

キャリアペプチドによる RNA の細胞内導入法

はじめに

細胞内に侵入する性質をもつペプチドが近年多数報告され、cell-penetrating peptide (CPP) と総称されている (protein transduction domain と呼ばれる場合もある)。多くの CPP は塩基性に富んだアミノ酸配列をもつ。CPP の例としては、天然配列 (ウイルスのタンパク質に由来する Tat ペプチド、動物の転写因子に由来する penetratin ペプチドなど) の他に、これらを改変した配列や人工配列 (ポリアルギニンなど) がある。発見当初、CPP はその名の通り、細胞膜を透過して自発的に細胞内へ侵入すると考えられていたが、現在では主に細胞のエンドサイトーシス経路を経て侵入するという説が一般的である。CPP は、単独で細胞内に侵入するだけでなく、CPP に結合させたタンパク質や有機・無機化合物、核酸分子などの細胞内導入のためのキャリアとしても利用できる。CPP の細胞内侵入機構の詳細については他の総説に譲るとして¹⁾、本稿では CPP を利用した RNA の細胞内導入に焦点を当てて解説する。RNA の細胞内導入にはカチオン性の合成高分子キャリアが用いられることが多いが、CPP は合成高分子と比べると生体に悪影響を与える恐れが少ない。ここでは、RNAi を引き起こす short interfering RNA (siRNA) や short hairpin RNA (shRNA) の細胞内導入について取り上げる。RNAi とは siRNA や shRNA により配列特異的に遺伝子発現抑制が起こる現象である。以下では、RNA を CPP に共有結合させて細胞内導入した例と、共有結合によらずに結合させて導入した例に分けて述べる。

1. 共有結合型 RNA キャリアペプチド

運び手である CPP と積み荷分子とを共有結合させることで、確実に CPP の細胞内侵入性を積み荷分子に付加することができる (図 1A)。Chiu らはチオール基とマレイミド基の結合により CPP と siRNA をつないで RNA の細胞内導入を成功させたが、この問題点として、RNA が CPP に共有結合しているため RNAi 機構で重要な役割を果たす RNA-induced silencing complex (RISC) に siRNA が取り込まれにくくなることが懸念される²⁾。そのため、細胞質内に送達された後に CPP と siRNA とが自発的に離れることを狙い、ジスルフィド結合を介して CPP-siRNA を共有結合させ細胞内に RNA を導入する方法が報告されている³⁻⁵⁾。細胞質内は還元的環境なので、CPP-siRNA 間のジスルフィド結合が開裂するわけである。例えば Davidson らは penetratin を結合させた siRNA を用いて初代培養神経細胞への RNA 導入と標的であるスーパーオキシドジスムターゼ 1 やカスパーゼ-3 の発現抑制に成功している³⁾。ただし、初期 (2004 年) の報告^{2,3)}では、RNA と CPP を共有結合させた後、精製が不完全なまま細胞に投与しているため、本当に CPP-siRNA の形で共有結合したものが RNAi 効果に結びついているかは不明であった。また、siRNA 投与後、mRNA 量が低下しはじめる前にタンパク質量が低下しているなど矛盾点を含んでいた³⁾。その後、精製した CPP-siRNA を用いた報告によると、細胞レベルの実験で、初期の報告よりも 2 桁ほど高濃度 (10 μ M) の CPP-siRNA を用いてはじめて 20~60% の発現抑制が見られた^{4,5)}。まだ報告例が少ないため、この違いは RNAi ターゲットや細胞株の違いによるものかもしれない。今後、精製した CPP-siRNA を用いた、より系統的な研究結果が望まれる。

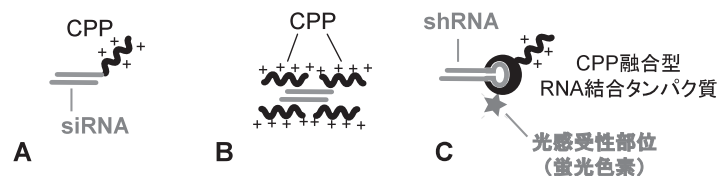


図 1 A. 共有結合型 RNA キャリアペプチド。B. 静電的相互作用により結合する RNA キャリアペプチド。C. shRNA のループ配列に特異的に結合する RNA キャリア (CPP 融合型 RNA 結合タンパク質)。このキャリアの C 末端には光感受性部位を付加してある。

2. 非共有結合型 RNA キャリアペプチド

2.1 静電的相互作用により非特異的に RNA に結合する キャリアペプチド

非共有結合型の RNA キャリアペプチドでは、共有結合型の場合と異なり siRNA をそのままの形 (RNAi を引き起こしやすい状態) で細胞内へ導入することができる。また、化学反応や精製などの煩わしい過程が必要なく、キャリアペプチドと siRNA とを混合して細胞に加えるだけという利点がある。最近、オリゴアルギニンや MPG などの CPP を、RNA と共有結合させることなく、RNA の細胞内導入に用いる研究例が幾つか報告されている⁶⁻⁹⁾。正電荷に富む CPP は RNA と静電的相互作用により結合し (図 1B)、RNA が CPP の正電荷で覆われるため、細胞膜との相互作用および細胞内への侵入が促進されると考えられる。なお、MPG は、HIV-1 の外皮タンパク質由来の疎水性ペプチド (N 末側) と、塩基性に富む SV40 large T 抗原由来の核移行シグナル (NLS) 配列 (C 末側) とを融合させた人工ペプチドである。MPG はプラスミドなどの DNA の導入に用いられてきたが、siRNA 導入においては MPG の NLS 配列部分に点変異を加えて核移行性を失くした MPG Δ NLS が用いられる⁶⁾。MPG Δ NLS では、塩基性を保ちつつ核移行シグナルとしての働きを抑えることで、導入された siRNA が核ではなく細胞質に留まり RNAi が起こるように設計されている。

2.2 RNA 配列特異的に結合するキャリアタンパク質

図 1B のタイプは静電的相互作用により RNA を細胞内に運ぶため、他の核酸やアニオン性生体分子の存在下では、それらも見境なく細胞内導入してしまう可能性が高い。そこで、筆者らは、特定の RNA 配列としか結合しないキャリアを設計した (図 1C 参照)。これは、CPP と RNA 結合タンパク質 (RBP) を融合させた非共有結合型の RNA キャリアタンパク質である。その一例として、スプライソソームに含まれる U1A タンパク質の RNA 結合ドメインと、CPP である Tat を融合した「TatU1A」を作製した。これに対応する RNA として U1A が認識する配列を付加した siRNA および shRNA を作製した。TatU1A を用いて細胞内への RNA 導入を評価してみたところ、通常の siRNA と比べて U1A が認識する配列を付加した siRNA を効率よく導入することができた¹⁰⁾。

非共有結合型の RNA キャリアの場合は、オリゴアルギニン、MPG、TatU1A 共に RNA と混合するときの量比が

導入効率に大きく影響してくる。例えば、RNA の負電荷：キャリアの正電荷で表すと、オリゴアルギニンの場合には 1:12 (モル比では 1:56)¹¹⁾、MPG の場合には 1:10 (モル比では 1:84)⁶⁾ などの荷電比で RNA 導入が行われている。正電荷をもつ CPP を過剰に混合して RNA の負電荷を打ち消すことで、同じく負電荷をもつ細胞膜という障害を乗り越えることができるようになるのであろう。筆者らの TatU1A の場合でもモル比で RNA : TatU1A = 1:1 では細胞内への導入効率は低く、1:5~10 (荷電比では 1:1.2~2.4) の条件で実験を行っている。特異的な相互作用による 1:1 の複合体では導入に不十分で、ある程度の非特異的な静電的相互作用の助けが必要と思われる。

3. RNA のエンドソーム局在と、光刺激による細胞質への RNA 放出

CPP による細胞内への分子導入はエンドサイトーシスを経由する結果、導入後の分子のエンドソーム局在がしばしば見られる。エンドソームから細胞質への移行の過程は完全には明らかになっておらず、CPP の種類や積み荷の種類により細胞質への到達効率は変わってくる。Lundberg らは前述の MPG も含め数種類の CPP をキャリアとして用い、細胞内への RNA 導入量と RNAi 効率を比較している¹²⁾。その結果、CPP によっては RNA 導入量が少なくても RNAi 効率が高かったり、逆に RNA 導入量は多くても RNAi 効果が見られなかったりした。つまり RNAi 効果発現までのボトルネックは、siRNA の細胞内侵入ではなくエンドソーム外放出 (細胞質への移行) なのである。筆者らの TatU1A を用いた場合も、細胞内に入った TatU1A/RNA 複合体はエンドソームに閉じ込められており、RNAi 効果が見られなかった。そこで筆者らは、TatU1A による RNA 導入と光照射による細胞質移行とを組み合わせることで RNAi の誘導を試みた。CPP に付加した蛍光色素に光を照射することでエンドソーム内にある CPP が細胞質移行した例については、幾つか報告がある^{13,14)}。TatU1A に蛍光色素 Alexa Fluor 546 を付加し (TatU1A-Alexa)、特異的に結合する shRNA と混合して細胞に添加した。続いて蛍光色素の励起波長 (530-550 nm) で照射したところ、TatU1A-Alexa/RNA 複合体はエンドソームから細胞質へと移行し、遺伝子発現の抑制を引き起こした (図 2)¹⁰⁾。このような現象が起こる機構は明らかになっていないが、励起状態の蛍光色素から生じる反応性の高い一重項酸素がエンドソーム膜を不安定にしたと考えている。この系では光照射をしなければほとんど RNAi は起こらず、光照射量により RNAi

効果をコントロールすることができた。TatU1A-Alexaのようなキャリアを用いて、光でRNAiのON/OFF制御をする方法を、(CPP-linked RBP-mediated RNA internalization and photo-induced RNAi) CLIP-RNAi法と名付けた¹⁰⁾。CLIPという部分に、光で「切り取る」ように遺伝子発現抑制ができるという意味を込めた。

おわりに

RNAiを介した特異的な遺伝子発現抑制法は、遺伝子の機能解析にはなくてはならない実験手法になってきた。同時に、遺伝子疾患やウイルス疾患に対する治療法としても注目を集めている。そのような中で、培養細胞レベルや個体レベルにおいて、安全かつ簡便にsiRNAやshRNAを細胞内導入できるキャリアの開発が強く望まれている。CPPを利用したRNAの細胞内導入は、汎用的な合成高分子キャリアと比較しても細胞毒性が低いと報告されており、特に非共有結合型のRNAキャリアはRNAと混合して細胞に添加するだけなので非常に簡便である。加えて、筆者らの研究では新型RNAキャリアの開発の中で、RNAi手法に光制御という側面を与えた。光照射は、その強度やタイミング、場所などを規定することが容易であるため、そのような特性を生かしたRNAi法の応用展開が期待される。

- 1) Futaki, S. ed. (2008) Special theme issue on membrane permeable peptide vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 447-614.
- 2) Chiu, Y.L., Ali, A., Chu, C.Y., Cao, H., & Rana, T.M. (2004) *Chem. Biol.*, **11**, 1165-1175.
- 3) Davidson, T.J., Harel, S., Arboleda, V.A., Prunell, G.F., Shelanski, M.L., Greene, L.A., & Troy, C.M. (2004) *J. Neurosci.*, **24**, 10040-10046.
- 4) Moschos, S.A., Jones, S.W., Perry, M.M., Williams, A.E., Erjefalt, J.S., Turner, J.J., Barnes, P.J., Sproat, B.S., Gait, M.J., & Lindsay, M.A. (2007) *Bioconjug. Chem.*, **18**, 1450-1459.
- 5) Turner, J.J., Jones, S., Fabani, M.M., Ivanova, G., Arzumanov, A.A., & Gait, M.J. (2007) *Blood Cells Mol. Dis.*, **38**, 1-7.
- 6) Simeoni, F., Morris, M.C., Heitz, F., & Divita, G. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2717-2724.
- 7) Veldhoen, S., Laufer, S.D., Trampe, A., & Restle, T. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, 6561-6573.
- 8) Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P., & Manjunath, N. (2007) *Nature*, **448**, 39-43.
- 9) Kumar, P., Ban, H.S., Kim, S.S., Wu, H., Pearson, T., Greiner, D.L., Laouar, A., Yao, J., Haridas, V., Habiro, K., Yang, Y.G.,

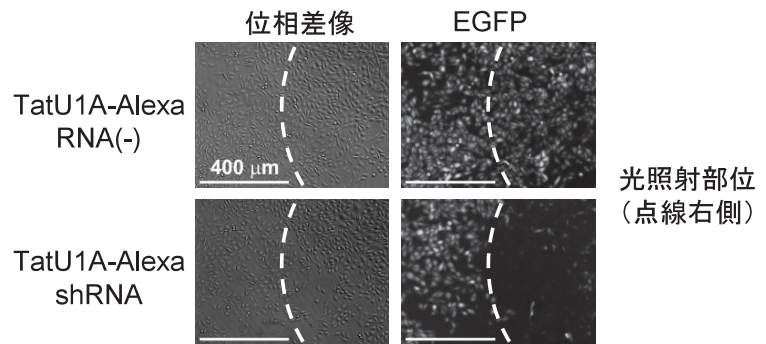


図2 TatU1A-Alexa (図1CタイプのRNAキャリア)によるshRNAの細胞内導入と光照射部位特異的なRNAi効果

EGFPを安定発現するCHO細胞に対してTatU1A-Alexaによりanti-EGFP配列のshRNAを導入し、530-550nmの光照射を行った(各写真の点線右側のみ)。照射24時間後に写真を撮った。shRNAを加えない場合(上)と加えた場合(下)について、位相差像(左)とEGFP蛍光像(右)を示す。

- Jeong, J.H., Lee, K.Y., Kim, Y.H., Kim, S.W., Peipp, M., Fey, G.H., Manjunath, N., Shultz, L.D., Lee, S.K., & Shankar, P. (2008) *Cell*, **134**, 577-586.
- 10) Endoh, T., Sisido, M. & Ohtsuki, T. (2008) *Bioconjug. Chem.*, **19**, 1017-1024.
 - 11) Wang, Y.H., Hou, Y.W., & Lee, H.J. (2007) *J Biochem. Biophys. Methods*, **70**, 579-586.
 - 12) Lundberg, P., El-Andaloussi, S., Sutlu, T., Johansson, H., & Langel, U. (2007) *FASEB J.*, **21**, 2664-2671.
 - 13) Maiolo, J.R., 3rd, Ottinger, E.A., & Ferrer, M. (2004) *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 15376-15377.
 - 14) Matsushita, M., Noguchi, H., Lu, Y.F., Tomizawa, K., Michiue, H., Li, S.T., Hirose, K., Bonner-Weir, S., & Matsui, H. (2004) *FEBS Lett.*, **572**, 221-226.

大槻 高史, 遠藤 玉樹

(岡山大学大学院自然科学研究科機能分子化学専攻
医用生命工学講座)

Cellular RNA delivery using carrier peptides
Takashi Ohtsuki and Tamaki Endoh (Department of Bio-science and Biotechnology, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan)