-EGFP については PI 流入が見られた細胞のうち 90%以上の細胞 (33 細胞中 31 細胞) においてシグナルの集積が観察された (Figure 3-3B)。これに対して、ANXA1-EGFP の場合は 30% (30 細胞中 9 細胞)、ANXA5-EGFP の場合は約 24% (29 細胞中 7 細胞) で集積が見られ、ANXA2-EGFP ほど顕著な集積が見られないことが確認された (Figure 3-3B)。コントロールとして EGFP を用いた場合は、集積が見られる細胞の割合は 0% (21 細胞中 0 細胞) であった (Figure 3-3B)。また、サイトゾル中の Ca^{2+} 濃度を上昇させるために ionomycin を添加した場合は、HeLa 細胞において ANXA1-EGFP、ANXA2-EGFP、ANXA5-EGFP の全てが細胞膜へ移行したことから (Figure 3-3C)、一過性発現させた EGFP タグつき ANXA が正常に機能しており、 Ca^{2+} に対する感受性の違いによって各 ANXA の L17E に対する反応性が異なる可能性が示唆された。以上の結果から、ANXA1-EGFP、ANXA2-EGFP、ANXA5-EGFP のうち、ANXA2-EGFP が最も顕著に L17E 依存的な膜への移行を示すことが確認された。これにより、ANXA2 が L17E によって引き起こされる膜傷害の修復において、他の ANXA ファミリーよりも大きな役割を果たしている可能性が示唆された。また、このことが、ANXA1、ANXA2、ANXA5 のうち、ANXA2 のみが pHeLa と nHeLa 間で膜画分におけるタンパク質量に差を示した (Figures 3-2C, D) 理由である可能性がある。

そこで、ANXA2 が L17E 活性に影響するかを検証するために、siRNA を用いた ANXA2 のノックダウン (KD) を行った。HeLa 細胞における ANXA2 の KD をウエスタンブロットにより評価し、KD 効率が十分であることを確認した (Figure 3-4A)。L17E による PI の送達効率を評価したところ、ANXA2 KD によって L17E による送達効率がわずかではあるが有意に増加することが明らかになった (Figure 3-4B)。この結果から、ANXA2 が L17E 活性を抑制的に制御していることが示された。さらに、*KCNN4* 発現量が低く、L17E によるサイトゾル送達がほとんど見られない T24 細胞においても、ANXA2 KD によってサイトゾル送達効率が有意に増加することが確認された (Figures 3-4C, D)。この結果から、*KCNN4* の発現量が低い細胞株においても、ANXA2 の機能を抑制することで、L17E による送達効率の向上が可能であることが示唆された。

次に、ANXA2 を過剰発現させた場合に L17E 活性が抑制されるかを検討した。対象として、HeLa 細胞および第 2 章にて L17E による高効率なサイトゾル送達を確認された HT1080 細胞を選

折し、それぞれの細胞において ANXA2-EGFP を一過性に過剰発現させた。同様に、ANXA1 および ANXA5 についても、ANXA1-EGFP および ANXA5-EGFP をそれぞれ過剰発現させ、その影響を検討した。その結果、ANXA1、ANXA2、ANXA5 のいずれを過剰発現させた場合でも、コントロールとして EGFP のみを発現させた場合と比較して、L17E による送達効率には有意な変化は認められなかった (Figure 3-5)。この結果は、ANXA2 の発現量が低下すると L17E が増強する一方で、ANXA1 や ANXA5 を含む ANXA ファミリーの発現量を人為的に増加させても、L17E 活性が減弱しないことを示している。ANXA2 の過剰発現が L17E の活性低下を引き起こさなかった理由として、内在性の ANXA2 が十分に機能しているために、過剰発現させても ANXA2 による膜修復活性がそれほど上昇しないことが考えられる。また、単なる過剰発現では膜周辺での ANXA2 存在量がそれほど変化しない可能性もある。膜近傍での ANXA2 存在量に影響する要因としては、ANXA2 が結合するための不電荷脂質の存在量や、ANXA2 とともに膜へと移行することが知られる S100A11 タンパク質¹⁴⁵の影響が可能性として考えられる。

本節の結果より、ANXA ファミリーの中で少なくとも ANXA2 が L17E 活性を抑制的に制御していることが示された。さらに、細胞膜近傍での ANXA2 の局在量の違いが、同一細胞株内における個々の細胞の L17E 感受性 (L17E を添加した時にサイトゾル送達が生じるかどうか) を決定している可能性が示唆された (Figure 3-6)。

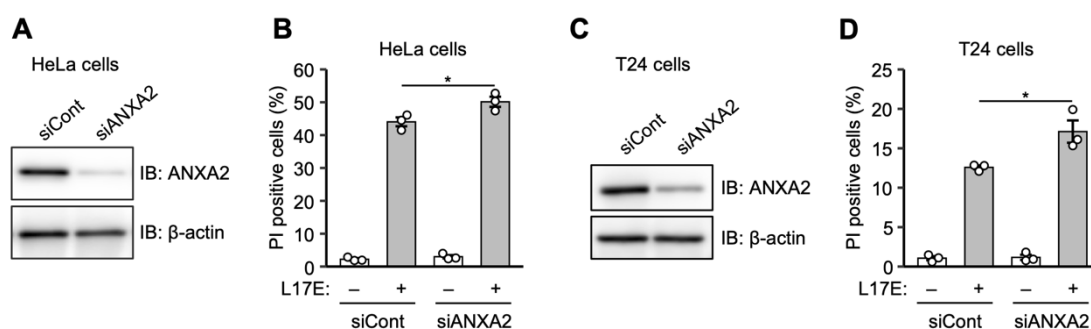


Figure 3-4. Enhanced L17E-mediated intracellular delivery efficiency by ANXA2 knockdown. (A) Western blot analysis for ANXA2 in HeLa cells transfected either with control siRNA (siCont) or ANXA2 siRNA (siANXA2). (B) PI delivery by L17E in ANXA2 KD HeLa cells. Cells were transfected either with siCont or siANXA2 and treated with PI and L17E (40 μ M) for 5 min. PI delivery efficiency was analyzed by flow cytometry. (C) Western blot analysis for ANXA2 in T24 cells transfected either with control siRNA (siCont) or ANXA2 siRNA (siANXA2). (D) PI delivery by L17E in ANXA2 KD T24 cells. Cells were transfected either with siCont or siANXA2 and treated with PI and L17E (40 μ M) for 5 min. PI delivery efficiency was analyzed by flow cytometry. Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates (B, D). *, $p < 0.05$. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (B, D).

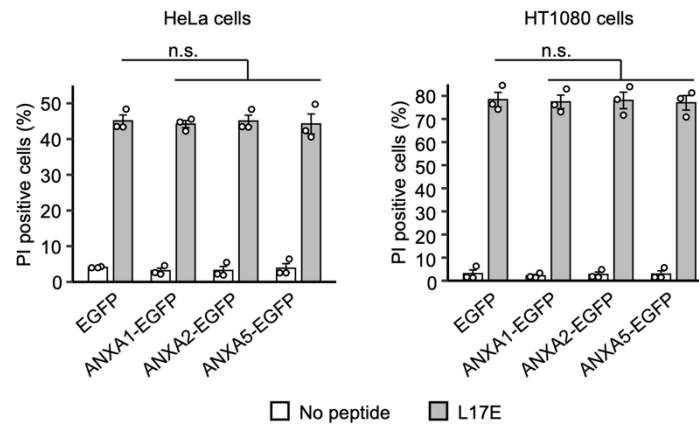


Figure 3-5. ANXA2 overexpression does not affect L17E activity. HeLa cells (left) and HT1080 cells (right) were transfected either with EGFP, ANXA1-EGFP, ANXA2-EGFP, or ANXA5-EGFP vector and treated with PI and L17E (40 μ M) for 5 min. PI delivery efficiency was analyzed by flow cytometry. Data represent the mean $\pm$ SE of three independent biological replicates. n.s., not significant. One-way ANOVA followed by Tukey–Kramer’s post hoc test.

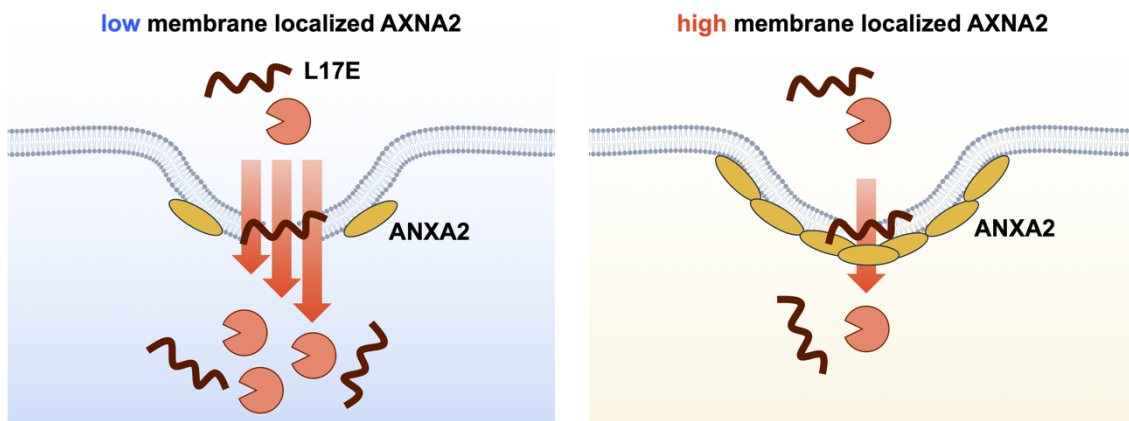


Figure 3-6. Proposed involvement of ANXA2 in L17E activity. Cells with low membrane-localized ANXA2 levels are relatively sensitive to L17E-mediated cytosolic delivery (left). Cells with high membrane-localized ANXA2 level are relatively resistant to L17E due to its strong membrane repair activity.

第3節 CPPのサイトゾル移行に対する膜電位および膜修復の関与

第3章ではこれまでに L17E 活性に対する膜修復タンパク質 ANXA2 の影響を検討してきた。多くの膜修復反応は細胞膜が傷害されることによる Ca^{2+} 流入により開始されることが知られており、ANXA2 をはじめとする膜修復タンパク質は Ca^{2+} 依存的に機能する¹⁴⁹。また、第2章で L17E 活性の必須因子として同定された KCa3.1 も同様に Ca^{2+} による活性化を受け^{129,130}、そのため L17E によるサイトゾル送達には細胞外 Ca^{2+} の流入が必須であった。さらに、一般的な細胞膜透過ペプチド (CPP) のサイトゾル移行に対しても、KCa3.1 をはじめとするカリウムチャネルの発現や適切な膜電位の維持が重要であることが報告されている^{112,123}。しかし、CPP のサイトゾル移行に対する膜修復機構や Ca^{2+} の詳細な寄与については不明である^{137,150}。そこで、以下では、L17E 以外の一般的な細胞膜透過ペプチド (CPP) のサイトゾル移行に対する細胞外 Ca^{2+} や膜修復機構の寄与を検討した。L17E と他の CPP との相違点として、L17E はサイトゾル送達の際に目的分子との結合を必要としないことが挙げられる。そのため、第2章、第3章においては、L17E そのものではなく、L17E と共投与した蛍光分子 (PI や AF488-dex10) の送達効率 (何%の細胞で蛍光分子のサイトゾル送達が見られるか) を評価していた。しかし、一般的な CPP ではペプチド単体や目的

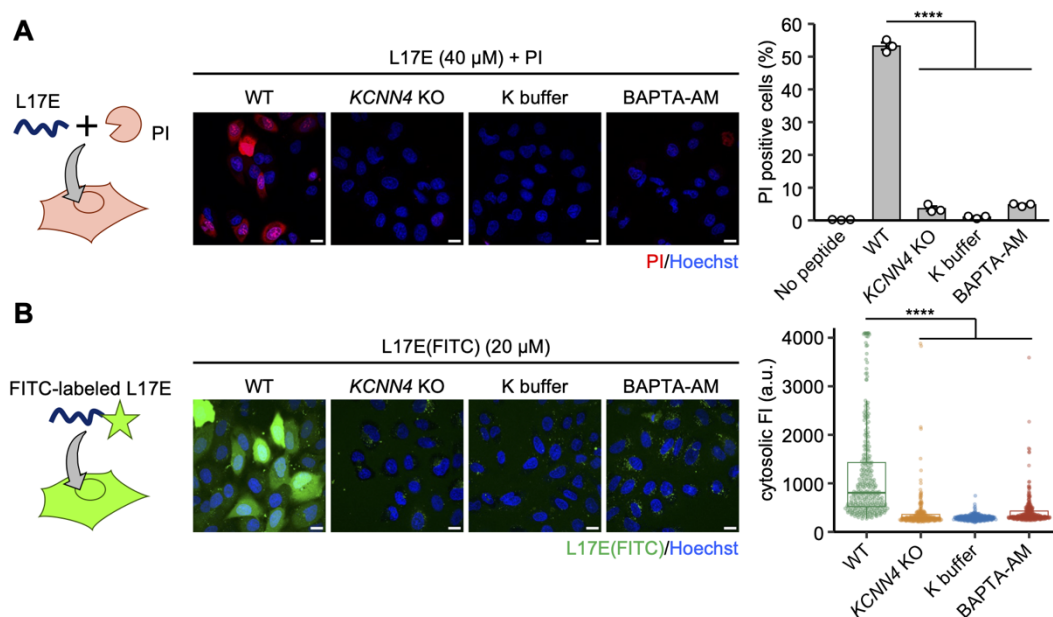


Figure 3-7. Effect of *KCNN4* KO, K buffer and BPTA-AM on L17E-mediated cytosolic delivery and L17E translocation into cytosol. (A) Experimental overview (left). The percentage of the cells with cytosolic PI signal after L17E treatment was analyzed. U2OS cells (WT or *KCNN4* KO) were treated with PI and L17E (40 μM) for 5 min in the condition of high extracellular concentration of KCl (140 mM) (K buffer) or in the presence of BAPTA-AM (40 μM). Confocal microscopy observation of PI delivery (middle) and flow cytometry analysis of PI internalized cells (right). (B) Experimental overview (left). Cytosolic internalization of FITC-labeled L17E was quantitatively analyzed. U2OS cells (WT or *KCNN4* KO) were treated with FITC-labelled L17E [L17E(FITC)] (20 μM) for 5 min in K buffer or in the presence of BAPTA-AM (40 μM). Confocal microscopy observation of internalized L17E(FITC) (middle) and quantification of cytosolic fluorescence intensity of L17E(FITC) (right). Scale bars, 20 μm (A, B). Data represent the mean ± SE of three independent biological replicates (A). Data from three independent biological replicates are shown in box and dot plots (B). ****, $p < 0.0001$. One-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's post hoc test (A); Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass test (B).

分子とペプチドの結合体が細胞内へと移行するため、CPP 活性の指標として、FITC により蛍光標識したペプチドのサイトゾル移行量を画像解析により定量的に評価した。まず初めに、L17E 自体のサイトゾル移行量について評価するために、FITC 標識をした L17E (L17E(FITC)) を用いて U2OS 細胞におけるサイトゾル移行量を評価した。その結果、*KCNN4* KO U2OS 細胞では WT U2OS 細胞と比較して移行量が有意に減少した (Figure 3-7B)。さらに、WT U2OS 細胞において膜電位を消失させる目的で 140 mM の KCl を含有する K buffer 処理を行った場合や、細胞外 Ca^{2+} 流入を抑制するために BAPTA-AM を処理した場合でも、L17E(FITC) の細胞内移行量は有意に減少した (Figure 3-7B)。この傾向は、FITC 標識をしていない L17E による PI のサイトゾル送達と同様であった (Figure 3-7A)。これらの結果から、L17E によるサイトゾル送達だけでなく、L17E 自体のサイトゾル移行にも、*KCNN4* の発現と適切な膜電位の形成、および細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が必須であることが確認された。また、L17E のサイトゾル移行には、膜傷害に先立って Ca^{2+} 流入による KCa3.1 の活性化が必要であると考えられる。

続いて、他の CPP についても同様の傾向が見られるかを確認するために、三種類の CPP (L17ER4¹⁵¹、R8^{28,29}、および Pen³⁰) を選択し、それぞれ FITC による蛍光標識を施した (L17ER4(FITC)、FITC-R8、および FITC-Pen)。これらの FITC 標識 CPP について U2OS 細胞にお

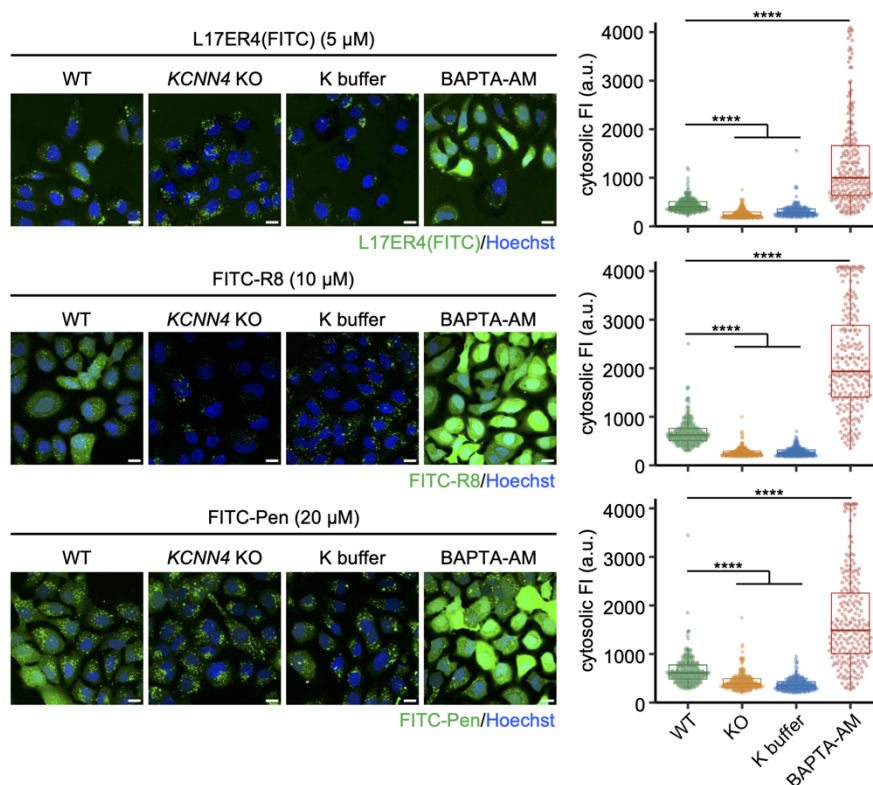


Figure 3-8. Effect of *KCNN4* KO, K buffer and BPTA-AM on CPPs internalization into cytosol. U2OS cells (WT or *KCNN4* KO) were treated with L17ER4(FITC) (5 μM), FITC-R8 (10 μM), or FITC-Pen (20 μM) for 30 min in K buffer or in the presence of BAPTA-AM (40 μM). Confocal microscopy observation of FITC-labelled CPP internalization (left) and quantification of cytosolic fluorescence intensity of FITC-labeled CPP (right). Scale bars, 20 μm. Data from three independent biological replicates are shown in box and dot plots. ****, $p < 0.0001$. Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass test.

けるサイトゾル移行量を評価したところ、*KCNN4* KO および K buffer 処理によってはこれら三種類の CPP のサイトゾル移行量が減少したが、BAPTA-AM の処理によっては、いずれの CPP の場合においても、L17E(FITC)の場合とは反対に、サイトゾル移行量が著しく増加することが確認された (Figure 3-8)。この結果から、これらの CPP のサイトゾル移行には、適切な膜電位の維持や *KCa3.1* の発現が必要であるものの、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加やそれによる *KCa3.1* の活性化は必要ではないことが示唆された。また、BAPTA-AM 処理によってサイトゾル移行量が増加したことから、膜修復機構の抑制によってサイトゾル移行量が増加している可能性が示唆された。そこで、これらの CPP のサイトゾル移行に対する ANXA2 の関与を検討した。その結果、HeLa 細胞において ANXA2 を KD しても、いずれの CPP についてもサイトゾル移行量の増加は確認されず、ANXA2 はこれらの CPP のサイトゾル移行に対して少なくとも抑制的には寄与していないことが示唆された (Figure 3-9)。

そこで、ANXA2 以外の膜修復機構がこれらの CPP のサイトゾル移行に関与しているかを検討した。膜修復機構には ANXA 以外にも ESCRT 複合体の機能が関与する^{152,153}。ESCRT タンパク質は、比較的小規模な膜損傷の修復に関与することが知られており、他の膜修復因子と同様に Ca^{2+} 依存的に膜損傷部位に誘導される。さらに、ESCRT は損傷部位に複合体を形成することで、損傷部位を除去する機能を持つ^{152,153}。また、ESCRT の機能を阻害することによって、TAT-RasGAP₃₁₇₋₃₂₆ (代表的な CPP である TAT と p120 RasGAP の SH3 ドメイン由来のペプチド配列との融合ペプチド) による細胞膜損傷が増加することも報告されている¹⁵⁴。ESCRT 複合体の機能を阻害するために、VPS4a のドミナントネガティブである VPS4a^{E228Q} (E228Q: Glu²²⁸ → Gln)^{155,156} を用いた。VPS4a は ESCRT 複合体の膜切断機能を制御する重要な分子であり、その機能が欠損すると ESCRT

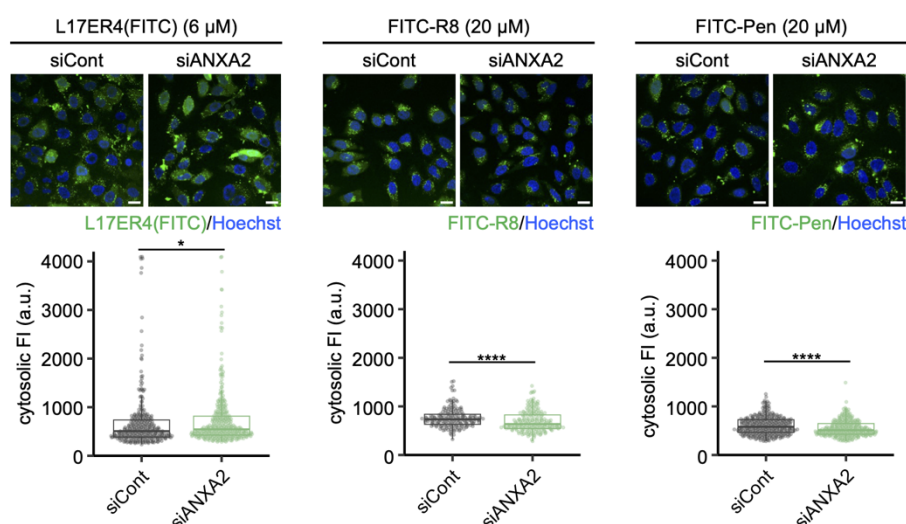
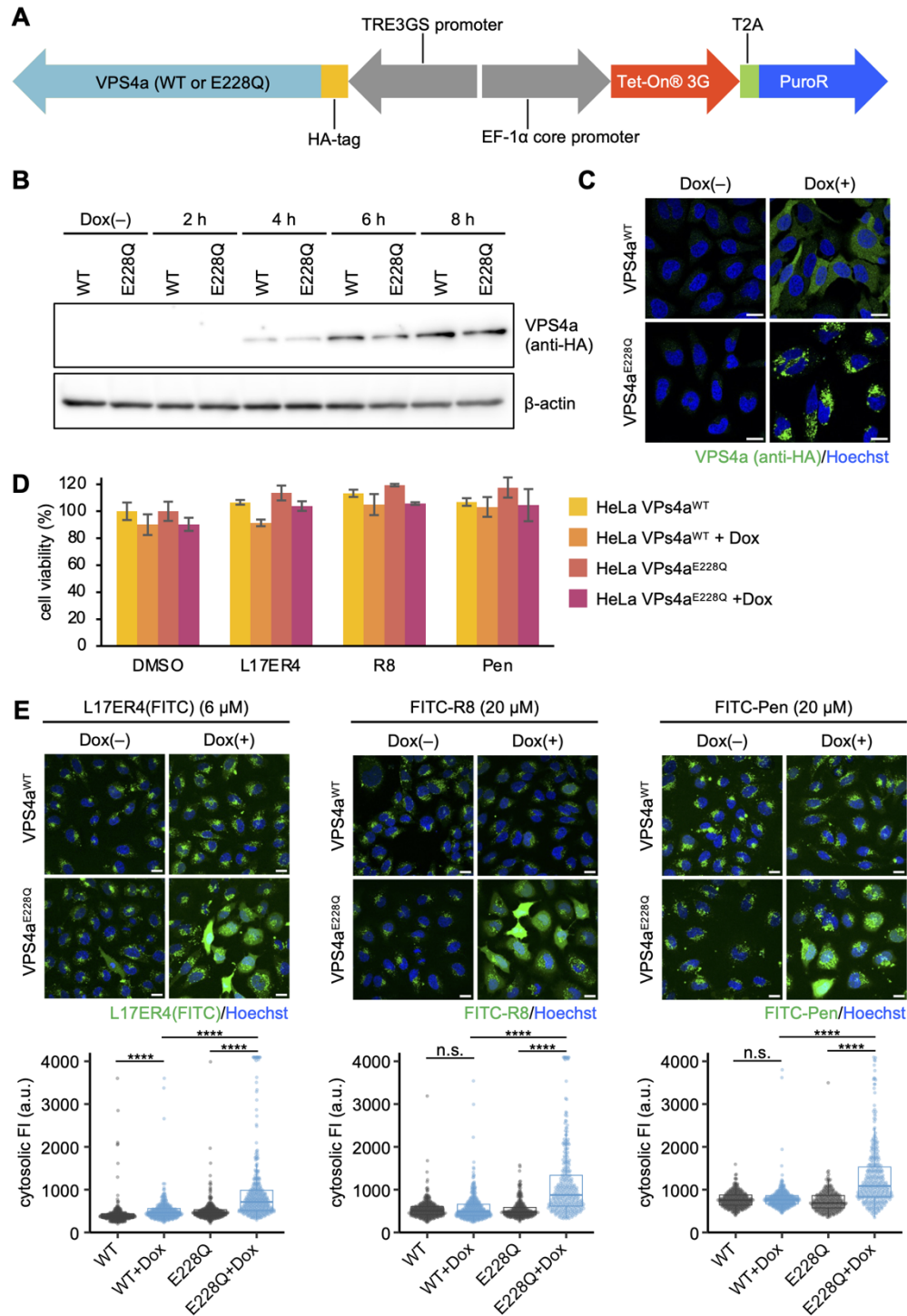


Figure 3-9. Effect of ANXA2 KD on CPPs internalization into cytosol. HeLa cells were transfected either with control siRNA (siCont) or ANXA2 siRNA (siANXA2) and then treated with L17ER4(FITC) (6 μM), FITC-R8 (20 μM), or FITC-Pen (20 μM) for 30 min. Confocal microscopy observation of FITC-labeled CPP internalization (top) and quantification of cytosolic fluorescence intensity of FITC-labelled CPP (bottom). Scale bars, 20 μm . Data from two (FITC-R8) or three (L17ER4(FITC), FITC-Pen) independent biological replicates are shown in box and dot plots. *, $p < 0.05$; ****, $p < 0.0001$. Wilcoxon rank-sum test.

複合体の解体と再利用が阻害される^{157,158}。ESCRT タンパク質は膜修復以外にも、エンドソームの成熟や細胞分裂などの重要な細胞プロセスに関与するため^{159,160}、長期的な ESCRT 阻害はそれ自体が細胞死を引き起こす可能性がある^{161,162}。そこで、タイミング制御可能な ESCRT 阻害方法として、Tet-On システムによる Dox 依存的な VPS4a^{E228Q} 発現誘導系を用いた。PiggyBac システムを用いて、VPS4a (WT または E228Q 変異体) を Dox 依存的に発現する HeLa 細胞 (HeLa VPS4a^{WT} および HeLa VPS4a^{E228Q}) を樹立した (Figures 3-10A)。Dox 処理時間依存的に VPS4a の発現量が



増加することをウエスタンブロットにより確認した (Figures 3-10B)。さらに、免疫染色によって VPS4a^{WT} および VPS4a^{E228Q} の細胞内局在を評価したところ、VPS4a^{WT} はサイトゾル全体に均一に分布していたのに対し、VPS4a^{E228Q} はエンドソームと思われる部位に蓄積していた (Figures 3-10C)。これは、VPS4a^{E228Q} においてはその機能が失われているために、エンドソーム膜上での ESCRT 複合体の解離が正常に進行しなくなり、局所的な蓄積が生じたためと考えられる。また、HeLa VPS4a^{WT} および HeLa VPS4a^{E228Q} の両細胞において、Dox の有無に関わらず、FITC 標識 CPP 非存在下および存在下の両条件で顕著な細胞毒性が見られないことを確認した (Figure 3-10D)。続いて、FITC 標識 CPP のサイトゾル移行に対する ESCRT の影響を検討した。HeLa VPS4a^{WT} においては、Dox 処理の有無に関わらず、FITC 標識 CPP のサイトゾル移行量は変化しなかったが、HeLa VPS4a^{E228Q} においては、Dox 処理後にいずれの FITC 標識 CPP についてもサイトゾル移行量の有意な増加が確認された (Figure 3-10E)。以上の結果から、ESCRT は、L17ER4(FITC)や代表的な CPP である R8 や Pen のサイトゾル移行に対して抑制的に働いており、ESCRT を阻害することで CPP のサイトゾル移行を促進できることが確認された。

まとめると、L17E によるサイトゾル送達には ANXA2 が関与していたが、L17ER4、R8、Pen などの CPP のサイトゾル移行に対する ANXA2 の影響は限定的であり、ESCRT 複合体による膜修復がより重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

Figure 3-10. Effect of ESCRT inhibition on CPPs internalization into cytosol. (A) Graphical overview of the PiggyBac plasmids used to establish HeLa cells with puromycin (Puro) resistance and doxycycline (Dox)-inducible expression of HA-tagged VPS4a (WT or E228Q mutant). (B) Western blot analysis for Dox-induced expression of HA-tagged VPS4a (WT or E228Q) in HeLa VPS4a^{WT} and HeLa VPS4a^{E228Q} cells. Cells were treated with Dox (1 µg/mL) for 0, 2, 4, 6, or 8 h. (C) Immunostaining analysis for HA-tagged VPS4a (WT or E228Q) in HeLa VPS4a^{WT} and HeLa VPS4a^{E228Q} cells treated with Dox (1 µg/mL) for 16 h. (D) Cell viability assay for HeLa VPS4a^{WT} and HeLa VPS4a^{E228Q} cells. Cells were treated with Dox (1 µg/mL) for 8 h and then incubated with L17ER4(FITC) (6 µM), FITC-R8 (20 µM), or FITC-Pen (20 µM) for 30 min. (E) CPP internalization in HeLa VPS4a^{WT} and HeLa VPS4a^{E228Q} cells. Cells were treated with Dox (1 µg/mL) for 8 h and then incubated with L17ER4(FITC) (6 µM), FITC-R8 (20 µM), or FITC-Pen (20 µM) for 30 min. Confocal microscopy observation of FITC-labeled CPP internalization (top) and quantification of cytosolic fluorescence intensity of FITC-labelled CPP (bottom). Scale bars, 20 µm (C, E). Data represent the mean ± SD of triplicate samples from one experiment (D). Data from three independent biological replicates are shown in box and dot plots (E). ****, $p < 0.0001$; n.s., not significant. Kruskal-Wallis test followed by Steel-Dwass test (E).

討論と展望

第3章では、HeLa細胞内でのL17E感受性の違いに着目することで、L17E活性に影響する因子として膜修復タンパク質であるANXA2を同定した(Figure 3-6)。また、L17E以外の代表的なCPPの膜透過(サイトゾル移行)にもESCRT依存的な膜修復機構が関与していることを明らかにした。

本章では、L17Eによるサイトゾル送達が生じた細胞群由来のpHeLaと送達が生じなかった細胞群由来のnHeLaにおけるプロテオームの比較を行った。その結果、膜画分では、nHeLaにおけるANXA2量がpHeLaの約1.4倍であったのに対し、サイトゾル画分においては両者でのANXA2量にほとんど差がなかった(Figure 3-2)。このことから、L17Eが細胞膜を傷害する際、細胞膜直下に存在するANXA2量が多いほど、ANXA2が膜修復に動員されやすくなり、結果としてL17Eによるサイトゾル送達が抑制される可能性が示唆された。しかし、ANXA2をはじめとするANXAファミリーは通常サイトゾルに局在しており、膜傷害時に Ca^{2+} と結合することではじめて膜へと移行すると考えられている^{94,146,163}。膜画分におけるANXA2局在量の差が生じるメカニズムや、局在量の差が膜修復活性に与える影響は、今後の重要な研究課題である。

pHeLaとnHeLa間でのANXA2の膜局在量の差を生み出す要因として、S100A11タンパク質の関与が考えられる。ANXA2は、S100A11タンパク質と結合しヘテロ四量体を形成することで、膜へと移行する^{145,164}。今後、ANXA2の膜局在量が変化した理由として、S100A11の発現量や細胞内局在に着目することで、新たな知見が得られる可能性がある。さらに、ANXA2の膜局在量変化の別の要因として、L17E処理の結果として、カルパイン依存的なANXA2の細胞外への放出が生じる可能性も考慮に入れる必要がある¹⁶⁵。L17Eによる膜傷害を受けた細胞では、ANXA2が膜修復応答の結果として小胞を形成し、細胞膜から遊離することで、pHeLaとnHeLa間でのANXA2量に差が生じた可能性が考えられる。しかし、本章で実施したANXA2-EGFPのタイムラプスイメージングでは、報告されているようなEGFP陽性の小胞の遊離は観察されなかった。このことから、L17Eの作用によってANXA2量が増加したのではなく、初期段階でのANXA2量の違いがL17E感受性の違いを生じさせたと考えるのが妥当である。

さらに、ANXA2は、同じく膜修復活性を持つことが知られるANXA1やANXA5と比較して、L17E添加時により顕著な細胞膜への集積を示すことが観察された。また、プロテオーム解析の結果、膜画分におけるANXA1およびANXA5の存在量には、nHeLaとpHeLa間でANXA2ほどの差は見られなかった(Figure 3-2)。これらの結果から、L17Eによる膜傷害に対して、ANXA2がANXA1やANXA5よりも大きく寄与していることが示唆される。ANXAファミリーは、そのコアドメインにタイプII Ca^{2+} 結合部位と呼ばれる Ca^{2+} /膜結合構造モチーフを持ち¹⁶⁶、この領域におけるパラログ間でのわずかなアミノ酸配列の違いが Ca^{2+} と脂質膜への親和性の違いを生み出していると考えられている¹⁶⁷。実際、ANXA6はANXA1と比較して低い Ca^{2+} 濃度で脂質膜に結合できることが報告されており¹⁶⁸、ANXA1、A2、A5間でのカルシウム応答性の違いが、L17E処理に伴う局在変化の程度の差異の原因である可能性がある。また、ANXAのN末端領域は一般的にパラログ間で相同性を欠いており、各ANXAの機能の多様性を生み出していると考えられている¹⁶⁷。その一方で、ANXA同士が互いに機能を補完し合うことで、ANXA依存的な膜修復機能の一部が

単一の ANXA 欠損に対して冗長性を持つ可能性が指摘されている¹⁶⁹。本章の結果では、ANXA2 をロックダウンしても L17E による送達効率はや約 5% の増加にとどまった (Figure 3-4)。このことから、他の ANXA が ANXA2 の膜修復機能を補完している可能性を考慮し、さらなる検討を行うことも有用であると思われる。

今回同定された ANXA2 は細胞膜だけでなく、リソソーム膜の修復にも関与していることが報告されている^{170,171}。したがって、L17E のような細胞膜を介したサイトゾル送達手法のみならず、エンドサイトーシスを介した送達経路のエンドソーム脱出効率にも ANXA2 が関与している可能性が考えられる。L17E 以外の送達系に対する ANXA2 の寄与は今後の重要な検討課題である。また、特に浸潤能を持つがん細胞では膜が傷付きやすく、それを補償するために ANXA による膜修復系が高活性化している可能性が指摘されている^{94,145}。そのため、膜修復系の抑制は、特にがん細胞におけるサイトゾル送達効率を向上するための有効な戦略となる可能性がある。

第3章の後半においては、L17E 以外の CPP に対する膜修復系の影響を検討した。代表的な CPP として、R8、Penetratin (Pen)、および所属研究室で開発された L17ER4 を用いて検討を行った。その結果、これらの CPP のサイトゾル移行には Ca^{2+} 依存的な膜修復系が抑制的に作用している可能性が示唆された (Figure 3-8)。また、これらの CPP のサイトゾル移行に対しては、ANXA2 よりも ESCRT 複合体の寄与がより大きいことが確認された (Figures 3-9, 10)。CPP のサイトゾル移行と膜修復の関連についてはこれまでも示唆されており、CPP 処理によって膜修復応答の一つであるエキソサイトーシスが亢進することや、細胞外 Ca^{2+} 濃度が CPP のサイトゾル移行に影響を与えることが報告されている^{137,150}。CPP のサイトゾル移行に対して ANXA2 よりも ESCRT 複合体の寄与が大きかった理由としては、CPP が細胞膜を透過する際のポアサイズが影響している可能性がある。CPP の膜透過時に形成されるポアは直径数 nm であると推定されており¹¹²、ANXA が数 μm の大きさの損傷部位を閉鎖できるのに対し⁹⁴、ESCRT は数 10 nm の大きさの損傷の修復に関与していると言われている¹⁵²。このことから、より小さいサイズのポアを形成する一般的な CPP のサイトゾル移行については ESCRT の寄与が大きく、対して L17E は抗体などの巨大分子も送達可能なことからより大きなポアを形成すると予想されるため、ANXA の関与が大きい可能性が考えられる。各ペプチドにより形成されるポアサイズの違いにより、関与する修復機構が異なる可能性があり、この点も今後の重要な研究課題である。

総 括

生物活性バイオ高分子を細胞内に導入することは、細胞生物学において細胞機能を制御するための新規ツールとなるだけでなく、治療の可能性を拡大するための重要な戦略である。それにもかかわらず、これらの手法の臨床応用を達成することは依然として難しい。その主な理由は、既存のデリバリー戦略における、送達効率の低さと選択性の乏しさである。このような課題が残る原因として、それぞれの細胞内送達経路のメカニズムが未だ完全には理解されていないことが挙げられる。本研究の成果の重要性は、細胞内送達系を制御する細胞因子を同定した点にある。第1章においては、近年注目を集めている細胞内送達経路である MPC に着目し、機械受容チャネル Piezo1 を活性化することで、MPC 活性を抑制的に制御できることを見出した。第2章、第3章においては、所属研究室で開発された送達活性を持つペプチド L17E に着目し、L17E が細胞株間および細胞株内において細胞選択性を持つことを示した。さらにこの選択性を説明し得る細胞因子として、KCa3.1 と ANXA2 を同定した。

本研究での知見を選択性の高い細胞内送達技術として応用できるレベルにまで昇華させるためにはさらなる研究が必要であるが、送達系に影響を与える細胞因子を同定したことにより、細胞機能の制御による送達効率の調節という、新たな送達戦略の可能性が提示された。また、本論文の知見を応用することで、選択性を付与した送達技術の開発も可能になるかもしれない。さらには、本研究で同定されたような送達効率の決定因子は、細胞内送達技術を *in vivo* 応用する際の各標的への適用可能性の予測バイオマーカーとしても期待できる。本研究第2章、第3章で行ったような、細胞間の送達効率の違いを比較し、その送達効率の決定因子を特定する方法は、細胞内送達メカニズムを解明するための普遍的な手法として、他の多様な送達戦略に対しても、実用的な洞察をもたらすことが期待される。

総合すると、本研究の成果は、細胞生物学における新たな知見として重要なだけでなく、既存の細胞内送達技術の臨床的な応用を目指す際の潜在的な課題の解決へのアプローチを与えうるものである。

実験の部

第 1 章の実験

試薬

D-MEM、D-MEM low glucose は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation から購入した。ウシ胎児血清 (FBS)、Opti-MEM は Gibco から購入した。Lipofectamine LTX、Lipofectamine RNAiMAX、Hoechst 33342 は Invitrogen から購入した。Recombinant EGF、Yoda1、EIPA、Puromycin は Sigma-Aldrich から購入した。TRAM-34、SKA-31 は Tocris Bioscience から購入した。TMR-labeled dextran 70 kDa、Alexa Fluor 568 labeled-transferrin、rhodamine-labeled phalloidin は Thermo Fisher Scientific から購入した。Ionomycin は AdipoGen から購入した。試薬は必要であればメーカーが推奨する溶媒に溶かし、分注し、 -30°C にて保存した。

細胞培養

A431 細胞は 10% (v/v) 非働化 FBS を含む高グルコース D-MEM 培地 (D-MEM(+)) 中で培養した。HEK293T 細胞は 10% (v/v) 非働化 FBS を含む低グルコース D-MEM 培地 (D-MEM LG(+)) 中で培養した。全ての細胞は 37°C 、5% CO_2 条件で培養し、80-90%コンフルエントの状態 で 2-4 日ごとに継代を行った。実験には、継代数 1-15 の細胞を用いた。実験は、特に指定のない限り、非働化 FBS を含まない D-MEM 培地 (D-MEM(-)) 中で行った。実験中の細胞インキュベーションは、特に指定のない限り、 37°C 、5% CO_2 条件で行った。本章で用いた細胞株は次の通りである。A431 (human epidermoid carcinoma, ATCC, CRL-1555)、HEK293T (human embryonic kidney, RIKEN BRC, RCB2202)

プラスミド構築

pGP-CMV-GCaMP6s : pGP-CMV-GCaMP6s-CAAX (Addgene # 52228) から CAAX 配列を削除することで作製した。

pIRES2-mCherry : pIRES2-ZsGreen1 (Takara) から BstXI/NotI による消化で ZsGreen1 をコードする cDNA を除去し、同じ部位に mCherry の cDNA 断片を挿入することで作製した。

pPiezo1-IRES2-mCherry : ヒト Piezo1 の cDNA (Promega, FXC01061) を、pIRES2-mCherry の EcoRI/BamHI 部位に挿入して作製した。

pPiezo1(Δ 946-956)-IRES2-mCherry および pPiezo1(Δ 944-946)-IRES2-mCherry : pPiezo1-IRES2-mCherry の MluI/SalI 部位間の WT Piezo1 配列を削除配列に置き換えることで作製した。

pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 : Feng Zhang 博士から提供された (Addgene #62988)。

PX459-Piezo1 : Piezo1 をターゲットとする CRISPR/Cas9 プラスミド (PX495-Piezo1) は、ヒト Piezo1 遺伝子のガイド配列 (TATTCGAGGCCATCGTGTACCGG) を、pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 の BbsI 部位に導入することで作製した。

pGFP-C1-PLCδ-PH および pmCherry-C1-D4H : Gregory Fairn 博士 (St. Michael's Hospital, Toronto, Canada) よりご厚意により提供された。

すべてのプラスミドの配列を DNA シーケンス (Eurofins) によって確認した。

プラスミドトランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションは、Lipofectamine LTX を用いて、メーカー推奨のプロトコルに従って行った。各プラスミドと LTX 試薬、PLUS reagent を Opti-MEM 中で混合し、室温で 5 分静置した。その後、血清を含む培地と混合し、これを細胞に添加した。細胞を 4 時間インキュベーションした後、プラスミドを含むトランスフェクション溶液を除去し、血清を含む培地を細胞に添加した。トランスフェクション後 24 時間培養した細胞を実験に用いた。

Piezo1 KO A431 細胞の樹立

Piezo1 KO A431 細胞株を、CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立した。ヒト Piezo1 をノックアウトするためのガイドシーケンス (TATTCGAGGCCATCGTGTACCGG) は、CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp>) を用いて決定した。A431 細胞を 60 mm dish に 7×10^5 cells/dish で播種し、1 日培養後に、PX459-Piezo1 プラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクション後、1 日間培養した後、puromycin (1 μ g/mL) を培地に添加し、3 日間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、puromycin を含まない培地中で、100 mm dish コンフルエントまで培養した。この細胞を、96-well plate に 0.8 cells/well で播種し、増殖させることで、限界希釈法によってシングルセルクローンを得た。

ゲノム配列の確認

シングルセルクローンにおける Piezo1 ノックアウトは、ゲノム DNA の塩基配列決定により確認した。A431 細胞 (WT およびクローン #1、#2) を 35 mm dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。これらの細胞から、GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA から、プライマーペア : 5'-CCAACAGCACCAACTTGCTG-3' (forward) と 5'-AGGAGTCCAGGGAAGCCGT-3' (reverse) を用いた PCR により、CRISPR/Cas9 ターゲット付近の配列を増幅した。増幅配列を、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio) を用いた TA クローニング法により、T-Vector pMD20 (Takara Bio) に挿入した。プラスミドベクター中に挿入された配列を DNA シーケンス (Eurofins) によって確認した。

リアルタイム定量 PCR

細胞を 35 mm dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を 0.05% trypsin で 5 分間処理して剥離させ、NucleoSpin RNA Plus (Takara Bio) を用いて total RNA を回収した。2 μ g のトータル RNA を PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いて cDNA に逆転写した。リアルタイム定量 PCR は、PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて QuantStudio

3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により行った。熱サイクルは、95°C (3 分) に続いて、[95°C (5 秒) と 60°C (30 秒)] を 40 サイクル繰り返す条件で行った。mRNA の発現量の評価は検量線法により行った。全ての実験で *GAPDH* を参照遺伝子として用いた。使用したプライマーは次の通りである。5'-CCTGTTTCGACAGTCAGCCG-3' (*GAPDH* forward) と 5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3' (*GAPDH* reverse)、5'-AGGCGCATCAGTCTACGTTT-3' (Piezol forward) と 5'-GCTTGGCCTCTTCTCTCTCC-3' (Piezol reverse)

デキストラン 70 kDa 取り込みアッセイ

デキストラン 70 kDa (TMR-dex70) の取り込みは、共焦点顕微鏡観察とフローサイトメトリー解析によって評価した。

共焦点顕微鏡観察を行う場合は、A431 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、実験前に D-MEM(-)中で一晩血清飢餓培養を行った。その後、細胞を D-MEM(-)中で TMR-dex70 (0.5 mg/mL) を Yoda1 (1.5 μ M) の存在下または非存在下において 37°C で 10 分間インキュベートした。細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、Hoechst 33342 (5 μ g/mL) を含む PBS を投与して室温で 5 分間処理することで核染色を行った。観察は、60×対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を装備した FV1000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。解析は、ImageJ ソフトウェア (NIH) を使用して行った。

フローサイトメトリー解析を行う場合は、A431 細胞を 24-well plate に 1×10^5 cells/dish で播種した後、顕微鏡観察時と同様の処理を行い、氷冷 PBS で 2 回洗浄後、0.25%トリプシンで 37°C、10 分間処理することでプレートから剥離させた。その後、D-MEM(+)を加えて細胞を懸濁し、これをチューブに回収した。細胞を遠心分離 (800×g、25°C、5 分) し、得られた細胞ペレットを PBS で洗浄した。この洗浄操作を再度繰り返した後、最終的に細胞を 500 μ L の PBS で再懸濁し、Attune NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific) を使用して、各サンプルあたり 10,000 個の細胞の蛍光量を測定した。結果は、10,000 細胞の蛍光強度の中央値の相対値として示した。

トランスフェリン取り込みアッセイ

トランスフェリン (Tfn) の取り込みは、共焦点顕微鏡観察とフローサイトメトリー解析によって評価した。

共焦点顕微鏡観察を行う場合は、A431 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、実験前に D-MEM(-)中で 1 時間血清飢餓培養を行った。その後、細胞を D-MEM(-)中で AF568-Tfn (20 μ g/mL) を Yoda1 (1.5 μ M) の存在下または非存在下において 37°C で 10 分間インキュベートした。その後、細胞膜上の AF568-Tfn を除去するため、グリシン-HCl バッファー (150 mM NaCl、pH 3.0) で 2 回酸洗浄した。さらに PBS で 2 回洗浄した後、4% PFA を用いて室温で 10 分間固定し、Hoechst 33342 (5 μ g/mL) を含む PBS を投与して室温で 5 分間処理することで核染色を行った。顕微鏡観察は、デキストラン 70 kDa 取り込みアッセイの方法に記載の通り実施した。

フローサイトメトリー解析を行う場合は、A431 細胞を 24-well plate に 1×10^5 cells/dish で播種した後、顕微鏡観察時と同様の処理を行い、酸洗浄後に細胞を剥離させ、デキストラン 70 kDa 取り込みアッセイの方法に記載の通りにフローサイトメトリー解析を実施した。

タイムラプスライブセルイメージング

A431 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、必要に応じてプラスミドをトランスフェクションし、血清飢餓状態で培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、培地を D-MEM(-) (150 μ L、dish 中央部分のみ) に置き換えた。細胞を FV3000 顕微鏡ステージに取り付けられたマイクロチャンバー (STXG-IX3WX-SET、Tokai Hit) 内で 37°C に維持した。D-MEM(-)中の試薬 (50 μ L) を対応する図の凡例に記載された最終濃度になるよう添加した。DIC および蛍光画像は、60 倍対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を備えた FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して 10 秒または 20 秒ごとに取得した。

A431 細胞での GCaMP6s を用いたカルシウムイメージング

A431 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、GCaMP6s プラスミドをトランスフェクションした。細胞を HBSS (400 mg/L KCl、60 mg/L KH_2PO_4 、8000 mg/L NaCl、350 mg/L NaHCO_3 、60 mg/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1000 mg/L D-Glucose、1 mM Ca^{2+} 、1 mM Mg^{2+} 含有 20 mM HEPES (pH 7.4)) で洗浄し、培地を HBSS (150 μ L、dish 中央部分のみ) に置き換えた。GCaMP6s の蛍光画像は、タイムラプスライブセルイメージングの方法と同様に、1 分ごとに取得した。蛍光強度は ImageJ ソフトウェア (NIH) を使用して測定した。Yoda1 (1.5 μ M) による Ca^{2+} 流入は、GCaMP6s 蛍光強度の最大値 (F_{max}) とベースの値 (F_0) の比として定量化した。

HEK293T 細胞での Fluo-8 を用いたカルシウムイメージング

HEK293T 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、pPiezo1 (フルレングス) -IRES2-mCherry、pPiezo1 (Δ 946–956) -IRES2-mCherry、pPiezo1 (Δ 944–946) -IRES2-mCherry、または空ベクター (pIRES2-mCherry) をそれぞれトランスフェクションした。細胞を Fluo-8 AM (5 μ M、AAT Bioquest) で 45 分間処理し、PBS で 2 回洗浄した。その後、細胞を HBSS で洗浄し、培地を HBSS (150 μ L、dish 中央部分のみ) に置き換えた。Fluo-8 の蛍光画像は、タイムラプスライブセルイメージングの方法と同様に、1 分ごとに取得した。蛍光強度は ImageJ ソフトウェア (NIH) を使用して測定した。Yoda1 (1.5 μ M) による Ca^{2+} 流入は、Fluo-8 蛍光強度の最大値 (F_{max}) とベースの値 (F_0) の比として定量化した。

ファロイジンによる F-actin 染色

A431 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2.5×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、実験の前に一晚血清飢餓状態で培養した。細胞を D-MEM(-)中で EGF (20 nM) と Yoda1 (1.5 μ M) とともに 37°C で 5 分間処理し、4% PFA (Nacalai Tesque) を用いて室温 ($\sim 25^\circ\text{C}$) で 10 分間固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 を含む PBS を用いて室温 ($\sim 25^\circ\text{C}$) で 4 分間膜透

過処理を行った。その後、細胞を 1% BSA を含む PBS を用いて室温（～25℃）で 30 分処理することでブロッキングを行い、rhodamine 標識 phalloidin（Invitrogen）を含む 1% BSA 溶液を用いて室温（～25℃）で 30 分間処理することで F-actin を染色した。観察は、40×対物レンズ（UPlanSApo、NA0.95、Olympus）を備えた FV1000 CLSM システム（Olympus）を使用して行った。コロニーの辺縁に位置する細胞のうち、12 μm 以上の phalloidin の集積を有する細胞を、ラッフルを形成した細胞としてカウントした。

走査型電子顕微鏡観察

血清飢餓状態にした A431 細胞を D-MEM(-)中で EGF (20 nM) と Yoda1 (1.5 μM) とともに 37℃ で 5 分間処理し、2%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) と 4%パラホルムアルデヒドで 2 時間固定した。カコジル酸緩衝液で洗浄後、1%四酸化オスミウムを含むカコジル酸緩衝液中で 2 時間後固定し、蒸留水で洗浄後、1%緩衝四酸化オスミウムと 1%タンニン酸による伝導染色 (O-T-O 法) を行った。その後、エタノールと臨界点乾燥 (臨界点乾燥機 HCP-1、日立製作所) で段階的に脱水し、オスミウムコーター (HPC-30W、Vacuum Device) で薄膜 (3 nm) をコーティングし、電界放出形走査電子顕微鏡 (S-4800、日立製作所) により加速電圧 2 kV で観察した。

Rac1 活性化アッセイ

Rac1 活性化アッセイは、Rac1 Pull-Down Activation Assay Biochem Kit (Cytoskeleton) を使用し、メーカー推奨のプロトコルに従って実施した。A431 細胞を 100 mm dish に 9×10^5 cells/dish で播種し、2 日間培養した後、実験の前に一晩血清飢餓状態で培養した。細胞を D-MEM(-)中で EGF (20 nM) と Yoda1 (1.5 μM) とともに 37℃ で 5 分間インキュベートした。細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、氷冷した溶解バッファー (10 mM MgCl₂、0.5 M NaCl、2% IGEPAL 含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5)) 240 μL で溶解した。細胞ライセートを遠心分離 (10,000×g、1 分、4℃) した後、上清を回収した。得られた上清のうち 30 μL をタンパク質濃度の測定および total Rac1 検出のためのライセートの調製に使用した。残りの上清は、GST タグ付き PAK-PBD ビーズとともに 4℃ で 1 時間インキュベートした。ビーズを洗浄した後、結合タンパク質を SDS sample buffer (2% SDS、40% glycerol、5% 2-mercaptoethanol、少量の bromophenol blue 含有 60 mM Tris-HCl (pH 6.8)) で溶出した。5–20% polyacrylamide グラジエントゲル (SuperSep Ace; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて展開した後、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) を用いたセミドライ式ブロッキング法により PVDF 膜に転写した。転写された PVDF 膜を、5%スキムミルクを添加した 0.1% Tween-20 含有 TBS (TBS-T) に浸し、室温（～25℃）で 1 時間振とうしてブロッキングを行った。その後、適切な一次抗体を含む 5%スキムミルク含有 TBS-T に浸し、4℃で終夜振とう反応させた。PVDF 膜を TBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、適切な二次抗体を含む 5%スキムミルク含有 TBS-T 中に浸し、室温（～25℃）で 1 時間振とう反応させた。PVDF 膜を TBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、ECL Prim (GE Healthcare) で 5 分間処理し、LAS3000 mini (FUJIFILM) により化学発光を検出した。用いた抗体は次の通りである。anti-Rac1 (mouse

monoclonal、Merck Millipore、05-389、1:1,000)、anti- β -actin (mouse monoclonal、Sigma-Aldrich、A2228、1:10,000)、anti-mouse IgG HRP (goat polyclonal、GeneTex、GTX213111-01、1:5,000)

ウェスタンブロット

A431 細胞を 6-well plate に 3×10^5 cells/well で播種し、1 日間培養したあと、一晚血清飢餓状態で培養した。細胞を D-MEM(-)中で EGF (20 nM) と Yoda1 (1.5 μ M) とともに 37°C で 5 分間インキュベートした。細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、protease inhibitor cocktails(Roche)と phosphatase inhibitor cocktails (Roche) を含む 100 μ L の RIPA buffer (150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate 含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)) によって溶解した。細胞ライセートを遠心分離 (16000 $\times$ g、20 分、4°C) した後、上清を回収した。上清のタンパク質濃度を BCA protein assay using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) によって測定し、SDS sample buffer 中で 0.5 μ g/ μ L になるよう調製した。各サンプル 20 μ L のライセートを 5–20% polyacrylamide グラジエントゲル (SuperSep Ace; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて展開した。その後の処理は Rac1 活性化アッセイの項に記載の通りである。EGFR および Vav2 を検出する際には、pEGFR または pVav2 を検出した後、Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) で PVDF 膜を 5 分間振とう洗浄してストリップした後、TBST で 10 分間 2 回洗浄し、次いで EGFR または Vav2 を検出した。使用した抗体は次の通りである。anti- β -actin (mouse monoclonal、Sigma-Aldrich、A2228、1:10,000)、anti-EGFR (rabbit monoclonal、Cell Signaling Technology、4267、1:1,000)、anti-pEGFR (Y1068) (rabbit polyclonal、Cell Signaling Technology、2234、1:1,000)、anti-Vav2 (rabbit monoclonal、Cell Signaling Technology、2848、1:1,000)、anti-pVav2 (Y172) (rabbit monoclonal、Abcam、ab86695、1:1000)、anti-rabbit IgG HRP (goat、Cell Signaling Technology、7074、1:2,000)、anti-mouse IgG HRP (goat polyclonal、GeneTex、GTX213111-01、1:5,000)

細胞内 pH 測定

A431 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2.5×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を D-MEM(-)中で SNARF-5F AM (20 μ M、Invitrogen) とともに 37°C で 30 分間インキュベートした後、PBS で 2 回洗浄し、Yoda1 (1.5 μ M) を含む D-MEM(-)を添加して 37°C で 10 分間インキュベートした。細胞内 pH を低下させるポジティブコントロールとして、EIPA (25 μ M) を D-MEM(-)中で 37°C で 30 分間処理した。観察は、40 $\times$ 対物レンズ (UPlanSApo、NA 0.95、Olympus) を備えた FV1000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。SNARF-5F AM は 559 nm で励起され、585 nm および 645 nm の蛍光シグナルを評価するために、それぞれ 570–600 nm および 630–660 nm の範囲で画像を取得した。蛍光強度は ImageJ ソフトウェア (NIH) を使用して測定し、585/645 nm の蛍光シグナル比を計算した。検量線を作成するために、細胞を上述のように SNARF-5F AM とインキュベートし、キャリブレーションバッファー (130 mM KCl、10 mM NaCl、1 mM MgSO_4 含有 10 mM MOPS (pH 6.2、6.6、7.0、7.4、7.8、または 8.2)) で 2 回洗浄し、その後、細胞内 pH を細胞外 pH と平衡化するために、nigericin (10 μ g/mL) を含むキャリブレーションバッファー中で室温 (~25°C) で 15 分間インキュベートした。

細胞生存試験

WST-8 アッセイを Cell Counting Kit-8（同仁化学研究所）を用いてメーカー推奨のプロトコルに従って行った。A431 細胞を 96-well plate に 1×10^4 cells/well で播種し、1 日間培養した。その後、細胞を DMSO または Yodal（1.5 および 3 μ M）を含む D-MEM(+)中で 37°C で 4 時間処理した。飢餓培養をする場合は、細胞を一晩 D-MEM(-)で培養することで血清飢餓状態にした後、DMSO または Yodal（1.5 および 3 μ M）を含む D-MEM(-)中で 37°C で 30 分または 4 時間処理した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、各ウェルに 100 μ L の D-MEM(-)と 10 μ L の CCK-8 溶液を加えた。細胞を 37°C で 2 時間培養した後、吸光度（ $A_{450 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}$ ）を測定した。

統計処理

すべてのデータは、特に記載がない限り、3 回の独立した生物学的反復（ $n=3$ ）の平均 $\pm$ 標準誤差（SE）として示した。統計解析はすべて JMP Pro 14（SAS Institute）を用いて行った。2 群間の比較には、Student の t 検定を使用した。多重比較には、一元配置の分散分析（one-way ANOVA）を行った後、続いて群間の比較を行う場合は Tukey の HSD 検定、コントロール群との比較を行う場合は Dunnett の検定を行った。計算された P 値が 0.05 よりも小さい場合に有意な差があるとみなした。

第2章の実験

試薬

D-MEM、D-MEM low glucose、 α -MEM、RPMI 1640 培地、valinomycin、gramicidin は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation から購入した。ウシ血清 (BS)、ウシ胎児血清 (FBS)、Opti-MEM は Gibco から購入した。Lipofectamine LTX、Lipofectamine RNAiMAX、Hoechst 33342 は Invitrogen から購入した。Propidium iodide、Puromycin は Sigma-Aldrich から購入した。TRAM-34、SKA-31 は Tocris Bioscience から購入した。Alexa Fluor 488-labeled dextran 10 kDa、TMR-labeled dextran 10 kDa、DiBAC4(3)は Thermo Fisher Scientific から購入した。BAPTA-AM は Abcam から購入した。試薬は必要であればメーカーが推奨する溶媒に溶かし、分注し、 -30°C にて保存した。

ペプチド合成

L17E と L9E は、Rink Amide AM resin を用いて、ペプチド自動合成装置 Syro I (Biotage) により自動合成した。FITC 標識した L17E (L17E(FITC)) は過去に報告されている通り合成した¹⁵¹。合成後のペプチド樹脂を、TFA/EDT (95:5 (v:v)) 中で室温 ($\sim 23^{\circ}\text{C}$)、3 時間処理することで樹脂からの切り出しと脱保護を行った。精製は、COSMOSIL₅C₁₈AR-II カラム (Nacalai Tesque) を用いた逆相 HPLC により行った。精製したペプチドは凍結乾燥後、MALDI-TOF MS で質量を測定した。ペプチドは DMSO に溶解させ、 -30°C で保存した。合成した各ペプチドのアミノ酸配列と質量 (実測値 m/z および理論値 $[M+H]^+$) は次の通りである。

L17E : IWLTKFLGKHAAKHEAKQQLSKL-amide

実測値 : 2859.0、理論値 : 2858.7

L9E : IWLTKLFEGKHAAKHLAKQQLSKL-amide

実測値 : 2859.0、理論値 : 2858.7

L17E(FITC) : IWLTKFLGKHAAKHEAKQQLSKLGGK(FITC)-amide

実測値 : 3489.9、理論値 : 3490.19

細胞培養

例外を除く全ての細胞は、10% (v/v) 非働化 FBS を含む D-MEM 培地 (D-MEM(+)) 中で培養した。HeLa 細胞は 10% (v/v) 非働化 BS を含む α -MEM 培地 (α -MEM(+)) 中で培養した。SJSA1 細胞は 10% (v/v) 非働化 FBS を含む RPMI 培地 (RPMI(+)) 中で培養した。HEK293T 細胞は 10% (v/v) 非働化 FBS を含む低グルコース D-MEM 培地 (D-MEM LG(+)) 中で培養した。全ての細胞は 37°C 、5% CO_2 条件で培養し、80-90%コンフルエントの状態ですぐに継代を行った。実験には、継代数 1-15 の細胞を用いた。実験は、特に指定のない限り、非働化 FBS を含まない D-MEM 培地 (D-MEM(-)) 中で行った。実験中の細胞インキュベーションは、特に指定のない限り、 37°C 、5% CO_2 条件で行った。本章で用いた細胞株は次の通りである。HT1080 (human fibrosarcoma、JCRB、JCRB9113)、MIA PaCa-2 (human pancreatic cancer、RIKEN BRC、RCB2094)、MDA-MB-231 (human breast cancer、ATCC、HTB-26)、U2OS (human osteosarcoma、ECACC、92022711)、HeLa (human cervical cancer、ECACC、93021013)、SW480 (human colon cancer、gift from Dr. Hiromu Suzuki、

Sapporo Medical University)、A549 (human lung cancer、RIKEN BRC、RCB0098)、MCF7 (human breast cancer、ATCC、HTB-22)、LoVo (human colon cancer、gift from Dr. Hiromu Suzuki、Sapporo Medical University)、T24 (human bladder cancer、JCRB、JCRB0711)、SJSA1 (human osteosarcoma、ATCC、CRL-2098)、HEK293T (human embryonic kidney、RIKEN BRC、RCB2202)

プラスミド構築

PX495-KCNN4：KCNN4 をターゲットとする CRISPR/Cas9 プラスミド (PX495-KCNN4) は、KCNN4 遺伝子のガイド配列 (GCCAGGTGCGGCTGAAACAC) を、pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 (Addgene #62988) の BbsI 部位に導入することで作製した。

ANXA4-EGFP：ヒト ANXA4 を、HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリー (total RNA の抽出と cDNA への逆転写の方法はリアルタイム定量 PCR の項を参照) を鋳型として、プライマーペア 5'-GGAGAATTCATGGCCATGGCAACCAAAGGA-3' (forward) と 5'-GGAGGATCCGAATCATCTCCTCCACAGAGA-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、pEGFP-N1 (Clontech) の EcoRI/BamHI サイトに導入した。

pEGFP-C1：pmCherry-C1 (Clontech) の mCherry 部分を、pEGFP-N1 から増幅した EGFP に置き換えた。

EGFP-KCa3.1：ヒト KCa3.1 を、HT1080 細胞由来の cDNA ライブラリーを鋳型として、プライマーペア 5'-GGAGAATTCTATGGGCGGGGATCTGGTGC-3' (forward) と 5'-GGAGGATCCCTACTTGACTGCTGGCTGG-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、pEGFP-C1 の EcoRI/BamHI サイトに導入した。

FLAG-KCa3.1：FLAG タグの 3 回繰り返し配列 (MDYKDDDDKGDYKDDDDKGDYKDDDDKKG) をコードする遺伝子断片 (ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAAGGTGACTACAAAGATGATGACGATAAAGGCGAC TATAAGGACGATGACGACAAGGGA) を、NEBuilder HiFi DNA Assembly (NEB) を用いて、pcDNA3 (Invitrogen) 上で KCa3.1 の N 末端に導入した。

FLAG-KCa2.1：ヒト KCa2.1 を、IDG_KCNN1_OE_1 (Addgene、#161693) を鋳型として、プライマーペア 5'-GATGACGACAAGGGAATGAACAGCCACAGC-3' (forward) と 5'-ATATCTGCAGAATTCTCACCCGAGTCCGA-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、FLAG-KCa3.1 の KC3.1 部分を、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて KCa2.1 と置き換えた。

FLAG-KCa4.1：ヒト KCa4.1 を、pcDNA3+hSlo2.2 (Addgene、#16214) を鋳型として、プライマーペア 5'-ATGAGCGACCTGGACTCCGAG-3' (forward) と 5'-ATATCTGCAGAATTCTCAGAGCTGTGTCTC-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、FLAG-KCa3.1 の KC3.1 部分を、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて KCa4.1 と置き換えた。pcDNA3+hSlo2.2 中の配列に 1 bp 変異と 63 bp の挿入が確認されたため、これらを修正した。

FLAG-Kir2.1：ヒト Kir2.1 を、HT1080 細胞由来の cDNA ライブラリーを鋳型として、プライマーペア 5'-GGAGGATCCATGGGCAGTGTGCGAACCAAC-3' (forward) と 5'-

GGAGAATTCTCATATCTCCGACTCTCGCCG-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、FLAG-KCa3.1 の KC3.1 部分を、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて Kir2.1 と置き換えた。

GCaMP8s-CAAX : K-Ras 由来の CAAX モチーフ (GAGAKEKMSKDGKKKKKSKTKCVIM) をコードする遺伝子断片 (GGAGCAGGAGCAAAAGAAAAGATGAGCAAAGATGGTAAAAAGAAGAAAAAGAAGTCAAA GACAAAGTGTGTAATTATG) を、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて、pGP-CMV-jGCaMP8s (Addgene) 上で GCaMP8s の C 末端に導入した。

すべてのプラスミドの配列を DNA シーケンス (Eurofins) によって確認した。

プラスミドトランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションは、Lipofectamine LTX を用いて、メーカー推奨のプロトコルに従って行った。各プラスミドと LTX 試薬、PLUS reagent を Opti-MEM 中で混合し、室温で 5 分静置した。その後、血清を含む培地と混合し、これを細胞に添加した。細胞を 4 時間インキュベーションした後、プラスミドを含むトランスフェクション溶液を除去し、血清を含む培地を細胞に添加した。トランスフェクション後 24 時間培養した細胞を実験に用いた。

siRNA トランスフェクション

siRNA のトランスフェクションは、Lipofectamine RNAiMAX を用いて、メーカー推奨のプロトコルに従って行った。各 siRNA と RNAiMAX 試薬を Opti-MEM 中で混合し、室温で 5 分静置した。その後、血清を含む培地と混合し、これを細胞に添加した。細胞を 6 時間インキュベーションした後、siRNA を含むトランスフェクション溶液を除去し、血清を含む培地を細胞に添加した。トランスフェクション後 72 時間培養した細胞を実験に用いた。本研究で用いた siRNA は次の通りである。Control siRNA: ON-TARGETplus Non-targeting Pool (Dharmacon、D-001810-10-05)、CHC siRNA: MISSION siRNA for clathrin heavy chain (Sigma-Aldrich、SASI_Hs01_00208103)、Rac1 siRNA: target sequence 5'-GGAACUAAACUUGAUCUUAGGGA-3' (Nippon Gene)、KCNN4 siRNA: ON-TARGETplus Human KCNN4 siRNA SMARTPool (Dharmacon、L-004461-00-0005)

KCNN4 KO U2OS 細胞株の樹立

KCNN4 KO U2OS 細胞株を、CRISPR/Cas9 システムを用いて樹立した。ヒト KCNN4 をノックアウトするためのガイドシーケンス (GCCAGGTGCGGCTGAAACAC) は、CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp>) を用いて決定した。U2OS 細胞を 60 mm dish に 5×10^5 cells/dish で播種し、1 日培養後に、PX459-KCNN4 プラスミド (4 μ g) をトランスフェクションした。トランスフェクション後、1 日間培養した後、puromycin (1 μ g/mL) を培地に添加し、3 日間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、puromycin を含まない培地中で、100 mm dish コンフルエントまで培養した。この細胞を、96-well plate に 0.5 cells/well で播種し、増殖させることで、限界希釈法によってシングルセルクローンを得た。

ゲノム配列の確認

シングルセルクローンにおける *KCNN4* ノックアウトは、ゲノム DNA の塩基配列決定により確認した。U2OS 細胞 (WT および *KCNN4* KO) を 35 mm dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。これらの細胞から、GeneArt Genomic Cleavage Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてゲノム DNA を抽出した。得られたゲノム DNA から、プライマーペア：5'-CTGGGTACCTGGGTTTCTAC-3' (forward) と 5'-AACACTGGGGTTCTTTGTGC-3' (reverse) を用いた PCR により、CRISPR/Cas9 ターゲット付近の配列を増幅した。増幅配列を、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio) を用いた TA クローニング法により、T-Vector pMD20 (Takara Bio) に挿入した。プラスミドベクター中に挿入された配列を DNA シーケンス (Eurofins) によって確認した。

PI 内在化および ANXA4-EGFP 局在のタイムラプス観察

U2OS 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞に ANXA4-EGFP プラスミド (400 ng) をトランスフェクションし、1 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、培地を D-MEM(-) に置き換えた。細胞を顕微鏡のステージに取り付けられたマイクロチャンバー (STXG-IX3WX-SET, Tokai Hit) 内に 37°C で静置した。35 mm glass-bottomed dish から D-MEM(-) を除去し、直後にタイムラプス撮影を開始した。DIC および EGFP と PI の蛍光画像を 10 秒ごとに合計 5 分間取得した。撮影開始 30 秒後に、L17E (40 μ M) と PI (50 μ g/mL) を含む D-MEM(-) (200 μ L) を dish 上のガラス部分に添加した。撮影は、60 $\times$ 対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を装備した FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。解析は、ImageJ ソフトウェア (バージョン 2.14.0、NIH) を使用して行った。

PI 送達アッセイ

L17E による PI のサイトゾル送達効率は、L17E 存在下で PI が内在化した細胞の割合を、共焦点顕微鏡観察とフローサイトメトリー解析によって評価した。

共焦点顕微鏡観察を行う場合は、細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、L17E (40 μ M) と PI (50 μ g/mL) を含む D-MEM(-) を投与し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、Hoechst 33342 (5 μ g/mL) を含む D-MEM(-) を投与し、37°C で 5 分間処理することで核染色を行った。細胞を PBS で洗浄後、D-MEM(-) を添加した。観察は、60 $\times$ 対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を装備した FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。解析は、ImageJ ソフトウェア (バージョン 2.14.0、NIH) を使用して行った。

フローサイトメトリー解析を行う際は、細胞を 24-well plate に 5×10^4 cells/well で播種し、1 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、L17E (40 μ M) と PI (50 μ g/mL) を含む D-MEM(-) を投与し、37°C で 5 分間した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.05% trypsin で 5 分間処理することで細胞をプレートから剥離させた。その後、D-MEM(+) を加えて細胞を懸濁し、これをチューブに回収した。細胞を遠心分離 (800 $\times$ g、25°C、5 分) し、得られた細胞ペレットを PBS で洗浄し

た。この洗浄操作を再度繰り返した後、最終的に細胞を 500 μ L の PBS で再懸濁し、Attune NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific) を使用して、各サンプルあたり 10,000 個の細胞の蛍光量を測定した。

siRNA トランスフェクションを行う場合、細胞を 6-well plate に 2×10^5 cells/well で播種し、1 日間培養した後に、コントロール siRNA (ON-TARGETplus Non-targeting Pool, Dharmacon) (20 nM) または KCNN4 siRNA (ON-TARGETplus Human KCNN4 siRNA SMARTPool, Dharmacon) (20 nM) をトランスフェクションした。48 時間後に、35 mm glass-bottomed dish または 24-well plate にそれぞれ 2×10^5 cells/dish または 5×10^4 cells/well で再播種した。その後の実験は、再播種から 24 時間後 (siRNA トランスフェクションから 72 時間後) に、上述の通り行った。

プラスミドトランスフェクションを行う場合、細胞を 35 mm glass-bottomed dish または 24-well plate にそれぞれ 1.5×10^5 cells/dish または 5×10^4 cells/well で播種し、1 日間培養後に、目的のプラスミド (400 ng) をトランスフェクションした。実験は、プラスミドトランスフェクションから 24 時間後に、上述の通り行った。

SKA-31、TRAM-34 または valinomycin 処理を行う場合、細胞を PBS で 2 回洗浄した後、SKA-31 (10 μ M)、TRAM-34 (10 μ M) または valinomycin (10 μ M) を含む D-MEM(-)を投与し、37°C で 5 分間前処理を行った。その後、各試薬を含む D-MEM(-)中で PI および L17E を上述の通り処理した。

HEPES 緩衝液処理を行う場合、細胞を PBS で 2 回洗浄した後、異なる濃度の KCl および NaCl を含む HEPES 緩衝液 (1 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂、10 mM D-glucose、20 mM HEPES、pH 7.4 に、KCl (5.4、10、20 または 140 mM) および NaCl (140、135.4、125.4 または 5.4 mM) を KCl と NaCl の濃度の合計が 145.4 mM に保たれるように添加したもの) を投与し、37°C で 30 分間インキュベートした。その後、各 HEPES 緩衝液中で PI および L17E を上述の通り処理した。

BAPTA-AM 処理を行う場合、細胞を PBS で 2 回洗浄した後、BAPTA-AM (40 μ M) を含む D-MEM(-)を投与し、37°C で 30 分間前処理した。その後、PBS で洗浄を行い、BAPTA-AM を含まない D-MEM(-)中で PI および L17E を上述の通り処理した。

Thapsigargin 処理を行う場合、細胞を PBS で 2 回洗浄した後、thapsigargin (5 μ M) を含む D-MEM(-)を投与し、37°C で 10 分間前処理した。その後、thapsigargin を含む HBSS (400 mg/L KCl、60 mg/L KH₂PO₄、8,000 mg/L NaCl、350 mg/L NaHCO₃、60 mg/L Na₂HPO₄ · H₂O、1,000 mg/L D-glucose、1.8 mM CaCl₂、1 mM MgCl₂ 含有 20 mM HEPES (pH 7.4)) 中で PI および L17E を上述の通り処理した。

EGTA 処理を行う場合、前処理は行わず、EGTA (2.5 mM) を含む HBSS 中で PI および L17E を上述の通り処理した。

デキストラン 10 kDa 送達アッセイ

L17E 存在下で蛍光標識デキストラン 10 kDa が細胞内に移行した様子を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。細胞を 35-mm glass-bottom dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、L17E (40 μ M) と AF488-dex10 (200 μ g/mL) または TMR-dex10 (200 μ g/mL)

を含む D-MEM(-)を投与し、37°Cで 5 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を含む D-MEM(-)を投与し、37°Cで 5 分間インキュベートすることで核染色を行った。共焦点顕微鏡による観察および画像解析は、PI 送達アッセイの項に記載の通り実施した。プラスミドのトランスフェクションを行う際の実験は、PI 送達アッセイの項に記載の通り実施した。

遺伝子発現と L17E 活性の相関解析

遺伝子発現データは、CCLE に登録されている 1019 種類のヒトがん細胞株の次世代シーケンサーによる RNA シーケンスの結果から取得した。このデータベース中の細胞リストから、本研究で利用した 11 種類の細胞株を選択し、各細胞株について、登録されているすべての遺伝子の発現量データを tsv ファイル形式で取得した。取得した遺伝子のうち、初めに 11 種類の細胞株全てで発現している 16,487 遺伝子を抽出した。次に、11 の細胞株における、各遺伝子量の発現量と L17E による PI 内送達効率の相関係数を、これら 16,487 遺伝子すべてに対して計算した。データ解析は、Microsoft Excel (Microsoft) および R (バージョン 4.3.1, R Development Core Team) を使用して、RStudio (バージョン 2023.12.1+402, RStudio PBC) で行った。高い相関係数を持つ遺伝子のタンパク質ネットワーク解析は、STRING (<https://string-db.org/>) を使用して行った。

リアルタイム定量 PCR

細胞を 35 mm dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を 0.05% trypsin で 5 分間処理して剥離させ、NucleoSpin RNA Plus (Takara Bio) を用いて total RNA を回収した。2 µg のトータル RNA を PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いて cDNA に逆転写した。リアルタイム定量 PCR は、PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により行った。熱サイクルは、95°C (3 分)、[95°C (5 秒) と 60°C (30 秒)] を 40 サイクル繰り返す条件で行った。mRNA の発現量の評価は、各図の凡例に示す通り、比較 CT 法もしくは検量線法により行った。全ての実験で *GAPDH* を参照遺伝子として用いた。使用したプライマーは次の通りである。5'-CCTGTTTCGACAGTCAGCCG-3' (*GAPDH* forward) と 5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3' (*GAPDH* reverse)、5'-CATTCCTGACCATCGGCTATGG-3' (*KCNN4* forward) と 5'-GCCTTGTTAACTCCAGCTTCCG-3' (*KCNN4* reverse)、5'-TGAAGTTGGCACACCACCTA-3' (*CHC* forward) と 5'-TGGCTTCATGAGGTGCAGTA-3' (*CHC* reverse)、5'-GCCAATGTTATGGTAGAT-3' (*Rac1* forward) と 5'-GACTCACAAGGGAAAAGC-3' (*Rac1* reverse)

ウェスタンブロット

細胞を 12-well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、1 日間培養した。細胞にプラスミド (800 ng) をトランスフェクションし、1 日後に、氷冷 PBS を用いて 2 回洗浄した後、protease inhibitor cocktails (Roche) と phosphatase inhibitor cocktails (Roche) を含む 100 µL の RIPA buffer (150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate 含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.6))

によって溶解した。細胞ライセートを遠心分離 (16000×g、20 分、4°C) した後、上清を回収した。上清のタンパク質濃度を BCA protein assay using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) によって測定し、SDS sample buffer (2% SDS、40% glycerol、5% 2-mercaptoethanol、少量の bromophenol blue 含有 60 mM Tris-HCl (pH 6.8)) 中で 0.5 µg/µL になるよう調製した。各サンプル 20 µL のライセートを 5–20% polyacrylamide グラジエントゲル (SuperSep Ace; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用いて展開した後、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) を用いたセミドライ式ブロッティング法により PVDF 膜に転写した。転写された PVDF 膜を、5% スキムミルクを添加した 0.1% Tween-20 含有 TBS (TBS-T) に浸し、室温 (~25°C) で 1 時間振とうしてブロッキングを行った。その後、適切な一次抗体を含む 5% スキムミルク含有 TBS-T に浸し、4°C で終夜振とう反応させた。PVDF 膜を TBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、適切な二次抗体を含む 5% スキムミルク含有 TBS-T 中に浸し、室温 (~25°C) で 1 時間振とう反応させた。PVDF 膜を TBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、ECL Prim (GE Healthcare) で 5 分間処理し、Amersham ImageQuant 800 (Cytiva) により化学発光を検出した。使用した抗体は次の通りである。anti-FLAG clone M2 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, F3165, 1:4,000)、anti-β-actin (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, A2228, 1:10,000)、anti-mouse IgG HRP (goat polyclonal, GeneTex, GTX213111-01, 1:5,000)

免疫染色

細胞を 35-mm glass-bottomed dish 上に 1×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞にプラスミド (400 ng) をトランスフェクションし、1 日後に、PBS で 2 回洗浄した後、4% PFA (Nacalai Tesque) を用いて室温 (~25°C) で 15 分間固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 を含む PBS を用いて室温 (~25°C) で 15 分間膜透過処理を行った。再度、PBS で 2 回洗浄し、1% BSA を含む 0.1% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) を用いて室温 (~25°C) で 30 分間ブロッキングを行った。その後、細胞を anti-FLAG M2 antibody を含む 1% BSA 含有 PBS-T 中で、室温 (~25°C) で 1 時間インキュベーションした。細胞を PBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、AF488 標識 anti-mouse IgG antibody を含む 1% BSA 含有 PBS-T 中で、室温 (~25°C) で 1 時間インキュベーションした。細胞を PBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を含む PBS を添加し、室温 (~25°C) で 5 分間細胞核を染色した。観察は、60×対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を装備した FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。解析は、ImageJ ソフトウェア (バージョン 2.14.0、NIH) を使用して行った。使用した抗体は次の通りである。anti-FLAG clone M2 (mouse monoclonal, Sigma-Aldrich, F3165, 1:300)、anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (goat polyclonal, Invitrogen, A11001, 1:2,000)

膜電位測定

膜電位測定は、電位感受性プローブ DiBAC₄(3)を用いて、既報の通りに行った¹²⁷。細胞を 6-well plate に 3×10^5 cells/well で播種し、1 日間培養した。プレート上の細胞を TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific) を用いて剥離し、D-MEM(+)を加えて回収した後、遠心分離 (800×g、25°C、5 分)

し、得られた細胞ペレットを D-MEM(+)中で懸濁した。細胞懸濁液と DiBAC₄(3) (200 nM) を含む D-MEM(+)を、1:1 の割合で DiBAC₄(3)の濃度が 100 nM になるよう 24-well plate 上で混合し、37°C で 20 分間インキュベートすることで、膜電位測定用サンプルとした。

HEPES 緩衝液処理を行う場合、遠心後の細胞を、異なる濃度の KCl および NaCl を含む HEPES 緩衝液（詳細は PI 送達アッセイのセクションに記載の通り）中に懸濁し、37°C で 30 分間インキュベートし、その後、それぞれの緩衝液中で DiBAC₄(3) (100 nM) と共に 37°C で 20 分間、24-well plate 上でインキュベートした。

valinomycin 処理を行う場合、遠心後の細胞を、D-MEM(+)中で valinomycin (10 μM) と共に 37°C で 5 分間インキュベートし、その後、valinomycin 存在下で DiBAC₄(3) (100 nM) と共に 37°C で 20 分間、24-well plate 上でインキュベートした。

TRAM-34 および SKA-31 処理を行う場合、遠心後の細胞を、D-MEM(+)中で TRAM-34 (10 μM) または SKA-31 (10 μM) と共に 37°C で 5 分間インキュベートし、その後、TRAM-34 および SKA-31 存在下で DiBAC₄(3) (100 nM) と共に 37°C で 20 分間、24-well plate 上でインキュベートした。

BAPTA-AM 処理を行う場合、6-well plate 上の細胞を D-MEM(-)中で BAPTA-AM (40 μM) と共に 37°C で 30 分間インキュベートし、プレートから剥離し遠心した後、BAPTA-AM を含まない D-MEM(+)中で、37°C で 20 分間、DiBAC₄(3) (100 nM) と共にインキュベートした。

検量線を作成するために、遠心後の細胞を、gramicidin (2 μg/mL) を含む D-MEM(+)を用いて、37°C で 20 分間処理することにより膜電位を完全に消失させた。その後、gramicidin を含む D-MEM(+)中で、DiBAC₄(3) (0、25、50、100、200 nM) と共に 37°C で 20 分間、24-well plate 上でインキュベートし、これを検量線作成用サンプルとした。

膜電位測定用サンプル、検量線作成用サンプルともに、各サンプルあたり 10,000 個の細胞の蛍光量を、Attune NxT Flow Cytometer (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。膜電位は、フローサイトメータで測定した 10,000 個の細胞の蛍光強度の平均値を各サンプルの細胞内 DiBAC₄(3)濃度の指標として、次のように計算した。DiBAC₄(3)は、アニオン性の膜電位感受性色素であり、細胞膜の脱分極に伴って、細胞質中への分布が増し、その蛍光が増強する。膜電位が gramicidin によって完全に消失した細胞の細胞内 DiBAC₄(3)濃度 D_i は、細胞外 DiBAC₄(3)濃度 D_e と等しいと仮定できる。膜電位 V_p は、37°C での一価アニオン DiBAC₄(3)に対してのネルンスト方を用いて次のように計算できる。

$$V_p = \frac{RT}{zF} \ln \left(\frac{D_e}{D_i} \right)$$

$$V_p = -61 \log_{10} \left(\frac{D_e}{D_i} \right)$$

蛍光強度 FI が細胞内の DiBAC₄(3)濃度と線形の関係にあり、その直線が 0 と交差する場合、上記のネルンスト式は次のようになる。

$$V_p = -61 \log_{10} \left(\frac{FI_{dep}}{FI} \right)$$

ここで、 F_{dep} は膜電位が完全に消失した細胞での蛍光強度である（この時、 $D_e = D_i$ となる）。

カルシウムイメージング

細胞内カルシウム濃度の評価は、膜局在型カルシウム感受性蛍光タンパク質である GCaMP8s-CAAX を細胞に一過性強制発現させ、その蛍光量をイメージングにより定量することで行った。細胞を 35-mm glass-bottom dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、GCaMP8s-CAAX プラスミド (400 ng) をトランスフェクションした。細胞を PBS で洗浄し、HBSS を細胞に添加した。細胞を顕微鏡のステージに取り付けられたマイクロチャンバー (STXG-IX3WX-SET, Tokai Hit) 内に 37°C で静置した。35 mm glass-bottomed dish から HBSS を除去し、直後にタイムラプス撮影を開始した。DIC および GCaMP8s の蛍光画像を 10 秒ごとに計 5 分 30 秒間取得した。イメージング開始から 30 秒後に、L17E (40 μ M) または L9E (40 μ M) を含む HBSS (200 μ L) を dish 上のガラス部分に滴下した。観察は、60 $\times$ 対物レンズ (UPlanSApo, 油浸, NA 1.35, Olympus) を装備した FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。解析は、ImageJ ソフトウェア (バージョン 2.14.0, NIH) を使用して行った。

BAPTA-AM 処理を行う場合、細胞を PBS で洗浄した後、BAPTA-AM (40 μ M) を含む D-MEM(-) 中で、37°C で 30 分間前処理した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、BAPTA-AM を含まない HBSS 中でイメージングを行った。

SKA-31 処理を行う場合、BAPTA-AM 処理後の細胞に SKA-31 (10 μ M) を含む D-MEM(-) を添加し、さら 5 分間前処理した。イメージングは SKA-31 (10 μ M) を含む HBSS 中で行った。

Thapsigargin 処理を行う場合、細胞を PBS で回洗浄した後、thapsigargin (5 μ M) を含む D-MEM(-) を投与し、37°C で 10 分間前処理した。その後、thapsigargin (5 μ M) を含む HBSS 中でイメージングを行った。

EGTA 処理を行う場合、前処理は行わず、イメージング開始後に、EGTA (2.5 mM) を L17E と同時に添加した。

Alexa Fluor 488 標識抗体の送達

ヒト IgG または抗核膜孔複合体抗体 (anti-NPC IgG) を Alexa Fluor 488 5-sulfodichlorophenol (SDP) ester (Invitrogen) と共に 100 mM NaHCO₃ を含む PBS 中で 1 時間反応させることで抗体の Alexa Fluor 488 標識を行った。標識された抗体は、PBS を用いて PD-10 脱塩カラム (GE Healthcare) で精製し、Amicon Ultra-4 遠心フィルター 50K (Merck Millipore) による超濾過で収集および濃縮した。

WT U2OS 細胞または *KCNN4* KO U2OS 細胞を 35-mm glass-bottom dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、L17E (40 μ M) と hIgG-AF488 (1 mg/mL) または anti-NPC IgG-AF488 (0.34 mg/mL) を含む D-MEM(-) を投与し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、Hoechst 33342 (5 μ g/mL) を含む D-MEM(-) を投与し、37°C で 5 分間インキュベートすることで核染色を行った。共焦点顕微鏡による観察および画像解析は、PI 送達アッセイの項に記載の通り実施した。

統計解析

すべてのデータは、特に記載がない限り、3回の独立した生物学的反復（n=3）の平均 ± 標準誤差（SE）として示した。統計解析はすべて JMP Pro 17（SAS Institute）を用いて行った。2群間の比較には、Student の t 検定を使用した。多重比較には、一元配置の分散分析（one-way ANOVA）を行った後、続いて群間の比較を行う場合は Tukey の HSD 検定、コントロール群との比較を行う場合は Dunnett の検定を行った。もしくは、ノンパラメトリックな多重比較法として、Kruskal-Wallis 検定を行った後、Steel-Dwass 検定を行った。計算された P 値が 0.05 よりも小さい場合に有意な差があるとみなした。

第3章の実験

試薬

α -MEM、D-MEM、Doxycycline、Penicillin-Streptomycin は FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation から購入した。ウシ胎児血清 (FBS)、Opti-MEM は Gibco から購入した。Lipofectamine LTX、Lipofectamine RNAiMAX、Hoechst 33342 は Invitrogen から購入した。Puromycin は Sigma-Aldrich から購入した。Alexa Fluor 488 labeled-dextran 10 kDa、Tet-System Approved FBS は Thermo Fisher Scientific から購入した。試薬は必要であればメーカーが推奨する溶媒に溶かし、分注し、 -30°C にて保存した。

ペプチド合成

L17E および L17E(FITC)の合成は第2章の実験項に示す通りである。FITC-R8 は Rink Amide AM resin を用いて、ペプチド自動合成装置 Syro I (Biotage) により自動合成した。FITC-Pen は TGS-RAM resin (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) により合成した。L17ER4-FITC は過去に報告されている通り合成した¹⁵¹。合成後のペプチド樹脂を、TFA/EDT (95:5 (v:v)) 中で室温 ($\sim 23^{\circ}\text{C}$)、3 時間処理することで樹脂からの切り出しと脱保護を行った。精製は、COSMOSIL₅C₁₈AR-II カラム (Nacalai Tesque) を用いた逆相 HPLC により行った。精製したペプチドは凍結乾燥後、MALDI-TOF MS で質量を測定した。ペプチドは DMSO に溶解させ、 -30°C で保存した。第3章で新たに合成した各ペプチドのアミノ酸配列と質量 (実測値 m/z および理論値 $[M+H]^+$) は次の通りである。ただし、配列中の GABA は γ -aminobutyric acid である。

L17ER4(FITC) : IWLTKFLGKHAARKHEAKQQLSKLGRRRRRGK(FITC)-amide

実測値 : 4114.1、理論値 : 4114.6

FITC-R8 : FITC-GABA-RRRRRRRRR-amide

実測値 : 1740.8、理論値 : 1741.3

FITC-Pen : FITC-GABA-RQIKIWFQNRRMKWKK-amide

実測値 : 2718.7、理論値 : 2719.8

細胞培養

HeLa 細胞は 10% (v/v) 非働化 BS を含む α -MEM 培地 (α -MEM(+)) 中で培養した。Tet 誘導性 VPS4a 安定発現 HeLa 細胞は非働化 Tet-System Approved FBS (Thermo Fisher Scientific) と puromycin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を含む α -MEM 培地中で培養した。その他の細胞は 10% (v/v) 非働化 FBS を含む D-MEM 培地 (D-MEM(+)) 中で培養した。全ての細胞は 37°C 、5% CO_2 条件で培養し、80-90%コンフルエントの状態ですぐに継代を行った。実験には、継代数 1-15 の細胞を用いた。実験は、特に指定のない限り、非働化 FBS を含まない D-MEM 培地 (D-MEM(-)) 中で行った。実験中の細胞インキュベーションは、特に指定のない限り、 37°C 、5% CO_2 条件で行った。KCNN4 KO U2OS については、第2章で述べた通りである。本章で用いた細胞株は次の通りである。HeLa (human cervical cancer, ECACC, 93021013)、HT1080 (human fibrosarcoma, JCRB, JCRB9113)、T24 (human bladder cancer, JCRB, JCRB0711)、U2OS (human osteosarcoma, ECACC, 92022711)

プラスミド構築

ANXA1-EGFP：ヒト ANXA1 を、HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーを鋳型として、プライマー ペア 5'-GGACTCGAGATGGCAATGGTATCAGAATTC-3' (forward) と 5'-GGAGGATCCTTGTTCCTCCACAAAGAGCC-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、pEGFP-N1 の XhoI/BamHI サイトに導入した。

ANXA2-EGFP：ヒト ANXA2 を、HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーを鋳型として、プライマー ペア 5'-CAAGCTTCGAATTCATGGGCCGCCAGCTAG-3' (forward) と 5'-ACCGGTGGATCCGAGTCATCTCCACCACAC-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、pEGFP-N1 に NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて導入した。

ANXA5-EGFP：ヒト ANXA2 を、HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーを鋳型として、プライマー ペア 5'-CAAGCTTCGAATTCATGGCACAGGTTCTCA-3' (forward) と 5'-ACCGGTGGATCCGAGTCATCTTCTCCACAG-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、pEGFP-N1 に NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて導入した。

pTRE3G-HA-VPS4a^{WT}：ヒト VPS4a を、HeLa 細胞由来の cDNA ライブラリーを鋳型として、プライマー ペア 5'-ATGACAACGTCAACCCTCCAG-3' (forward) と 5'-CTACTAGTTTAACTCTCTTGCCCCAAAGTCC-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて XLone-Puro eGFP (Addgene #140027) の EGFP 領域と入れ替えた。HA タグ (MYPYDVPDYA) をコードする遺伝子断片 (ATGTATCCTTATGACGTACCTGACTACGCA) を NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて VPS4a の N 末端に導入した。

pTRE3G-HA-VPS4a^{E228Q}：ヒト VPS4a の E228 付近を 2 つのプライマーペア 5'-ATGACAACGTCAACCCTCCAG-3' (forward) と 5'-GGAATCCACCTGATCGATGAAGATG-3' (reverse) 、 5'-CATCTTCATCGATCAGGTGGATTCC-3' (forward) と 5'-CTACTAGTTTAACTCTCTTGCCCCAAAGTCC-3' (reverse) を用いた PCR により増幅し、NEBuilder HiFi DNA Assembly を用いて pTRE3G-HA-VPS4a の VPS4a 領域と入れ替えた。

プラスミドトランスフェクション

プラスミドのトランスフェクションは、Lipofectamine LTX を用いて、メーカー推奨のプロトコルに従って行った。各プラスミドと LTX 試薬、PLUS reagent を Opti-MEM 中で混合し、室温で 5 分静置した。その後、血清を含む培地と混合し、これを細胞に添加した。細胞を 4 時間インキュベーションした後、プラスミドを含むトランスフェクション溶液を除去し、血清を含む培地を細胞に添加した。トランスフェクション後 24 時間培養した細胞を実験に用いた。

siRNA トランスフェクション

siRNA のトランスフェクションは、Lipofectamine RNAiMAX を用いて、メーカー推奨のプロトコルに従って行った。各 siRNA と RNAiMAX 試薬を Opti-MEM 中で混合し、室温で 5 分静置し

た。その後、血清を含む培地と混合し、これを細胞に添加した。細胞を 6 時間インキュベーションした後、siRNA を含むトランスフェクション溶液を除去し、血清を含む培地を細胞に添加した。トランスフェクション後 72 時間培養した細胞を実験に用いた。本研究で用いた siRNA は次の通りである。Control siRNA: ON-TARGETplus Non-targeting Pool (Dharmacon、D-001810-10-05)、ANXA2 siRNA: ON-TARGETplus Human ANXA2 siRNA SMARTPool (Dharmacon、L-010741-00-0005)

リアルタイム定量 PCR

細胞を 35 mm dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を 0.05% trypsin で 5 分間処理して剥離させ、NucleoSpin RNA Plus (Takara Bio) を用いて total RNA を回収した。2 μ g のトータル RNA を PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いて cDNA に逆転写した。リアルタイム定量 PCR は、PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) により行った。熱サイクルは、95°C (3 分)、[95°C (5 秒) と 60°C (30 秒)] を 40 サイクル繰り返す条件で行った。mRNA の発現量の評価は検量線法により行った。全ての実験で *GAPDH* を参照遺伝子として用いた。使用したプライマーは次の通りである。5'-CCTGTTTCGACAGTCAGCCG-3' (*GAPDH* forward) と 5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3' (*GAPDH* reverse)、5'-CATTCCTGACCATCGGCTATGG-3' (*KCNN4* forward) と 5'-GCCTTGTTAAACTCCAGCTTCCG-3' (*KCNN4* reverse)

セルソーターによる HeLa 細胞の分離

HeLa 細胞を 100 mm dish に 1×10^6 cells/dish で播種し、2 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、L17E (40 μ M) と AF488-dex10 (100 μ g/mL) を含む α -MEM(-)を投与し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.05% trypsin で 5 分間処理することで細胞をプレートから剥離させた。その後、 α -MEM(+)を加えて細胞を懸濁し、これをチューブに回収した。細胞を遠心分離 (800 $\times$ g、25°C、5 分) し、得られた細胞ペレットを α -MEM(-)に懸濁した。細胞を FACS Aria II (BD Biosciences) を用いてソーティングした。一回の実験あたり、5 または 6 枚の 100 mm dish から回収した細胞をソーティングに使用した。ソーティングした細胞を遠心分離 (800 $\times$ g、25°C、5 分) し、得られた細胞ペレットを 100 mm dish に播種し、Penicillin-Streptomycin を含む α -MEM(+)培地中で 3 日以上培養した。プロテオミクスサンプルの調製にはソーティング後 3 または 4 日後の細胞を使用した。それ以外の実験にはソーティング後 14 日以内の細胞を使用した。

膜タンパク質画分の濃縮

膜タンパク質画分の回収は Mem-PER Plus Membrane Protein Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて推奨プロトコルに従って行なった。100 mm dish 上でコンフルエントになった細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、氷冷 PBS を 1 mL 加えてセルスクレーパーにより細胞を剥離し、これをチューブに回収した。細胞を遠心分離 (800 $\times$ g、4°C、5 分) し、得られた細胞ペレットを Cell Wash Solution により洗浄した。細胞を遠心分離 (800 $\times$ g、4°C、5 分) し、再度 Cell Wash Solution により

洗浄した。細胞を遠心分離（800×g、4℃、5分）し、Permeabilization Buffer を加えて懸濁し、4℃で10分間転倒混和した。その後細胞を遠心分離（16,000×g、4℃、15分）し、上清をサイトゾル画分として回収した。残ったペレットに Solubilization Buffer を加えて懸濁し、4℃で30分間転倒混和した。その後細胞を遠心分離（16,000×g、4℃、15分）し、上清を膜画分として回収した。タンパク質濃度は BCA protein assay using Pierce BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）によって測定した。

プロテオーム解析

20 µg のタンパク質を冷アセトンによって沈澱、風乾し、8M 尿素を含む 30 mM 重炭酸アンモニウム水溶液に溶解した。ジチオスレイトールとヨードアセトアミドによって還元・アルキル化した後、トリプシンで消化し、得られたペプチドを PierceTM C-18 Spin Column (Thermo Fisher Scientific) を用いて精製した。0.1% ギ酸水溶液に溶解した精製ペプチド 1 µg 相当量をナノ流量液体クロマトグラフ (Nano-LC-Ultra 2D-Plus (Eksigent)) に導入し、トラップカラムで脱塩後、分析カラムで分離した。トラップカラムには 200 µm x 0.5 mm ChromXP C18-CL 3 µm 120 Å (Eksigent)、分析カラムには 75 µm x 15 cm ChromXP C18-CL 3 µm 120 Å (Eksigent) を用いた。分析カラムでの分離には移動相 2 種類 (0.1% ギ酸水溶液および 0.1% ギ酸アセトニトリル溶液) を混和するバイナリグラジエントを用い、カラム温度は 40℃、流速は 300 nL/min に設定した。分析カラムから溶出したペプチドを流路で直接接続された四重極飛行時間型質量分析装置 (TripleTOF 5600+ System (SCIEX)) に連続的に導入し、Nanospray III イオンソース (SCIEX) によって正に荷電させた後、装置内部に導入した。測定は Information-dependent acquisition 法 (SCIEX) によって行い、MS および MS/MS スペクトルを網羅的に取得した。ペプチド同定には ProteinPilot ソフトウェア (バージョン 5.01 (SCIEX)) およびヒト UniProtKB/Swiss-Prot ライブラリ (2024 年 7 月取得) を用いた。サンプル間のプロテオーム構成の比較には、Progenesis QI for Proteomics ソフトウェア (バージョン 4.2 (Nonlinear Dynamics)) を用いた。測定によって得られたデータセットを Progenesis QI for Proteomics のプラットフォームにインポートし、アラインメントと標準化を行った後、個々のペプチドピークに ProteinPilot により得られた同定結果 (信頼度が 95% を超えるもの) をアサインした。個別タンパク質の相対定量値の算出には、Hi-N 法 (N=3) (Nonlinear Dynamics) を用いた。

Tet 誘導性 VPS4a 安定発現 HeLa 細胞の樹立

Tet-On システムにより Dox 依存的に VPS4a (WT または E228Q 変異体) を発現する HeLa 細胞 (HeLa VPS4a^{WT} および HeLa VPS4a^{E228Q} 細胞) を、piggyBac ベクターシステムを用いて樹立した。HeLa 細胞を 6-well plate に 1×10⁵ cells/well で播種し、1 日間培養した。pTRE3G-HA-VPS4a^{WT} または pTRE3G-HA-VPS4a^{E228Q} と Transposase Expression Vector (System Biosciences, PB210PA-1) を 1 well あたり 600 ng : 200 ng の量比でトランスフェクションした。トランスフェクション後、1 日間培養した後、puromycin (1 µg/mL) を培地に添加し、9 日間セレクションを行った。セレクション後は、10% (v/v) 非働化 Tet-System Approved FBS と puromycin (1 µg/mL) を含む α-MEM 培地中で培養した。シングルセルクローンの取得は行わず、ポリクローンの状態で実験に使用した。

Dox による VPS4a 発現誘導

Tet 誘導性 VPS4a (WT または E228Q) 安定発現 HeLa を実験用に播種し、1 日間培養した。実験前に 10% (v/v) 非働化 Tet-System Approved FBS と puromycin (1 µg/mL)、Dox (1 µg/mL) を含む α -MEM 培地中で 8 時間培養することで VPS4a (WT または E228Q) の発現誘導を行なった。その後の実験は puromycin および Dox を含まない培地中で行なった。

PI 送達アッセイ

L17E 存在下で PI が内在化した細胞の割合をフローサイトメトリー解析によって評価した。細胞を 24-well plate に 5×10^4 cells/well で播種し、1 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、L17E (40 µM) と PI (50 µg/mL) を含む α -MEM(-)または D-MEM(-)を投与し、37°C で 5 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、0.05% trypsin で 5 分間処理することで細胞をプレートから剥離させた。その後、D-MEM(+)を加えて細胞を懸濁し、これをチューブに回収した。細胞を遠心分離 (800×g、25°C、5 分) し、得られた細胞ペレットを PBS で洗浄した。この洗浄操作を再度繰り返した後、最終的に細胞を 500 µL の PBS で再懸濁し、Attune NxT flow cytometer (Thermo Fisher Scientific) を使用して、各サンプルあたり 10,000 個の細胞の蛍光量を測定した。

siRNA トランスフェクションを行う場合、細胞を 6-well plate に 2×10^5 cells/well で播種し、1 日間培養した後に、siRNA をトランスフェクションした。48 時間後に 24-well plate に 5×10^4 cells/well で再播種した。その後の実験は、再播種から 24 時間後 (siRNA トランスフェクションから 72 時間後) に、上述の通り行った。

プラスミドトランスフェクションを行う場合、細胞を 24-well plate に 5×10^4 cells/well で播種し、1 日間培養後に、目的のプラスミド (200 ng) をトランスフェクションした。実験は、プラスミドトランスフェクションから 24 時間後に、上述の通り行った。

BAPTA-AM 処理を行う場合、24-well plate 上の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、BAPTA-AM (40 µM) を含む D-MEM(-)を投与し、37°C で 30 分間前処理を行った。その後の実験は、BAPTA-AM を含まない条件で上述の通り行った。

K buffer 処理を行う場合、24-well plate 上の細胞を PBS で 2 回洗浄した後、10%非働化 FBS を含む HEPES buffer (140 mM KCl、5.4 mM NaCl、1 mM MgCl₂、1.8 mM CaCl₂、10 mM D-glucose、20 mM HEPES、pH 7.4) 中でペプチド処理を行った。

デキストラン 10 kDa 送達アッセイ

L17E 存在下で蛍光標識デキストラン 10 kDa が細胞内に移行した様子を、共焦点顕微鏡を用いて観察した。細胞を 35-mm glass-bottom dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、L17E (40 µM) と AF488-dex10 (200 µg/mL) を含む α -MEM(-)または D-MEM(-)を投与し、37°C で 10 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、Hoechst 33342 (5 µg/mL) を含む α -MEM(-)または D-MEM(-)を投与し、37°C で 5 分間インキュベートすることで核染色を行った。観察は、60×対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を装備した

FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。解析は、ImageJ ソフトウェア (バージョン 2.14.0、NIH) を使用して行った。

タイムラプスライブセルイメージングによる EGFP 標識 ANXA の局在観察

HeLa 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 1.5×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した後、プラスミドのトランスフェクションを行った。1 日間培養した後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、培地を α -MEM(-) (150 μ L、dish 中央部分のみ) に置き換えた。細胞を FV3000 顕微鏡ステージに取り付けられたマイクロチャンバー (STXG-IX3WX-SET、Tokai Hit) 内で 37°C に維持した。イメージング開始直前に dish 中央部分の培地を全て除去し、イメージング開始 30 秒後に L17E (40 μ M) と PI (50 μ g/mL) を含む α -MEM(-)培地を添加した。DIC および蛍光画像は、60 倍対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を備えた FV3000 共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM) システム (Olympus) を使用して 5 秒ごとに取得した。

FITC 標識ペプチドのサイトゾル移行の観察と定量

細胞を 35-mm glass-bottom dish に 2×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。FITC 標識ペプチドを含む α -MEM(+)または D-MEM(+)を投与し、37°Cで 30 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、Hoechst 33342 (5 μ g/mL) を含む α -MEM(-)または D-MEM(-)を投与し、37°Cで 5 分間処理することで核染色を行った。細胞を PBS で洗浄後、 α -MEM(-)または D-MEM(-)を添加した。観察は、60×対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を装備した FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。FITC 標識ペプチドのサイトゾル移行量の定量は、ImageJ ソフトウェア (バージョン 2.14.0、NIH) を用い、Hoechst 33342 で染色された領域中の蛍光量を 1 細胞ごとに取得することで行なった。

siRNA トランスフェクション、BAPTA-AM 処理、K buffer 処理は PI 送達アッセイの項に記載の通り行った。

ウェスタンブロット

細胞を 12-well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、1 日間培養した。ANXA2 のウェスタンブロットの場合、細胞を氷冷 PBS を用いて 2 回洗浄した後、protease inhibitor cocktails (Roche) と phosphatase inhibitor cocktails (Roche) を含む 100 μ L の RIPA buffer (150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate 含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)) によって溶解した。細胞ライセートを遠心分離 ($16000 \times g$ 、20 分、4°C) した後、上清を回収した。VPS4a のウェスタンブロットの場合、細胞を 95°Cに加熱した SDS hot lysis buffer (1% SDS、1 mM Na-orthovanadate 含有 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) で溶解し、95°Cで 10 分間加熱した。上清のタンパク質濃度を BCA protein assay using Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) によって測定し、SDS sample buffer (2% SDS、40% glycerol、5% 2-mercaptoethanol、少量の bromophenol blue 含有 60 mM Tris-HCl (pH 6.8)) 中で 0.5 μ g/ μ L になるよう調製した。各サンプル 20 μ L のライセートを 5–20% polyacrylamide グラジエントゲル (SuperSep Ace; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) を用

いて展開した後、Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad) を用いたセミドライ式ブロッティング法により PVDF 膜に転写した。転写された PVDF 膜を 5% BSA (ANXA2 の場合) または 5% スキムミルク (VPS4a の場合) を添加した 0.1% Tween-20 含有 TBS (TBS-T) に浸し、25°C で 1 時間振とうしてブロッッキングを行った。その後、適切な一次抗体を含むブロッッキング溶液に浸し、4°C で終夜振とう反応させた。PVDF 膜を TBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、適切な二次抗体を含むブロッッキング溶液に浸し、25°C で 1 時間振とう反応させた。PVDF 膜を TBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、ECL Prim (GE Healthcare) で 5 分間処理し、Amersham ImageQuant 800 (Cytiva) により化学発光を検出した。使用した抗体は次の通りである。anti-ANXA2 (rabbit monoclonal IgG、Cell Signaling Technology、8235、1:1,000)、anti-HA (mouse monoclonal IgG、Sigma-Aldrich、H9658、1:10,000)、anti- β -actin (mouse monoclonal、Sigma-Aldrich、A2228、1:10,000)、anti-rabbit IgG (HRP) (goat polyclonal、Cell Signaling Technology、7074、1:2,000)、anti-mouse IgG HRP (goat polyclonal、GeneTex、GTX213111-01、1:5,000)

免疫染色

細胞を 35-mm glass-bottomed dish 上に 1×10^5 cells/dish で播種し、1 日間培養した。Dox 処理後、PBS で 2 回洗浄した後、4% PFA (Nacalai Tesque) を用いて 25°C で 15 分間固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、0.1% Triton X-100 を含む PBS を用いて 25°C で 15 分間膜透過処理を行った。再度、PBS で 2 回洗浄し、5% BSA を含む 0.1% Tween-20 含有 PBS (PBS-T) を用いて 25°C で 30 分間ブロッッキングを行った。その後、細胞を anti-HA antibody を含む 1% BSA 含有 PBS-T 中で、25°C で 1 時間インキュベーションした。細胞を PBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、AF488 標識 anti-mouse IgG antibody を含む 5% BSA 含有 PBS-T 中で、25°C で 1 時間インキュベーションした。細胞を PBS-T で 10 分間、3 回振とう洗浄した後、Hoechst 33342 (5 μ g/mL) を含む PBS を添加し、25°C で 10 分間細胞核を染色した。観察は、60 $\times$ 対物レンズ (UPlanSApo、油浸、NA 1.35、Olympus) を装備した FV3000 CLSM システム (Olympus) を使用して行った。解析は、ImageJ ソフトウェア (バージョン 2.14.0、NIH) を使用して行った。使用した抗体は次の通りである。anti-HA (mouse monoclonal IgG、Sigma-Aldrich、H9658、1:1,000)、anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 (goat polyclonal、Invitrogen、A11001、1:2,000)

細胞生存試験

WST-8 アッセイを Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) を用いてメーカー推奨のプロトコルに従って行った。細胞を 96-well plate に 1.5×10^4 cells/well で播種し、1 日間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、ペプチドを含む α -MEM(+) で 37°C で 30 分間処理した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、各ウェルに 100 μ L の α -MEM(-) と 10 μ L の CCK-8 溶液を加えた。細胞を 37°C で 2 時間培養した後、吸光度 ($A_{450 \text{ nm}} - A_{600 \text{ nm}}$) を測定した。結果は 1 回の実験から得られた 3 連の平均 $\pm$ 標準偏差 (SD) として示した。

統計解析

すべてのデータは、特に記載がない限り、3回の独立した生物学的反復（n=3）の平均 ± 標準誤差（SE）として示した。統計解析はすべて JMP Pro 17（SAS Institute）を用いて行った。2群間の比較には、Student の t 検定を使用した。多重比較には、一元配置の分散分析（one-way ANOVA）を行った後、続いて群間の比較を行う場合は Tukey の HSD 検定、コントロール群との比較を行う場合は Dunnett の検定を行った。ノンパラメトリックな2群の比較には Wilcoxon の順位和検定を用いた。ノンパラメトリックな多重比較法としては、Kruskal-Wallis 検定を行った後、Steel-Dwass 検定を行った。計算された P 値が 0.05 よりも小さい場合に有意な差があるとみなした。

発表論文

第 1 章

1. Piezo1 activation using Yoda1 inhibits macropinocytosis in A431 human epidermoid carcinoma cells.
Masashi Kuriyama, Hisaaki Hirose, Toshihiro Masuda, Masachika Shudou, Jan Vincent V. Arafiles, Miki Imanishi, Masashi Maekawa, Yuji Hara, Shiroh Futaki
Scientific Reports (2022) 12(1), 6322. doi: 10.1038/s41598-022-10153-8

第 2 章

2. *KCNN4* as a genomic determinant of cytosolic delivery by the attenuated cationic lytic peptide L17E.
Masashi Kuriyama, Hisaaki Hirose, Yoshimasa Kawaguchi, Junya Michibata, Masashi Maekawa, Shiroh Futaki
Molecular Therapy (2025) 33(2), 595–614. doi: 10.1016/j.ymthe.2024.12.050

第 3 章

未発表（投稿予定）

その他

3. Discovery of a macropinocytosis-inducing peptide potentiated by medium-mediated intramolecular disulfide formation.
Jan Vincent V. Arafiles, Hisaaki Hirose, Yusuke Hirai, Masashi Kuriyama, Maxwell Mamfe Sakyiamah, Wataru Nomura, Kazuhiro Sonomura, Miki Imanishi, Akira Otaka, Hirokazu Tamamura, Shiroh Futaki
Angewandte Chemie International Edition (2021) 60(21), 11928–11936. doi: 10.1002/anie.202016754
4. A noncanonical endocytic pathway is involved in the internalization of 3 μ m polystyrene beads into HeLa cells.
Hisaaki Hirose, Masashi Maekawa, Hiroki Ida, Masashi Kuriyama, Yasufumi Takahashi, Shiroh Futaki
Biomaterials science (2022) 10(24), 7093–7102. doi: 10.1039/d2bm01353c
5. ATP2B4 is an essential gene for epidermal growth factor-induced macropinocytosis in A431 cells.
Shunsuke Yoshie, Masashi Kuriyama, Masashi Maekawa, Wei Xu, Takuro Niidome, Shiroh Futaki, Hisaaki Hirose
Genes to Cells (2024) 29(6), 512–520. doi: 10.1111/gtc.13118

参考文献

1. Leader, B., Baca, Q.J., and Golan, D.E. (2008). Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 21-39. doi: 10.1038/nrd2399.
2. Ebrahimi, S.B., and Samanta, D. (2023). Engineering protein-based therapeutics through structural and chemical design. *Nat. Commun.* 14, 2411. doi: 10.1038/s41467-023-38039-x. ¹
3. Shepard, H.M., Phillips, G.L., C, D.T., and Feldmann, M. (2017). Developments in therapy with monoclonal antibodies and related proteins. *Clin. Med. (Lond.)* 17, 220-232. doi: 10.7861/clinmedicine.17-3-220.
4. Lagasse, H.A., Alexaki, A., Simhadri, V.L., Katagiri, N.H., Jankowski, W., Sauna, Z.E., and Kimchi-Sarfaty, C. (2017). Recent advances in (therapeutic protein) drug development. *F1000Res.* 6, 113. doi: 10.12688/f1000research.9970.1.
5. Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A.P., Donadi, R.S., Bologa, C.G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T.I., and Overington, J.P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 16, 19-34. doi: 10.1038/nrd.2016.230.
6. Xie, X., Yu, T., Li, X., Zhang, N., Foster, L.J., Peng, C., Huang, W., and He, G. (2023). Recent advances in targeting the "undruggable" proteins: from drug discovery to clinical trials. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, 335. doi: 10.1038/s41392-023-01589-z.
7. Chou, L.Y., Ming, K., and Chan, W.C. (2011). Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles. *Chem. Soc. Rev.* 40, 233-245. doi: 10.1039/c0cs00003e.
8. Fu, A., Tang, R., Hardie, J., Farkas, M.E., and Rotello, V.M. (2014). Promises and pitfalls of intracellular delivery of proteins. *Bioconjug. Chem.* 25, 1602-1608. doi: 10.1021/bc500320j.
9. Stewart, M.P., Sharei, A., Ding, X., Sahay, G., Langer, R., and Jensen, K.F. (2016). In vitro and ex vivo strategies for intracellular delivery. *Nature* 538, 183-192. doi: 10.1038/nature19764.
10. Goswami, R., Jeon, T., Nagaraj, H., Zhai, S., and Rotello, V.M. (2020). Accessing intracellular targets through nanocarrier-mediated cytosolic protein delivery. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 743-754. doi: 10.1016/j.tips.2020.08.005.
11. Chan, A., and Tsourkas, A. (2024). Intracellular protein delivery: approaches, challenges, and clinical applications. *BME Front.* 5, 0035. doi: 10.34133/bmef.0035.
12. Sahay, G., Alakhova, D.Y., and Kabanov, A.V. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *J. Control. Release* 145, 182-195. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.01.036.
13. Varkouhi, A.K., Scholte, M., Storm, G., and Haisma, H.J. (2011). Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* 151, 220-228. doi: 10.1016/j.jconrel.2010.11.004.
14. Smith, S.A., Selby, L.I., Johnston, A.P.R., and Such, G.K. (2019). The endosomal escape of nanoparticles: toward more efficient cellular delivery. *Bioconjug. Chem.* 30, 263-272. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00732.
15. He, W., Xing, X., Wang, X., Wu, D., Wu, W., Guo, J., and Mitragotri, S. (2020). Nanocarrier-mediated cytosolic delivery of biopharmaceuticals. *Adv. Funct. Mater.* 30, 1855-1863. doi: 10.1002/adfm.201910566.
16. Pei, D., and Buyanova, M. (2019). Overcoming endosomal entrapment in drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 30, 273-283. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00778.
17. Futaki, S., Arafles, J.V.V., and Hirose, H. (2020). Peptide-assisted intracellular delivery of biomacromolecules. *Chem. Lett.* 49, 1088-1094. doi: 10.1246/cl.200392.
18. Conner, S.D., and Schmid, S.L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37-44. doi:

- 10.1038/nature01451.
19. Cardarelli, F., Pozzi, D., Bifone, A., Marchini, C., and Caracciolo, G. (2012). Cholesterol-dependent macropinocytosis and endosomal escape control the transfection efficiency of lipoplexes in CHO living cells. *Mol. Pharm.* 9, 334-340. doi: 10.1021/mp200374e.
 20. Costa Verdera, H., Gitz-Francois, J.J., Schiffelers, R.M., and Vader, P. (2017). Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis. *J. Control. Release* 266, 100-108. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.019.
 21. 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. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00221.
 22. Desai, A.S., Hunter, M.R., and Kapustin, A.N. (2019). Using macropinocytosis for intracellular delivery of therapeutic nucleic acids to tumour cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 374, 20180156. doi: 10.1098/rstb.2018.0156.
 23. Arafiles, J.V.V., Hirose, H., Akishiba, M., Tsuji, S., Imanishi, M., and Futaki, S. (2020). Stimulating macropinocytosis for intracellular nucleic acid and protein delivery: a combined strategy with membrane-lytic peptides to facilitate endosomal escape. *Bioconjug. Chem.* 31, 547-553. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00064.
 24. Freund, G., Sibling, A.P., Desplancq, D., Oulad-Abdelghani, M., Vigneron, M., Gannon, J., Van Regenmortel, M.H., and Weiss, E. (2013). Targeting endogenous nuclear antigens by electrotransfer of monoclonal antibodies in living cells. *MAbs* 5, 518-522. doi: 10.4161/mabs.25084.
 25. Clift, D., McEwan, W.A., Labzin, L.I., Konieczny, V., Mogessie, B., James, L.C., and Schuh, M. (2017). A method for the acute and rapid degradation of endogenous proteins. *Cell* 171, 1692-1706 e1618. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.033.
 26. Mix, K.A., Lomax, J.E., and Raines, R.T. (2017). Cytosolic delivery of proteins by bioreversible esterification. *J. Am. Chem. Soc.* 139, 14396-14398. doi: 10.1021/jacs.7b06597.
 27. Vives, E., Brodin, P., and Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J. Biol. Chem.* 272, 16010-16017. doi: 10.1074/jbc.272.25.16010.
 28. Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., and Rothbard, J.B. (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13003-13008. doi: 10.1073/pnas.97.24.13003.
 29. Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y. (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J. Biol. Chem.* 276, 5836-5840. doi: 10.1074/jbc.M007540200.
 30. Joliot, A., and Prochiantz, A. (2008). Homeoproteins as natural Penetratin cargoes with signaling properties. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 608-613. doi: 10.1016/j.addr.2007.09.004.
 31. Akishiba, M., Takeuchi, T., Kawaguchi, Y., Sakamoto, K., Yu, H.H., Nakase, I., Takatani-Nakase, T., Madani, F., Graslund, A., and Futaki, S. (2017). Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat. Chem.* 9, 751-761. doi: 10.1038/nchem.2779.
 32. Erazo-Oliveras, A., Muthukrishnan, N., Baker, R., Wang, T.Y., and Pellois, J.P. (2012). Improving the endosomal escape of cell-penetrating peptides and their cargos: strategies and challenges. *Pharmaceuticals (Basel)* 5, 1177-1209. doi: 10.3390/ph511177.
 33. Au, J.L., Yeung, B.Z., Wientjes, M.G., Lu, Z., and Wientjes, M.G. (2016). Delivery of cancer therapeutics to extracellular and intracellular targets: Determinants, barriers, challenges and

- opportunities. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 97, 280-301. doi: 10.1016/j.addr.2015.12.002.
34. Swanson, J.A., and Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends. Cell Biol.* 5, 424-428. doi: 10.1016/s0962-8924(00)89101-1.
 35. Swanson, J.A. (2008). Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 639-649. doi: 10.1038/nrm2447.
 36. Lim, J.P., and Gleeson, P.A. (2011). Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* 89, 836-843. doi: 10.1038/icb.2011.20.
 37. Ivanov, A.I. (2008). Pharmacological inhibition of endocytic pathways: is it specific enough to be useful? *Methods Mol. Biol.* 440, 15-33. doi: 10.1007/978-1-59745-178-9_2.
 38. Egami, Y., Taguchi, T., Maekawa, M., Arai, H., and Araki, N. (2014). Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation. *Front. Physiol.* 5, 374. doi: 10.3389/fphys.2014.00374.
 39. Sachs, F. (2010). Stretch-activated ion channels: what are they? *Physiology* 25, 50-56. doi: 10.1152/physiol.00042.2009.
 40. Sukharev, S., and Sachs, F. (2012). Molecular force transduction by ion channels: diversity and unifying principles. *J. Cell Sci.* 125, 3075-3083. doi: 10.1242/jcs.092353.
 41. Canton, J., Schlam, D., Breuer, C., Gutschow, M., Glogauer, M., and Grinstein, S. (2016). Calcium-sensing receptors signal constitutive macropinocytosis and facilitate the uptake of NOD2 ligands in macrophages. *Nat. Commun.* 7, 11284. doi: 10.1038/ncomms11284.
 42. Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T.J., Ranade, S., Petrus, M.J., Dubin, A.E., and Patapoutian, A. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330, 55-60. doi: 10.1126/science.1193270.
 43. Syeda, R., Florendo, M.N., Cox, C.D., Kefauver, J.M., Santos, J.S., Martinac, B., and Patapoutian, A. (2016). Piezo1 channels are inherently mechanosensitive. *Cell Rep.* 17, 1739-1746. doi: 10.1016/j.celrep.2016.10.033.
 44. Syeda, R., Xu, J., Dubin, A.E., Coste, B., Mathur, J., Huynh, T., Matzen, J., Lao, J., Tully, D.C., Engels, I.H., Petrassi, H.M., et al. (2015). Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. *Elife* 4. e07369. doi: 10.7554/eLife.07369.
 45. Cahalan, S.M., Lukacs, V., Ranade, S.S., Chien, S., Bandell, M., and Patapoutian, A. (2015). Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife* 4. e07370. doi: 10.7554/eLife.07370.
 46. Maekawa, M., Terasaka, S., Mochizuki, Y., Kawai, K., Ikeda, Y., Araki, N., Skolnik, E.Y., Taguchi, T., and Arai, H. (2014). Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111, E978-987. doi: 10.1073/pnas.1311029111.
 47. Williamson, C.D., and Donaldson, J.G. (2019). Arf6, JIP3, and dynein shape and mediate macropinocytosis. *Mol. Biol. Cell* 30, 1477-1489. doi: 10.1091/mbc.E19-01-0022.
 48. Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8, 2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143.
 49. Chen, T.W., Wardill, T.J., Sun, Y., Pulver, S.R., Renninger, S.L., Baohan, A., Schreiter, E.R., Kerr, R.A., Orger, M.B., Jayaraman, V., Looger, L.L., et al. (2013). Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* 499, 295-300. doi: 10.1038/nature12354.
 50. Bloomfield, G., and Kay, R.R. (2016). Uses and abuses of macropinocytosis. *J. Cell Sci.* 129, 2697-2705. doi: 10.1242/jcs.176149.
 51. Isogai, T., van der Kammen, R., Leyton-Puig, D., Kedziora, K.M., Jalink, K., and Innocenti, M. (2015).

- Initiation of lamellipodia and ruffles involves cooperation between mDial1 and the Arp2/3 complex. *J. Cell Sci.* 128, 3796-3810. doi: 10.1242/jcs.176768.
52. Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410. doi: 10.1016/0092-8674(92)90164-8.
 53. Koivusalo, M., Welch, C., Hayashi, H., Scott, C.C., Kim, M., Alexander, T., Touret, N., Hahn, K.M., and Grinstein, S. (2010). Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* 188, 547-563. doi: 10.1083/jcb.200908086.
 54. Grimmer, S., van Deurs, B., and Sandvig, K. (2002). Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J. Cell Sci.* 115, 2953-2962. doi: 10.1242/jcs.115.14.2953.
 55. Ridone, P., Pandzic, E., Vassalli, M., Cox, C.D., Macmillan, A., Gottlieb, P.A., and Martinac, B. (2020). Disruption of membrane cholesterol organization impairs the activity of PIEZO1 channel clusters. *J. Gen. Physiol.* 152. e201912515. doi: 10.1085/jgp.201912515.
 56. Maekawa, M., and Fairn, G.D. (2015). Complementary probes reveal that phosphatidylserine is required for the proper transbilayer distribution of cholesterol. *J. Cell Sci.* 128, 1422-1433. doi: 10.1242/jcs.164715.
 57. Wang, S., Chennupati, R., Kaur, H., Iring, A., Wettschureck, N., and Offermanns, S. (2016). Endothelial cation channel PIEZO1 controls blood pressure by mediating flow-induced ATP release. *J. Clin. Invest.* 126, 4527-4536. doi: 10.1172/JCI87343.
 58. Mendoza, S.A., Fang, J., Gutterman, D.D., Wilcox, D.A., Bubolz, A.H., Li, R., Suzuki, M., and Zhang, D.X. (2010). TRPV4-mediated endothelial Ca²⁺ influx and vasodilation in response to shear stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 298, H466-476. doi: 10.1152/ajpheart.00854.2009.
 59. Swanson, J.A., and Yoshida, S. (2019). Macropinosomes as units of signal transduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 374, 20180157. doi: 10.1098/rstb.2018.0157.
 60. Srivastava, S., Li, Z., Lin, L., Liu, G., Ko, K., Coetzee, W.A., and Skolnik, E.Y. (2005). The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin-related protein 6 (MTMR6) is a negative regulator of the Ca²⁺-Activated K⁺ Channel KCa3.1. *Mol. Cell. Biol.* 25, 3630-3638. doi: 10.1128/mcb.25.9.3630-3638.2005.
 61. Bradding, P., and Wulff, H. (2009). The K⁺ channels KCa3.1 and Kv1.3 as novel targets for asthma therapy. *Br. J. Pharmacol.* 157, 1330-1339. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00362.x.
 62. Wulff, H., Miller, M.J., Hansel, W., Grissmer, S., Cahalan, M.D., and Chandy, K.G. (2000). Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 8151-8156. doi: 10.1073/pnas.97.14.8151.
 63. Zoncu, R., Perera, R.M., Sebastian, R., Nakatsu, F., Chen, H., Balla, T., Ayala, G., Toomre, D., and De Camilli, P.V. (2007). Loss of endocytic clathrin-coated pits upon acute depletion of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 3793-3798. doi: 10.1073/pnas.0611733104.
 64. Maekawa, M., and Fairn, G.D. (2014). Molecular probes to visualize the location, organization and dynamics of lipids. *J. Cell Sci.* 127, 4801-4812. doi: 10.1242/jcs.150524.
 65. Sankaranarayanan, A., Raman, G., Busch, C., Schultz, T., Zimin, P.I., Hoyer, J., Kohler, R., and Wulff, H. (2009). Naphtho[1,2-d]thiazol-2-ylamine (SKA-31), a new activator of KCa2 and KCa3.1 potassium channels, potentiates the endothelium-derived hyperpolarizing factor response and lowers blood pressure. *Mol. Pharmacol.* 75, 281-295. doi: 10.1124/mol.108.051425.
 66. Borbiri, I., Badheka, D., and Rohacs, T. (2015). Activation of TRPV1 channels inhibits mechanosensitive Piezo channel activity by depleting membrane phosphoinositides. *Sci. Signal.* 8, ra15.

- doi: 10.1126/scisignal.2005667.
67. Buyan, A., Cox, C.D., Barnoud, J., Li, J., Chan, H.S.M., Martinac, B., Marrink, S.J., and Corry, B. (2020). Piezo1 forms specific, functionally important interactions with phosphoinositides and cholesterol. *Biophys. J.* 119, 1683-1697. doi: 10.1016/j.bpj.2020.07.043.
 68. Cox, C.D., Bae, C., Ziegler, L., Hartley, S., Nikolova-Krstevski, V., Rohde, P.R., Ng, C.A., Sachs, F., Gottlieb, P.A., and Martinac, B. (2016). Removal of the mechanoprotective influence of the cytoskeleton reveals PIEZO1 is gated by bilayer tension. *Nat. Commun.* 7, 10366. doi: 10.1038/ncomms10366.
 69. Loh, J., Chuang, M.C., Lin, S.S., Joseph, J., Su, Y.A., Hsieh, T.L., Chang, Y.C., Liu, A.P., and Liu, Y.W. (2019). An acute decrease in plasma membrane tension induces macropinocytosis via PLD2 activation. *J. Cell Sci.* 132. jcs232579. doi: 10.1242/jcs.232579.
 70. Skokan, T.D., Hobmayer, B., McKinley, K.L., and Vale, R.D. (2024). Mechanical stretch regulates macropinocytosis in *Hydra vulgaris*. *Mol. Biol. Cell* 35, br9. doi: 10.1091/mbc.E22-02-0065.
 71. Zhang, J., Zhou, Y., Huang, T., Wu, F., Liu, L., Kwan, J.S.H., Cheng, A.S.L., Yu, J., To, K.F., and Kang, W. (2018). PIEZO1 functions as a potential oncogene by promoting cell proliferation and migration in gastric carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 57, 1144-1155. doi: 10.1002/mc.22831.
 72. Fu, R., Wang, W., Huo, Y., Li, L., Chen, R., Lin, Z., Tao, Y., Peng, X., Huang, W., and Guo, C. (2024). The mechanosensitive ion channel Piezo1 contributes to podocyte cytoskeleton remodeling and development of proteinuria in lupus nephritis. *Kidney Int.* 106, 625-639. doi: 10.1016/j.kint.2024.06.025.
 73. Yoshie, S., Kuriyama, M., Maekawa, M., Xu, W., Niidome, T., Futaki, S., and Hirose, H. (2024). ATP2B4 is an essential gene for epidermal growth factor-induced macropinocytosis in A431 cells. *Genes Cells* 29, 512-520. doi: 10.1111/gtc.13118.
 74. Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., Rabinowitz, J.D., et al. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* 497, 633-637. doi: 10.1038/nature12138.
 75. Palm, W. (2019). Metabolic functions of macropinocytosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 374, 20180285. doi: 10.1098/rstb.2018.0285.
 76. Stow, J.L., Hung, Y., and Wall, A.A. (2020). Macropinocytosis: insights from immunology and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 65, 131-140. doi: 10.1016/j.ceb.2020.06.005.
 77. Song, S., Zhang, Y., Ding, T., Ji, N., and Zhao, H. (2020). The dual role of macropinocytosis in cancers: Promoting growth and inducing methuosis to participate in anticancer therapies as targets. *Front. Oncol.* 10, 570108. doi: 10.3389/fonc.2020.570108.
 78. Yoshida, S., Pacitto, R., Inoki, K., and Swanson, J. (2018). Macropinocytosis, mTORC1 and cellular growth control. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 1227-1239. doi: 10.1007/s00018-017-2710-y.
 79. Zhang, Y., and Commisso, C. (2019). Macropinocytosis in cancer: a complex signaling network. *Trends Cancer* 5, 332-334. doi: 10.1016/j.trecan.2019.04.002.
 80. Lin, H.P., Singla, B., Ghoshal, P., Faulkner, J.L., Cherian-Shaw, M., O'Connor, P.M., She, J.X., Belin de Chantemele, E.J., and Csanyi, G. (2018). Identification of novel macropinocytosis inhibitors using a rational screen of Food and Drug Administration-approved drugs. *Br. J. Pharmacol.* 175, 3640-3655. doi: 10.1111/bph.14429.
 81. Dai, X.Q., Ramji, A., Liu, Y., Li, Q., Karpinski, E., and Chen, X.Z. (2007). Inhibition of TRPP3 channel by amiloride and analogs. *Mol. Pharmacol.* 72, 1576-1585. doi: 10.1124/mol.107.037150.
 82. Copolovici, D.M., Langel, K., Eriste, E., and Langel, U. (2014). Cell-penetrating peptides: design,

- synthesis, and applications. *ACS Nano* 8, 1972-1994. doi: 10.1021/nm4057269.
83. Guo, Z., Peng, H., Kang, J., and Sun, D. (2016). Cell-penetrating peptides: Possible transduction mechanisms and therapeutic applications. *Biomed. Rep.* 4, 528-534. doi: 10.3892/br.2016.639.
 84. Durymanov, M., and Reineke, J. (2018). Non-viral delivery of nucleic acids: insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers. *Front. Pharmacol.* 9, 971. doi: 10.3389/fphar.2018.00971.
 85. Futaki, S. (2021). Functional peptides that target biomembranes: design and modes of action. *Chem. Pharm. Bull.* 69, 601-607. doi: 10.1248/cpb.c21-00140.
 86. Akinc, A., Querbes, W., De, S., Qin, J., Frank-Kamenetsky, M., Jayaprakash, K.N., Jayaraman, M., Rajeev, K.G., Cantley, W.L., Dorkin, J.R., Butler, J.S., et al. (2010). Targeted delivery of RNAi therapeutics with endogenous and exogenous ligand-based mechanisms. *Mol. Ther.* 18, 1357-1364. doi: 10.1038/mt.2010.85.
 87. Tanaka, G., Nakase, I., Fukuda, Y., Masuda, R., Oishi, S., Shimura, K., Kawaguchi, Y., Takatani-Nakase, T., Langel, U., Graslund, A., Okawa, K., et al. (2012). CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem. Biol.* 19, 1437-1446. doi: 10.1016/j.chembiol.2012.09.011.
 88. Kawaguchi, Y., Takeuchi, T., Kuwata, K., Chiba, J., Hatanaka, Y., Nakase, I., and Futaki, S. (2016). Syndecan-4 is a receptor for clathrin-mediated endocytosis of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Bioconjug. Chem.* 27, 1119-1130. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00082.
 89. Dilliard, S.A., Cheng, Q., and Siegwart, D.J. (2021). On the mechanism of tissue-specific mRNA delivery by selective organ targeting nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 118, e2109256118. doi: 10.1073/pnas.2109256118.
 90. Boehnke, N., Straehla, J.P., Safford, H.C., Kocak, M., Rees, M.G., Ronan, M., Rosenberg, D., Adelmann, C.H., Chivukula, R.R., Nabar, N., Berger, A.G., et al. (2022). Massively parallel pooled screening reveals genomic determinants of nanoparticle delivery. *Science* 377, eabm5551. doi: 10.1126/science.abm5551.
 91. Hong, L., Li, W., Li, Y., and Yin, S. (2023). Nanoparticle-based drug delivery systems targeting cancer cell surfaces. *RSC Adv.* 13, 21365-21382. doi: 10.1039/d3ra02969g.
 92. Akishiba, M., and Futaki, S. (2019). Inducible membrane permeabilization by attenuated lytic peptides: a new concept for accessing cell interiors through ruffled membranes. *Mol. Pharm.* 16, 2540-2548. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00156.
 93. Narcis, J.O., Tapia, O., Tarabal, O., Piedrafita, L., Caldero, J., Berciano, M.T., and Lafarga, M. (2018). Accumulation of poly(A) RNA in nuclear granules enriched in Sam68 in motor neurons from the SMNDelta7 mouse model of SMA. *Sci. Rep.* 8, 9646. doi: 10.1038/s41598-018-27821-3.
 94. Boye, T.L., Maeda, K., Pezeshkian, W., Sonder, S.L., Haeger, S.C., Gerke, V., Simonsen, A.C., and Nylandsted, J. (2017). Annexin A4 and A6 induce membrane curvature and constriction during cell membrane repair. *Nat. Commun.* 8, 1623. doi: 10.1038/s41467-017-01743-6.
 95. Duchardt, F., Fotin - Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R. (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* 8, 848-866. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00572.x.
 96. Hirose, H., Takeuchi, T., Osakada, H., Pujals, S., Katayama, S., Nakase, I., Kobayashi, S., Haraguchi, T., and Futaki, S. (2012). Transient focal membrane deformation induced by arginine-rich peptides leads to their direct penetration into cells. *Mol. Ther.* 20, 984-993. doi: 10.1038/mt.2011.313.
 97. Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., and Futaki, S. (2008). Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and

- plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug. Chem.* 19, 656-664. doi: 10.1021/bc700289w.
98. Brock, D.J., Kondow-McConaghy, H.M., Hager, E.C., and Pellois, J.P. (2019). Endosomal escape and cytosolic penetration of macromolecules mediated by synthetic delivery agents. *Bioconjug. Chem.* 30, 293-304. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00799.
 99. Zhou, J., Shao, Z., Liu, J., Duan, Q., Wang, X., Li, J., and Yang, H. (2020). From endocytosis to nonendocytosis: the emerging era of gene delivery. *ACS Appl. Bio. Mater.* 3, 2686-2701. doi: 10.1021/acsabm.9b01131.
 100. Miaczynska, M., and Stenmark, H. (2008). Mechanisms and functions of endocytosis. *J. Cell Biol.* 180, 7-11. doi: 10.1083/jcb.200711073.
 101. Royle, S.J. (2006). The cellular functions of clathrin. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 1823-1832. doi: 10.1007/s00018-005-5587-0.
 102. Sakamoto, K., Akishiba, M., Iwata, T., Murata, K., Mizuno, S., Kawano, K., Imanishi, M., Sugiyama, F., and Futaki, S. (2020). Optimizing Charge Switching in Membrane Lytic Peptides for Endosomal Release of Biomacromolecules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 59, 19990-19998. doi: 10.1002/anie.202005887.
 103. Sugita, S., Enokida, H., Yoshino, H., Miyamoto, K., Yonemori, M., Sakaguchi, T., Osako, Y., and Nakagawa, M. (2018). HRAS as a potential therapeutic target of salirasib RAS inhibitor in bladder cancer. *Int. J. Oncol.* 53, 725-736. doi: 10.3892/ijo.2018.4435.
 104. Puccini, J., Wei, J., Tong, L., and Bar-Sagi, D. (2023). Cytoskeletal association of ATP citrate lyase controls the mechanodynamics of macropinocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 120, e2213272120. doi: 10.1073/pnas.2213272120.
 105. Barretina, J., Caponigro, G., Stransky, N., Venkatesan, K., Margolin, A.A., Kim, S., Wilson, C.J., Lehar, J., Kryukov, G.V., Sonkin, D., Reddy, A., et al. (2012). The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483, 603-607. doi: 10.1038/nature11003.
 106. Tan, L., He, X., and Shen, G. (2020). Identification of a 15-pseudogene based prognostic signature for predicting survival and antitumor immune response in breast cancer. *Aging (Albany NY)* 13, 14499-14521. doi: 10.18632/aging.103735.
 107. Latchman, D.S. (2002). Urocortin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 34, 907-910. doi: 10.1016/s1357-2725(02)00011-0.
 108. Cahalan, S.M., Lukacs, V., Ranade, S.S., Chien, S., Bandell, M., and Patapoutian, A. (2015). Piezo1 links mechanical forces to red blood cell volume. *Elife* 4, e07370. doi: 10.7554/eLife.07370.
 109. Todesca, L.M., Maskri, S., Brommel, K., Thale, I., Wunsch, B., Koch, O., and Schwab, A. (2021). Targeting KCa3.1 channels in cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* 55, 131-144. doi: 10.33594/000000374.
 110. Urrego, D., Tomczak, A.P., Zahed, F., Stuhmer, W., and Pardo, L.A. (2014). Potassium channels in cell cycle and cell proliferation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 369, 20130094. doi: 10.1098/rstb.2013.0094.
 111. Feske, S., Wulff, H., and Skolnik, E.Y. (2015). Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 291-353. doi: 10.1146/annurev-immunol-032414-112212.
 112. Trofimenko, E., Grasso, G., Heulot, M., Chevalier, N., Deriu, M.A., Dubuis, G., Arribat, Y., Serulla, M., Michel, S., Vantomme, G., Ory, F., et al. (2021). Genetic, cellular, and structural characterization of the membrane potential-dependent cell-penetrating peptide translocation pore. *Elife* 10, e69832. doi: 10.7554/eLife.69832.
 113. Szklarczyk, D., Kirsch, R., Koutrouli, M., Nastou, K., Mehryary, F., Hachilif, R., Gable, A.L., Fang, T., Doncheva, N.T., Pyysalo, S., Bork, P., et al. (2023). The STRING database in 2023: protein-protein

- association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. *Nucleic Acids Res.* 51, D638-D646. doi: 10.1093/nar/gkac1000.
114. Adelman, J.P., Maylie, J., and Sah, P. (2012). Small-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels: form and function. *Annu. Rev. Physiol.* 74, 245-269. doi: 10.1146/annurev-physiol-020911-153336.
 115. Stocker, M. (2004). Ca^{2+} -activated K^+ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 758-770. doi: 10.1038/nrn1516.
 116. Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005). International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 463-472. doi: 10.1124/pr.57.4.9.
 117. Yuan, A., Santi, C.M., Wei, A., Wang, Z.W., Pollak, K., Nonet, M., Kaczmarek, L., Crowder, C.M., and Salkoff, L. (2003). The sodium-activated potassium channel is encoded by a member of the Slo gene family. *Neuron* 37, 765-773. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00096-5.
 118. Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., and Vandenberg, C.A. (2005). International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 509-526. doi: 10.1124/pr.57.4.11.
 119. Matsuzaki, K., Sugishita, K., Fujii, N., and Miyajima, K. (1995). Molecular basis for membrane selectivity of an antimicrobial peptide, magainin 2. *Biochemistry* 34, 3423-3429. doi: 10.1021/bi00010a034.
 120. Wu, M., Maier, E., Benz, R., and Hancock, R.E. (1999). Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 38, 7235-7242. doi: 10.1021/bi9826299.
 121. Gao, X., Hong, S., Liu, Z., Yue, T., Dobnikar, J., and Zhang, X. (2019). Membrane potential drives direct translocation of cell-penetrating peptides. *Nanoscale* 11, 1949-1958. doi: 10.1039/c8nr10447f.
 122. Henriques, S.T., Costa, J., and Castanho, M.A. (2005). Translocation of beta-galactosidase mediated by the cell-penetrating peptide pep-1 into lipid vesicles and human HeLa cells is driven by membrane electrostatic potential. *Biochemistry* 44, 10189-10198. doi: 10.1021/bi0502644.
 123. Rothbard, J.B., Jessop, T.C., Lewis, R.S., Murray, B.A., and Wender, P.A. (2004). Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J. Am. Chem. Soc.* 126, 9506-9507. doi: 10.1021/ja0482536.
 124. Serulla, M., Anees, P., Hallaj, A., Trofimenko, E., Kalia, T., Krishnan, Y., and Widmann, C. (2023). Plasma membrane depolarization reveals endosomal escape incapacity of cell-penetrating peptides. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 184, 116-124. doi: 10.1016/j.ejpb.2023.01.019.
 125. Thurber, A.E., Nelson, M., Frost, C.L., Levin, M., Brackenbury, W.J., and Kaplan, D.L. (2017). IK channel activation increases tumor growth and induces differential behavioral responses in two breast epithelial cell lines. *Oncotarget* 8, 42382-42397. doi: 10.18632/oncotarget.16389.
 126. Tajhya, R.B., Hu, X., Tanner, M.R., Huq, R., Kongchan, N., Neilson, J.R., Rodney, G.G., Horrigan, F.T., Timchenko, L.T., and Beeton, C. (2016). Functional KCa1.1 channels are crucial for regulating the proliferation, migration and differentiation of human primary skeletal myoblasts. *Cell Death Dis.* 7, e2426. doi: 10.1038/cddis.2016.324.
 127. Klapperstuck, T., Glanz, D., Klapperstuck, M., and Wohlrab, J. (2009). Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. *Cytometry A* 75, 593-608. doi: 10.1002/cyto.a.20735.
 128. Andreoli, T.E., Tieffenberg, M., and Tosteson, D.C. (1967). The effect of valinomycin on the ionic

- permeability of thin lipid membranes. *J. Gen. Physiol.* 50, 2527-2545. doi: 10.1085/jgp.50.11.2527.
129. Joiner, W.J., Wang, L.Y., Tang, M.D., and Kaczmarek, L.K. (1997). hSK4, a member of a novel subfamily of calcium-activated potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11013-11018. doi: 10.1073/pnas.94.20.11013.
 130. Wulff, H., and Castle, N.A. (2010). Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends. *Expert. Rev. Clin. Pharmacol.* 3, 385-396. doi: 10.1586/ecp.10.11.
 131. Fanger, C.M., Ghanshani, S., Logsdon, N.J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K.G., Cahalan, M.D., and Aiyar, J. (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCa channel, IKCa1. *J. Biol. Chem.* 274, 5746-5754. doi: 10.1074/jbc.274.9.5746.
 132. Lee, C.H., and MacKinnon, R. (2018). Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science* 360, 508-513. doi: 10.1126/science.aas9466.
 133. Hancock, J.F., Paterson, H., and Marshall, C.J. (1990). A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63, 133-139. doi: 10.1016/0092-8674(90)90294-o.
 134. Zhang, Y., Rozsa, M., Liang, Y., Bushey, D., Wei, Z., Zheng, J., Reep, D., Broussard, G.J., Tsang, A., Tsegaye, G., Narayan, S., et al. (2023). Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *Nature* 615, 884-891. doi: 10.1038/s41586-023-05828-9.
 135. Tsien, R.Y. (1981). A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. *Nature* 290, 527-528. doi: 10.1038/290527a0.
 136. Thastrup, O., Cullen, P.J., Drobak, B.K., Hanley, M.R., and Dawson, A.P. (1990). Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2466-2470. doi: 10.1073/pnas.87.7.2466.
 137. Palm-Apergi, C., Lorents, A., Padari, K., and Pooga, M. (2008). The membrane repair response masks membrane disturbances caused by cell-penetrating peptide uptake. *FASEB J.* 23, 214-223. doi: 10.1096/fj.08-110254.
 138. Arsov, Z., Nemec, M., Schara, M., Johansson, H., Langel, Ü., and Zorko, M. (2008). Cholesterol prevents interaction of the cell-penetrating peptide transportan with model lipid membranes. *J. Pept. Sci.* 14, 1303-1308. doi: 10.1002/psc.1062.
 139. Bechtella, L., Chalouhi, E., Milan Rodriguez, P., Cosset, M., Ravault, D., Illien, F., Sagan, S., Carlier, L., Lequin, O., Fuchs, P.F.J., Sachon, E., et al. (2022). Structural bases for the involvement of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in the internalization of the cell-penetrating peptide penetratin. *ACS Chem. Biol.* 17, 1427-1439. doi: 10.1021/acscchembio.1c00974.
 140. Wu, W., Wang, Y., Deng, X.L., Sun, H. Y., and Li, G. R. (2013). Cholesterol down-regulates BK channels stably expressed in HEK 293 cells. *PLoS ONE* 8. e79952. doi: 10.1371/journal.pone.0079952.
 141. Lennon, N.J., Kho, A., Bacskai, B.J., Perlmutter, S.L., Hyman, B.T., and Brown, R.H., Jr. (2003). Dysferlin interacts with annexins A1 and A2 and mediates sarcolemmal wound-healing. *J. Biol. Chem.* 278, 50466-50473. doi: 10.1074/jbc.M307247200.
 142. Koerdt, S.N., and Gerke, V. (2017). Annexin A2 is involved in Ca^{2+} -dependent plasma membrane repair in primary human endothelial cells. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 1864, 1046-1053. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.12.007.
 143. Bittel, D.C., Chandra, G., Tirunagri, L.M.S., Deora, A.B., Medikayala, S., Scheffer, L., Defour, A., and Jaiswal, J.K. (2020). Annexin A2 mediates Dysferlin accumulation and muscle cell membrane repair. *Cells* 9. 1919. doi: 10.3390/cells9091919.

144. Gerke, V., Creutz, C.E., and Moss, S.E. (2005). Annexins: linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6, 449-461. doi: 10.1038/nrm1661.
145. Jaiswal, J.K., Lauritzen, S.P., Scheffer, L., Sakaguchi, M., Bunkenborg, J., Simon, S.M., Kallunki, T., Jaattela, M., and Nylandsted, J. (2014). S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells. *Nat. Commun.* 5, 3795. doi: 10.1038/ncomms4795.
146. McNeil, A.K., Rescher, U., Gerke, V., and McNeil, P.L. (2006). Requirement for annexin A1 in plasma membrane repair. *J. Biol. Chem.* 281, 35202-35207. doi: 10.1074/jbc.M606406200.
147. Bouter, A., Gounou, C., Berat, R., Tan, S., Gallois, B., Granier, T., d'Estaintot, B.L., Poschl, E., Brachvogel, B., and Brisson, A.R. (2011). Annexin-A5 assembled into two-dimensional arrays promotes cell membrane repair. *Nat. Commun.* 2, 270. doi: 10.1038/ncomms1270.
148. Demonbreun, A.R., Quattrocchi, M., Barefield, D.Y., Allen, M.V., Swanson, K.E., and McNally, E.M. (2016). An actin-dependent annexin complex mediates plasma membrane repair in muscle. *J. Cell Biol.* 213, 705-718. doi: 10.1083/jcb.201512022.
149. Andrews, N.W., Almeida, P.E., and Corrotte, M. (2014). Damage control: cellular mechanisms of plasma membrane repair. *Trends Cell Biol.* 24, 734-742. doi: 10.1016/j.tcb.2014.07.008.
150. Lorents, A., Kodavali, P.K., Oskolkov, N., Langel, U., Hallbrink, M., and Pooga, M. (2012). Cell-penetrating peptides split into two groups based on modulation of intracellular calcium concentration. *J. Biol. Chem.* 287, 16880-16889. doi: 10.1074/jbc.M111.318063.
151. Shinga, K., Iwata, T., Murata, K., Daitoku, Y., Michibata, J., Arafiles, J.V.V., Sakamoto, K., Akishiba, M., Takatani-Nakase, T., Mizuno, S., Sugiyama, F., et al. (2022). L17ER4: A cell-permeable attenuated cationic amphiphilic lytic peptide. *Bioorg. Med. Chem.* 61, 116728. doi: 10.1016/j.bmc.2022.116728.
152. Jimenez, A.J., Maiuri, P., Lafaurie-Janvore, J., Divoux, S., Piel, M., and Perez, F. (2014). ESCRT machinery is required for plasma membrane repair. *Science* 343, 1247136. doi: 10.1126/science.1247136.
153. Scheffer, L.L., Sreetama, S.C., Sharma, N., Medikayala, S., Brown, K.J., Defour, A., and Jaiswal, J.K. (2014). Mechanism of Ca^{2+} -triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nat. Commun.* 5, 5646. doi: 10.1038/ncomms6646.
154. Serulla, M., Ichim, G., Stojceski, F., Grasso, G., Afonin, S., Heulot, M., Schober, T., Roth, R., Godefroy, C., Milhiet, P.E., Das, K., et al. (2020). TAT-RasGAP(317-326) kills cells by targeting inner-leaflet-enriched phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 117, 31871-31881. doi: 10.1073/pnas.2014108117.
155. Bishop, N., and Woodman, P. (2000). ATPase-defective mammalian VPS4 localizes to aberrant endosomes and impairs cholesterol trafficking. *Mol. Biol. Cell* 11, 227-239. doi: 10.1091/mbc.11.1.227.
156. Ritter, A.T., Shtengel, G., Xu, C.S., Weigel, A., Hoffman, D.P., Freeman, M., Iyer, N., Alivodej, N., Ackerman, D., Voskoboinik, I., Trapani, J., et al. (2022). ESCRT-mediated membrane repair protects tumor-derived cells against T cell attack. *Science* 376, 377-382. doi: 10.1126/science.abl3855.
157. Adell, M.A., and Teis, D. (2011). Assembly and disassembly of the ESCRT-III membrane scission complex. *FEBS Lett.* 585, 3191-3196. doi: 10.1016/j.febslet.2011.09.001.
158. Caillat, C., Maity, S., Miguët, N., Roos, W.H., and Weissenhorn, W. (2019). The role of VPS4 in ESCRT-III polymer remodeling. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 441-448. doi: 10.1042/BST20180026.
159. Raiborg, C., and Stenmark, H. (2009). The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452. doi: 10.1038/nature07961.
160. Vietri, M., Radulovic, M., and Stenmark, H. (2020). The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 25-42. doi: 10.1038/s41580-019-0177-4.
161. Gong, Y.N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J.U., Yang, M., Fitzgerald, P., Linkermann, A., and Green, D.R. (2019). ESCRT-III mediates the repair of plasma membrane damage in cells. *Nat. Commun.* 10, 1111. doi: 10.1038/s41467-019-0811-1.

- D.R. (2017). ESCRT-III acts downstream of MLKL to regulate necroptotic cell death and its consequences. *Cell* 169, 286-300 e216. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.020.
162. Ruhl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J.C., and Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science* 362, 956-960. doi: 10.1126/science.aar7607.
 163. Heitmann, A.S.B., Zanjani, A.A.H., Klenow, M.B., Mularski, A., Sonder, S.L., Lund, F.W., Boye, T.L., Dias, C., Bendix, P.M., Simonsen, A.C., Khandelia, H., et al. (2021). Phenothiazines alter plasma membrane properties and sensitize cancer cells to injury by inhibiting annexin-mediated repair. *J. Biol. Chem.* 297, 101012. doi: 10.1016/j.jbc.2021.101012.
 164. Rety, S., Sopkova, J., Renouard, M., Osterloh, D., Gerke, V., Tabaries, S., Russo-Marie, F., and Lewit-Bentley, A. (1999). The crystal structure of a complex of p11 with the annexin II N-terminal peptide. *Nat. Struct. Biol.* 6, 89-95. doi: 10.1038/4965.
 165. Williams, J.K., Ngo, J.M., Murugupandiyar, A., Croall, D.E., Hartzell, H.C., and Schekman, R. (2024). Calpains orchestrate secretion of Annexin-containing microvesicles during membrane repair. *bioRxiv*. doi: 10.1101/2024.09.05.611512.
 166. Seaton, B.A., and Dedman, J.R. (1998). Annexins. *Biometals* 11, 399-404. doi: 10.1023/a:1009205925714.
 167. Gerke, V., Gavins, F.N.E., Geisow, M., Grewal, T., Jaiswal, J.K., Nylandsted, J., and Rescher, U. (2024). Annexins-a family of proteins with distinctive tastes for cell signaling and membrane dynamics. *Nat. Commun.* 15, 1574. doi: 10.1038/s41467-024-45954-0.
 168. Potez, S., Luginbuhl, M., Monastyrskaya, K., Hostettler, A., Draeger, A., and Babiychuk, E.B. (2011). Tailored protection against plasmalemmal injury by annexins with different Ca²⁺ sensitivities. *J. Biol. Chem.* 286, 17982-17991. doi: 10.1074/jbc.M110.187625.
 169. Lauritzen, S.P., Boye, T.L., and Nylandsted, J. (2015). Annexins are instrumental for efficient plasma membrane repair in cancer cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 45, 32-38. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.028.
 170. Yim, W.W., Yamamoto, H., and Mizushima, N. (2022). Annexins A1 and A2 are recruited to larger lysosomal injuries independently of ESCRTs to promote repair. *FEBS Lett.* 596, 991-1003. doi: 10.1002/1873-3468.14329.
 171. Scharf, B., Clement, C.C., Wu, X.X., Morozova, K., Zanolini, D., Follenzi, A., Larocca, J.N., Levon, K., Sutterwala, F.S., Rand, J., Cobelli, N., et al. (2012). Annexin A2 binds to endosomes following organelle destabilization by particulate wear debris. *Nat. Commun.* 3, 755. doi: 10.1038/ncomms1754.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、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。

研究生生活において、直接ご指導を賜りました、京都大学化学研究所 広瀬 久昭 特定准教授に深く感謝いたします。また、多くの示唆に富むご意見を頂きました、京都大学化学研究所 今西 未来 准教授、川口 祥正 助教、京都大学大学院薬学研究科 河野 健一 助教に心より感謝申し上げます。さらに、研究に関して活発な議論を交わし、貴重なご助言を賜りました、静岡県立大学薬学部 原 雄二 教授、慶應義塾大学薬学部 前川 大志 専任講師に深く感謝申し上げます。

第1章での電子顕微鏡観察を行っていただきました、愛媛大学 首藤 政親 先生に深く感謝申し上げます。

第2章の研究を進めるにあたり、イオンチャネルおよび膜電位に関してご教示いただきました、生理学研究所 久保 義弘 教授、立山 充博 准教授、下村 拓史 助教に心より感謝申し上げます。

第2章での膜電位測定に関して貴重なご助言を頂きました、ローザンヌ大学 Christian Widmann 博士、Evgeniya Trofimenko 博士に心より感謝申し上げます。

第3章での質量分析を実施していただきました、京都大学大学院医学研究科 伊藤 慎二 特定講師、佐藤 淳子 博士に深く感謝申し上げます。

第3章でのセルソーターの使用に関してご協力いただきました、京都大学化学研究所 上杉 志成 教授、安保 真裕 助教、Asmaa Farrag 氏に深く感謝いたします。

研究のみならず、日々の研究室生活のあらゆる面を支えていただきました、益田 俊博 博士、Jan Vincent V. Arafles 博士、同期の音成 兼光 氏、道端 惇也 氏をはじめとする京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域の卒業生ならびに在学生の皆様に心より感謝申し上げます。

本研究は、京都大学大学院教育支援機構プログラムおよび日本学術振興会 DC2 の支援を受けて実施されました。この場を借りて、深く感謝申し上げます。

最後に、研究活動と日々の生活において、常に温かく見守り、励まし、支えていただいた、家族、親族、友人の皆様に心より深く感謝申し上げます。