

●細胞膜透過性ペプチドとしてのリムキナーゼ2核小体移行性シグナル

先端科学研究所バイオインフォマティクスグループ 小林菜穂子、丹羽 幹夫、吉田 徹彦

リムキナーゼ2 (LIMK2)は、LIMドメインを内在するプロテインキナーゼである。LIMK2は、アクチン脱重合因子であるコフィリンをリン酸化することでアクチン重合を制御する機能を有する。また、LIMK2には、内皮細胞において、細胞質と核小体の間を移行するという特性がある。LIMK2に内在する13アミノ酸鎖長の塩基性アミノ酸に富む領域は、核小体移行性シグナル(NoLS)として、細胞質から核、及び核小体への移行において重要な役割を担っていることが報告されている。我々は、新しい細胞膜透過性ペプチド(CPPs)の探索を目的に、LIMK2のNoLSに着目した。CPPsは、タンパク質や核酸、ナノ分子等を細胞外から細胞内へ輸送する働きを有する機能性ペプチドである。LIMK2 NoLSに、神経分化に関与することで知られるVHLタンパク質由来のBC-boxモチーフペプチドや緑色蛍光タンパク質(GFP)を結合し、それらの細胞膜透過機能を評価した。その結果、LIMK2 NoLSは、細胞の種類や付加する生理活性物質の分子量の大きさに関わらず非常に優れた細胞膜透過機能を有するとともに、血液脳関門(BBB)を透過する特殊な機能を有することを見出した。本研究では、CPPとしてのLIMK2 NoLSの報告を通して、NoLSをベースとした新しいCPPsを提案する。

1 緒言

細胞膜透過性ペプチド(Cell penetrating peptides, CPPs)は、細胞外から細胞内へ移行する機能を有する約10~30アミノ酸鎖長の小さなペプチドである¹⁾。タンパク質や核酸、ナノ分子をCPPsに結合することで、これらの分子を効率よく細胞外から細胞内へ導入し機能させることができる^{2,3)}。従来用いられている細胞内への分子導入方法には、エレクトロポレーションやケミカルトランスフェクション、マイクロインジェクション等があるが、いずれも細胞へ大きなダメージを与えてしまうことが知られている。それに対して、CPPsは、低毒性で、且つ細胞の種類に関わらず優れた膜透過機能を有すると考えられていることから、ドラッグデリバリーシステムを始め様々な分野への応用が期待されている^{2,4,5)}。CPPsが最初に報告されたのは、1989年、HIV-1ウイルスのTransactivating protein(Tat)が細胞膜を透過し細胞質内へ移行するという発見であった^{6,7)}。1991年には、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の転写制御因子Antennapedia由来のpAntp43-58(Penetratin)が、細胞膜を透過することが報告された⁸⁾。その後、天然に存在するタンパク質の低分子ドメインやポリアルギニンの様な人工ペプチド等がCPPsとして見出されてきた。現在、30種類以上のCPPsが報告されており、大きく7種類のファミリー(塩基性CPPs、疎水性CPPs、プロリンリッチCPPs、キメラCPPs、 β -ペプチド、両親媒性ペプチド、及び抗菌ペプチド)に分類できる⁹⁾。CPPsの膜透過メカニズムには諸説ある。主に、TatやPenetratinがエンドサイトーシスにより膜透過するという報告¹¹⁾から、CPPsの膜透過には細胞膜上に存在するレセプターは関与しないと考えられている^{1,10)}。また、Tatはヘパラン硫酸(HS)プロテオ

グリカンへの結合に関与しないことからエンドサイトーシス依存型膜透過ではないという意見もある¹²⁾。このように、CPPsの細胞膜透過機能のメカニズムは明確に解明されておらず、現在議論中である。

LIMK2は、LIMドメインと呼ばれるシステイン残基に富む亜鉛結合ドメインを内在するリムキナーゼファミリーに属するタンパク質である¹³⁾。LIMドメインは、遺伝子発現制御や細胞構築、細胞接着、細胞運動性、シグナル伝達等に関係する様々なタンパク質に内在することが知られている。LIMK2は、コフィリンのリン酸化を介してアクチン細胞骨格の再構築を制御する機能を有する¹⁴⁾。アクチンフィラメント動態において、次のようなシグナル伝達系が作動する。Rho-associated, coiled coil containing protein kinase(ROCK)がLIMK2のThr-505をリン酸化することにより、LIMK2が賦活化する。賦活化したLIMK2はアクチン脱重合因子コフィリンをリン酸化することにより不活性化する。これによりアクチン重合が起こるのである¹⁵⁻¹⁷⁾。また、LIMK2には、同じくリムキナーゼファミリーに属するLIMK1には見られない核小体に蓄積するという性質が報告¹⁸⁾されている。このユニークな性質の要因となっているのが、核小体移行性シグナル(Nucleolar localization signal, NoLS)である。ヒトLIMK2(hLIMK2)では、塩基性アミノ酸に富む領域(アミノ酸491番目から503番目)が核小体への移行機能を担うNoLSとして同定されている^{18,19)}。また、hLIMK2 NoLSの核小体移行機能は、NoLSに内在するThr-494のリン酸化によって阻害されることが報告されている¹⁸⁾。我々は、NoLSが核小体移行機能とともに細胞膜透過機能を有するという仮説を立て、LIMK2 NoLSに生理活性ペプチドやタンパク質を結合し、それらの細胞膜透過活性を検証した。その結果、LIMK2 NoLSは、最

も利用されているCPPであるポリアルギニン(R9)より優れた細胞膜透過機能を有することを見出した。更に、ドラッグデリバリーシステムへの応用課題として挙げられる脳内すなわち血液脳関門(Blood-brain barrier、BBB)の透過活性についてもマウス生体内実験により検証したところ、BBBを透過する機能を有することを見出した。

2 実験

2.1 ペプチド合成

ペプチド合成は、9-fluorenylmethyloxycarbonyl(Fmoc)固相合成法を用いて行った。HOBtとDICを用いた脱水縮合反応によりrink amide MBHA resin(Novabiochem)上にアミノ酸を伸長した後、N末端側に6-aminocaproic acid(Acp)リンカーを介してfluoresceinisothiocyanate isomer-I(FITC)を結合した。その後、reagent K(82.5% trifluoroacetic acid、5% water、5% *m*-cresol、及び2.5% 1,2-ethanedithiol)を5時間反応させ、側鎖の脱保護、及びレジンの切断を行った。その後、冷ジエチルエーテルによりペプチドを沈殿させ、遠心分離(2000rpm、5分)により回収した。HPLCを用いてODSカラムにより純度95%以上に精製した。

2.2 リコンビナント融合タンパク質の合成

GFPのN末端にhLIMK2_{NoLS}を融合したタンパク質(hLIMK2_{NoLS}-GFP)をコードするように融合遺伝子(人工合成DNA)を作製し、昆虫細胞を用いたバキュロウイルス発現システムによって目的の融合タンパク質を生合成した。

制限酵素Bgl-ⅡとXba-Ⅰ(Takara)により人工合成DNAの両端を切断し、同じ制限酵素で切断したpM15ベクター(片倉工業)に組み込んでトランスファーベクターを作製した。これをバキュロウイルスCPd株のゲノムDNA(片倉工業)とBmN細胞(片倉工業)へ共感染させ、組み換えウイルスを作製した。得られた組み換えウイルスをカイコ(*Bombyx mori*、片倉工業)に感染させ、蛹になるまで飼育した後、蛹を摩砕用のバッファー[20mM Tris-HCl(pH 8.0)、150mM NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、10% glycerol、10mM benzamidine、1mM PMSF、及び1mM DTT]中でテフロン加工ホモジナイザーを用いて破碎した。得られた破碎液にTween20を濃度1%となる様に添加し、4℃で1時間攪拌し可溶化した後、超遠心分離(100000g×1時間、4℃)を行い、hLIMK2_{NoLS}-GFPを含む可溶性画分を得た。本可溶性画分をPD-10脱塩カラム(GE-Healthcare)を用いて、吸着バッファー[20mM phosphate(pH 7.5)、500mM NaCl、1mM DTT、及び5mM imidazole]に置換させた後、HisTrapカラム(GE-Healthcare)に添加してhLIMK2_{NoLS}-GFPを結合させた。同バッファーにより洗浄した後、溶出バッファー[20mM phosphate(pH 7.5)、500mM

NaCl、及び500mM imidazole]でhLIMK2_{NoLS}-GFPを溶出させた。得られた溶出画分をD-PBSにバッファー置換した後、フィルター(0.45μm膜)滅菌処理を行った。

2.3 細胞培養

ヒト皮膚線維芽細胞(HNFs、新生児由来、CCD-1079sk、ATCC)は、90% Eagle's minimum essential medium(2mM L-glutamine、Eagle's BSS、0.1mM non-essential amino acids、及び1mM sodium pyruvate含有)に10% fetal bovine serumを添加した培地を用い、ゼラチンコートディッシュ上にて37℃、5% CO₂環境下で培養した。培養した細胞を0.05% Trypsin/EDTAを用いて剥離し、ゼラチンコート8ウェルチャンバースライド(BD Falcon)上に密度2.5×10⁴cells/wellとなるように播種した。

神経幹細胞(NSCs)は、C57BL/6Nマウス(生後7日)の側脳室から単離した。Dulbecco's modified Eagle medium/F12(DMEM/F12)(2mM L-glutamine、N2 supplement、50units/50μg/ml penicillin/streptomycin、20ng/ml bFGF、及び20ng/ml EGF含有)を用いて低接着表面ディッシュ(Iwaki)上にて、37℃、5% CO₂環境下で7日から10日間培養し、ニューロスフェア(神経球)を作製した。ピペッティングにより作製したニューロスフェアを単一細胞に分離し、ポリ-D-リシン/ラミニンコート8ウェルチャンバースライド(BD Falcon)上に密度2.5×10⁴cells/wellとなるように播種した。

ヒト人工多能性幹細胞(iPSCs、201B2、京都大学)²⁰は、ヒト胚性幹細胞培地(DMEM/F12、20% knockout serum replacement(KSR)、2mM L-glutamine、0.1mM non-essential amino acids、0.1mM 2-mercaptoethanol、50 units/50μg/ml penicillin/streptomycin、及び4ng/ml bFGF)を用いて、mitomycin C処理したSNLフィーダー細胞を播種したゼラチンコートディッシュ上にて37℃、5% CO₂環境下で培養した。培養したiPSCsをCTK溶液(1mg/ml collagenase IV、2.5% trypsin、0.1M CaCl₂、及び20% KSR含有)処理により回収し、ピペッティングにより小凝集塊の懸濁液を作製し、mitomycin C処理したSNLフィーダー細胞を播種したゼラチンコート8ウェルチャンバースライド上に播種した。

2.4 合成ペプチド(FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS})とリコンビナント融合タンパク質(hLIMK2_{NoLS}-GFP)の細胞膜透過性評価(*in vitro*)

FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS}ストック溶液(1mM)を既定濃度となるよう細胞培養液に添加し、37℃、5%CO₂環境下で培養した。培養後、冷メタノールを用いて細胞を固定し、DAPI含有蛍光褪色防止剤(Invitrogen)を用いて封入した。また、hLIMK2_{NoLS}-GFPストック溶液(350μg/ml)を既定濃度となるよう細胞培養液に添加し、37℃、5% CO₂環境下で培養し

3 結果

3.1 LIMK2 NoLS結合ペプチド

hLIMK2 NoLS(アミノ酸491番目から503番目)のアミノ酸配列は、KKRTLKNDKRRである^{18,19}。げっ歯類のLIMK2タンパク質にはhLIMK2 NoLSと高い相同性のある領域が存在する(rLIMK2 NoLS: KKRTLKSDRKKR)。各々のNoLSのC末端に、ヒトVon Hippel-Lindau (VHL)タンパク質のBC-boxモチーフ領域(アミノ酸157番目から171番目)に由来する15アミノ酸残基のペプチド(VHLペプチド)、及びFITCを結合した。VHLペプチドは、既に骨髄間質細胞や皮膚由来前駆細胞から神経系細胞への分化誘導に関与する生理活性ペプチドとして報告されている^{21,22}。VHLペプチドを結合したヒト、及びげっ歯類のLIMK2 NoLSにFITCを結合し、各々、^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}、及び^{FITC}-VHL-rLIMK2_{NoLS}と名付けた。また、hLIMK2 NoLSのN末端にGFPを結合し、hLIMK2_{NoLS}-GFPと名付けた。比較CPPとしてR9を用い、R9のN末端にVHLペプチド及びFITCを結合し、^{FITC}-R9-VHLと名付けた(**Table 1**)。

3.2 HNFsに対する細胞膜透過性(*in vitro*)

^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}を濃度1 μ MとなるようにHNFs培養液中に添加し、1時間及び4時間培養処理を行った。^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}は、1時間以内に、細胞膜及び核膜を移行することが明らかとなった。また、細胞膜を移行したペプチドは少なくとも4時間までは核や細胞質に蓄積することが明らかとなった(**Fig. 1**)。次に、分子量の大きな生理活性物質の輸送機能を調べるために、分子量約28kDaのhLIMK2_{NoLS}-GFPを濃度1 μ g/ml、3 μ g/ml、または10 μ g/mlとなるよう培養液中に添加し、2時間及び14時間培養処理を行った。その結果、hLIMK2_{NoLS}-GFPの細胞膜透過は2時間以内に起こることが明らかとなった。しかし、^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}の場合と異なり、培養2時間の間に、細胞質内においてhLIMK2_{NoLS}-GFPの分解が開始しており、蛍光シグナルは主に核及び核小体で検出された。更に、hLIMK2_{NoLS}-GFPを異な

た。培養後、冷メタノールを用いて細胞を固定した後、免疫染色を行った。細胞を5% goat serumを用いてブロッキングした後、一次抗体にrabbit anti-GFP(1:500、Invitrogen)、二次抗体にAlexa Fluor 555 goat anti-rabbit IgG (1:800、Invitrogen)を用いて染色を行い、DAPI含有蛍光褪色防止剤を用いて封入した。共焦点レーザー顕微鏡(confocal laser scanning microscopy、CLSM、LSM 510 ver 3.2、Carl Zeiss)を用いて、各々の封入サンプルにおける蛍光シグナルを検出することによりNoLS結合ペプチド及びタンパク質の細胞膜透過機能を評価した。

2.5 iPSCsによる合成ペプチドの取り込み量の測定

ペプチドストック溶液(1 mM)を既定濃度となるよう細胞培養液に添加し、37°C、5% CO₂環境下で1時間培養した。培養後、細胞を冷メタノールで固定し、DAPI含有蛍光褪色防止剤を用いて封入した。細胞内のFITC蛍光強度をCLSM解析により測定した。(アルゴンレーザー励起波長488nm; 対物レンズPlan-Apochromat 20 \times /0.75; xyイメージ; 1024 \times 1024ピクセル; スキャン時間31.46秒; スキャン回数4)ペプチドの相対蛍光強度を^{FITC}-R9-VHL(1 μ M)の取り込み量を1として算出した。測定は、独立して3回実施し、その平均値を蛍光強度とした。

2.6 合成ペプチドのBBB透過性評価(*in vivo*)

C57BL/6N(体重20~25g/匹)マウスに、1 μ mol/kg ^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}を腹腔投与した。また、コントロールとして同濃度のFITCを腹腔投与した。腹腔投与16時間後、マウスをPBSで灌流し、4% paraformaldehydeで固定した。その後、脳を取り出し、凍結切片(脳冠状切片、10 μ m)を作製した。CLSMを用いて凍結切片中のFITC蛍光シグナルを検出することにより^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}のBBB透過活性を評価した。

Table 1 LIMK2 NoLS結合ペプチド、タンパク質、及びR9結合ペプチド

Sequence ^a	Structure ^b	Residues	Mw.
TLKERCLQVVRSLVKK KKRTLKNDKRR	^{FITC} -VHL-hLIMK2 _{NoLS}	28	3981.9 Da
TLKERCLQVVRSLVKK KKRTLKSDRKKR	^{FITC} -VHL-rLIMK2 _{NoLS}	28	3954.9 Da
KKRTLKNDKRR -GFP	hLIMK2 _{NoLS} -GFP	278	28 kDa
RRRRRRRRR TLKERCLQVVRSLVK	^{FITC} -R9-VHL	24	3679 Da

^a) LIMK2 NoLS及びpoly-arginine (R9) は太字標記。 ^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}、 ^{FITC}-VHL-rLIMK2_{NoLS}、 及び^{FITC}-R9-VHLのC末端はアミド修飾。 GFP : green fluorescent protein.
^b) FITC : Fluorescein isothiocyanate isomer-I ; VHL : the BC-box motif of VHL protein (aa157-171)、hLIMK2_{NoLS} : human LIM kinase 2 nucleolar localization signal peptide、rLIMK2_{NoLS} : げっ歯類のhLIMK2_{NoLS}との相同領域。

る濃度で添加し培養した結果、濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ から $10 \mu\text{g/ml}$ へ増加するにつれて、核、及び核小体における蛍光シグナル強度が増加したことから、hLIMK2 NoLSの膜透過機能は濃度依存性を示すことが明らかとなった (Fig. 2A)。また、hLIMK2_{NoLS}-GFPを濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ で培養処理すると、培養処理2時間後に強い蛍光シグナルが検出されたが、培養処理14時間後になると蛍光シグナル強度が低下したことから、hLIMK2_{NoLS}-GFPは一度、細胞膜及び核膜を移行した後、14時間以内に分解されることが確認された (Fig. 2B)。

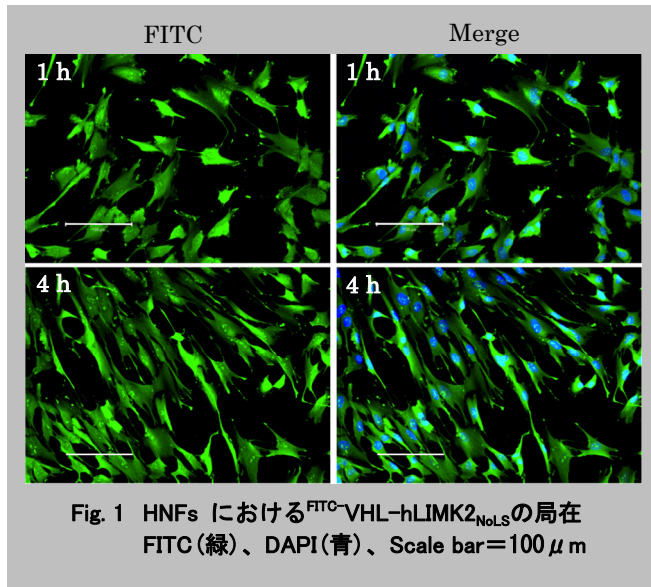


Fig. 1 HNFs における FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} の局在 FITC (緑)、DAPI (青)、Scale bar = $100 \mu\text{m}$

3.3 NSCsに対する細胞膜透過性 (in vitro)

異なる濃度の FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} ($0.05 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ 及び $1 \mu\text{M}$) をマウス新生仔由来 NSCs 培養液中に添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で培養処理を行った。FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} ($1 \mu\text{M}$) の細胞膜及び核膜の移行は培養30分で確認された。そこで、30分、1時間、2時間、6時間後に経過観察を行った。その結果、FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} は、30分から2時間にかけて徐々に細胞質、核、核小体へと移行し、それ以降は核や核小体への更なる移行が起らなかった。一方、細胞質への移行は少なくとも6時間継続された。これらのことから、FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} の細胞膜移行は時間依存性を示すことが明らかとなった。また、濃度 $0.05 \mu\text{M}$ 及び $0.2 \mu\text{M}$ の場合でも同様の結果が得られた (Fig. 3)。

3.4 iPSCsに対する細胞膜透過性 (in vitro)

異なる濃度の FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} ($0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 及び $4 \mu\text{M}$) を iPSCs 培養液中に

添加し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 環境下で1時間培養処理を行った。濃度 $0.5 \mu\text{M}$ において検出された弱い蛍光シグナルは、 $1 \mu\text{M}$ から $4 \mu\text{M}$ へと、濃度の上昇に伴い増加したことから、FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} の細胞膜透過機能は濃度依存性を示すことが明らかとなった。また、細胞の拡大イメージによると、

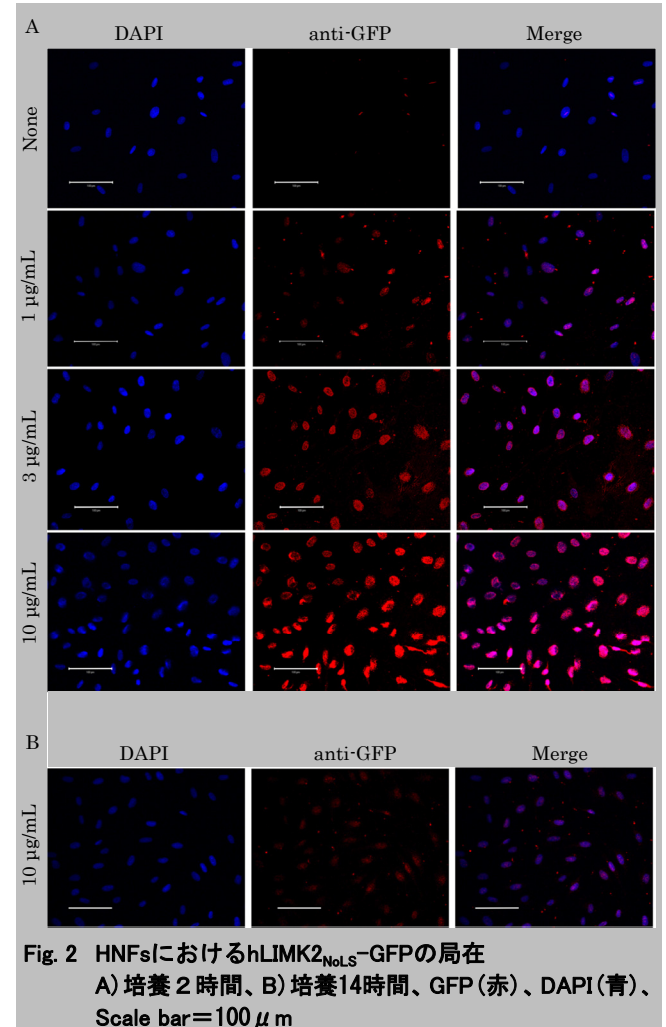


Fig. 2 HNFs における hLIMK2_{NoLS}-GFP の局在 A) 培養2時間、B) 培養14時間、GFP (赤)、DAPI (青)、Scale bar = $100 \mu\text{m}$

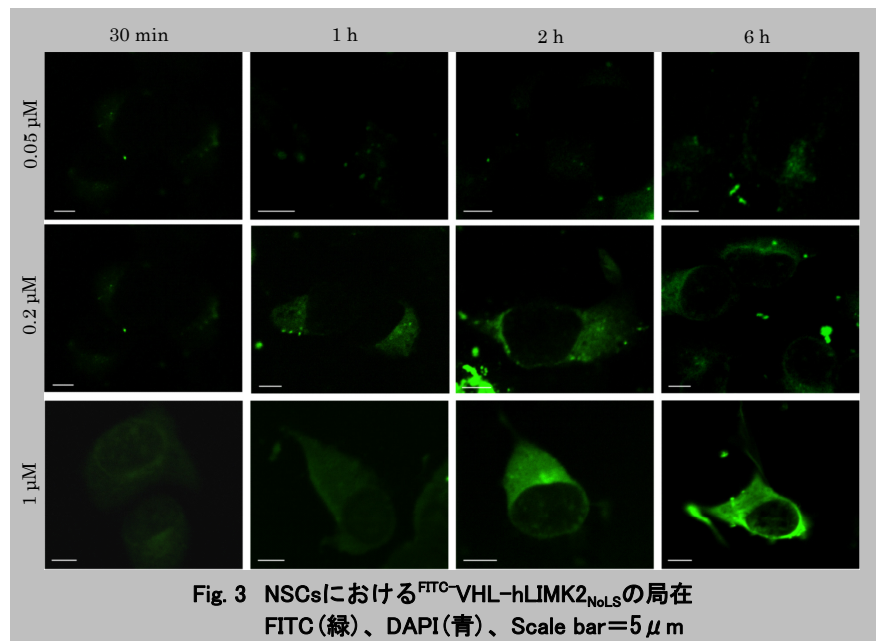


Fig. 3 NSCs における FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS} の局在 FITC (緑)、DAPI (青)、Scale bar = $5 \mu\text{m}$

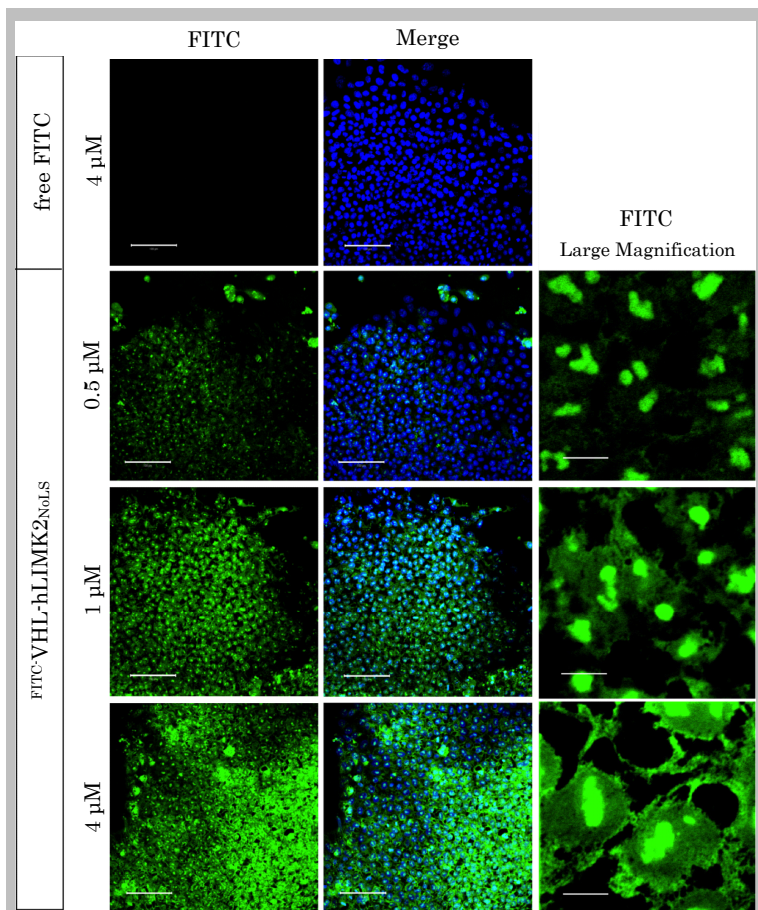


Fig. 4 iPSCsにおける^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}の局在
FITC(緑)、DAPI(青)、Scale bar=100 μm

ほどの強い蛍光シグナルが検出された。これに対し、コントロールとして用いた4 μM FITCでは、バックグラウンドレベルの蛍光シグナルしか検出されなかった。従って、^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}は、細胞膜を透過した後、優先的に細胞質ではなく核小体へ移行する機能を有していることが明らかとなった (Fig. 4)。

LIMK2 NoLSと人工細胞膜透過性ペプチドとしてよく用いられているR9を比較するために、iPSCsによる^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}、^{FITC}-VHL-rLIMK2_{NoLS}、及び^{FITC}-R9-VHLの取り込み量を定量した。各々のペプチド(濃度0.5 μM、1 μM及び4 μM)を添加し、37°C、5% CO₂環境下で1時間iPSCsの培養処理を行い、CLSMを用いて細胞内蛍光シグナル強度を定量した。^{FITC}-R9-VHLは、濃度0.5 μM及び1 μMにおいて、細胞による取り込みが殆ど無いが、4 μMになると取り込み量が増加した。これに対し、^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}の取り込み量は、0.5 μMでは^{FITC}-R9-VHLの12倍、1 μMでは7.4倍であった。また、^{FITC}-VHL-rLIMK2_{NoLS}の取り込み量は、0.5 μMでは^{FITC}-R9-VHLの17倍、1 μMでは9.4倍であった。最も高い取り込み量を示したのは、4 μM ^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}の場合で、同濃度の^{FITC}-R9-VHLに比べると1.7倍であった。以上のことから、iPSCsに対するLIMK2 NoLSの細胞膜透過機能は、ポリアルギニンに比べて優れていることが明らかとなった。また、その性能の差は、特に低濃度において顕著に示された (Fig. 5)。

4 μMという高濃度では、iPSCsによる取り込みは、飽和レベルに達している可能性があり大きな差が出なかったと考える。

LIMK2 NoLSに分子量の大きな生理活性物質をiPSCs内へ輸送する機能があるかどうかを検証するために、異なる濃度のhLIMK2_{NoLS}-GFP(1 μg/ml、3 μg/ml及び10 μg/ml)をiPSCs培養液中に添加し、37°C、5% CO₂環境下で1時間培養処理を行った。蛍光シグナルは、主に、核及び核小体で検出された。また、添加タンパク質濃度の上昇に伴って、蛍光シグナル強度が増加した。一方、コントロールとして用いた10 μg/ml GFPによる培養処理では、バックグラウンド程度の蛍光シグナルしか検出されなかった。以上のことから、hLIMK2_{NoLS}-GFPのiPSCs内への移行は、^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}の場合と同様に濃度依存性を示すことが明らかとなった (Fig. 6)。

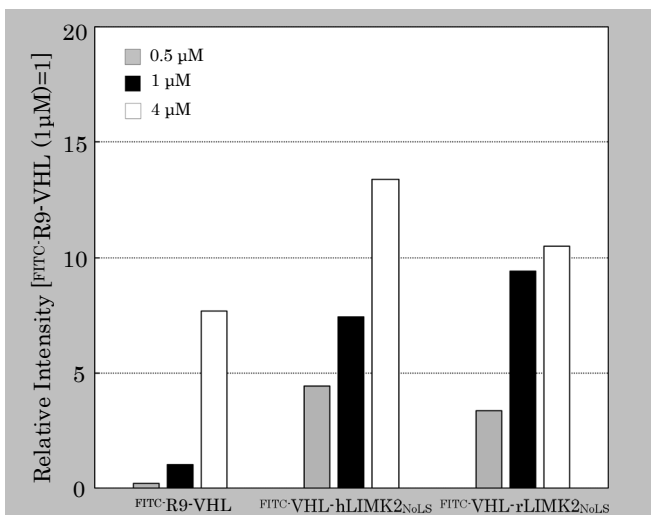


Fig. 5 iPSCsによるLIMK2 NoLS結合ペプチドとR9結合ペプチドの取り込み量

評価した3段階の濃度いずれにおいても、^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}は核小体に蓄積していることが確認された。低濃度(0.5 μM)の場合、主に核小体で蛍光シグナルが検出されたが、1 μMの場合には、核小体、核及び細胞質においてより強い蛍光シグナルが検出された。更に、4 μMの場合には、核小体、核及び細胞質においてiPSCsの輪郭をはっきりと浮かび上が

3.5 ^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}のBBB透過性 (in vivo)

LIMK2 NoLSがBBBを透過し、脳組織へVHLペプチドを輸送する機能を有するかどうかを検証するために、C57BL/6Nマウスに^{FITC}-VHL-hLIMK2_{NoLS}を腹腔内投与(1 μmol/kg)した。また、コントロールとして同濃度のFITCを腹腔内投与した。

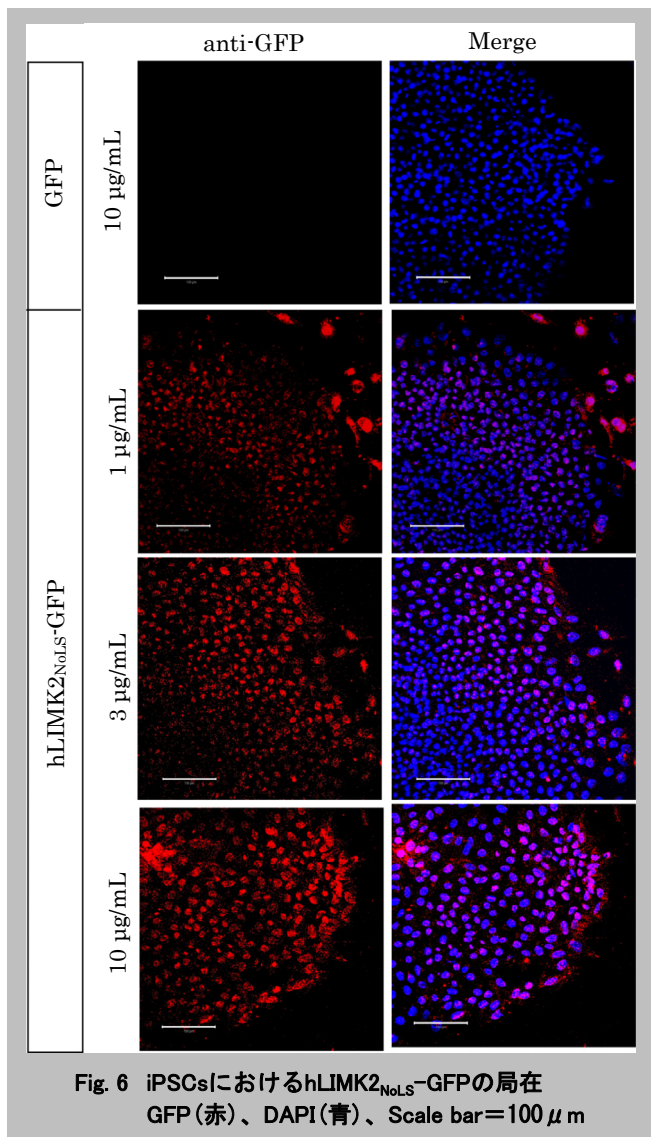


Fig. 6 iPSCsにおけるhLIMK2_{NoLS}-GFPの局在
GFP(赤)、DAPI(青)、Scale bar=100 μm

腹腔内投与16時間後に解剖し、作製した脳冠状切片をCLSMを用いて解析したところ、FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS}を投与したマウス的大脑皮質において、強い蛍光シグナルが検出された。一方、FITCを腹腔内投与したマウス的大脑皮質には、バックグラウンド程度の蛍光シグナルしか検出されなかった。以上のことから、LIMK2 NoLSは、BBB透過機能を有し、更にその機能は、通常BBBを透過できる限界サイズ(分子量500Daを超える分子サイズ)を遥かに超える分子を輸送できることが実証された(Fig. 7)。

4 考察

現在、様々な生理活性物質を輸送するための新しい技術としてペプチドを基にしたベクターが注目されている。最初のCPPであるHIV-1 Tatが発見されて以来、約二十年間に亘り様々なタンパク質に由来する新しいCPPsの探索、並びに、CPPsのメカニズムの解明研究が盛んに行われてきた。本研究において、我々は、NoLSに着目するという新しいアプロ

ーチにより非常に優れたCPPを発見した。LIMK2に内在する塩基性アミノ酸リッチなモチーフ領域(491番目から503番目のアミノ酸配列)は、核膜を透過し核小体へ移行する役割を担うNoLSとして同定されていたが、このモチーフ領域の細胞膜透過機能については全く知られていなかった。実際に、LIMK2 NoLSの発見者が、LIMK2 NoLSの核移行における活性部位の特定にエレクトロポレーションによるトランジェントトランスフェクションを用いた¹⁸⁾ように、NoLSには細胞膜透過機能がないと考えられてきた。LIMK2は、アクチン重合を制御する機能を有する核小体移行性タンパク質であり、分泌タンパク質や膜タンパク質の様な細胞外で機能するタンパク質ではないこと、またウイルス由来のタンパク質ではないこと等から、LIMK2と細胞膜透過機能が結びつかなかったことが理由と考える。近年、細胞質から核への移行を制御することで知られる核移行性シグナル(Nuclear localization signal, NLS)に細胞膜透過機能が見出されていることから、我々は、NoLSには核小体移行機能だけでなく細胞膜透過機能が内在するという仮説をたて、様々な種類の細胞(HNFs, NSCs及びiPSCs)を用いてLIMK2 NoLSの細胞膜透過機能評価を行った。その結果、LIMK2 NoLSに、CPPとしての有用性があることを見出した。

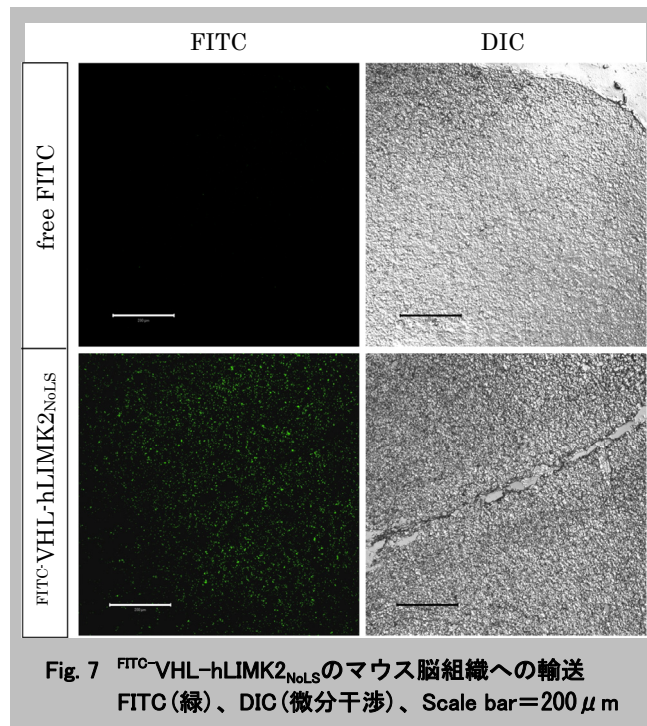


Fig. 7 FITC-VHL-hLIMK2_{NoLS}のマウス脳組織への輸送
FITC(緑)、DIC(微分干渉)、Scale bar=200 μm

NoLSは、HIV-1 TatやHVS ORF57のようにNLSと同じモチーフを共有する場合もあり、NLSと共に議論されることが多い。しかし、NLSは核膜孔複合体(Nuclear pore complexes, NPCs)に依存して核と細胞質の間を移行することや、更にその移行はβ-Karyopherin(Kap)に仲介されることが明らかとなっている²³⁾一方、NoLSがどのようなメカニズムで核小体に移行しているのかは明らかになっていない。現在のところ、

NoLSの移行機構としては、NLSの様に核膜に存在する認識モチーフを標的にしているのではなく、核小体に存在するタンパク質や核酸と高親和性を示し相互作用するために起こると考えられている¹⁸⁾。

^{Fluorescently} VHL-hLIMK2_{NoLS}は、HNFs、NSCs及びiPSCsにおいて、濃度依存的に、細胞膜を透過した後、核膜を透過し、そして核小体へ移行した。分子量の大きなLIMK2_{NoLS}-GFPも同様に、濃度依存的にHNFsやiPSCsの細胞膜を透過した。また、げっ歯類のLIMK2に存在するヒトLIMK2 NoLSとの相同領域を評価したところ、ヒトLIMK2 NoLSと同様に細胞膜を透過した。更に、LIMK2 NoLSの細胞膜透過活性は、現在最も有効なCPPとして用いられるR9より優れていることが明らかとなった。

更に、マウスを用いた生体内評価実験において、腹腔内投与した^{Fluorescently} VHL-hLIMK2_{NoLS}が脳組織で検出されたことから、LIMK2 NoLSは、BBBを透過し、生理活性物質を脳組織へ輸送する機能を有することが明らかとなった。BBBは毛細血管内皮細胞によって形成されており、血中から中枢神経系への基質の透過を制御している。分子量が約500Da以下の小分子や脂質溶解性の小さなタンパク質はBBBを透過できるが、分子量の大きなタンパク質はBBBを透過できないか、或いは中枢神経系に移行するための受容体介在性トランスサイトシスが必要となる^{24, 25)}。BBBは、毒性のある生体異物の侵入から脳を保護するために重要な役割を担っているのである。しかしながら、神経変性疾患治療の新しいアプローチとして、治療を目的としたタンパク質等を脳内の神経細胞やグリア細胞へ安全かつ効率よく輸送することが求められている今日、BBBのtight junction (脳毛細血管で内皮細胞同士が密着結合した部位)が障壁となっている。我々は、LIMK2 NoLSのマウスBBB透過性評価を行い、LIMK2 NoLSが分子量500Daを超える大きなタンパク質を脳組織内へ輸送できるという非常に優れたBBB透過機能を有することを見出した。BBBを透過するCPPの報告は、1999年、HIV-1 Tatがβ-ガラクトシダーゼをマウス脳内へ輸送できるという発見から始まった²⁶⁾。続いて、ショウジョウバエに由来するPenetratinやSynBベクターに由来するSynB1にBBB透過機能が発見された^{4, 27, 28)}。現在、脳腫瘍などの治療を目的とした脳内への薬剤デリバリーが上述した3つのCPPsを中心に議論されている。LIMK2 NoLSを基にしたCPPは、初めてのヒトタンパク質に由来するBBB透過性CPP^{29, 30)}であり、ペプチドをベースとしたドラッグデリバリーシステムにおいて、新しい候補となり得ると考える。

引用文献

- 1) V. Sebbage, *Bioscience Horizons*, **2**, 64 (2009).
- 2) T. Teesalu, K. N. Sugahara, V. R. Kotamraju, and E.

- Ruoslahti, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 16157 (2009).
- 3) G. P. Dietz, E. Kilic, and M. Bähr, *Mol. Cell. Neurosci.*, **21**, 29 (2002).
- 4) G. P. Dietz and M. Bähr, *Mol. Cell Neurosci.*, **27**, 85 (2004).
- 5) U. Langel, *Handbook of Cell-penetrating peptides*, 2nd Ed., CRC/Taylor & Francis, Boca Raton, FL (2007).
- 6) A. D. Frankel and C. O. Pabo, *Cell*, **55**, 1189 (1988).
- 7) M. Green and P. M. Loewenstein, *Cell*, **55**, 1179 (1988).
- 8) A. Joliot, C. Pernelle, H. Deagostini-Bazin, and A. Prochiantz, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 1864 (1991).
- 9) R. Fischer, M. Fotin-Mleczek, H. Hufnagel, and R. Brock, *Chembiochem*, **6**, 2126 (2005).
- 10) J. P. Richard, K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, and B. Lebleu, *J. Biol. Chem.*, **278**, 585 (2003).
- 11) U. Koppelhus, S. K. Awasthi, V. Zachar, H. U. Holst, P. Ebbesen, and P. E. Nielsen, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **12**, 51 (2002).
- 12) M. Silhol, M. Tyagi, M. Giacca, B. Lebleu, and E. Vivès, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 494 (2002).
- 13) K. Nagata, K. Ohashi, N. Yang, and K. Mizuno, *Biochem. J.*, **343**, 99 (1999).
- 14) J. L. Kadrmaz and M. C. Beckerle, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 920 (2004).
- 15) T. Sumi, K. Matsumoto, and T. Nakamura, *J. Biol. Chem.*, **276**, 670 (2001).
- 16) S. T. Po'uha, M. S. Shum, A. Goebel, O. Bernard, and M. Kavallaris, *Oncogene*, **29**, 597 (2010).
- 17) T. Amano, K. Tanabe, T. Eto, S. Narumiya, and K. Mizuno, *Biochem. J.*, **354**, 149 (2001).
- 18) P. Goyal, D. Pandey, and W. Siess, *J. Biol. Chem.*, **281**, 25223 (2006).
- 19) E. Emmott and J. A. Hiscox, *EMBO Rep.*, **10**, 231 (2009).
- 20) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, *Cell*, **131**, 861 (2007).
- 21) Y. Yamazaki, H. Kanno, K. Maeda, T. Yoshida, N. Kobayashi, A. Kubo, Y. Yamaguchi, and T. Saito, *Neuroreport*, **21**, 287 (2010).
- 22) A. Kubo, T. Yoshida, N. Kobayashi, T. Yokoyama, T. Mimura, T. Nishiguchi, T. Higashida, I. Yamamoto, and H. Kanno, *Stem Cells Dev.*, **18**, 1523 (2009).
- 23) M. P. Rout, J. D. Aitchison, M. O. Magnasco, and B. T. Chait, *Trends Cell Biol.*, **13**, 622 (2003).
- 24) E. Kilic, U. Kilic, and D. M. Hermann, *CNS Drug Rev.*, **11**, 369 (2005).

-
- 25) B. J. Spencer and I. M. Verma, *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 7594 (2007).
 - 26) S. R. Schwarze, A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S. F. Dowdy, *Science*, **285**, 1569 (1999).
 - 27) S. V. Sarantseva¹, O. I. Bolshakova¹, S. I. Timoshenko, A. A. Kolobov, M. P. Vitek, and S. A. L. Schwarzman¹, *Biochemistry (Moscow) Supplemental Series B: Biomedical Chemistry*, **3**, 149 (2009).
 - 28) C. Rousselle, P. Clair, J. M. Lefauconnier, M. Kaczorek, J. M. Scherrmann, and J. Tamsamani, *Mol. Pharmacol.*, **57**, 679 (2000).
 - 29) N. Kobayashi, M. Niwa, H. Yang, and T. Yoshida, *Protein Pept Lett.*, **17**, 1480 (2010).
 - 30) 東亜合成株式会社. 人工ペプチド及びその利用. 国際公開WO 2009/093692号公報. 2009-07-30.