

- 1) Ishiura, M., Kutsuna, S., Aoki, S., Iwasaki, H., Andersson, C.-R., Tanabe, A., Golden, S.-S., Johnson, C.-H., & Kondo, T. (1998) *Science*, **281**, 1519–1523.
- 2) Iwasaki, H., Nishiwaki, T., Kitayama, Y., Nakajima, M., & Kondo, T. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15788–15793.
- 3) Xu, Y., Mori, T., & Johnson, C.-H. (2003) *EMBO J.*, **22**, 2117–2126.
- 4) Nishiwaki, T., Satomi, Y., Nakajima, M., Lee, C., Kiyohara, R., Kageyama, H., Kitayama, Y., Temamoto, M., Yamaguchi, A., Hijikata, A., Go, M., Iwasaki, H., Takao, T., & Kondo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13927–13932.
- 5) Xu, Y., Mori, T., Pattanayek, R., Pattanayek, S., Egli, M., & Johnson, C.-H. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13933–13938.
- 6) Nishiwaki, T., Satomi, Y., Kitayama, Y., Terauchi, K., Kiyohara, R., Takao, T., & Kondo, T. (2007) *EMBO J.*, **26**, 4029–4037.
- 7) Rust, M.-J., Markson, J.-S., Lane, W.-S., Fisher, D.-S., & O’Shea, E.-K. (2007) *Science*, **318**, 809–812.
- 8) Kitayama, Y., Iwasaki, H., Nishiwaki, T., & Kondo, T. (2003) *EMBO J.*, **22**, 2127–2134.
- 9) Nakajima, M., Imai, K., Ito, H., Nishiwaki, T., Murayama, Y., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2005) *Science*, **308**, 414–415.
- 10) 大川 (西脇) 妙子 (2008) *生化学*, **80**, 833–838.
- 11) Kitayama, Y., Nishiwaki, T., Terauchi, K., & Kondo, T. (2008) *Genes Dev.*, **22**, 1513–1521.
- 12) Iwasaki, H., Williams, S.-B., Kitayama, Y., Ishiura, M., Golden, S.-S., & Kondo, T. (2000) *Cell*, **101**, 223–233.
- 13) Takai, N., Nakajima, M., Oyama, T., Kito, R., Sugita, C., Sugita, M., Kondo, T., & Iwasaki, H. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12109–12114.
- 14) Taniguchi, Y., Katayama, M., Ito, R., Takai, N., Kondo, T., & Oyama, T. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 60–70.
- 15) Liu, Y., Tsinoremas, N.-F., Johnson, C.-H., Lebedeva, N.-V., Golden, S.-S., Ishiura, M., & Kondo, T. (1995) *Genes Dev.*, **9**, 1469–1478.
- 16) Nakahira, Y., Katayama, M., Miyashita, H., Kutsuna, S., Iwasaki, H., Oyama, T., & Kondo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 881–885.
- 17) Nair, U., Ditty, J.-L., Min, H., & Golden, S.-S. (2002) *J. Bacteriol.*, **184**, 3530–3538.
- 18) Woelfle, M.-A. & Johnson, C.-H. (2006) *J. Biol. Rhythms*, **21**, 419–431.

谷口 靖人¹, 小山 時隆^{1,2}
¹名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻
²京都大学大学院理学研究科
 生物科学専攻 (植物学教室)

Output pathways of the cyanobacterial circadian clock
 Yasuhito Taniguchi¹ and Tokitaka Oyama^{1,2} (¹Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa, Nagoya 464–8602, Japan; ²Department of Botany, Graduate School of Science, Kyoto University, Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606–8502, Japan)

細胞膜透過ペプチドベクターの開発とメカニズム

はじめに

細胞膜 (形質膜) は細胞の内外を隔てるバリアであり, タンパク質や核酸といった親水性が高い物質は通常細胞膜を透過しない。細胞の恒常性の維持という意味ではこの性質はありがたいものではあるが, 細胞機能を探ったり, 制御するため, あるいは医療目的で, これらの分子を細胞外から細胞内に導入することは一般的に困難である。このため, マイクロインジェクションやエレクトロポレーションといった細胞膜を一過的に破って導入する方法や, 膜融合をもつりポソームを用いて導入する方法などがこれまで用いられてきた。しかし, これらの方法は, 導入効率, 操作の煩雑さ, 細胞に与える損傷の大きさから, 必ずしも満足のいく方法とは言えなかった。

一方では, 膜透過性を有するペプチドをベクターとして用いて, 細胞内にタンパク質をはじめとする膜不透過性の分子を導入する方法が盛んに試みられるようになってきた。膜透過ペプチドは CPP (cell-penetrating peptide), あるいは PTD (protein transduction domain) と呼ばれ, これらの用語を論文で目にする機会も増えてきた。膜透過ペプチドと導入する物質との化学的架橋体あるいは融合タンパク質を調製し, 細胞培養液に加えるだけで, 多くの場合細胞への取り込みの促進が見られる。また, これにより細胞機能が制御された例も数多く報告され, 細胞生化学的手法の一つとして認知されるとともに, 医薬品の新しい送達法としても注目されている¹⁾。本稿では, 膜透過ペプチド

を巡る最近の話題を、筆者らの研究室の試みと合わせて紹介する。

1. 細胞膜透過ペプチドとは

ヒト免疫不全ウイルス1型 (HIV-1) の Tat タンパク質由来のアルギニンに富む塩基性ペプチド (TAT, 表1) は膜透過ペプチドとして最も頻繁に用いられているものの一つである。Tat タンパク質は HIV の転写制御に係わる RNA 結合タンパク質であり, HIV の細胞への侵入とは無関係である。このタンパク質の生理的意義の解明の過程で, 細胞外から加えた Tat タンパク質が細胞内に移行することが偶然見つかった²⁾。その後の研究で, Tat タンパク質の RNA 結合領域 (48-60 位) がこのタンパク質の細胞内移行の本質を担うことが明らかとなった³⁾。さらに興味あることに, この領域に対応するペプチドを化学的手法あるいは遺伝子工学的手法で外因性のタンパク質と結合させることにより, 効率的にこれらのタンパク質を細胞内に移送できることも見いだされ, 細胞内送達ベクターとしてのこのペプチド配列が TAT ペプチドと呼ばれるようになった³⁾。Drosophila 由来の転写因子 Antennapedia タンパク質の DNA 結合領域は塩基性両親媒性ヘリックス構造を有しているが, この配列をもつペプチド (penetratin) も同様の機能を有することが明らかとなった⁴⁾。タンパク質・ペプチド以外にも, これらのペプチドとの架橋により, 核酸, 合成高分子, リポソーム, 微小磁石など様々な物質が細胞内に導入されたことが報告され, 新しい細胞内への生理活性物質の導入法として盛んに用いられるようになっている。

膜透過ペプチドと呼ばれるものには, 実は, 前述の TAT あるいはオリゴアルギニンのように配列中のほとんどのアミノ酸がアルギニンであるもの, penetratin のように塩基性でかつ疎水性アミノ酸を含む両親媒性ペプチド, あるいは逆にほとんどが疎水性のアミノ酸で若干の塩基性アミノ酸を有するもの (TP-10 など) など様々なものがある (表1)^{1,5)}。何れも比較的短い 10~20 アミノ酸程度のペプチドであり, これらの付加により効率的な細胞内移行が達成されることが報告されている。しかし, それぞれのペ

プチドの物性の違いを考慮すると, これらのペプチドは異なる機序で細胞内に移行することが予想される。本稿では, 膜透過ペプチドの中で最もよく用いられているアルギニンペプチドに関して主に解説する。

2. アルギニンペプチドの効率的細胞内移行を可能とする機序 (エンドサイトーシス側面)

アルギニンは側鎖官能基としてグアニジノ基を有し, その pK_a は 12.5 と強塩基性であり, もちろん親水性も非常に高い。効率的な膜透過には, アルギニンが 6 個から 12 個程度必要であることが, 筆者ら及び他のグループの研究により明らかとなっている^{6,7)}。メリチンやマストパランなどの塩基性ペプチドは強い細胞膜傷害性を有しているが, TAT やオリゴアルギニンは顕著な細胞毒性を示さない。何故このように高い塩基性を示すペプチドが細胞膜を効果的に透過できるのかに関しても大きな関心が集まっている。当初, アルギニンペプチドは, 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, 直接的な膜透過により細胞内に移行すると言われていたが, その後の検討により, マクロピノサイトーシスと呼ばれるアクチン依存性の特殊なエンドサイトーシスをはじめとした生理的取り込み機序が関与していることが明らかとなった^{5,8,9)}。以前より, アルギニンペプチドの細胞移行には, 細胞表面に存在する硫酸化糖鎖 (プロテオグリカン) との相互作用の重要性が言われていた⁵⁾。すなわち, 正に帯電したアルギニンペプチドと負に帯電したプロテオグリカンとの間の静電的相互作用, あるいはアルギニンのグアニジノ基と硫酸基との間の水素結合形成により, アルギニンが細胞表面に引き寄せられ, 細胞内への取り込みが加速されるというものである。筆者らは, このような静的な相互作用のみならず, アルギニンペプチドとプロテオグリカンとの相互作用により Rac GTPase を介した細胞内情報伝達系が活性化され, アクチン重合化とマクロピノサイトーシスによる取り込みが誘起されることを初めて示した⁹⁾ (図1)。マクロピノサイトーシスは通常の細胞ではハウスキーピング的には起こっておらず, EGF などの外的刺激に応じて誘導される。また, プロテオグリカンを欠失した細胞においては, アルギニンペプチドを加えてもアクチン重合やマクロピノサイトーシスは誘導されない。すなわち, これまで言われていた「プロテオグリカンとの相互作用による細胞表面へのペプチドの濃縮」に加えて, 細胞表面のプロテオグリカンを介した「マクロピノサイトーシスの誘導による積極的な細胞内取り込みの誘起」という二つの理由で, アルギニ

表1 代表的な膜透過ペプチド

ペプチド	アミノ酸配列
TAT	GRKKRRQRRPPQ
オリゴアルギニン	Rn (n=6~12 程度)
penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK
TP-10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL

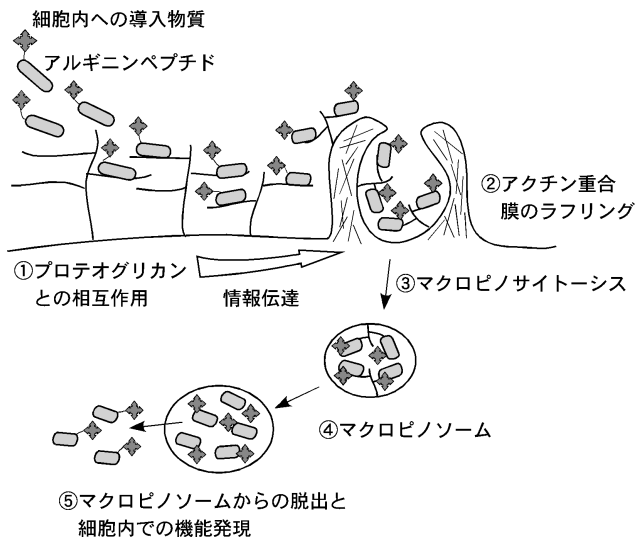


図1 マクロピノサイトーシスを介したアルギニンペプチドの細胞内取り込み様式

①アルギニンペプチドが形質膜上に提示されているプロテオグリカンと相互作用することにより、細胞内に刺激が伝わり、②細胞骨格タンパク質のアクチンの重合とこれに伴う形質膜のラフリング（波打ち現象）が誘起される。③隆起した形質膜が融合して細胞外液を細胞内に取り込む（マクロピノサイトーシス）。④ペプチドとともに取り込まれ、マクロピノソーム内に保持された導入物質は、細胞内に存在しているものの膜に囲まれているために、期待された生理活性や機能を発揮できない。⑤マクロピノソームから脱出して初めてこれが可能となるが、どの段階でどのようにしてアルギニンペプチドがここから脱出するかに関してはよく分かっていない。

ンペプチドは効果的な細胞内移送を達成する⁵⁾。ただ、この「細胞内への取り込み」という言葉には注意を要する。マクロピノサイトーシスで「細胞内」に取り込まれたとしてもペプチドはマクロピノソーム（あるいはエンドソーム）という小胞のなかに閉じこめられており、そこから脱出して、サイトゾルへ移行しない限りは、アルギニンペプチドとともに細胞内に導入された物質に求められる生理活性を得ることはできない（図1）。アルギニンペプチドが小胞からどのように脱出するかについての詳細は不明であり、この脱出効果を如何に高めるかが今後の課題の一つとなっている。

3. アルギニンペプチドの効率的細胞内移行を可能とする機序（非エンドサイトーシス局面）

アルギニンペプチドの細胞内移行にはマクロピノサイトーシスをはじめとする生理的取り込み機序が関与することが明らかとなった反面、これで説明できない様々な現象

が観察された。例えば、エンドサイトーシスはATPなどのエネルギーを利用して行われる過程であり、低温では休止する。ところが、蛍光ラベルしたアルギニンペプチドを低温条件下に細胞と処理すると、細胞内全体に拡散したペプチドのシグナルが観察される^{8,10)}。また、37°Cでインキュベートした時とは異なり、ペプチドはサイトゾルならびに核に拡散したように観察される。この条件下、形質膜の顕著な損傷は見られず、形質膜との直接相互作用により、アルギニンペプチドが直接サイトゾルへ移行したことが考えられる。このようにサイトゾルへのペプチドの直接移行を示唆する結果は、たとえば、無血清条件下、高濃度のアルギニンペプチド存在下、あるいは比較的ペプチド鎖長が長い場合にも認められ¹⁰⁾、形質膜とペプチドの相互作用が強まる条件下では、アルギニンペプチドは形質膜を直接透過する可能性を示唆するものである。ここで蛍光団を小分子薬物のモデルとみなすと、分子量1,000~2,000程度の化合物もアルギニンペプチドとほぼ同じ挙動で細胞内に移行できることが推測される。また、膜電位や疎水性の対イオンの存在などがアルギニンペプチドの直接膜透過を容易にする要因とも考えられている^{7,11)}。

4. 膜透過ペプチドをどのように使うか？：細胞生化学的手技としての可能性

前述のように、アルギニンペプチドを使って、生理活性タンパク質やペプチドを細胞に導入することにより、例えば細胞周期の制御やアポトーシスの誘導など細胞機能のコントロールに成功した例は既に数多く報告されており、試薬として市販されているものもある。最近のホットな話題として、11残基のアルギニンを付加した4種のタンパク質（Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc）を細胞内に導入することにより、遺伝子を使わず新型万能細胞（iPS細胞）の樹立に成功した例が挙げられる¹²⁾。

膜透過ペプチドを使えば、遺伝子がコードする以外の非天然アミノ酸を含んだり、化学修飾されたタンパク質などを細胞内に導入できる。例えば、イノシトール-1,4,5-三リン酸（IP₃）などの細胞内計測が可能となった¹³⁾。また、ピレンブチレートに対イオン型導入補助剤として用い¹⁴⁾、^[¹⁵N] 標識したユビキチン関連タンパク質を高効率で細胞内に導入することで、哺乳類の細胞内におけるタンパク質の構造をNMRで「その場計測」できたことが白川らにより報告されている¹⁵⁾。

このように、アルギニンペプチドを用いた細胞導入は、医薬品の細胞導入のみならず、細胞機能を理解するための

有用なツールである。

おわりに

上記のように、細胞導入ツールとして興味をもたれているアルギニンペプチドではあるが、これらのペプチドを一種のプロープとして用いることにより、細胞への物質取り込みや、膜透過に関する新しい知見が見いだされてきている。また、ペプチドと細胞との相互作用様式は単一のものではなく、様々な条件によって変化しうることが最近明らかとなってきた。従ってこれらの取り込み様式や細胞との相互作用を詳細に検討することで、新しい細胞応答の概念が見いだされるかも知れない。実際、Prochiantzらは、細胞から分泌された *Antennapedia* 類縁タンパク質が周囲の細胞に取り込まれることにより、周辺細胞の転写が活性化されることを明らかにするとともに、発生におけるこの機序の重要性を示唆している⁴⁾。様々なRNA/DNA結合タンパク質やウイルスのコートタンパク質に同様のアルギニンに富む配列が存在することから、アルギニンペプチドを用いた研究によって、細胞とこれらのタンパク質の相互作用様式に関する新たな知見も得られるかもしれない。

- 1) Futaki, S. (2006) *Biopolymers*, **84**, 241-249.
- 2) Frankel, A.D. & Pabo, C.O. (1988) *Cell*, **55**, 1189-1193.
- 3) Brooks, H., Lebleu, B., & Vivès, E. (2005) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 559-577.
- 4) Joliot, A. & Prochiantz, A. (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 608-613.
- 5) Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., & Futaki, S. (2008) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 598-607.
- 6) Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., & Sugiura, Y. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 5836-5840.
- 7) Goun, E.A., Pillow, T.H., Jones, L.R., Rothbard, J.B., & Wender, P.A. (2006) *ChemBioChem*, **7**, 1497-1515.
- 8) Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., Jones, A.T., Sugiura, Y., & Futaki, S. (2004) *Mol. Ther.*, **10**, 1011-1022.
- 9) Nakase, I., Tadokoro, A., Kawabata, N., Takeuchi, T., Katoh, H., Hiramoto, K., Negishi, M., Nomizu, M., Sugiura, Y., & Futaki, S. (2007) *Biochemistry*, **46**, 492-501.
- 10) Kosuge, M., Takeuchi, T., Nakase, I., Jones, A.T., & Futaki, S. (2008) *Bioconjug. Chem.*, **19**, 656-664.
- 11) Sakai, N., Takeuchi, T., Futaki, S., & Matile, S. (2005) *ChemBioChem*, **6**, 114-122.
- 12) Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Schöler, H.R., Duan, L., & Ding, S. (2009) *Cell Stem Cell*, **4**, 381-384.
- 13) Sugimoto, K., Nishida, M., Otsuka, M., Makino, K., Ohkubo,

- K., Mori, Y., & Morii, T. (2004) *Chem. Biol.*, **11**, 475-485.
- 14) Takeuchi, T., Kosuge, M., Tadokoro, A., Sugiura, Y., Nishi, M., Kawata, M., Sakai, N., Matile, S., & Futaki, S. (2006) *ACS Chem. Biol.*, **1**, 299-303.
 - 15) Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S., Ito, Y., Hiroaki, H., & Shirakawa, M. (2009) *Nature*, **458**, 106-109.

中瀬 生彦, 二木 史朗

(京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域)

Development of membrane-permeable peptide vectors and their internalization mechanisms

Ikuhiko Nakase and Shiroh Futaki (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan)

シヨウジョウバエ生殖質形成における膜輸送系の役割

1. 生殖質

細胞内の特定の場所に分子群やオルガネラを時空間的に正しく配置させることは、細胞の分化決定や細胞機能発揮の基盤となっている。多くの動物において、生殖細胞系列は胚発生初期に確立されるが、その分化決定は卵内の特定の細胞質領域(生殖質)に局在する母性因子によって制御される。このような生殖質の形成は、細胞極性確立とRNAやタンパク質の細胞質内局在化機構の解析の良いモデル系の一つとして精力的な研究が進められている^{1,2)}。シヨウジョウバエの生殖質は、卵形成過程に卵母細胞の後極に形成される。既に数多くの生殖質因子が同定されているが、それらは卵形成過程で逐次的に卵母細胞後極に輸送される(図1)。これらの生殖質因子の局在化過程には、細胞骨格が深く関わっており、生殖質因子が後極まで輸送される過程では微小管が、輸送されてきた生殖質因子を後極につなぎ止める過程ではアクチンがそれぞれ働いていると考えられている²⁾。しかし、その具体的な機構には不明な点が多い。本稿では、近年明らかとなってきた、シヨウジョウバエにおけるエンドソーム経路を介したアクチン骨格系制御と生殖質因子の局在化機構との関連について概説したい。

2. Oskar

生殖質形成は、卵形成過程で *oskar* RNA が卵母細胞後