

# 琉球大学学術リポジトリ

## [総説] タンパク質の直接導入法

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2010-09-28 キーワード (Ja): キーワード (En): Protein transduction domain, Tat, Polyarginine, siRNA and peptide 作成者: 松下, 正之, Matsushita, Masayuki メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016222">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016222</a>

## タンパク質の直接導入法

松下正之

琉球大学医学部 分子・細胞生理学講座

## Protein Transduction Technology

Masayuki Matsushita

*Molecular and Cellular Physiology, School of Medicine, University of the Ryukyus*

### ABSTRACT

Small domains called protein transduction domains (PTD) have been developed for the direct delivery of proteins and functional peptides into eukaryotic cells. This protein delivery system has been proved useful in answering important biological questions in culture cells and disease related animal models. PTD containing 6-11 arginine residues have gained attention particularly due to their higher transduction rates and fewer side effects. In this review, I discuss the recent advance in PTD and their implications for clinical use and future research. *Ryukyu Med. J.*, 28(3,4)1~5, 2009

Key words: Protein transduction domain, Tat, Polyarginine, siRNA and peptide

### はじめに

高分子を細胞内に導入する技術は、分子生物学の発展とともに目覚ましい進展を遂げてきた。特に、細胞における遺伝子機能を解析する方法として、DNA や機能性 RNA を細胞内に導入し、転写翻訳後のタンパク質として、あるいは RNA 干渉により遺伝子機能を解析する方法が一般的に用いられる。これらの核酸導入においては、電気穿孔法、リポソーム、ウイルスなどがそれぞれの目的や細胞種に応じて使い分けられている。

一方、タンパク質・機能性ペプチドを細胞内へ直接導入する技術は、細胞研究を行う上で有効であるとともに、新しい疾患治療法へとつながる可能性を持っている。しかしながら、細胞の疎水性脂質二重膜は、タンパク質を直接細胞内に導入する大きな障害となっていたが、近年、タンパク質を効率的に細胞内へ輸送する技術が開発された。この技術は、Protein Transduction Domain (PTD) と呼ばれる特定のアミノ酸配列を持ったペプチドを、通常では細胞内に導入できないタンパク質に融合する事により、細胞内導入可能にする技術である。PTDとして、ホメオプロテインとよばれる転写因子である Antennapedia<sup>1,2)</sup>、ヒト免疫不全ウイルス (human

immunodeficiency virus (HIV-1)) 由来の Tat タンパク質<sup>3,4)</sup>、ヘルペスウイルス 1 型 (herpes simplex virus (HSV) type 1) 由来の VP22<sup>5)</sup>などに含まれる 10~20 アミノ酸からなるペプチドが使用されていた。これらのタンパク質導入ドメインは、gp41 を例外としてアルギニンやリシンの塩基性アミノ酸が豊富である特徴を持っている (Table 1)。私たちは、これらの特徴より、ポリアルギニン、特に 11 個のアルギニン (11R) を導入ドメインとして使用した場合に、より効率的にタンパク質を細胞内に導入できることを発見した<sup>6,7)</sup>。また、国内外のグループからも同様にポリアルギニンによる高率のタンパク質導入効果を認めた報告がなされた。Tat や 11R は、ほぼすべての細胞種への目的のタンパク質の導入が可能であり、かつ *in vivo* での導入も可能である<sup>4)</sup>。また、タンパク質導入ドメインはタンパク質やペプチドのみならず、antisense oligonucleotides や、peptide nucleic acids (PNA)、short interfering RNA (siRNA)、nanoparticles、liposomes、plasmids など、導入可能であることが報告され、多様な用途に応用展開されている。本総説では、タンパク質導入技術の最近のめざましい進歩について紹介する。

Table 1 Amino acid sequence of protein transduction domains  
Protein Transduction Domain (PTD)

CPP	amino acid sequence	character
Tat	RKKRPQRRR	HIV-1 Tat
gp41 fusion seq.	GALFLGWLGAAGSTMGA	HIV-1 env. gp41
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	pAntp (43-58)
Transportan	GWTLNSAGYLLGKINKALAALAKKIL	artificial PTD
SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR	artificial PTD
Prion	MANLGYWLLALFVTMTDVGGLCKKRPKP	prion protein (1-28)
SV40	PKKKRKV	SV40 NLS
poly-Arg	R <sub>6-11</sub>	polyarginine

### 細胞内導入のメカニズム

タンパク質導入技術が報告された初期の研究報告では、細胞内導入は、4条件、ATPの枯渇状態、あるいはエンドサイトーシスの抑制剤を用いても障害されないと報告されていた<sup>8,9)</sup>。そのため、細胞内導入メカニズムは、エンドサイトーシス・レセプター・トランスポーター非依存性であると考えられていた。しかしながら、細胞内導入効率が、メタノール固定などの操作によって増強されることが報告され<sup>10)</sup>、導入メカニズムがエンドサイトーシス・レセプター・トランスポーター非依存性であるという考えに疑問が投げかけられた。また、同時期に導入メカニズムがエンドサイトーシスであるという報告もされるようになり、細胞導入メカニズムが再検討されるようになった。最近の報告では、抗菌ペプチドの導入メカニズム<sup>11)</sup>と同じメカニズムで細胞内に入るという報告や、inverted micelles というメカニズムで細胞内に導入されるという報告もある<sup>12)</sup>。Tat や11Rなどの塩基性アミノ酸由来の導入ペプチドに関しては、マクロピノサイトーシスが導入メカニズムであるという報告がされており、現在ではこの説が有力である<sup>13)</sup>。また、導入には、細胞表面にあるヘパラン硫酸プロテオグリカンが重要であることがわかっている<sup>3)</sup>。タンパク質導入ドメインはアルギニンやリシンといった陽性電荷を帯びたアミノ酸が豊富に含まれており、このことは陰性電荷を帯びているヘパラン硫酸プロテオグリカンとの接着に大きく関わっていると考えられる。タンパク質導入ドメインが細胞接着の後、マクロピノサイトーシスとよばれるエンドサイトーシスの一種によって細胞内に導入され、エンドソームから放出されることにより細胞質内および核内へ移行し、その生物学的活性を発揮することが考えられる。一方で、塩基性アミノ酸含有量の少ない導入ペプチドも多数存在し、異なったメカニズムで細胞内に侵入していることが想定され、それぞれのPTDに特有のメカニズムが関与していると考えられている。

### タンパク質導入技術の応用展開

#### (1) タンパク質導入ドメインと導入物質との結合

タンパク質導入技術は、タンパク質導入ドメインを目的とするタンパク質やペプチドに直接結合させることにより細胞内へ導入するのが一般的であるが、この結合により、タンパク質やペプチドの生物学的活性が減弱したり失われたりする可能性がある。この点を解決するために、目的のタンパク質とタンパク質導入ドメインをdisulfide bondにて可逆的に結合させるように設計されたものが報告されている<sup>14)</sup>。また、disulfide bondを用いた細胞内導入は、タンパク質やペプチドにとどまらず、DNAやRNAと安定して複合体を形成できるPeptide nucleic acids (PNAs)の細胞内導入にも使用されている。細胞内へ導入後、細胞内でPTDと導入目的分子を解離させる他の方法も開発されている。PTDと低分子化合物をpH感受性のリンカーを用いて結合し、細胞内に侵入すると切り離されるように工夫している<sup>15)</sup>。このように、PTDと低分子化合物を細胞内で解離することにより、低分子化合物の活性が高まることが示されている。

#### (2) 細胞内での安定性

タンパク質導入技術の別の問題点として、導入されたタンパク質の細胞内での安定性が挙げられる。細胞内タンパク質はユビキチン化により分解されるが、ユビキチン化抵抗性のタンパク質を導入することにより半減期を延ばそうという試みがされている。われわれはユビキチン化抵抗性のp53変異タンパク質を細胞内に導入することにより、より細胞内でp53機能を長期的に維持することに成功した<sup>16)</sup>。また、ペプチドを人工合成する場合、D型のペプチドを使用したペプチドが、通常自然界で存在するL型よりも安定性を示し、効果的であることが報告されている<sup>17)</sup>。

#### (3) siRNA 導入

PTDを用いてsiRNAを細胞内に導入し、特定のRNA

をノックダウンする方法が開発されてきた。特に、初代培養細胞や生体への応用の場合のように、既存のカチオン性リピッドでは導入効率が低いことから、PTDを応用して、どの細胞でも使用できる siRNA 導入試薬が待ち望まれていた。siRNA を導入できるペプチドとして、HIV GP41由来のN-terが開発され市販されている<sup>18)</sup>。N-terの特徴は、siRNA と混合するだけで初代培養細胞に高い導入を示すことである。また、Tat と dsRNA 結合ドメインを融合した方法も開発されている<sup>19)</sup>。生体への siRNA の導入に関しては、臨床応用も視野に入れ、世界中で競争が激化している。近年、アセチルコリン受容体への結合能を有するペプチドと 9R の融合ペプチドを用いて、生体レベルで血液脳関門を通過させ神経細胞に siRNA を導入できることが報告され注目を集めている<sup>20)</sup>。

(4) 幹細胞制御技術への応用

PTDを用いたタンパク質導入法は、ウイルスのようにゲノムを傷つけないために癌化などの副作用がなく、幹細胞制御技術や iPS 細胞作製技術に理想的な方法である。幹細胞制御技術に関しては、Tat の PTD としての有効性が報告されてきた<sup>21)</sup>。また、11R や 9R を iPS 化に必要な転写因子と融合した組み換えタンパク質を培養液に添加するのみで繊維芽細胞が iPS 化することも報告されている<sup>22,23)</sup>。しかしながら、iPS 細胞作製効率の面でウイルスを用いた方法に比べ低いため、転写因子導入効率の改善などが今後の課題となっている。

(5) 生体レベルでの応用展開

私たちは11Rを用いた機能性ペプチドを疾患モデルマウス治療へ展開し、その有効性を確認した<sup>7)</sup>。機能性ペプチドは、低分子化合物では困難なタンパク質・タンパク質間の結合阻害ペプチドを結晶構造などより論理的にデザインすることが可能である (Fig. 1)。私たちは、NFAT と calcineurin の結合阻害ペプチドより、免疫抑制剤を開発することに成功している。また、SF Dowdy らのグループは、D 体から成る p53 由来ペプチドを人工合成することで、生体内でのそペプチドの安定性を高め、癌治療へ応用展開することに成功している<sup>17)</sup>。

(6) 組織特異的導入

Tat やポリアルギニンなどを用いたタンパク質導入技術は組織特異性がなく、このことは、治療目的でアポトーシス物質などを *in vivo* で導入したい場合、おのずと制限を受けることを意味している。Miらは滑膜特異的な導入ペプチドを探しだすため、M13 peptide phage display library にてスクリーニングを行い、HAP-1 および HAP-2 を同定した。このペプチドは滑膜細胞特異的に目的タンパク質を導入できることが *in vitro* および *in vivo* で証明されており<sup>24)</sup>、このことは組織特異的導入を *in vivo* で行える可能性を示している。我々も、ペプチドライブラリーより多種類の細胞特異的導入ペプチドを発見しており、細胞選択的導入ペプチドを用いた疾患治療戦略が発展することが期待される。

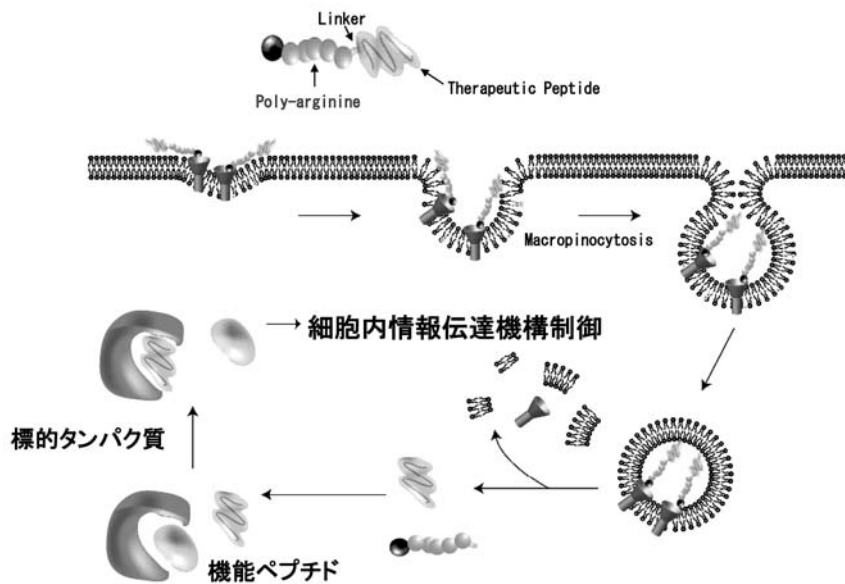


Fig. 1 Recent advance in protein transduction technique

細胞内情報伝達を制御可能なペプチドを蛋白質機能情報・結晶構造などよりデザインし、PTDと融合したペプチドを人工合成することにより細胞内導入型とする。細胞内導入のメカニズムは、エンドサイトーシスのひとつであるマクロピノサイトーシスで細胞内へ導入され、エンドソームから放出されることにより細胞質へ移行する説が有力である。



## おわりに

タンパク質導入技術は毒性が低く、且つ導入効率が高いため、研究としての使用のみならず先進的治療法として期待される。最近の、幹細胞制御技術への応用展開、siRNA 導入ペプチド、細胞選択的導入ペプチドの発見により、その期待がさらに膨らんでいる。

## 文 献

1. Noguchi H., Matsumoto S., Okitsu T., Iwanaga Y., Yonekawa Y., Nagata H., Matsushita M., Wei F.Y., Matsui H., Minami K., Seino S., Masui Y., Futaki S. and Tanaka K.: PDX-1 protein is internalized by lipid raft-dependent macropinocytosis. *Cell Transplant.* 14: 637-45, 2005.
2. Joliot A. and Prochiantz A.: Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 6: 189-196, 2004.
3. Tyagi M., Rusnati M., Presta M. and Giacca M.: Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 276: 3254-61, 2001.
4. Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A. and Dowdy S.F.: In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science.* 285: 1569-1572, 1999.
5. Elliott G. and O'Hare P.: Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88: 223-233, 1997.
6. Matsushita M., Tomizawa K., Moriwaki A., Li S.T., Terada H. and Matsui H.: A high-efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long-lasting long-term potentiation. *J Neurosci* 21: 6000-6007, 2001.
7. Noguchi H., Matsushita M., Okitsu T., Moriwaki A., Tomizawa K., Kang S., Li S.T., Kobayashi N., Matsumoto S., Tanaka K., Tanaka N. and Matsui H.: A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 10: 305-309, 2004.
8. Vives E., Brodin P. and Lebleu B.: A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272: 16010-16017, 1997.
9. Derossi D., Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G. and Prochiantz A.: Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271: 18188-18193, 1996.
10. Lundberg M. and Johansson M.: Positively charged DNA-binding proteins cause apparent cell membrane translocation. *Biochem Biophys Res Commun* 291: 367-371, 2002.
11. Matsuzaki K.: Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* 1462: 1-10, 1999.
12. Dom G., Shaw-Jackson C., Matis C., Bouffioux O., Picard J.J., Prochiantz A., Mingeot-Leclercq M.P., Brasseur R. and Rezsöházy R.: Cellular uptake of Antennapedia Penetratin peptides is a two-step process in which phase transfer precedes a tryptophan-dependent translocation. *Nucleic Acids Res* 31: 556-561, 2003.
13. Wadia J.S., Stan R.V. and Dowdy S.F.: Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10: 310-315, 2004.
14. Begley R., Liron T., Baryza J. and Mochly-Rosen D.: Biodistribution of intracellularly acting peptides conjugated reversibly to Tat. *Biochem Biophys Res Commun* 318: 949-954, 2004.
15. Rothbard J.B., Garlington S., Lin Q., Kirschberg T., Kreider E., McGrane P.L., Wender P.A. and Khavari P.A.: Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med* 6: 1253-1257, 2000.
16. Michiue H., Tomizawa K., Matsushita M., Tamiya T., Lu Y.F., Ichikawa T., Date I. and Matsui H.: Ubiquitination-resistant p53 protein transduction therapy facilitates anti-cancer effect on the growth of human malignant glioma cells. *FEBS Lett* 579: 3965-3969, 2005.
17. Snyder E.L., Meade B.R., Saenz C.C. and Dowdy S.F.: Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. *PLoS Biol* 2: E36, 2004.
18. Simeoni F., Morris M.C., Heitz F. and Divita G.: Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNA into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 31: 2717-2724, 2003.

19. Eguchi A., Meade B.R., Chang Y.C., Fredrickson C.T., Willert K., Puri N. and Dowdy S.F.: Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol* 27: 567-571, 2009.
20. Kumar P., Wu H., McBride J.L., Jung K.E., Kim M.H., Davidson B.L., Lee S.K., Shankar P. and Manjunath N.: Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 448: 39-43, 2007.
21. Kros J., Austin P., Beslu N., Kroon E., Humphries R.K. and Sauvageau G.: In vitro expansion of hematopoietic stem cells by recombinant TAT-HOXB4 protein. *Nat Med* 9: 1428-1432, 2003.
22. Zhou H., Wu S., Joo J.Y., Zhu S., Han D.W., Lin T., Trauger S., Bien G., Yao S., Zhu Y., Siuzdak G., Sch?ler H.R., Duan L. and Ding S.: Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384, 2009.
23. Kim D., Kim C.H., Moon J.I., Chung Y.G., Chang M.Y., Han B.S., Ko S., Yang E., Cha K.Y., Lanza R. and Kim K.S.: Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4: 472-476, 2009.
24. Mi Z., Lu X., Mai J.C., Ng B.G., Wang G., Lechman E.R., Watkins S.C., Rabinowich H. and Robbins P.D.: Identification of a synovial fibroblast-specific protein transduction domain for delivery of apoptotic agents to hyperplastic synovium. *Mol Ther* 8: 295-305, 2003.