

●蛋白質導入法による神経可塑性研究

松下 正之, 富澤 一仁, 李 勝天, 森脇 晃義, 松井 秀樹

岡山大学大学院医歯学総合研究科, 生体制御科学専攻, 細胞生理学 (医学部・第一生理学)

1. はじめに

脳スライスの神経細胞に遺伝子を導入する方法は、現在ウイルスを使うのが一般的であるが、急性の海馬スライスにおける実験の場合、遺伝子導入では目的の遺伝子の転写、翻訳に時間が必要であり、技術的に不可能である。本稿では、それにかわる手段として、直接蛋白質やペプチドなどの生理活性物質を海馬スライスの神経細胞に導入する方法について簡単に述べる。

2. 蛋白質導入法

蛋白質導入法は7～20のアミノ酸からなるProtein Transduction Domain (PTD) と呼ばれるペプチドを蛋白質に結合させることにより、目的の蛋白質やペプチドを細胞内に導入する方法である。最近、さまざまなPTDが開発され、実験レベルあるいは臨床レベルで応用されつつある(図1)。PTDのアミノ酸配列はANTENNAPEDIA, HIV/TAT, HSV/VP-22の細胞通過ドメインを用いたものが開発されてきたが[1, 2, 3], 最近7～11個のポリアルギニンを基本としたPTDが導入効率の面から注目されている[4, 5, 6]。蛋白質導入法の特徴は、操作が目的の蛋白を添加するのみで簡単なこと、その導入時間が30分から1時間と短い事、また蛋白のみでなく、様々な生物活性物質を導入できる事、腹腔内注射や静脈

注射により各組織に導入できる事などが挙げられる[7]。

これらのPTDの細胞膜通過のメカニズムは、それぞれのPTDで異なるのではないかと考えられている。ANTENNAPEDIAに関しては人工脂質二重膜を通過することより、レセプター非依存性に細胞膜を通過すると考えられている[8, 9]。また、TATに関してはHeparan Sulfate ProteoglycanやLDL Receptorが細胞内導入に関与しているとの報告がある[10]。我々の研究では、ポリアルギニンによる細胞内導入もTATと同様のメカニズムではないかと考えられる。

3. 海馬スライスへの導入

ポリアルギニンによるPTDを用い海馬スライスへのEnhanced Green Fluorescence Protein (EGFP)の導入を試みた。11個のアルギニンとEGFPを融合蛋白質としてE.coliより8M ureaを用い変性条件で精製し、PBSにて透析した後の11R-EGFPを使用した。添加は、一般的な海馬スライス実験と同様、環流装置に1 μ Mで30分から1時間環流し、その後ACSF溶液でさらに1時間環流洗浄した。環流後スライスをコンフォーカルレーザー顕微鏡で観察し、導入を確認した(図2)。図に示すように海馬CA1の錐体細胞層に導入されたEGFPのシグナルが観察される。

HIV-TAT: YGRKKRRQRRR

HSV VP22: DAATATRGRSAASRPTERPRAPARSASRPRRPVE

ANTP: RQIKIKWPQNRRMKWKK

図1. HIV-TAT, HSV-VP22, ANTENNAPEDIA (ANTP) の蛋白質導入ドメインのアミノ酸配列を示す。

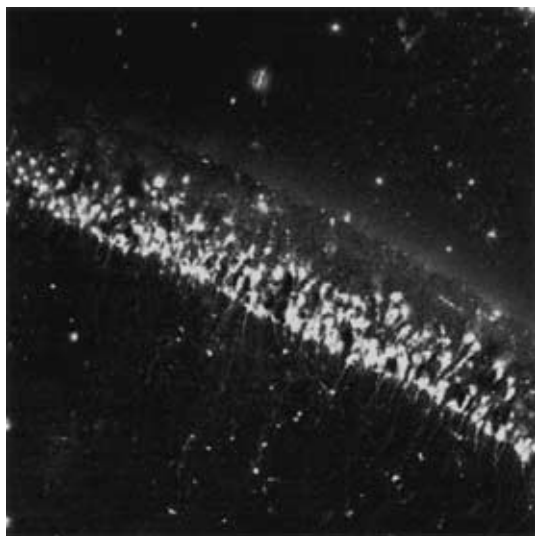


図2. ラット海馬CA1スライスに11R-EGFPを $1\mu\text{M}$ 環流し、その後蛍光レーザー顕微鏡でスライスを観察した。CA1領域の錐体細胞に強いシグナルが見られる。

4. 神経細胞内局在化

この11Rに細胞内局在化シグナルを付加する事により、目的の物質を細胞内小器官に特異的に導入する試みを行った。たとえば、核移行シグナル、ミトコンドリア移行シグナルなどを用い、目的の物質を細胞に添加するのみで細胞内小器官に導入できる。

5. 細胞内情報伝達操作

神経細胞の興奮性の可塑的变化にはLTP (Long term potentiation) とL-LTP (Long lasting LTP) の2つが知られている。LTPはシナプス領域のリン酸化などが関与していると考えられ、1時間から3時間のEPSPの増加が見られる現象である。またL-LTPは、転写、翻訳が必須であると考えられ、3時間以上のEPSPの増加が観察される。このL-LTPにはPKAの核内での転写因子であるCREbのリン酸化が必要であると考えられている。この説を、11Rと核移行シグナルとProtein Kinase A (PKA) の阻害ペプチド

(PKI) を融合し、核特異的にPKIを海馬スライスに導入することにより証明した。多くの酵素は特異性の高い阻害ペプチドが開発されている。しかし、ペプチド単独では細胞膜透過性がなく生理学的実験には使用が困難であった。今後PKIの様に、PTDと阻害ペプチドを融合する事により、細胞内情報伝達を操作する事が可能になると思われる。

6. 考察

蛋白質導入法は、現在開発が進んでいるが、今後その副作用あるいは、導入効率の増加などを考慮し、新たな導入配列の開発が期待される。また、今後高分子導入法を用い新たな実験ツールや臨床応用できる薬剤の開発が期待される。

文 献

1. Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G, Prochiantz A (1996) Cell Internalization of the third helix of antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J. Biol. Chem.* 271 : 18188–181936.
2. Elliott G, O'Hare P (1997) Intracellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structure protein. *Cell.* 88 : 223–233.
3. Nagahara H, Vocero-Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker-Hapak M, Ezhevsky SA, Dowdy SF (1998) Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p-27^{Kip1} induces cell migration. *Nature Med.* 4 : 1449–1452.
4. Rothbard JB, Garlington S, Lin Q, Kirschberg T, Kreider E, McGrane PL, Wender PA, Khavari PA (2000) Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nature Med* 6 : 1253–1257.
5. Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, Sugiura Y. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem.* 2001 Feb 23; 276 (8) : 5836–5840.
6. Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, Li SH, Terada H, and Matsui H. A High Efficiency Protein Transduction System Demonstrating the Role of PKA in Long Lasting LTP. *J. Neurosci.* 21 : 6000–

RECORDS

- 6007.
7. Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani AM, Dowdy SF (1999) In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285: 1569–1572.
 8. Thoren PE, Persson D, Karlsson M, Norden B (2000). The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers-the first direct observation. *FEBS Lett* 482 : 265–268.
 9. Tyagi M, Rusnati M, Presta M, Giacca M (2001). Internalization of HIV-1 Tat Requires Cell Surface Heparan Sulfate Proteoglycans. *J.Biol. Chem* 276 : 3254–3261.
 10. Liu Y, Jones M, Hingtgen CM, Bu G, Laribee N, Tanzi RE, Moir RD, Nath A, He JJ. Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med.* 2000 Dec; 6 (12) : 1380–1387.