



東北大学



平成23年3月30日

東北大学大学院医学系研究科

HIV-1 タンパク質の細胞膜透過の仕組みをナノメートルレベルで可視化し解明
(ナノメートル精度の一分子可視化技術開発により、
HIV-1 タンパクの細胞膜透過機序を発見)

〈概要〉

東北大学大学院医学系研究科の鈴木康弘 講師の研究グループは、同研究科ナノ医科学寄附講座の権田幸祐 講師ら、東京大学大学院理学系研究科の樋口秀男 教授らと共同で、エイズウイルスが発現する TAT (Trans-activator of transcription) タンパク質の細胞膜上での動態を 7 ナノメートル (ナノメートル：ミリメートルの百万分の一) で直接可視化・解析する方法を世界で初めて開発しました。この方法により、TAT タンパク質が細胞表面の膜貫通タンパクに結合し、その後、細胞に侵入する様子を TAT タンパク質 1 分子ごとに観察し、その細胞侵入機序の解明に成功しました。TAT タンパク質の動態を 1 分子レベルで直接観察できるようになったことで、今後、その侵入機序の解析をもとにしたエイズの進行抑制法開発が期待されると同時に、TAT タンパク質の持つ侵入特性を利用して開発中の細胞へのタンパク質導入法の開発・改良が飛躍的に改善され、再生医学やがん治療法の開発等への応用が期待されます。

TAT はヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-1) *¹ の作る転写活性分子で、感染細胞の HIV-1 ウイルス転写量を増加させると同時に HIV-1 感染細胞から分泌され、近傍の非感染 T 細胞に直接侵入しアポトーシスを引き起こし、HIV-1 感染症の免疫不全進行に深く関わっていることが示されてきました。また、TAT タンパク質中の 11 個のアミノ酸ドメイン、膜透過性ペプチド*² が膜透過性を引き起こすことが明らかになり、その後、膜透過性ペプチドを付加することでタンパク質、ペプチド、低分子化合物などを細胞内に直接導入し機能させるタンパク質導入法が開発され、がんや iPS 細胞作成などの再生医学への幅広い応用が期待されています。このように、TAT タンパク質は、HIV-1 治療の観点と生物活性分子の細胞直接導入法の開発の 2 つの観点から注目を集めています。ところが、これまでの研究では TAT タンパクの細胞内侵入過程を直接的に観察する方法が存在せず、その侵入の仕組みは謎とされてきました。

本研究グループは量子ドット*³ (蛍光性ナノ粒子) が結合した HIV-1 TAT タンパク質の膜透過性ペプチド分子を作製し、独自に開発した 1 分子顕微鏡を用いることで、世界で初めて、TAT-膜透過性ペプチド 1 分子の動態を生細胞上で 7 ナノメートルの精度で 1 時間以上の長時間にわたり 23 ms/frame という高速で直接可視化・定量化する方法の開発に成功しました。その結果、(1) 膜透過性ペプチドは最初に細胞表面のヘパラン硫酸プロテオグリカン*⁴ に結合し、(2) ヘパラン硫酸プロテオグリカンを架橋し、細胞内取り込み機序

を活性化させることで効率的に細胞内侵入を行っていること、(3) 膜透過性ペプチドの価数を 8 倍にし、細胞表面へパラン硫酸プロテオグリカン結合力及び架橋力を上昇させると、細胞内導入効率を 100 倍以上に改善することができることを示しました。本研究によって、はじめて分子レベルで HIV-1 TAT タンパク質由来膜透過性ペプチドの細胞内侵入の仕組みを直接的に可視化解明することができました。

TAT タンパク質の細胞での動態を分子レベルで直接観察できるようになったことで、今後、その侵入機序の解析をもとにしたエイズの進行抑制法開発が期待されると同時に、TAT タンパク質の持つ侵入特性を利用して開発中の細胞へのタンパク質導入法の開発・改良が飛躍的に改善され、再生医学やがん治療法の開発等への応用が期待されます。本研究の成果は生命科学分野の学術誌「Journal of Biological Chemistry」(アメリカ生化学・分子生物学会誌)の 2011 年 3 月 25 日号に発表されました。

<詳細>

TAT はヒト免疫不全ウイルス I 型 (HIV-1) の作る転写活性分子で、感染細胞の HIV-1 ウイルス転写量を増加させると同時に HIV-1 感染細胞から分泌され、非感染 T 細胞内に直接侵入しアポトーシスを引き起こし、免疫不全進行に関与することが示されてきました。このことから、現在、TAT を標的とした抗ウイルス薬やワクチンの開発が世界中で行われています。細胞は脂質膜に包まれて外部から隔離されています。このため様々な高分子物質を細胞内に取り込ませるには、この脂質膜の関門を通り抜けさせなければなりません。タンパク質は高分子で細胞膜を透過させることができず、タンパク質を直接細胞内に透過させる技術、“タンパク質導入法”は、夢の技術として待望されてきました。この点で、TAT タンパクが細胞膜を貫通して細胞内に侵入する性質が大きな注目を集めてきました。近年の研究から TAT タンパク質中の 11 個のアミノ酸ドメイン、膜透過性ペプチドが膜透過性を引き起していることが明らかになりました。さらに、この膜透過性ペプチドを付加することでタンパク質、ペプチド、低分子化合物などを、毒性なしに細胞内に直接導入し機能させる事が示され、膜透過性ペプチドを用いたタンパク質導入法は大きな注目を集めています。しかし TAT 膜透過性ペプチドを利用したタンパク導入効率は十分でなく、臨床的な応用には更なる技術開発が不可欠であることも明らかになってきました。そこで、膜透過性ペプチドの透過効率改善のためには細胞内どのような機序でペプチドが取り込まれ、どのステップが律速段階になり、取り込み効率の低下につながっているかを明らかにする必要があると考えられています。ところが、膜透過性ペプチドには直接観察する方法がなく、そのために間接的な傍証をもとにしてしか侵入機序を解明する方法がありませんでした。今回、研究グループは、量子ドットで蛍光標識された膜透過性ペプチドを作製し、一分子レベルで細胞上での動態を可視化・解析する方法の開発を行い、膜透過性ペプチド 1 分子ごとの動態を生細胞上で 7 ナノメートルの精度で 1 時間以上の長時間にわたり 23 ms/frame という高速で直接可視化・定量化する方法の開発に成功しました(図 1)。

これまでの研究では 1) 膜透過性ペプチドが細胞膜表面から直接細胞内に入るのか、それとも一度細胞表面受容体に結合し、細胞内に取り込まれ、その後、取り込み小胞膜を通過して細胞内に入るのか、2) 膜透過性ペプチドの細胞内侵入は受動的に起こるのか、それとも細胞を活性化し、取り込み機構を活性化した後能動的に細胞内に侵入するのかという点が明らかにされていませんでした。

本研究グループは、量子ドットを結合させたトレーサー TAT タンパク質・膜透過性ペプチドを作製し、このトレーサー膜透過性ペプチドを培養細胞に添加し、添加した瞬間から、超高性能 CCD カメラを組み合わせた独自の一分子顕微鏡装置で量子ドットの細胞膜状での動きを直接可視化・撮影すると同時にトレーサー分

子の蛍光重心位置を解析することで(図1)、膜透過性ペプチドの動きの変化を23 ms/frame という高速で測定しました。その結果、(1) 膜透過性ペプチド細胞に侵入するためには細胞表面上の受容体分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカンに最初に結合することが不可欠であること、(2) 膜透過性ペプチドがヘパラン硫酸プロテオグリカンを架橋し、細胞を活性化させてタンパクの細胞内取り込み機序(貪食能)を活性化させることで細胞内導入効率を上げることが明らかになりました。さらに、量子ドット一個の上に結合する膜透過性ペプチドの数を8個にしたとき(8価)に、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合速度、架橋効率がともに最高になり細胞内導入効率も120倍以上に上昇することを発見しました。

以上の結果から、HIV-1 TAT タンパク質の細胞内侵入を阻害する為には細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの結合を阻害してやるのが重要であることが明らかになり、同時に、膜透過性ペプチドの細胞導入効率改善には、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカンへの結合能およびその架橋能の増強、とそれによる取り込み機序の活性化が、まずは重要であることが明らかになりました。

TAT タンパク質の細胞での動態を分子レベルで直接観察する技術が開発されたことで、可視化技術をもとにしたTAT タンパク質侵入抑制薬の開発が期待されると同時に、TAT タンパク質・膜透過性ペプチドをもとにしたタンパク質導入法の開発・改良が飛躍的に改善され、再生医学やがん治療法の開発等への応用が期待されます。

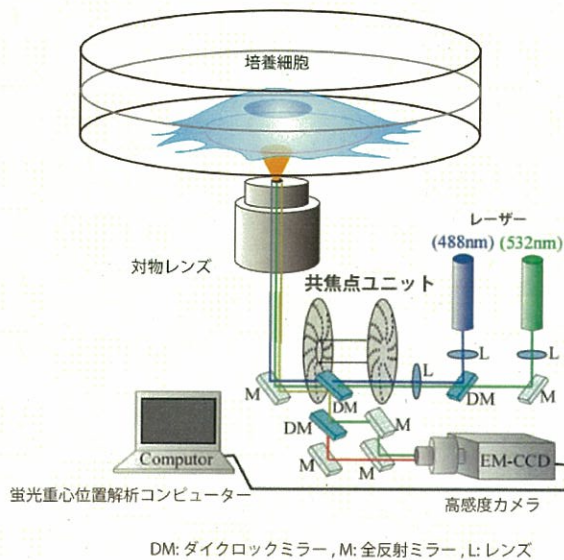


図1 解析装置の概略図

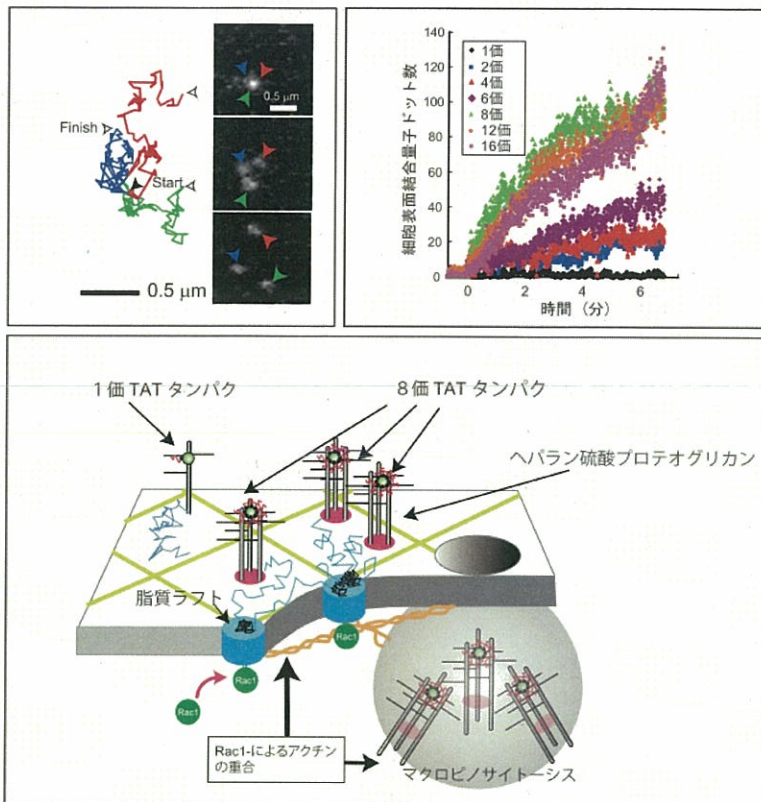


図2 実験方法と結果の概略図

TAT タンパクを量子ドットで標識して細胞培養液に加えて、その後、独自光学装置で量子ドットを可視化して蛍光重心位置を解析し TAT タンパクの動きの変化を調べました。その結果、(上左)細胞表面でのTATタンパクの動きの状態が調べられるようになるとともに、(上右)細胞上に結合する数を定量化できるようになりました。(1) 膜透過性ペプチド細胞に侵入するためには細胞表面上の受容体分子であるヘパラン硫酸プロテオグリカンに最初に結合することが不可欠であること、(2) 膜透過性ペプチドがヘパラン硫酸プロテオグリカンを架橋し、細胞を活性化させてタンパクの細胞内取り込み機序(マクロピノサイトーシス)を活性化させることで細胞内導入効率を上げることが明らかになりました。さらに、量子ドット一個の上に結合する膜透過性ペプチドの数を8個にしたとき(8価)に、細胞表面ヘパラン硫酸プロテオグリカン結合速度、架橋効率がともに最高になり細胞内導入効率も120倍以上に上昇することを発見しました。

本研究は以下の研究事業の成果の一部として得られました。

- 厚生労働科学研究費補助金（厚生労働省）：研究代表者：鈴木康弘（東北大学大学院医学系研究科・講師）

用語解説

* 1 ヒト免疫不全ウイルスI型（HIV-1）：

ヒトの免疫細胞に感染して免疫細胞を破壊し、最終的にエイズ（後天性免疫不全症候群：AIDS）を発症させるウイルス。同様の働きをするウイルスに、ほかにHIV-2がある。日本でも報告されているエイズ感染者のほとんどは、HIV-1による。

* 2 膜透過性ペプチド：

細胞膜を通過し、細胞内に移行することができるペプチド。最初に見つかったHIV-1 TATタンパク質由来のものほかに、いくつか発見されており、タンパク質などと結合させることで細胞内に物質を導入し機能させるツールとして注目されている。

* 3 量子ドット：

蛍光性ナノ粒子で従来用いられてきた有機系蛍光色素（例えば緑色蛍光タンパク質）の数十倍以上の蛍光強度、数百倍の耐光性を持っており長時間の観察が可能となる。

* 4 ヘパラン硫酸プロテオグリカン：

ヘパラン硫酸で修飾された糖タンパクの総称。細胞表面や、細胞外マトリックス、特に基底膜に多い。

<論文名・著者名>

Single Particle Tracking Confirms That Multivalent Tat Protein Transduction Domain-induced Heparan Sulfate Proteoglycan Cross-linkage Activates Rac1 for Internalization

（日本語訳：一分子追跡法を用いて、多価のTat-膜透過性ペプチドはヘパラン硫酸プロテオグリカンを架橋し、Rac1活性化を引き起こし、細胞内に取り込まれることを証明した）

Junji Imamura, Yasuhiro Suzuki, Kohsuke Gonda, Chandra Nath Roy, Hiroyuki Gatanaga, Noriaki Ohuchi, and Hideo Higuchi *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* VOL. 286, NO. 12, pp. 10581–10592, March 25, 2011

<お問い合わせ先>

鈴木 康弘（スズキ ヤスヒロ）

東北大学大学院医学系研究科 感染症態学講座 講師

TEL: 022-717-8220

FAX: 022-717-8221

E-Mail: suzukiy39@med.tohoku.ac.jp

権田幸祐 (ゴンダ コウスケ)

東北大学大学院医学系研究科 ナノ医科学寄附講座 講師

TEL: 022-795-4735

FAX: 022-795-5753

E-Mail: gonda@med.tohoku.ac.jp

樋口 秀男 (ヒグチ ヒデオ)

東京大学大学院 理学系研究科物理学専攻 教授

TEL: 03-5841-4128

FAX: 03-5841-7646

E-Mail: higuchi@phys.s.u-tokyo.ac.jp

報道担当

長神 風二 (ナガミ フウジ)

東北大学大学院医学系研究科広報室

TEL : 022-717-7908

FAX : 022-717-7923

E-Mail : f-nagami@med.tohoku.ac.jp