【解説】

二木史朗

HIV-1 Tat ペプチドなどの膜透過能を有するペプチドを用いた蛋白質の動物細胞への導入法が注目されている⁽¹⁾。cell-penetrating peptides (CPP) あるいは protein transduction domain (PTD) とも総称されるこれらのペプチドと、細胞内に導入したい蛋白質との融合蛋白質あるいは化学的架橋体を、細胞の培養液に単に加えるだけで、目的蛋白質が細胞内に移送される (図1)。この方法により細胞機能が制御できたことを報告する論文数はすでに 100 を超えており、新しい細胞内蛋白質導入法として認知されてきている。

Intracellular Protein Delivery Using Membrane-Permeable Peptides
Shiroh FUTAKI, 京都大学化学研究所

などがあげられる。Tat あるいは Antennapedia 由来ペプチドは、これらの中でも最もよく用いられている。本稿では、このうち①のタイプの HIV-1 Tat ペプチドやオリゴアルギニンを中心に、このようなペプチドを用いる細胞内移送の現状を概観し、その可能性と問題点について述べる。

図 1 ■ 膜透過ペプチドを用いた細胞内移送

表 1 ■ 膜透過性のペプチド

ペプチド	特徴	アミノ酸配列
HIV-1 Tat (48-60) オリゴアルギニン	塩基性	GRKKRRQRRRPPQ R_n ($n=7\sim 11$ 程度)
Antennapedia (43-58) (penetratin)	塩基性/疎水性	RQIKIWFQNRRMKWKK
Transportan	キメラ (galanin/mastoparan)	GWTLNSAGYLLGK- INLKALAALAKKIL
Membrane translocating sequence peptide (MTS)	疎水性	AAVALLPAVLLALLP

膜透過能を有するキャリアペプチドと細胞内導入

蛋白質の導入操作としては、膜透過ペプチドと導入する蛋白質とを架橋剤などを用いて化学的に架橋したものの、あるいは、遺伝子工学的手法により大腸菌などを用いて産生させた融合蛋白質を、細胞培養液に単に加えるだけである。膜透過ペプチドと目的蛋白質が化学的に結合していることが重要であり、一般にこれらを混合するだけでは高い導入効果は得られない。この操作により、うまくいけば数分から数十分ではほぼすべての細胞に導入される。目的蛋白質をコードする遺伝子のトランスフェクションでは、多くの場合、たかだか数十%の細胞に目的蛋白質が発現するに過ぎないので、遺伝子導入に比べて高い効率で細胞内に蛋白質を導入しうる。遺伝子導入の際には、血清存在下ではしばしば導入効率が低下することが多いが、ペプチドベクターを用いる方法では血清は細胞内移行効率にさほど影響しない。また、Tat ペプチドなどを数十 μM 程度の濃度で細胞に加えても顕著な毒性がみられない。

細胞内導入への応用

この方法を用いて、培養細胞へ生理活性蛋白質を導入

表 2 ■ 膜透過ペプチドによる細胞内蛋白質導入と機能調節例

導入蛋白質	効果
p16 ^{INK4a} (Cdk4/6 inhibitor)	細胞周期調節
caspase-3	アポトーシス誘導
Bcl-x _L	アポトーシス阻害
Cre	遺伝子組換え
p53	ガン抑制
Cu, Zn-SOD	抗酸化

Cdk: cyclin-dependent kinase, SOD: superoxide dismutase

することにより、アポトーシスの誘導や細胞周期の調節をはじめとする様々な細胞機能が調節できたことが報告されている (表 2)。また、蛋白質以外にも、小分子薬物やオリゴ核酸、リポソーム、微小磁石、ファージといった種々の物質が細胞内に導入されたことが報告されている (図 1)。in vivo における蛋白質の組織・臓器への移送に対しての適用の可能性を示唆する例として、たとえば、Dowdy らはマウスの腹腔内に Tat ペプチドと β -ガラクトシダーゼの融合蛋白質を投与したところ、肝臓、腎臓、肺、脳などの臓器において、この蛋白質の酵素活性が認められたことを報告している⁽⁸⁾。また、p53 蛋白質などの送達によるガン抑制⁽⁹⁾や、Bcl-2 ファミリーの蛋白質、Bcl-x_L の送達による虚血性脳損傷における神経細胞死の軽減⁽¹⁰⁾なども報告されている。

アルギニンペプチドの細胞内移行機序

このような効率的細胞内移送を可能にする機序にも興味をもたれている。Tat ペプチドの細胞内移行に関する研究の初期の段階では、エンドサイトーシスが抑制される 4℃ においてもほとんど細胞内移行効率が変わらないとされ、エンドサイトーシスを介さない未知の経路で細胞内に移行し、細胞内移行後は核に集積するとされていた。しかし、最近、これらの結果は顕微鏡観察の際のパラホルムアルデヒドなどを用いた固定処理によるアーティファクトであることが指摘された⁽¹¹⁾。蛍光ペプチドや EGFP (高感度緑色蛍光蛋白質) を投与した細胞を固定することなく生きたままの状態を観察すると、エンドソーム様の細胞内粒子が主として観察され、また核への顕著な局在はほとんど見られないことがわかった。また、低温条件下では細胞内への取り込みは大きく減少することがわかってきた。これらの結果から、Tat などのアルギニンペプチドの細胞内移行には、少なくともかなりの割合である種のエンドサイトーシスが関与していると考えられるに至った。アルギニンペプチドの細胞への取り込みには通常みられるクラスリンエンドサイトーシスの阻害剤が効果を示さなかったり、細胞内でトランスフェリンとアルギニンペプチドとの局在が必ずしも一致しなかったことから、これ以外のエンドサイトーシス系の関与が示唆された。これに関して、マクロピノサイトーシスと呼ばれる特殊なエンドサイトーシス (図 2) が主な取り込み経路の一つとして関与することが最近指摘された^(12, 13)。

図2 ■ 膜透過ペプチドの細胞内移行における硫酸糖とマクロピノサイトーシスの寄与

マクロピノサイトーシスは細胞膜周辺のアクチンフィラメントが重合することにより細胞外へ膜が突き出し、細胞外液を細胞内に取り込む機序である⁽¹⁴⁾。通常のエンドサイトーシスが細胞内に細胞膜が陥没する形でエンドソームが形成されるのと対照的であり、また後者のエンドソームの直径がたかだか 100 nm 程度であるのに対して、マクロピノサイトーシスの場合はしばしば 1 μm を越すエンドソーム (マクロピノソーム) が形成されるとされており、直径 200 nm を越す Tat 修飾リボソームやファージが細胞内に取り込まれることを説明するのにも都合がよいと考えられた。実際、アルギニンペプチドや Tat-Cre の融合蛋白質の細胞取り込みはアミロリドと呼ばれるマクロピノサイトーシス阻害剤で効果的に阻害された。また、アクチン重合を阻害するサイトカラシン D によっても阻止されることが示されている。

ヘパラン硫酸などの細胞表層の硫酸化された糖鎖が Tat やアルギニンペプチドの取り込みに重要な役割を果たすことも示唆されている^(15, 16)。すなわち、負電荷を帯びた硫酸化糖との静電的相互作用により、アルギニンなどの正電荷を帯びたペプチドが細胞表層に濃縮され、ついで細胞内に取り込まれることが考えられる。実際、ヘパラン硫酸などを欠損する細胞へのアルギニンペプチドの取り込みは、これらを有する細胞への取り込みに比べて有意に少ない。

以上のように、Tat などのアルギニンペプチドの細胞内移行にはある種のエンドサイトーシスが関与することが明らかとなったものの、何らかの機序でエンドソーム膜を通り抜けて細胞質に移行しないことには細胞内での活性は発現しない。エンドソームがアルギニンの相互作用により内容物を漏出しやすくなるという説もあるが、具体的にどのようにして膜を通過しているのかに関しては詳細にはわかっていない。

最近、一つの魅力的な説明として、疎水性部位を有する対アニオンの寄与が示唆された。驚くべきことに、ラウリン酸やホスファチジルグリセロール存在下、親水性のきわめて高いオリゴアルギニンペプチドがオクタノールあるいはクロロホルムなどの有機溶媒に可溶化される^(17, 18) (図 3-A, B)。疎水性アニオンが、アルギニンペプチドとイオン対を形成することにより見かけの電荷を減らし、さらに対アニオンの疎水性部分がアルギニンペプチドを取り巻く形で全体が疎水化されることで、可溶化されることが考えられる。この結果から、細胞膜中に存在する類似の働きをする疎水性アニオン分子とアルギニンペプチドが複合体を形成することにより膜を透過できるようになることが類推される。さらに、この際、アルギニ

図3 ■ アルギニンペプチドの膜透過と対イオン形成

疎水性の高い対イオンであるホスファチジルグリセロール (PG) (A) が共存するとアルギニンペプチドは有機溶媒のクロロホルムにも溶けるが、PG が共存しないとクロロホルムにはほとんど溶けない (B) (文献 18 参照)。アルギニンペプチドのグアニジノ基は、リン酸基、硫酸基、カルボキシル基などと 2 本の水素結合で結合しうることが膜透過に重要であると思われる (C)。

ンが、カルボキシル基やリン酸基などと図 3-C に示すような 2 個の水素結合を介して相互作用することが重要であることも示唆された。細胞への取り込みにおいて、アミノ基を有するリジンよりもグアニジノ基を有するアルギニンが本質的な役割を果たすという知見とこの結果は一致する⁽¹⁹⁾。また、細胞内は通常 -60 mV 程度の負電荷を帯びているが、この膜電位が取り込みに重要であることも同時に示唆された⁽¹⁷⁾。

今後の展望

以上のように、Tat ペプチドをはじめとした膜透過ペプチドを用いて様々な物質が細胞内に移送できることが示されてきた。この方法は、たとえば非分裂細胞など、通常遺伝子導入が困難な細胞への適用など、トランスフェクション法と相補的に用いることも期待される。また、この方法を用いて、非天然アミノ酸や蛍光物質、修飾試薬などを分子内に有するペプチドや蛋白質も細胞内に導入することも可能であり、従来とは異なる角度から細胞機能に関する情報を与えてくれるかもしれない。

Tat をはじめとした膜透過ペプチドを用いた細胞内移送は、その移送能ならびに移送機序の両面から興味を集めており、特に過去 2~3 年のこれらに関する報告数の増加には目をみはるものがある。導入の成功例が華々しく取り上げられている反面、同時にこの系を用いても上

手くいかなかった例もあるに違いなく、その理由を検討することにより、膜透過ペプチドを用いてどのような物質をどのように導入するのが最善であるのかについての情報が蓄積されるのではないと思われる。また、機序に関しても、現在様々な説が提唱されているが、細胞の種類や導入条件、導入物の物性の多様性を考慮することなく膜透過ペプチドはあたかも単一の導入機序で細胞内に移行するように包括的に論じられている場合が多く、移行機序の解釈に混乱が生じている場合も多いように思える。ペプチドや細胞、投与条件によって、細胞移行機序が微妙に変わってくる場合もあり⁽¹³⁾、機序や効率の優劣を厳密に比較しようとする場合にはこれらに注意する必要がある。

膜透過ペプチドを用いた細胞内導入法は、現時点では当初思われていたようなオールマイティの系ではないかもしれないが、新しい概念による細胞内物質移送の手段であることは間違いなく、移送機序や適用に関する今後の研究の過程から、従来の限界を打破するまったく新しい細胞移送に関する概念が生まれてくることを筆者は期待している。

文献

- 1) S. Futaki: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 547 (2005).
- 2) J. S. Wadia & S. F. Dowdy: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 579 (2005).
- 3) L. R. Wright, J. B. Rothbard & P. A. Wender: *Curr. Pro-*

- tein Pept. Sci., 4, 105 (2003).
- 4) S. Futaki, S. Goto & Y. Sugiura : *J. Mol. Recognit.*, **16**, 260 (2003).
 - 5) A. Joliot & A. Prochiantz : *Nature Cell Biol.*, **6**, 189 (2004).
 - 6) M. Pooga, M. Hallbrink, M. Zorko & U. Langel : *FASEB J.*, **12**, 67 (1998).
 - 7) Y. Z. Lin, S. Y. Yao, R. A. Veach, T. R. Torgerson & J. Hawiger : *J. Biol. Chem.*, **270**, 14255 (1995).
 - 8) S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani & S. F. Dowdy : *Science*, **285**, 1569 (1999).
 - 9) H. Noguchi, M. Matsushita, T. Okitsu, A. Moriwaki, K. Tomizawa, S. Kang, S. T. Li, N. Kobayashi, S. Matsu-moto, K. Tanaka, N. Tanaka & H. Matsui : *Nature Med.*, **10**, 305 (2004).
 - 10) S. Asoh, I. Ohsawa I, T. Mori, K. Katsura, T. Hiraide, Y. Katayama, M. Kimura, D. Ozaki, K. Yamagata & S. Ohta : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 17107 (2002).
 - 11) J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Ver-beure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik & B. Lebleu : *J. Biol. Chem.*, **278**, 585 (2003).
 - 12) J. S. Wadia, R. V. Stan & S. F. Dowdy : *Nature Med.*, **10**, 310 (2004).
 - 13) I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J. C. Simpson, A. T. Jones, Y. Sugiura & S. Futaki : *Mol. Ther.*, **10**, 1011 (2004).
 - 14) S. D. Conner & S. L. Schmid : *Nature*, **422**, 37 (2003).
 - 15) T. Suzuki, S. Futaki, M. Niwa, S. Tanaka, K. Ueda & Y. Sugiura : *J. Biol. Chem.*, **277**, 2437 (2002).
 - 16) A. Fittipaldi & M. Giacca : *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 597 (2005).
 - 17) J. B. Rothbard, T. C. Jessop, R. S. Lewis, B. A. Murray & P. A. Wender : *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 9506 (2004).
 - 18) N. Sakai, T. Takeuchi, S. Futaki & S. Matile : *ChemBio-Chem*, **6**, 114 (2005).
 - 19) S. Futaki, T. Suzuki, W. Ohashi, T. Yagami, S. Tanaka, K. Ueda & Y. Sugiura : *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836 (2001).

プロフィール

平 沢 正 (Tadashi Hirasawa) <略歴>1973年東京農工大学農学部農学科卒業/同年同大学農学部文部技官後, 同大学助手, 助教授を経て, 1997年同大学教授, 現在にいたる。この間, 1985年米国カリフォルニア大学デービス校訪問研究員, 1986~87年米国コロラド州立大学留学, 1992~94年鳥取大学乾燥地研究センター客員助教授<研究テーマと抱負>作物の多収性と環境ストレス耐性(特に水ストレス, 塩ストレス)に関する生態生理, 特に根の機能と地上部の諸生理との関わりを解明していきたい

深 山 浩 (Hiroshi Fukayama) <略歴>平成5年神戸大学農学部園芸農学科卒業/7年同大学大学院農学研究科園芸農学専攻博士課程前期課程修了/10年同大学院自然科学研究科資源生物科学専攻博士課程後期課程修了(学術博)/同年生物系特定産業技術研究推進機構派遣研究員/11年農業生物資源研究所研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>C₃植物におけるC₄光合成関連酵素の機能の解明, 光合成, 炭素代謝の改良<趣味>スポーツ観戦, 酒を飲むこと

福田 智行 (Tomoyuki Fukuda) <略歴>2000年京都大学理学部卒業/2005年東京大学大学院新領域創成科学研究科博士課程修了/同年(独)理化学研究所基礎科学特別研究員, 現在にいたる<研究テーマと抱負>減数分裂期組換え機構, ホーミングエンドヌクレアーゼなど<趣味>絵画鑑賞

二木 史朗 (Shiroh Futaki) <略歴>昭和58年京都大学薬学部卒業/60年同大学大学院薬学研究科修士課程修了/62年同博士後期課程中退/同年徳島大学薬学部薬品製造化学助手/平成5年同大学薬学部附属医薬資源教育センター環境生物工学分野助教授/9年京都大学化学研究所生体反応設計研究部門II助教授/16年同研究所生体機能化学研究系生体機能設計化学研究領域助教授(改組のため)/17年同教授, 現在にいたる。この間, 平成元年~3年米国ロックフェラー大学博士研究員(J. M. Manning 博士), 平成14年(~現在)科学技術振興事業団戦略的創造研究推進事業さきがけプログラム(「合成と制御」研究領域)研究代表者・個人研究員(併任), 平成元年薬博(京都大学)<研究テーマと抱負>細胞で機能するペプチドの設計<趣

味>旅行(見知らぬ土地を歩くこと)

松井 健二 (Kenji Matsui) <略歴>1984年京都大学農学部農芸化学学科卒業/1986年同大学大学院農学研究科博士前期課程修了/同年同博士後期課程中退/1987年山口大学農学部助手/1994年同大学農学部助教授/2005年同教授, 現在にいたる。1991年農博(京都大学)<研究テーマと抱負>植物の放つ香りの生理学的, 生態学的意義の解明とその応用<趣味>スポーツ観戦

水谷 正治 (Masaharu Mizutani) <略歴>1989年京都大学農学部農芸化学学科卒業/1991年同大学大学院農学研究科農芸化学専攻修士課程修了/同年日本チバガイギー(株)宝塚研究所研究員/1998年京都大学化学研究所生体分子機能1助手, 現在にいたる。1997年農博(京都大学)<研究テーマと抱負>植物生理活性物質の活性化・不活性化に関わる酵素(特にシクロロムP450とβ-グルコシダーゼ)の解析, 烏龍茶の香気生成機構の解明<趣味>まめめ兄妹の成長観察