ミニレビュー

細胞膜透過ペプチド： ポリヒスチジンを利用した動物・植物細胞に対する分子輸送[#]

岩崎 崇*

鳥取大学農学部

(2018年12月29日受理)

Molecular delivery into mammalian and plant cells using new cell-penetrating peptide “PolyHis”

Takashi IWASAKI

Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680–8553, Japan

Keywords: cell-penetrating peptide, histidine, drug delivery, mammalian cells, plant cells.

はじめに

細胞膜透過ペプチド (CPP: Cell-penetrating peptide) は核酸やタンパク質の細胞内輸送キャリアーとして、現在幅広い分野で利用されている。近年、100種を超えるCPPが報告されており、これらはアルギニンやリジンといった塩基性アミノ酸を豊富に含有することが知られている。代表的な例として Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂)¹⁾ HIV-Tat (48-60) (GRKKRRQRRRPPQ-NH₂)²⁾ Octa-arginine (R8) (RRRRRRRR-NH₂)³⁾ などが世界的に有名なCPPとして挙げられる。これらのCPPは生理的条件下で高密度の正電荷を帯び、細胞表面の負電荷を帯びた糖鎖と相互作用することにより、細胞膜を透過することが報告されている。⁴⁻⁶⁾ すなわち、CPPにとって正電荷は重要な原動力であると考えられている。

筆者らは、この細胞膜透過ペプチドを利用して、様々な応

用技術の創生に挑戦している。その一環として、腫瘍組織を標的とした細胞膜透過ペプチドの開発を試みた。本稿で紹介させていただく『細胞膜透過ペプチド：ポリヒスチジン (PolyHis)』は、その過程で発見されたものである。以下に、PolyHisの発見の経緯とPolyHisの分子輸送能、そしてそれを利用した応用技術について具体的に紹介をさせていただく。

1. PolyHisの発見の経緯

当初、筆者らは腫瘍組織を標的とした薬物輸送キャリアーを創生するために、腫瘍組織に選択的なCPPの開発に取り組んでいた。腫瘍組織を標的とする際に、筆者らは腫瘍組織内で特異的に形成される『低pH環境』を標的とした。腫瘍組織内で低pH環境が形成されるメカニズムは次の通りである。まず、腫瘍組織では無秩序な血管・組織形成が行われるため、その内部が低酸素状態 (Hypoxia) にあることが知られている。ゆえに、腫瘍組織の内部では嫌気呼吸が亢進し、酸性代謝産物が蓄積していることがわかっている。そのため、腫瘍組織内部は低pH (弱酸性) 環境にあることが報告されている。^{7,8)} 近年では、この腫瘍組織内部の微小環境である低pH環境を標的とした薬物輸送技術の開発が盛んに進め

[#] 第43回大会シンポジウムを取りまとめた解説。

* 〒680-8553 鳥取県鳥取市湖山町南4-101

E-mail: itaka@tottori-u.ac.jp

© 日本農薬学会

図1. PolyHisの電荷と細胞膜透過. (A) PolyHisの鎖長とpH環境と電荷(Z)の相関図. (B) 生理的pH条件(pH7.4)および低pH条件(pH6.0)におけるPolyHisの細胞膜透過. HepG2細胞(ヒト肝癌細胞)に対するPolyHisの細胞膜透過をフローサイトメーターにより定量解析した.

られている.

そこで筆者らは、この『低pH環境を標的としたCPP』を開発することで、『腫瘍組織に選択的なCPP』を作れるのではないかと考えた. 低pH環境を標的としたCPPを設計するにあたり、筆者らは低pH環境で限定的に機能発現をするCPPの設計を目指した. 前述の通り、CPPの原動力は正電荷であることが広く知られているため、低pH環境で限定的に正電荷を帯びるペプチドを設計することができれば、低

pH選択的なCPPとして機能するのではないかと考えた. そこで、筆者らは低pH選択的なCPPを設計するために、ヒスチジンを利用することにした. ヒスチジンは側鎖にイミダゾール基を有しており、側鎖の解離定数 $pK_a=6.04$ であるため、生理的pH条件下では電荷的に中性である一方で、低pH条件下では正電荷を帯びる性質を有している. ゆえに、ヒスチジンを低pH応答性のトリガーとして利用することで、低pH選択的に正電荷を帯びるペプチド(すなわち、低

表1. PolyHisのアミノ酸配列と電荷. すべてのPolyHisは、N末端をTetramethylrhodamine(TAMRA)標識し、C末端をアミド化修飾した状態で化学合成した. 生理的pH条件(pH7.4)および低pH条件(pH6.0)におけるPolyHisの電荷は、図1Aの計算式を用いて算出した.

PolyHis	Sequence	Net charge	
		pH7.4	pH6.0
H6	TAMRA-HHHHHH-NH ₂	0.23	3.00
H8	TAMRA-HHHHHHHH-NH ₂	0.31	4.00
H10	TAMRA-HHHHHHHHHH-NH ₂	0.38	5.00
H12	TAMRA-HHHHHHHHHHHH-NH ₂	0.46	6.00
H14	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHH-NH ₂	0.54	7.00
H16	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHH-NH ₂	0.61	8.00
H18	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH ₂	0.69	9.00
H20	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH ₂	0.77	10.00
H22	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH ₂	0.84	11.00
H24	TAMRA-HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHH-NH ₂	0.92	12.00

図2. PolyHis(H16) の細胞選択性. (A) *In vitro* 細胞選択性. 比較対象として代表的な CPP である Octa-arginine(R8) を使用して, 以下の哺乳動物細胞株に対する細胞膜透過を定量した. NIH-3T3: マウス繊維芽細胞, U251: ヒト神経膠腫細胞, RAW264: マウスマクロファージ, HepG2: ヒト肝癌細胞, RERF: ヒト扁平上皮肺癌細胞, HT1080: ヒト線維肉腫細胞. (B) *In vivo* 腫瘍ターゲティング能. Dylight750 標識した Octa-arginine(R8) と PolyHis(H16) を担癌マウスの尾静脈から投与した. 矢印は HT1080 細胞由来の腫瘍部位を, 矢頭は腎臓を示す.

pH 選択的な CPP として期待されるペプチド) を開発できると考えた. そこで筆者らは, ヒスチジン残基のみから構成される様々な鎖長のポリヒスチジン (PolyHis) を合成し, pH 環境と電荷と細胞膜透過能の関係性を調べることにした (図 1A, 表 1).

最初に, HepG2 細胞 (ヒト肝癌細胞) を用いて, 生理的 pH 条件 (pH 7.4) と低 pH 条件 (pH 6.0) における PolyHis の細胞膜透過を調べた. その結果, 面白いことに, PolyHis を構成するヒスチジン残基数が増えるにしたがって PolyHis の細胞膜透過能は上昇し, ヒスチジン 16 残基の PolyHis (H16) においてピークに到達することが明らかになった. このときの細胞膜透過効率は, 代表的な CPP である Octa-arginine(R8) をはるかにしのぐものであった. さらに予想外であり, かつ極めて興味深いことに, PolyHis の細胞膜透過は生理的 pH 条件 (pH 7.4) および低 pH 条件 (pH 6.0) において, ほとんど差がないことが分かった (図 1B). PolyHis は生理的 pH 条件 (pH 7.4) ではほとんど正電荷を帯びない一方で, 低 pH 条件 (pH 6.0) においては高い正電荷を帯びるペプチドである. しかし, pH 条件 (正電荷の有無) に関係なく, PolyHis は細胞膜透過を示したことから, PolyHis は正電荷に依存しない CPP であることが明らかになった. すなわち, 低 pH 選択的な CPP を開発するという当初の目的を果たすことはできなかったが, 従来の CPP とは

異なる新しいタイプの CPP として PolyHis を発見するに至った.

2. 動物細胞に対する PolyHis の分子輸送能

前述のように, 筆者らは新しい CPP として PolyHis を発見した. PolyHis は代表的な CPP よりも高い細胞膜透過能を有していることから, 有力な薬物輸送キャリアーとして利用できることが期待された. そこで, PolyHis の動物細胞に対する分子輸送能を明らかにするために, PolyHis のひとつである PolyHis (H16) について, まずは細胞選択性の解明を試みた. 当研究室で保有している様々な哺乳動物細胞株を使用した結果, PolyHis (H16) は RERF-LC-AI 細胞 (ヒト扁平上皮肺癌細胞) や HT1080 細胞 (ヒト線維肉腫細胞) といった細胞株に対して, 特に高い細胞膜透過を示すことがわかった (図 2A). さらに, HT1080 細胞を移植した担癌マウスに PolyHis (H16) を尾静脈注射により投与したところ, 担癌マウス生体内においても PolyHis (H16) は腫瘍部位 (線維肉腫) に集積することが確認された (図 2B). 以上の結果から, PolyHis (H16) は生体内において腫瘍 (線維肉腫) ターゲティング能を示す有力な薬物輸送キャリアーになり得る可能性が示されたと言える.^{9,10)}

さらに, PolyHis の薬物輸送技術への応用を志向して, PolyHis (H16) の分子輸送能の解明を試みた. まず,

PolyHis(H16) のタンパク質輸送能を明らかにするために、RFP (Red fluorescent protein) に PolyHis(H16) を融合した RFP-H16 を遺伝子工学的手法により調製した。この過程において、RFP-H16 は抗 His-tag 抗体を用いた Western blotting により検出が可能であることや、Ni 固定化樹脂を用いたアフィニティー精製により単離できることが確認された。さらに、精製した RFP-H16 を HT1080 細胞に投与したところ、細胞内に移行することが確認された (図3A)。すなわち、PolyHis(H16) をタンパク質に融合することで、簡便な検出・精製・細胞内導入が可能であることを示すことができた。

次に、より高分子であり、また薬物輸送キャリアーとしても利用されているリポソームに着目し、PolyHis(H16) のリポソーム輸送能について評価した。まず、リポソーム表面に PolyHis(H16) を効率的に修飾するために、Stearyl 基を修飾した Stearyl 化 PolyHis(H16) (以下 STR-H16 と呼称する) を合成した。次いで、Fluorescein を内包したリポソーム (Dioleoyl phosphatidylcholine:Cholesterol=10:1 (mol/mol), 粒径約 100 nm) を調製し、このリポソームに対して STR-H16 を処理した。リポソームの脂質二重層の疎水領域に Stearyl 基を導入することで、PolyHis(H16) 修飾リポソーム (以下 H16-Lipo と呼称する) を調製した。H16-Lipo の細胞膜透過を調べたところ、リポソーム表面に導入する STR-H16 の量に比例して、H16-Lipo の細胞膜透過量が増加することが確認された (図3B)。このことから、PolyHis(H16) は粒径

約 100 nm 程度のリポソームであれば、細胞内へ輸送する能力を有していることが確認された。H16-Lipo の細胞内分布を調べてみたところ、H16-Lipo は細胞内でゴルジ体やリソソームに集積することが明らかになった。実際に、我々は H16-Lipo を利用することで細胞内リソソームを標的とした薬物輸送に成功しているが、¹¹⁾ 頁数の関係上、本稿では割愛させていただく。以上の知見から、PolyHis は高い細胞膜透過能と分子輸送能を有した有力な薬物輸送キャリアーであることが示された。

3. 植物細胞に対する PolyHis の分子輸送能

前述の通り、PolyHis は多彩な応用性を秘めている CPP であることが確認された。しかし、これらの研究成果はすべて動物細胞を対象とした研究に由来するものであった。一方で、動物以外の細胞種では、植物細胞もまた物質生産や品種改良といった観点から産業的に利用価値の高い細胞であり、CPP の応用先としては有力な細胞種であると言える。しかし植物細胞は、動物細胞には存在しない細胞壁を有しており、この細胞壁が物理的障壁として CPP の応用を阻んでいる。実際に、アルギニンまたはリジンに富んだ従来の CPP は細胞壁にトラップされてしまうため、植物細胞に対しては有効でないことが報告されている。^{12,13)} この理由としては、負電荷に富んだ細胞壁に対して、正電荷に富んだ従来の CPP が電荷的にトラップされてしまうためであると考えられている。この点において、ポリヒスチジンは正電荷に依存

図3. (A) PolyHis(H16) のタンパク質輸送能. PolyHis(H16) を融合したタンパク質は既存の His-Tag 用アプリケーションが適用可能である。RFP-H16 の細胞膜透過は、RFP-H16 を HT1080 細胞に添加し、3 時間後にフローサイトメーターにより定量解析した。(B) PolyHis(H16) のリポソーム輸送能. Fluorescein 内包 H16-Lipo の細胞膜透過は、H16-Lipo を HT1080 細胞に添加し、3 時間後にフローサイトメーターにより定量解析した。

図4. 植物細胞に対するPolyHisのタンパク質輸送能. タバコBY2細胞に対してPolyHis融合RFPを添加し, 12時間後に細胞壁を除去し, 細胞内の蛍光量を定量した. また, RFP-H20をタバコBY2細胞に処理し, 細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡下で観察した. 赤色蛍光はRFP-H20, 青色蛍光は核(Hoechst染色)を示す.

しない新しいタイプのCPPであることから, 細胞壁を有する植物細胞に対しても有効な細胞膜透過を示す可能性が期待された. そこで我々は, PolyHisの植物細胞に対する細胞膜透過を評価し, 植物細胞に対する応用性について検証した.

まず, タバコBY-2細胞を使用して, PolyHisのタンパク質輸送能を調べた. 様々な鎖長のPolyHis(ヒスチジン8~20残基)を融合したRFPを遺伝子工学的に調製し, タバコBY-2細胞に処理した結果, ヒスチジン20残基(H20)を融合したRFP-H20がもっとも高い細胞膜透過を示した. さらに面白いことに, タバコBY-2細胞にRFP-H20を処理してから12時間後にはRFP-H20は細胞質中に確認されたのに対して, 48時間後にはRFP-H20が核内に移行していることが確認された(図4). この結果は, PolyHis(H20)が植物細胞に対して有効な細胞膜透過ペプチドであることを示すと同時に, PolyHis(H20)を利用することでタンパク質を植物細胞の核内まで輸送できることを示唆するものである. この結果を受け, 我々は, PolyHis(H20)にDNA結合タンパク質を融合することで, PolyHis(H20)を利用した植物細胞に対する遺伝子導入技術の開発に挑戦した.

4. PolyHisを利用した植物遺伝子導入技術の開発

遺伝子導入技術は, 基礎・応用研究を問わず多方面で利用されつつあり, 現代における必須基盤技術である. しかし, 植物を対象とした従来の遺伝子導入技術には, 導入効率が必要しも高くないという『効率の悪さ』に加え, 適用可能な生物種が限定されている『汎用性の低さ』という二つの致命的な課題が存在している. この最大の理由として, 従来の遺伝子導入技術では, アグロバクテリウムによる『植物細胞への感染=植物細胞内への遺伝子導入』を必須のプロセスとしている点が挙げられる. 従来法では, アグロバクテリウムの細胞内で, DNAとタンパク質(VirD2, VirE2)の複合体(これをT-DNA複合体と呼ぶ)を発現させ, アグロバクテリ

ウムを植物細胞に感染させることで, このT-DNA複合体を植物細胞内に導入する手法がとられている. しかし, 植物細胞側の防御反応によりアグロバクテリウムが感染しにくい植物種や, そもそもアグロバクテリウムが感染できない植物種では, 遺伝子の導入効率が悪い, または遺伝子導入自体ができないという問題点が存在する.

そこで筆者らは, 上記の律速段階(アグロバクテリウムによる植物細胞内への遺伝子導入のプロセス)を, 植物細胞に有効な細胞膜透過ペプチドPolyHis(H20)で代替することにより, アグロバクテリウムの感染に頼らずに, 植物細胞内に遺伝子を直接導入する『直接導入法』を考案した(図5). 本手法は, まずT-DNA複合体を構成するVirD2とVirE2の両タンパク質にPolyHis(H20)を融合した状態で発現し, 次い

図5. PolyHis(H20)を利用した植物遺伝子導入法『直接導入法』の概要図. 本手法では, アグロバクテリウム菌体内において, T-DNA複合体を構成するVirD2とVirE2の両タンパク質にPolyHis(H20)を融合した状態で発現させる. 次いで, アグロバクテリウムを菌体破碎することでPolyHis(H20)融合T-DNA複合体を抽出し, 植物細胞に導入する. これにより, アグロバクテリウムの感染を介さずに, T-DNA複合体を植物細胞に直接導入することができる.

でPolyHis(H20)が融合したT-DNA複合体をアグロバクテリウムから抽出し、植物細胞に直接導入するという手法である。この直接導入法では、従来の遺伝子導入技術のボトルネックである『アグロバクテリウムの植物細胞への感染』を必要としないため、従来法と比べて遺伝子導入効率が高く、また幅広い植物種に利用可能な高い汎用性を有していることが期待される。

PolyHis(H20)を利用した直接導入法の有効性を評価するために、VirD2-H20とVirE2-H20を発現する組換えアグロバクテリウムを構築した。この際、遺伝子導入を評価するためのレポーター遺伝子として、Luciferase (Luc) 遺伝子を利用した。この組換えアグロバクテリウムに対してAcetosyringoneを処理することで、菌体内でPolyHis(H20)融合T-DNA複合体(Luc遺伝子含有)の形成を誘導した。その後、菌体を破碎し、菌体破碎液を滅菌フィルター処理することにより、PolyHis(H20)融合T-DNA複合体を含んだ、アグロバクテリウム抽出液を得た。このアグロバクテリウム抽出液をタバコBY-2細胞に処理することで、直接導入法の評価・実証を試みた。

その結果、PolyHis(H20)融合T-DNA複合体をタバコBY-2細胞に処理してから、わずか3時間後には導入遺伝子(Luc遺伝子)の発現が確認され、その後も安定した遺伝子発現が観察された(図6)。アグロバクテリウム感染を利用した従来の遺伝子導入法では、アグロバクテリウム感染から導入遺伝子の発現が確認されるまでに数日(3日以上)を要することが知られている。一方で、筆者らが今回開発した直接導入法において、このような即効性が確認された理由として、直接導入法ではアグロバクテリウムの感染というプロセスを必要とせず、効率的(迅速)な遺伝子導入が実現できたためであると考えられる。¹⁴⁾

上記のように、アグロバクテリウムに頼らない遺伝子組換え法である『直接導入法』について、モデル植物種であるタバコBY-2細胞を使用して実証することができた。しか

し、現在地球上で栽培されている大部分の有用植物種はいわゆる非モデル植物種に分類される。ゆえに、今後はPolyHis(H20)を利用した『直接導入法』が非モデル植物種に有効であるかを評価し、非モデル植物種に有効な育種技術の開発・改良に尽力していく所存である。

ま と め

本研究を通じて、筆者らは新しいCPPとしてPolyHisを発見した。動物細胞に対しては、PolyHis(H16)が高い細胞膜透過を示し、タンパク質やリボソームといった高分子を細胞内へ輸送可能であることや、生体内では腫瘍ターゲティング能を発揮することを明らかにした。一方で、植物細胞のように細胞壁を有する細胞に対しては、より長鎖のPolyHis(H20)がタンパク質輸送に有効であることを明らかにした。さらに、このPolyHis(H20)を利用することで、アグロバクテリウムに頼らずに植物細胞に遺伝子を導入する直接導入法を開発した。

今後は、特に植物細胞を対象とした分子輸送技術の開発に注力していく予定である。具体的には、PolyHisを利用して植物細胞にゲノム編集酵素を輸送することで、遺伝子組換えを介さずにゲノム編集を実現する手法や、花成ホルモンのような生理活性物質を導入することで、植物の生長を制御する技術の開発に挑戦していきたいと考えている。

謝 辞

本研究の一部は、キヤノン財団、アステラス病態代謝研究会、高橋産業経済研究財団、加藤記念バイオサイエンス振興財団、住友電工グループならびに文部科学省(科研費)の支援のもと遂行したものです。この場をお借りして、心より感謝を申し上げます。また、本稿執筆の機会を賜りました農業学会の先生方にも、厚く御礼を申し上げます。

引 用 文 献

- 1) D. Derossi, A. H. Joliot, G. Chassaing and A. Prochiantz: *J. Biol. Chem.* **269**, 10444–10450 (1994).
- 2) E. Vives, P. Brodin and B. Lebleu: *J. Biol. Chem.* **272**, 16010–16017 (1997).
- 3) S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda and Y. Sugiura: *J. Biol. Chem.* **276**, 5836–5840 (2001).
- 4) G. M. Poon and J. Gariepy: *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 788–793 (2007).
- 5) S. Futaki, I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi and A. T. Jones: *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 784–787 (2007).
- 6) K. Melikov and L. V. Chernomordik: *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 2739–2749 (2005).
- 7) J. G. Pan and T. W. Mak: *Sci. STKE* **2007**, e14 (2007).
- 8) I. F. Tannock and D. Rotin: *Cancer Res.* **49**, 4373–4384 (1989).
- 9) T. Iwasaki, Y. Tokuda, A. Kotake, H. Okada, S. Takeda, T. Kawano

図6. 『直接導入法』による導入遺伝子の発現。35Sプロモーター配列とLuc遺伝子を含んだPolyHis(H20)融合T-DNA複合体を調製し、タバコBY-2細胞に処理した。その後、Nano-Glo (Promega社)を基質として使用することで、Luciferaseの発現量を経時的に定量した。

- and Y. Nakayama: *J. Control. Release* **210**, 115–124 (2015).
- 10) 岩崎 崇, 徳田佳久, 小竹彩香, 河野 強 (鳥取大学): 特許第 6202707 号 (2017).
  - 11) T. Hayashi, M. Shinagawa, T. Kawano and T. Iwasaki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **501**, 648–653 (2018).
  - 12) T. Mizuno, M. Miyashita and H. Miyagawa: *J. Pept. Sci.* **15**, 259–263 (2009).
  - 13) M. Chang, J. C. Chou and H. J. Lee: *Plant Cell Physiol.* **46**, 482–488 (2005).
  - 14) 岩崎 崇, 河野 強, 上中弘典, 三浦千裕, 渡辺倫子, 山崎明歳 (鳥取大学): 特願 2017-063568 (2017).

略 歴

岩崎 崇 (いわさき たかし)

生年月日: 1982 年 12 月 1 日

最終学歴: 筑波大学大学院博士後期課程

研究テーマまたは主な職歴: 細胞膜透過ペプチドを利用した薬物・分子輸送技術の開発, ヒスチジンリッチなタンパク質・ペプチドの生理機能の解明. 2007 年 4 月日本学術振興会特別研究員 DC, 2009 年 4 月農業生物資源研究所生体防御研究ユニット・日本学術振興会特別研究員 PD, 2010 年 4 月鳥取大学農学部助教, 2016 年 10 月同准教授

趣味: キャンプ, 登山, 釣り, ガイナーレ鳥取の応援