

氏 名	すずき ともき 鈴木 智 樹
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 522 号
学位授与の日付	平成 15 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	塩基性ペプチドの細胞内キャリア分子としての応用とその膜透過メカニ ズムに関する研究

論文調査委員	(主 査) 教 授 杉 浦 幸 雄	教 授 半 田 哲 郎	教 授 市 川 厚
--------	----------------------	-------------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

序 一般にペプチドは親水性が高く、単独では脂質二重層からなる細胞膜を通過することは困難であるが、一部の塩基性ペプチド、非常に疎水性の高いペプチド、あるいは両親媒性のペプチドの中には、細胞膜を通過することが可能なものがあることが以前より報告されていた。中でも HIV-1 Tat タンパク質由来のペプチド HIV-1 Tat (48-60), *Drosophila Antennapedia homeodomain* 由来のペプチド Antp (43-58) は、キャリアペプチドとしての利用例が非常に多く、他の膜透過ペプチドと比較してより優れた膜透過能、キャリア能を有しているものと思われる。そこで本研究では、これらのペプチドのうち、より大きな分子を細胞内に導入するポテンシャルを有することが報告されている HIV-1 Tat タンパク質由来のペプチド Tat (48-60) を基にし、同様の機能を有する新たな膜透過性ペプチドの探索を行うとともに、その膜透過のメカニズムを解明し、より高いキャリア分子としての機能をもつペプチドのデザインを最終目的とした研究を行った。

第1章 アルギニンに富む様々なペプチドの細胞膜透過 Tat (48-60) ペプチドの膜透過能の特異性を検討するため、蛍光標識した、配列内に変位を導入した類縁ペプチド、あるいは Tat (48-60) ペプチド同様、RNA への結合能を有するペプチドを調製し、それらの細胞内への移行能を、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、ほとんどのペプチドにおいて細胞内への移行が確認された。その効率は配列内のアルギニン残基の数に依存していたことから、アルギニンのみからなり、長さの異なるペプチドを用いて同様の検討を行ったところ、やはり細胞内への移行能には差異が見られ、効率的な膜透過には至適なアルギニン残基数が存在することが示唆された。また、Tat (48-60) ペプチドと同程度の細胞内移行効率を示したいくつかのペプチドにおいて、細胞内へのタンパク質キャリア能について検討したところ、分子量約 29000Da のタンパク質が、これらのペプチドと連結することにより、容易に細胞内へと移行することが明らかとなった。

第2章 アルギニンに富むペプチドの膜透過メカニズムに関する検討 Tat (48-60) ペプチドは、その機能が広く知られており、キャリア分子としての応用例も数多く報告されている。しかしながら、その膜透過メカニズムに関する十分な情報は得られていない。そこで Tat (48-60) ペプチドをはじめとしたアルギニンに富むペプチドの膜透過効率について詳細に検討するため、細胞内に移行したペプチド量を定量することにより、細胞種やペプチドの違いによる細胞内移行能の相違を検討した。また、新たに見出したアルギニンに富む膜透過ペプチドの膜透過経路に関する情報を得るため、エンドサイトーシスとの関連性、ATP 依存性、カベオラを介した細胞内移行経路の関与を検討するとともに、形質膜外層においてアルギニンに富むペプチドと相互作用しうる分子として硫酸化多糖に着目し、その関与について検討を行った。その結果、ペプチドの細胞内移行量には、実験に用いた RAW264.7, HeLa, COS-7 の三種の細胞間において大きな差異は見られなかった。また、エンドサイトーシス阻害、細胞内 ATP 枯渇、カベオラを介した細胞内移行経路の阻害、膜電位の変化によるペプチドの膜透過への影響は見られなかった。しかしながら、ペプチド間において、細胞内移行の競合が見られたことから、何らかの分子がその移行過程に関与しているか、細胞内での局在部位を競合するものと思われた。一方、細胞膜表層にプロテオグリカンの形で存在する硫酸化多糖に関して、中でも高度に硫酸化されていることが知られているヘパラン硫酸を酵素消化

により除去した細胞，あるいは，抗ヘパラン硫酸抗体で処理した細胞，あるいは，ヘパラン硫酸共存下における細胞内へのペプチドの移行効率は減少したことから，アルギニンに富むペプチドの膜透過経路における，硫酸化多糖の関与が示唆された。

総括 従来報告されている Tat (48-60) ペプチドをはじめとする，いくつかのペプチドが有する膜透過能は，それらのペプチドに固有の特殊な機能と考えられていた。しかしながら，少なくとも塩基性アミノ酸に富むペプチドに関しては，アルギニン残基がその膜透過性を左右する重要なファクターであり，配列中にアルギニンを 6～10 残基程度含むペプチドに関しては，遍く膜透過性を有する可能性が示唆された。また，その膜透過メカニズムに関しても，既知の膜透過経路の介在について種々の解析を行った結果，硫酸化多糖の関与を示唆する結果を得た。これらの結果はアルギニンに富む膜透過ペプチドのキャリア分子としての有用性を示すだけでなく，このようなペプチドをもとにした高効率キャリア分子の創製を目指す上で，有益な知見を提供するものである。

論文審査の結果の要旨

細胞内へ外来分子を導入する方法は，これまでいくつかの手法が開発されてきたが，それらには導入効率や細胞毒性などといった問題が常に存在し，十分に満足いく方法であるとは言い難いものであった。導入の際に最大の障壁となるのが細胞膜であり，いかにこの構造を乱すことなく目的分子を細胞内に導入するかということが，最大の懸案であった。一方，細胞膜透過性のペプチドは，1990 年代前半に見出され，それ以降，これらのペプチドが細胞膜を透過するのみならず，また，他の分子を伴って細胞内へ移行するキャリア分子としての機能を有していることが明らかにされてきた。しかし，そのようなペプチドの種類は限られており，中にはそのメカニズムも明らかにされていないものも数多く存在する。本研究では，その中でもこれまでに様々な外来分子の細胞内導入に利用されている，HIV-1 Tat タンパク質由来のペプチド Tat (48-60) を基にし，同様の機能を有する新たな膜透過性ペプチドの探索と，その膜透過メカニズムに関する検討を行い，以下に述べるような価値ある知見を得た。

Tat (48-60) ペプチドの細胞膜透過能が，このペプチドに特有の機能であるかを検討するために，類似したペプチド，さらには Tat (48-60) ペプチドと同様にアルギニン残基に富み，核酸結合性を有するペプチドの膜透過性を検討することにより，アルギニン残基に富むペプチドには，膜透過性が普遍的に存在する可能性を示唆する結果を得た。さらに，新たに見出した膜透過性ペプチドにも Tat (48-60) ペプチド同様に細胞内へのタンパク質デリバリー能が存在することを明らかにした。一方，これら一連の結果と，アルギニンのみからなるペプチドを用いた検討から，膜透過過程においてはアルギニン残基が重要な役割を果たしているということが示唆された。また，これらのペプチドによる細胞毒性も見られなかったこと，全ての細胞内に移行することなどから，極めて高機能な細胞内導入分子としての可能性を有するものと考えられる。

以上の結果により，Tat (48-60) ペプチドをはじめとする，アルギニンに富むペプチドは極めて親水性が高いにも関わらず，容易に膜を透過することが示唆されたが，その膜透過メカニズムに関しては，未だ明らかにされていない。そこで，細胞内へと移行したペプチドの量を定量することにより，ペプチド間・細胞間における膜透過効率の差異の有無についての検討を行った。その結果，本研究において新たに見出された，ペプチドの中にも，Tat (48-60) ペプチドと同程度の膜透過効率を示すものが存在した。また，そのメカニズムに関する具体的な検討を行い，細胞が外来分子を取り込む際のメカニズムとしてよく知られているエンドサイトーシスなどとの関連性に関して詳細な検討を行い，その可能性は低く，未知の，新規なメカニズムにより細胞内へと移行することが考えられた。そこで次に，これらのペプチドは全て非常に正電荷に富んでいることから，膜透過のいずれかの段階において，ペプチドと相互作用しうる負電荷を有する細胞の構成分子が関与する可能性を考えた。そこで本研究においてとりあげたのが，ほとんどすべての哺乳動物細胞の細胞膜表層に存在する硫酸化多糖である。なかでも，強度に硫酸化を受けていることが知られているヘパラン硫酸について，膜透過過程における関与を示唆する結果を得た。また，ヘパラン硫酸に限らず，これらのペプチドは硫酸化を受けた多糖全般と相互作用する可能性を示した。

以上，本研究は，膜透過ペプチドの機能拡張とそのメカニズムの解明に関して，有用な情報を与えるばかりでなく，アルギニンに富むペプチドを基にした，新規高効率細胞内キャリア分子をデザインに向けて有益な知見を提供するものである。

よって、本論文を博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成15年2月27日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。