原　　著

蛋白質導入によって形質膜近傍に留まる非疎水性シグナルタグの発見

大　湖　健太郎
新潟大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学分野
（主任：伊藤雅章教授）

A Non-transmembrane Fragment Targets Transduced Proteins in the Plasma Membrane

Kentaro Ohko

Department of Dermatology
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University
(Director: Prof. Masaaki Ito)

要　旨

蛋白質導入（protein transuduction）は，ウイルス由来のアミノ酸配列タグを用いて，外因性組換え蛋白質を細胞内に直接導入する方法である．この方法は，遺伝子過剰発現に代わる利点をいくつか持っている．例えば，この方法は1時間以内に蛋白質を導入することができる．しかし，欠点として，導入した蛋白質を細胞内の特定の部位に局在化させることができない．本研究では，小胞輸送に関与する形質膜蛋白質 syntaxin-3 の H3S ドメイン［192-241］を付加した組換え蛋白質が，蛋白質導入法では形質膜の内側にとどまることを明らかにし，可溶性蛋白質の緑色蛍光蛋白質（EGFP）および脳型脂肪酸結合蛋白質（FABP-7）が形質膜に結合できることを定量的に証明した．H3S 自体は組換え蛋白質としても可溶性であるため，その付加は蛋白質導入による導入分子の局在性のコントロールに有用であると結論される．

キーワード：蛋白質導入/シンタキシン/脳型脂肪酸結合蛋白質/形質膜

緒　　言

蛋白質導入（protein transduction）は，例えば細胞培養液などに組換え蛋白質を加えるだけで，その蛋白質を形質膜透過によって直接細胞内に導入する方法である[1)-3)]．この方法では種々のウ

Reprint requests to:Kentaro OHKO
Department of Dermatology
Graduate School of Medical and Dental Sciences
Niigata University
1-757 Asahimachi-dori Chuo-ku,
Niigata 951-8510 Japan

別刷請求先：〒951-8510　新潟市中央区旭町通1-757
新潟大学医歯学系皮膚科学教室　　大湖健太郎

イルス，例えばHIVなどが，形質膜を透過する際に利用しているアミノ酸配列をもとに作られたタグを，組換え蛋白質に融合することで，導入が可能となる[4]．これらのタグは塩基性アミノ酸のクラスター（例えば11個の連続したアルギニンから成るR11）を持ち，形質膜の表面にある陰性電荷と結合するため，高い膜透過性を持つと考えられる[5]．すでに開発から10年を経ずして，この方法は蛋白質の細胞内での機能を理解する上で，数多くの研究に用いられている．細胞内での蛋白質機能研究に最も多く用いられている方法は，そのcDNAをtransfectionして過剰発現するという手法であるが，この方法には効果を見るためには最低でも48時間程度かかるという欠点があり，細胞への蛋白質の急性導入効果をみるためには不適である．一方，蛋白質導入は，30分以内に導入効果を見ることが可能であり，際立った利点となっている[5]．

しかし蛋白質導入は組換え蛋白質をあらかじめ作成しておく必要があり，それが可溶性でなければならないという制約がある．例えば遺伝子導入法では，膜貫通部位のような疎水性部位が存在しても正しく局在化できるが，蛋白質導入に用いる蛋白質にそのような部位を付加することは難しく，導入された蛋白質が本来の局在とは異なるという欠点が存在していた．

本研究では膜貫通部位のような疎水性の高い部位に代わって，膜蛋白質であるsyntaxin-3由来の50残基［192-241］（H3Sドメイン；SEIEGRHKDIVRLESSIKELHDMFMDIAMLVENQGEMLDNIELNVMHTVD）を利用して，蛋白質に結合させ，形質膜への局在化を調べた．この蛋白質は小胞輸送に関係する，t-SNARE（target-SNARE）と呼ばれる分子であり，H3Sは種々の分子間相互作用に関係する部分に由来する[6]．R11-H3Sをタグとして，組換え蛋白質として緑色蛍光蛋白質（enhanced green fluorescent protein; EGFP）に結合させたものを蛋白質導入すると，*melan-a*メラノーマ，PC12，およびNG108細胞に導入することができ，いずれも形質膜近傍に局在した．このタグを結合させた脂肪酸結合蛋白質脳型アイソフォーム（fatty acid-binding protein-7; FABP-7）[7]は本来は可溶性分子であるにもかかわらず，蛋白質導入後は導入細胞の形質膜近傍の領域に分布した．これらの結果は，R11-H3Sタグは蛋白質の可溶性を高く保ったまま，効果的に導入蛋白質を形質膜領域に分布させることができることを示したものである．

方　　法

1．発現ベクターの設計と蛋白質導入

pET21a（*Novagen*）改発現ベクター[5]は松下正之博士（現・三菱化学生命化学研究所），松井秀樹教授（岡山大学）より供与頂いた．このベクターにsyntaxin-3のH3ドメインの前半3分の2（192-241残基；H3Sドメイン），FABP-7（信州大学　藤井博教授より供与）を連結した（**図1A**）．

2．蛋白質の精製[8]

蛋白質を発現させた大腸菌を0.1 M塩化ナトリウム，20 mMイミダゾールと7.2 M尿素を含む20 mM HEPES（pH 8.0）バッファーで溶解した．遠心後，上清に含まれる目的蛋白質をNi-Sepharose 6 Fast Flow（GE healthcare）カラムで精製をした．精製した蛋白質をPD-10カラムで脱塩し，終濃度10％となるようにグリセロールを加え－80℃で保存した．導入の際は，蛋白質溶液を16,000 x *g* 4℃で10分間遠心した後，細胞へ導入した．

3．細胞培養

マウスの不死化したメラノーマ細胞株である*melan-a*細胞（D.C. Bennett教授より供与）は，10％ウシ胎児血清，ペニシリン－ストレプトマイシン，phorbol 12-myristate 13-acetateを含むRPMI-1640培地で37℃，10％ CO_2[9]存在下で培養した．

NG108細胞（産業技術総合研究所　加藤薫博士より供与）は，10％ウシ胎児血清，1xHAT supplement，1 mMピルビン酸ナトリウム，ペニシリ

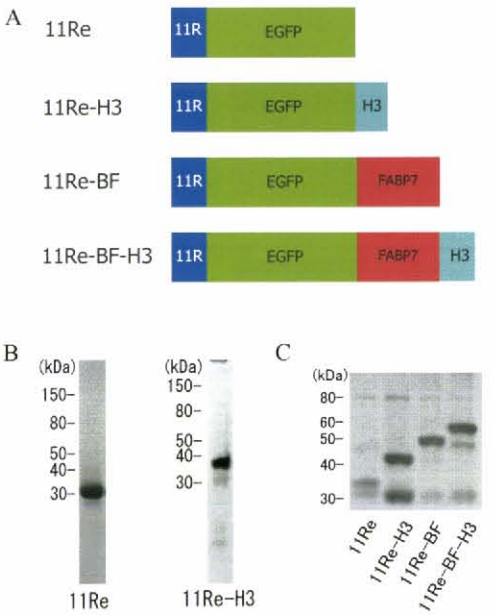


図 1　蛋白導入法を行うため，本研究で作製した組換え蛋白質

(A) それぞれをコードする cDNA は蛋白質発現ベクター R11 - EGFP - pET21[5] に連結した．

(B) 作製した組換え蛋白質の電気泳動像（クマシーブリリアントブルー染色）
組換え蛋白質は，容易に精製でき，可溶性も保たれていた．

(C) 融合蛋白質導入後のメラノーマ細胞（*melan - a*）のウエスタンブロット像．
Cell lysate 中に組換えタンパク質を認めた．

ンーストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle 培地で 5 % CO_2 存在下で培養した．

4．蛋白質導入と細胞染色

Melan - a 細胞は，Lab - tek チャンバースライド（Nalge Nunc）上に播き，48 から 72 時間後に，900 nM の組み換え蛋白質を含む RPMI - 1640 培地に交換した．20 分間培養した後[8]，洗浄を行い，蛋白質を含まない培地を交換し，更に 5 分間培養を行った．

細胞を 2 %パラホルムアルデヒドと 0.1 %グルタルアルデヒドで 20 分間前固定し，形質膜及び細胞質を染色するために 10μ g/ml CM - DiI（Invitrogen）を加え氷上で放置した[10]．その後，2 %パラホルムアルデヒドで 20 分間後固定を行った．

5．免疫染色

免疫染色は，0.1 % Triton - X100 で膜透過性処理を 1.5 分間行った後，1 %ウシ血清を用いて，ブロッキングを室温で 1 時間行った．抗 GFP ポリクローナル抗体（1: 500 MBL），Alexa - Fluor 488 conjugated IgG（1: 1000 Molecular Probes）を用いた間接蛍光抗体法で染色し観察した．共焦点レーザー顕微鏡は LSM510META（Carl Zeiss）を使用し，顕微鏡附属のソフトウエアを用いて，形質膜間の距離と，EGFP のスポットを解析した．

6．統計処理

GraphPad 社製 PRISM5 で Mann - Whitney の U 検定を用いて統計処理を行った．蛍光強度を測り，EGFP の分布を評価した．同時に，DiI の蛍光強度を測り，形質膜間およびその中点を決定した（**図 4**）．

7．ウエスタンブロット

掻爬した細胞をドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を含むサンプル溶液に溶解した．SDS - ポリアクリルアミド電気泳動を行った後，ニトロセルロース膜へ転写した．その後，5 %無脂肪乳を含む緩衝液中でブロッキングを行った後，抗 EGFP モノクローナル抗体（1: 1000 ベーリンガー社製）を用い，間接蛍光抗体法で検出した．

結　　果

まず H3S 部分が R11 - EGFP の形質膜近傍への導入に寄与するかどうかを検証した．R11 - EGFP 発現ベクターを用いて（**図 1A**），蛋白質導

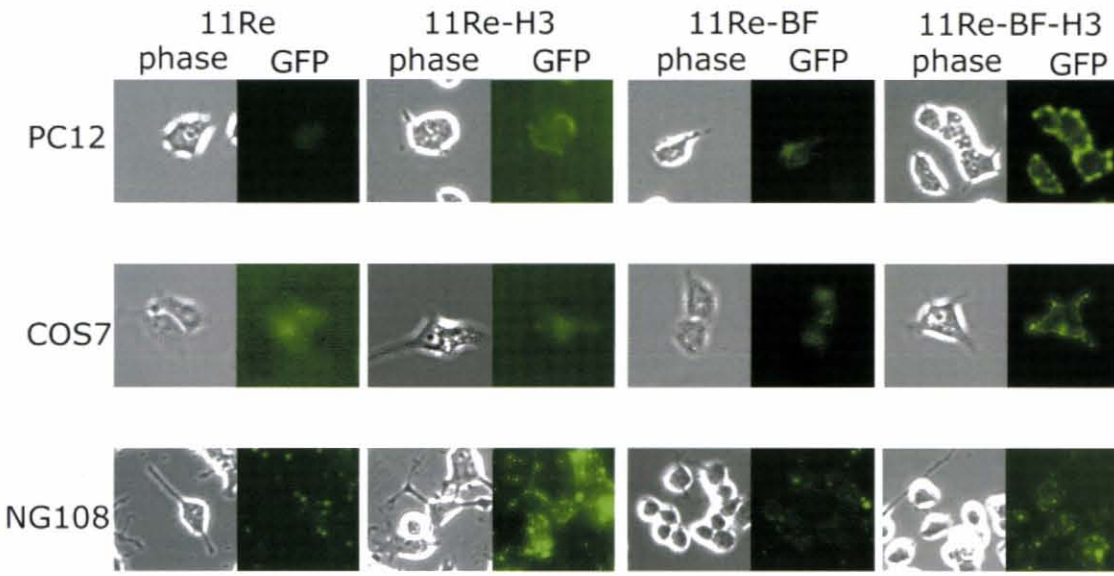


図2　導入した11Re-H3の分布

11Re-H3を，それぞれをPC12細胞（上段），COS7細胞（中段），NG108細胞（下段）に導入したところ，異なる細胞種においても形質膜近傍に集積した．

左：位相差像，右：蛍光像．　Scale bar = 10 μm

入用の組換え蛋白質を大腸菌で作成した．このタンパク質は，細胞内へ効率よく導入することができ，蛍光顕微鏡で観察する事が可能である．H3Sドメイン自体は膜貫通領域ではなく，非疎水性であり，大腸菌内で容易に作成する事が可能であった（**図1B**）．組換え蛋白質である11Re-H3（**図1A**）は，可溶性であり，精製も容易であった（**図1B**）．組換え蛋白質を悪性黒色腫の細胞株である*melan-a*細胞に導入し，抗EGFP抗体でウエスタンブロットを行い，細胞内への導入を確認した（**図1C**）．

蛋白質導入に関する標準手法[8]を用いる事で，EGFPは容易に導入することができ，形質膜の近傍へ存在した（**図2**）．蛋白質をPC12細胞や神経細胞株であるNG108細胞に導入した際にも同様に形質膜近傍に局在した（**図2**）．これらの結果により，H3Sタグを付加した導入蛋白質は，細胞種に依存せず形質膜領域へ分布することが示唆された．

次に，脂肪酸結合蛋白質（FABP）-7（脳型脂肪酸結合蛋白質）が細胞内へ導入できるかどうかを検証した．この小さな蛋白質は，FABPファミリーの一員であり，細胞質に存在している[7]．FABP蛋白質は不飽和の長鎖脂肪酸に対する結合部位を有している．FABPファミリーは細胞特異性・臓器特異性があり，例えばFABP-7は脳での発現が認められ，それ故，脳型FABPとも呼ばれている．FABP-7自体は膜貫通領域を持っていないため，*melan-a*細胞で過剰発現した際には細胞全体に認められた（データは示していない）．

組換蛋白質であるR11-H3S-FABP7-EGFP（11Re-H3-BF）も，容易に大腸菌内で作成する事ができ，また可溶性も保たれたまま精製をする事ができた．*Melan-a*細胞内へ導入した11Re-H3-BFは，共焦点レーザー顕微鏡で観察した限りにおいては，形質膜領域に局在した（**図3**）．一方，H3Sタグを欠いたR11-EGFP-FABP7（11Re-BF; **図1**）は，11Re同様，細胞内に均一に

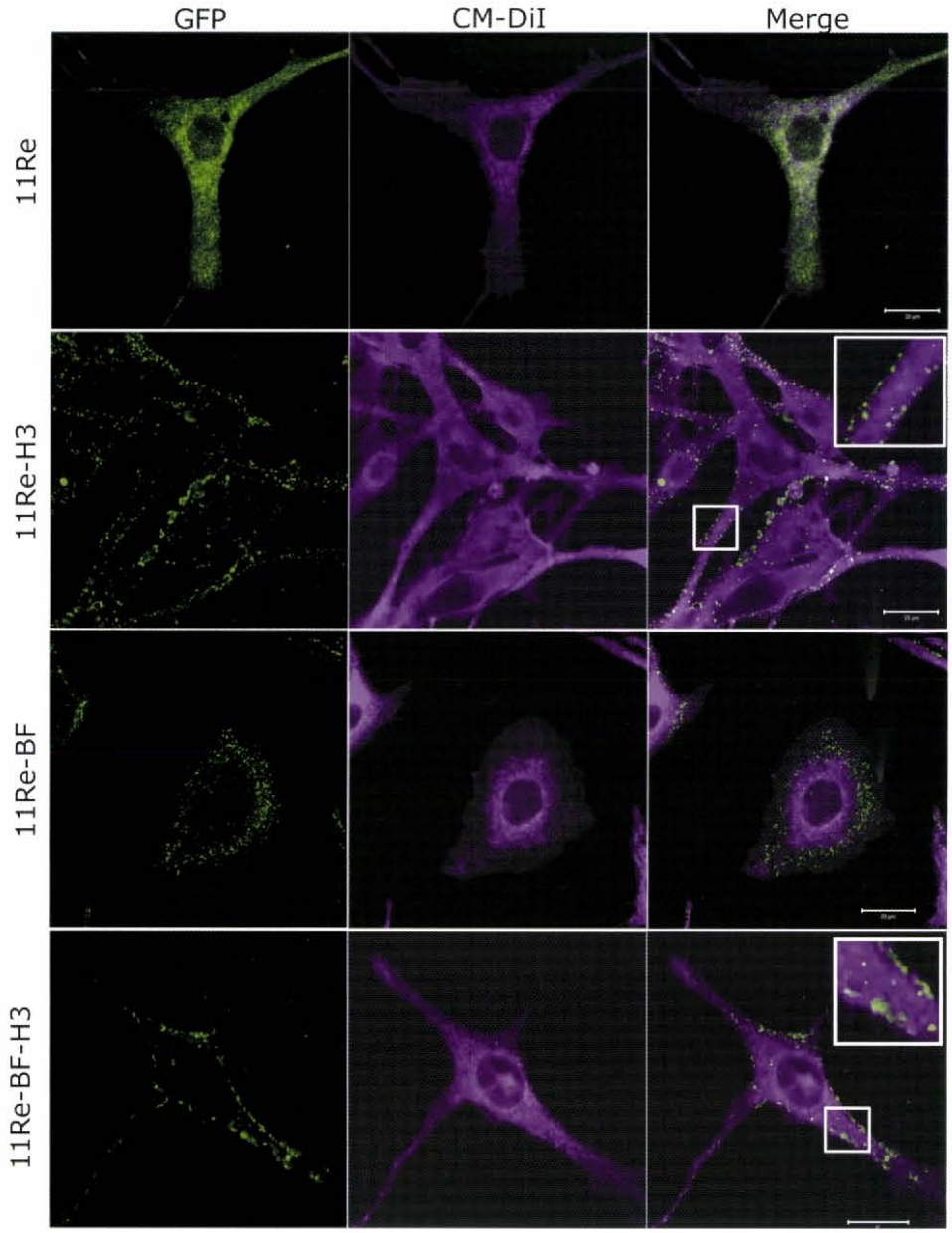


図3　H3S による細胞内導入 FABP7 の形質膜近傍への集積

11Re - H3 - BF 及び 11Re - BF を *melan - a* 細胞に導入後，共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った．膜脂質は CM - DiI（赤紫），導入蛋白質は抗 EGFP 抗体（緑）で示す．右は，2 つの像を重ね合わせた像を示す．

組換え蛋白質を 0.9 μM の濃度で 20 分間導入し，蛋白質を含まない培地で 5 分間培養を行った後，固定染色して観察を行った．H3S タグを付加した FABP（11Re - H3 - BF）は主に形質膜領域に存在したが，H3S を持たない FABP（11Re - BF）は細胞質全域に存在した．　Scale bar = 10 μm

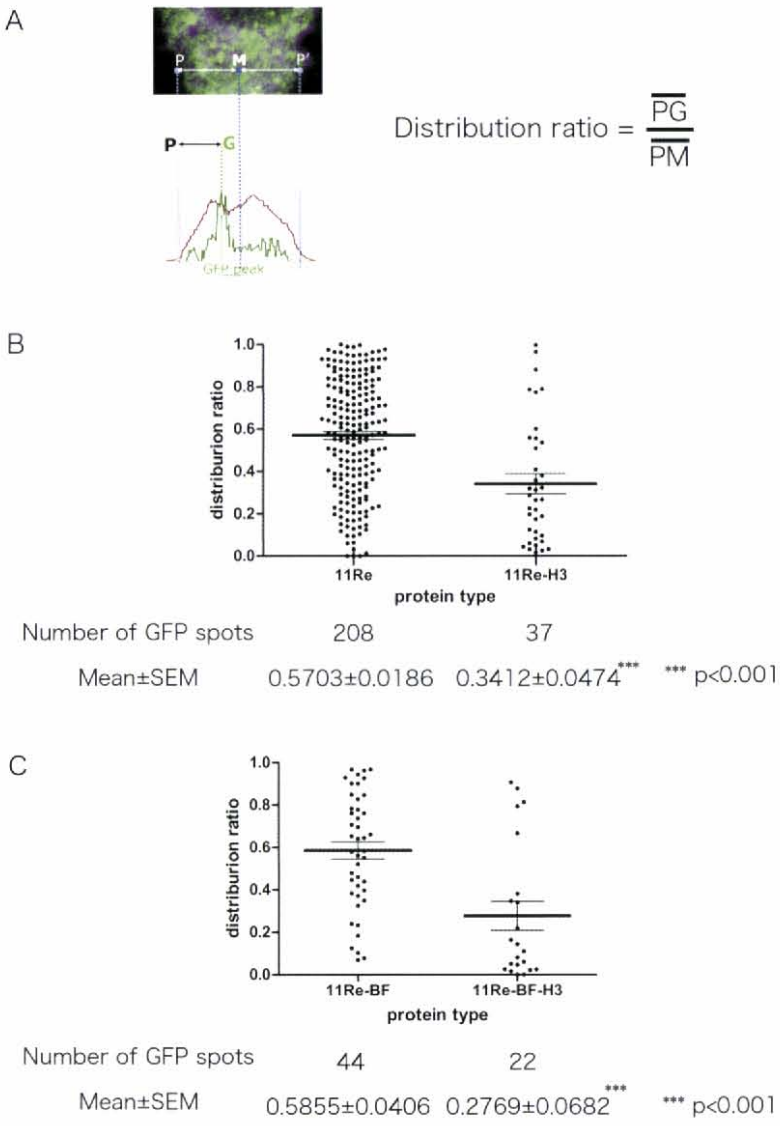


図4　H3Sタグが付加された導入蛋白質の局在の定量的解析

（A）定量的解析法の詳細．共焦点レーザー顕微鏡像を用い，*distribution ratio* を定義した．PP' は形質膜間距離，M はその中点を示す．PP' 上のEGFPの蛍光強度を計測し（緑色の曲線），蛍光強度の最も強い高い点をGとした．　PP' はDilの蛍光強度（赤色の曲線）を用いて決定した．*Distribution ratio* はPG間の距離をPM間の距離で割った値である．

（B及びC）（B）は11Re - H3と11Reの分布，（C）は11Re - BF - H3と11Re - H3の分布を比較した図．Mann - WhitneyのU検定で統計的有意差に関して解析を行った．（B）（C）共に，H3Sタグを付加した蛋白質はH3Sを付加しない蛋白質と比較して有意に比の値が低下しており，H3Sタグを付加することで蛋白質が形質膜近傍に近づいた事を意味している．

存在した（**図 3**）.

導入した蛋白質の分布をより明確にするために，膜の脂質を DiI を用いて染色した（**図 3**）. 11Re - H3 - BF の分布は DiI の分布に近かったが（**図 3**），11Re - BF は細胞質全体にびまん性に存在し，形質膜付近への存在を認めなかった（**図 3**）. この様に，H3S ドメインは融合蛋白質を形質膜へ運ぶ作用があると考えられる.

次いで，H3S ドメインを付加した組換蛋白質が形質膜領域近傍に留まるかどうか定量的に検証を行った（**図 4**）. 共焦点レーザー顕微鏡で得られた二重染色像を用い，形質膜からの距離を測定し解析を行った. 著者は，細胞の形質膜からの距離を表す定量指標として“*distribution ratio*”を定義した（**図 4A**）. この比は，0 から 1 までの間の値となり，0 に近づくほど形質膜に近い事を意味する. この数値をもとに定量解析を行った結果，H3S フラグメントを付加する事で，EGFP，FABP - EGFP の融合蛋白質は共に比が下がり，H3S フラグメントが導入蛋白質を形質膜領域に分布させる事がわかった（**図 4B，C**）.

考　　察

現在，細胞内での蛋白質機能解析の方法として最も用いられている方法は，目的とする遺伝子の cDNA を遺伝子導入し過剰発現する方法である. これは極めて有用度の高い方法ではあるが，いくつかの欠点がある. 最も問題となるのは，発現ベクターを細胞内へ導入してから蛋白質として発現するまで，最低でも 48 時間必要とする点である. それ故，導入によって生じる急性の効果を見るのには不適である. 一方，蛋白質導入法は，30 分ないしはそれより短い時間で導入効果を見る事が可能であり，過剰発現の欠点を克服することが可能である（例 **図 1C**，**図 2**）. 蛋白質導入法において，特定の細胞内小器官への局在性がコントロール可能となり，この手法の有用性をさらに増す事が出来ると考えられる. 発現ベクターでは，細胞内小器官をターゲットとするタグを付加する事が可能であったが，蛋白質導入法においては，この様な細胞内小器官を標的とする系が現在までに開発されていなかった. 本研究では，H3S ドメインを結合する事で FABP の様に細胞質に存在する蛋白質でも形質膜領域へ分布させることができる事を示した. この結果は　H3S 部分を付加する事で，如何なる蛋白質やドメインでも形質膜領域へ留まらせる事が可能であると考えられる.

蛋白質導入法は組換え蛋白質の作成が可能かどうかに依存するため，付加するタグの可溶性についてはさらなる考慮が必要である. しかし形質膜へ付加するタグの多くは非常に疎水性が高く，可溶性蛋白質として精製する事が非常に困難である事が多いが，H3S に関しては問題とならないため，この利点は大きい.

なぜ H3S を付加した組換え蛋白質が形質膜に留まるかに関するメカニズムはよく分かっていない（**図 3**，**図 4B**，**図 4C**）. Syntaxin は t - SNARE を介する細胞内小胞輸送系において最大のファミリーを形成しており[11)－12)]，それぞれ，C 端側に H3 ドメインと呼ばれるヘリックスドメインを持つ. さらに H3 ドメインを介して，他の SNARE 蛋白質と結合する事で SNARE 複合体を形成し，SNARE 複合体が形成される事により小胞と標的膜間の融合が起こる. この中で，syntaxin - 3 は形質膜に局在する syntaxin であり[13)]，消化管細胞で発現が認められる[6)]. Syntaxin - 1A の H3 ドメイン全長を導入した際には，細胞内輸送が阻害[14)]されたが，著者の研究で用いた濃度では H3S タグは細胞内輸送に影響は来さなかった. 例えば，導入後のメラノソームの数，分布は変化していなかった（データは示していない）. H3S タグが形質膜を構成する蛋白質と結合する事により，11Re - H3 蛋白質は，形質膜に結合している可能性がある. H3S タグがどのように融合蛋白質を形質膜へ標的にしているかに関しては，更なる研究が必要である.

異なる細胞種において，H3S ドメイン[15)]を付加する事で，蛋白導入法で融合蛋白質を形質膜へ留まる事が明らかになった（**図 3**，**図 4B**，**図 4C**）. このフラグメントはそれ自身可溶性であり，組み換え蛋白質に付加しても可溶性や，細胞形態に影

響を及ぼさず，導入蛋白質を形質膜へ結合する事が出来る理想的なタグであることを示した．このタグを用いる事で，細胞生物学分野において，導入蛋白質の有用性をより高める事ができるであろう．

謝 辞

伊藤 雅章教授（新潟大学・医歯学系・皮膚科学）のご校閲に深謝申し上げます．また本研究を実際にご指導くださった五十嵐 道弘教授（新潟大学・医歯学系・分子細胞機能学（医学部生化学第二））および渡部 通寿助教をはじめとする同教室の方々，共焦点レーザー顕微鏡の使用に便宜をお図りいただいた内藤 眞教授および大橋 瑠子先生（新潟大学・医歯学系・分子病理学）に深謝いたします．

文 献

1）Dietz GP and Bahr M: Peptide - enhanced cellular internalization of proteins in neuroscience. Brain Res Bull 68: 103 - 114, 2005.
2）El - Andaloussi S, Holm T and Langel U: Cell - penetrating peptides: mechanisms and applications. Curr Pharm Des 11: 3597 - 3611, 2005.
3）Fuchs SM and Raines RT: Internalization of cationic peptides: the road less (or more?) traveled. Cell Mol Life Sci 63: 1819 - 1822, 2006.
4）Nagahara H, Vocero - Akbani AM, Snyder EL, Ho A, Latham DG, Lissy NA, Becker - Hapak M, Ezhevsky SA and Dowdy SF: Transduction of full - length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT - p27Kip1 induces cell migration. Nat Med 4: 1449 - 1452, 1998.
5）Matsushita M, Tomizawa K, Moriwaki A, Li ST, Terada H and Matsui H: A high - efficiency protein transduction system demonstrating the role of PKA in long - lasting long - term potentiation. J Neurosci 21: 6000 - 6007, 2001.
6）Bennett MK, Garcia - Arraras JE, Elferink LA, Peterson K, Fleming AM, Hazuka CD and Scheller RH: The syntaxin family of vesicular transport receptors. Cell 74: 863 - 873, 1993.
7）Chmurzynska A: The multigene family of fatty acid - binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. J Appl Genet 47: 39 - 48, 2006.
8）Becker - Hapak M, McAllister SS and Dowdy SF: TAT - mediated protein transduction into mammalian cells. Methods 24: 247 - 256, 2001.
9）Bennett DC, Cooper PJ and Hart IR: A line of non - tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. Int J Cancer 39: 414 - 418, 1987.
10）Brandt R, Leger J and Lee G: Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino - terminal projection domain. J Cell Biol 131: 1327 - 1340, 1987.
11）Duman JG and Forte JG: What is the role of SNARE proteins in membrane fusion? Am J Physiol Cell Physiol 285: C237 - 249, 2003.
12）Li L and Chin LS: The molecular machinery of synaptic vesicle exocytosis. Cell Mol Life Sci 60: 942 - 960, 2003.
13）Nomura K, Ohyama A, Komiya Y and Igarashi M: Minimal residues in linker domain of syntaxin 1A required for binding affinity to Ca2+/calmodulin - dependent protein kinase II. J Neurosci Res 72: 198 - 202, 2003.
14）Ohara - Imaizumi M, Nakamichi Y, Nishiwaki C and Nagamatsu S: Transduction of MIN6 beta cells with TAT - syntaxin SNARE motif inhibits insulin exocytosis in biphasic insulin release in a distinct mechanism analyzed by evanescent wave microscopy. J Biol Chem 277: 50805 - 50811, 2002.
15）Watanabe M, Nomura K, Ohyama A, Ishikawa R, Komiya Y, Hosaka K, Yamauchi E, Taniguchi H, Sasakawa N, Kumakura K, Ushiki T, Sato O, Ikebe M and Igarashi M: Myosin - Va regulates exocytosis through Ca2+ - dependent binding of syntaxin - 1A. Mol Biol Cell 16: 4519 - 4530, 2005.

（平成20年1月11日受付）