

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名：

細胞を標的とする機能性ペプチドの開発と展開

### 2 研究者氏名：二木 史朗

研究員：桑田 啓子（研究期間 H. 15. 4～H. 17. 8）

田所 明子（研究期間 H. 15. 11～H. 18. 3）

### 3 研究のねらい：

アルギニンと呼ばれるアミノ酸を多く含んだペプチドを用いて、細胞内にタンパク質や薬物を効率よく導入する方法が注目されている。本研究では、様々なペプチドのデザインを通して、どのようなメカニズムでこれらのペプチドが細胞内に導入されるかを理解し、高い膜透過能と細胞選択能を併せ持った新しい細胞内薬物導入ペプチドの開発を目指した。

### 4 研究成果：

著者は、ペプチド化学・ペプチド工学的手法と細胞生物学的手法を併用し、(i) 配列や立体構造を念頭にデザインしたアルギニンペプチドを用いて膜透過機序の解明を図るとともに、(ii) 高い膜透過能と細胞選択性を併せ持つ高機能性キャリアペプチドを開発することを目的として、以下の研究を行った。

#### (1) アルギニンペプチドの膜透過機序の解明

当初、HIV-1 Tat ペプチドを含めたアルギニンペプチドの膜透過は、通常の細胞の物質取り込み経路であるエンドサイトーシスを介さない未知の機序によるものとされていた。しかし、その後の研究の進展により、かなりの割合でエンドサイトーシスが寄与することが明らかになってきた。著者は、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が、アルギニンペプチドの細胞内取り込みに重要な役割を果たしていることを見出し、この際、アクチンと呼ばれる細胞骨格形成タンパク質の形態が大きく変化することを世界に先駆けて明らかとした(図1)。これはすなわち、アルギニンペプチドとの相互作用により細胞内に何らかの刺激・情報が伝わり、細胞膜に影響を及ぼすことで、効率的な細胞内取り込みが行われる可能性を示唆する結果である。さらに、著者は、細胞とアルギニンペプチドとの相互作用により、アクチンの形態変化を誘導する Rac1 と呼ばれるタンパク質が実際に活性化されていることを指摘した。また、ヘパラン硫酸をはじめとする細胞表層の硫酸化された糖タンパク質とアルギニンペプチドの相互作用がアクチンの形態変化とマクロピノサイトーシスの誘導には重要であり、これらの糖タンパク質とペプチドが接することで、細胞内情報伝達系が活性化されることを指摘した。これらの結果は、細胞表層にアルギニンペプチドの取り込みに関与する受容体の存在の可能性をも示唆するものである。

マクロピノサイトーシスがアルギニンペプチドの細胞内取り込みに重要な役割を果たすことが明らかになったが、同時に、この取り込み過程はアルギニンペプチドの鎖長や配列に依存することや、濃度により複数の取り込み経路が活性化されることを明らかにした。さらに、通常、エンドサイトーシスが抑制される4℃でも取り込みが認められたことから、エンドサイトーシスを介さない経路もやはり存在することを指摘した。エンドサイトーシスは細胞膜表面より、細胞外の物質を脂質小胞で包み込む形で細胞内部へ取り込む過程であり、たとえ導入分子がエンドサイトーシスで取り込まれたとしても、その膜を透過して、細胞質内へと移行することなしには機能や薬効を発揮できない。また、前述のようにエンドサイトーシスが抑制される4℃においても細胞内にペプチドが移行することから、アルギニンペプチドが脂質膜を何らかの形で通過するトリックが存在するはずである。これを可能とする機序の一つとして著者らはアニオン化合物との複合体形成を考えている。例えば、生体膜の主要な構成脂質であるホスファチジルコリン存在下に、アルギニンペプチドをリン酸バッファーとクロロホルムとの混液に加えると、アルギニンペプチドはクロロホルム層に分配可

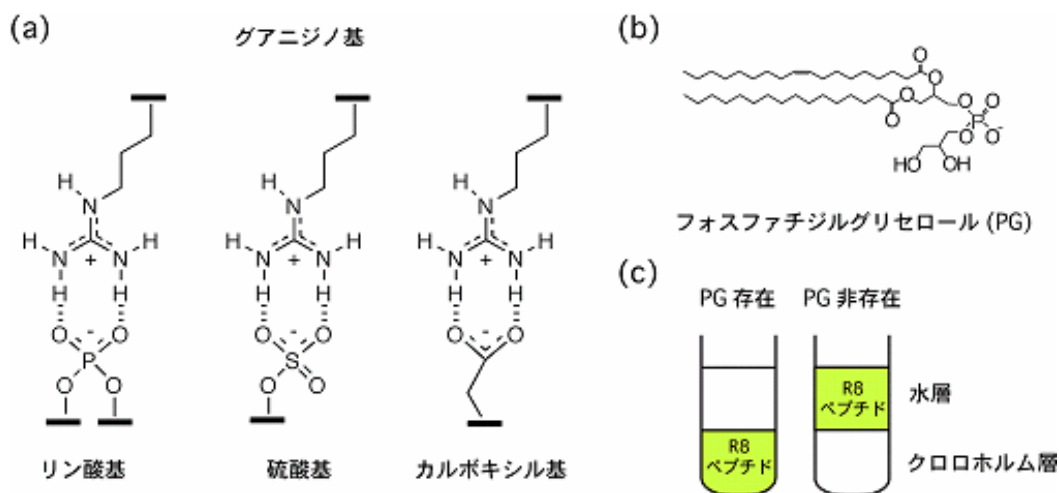
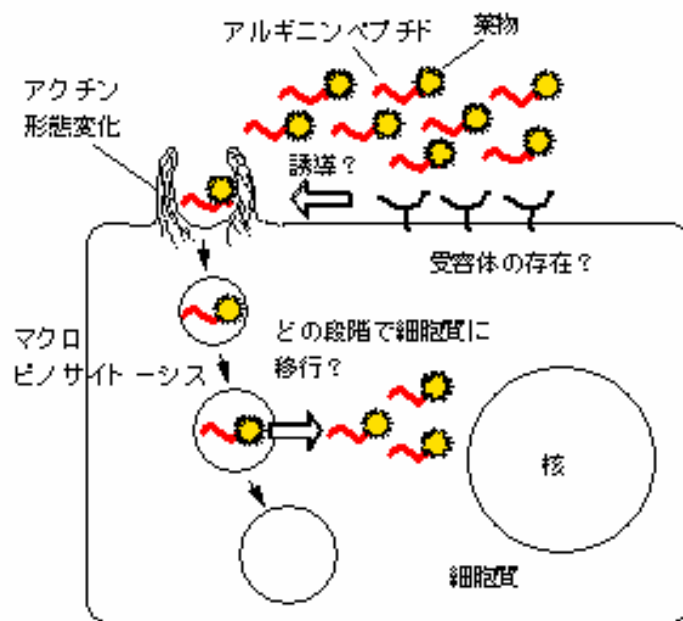


図2. アニオンとの複合体形成によってアルギニンペプチドの膜透過が促進されることを示唆する例。(a) アルギニンのグアニジノ基はリン酸基、硫酸基、カルボキシル基などとの間に2本の水素結合を形成しうる。フォスファチジルグリセロール(PG)(b)などの疎水性を有するアニオンが存在すると、アルギニンペプチドはこれらと複合体を形成することによりクロロホルム層に分配される(c)。

能である(図2)。また、血清非存在下において、カルボン酸、リン酸、硫酸などアルギニンのグアニジノ基と二本の水素結合で結合しうる官能基とピレンブチレートなどの疎水性原子団を併せ持つ両親媒性分子の存在下、アルギニンペプチドの細胞への取り込みが高まり得ることも見出している。現在、この方法のタンパク質などの細胞導入への応用に関しても検討中である。

## (2) 新しい概念による細胞内核酸送達系の開発

既に著者らは、ステアリル化したオクタアルギニン(R8)ペプチドとの複合体が、高い遺伝子導入能を持つ市販のカチオン性リポソーム、リポフェクタミンとほぼ同等の遺伝子導入活性を示すことを見出している。この系は培養細胞では高い導入能を示すと考えられるが、生体への適用を考えると、血中での安定性を考えるとこのままの形での投与は難しい。そこで、北海道大学薬学研究所原島秀吉教授との共同研究で、ステアリル R8 ペプチドをリポソームに埋め込むことにより、

表層に R8 ペプチドが呈示されたりポソームの調製に成功した。この内部に適切に折り畳んだプラスミド DNA を予め入れておくことにより、アデノウイルスベクターと同等のトランスフェクション効率を示した。ウイルス由来ベクターは高い遺伝子導入能を有する反面、感染等の危険が現時点では完全にクリアされておらず、同等の DNA 導入活性を有するに関わらず感染の恐れのない上記の非ウイルスベクターの開発は意義深い。これに関しては、現在、さらに細胞標的分子や、核移行が得られることを見出した。また、同時にリポソーム上のアルギニンペプチドの電荷密度が細胞内移行機序に重要な働きをすること明らかにし、この違いにより異なる機序で細胞内に移行することを示した。ウイルス由来ベクターは高い遺伝子導入能を有する反面、感染等の危険が現時点では完全にクリアされておらず、同等の DNA 導入活性を有するに関わらず感染の恐れのない上記の非ウイルスベクターの開発は意義深い。これに関しては、現在、さらに細胞標的分子や、核移行ペプチドを複合的に呈示したりポソームを開発中であり、より高選択性で高効率の遺伝子導入を目指している。

このほかにも、著者は、ヒスチジンタグキレート複合体や RNase S タンパク質複合体が細胞内に導入可能なことを見出し、後者に関しては細胞内で HIV-1 の複製阻害効果を発揮することなどを報告した。また、エンドソーム脱出効果を持つ膜融合ペプチドを用いたりポソームの細胞質への移行と遺伝子発現効率の向上などについても検討した。

## 5 自己評価：

当初の研究目標として、(1)アルギニンペプチドの膜透過機序の解明、(2)新しい概念による細胞内核酸送達系の開発、(3)細胞への標的化の制御をあげた。

(1)に関しては、配列や構造を念頭にデザインしたアルギニンペプチドと細胞生化学的手法を併用し、検討を行った結果、ペプチドとの相互作用により、細胞骨格タンパク質の構造変化とマクロピノサイトーシスと呼ばれる特殊な取り込み系が活性化されることを見いだした。また、ペプチドが細胞表層と相互作用する際や膜を通過する際における負電荷を帯びた分子との相互作用の重要性を示唆する結果を得た。取り込み機序の全容を解明するためには更なる検討が必要ではあるが、これらの知見はキャリアペプチドの設計において有用な知見を与えてくれるものと考えている。また、この過程で、ピレンブチレート存在下にアルギニンペプチドが非常に効率よく細胞内に移行することを見いだした。現在の所、血清非存在下でしか見られない現象であるが、投与条件等の検討により、従来のアルギニンペプチドによる細胞移送とは異なる概念によるブレイクスルー的な移送系になり得るかも知れず、今後その可能性についてさらに追求して行きたいと思っている。(2)に関しては、アルギニンを呈示したりポソームに DNA を内包させることで、アルギニンペプチドを用いての細胞導入の際に問題になる DNA とのアグリゲーションを回避し、アルギニンペプチドの性質を活かした形での遺伝子移送系を樹立することが出来た。生体への適用を含めてその実用性に関して今後さらに検討を進めたいと考えている。(3)に関しては、残念ながら具体的な設計指針をたてるには至らなかったが、今後(1)の機序解明が進むにつれて、方向性が定まってゆくと期待される。

アルギニンペプチドを追ったさきがけ研究の3年間において得られたもう一つの収穫は、アルギニンペプチドを通して細胞という複雑系を一生懸命見る機会を得ることが出来たことである。この化学の観点から細胞を理解しようとする過程で得られた「感触」を大切に、今後の研究を進めてゆきたい。

## 6 研究総括の見解：

高機能の細胞内薬物導入ペプチドの開発に向けて大きな進展があった。まず、アルギニンペプチドが効率よく細胞内へ移行する方法を見出し、その作用機構を明らかにした。これらの研究を進展させ、遺伝子導入のための新しいタイプのナノ脂質粒子(リポソーム)を創出するに至った。新しい膜透過機構を含む点やさらなる広い応用が期待される。

## 7 主な論文等：

論文

- (1) Arginine Carrier Peptide Bearing Ni(II) Chelator to Promote Cellular Uptake of Histidine-Tagged Proteins, Shiroh Futaki, Miki Niwa, Ikuhiko Nakase, Akiko Tadokoro, Youjun Zhang, Makoto Nagaoka, Noaya Wakako, Yukio Sugiura, *Bioconjug. Chem.*, 15(3), 475-481 (2004)
- (2) RNase S Complex Bearing Arginine-rich Peptide and Anti-HIV Activity, Shiroh Futaki, Ikuhiko Nakase, Tomoki Suzuki, Daisuke Nameki, Ei-ichi Kodama, Masao Matsuoka, Yukio Sugiura, *J. Mol. Recogn.*, 18(2), 169-174 (2004)
- (3) Cellular Uptake of Arginine-Rich Peptides: Roles for Macropinocytosis and Actin Rearrangement, Ikuhiko Nakase, Miki Niwa, Toshihide Takeuchi, Kazuhiro Sonomura, Noriko Kawabata, Yukihiko Koike, Masanori Takehashi, Seigo Tanaka, Kunihiko Ueda, Jeremy C. Simpson, Arwyn T. Jones, Yukio Sugiura, Shiroh Futaki, *Mol. Ther.*, 10(6), 1011-1022 (2004)
- (4) Development of a Non-viral Multifunctional Envelop-type Nano Device by a Novel Lipid Film Hydration Method, Kentaro Kogure, Rumiko Moriguchi, Kentaro Sasaki, Masaharu Ueno, Shiroh Futaki, Hideyoshi Harashima, *J. Control. Release*, 98(2), 317-323 (2004)
- (5) Anionic Fullerenes, Calixarenes, Coronenes, and Pyrenes Activators of Oligo/Polyarginines in Model Membranes and Live Cells, Florent Perret, Masamichi Nishihara, Toshihide Takeuchi, Shiroh Futaki, Adina N. Lazar, Anthony W. Coleman, Naomi Sakai, Stefan Matile, *J. Am. Chem. Soc.*, 127(4), 1114-1115 (2005)

#### 特許

- (1) 特願 2003-343857: 原島秀吉、二木史朗、小暮健太郎: 核移行能を有するポリアルギニン修飾リポソーム: 独立行政法人 科学技術振興機構: 2003年10月1日 同 PTC 出願 (PCT/JP2004/14500)
- (2) 特願 2004-205217: 茶木伸治、小暮健太郎、二木史朗、原島秀吉: リポソーム封入物質がエンドソームから脱出可能なリポソーム: (独)科学技術振興機構: 2004年7月12日
- (3) 特願 2005-086890: 小暮健太郎、中村孝司、秋田英万、原島秀吉、二木史朗: 目的物質を効率的に核内に送達可能なリポソーム: 国立大学法人北海道大学、国立大学法人京都大学: 2005年3月24日

#### 招待講演

- (1) 第12回アンチセンスシンポジウム  
吹田、2002.11.28-29(講演日 11.28)  
塩基性ペプチドによる細胞内効率的物質導入  
二木史朗
- (2) 3<sup>rd</sup> Peptide Engineering Meeting (PEM-III)  
Boston, 2003. 7. 17-18(講演日 7. 17)  
Potential of arginine-rich peptides as carriers for intracellular protein delivery  
Shiroh Futaki
- (3) 第19回バイオハイブリッド研究会  
横浜、2004.5.24  
塩基性ペプチドとのハイブリッド化によるタンパク質・薬物の効率的細胞内導入  
二木史朗
- (4) CBI学会 2004年大会  
東京、2004.7.28-30(講演日 7.28)  
アルギニンペプチドの膜透過と細胞内デリバリー  
二木史朗