

## 論文内容の要旨

論文題目 新規エンドサイトーシス経路によるヘルペスシンプレックスウイルス VP22-PTD の細胞内取り込み

(Cellular internalization of Herpes Simplex virus protein VP22-PTD via a novel endocytic pathway)

氏名 西 賢二

細胞内に任意のペプチドやタンパク質、核酸などの生体高分子を導入する手法は、生物学の研究面のみならず、医療面からも需要が高い。しかし、これらの生体高分子は、脂質二重膜からなる細胞膜を透過することはできない。そのような中で、ここ 10 数年間に、細胞の中にペプチドやタンパク質を導入することができる、ペプチドやタンパク質ドメインがいくつか同定されている。それらは、protein transduction domain (PTD) や cell penetrating peptide (CPP) と呼ばれている。最も初期に発見された CPP は、ヒト免疫不全ウイルス 1 型の転写活性化因子由来の TAT と、キイロシヨウジョウバエのアンテナペディアのホメオドメイン由来の penetratin である。多くの CPP は 8 から 30 アミノ酸よりなり、塩基性アミノ酸の割合が高いこと、または両親媒性であることがその特徴である。そして、ペプチドやタンパク質、核酸などの導入したい物質を CPP と共有結合させることや混ぜることにより、細胞内に取り込ませて、機能させることに成功している。

CPP に関する初期の研究では、細胞への取り込みが 37°C でも 4°C でも、エンドサイトーシスの阻害剤存在下でも同じようにおこることから、CPP はエンドサイトーシスと異なる機構で細胞に取り込まれると考えられてきた。しかし、これらの結果は、細胞の固定によって細胞表面に結合していた CPP が核内に局在が変化すること、強く細胞表面に結合している CPP を細胞内に導入したものとして取り込み量を多く見積もっていたことによる誤りであることが明らかになった。そこで CPP の細胞への取り込み機構は再評価され、エンド

サイトーシスが関与することが分かってきた。

短いペプチド型の CPP だけでなく、より長いタンパク質型の PTD も存在する。その中で最もよく使われている PTD は単純ヘルペスウイルス 1 型の VP22 タンパク質由来のものである。VP22 は、キャプシドとエンベロープの間のテグメントと呼ばれる領域の主要な構造タンパク質である。そして、発現細胞からゴルジ体を介さないメカニズムで分泌され、再び周囲の細胞内に入る特性をもつという報告がなされている。VP22 の C 末端側半分（アミノ酸残基 159-301、VP22.C1）は、他の $\alpha$ ヘルペスウイルスの VP22 ホモログ間でよく保存されていて、細胞に取り込まれる能力を有する。VP22.C1 はフルオレセイン標識したオリゴヌクレオチドと直径 0.3-1.0 $\mu\text{m}$  の粒子を形成する。この粒子は細胞に取り込まれ、光照射により粒子が分解され、細胞内でアンチセンス効果が引き起こされる。また、VP22.C1 融合タンパク質が細胞内に導入され、生理機能を発揮したという例も報告されている。以上のことから、短いペプチド性の CPP と同様に、VP22.C1 を用いてタンパク質や核酸を細胞に導入できる可能性があると考えられる。ところが、今日まで、VP22.C1 が細胞に取り込まれる機構についての解析はなされていない。そこで、本研究では、VP22.C1 に GFP を融合したタンパク質（以下では VP22-GFP と呼ぶ）を用いて、その取り込み機構を解析することにした。

上述のように実験手法により誤った結論が導かれる可能性があるので、これまでの実験手法を改善し、パラホルムアルデヒドによる細胞固定は VP22-GFP の局在に影響を与えないこと、トリプシン処理で細胞表面に吸着した VP22-GFP を取り除くことによって細胞内に取り込まれた量が正確に測定できることをまず明らかにした。

第一に、VP22 の導入には 142 アミノ酸からなる領域が使われており、他の CPP に比べて長いので、より短くなるかを VP22.C1 内の一部を欠失させた変異体タンパク質を作製して調べた。作製した VP22(159-267)-GFP、VP22(225-301)-GFP、VP22(268-301)-GFP の 3 つのタンパク質はいずれも VP22(159-301)-GFP と比べて取り込みは 20%以下であった。VP22(268-301)は細胞に取り込まれるのに必要な部分として報告されていたが、それだけでは十分な取り込みが起こらないことが分かった。この結果から VP22 の PTD は VP22(159-301)であると考えられる。

次に、CPP では細胞表面のグリコサミノグリカンがその取り込みに重要な役割を果たしているという報告があるので、VP22-GFP の取り込みに対するグリコサミノグリカンの役割を調べた。細胞をコンドロイチン硫酸分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC またはヘパラン硫酸分解酵素であるヘパリチナーゼで処理したとき、後者でのみ VP22-GFP の細胞表面への吸着及び細胞への取り込みが減少した。ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、及びヘパラン硫酸の硫酸基の生合成に関わる酵素がそれぞれ欠損している 3 種類の CHO-K1 変異細胞株においても、野生型の細胞株に比べ、VP22-GFP の細胞表面への吸着

及び細胞への取り込みの著しい減少が見られた。この結果は、ヘパラン硫酸の硫酸基が VP22-GFP の細胞表面への吸着及び取り込みに特に重要であることを示す。そこで、硫酸基との結合に関わると予想される VP22-PTD 内の 23 個の塩基性アミノ酸を一つずつアラニンまたはグルタミン酸に置換した GFP 融合タンパク質を作成し、その細胞への取り込みを調べた。取り込み量にほとんど影響を与えない置換と取り込み量に影響を与える置換があったことから、VP22-PTD 内のアミノ酸の位置依存的なヘパラン硫酸との相互作用があると考えられる。

そして、VP22-GFP の取り込みは 4°C や細胞内 ATP 枯渇下で著しく抑えられることから、エンドサイトーシスが関与していることが分かった。エンドサイトーシスにはクラスリン依存性のもの、カベオラ依存性のもの、クラスリン/カベオラに非依存的で脂質ラフトを介するものなど様々な経路がある。そこで、ドミナントネガティブ型のタンパク質の過剰発現、RNAi、薬剤処理などの方法を用いて VP22-GFP がいかなるエンドサイトーシス経路によって細胞に取り込まれるのか解析した。VP22-GFP の取り込みは、ドミナントネガティブ型のダイナミン 2 が発現している細胞で著しく低下した。クラスリン依存性エンドサイトーシスの阻害剤クロプロマジンによって VP22-GFP の取り込みは増加し、クラスリン重鎖遺伝子に対する RNAi によってもその取り込みは抑えられなかった。脂質ラフトは、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んだ細胞膜上のマイクロドメインで、低温で Triton X-100 などの非イオン性界面活性剤に不溶であることが知られている。細胞表面の VP22-GFP は脂質ラフトのマーカー CD59 と同様に低温での Triton X-100 処理に対して耐性であった。さらに、コレステロールを除去するメチル- $\beta$ -シクロデキストリンやアクチンフィラメントを破壊するサイトカラシン D といった脂質ラフト依存性エンドサイトーシスの阻害剤で、VP22-GFP の細胞への取り込みは減少した。また、カベオラ依存性エンドサイトーシスと異なり、取り込み初期の段階において VP22-GFP はカベオリン 1 と共局在せず、Src ファミリーキナーゼを阻害する PP2 によって取り込みが阻害されず、チロシンホスファターゼを阻害するバナジン酸によって取り込みが阻害された。以上の結果から、VP22-GFP はクラスリン/カベオラ非依存的に、ダイナミンに依存して脂質ラフトを介するエンドサイトーシスで取り込まれることが分かった。

この経路ではこれまで Rho family GTPase がその取り込みに関わることが知られている。ところが、VP22-GFP の取り込みは Rho family GTPase の阻害剤である *Clostridium difficile* のトキシン B によって阻害されなかった。さらに、Rho family GTPase に属する RhoA、Cdc42 に対する RNAi によっても、ドミナントネガティブ型の Rac1 を細胞に発現させても、VP22-GFP の取り込みは阻害されなかった。この結果は、これまで知られている脂質ラフト依存性エンドサイトーシスとは異なり、Rho family GTPase 非依存的な機構で VP22-GFP

は細胞に取り込まれることを示す。また、Arf6 に対する RNAi により、VP22-GFP の取り込みが抑えられたことから、その取り込みには Arf6 が関わることが示唆される。

さらに、細胞に取り込まれた後の VP22-GFP の局在を調べた。取り込み後 15 分において初期エンドソームのマーカである EEA1 とはよく共局在したが、リソソームのマーカである LAMP1 やゴルジ体のマーカである GM130 との共局在は見られなかった。1 時間後においては、EEA1 との共局在は減少し、LAMP1 との共局在が見られるようになった。このときも GM130 との共局在は見られなかった。VP22-GFP がリソソームに入ることは、エンドソームの酸性化を抑えてリソソーム酵素の働きを阻害するクロロキンで処理したときに、その取り込み量が増加することからも確認できた。さらに、VP22-GFP とトランスフェリンを細胞に同時に取り込ませたとき、取り込みの定常状態で両者の共局在が観察されたので、VP22-GFP の一部はリサイクリングエンドソームにも入っていることが示唆された。

以上、VP22-PTD の細胞表面の結合及び細胞への取り込みにはヘパラン硫酸が必要なこと、VP22-PTD の細胞への取り込みはクラスリン/カベオラ/Rho family GTPases に非依存的でダイナミン/Arf6 必要とする脂質ラフト依存性エンドサイトーシスによって起こること、取り込まれた VP22-PTD はまず初期エンドソームに入り、そしてリソソーム及びリサイクリングエンドソームに向かうことが示された。特に、VP22-PTD の取り込み様式は、これまでに知られているエンドサイトーシスとは異なる機構で起こっており、興味深い結果である。