

〈短報〉

## 改良型膜透過ペプチドによる extracellular signal-regulated kinase 1/2 の活性化について

奥田 明子<sup>1),2)</sup>、熊倉 百花<sup>1)</sup>、志水 穂乃花<sup>1)</sup>、須藤 里菜<sup>1)</sup>、須貝 景斗<sup>2)</sup>

### Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation by modified cell-penetrating peptide

Akiko Okuda<sup>1),2)</sup>, Momoka Kumakura<sup>1)</sup>, Honoka Shimizu<sup>1)</sup>, Rina Suto<sup>1)</sup>, Keito Sugai<sup>2)</sup>

**Summary** Pas2r12, a cell-penetrating peptide, has the ability to transport enhanced green fluorescent protein (EGFP) and IgG into the cytosol. The delivery by Pas2r12 involves caveolae-mediated endocytosis; however, the exact mechanism remains unknown. In this study, we examined the connection between Pas2r12 and activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). The phosphorylation of ERK1/2 was confirmed by introducing Pas2r12 or a complex of Pas2r12 and EGFP into HEK293 cells. Furthermore, analysis using confocal microscopy showed that treating cells with U0126, an inhibitor of ERK1/2 phosphorylation, did not reduce the rate of EGFPs cytosolic diffusion. These findings indicate that the stimulation of Pas2r12 or its complex with EGFP activates the mitogen-activated protein kinase pathway.

**Key words:** Cell-penetrating peptide, Drug delivery, Enhanced green fluorescent protein, Extracellular signal-regulated kinase 1/2

#### I. 緒言

ドラッグデリバリーシステムによって、タンパク質を細胞内へと導入するメリットの一つは「即効性」にある。遺伝子は、ウイルスベクターの感染から発現までに1日以上かかることから、心筋梗塞などの一刻を争うような治療には向い

ていない。心筋虚血再灌流時に、心筋細胞内に心筋細胞を保護する効果を持つタンパク質を送達することができれば、これまでの薬剤<sup>1)</sup>と併用することで細胞へのダメージを最小限に抑えることができるかもしれない。その為には、投与したタンパク質が血管から臓器へと移行し、さらに組織細胞内のサイトゾルへと移行して機

<sup>1)</sup>新潟大学医学部保健学科

〒951-8518 新潟県新潟市中央区旭町通2-746

<sup>2)</sup>新潟大学保健学研究科

〒951-8518 新潟県新潟市中央区旭町通2-746

連絡先：奥田明子

新潟大学医学部保健学科・保健学研究科

Tel: +81-25-227-2387

E-mail: okudaa@clg.niigata-u.ac.jp

<sup>1)</sup> School of Health Sciences, Faculty of Medicine, Niigata University, 2-746 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata, Niigata 951-8518, Japan

<sup>2)</sup> Graduate School of Health Sciences, Niigata University, 2-746 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata, Niigata 951-8518, Japan

受付日：2023年10月2日

採択日：2023年11月27日

能を発揮する必要がある。タンパク質は、電荷、サイズ、立体構造など、性質がタンパク質ごとに大きく異なる。このようなタンパク質の導入方法として、膜透過ペプチド、リボソーム、ポリマーナノ粒子など様々なキャリアが開発されている<sup>3)</sup>。これらのキャリアの多くは、エンドサイトーシスを介して細胞内へとタンパク質を送達することから、エンドソームからサイトゾルへの移行効率が低いことが課題となっていた。現状では、最適なタンパク質の導入方法について、様々なタンパク質の性質（分子サイズ、電荷、三次元立体構造など）や標的細胞との関係を検討しながら、使用するキャリアを開発・改良している段階にあり、培養細胞レベルでさえ確立されているとは言えない。

膜透過ペプチドによるタンパク質の細胞内導入は、エンドサイトーシスが主経路であり、エンドソームからサイトゾルへと導入分子を移行させることは難しかった<sup>3)</sup>。しかし、膜透過ペプチドであるR8 (RRRRRRRR) に透過促進配列 (penetration accelerating sequences (Pas), FFLIPKG) を付加することで、カーゴ (5 kDa程度までの大きさ) の細胞内導入量が増加することが報告された<sup>4,5)</sup>。我々は、このPas配列を利用した改良型膜透過ペプチド (Pas2r12, FFLIGFFLIGrrrrrrrrrrr、大文字はL-アミノ酸、小文字はD-アミノ酸) を開発し、カベオラエンドサイトーシスという特殊な経路を介して、緑色蛍光タンパク質や抗体をサイトゾルへと移行させることに成功した<sup>6)</sup>。カベオラは、細胞表面に存在する80 nm程度のフラスコ状の窪みであり、栄養素の輸送や病原体の侵入経路として報告されている<sup>7)</sup>。カベオラ依存性エンドサイトーシスを引き起こすリガンドと受容体の関係として、Simian virus 40 (SV40) とGM1ガングリオシド<sup>8,9)</sup>や、アルブミンとgp60<sup>10)</sup>などが報告されている。よって、Pas2r12にも特異的な受容体が存在する可能性があり、受容体依存的なデリバリーへと展開することが期待される。

これまでに、Pas2r12の受容体候補として、Pas2r12と相互作用するタンパク質の同定を試みてきたが、不溶性の凝集体を形成する為に同定には至っていない。そこで我々は、Pas2r12の刺激によって生じる、細胞内シグナルを検出できないかと考えた。Mitogen-activated protein

kinase (MAPK) 経路は、細胞外シグナルを細胞内へと伝達し、増殖、分化、アポトーシスおよびストレス応答を含む多種多様な細胞プロセスを調節する<sup>11,12)</sup>。これらの経路を活性化するシグナルは多様であり、受容体は多くの場合、Gタンパク質共役受容体あるいはチロシンキナーゼ受容体である<sup>13)</sup>。これらの受容体は、通常MAPK経路の上流でプロテインキナーゼカスケードを誘発し、MAPKキナーゼキナーゼがリン酸化されて活性化される。続いて、MAPKキナーゼキナーゼによってMAPKキナーゼがリン酸化され、活性化されたMAPKキナーゼはMAPKをリン酸化する。MAPK経路にはERK1/2、p38、JNK、ERK5をそれぞれ活性化する4つの経路が存在するが<sup>14)</sup>、一部のMEK-ERK経路の活性化は、エンドソーム上で行われていることが報告されていた<sup>15)</sup>。そこで本研究ではERK1/2に注目し、Pas2r12によりリン酸化されることを見出したので報告する。

## II. 材料と方法

### 1. 使用細胞株

HEK293 (ヒト胎児腎臓由来細胞) は、JCRB細胞バンクから購入した。Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, USA) に、10% 牛胎児血清 (FBS) (Corning, USA) を加え、5% CO<sub>2</sub> 濃度のもと 37℃ で培養を行い、5～7日ごとに継代して使用した。

### 2. ペプチドの調製

Pas2r12 (FFLIGFFLIGrrrrrrrrrrr-amide、分子量 3046.7、大文字はL-アミノ酸、小文字はD-アミノ酸) とr12 (rrrrrrrrrrr-amide、分子量 1891.2) は、スクラム社 (日本) に合成と精製を委託した。Pas2r12およびr12は、超純水に溶解して保存溶液とした。

### 3. EGFPの調製

新潟大学遺伝子組換え実験安全管理規則の規定に基づき、第二種使用等拡散防止措置を行い、以下の遺伝子組換え実験を行った (承認番号: SD00799)。大腸菌BL21 (DE3) 株 (BioDynamics Laboratory, 日本) でヒスチジンタグを付加させたenhanced green fluorescent protein (EGFP) を過剰発現させ、大腸菌の溶解液からNi-NTA agarose (Qiagen, Netherlands) を用いてEGFPを精製した<sup>6)</sup>。

精製されたEGFPは、限外濾過膜 (Vivaspin 6-PES 30000 MWCO; Sartorius, Germany) を用いてリン酸緩衝液への置換と濃縮を行った。EGFPの精製度は、Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により分離し、Coomassie Brilliant Blue R-250染色を行って確認した。

#### 4. U0126およびInsulinの調製

U0126 (ChemScene LLC, USA) は、100 mmol/L となるように dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、保存溶液とした。細胞に加える場合は、DMEMで10,000倍に希釈して使用した。コントロールとして、U0126溶液の溶媒であるDMSOを使用し、0.01%となるようにDMEMで希釈して使用した。Insulin (Fujifilm Wako, 日本) は、50  $\mu$ mol/L となるように超純水に溶解し、保存溶液とした。

#### 5. ウェスタンブロット法によるリン酸化ERK1/2の検出

HEK293細胞 (2 $\times$ 10<sup>6</sup>個) を96ウェルマイクロプレート (AGCテクノグラス, 日本) に播種した。これまでに、10% FBSを含むDMEM培地で培養した細胞に比べて、2.5% FBSで前培養を行った細胞の方が、Pas2r12によるEGFPのサイトゾル導入率が上昇することを報告している<sup>9)</sup>。よって本研究においては、よりサイトゾル導入率が高い条件である2.5% FBSを含むDMEM培地で、前培養を行うこととした。培養液をDMEM (2.5% FBS) に交換し、24時間培養を行った。その後、96ウェルマイクロプレートからDMEM培地を全て除き、U0126 (10  $\mu$ mol/L) またはDMSO (0.01%) を含むDMEM (2.5% FBS) を加え、30分間前培養を行った。Pas2r12とEGFPの複合体 (Pas2r12 + EGFP) 形成の為、マイクロチューブにDMEMとPas2r12 (40  $\mu$ mol/L) およびEGFP (30  $\mu$ mol/L) を加えて25  $\mu$ Lとし、室温で1時間静置した。r12およびPas2r12のみでインキュベートする場合も同様に、r12 (40  $\mu$ mol/L) およびPas2r12 (40  $\mu$ mol/L) が総溶液量25  $\mu$ LとなるようにDMEMを加え、室温で1時間静置した。静置後の溶液に、U0126 (20  $\mu$ mol/L) またはDMSO (0.01%) を含むDMEMを25  $\mu$ L加え、2倍に希釈したものを細胞添加用のペプチドまたは複合体溶液とした。ERKシグナルのポジティブコントロールであるinsulinは、insulin (5  $\mu$ mol/L) となるようにDMEM (10  $\mu$ mol/L U0126または0.01% DMSOを含

む) 50  $\mu$ Lに溶解した。このように調製されたr12 (20  $\mu$ mol/L)、Pas2r12 (20  $\mu$ mol/L)、Pas2r12 + EGFP 複合体溶液 (Pas2r12 20  $\mu$ mol/L, EGFP 15  $\mu$ mol/L)、insulin (5  $\mu$ mol/L) をそれぞれ含むDMEM (10  $\mu$ mol/L U0126または0.01% DMSOを含む) 50  $\mu$ Lを、各ウェルの細胞へと加えた。Control細胞へは、DMEM (10  $\mu$ mol/L U0126または0.01% DMSOを含む) 50  $\mu$ Lを加えた。これらの細胞を37 $^{\circ}$ Cで10分間培養した後、細胞を氷冷しながらプロテアーゼ阻害剤カクテル (ナカライテスク, 日本) とEZBlock Phosphatase inhibitor cocktail IIおよびIII (BioVision, USA) を含むSDS-PAGE サンプル処理液 (0.25 mol/L Tris  $\cdot$  HCl (pH 6.8)、10% 2-mercaptoethanol、4% sodium dodecyl sulfate、10% sucrose、0.01% bromophenol blue) 100  $\mu$ Lを加えて細胞を溶解し、熱処理を行った (95 $^{\circ}$ C、5分間)。タンパク質は、SDS-PAGEで分離し、PVDFメンブレン (Cytiva, 日本) へと転写を行った。メンブレンを30分間洗浄後、室温で1時間ブロッキング処理を行った。ブロッキング溶液として、リン酸化タンパク質であるpERK1/2を検出するメンブレンには、Blocking One P (ナカライテスク, 日本) を、GAPDHとERK1/2を検出するメンブレンには、Blocking One (ナカライテスク, 日本) を用いた。一次抗体は、anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (3E12) monoclonal antibody (Bioss, USA)、anti-ERK monoclonal antibody (Santa Cruz biotechnology, USA)、anti-pERK1/2 monoclonal antibody (Santa Cruz biotechnology, USA) を、Immuno Shot 抗原抗体反応増強用バッファー (Cosmo Bio, 日本) で2,000倍に希釈し、抗体溶液とした。一次抗体反応は、メンブレンに一次抗体溶液を加え、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。二次抗体は、anti-mouse IgG HRP-linked antibody (Cell Signaling, USA) をImmuno Shot バッファーで2,500倍に希釈し、抗体溶液とした。二次抗体反応は、メンブレンに二次抗体反応溶液を加え、室温で45分間振盪した。検出は、発光試薬であるイムノスター LD (Fujifilm Wako, 日本) を用いて、ChemiDoc XRS+システム (Bio-Rad, USA) により検出した。各サンプル (-U0126) のpERK1/2シグナルとGAPDHシグナルの平均値を、Image Lab (Bio-Rad, USA) で測定した。pERK1/2シグナルをGAPDHで正規化するために、pERK1/2の平均値をGAPDHの平均値で割った。次に、control (-U0126) と比較するために、各値をcontrolで割って比を算出した。これらの比について、Control、r12、Pas2r12、Pas2r12 + EGFP、insulinについて one way ANOVA

分析により有意差を確認し、Tukey法による多重比較を行った。4回独立して実験を行い、平均値±標準誤差で表した。

## 6. 共焦点顕微鏡によるPas2r12によるEGFPのサイトゾル導入率の解析

HEK293細胞 ( $4 \times 10^6$ 個) を直径35 mmのガラスベースディッシュ (AGCテクノグラス、日本) に播種し、10% FBSを含むDulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 中で5日間培養した。その後、方法5と同様に、培養液を2.5%FBSを含むDMEMに置換し、24時間培養を行った。Pas2r12とEGFPの複合体形成は、マイクロチューブ3本 (① control、② DMSO、③ U0126) にそれぞれPas2r12 (40  $\mu$  mol/L) およびEGFP (30  $\mu$  mol/L) を加えてDMEMで溶液量を50  $\mu$  Lとし、24°Cで1時間静置した。静置後の溶液に、① DMEM (2.5% FBS) を50  $\mu$  L、② DMSO (0.02%) を含むDMEM (2.5% FBS) を50  $\mu$  L、③ U0126 (20  $\mu$  mol/L) を含むDMEM (2.5% FBS) を50  $\mu$  L、それぞれに加えて2倍に希釈し、複合体溶液 (① 20  $\mu$  mol/L Pas2r12 + 15  $\mu$  mol/L EGFP、② 20  $\mu$  mol/L Pas2r12 + 15  $\mu$  mol/L EGFP、0.01% DMSO、③ 20  $\mu$  mol/L Pas2r12 + 15  $\mu$  mol/L EGFP、20  $\mu$  mol/L U0126) とした。複合体を加える前に、それぞれのガラスベースディッシュの培養液をDMEM (2.5% FBS) から① DMEM (2.5% FBS) 2 mL、② DMEM (2.5% FBS + 0.01% DMSO) 2 mL、③ DMEM (2.5% FBS + 10  $\mu$  mol/L U0126) 2 mLに置換して、30分間前培養を行った。その後、前培養を行ったガラスベースディッシュからDMEM培地を全て除き、中央の直径12 mmガラスベースウェル内の細胞に、調製した複合体溶液 (①~③) を加えた。細胞を37°Cで45分間培養し、DMEM (10% FBS) により洗浄を行った。その後、DMEM (10% FBS) 2 mLとHoechst 33342 (Dojindo, 日本) 1  $\mu$  gを加え、30分間37°Cで核染色を行った。生細胞内におけるEGFPの検出は、FluoView FV1200 (オリンパス、日本) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。対物レンズはUPlanSApo 60×O (オリンパス、日本) を使用し、5視野の細胞 (全視野の合計が300個程度) についてイメージング画像を取得した。蛍光画像と明視野を重ね合わせ、「EGFPがサイトゾルへ拡散している細胞数」を目視で計測し、核染色画像から目視で計測した「全細胞数」に対する割合を「サイトゾル導入率」とした。3回独立して実験を行い、

平均値±標準誤差で表した。controlとの比較は、スチューデントの*t*検定を行った。

## 7. 細胞生存率の解析

HEK293細胞 ( $2 \times 10^4$ 個) を96ウェルマイクロプレート (AGCテクノグラス、日本) に播種し、10% FBSを含むDMEM中で5日間培養した。その後、方法5と同様に、培養液を2.5% FBSを含むDMEMに置換し、24時間培養を行った。Pas2r12とEGFPの複合体形成は、マイクロチューブ3本にそれぞれPas2r12 (40  $\mu$  mol/L) およびEGFP (30  $\mu$  mol/L) を加えてDMEMで溶液量を25  $\mu$  Lとし、24°Cで1時間静置した。静置後の溶液に、① DMEM (2.5% FBS) を25  $\mu$  L、② DMSO (0.02%) を含むDMEM (2.5% FBS) を25  $\mu$  L、③ U0126 (20  $\mu$  mol/L) を含むDMEM (2.5% FBS) を25  $\mu$  L、それぞれに加えて2倍に希釈し、複合体溶液 (① 20  $\mu$  mol/L Pas2r12 + 15  $\mu$  mol/L EGFP、② 20  $\mu$  mol/L Pas2r12 + 15  $\mu$  mol/L EGFP、0.01% DMSO、③ 20  $\mu$  mol/L Pas2r12 + 15  $\mu$  mol/L EGFP、20  $\mu$  mol/L U0126) とした。複合体を加える前に、それぞれのウェルの培養液をDMEM (2.5% FBS) から① DMEM (2.5% FBS) 0.1 mL、② DMEM (2.5% FBS + 0.01% DMSO) 0.1 mL、③ DMEM (2.5% FBS + 10  $\mu$  mol/L U0126) 0.1 mLに置換して、30分間前培養を行った。その後、前培養を行ったウェルからDMEM培地を全て除き、調製した複合体溶液 (①~③) を加えた。細胞を37°Cで45分間培養した後、CellQuanti-MTT cell-viability assay kit (Bioassay Systems, USA) によりMTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assayを行った。反応溶液 (95  $\mu$  L) を、それぞれのウェルに加え、37°Cで4時間静置した。その後、溶解液を100  $\mu$  L加え、1時間振盪した。570 nmにおける吸光度をモデル550マイクロプレートリーダー (Bio-Rad, USA) を用いて測定した。測定値は、平均値±標準誤差で表した。統計学的有意差を判定する為に、①のcontrol細胞の測定値に対する②と③の測定値を、スチューデントの*t*検定により評価した。

## Ⅲ. 結果

まず、Pas2r12あるいは複合体 (Pas2r12 + EGFP) 導入による、ERK1/2のリン酸化につい

て調べた。細胞に、Pas2r12またはPas2r12 + EGFPを加えると、ERK1/2のリン酸化がcontrolに比べて約3.7倍または約5.2倍と顕著に増加した (Fig. 1A, B)。ポジティブコントロールとして用いたインスリンは、インスリン受容体のリガンドであり、MAPKを活性化する<sup>17)</sup>。インスリンで刺激した細胞におけるERK1/2のリン酸化は、controlに比べて約3.4倍と顕著に増加した。さらに、MEK1/2の活性化阻害剤であるU0126<sup>18)</sup>で細胞を処理すると、Pas2r12、Pas2r12 + EGFP、インスリンによるERK1/2のリン酸化はほぼ完全に抑制された (Fig. 1A)。一方、r12

を加えた細胞では、controlと比べて約1.2倍と有意な差はみられなかったが、Pas2r12、Pas2r12 + EGFP、インスリンとは有意差が見られた。以上の結果から、Pas2r12およびPas2r12 + EGFPによって、ERK1/2のリン酸化が促進されることが示された。

次に、Pas2r12によるEGFPのサイトゾル導入に、U0126が与える影響について調べた。DMEM (2.5% FBS) のみ、またはDMEM (2.5% FBS) にDMSOあるいはU0126を含む培地で前培養を行った細胞に、それぞれPas2r12 + EGFPを加えて培養を行った。Pas2r12によってサイトゾル導入されたEGFPは、核を

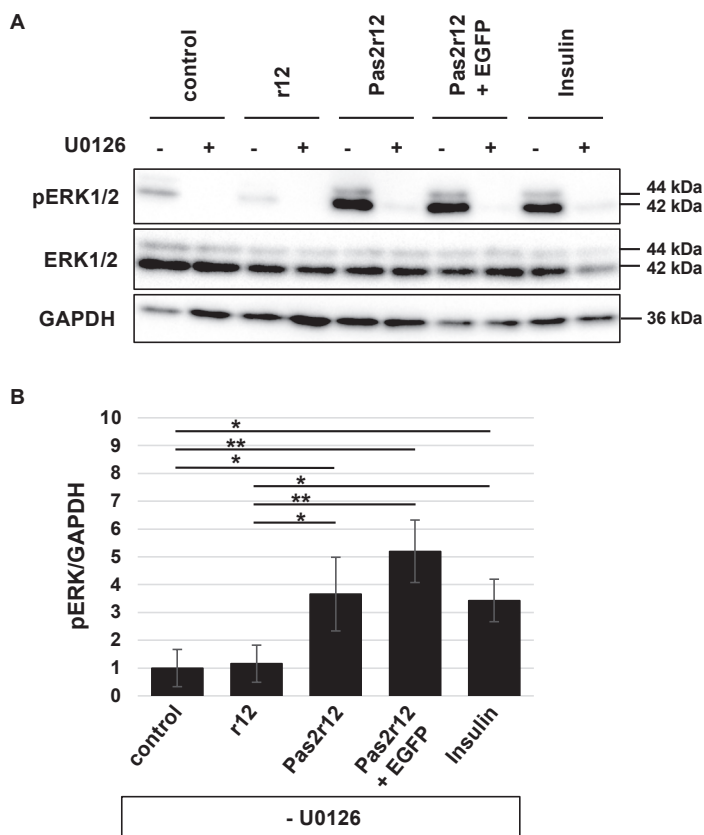


Fig. 1 Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (pERK1/2) by peptides or complexes. Cells with 10  $\mu$  mol/L U0126 or with vehicle (0.01% dimethyl sulfoxide, -U0126) were treated with r12 (20  $\mu$  mol/L), Pas2r12 (20  $\mu$  mol/L), Pas2r12 + enhance green fluorescent protein (EGFP) (20  $\mu$  mol/L + 15  $\mu$  mol/L), or insulin (5  $\mu$  mol/L). (A) Phosphorylation and expression of ERK were examined by Western blotting. (B) Comparison of pERK1/2 levels normalized by glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in treated cells without U0126 in A. The mean values of pERK1/2 and GAPDH signals (-U0126) of each sample were determined by Image Lab. To normalize the pERK1/2 signal by GAPDH, the mean value of pERK1/2 was divided by the mean value of GAPDH. Next, in order to compare with control (-U0126), the ratio was calculated by dividing each value by control. The data represent the mean  $\pm$  SEM from 4 experiments. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .

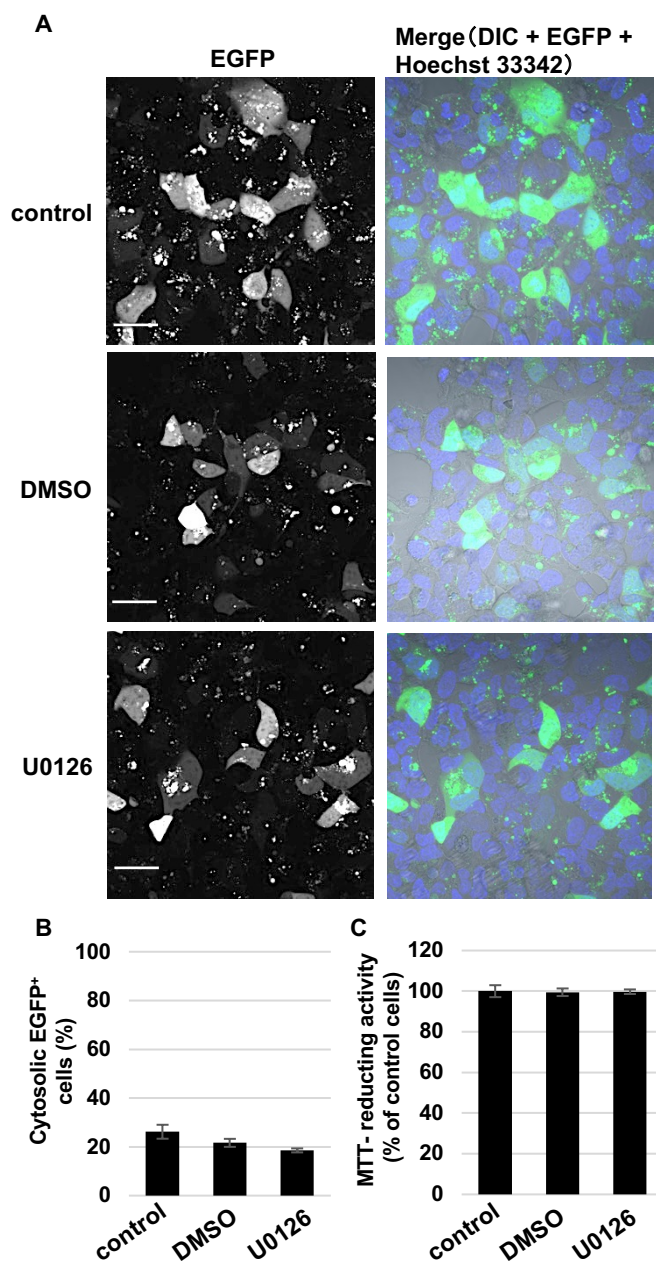


Fig. 2 Influence of U0126 treatment on cytosolic EGFP delivery by Pas2r12. Cells were treated with Pas2r12 (20  $\mu$  mol/L) + enhance green fluorescent protein (EGFP) (15  $\mu$  mol/L) for 45 min under U0126 (10  $\mu$  mol/L). For the control, Pas2r12 + EGFP were added to cells with or without 0.01% dimethyl sulfoxide (DMSO). (A) Cells were captured with confocal microscopy. The green channels show localization of EGFP. The blue channels show DNA, which is stained Hoechst 33342. DIC: differential interference contrast. Scale bars represent 20  $\mu$  m. (B) The bar graph of proportion of cells with cytosolic EGFP. The data represent the mean  $\pm$  SEM from 3 experiments. (C) Cell viability assay. MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. The data represent the mean  $\pm$  SEM from 3 experiments.

含めた細胞全体に拡散した (Fig. 2A)。それぞれのEGFPサイトゾル導入率は、control (2.5% FBSを含むDMEMのみで前培養) で26.1%、DMSOで21.6%、U0126で18.5%となった。Controlに対して、DMSO処理細胞 ( $p=0.065$ ) およびU0126 ( $p=0.821$ ) 処理細胞共に、有意差はみられなかった (Fig. 2A, B)。また、DMSOとU0126処理による細胞へのダメージを確認する為に、Fig. 2Aと同様の条件で処理した細胞に対して、細胞生存率の解析を行った。Controlに対して、DMSOとU0126処理細胞ともに有意差は見られなかった (Fig. 2C)。以上の結果から、Pas2r12 + EGFPによるERK1/2のリン酸化を抑制しても、EGFPのサイトゾル導入率には影響しないことが示された。

#### Ⅳ. 考察

本研究では、Pas2r12およびPas2r12 + EGFPの刺激により、ERK1/2がリン酸化されることを明らかにした。これは、Pas2r12およびPas2r12 + EGFPによる刺激を細胞内へと伝える受容体が、細胞表面に存在する可能性を示している。これまでに、リン酸化されたERK1/2の機能については、核へと移行して細胞増殖に関与する様々な転写因子をリン酸化することが広く知られているが<sup>11,12</sup>、後期エンドソーム上では、細胞内総MEK-ERKの約半分の活性化がみられることが報告されていた<sup>15</sup>。このMEK-ERKの活性化による機能はまだ明らかではないが、後期エンドソームからリソソームへの正常な移行を、補助している可能性が示唆されていた。

Pas2r12 + EGFPを加えた細胞において、ERK1/2がリン酸化されたが、このERK1/2の活性化を抑制してもEGFPのサイトゾル導入率に影響は見られなかった。Pas2r12 + EGFPは、主にカベオラ依存性エンドサイトーシスにより、EGFPがサイトゾルへと移行する。ERK1/2とエンドソームとの関係は、後期エンドソームからリソソームへの移行に関与していることが示唆されていたことから、本研究においてもPas2r12によるEGFPのサイトゾル導入は、後期エンドソームよりも前の段階で起きている可能性がある。この可能性も踏まえ、今後EGFPのエンドソームからサイトゾルへの移行のタイミングについて、検証する必要がある。

DMSOは、極性、非プロトン性、両親媒性の

特性を持つことから、細胞実験だけではなく生体治療薬の溶媒としても使用される。ただし、0.1%程度の低濃度でも、細胞内の脂質や核酸への影響が報告されている<sup>19</sup>。本研究では、DMSOをU0126の溶媒として用いたが、細胞への影響をできるだけ抑える為に、0.01%の濃度で使用した。この濃度では、細胞生存率への影響はみられなかったが、DMSOとU0126の存在下でのPas2r12によるEGFPのサイトゾル導入率は、DMSOやU0126を加えていないcontrolよりも平均値がわずかに低下した。よって、DMSOを使用する場合は、低濃度であっても細胞に対して何らかの影響が生じることは避けられず、細胞への影響が少ない溶媒の登場が望まれる。

一方、ERK1/2の活性化は、r12ではみられなかった。Pas2r12がERK1/2をリン酸化するようになった理由として、二つの可能性が考えられる。一つ目は、「ERK1/2を活性化する受容体」に対して、新たに結合できるようになったという可能性である。また、二つ目の可能性としては、r12と比べて「ERK1/2を活性化する受容体」に対して、より強く結合できるようになったという可能性である。これまでに、r12 (rrrrrrrrrrrr, D-アミノ酸) 単独の細胞内導入について報告はない。しかし、EGFPにr12を化学的にライゲーションしたEGFP-r12は、細胞内へと導入されることが報告されている<sup>20</sup>。また、R12 (RRRRRRRRRRRR, L-アミノ酸) については、細胞膜を直接透過する経路<sup>21</sup>と、Gタンパク質共役受容体であるCXCR4を介してマクロピノサイトーシスによって細胞内へと導入される経路<sup>22</sup>が知られている。このCXCR4に、ケモカインSDF-1 $\alpha$ が結合すると、ERK1/2がリン酸化される<sup>23</sup>。よって、Pas2r12の刺激により「ERK1/2を活性化する受容体」として、CXCR4を始めとしたMAPK上流に位置するGタンパク質共役受容体あるいはチロシキナーゼ受容体が候補となり得る。

今後、Pas2r12の特異的受容体が明らかとなれば、より効果的なデリバリーへと繋げることが出来るはずである。また、受容体をエントランスとしたターゲティングデリバリーの可能性と共に、エンドソームからサイトゾルへのタンパク質の移行のタイミングや詳細なメカニズムについても、検証する必要があると考える。

## 謝辞

本研究は、JSPS科研費20K05744の助成を受けたものです。

本論文内容に関連する著者らの利益相反：なし

## 文献

- 1) Li X, Liu M, Sun R, Zeng Y, Chen S and Zhang P: Protective approaches against myocardial ischemia reperfusion injury. *Exp Ther Med*, 12: 3823–3829, 2016.
- 2) He X, Xiong S, Sun Y, Zhong M, Xiao N, Zhou Z, Wang T, Tang Y and Xie J: Recent progress of rational modified nanocarriers for cytosolic protein delivery. *Pharmaceutics*, 15: 1610, 2023.
- 3) Ye J, Liu E, Yu Z, Pei X, Chen S, Zhang P, Shin MC, Gong J, He H and Yang VC: CPP-assisted intracellular drug delivery, What is Next? *Int J Mol Sci*, 17: 1892, 2016.
- 4) Takayama K, Nakase I, Michiue H, Takeuchi T, Tomizawa K, Matsui H and Futaki S: Enhanced intracellular delivery using arginine-rich peptides by the addition of penetration accelerating sequences (Pas). *J Control Release*, 138: 128–133, 2009.
- 5) Takayama K, Hirose H, Tanaka G, Pujals S, Katayama S, Nakase I and Futaki S: Effect of the attachment of a penetration accelerating sequence and the influence of hydrophobicity on octaarginine-mediated intracellular delivery. *Mol Pharm*, 9: 1222–1230, 2012.
- 6) Okuda A, Tahara S, Hirose H, Takeuchi T, Nakase I, Ono A, Takehashi M, Tanaka S and Futaki S: Oligoarginine-bearing tandem repeat penetration-accelerating sequence delivers protein to cytosol via caveolae-mediated endocytosis. *Biomacromolecules*, 20: 1849–1859, 2019.
- 7) Busija AR, Patel HH and Insel PA: Caveolins and cavins in the trafficking, maturation, and degradation of caveolae: implications for cell physiology. *Am J Physiol Cell Physiol*, 312: C459–477, 2017.
- 8) Pelkmans L, Kartenbeck J and Helenius A: Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, 3: 473–483, 2001.
- 9) Tsai B, Gilbert JM, Stehle T, Lencer W, Benjamin TL and Rapoport TA: Gangliosides are receptors for murine polyoma virus and SV40. *EMBO J*, 22: 4346–4355, 2003.
- 10) Botos E, Turi Á, Müllner N, Kovalszky I, Tátrai P and Kiss AL: Regulatory role of kinases and phosphatases on the internalisation of caveolae in HepG2 cells. *Micron*, 38: 313–320, 2007.
- 11) Carriere A, Ray H, Blenis J and Roux PP: The RSK factors of activating the Ras/MAPK signaling cascade. *Front Biosci*, 13: 4258–4275, 2008.
- 12) Guo Y, Pan W, Liu S, Shen Z, Xu Y and Hu L: ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med*, 19: 1997–2007, 2020.
- 13) Wu P-K, Becker A and Park J-I: Growth inhibitory signaling of the Raf/MEK/ERK pathway. *Int J Mol Sci*, 21: 2249–2257, 2020.
- 14) Cicenas J, Zalyte E, Rimkus A, Dapkus D, Noreika R and Urbonavicius S: JNK, p38, ERK and SKG1 inhibitor in cancer. *Cancers*, 10: 1, 2017.
- 15) Nada S, Honda A, Kasai A, Koike M, Saito K, Uchiyama Y and Okada M: The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes. *EMBO J*, 28: 477–489, 2008.
- 16) 奥田明子、及川晟: 改良型膜透過ペプチドによるサイトゾルへのタンパク質導入に牛胎児血清が与える影響. *生物試料分析*, 43: 314–320, 2020.
- 17) Hall C, Yu H and Choi E: Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Exp Mol Med*, 52: 911–920, 2020.
- 18) Favata MF, Horiuchi HY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA and Trzaskos JM: Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 273: 18623–18632, 1998.
- 19) Tunçer S, Gurbanov R, Sheraj I, Sobel E, Esenturk O and Banerjee S: Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci Rep*, 8: 14828, 2018.
- 20) Yu H-H, Nakase I, Pujals S, Hirose H, Tanaka G, Katayama S, Imanishi M and Futaki S: Expressed protein ligation for the preparation of fusion proteins with cell penetrating peptides for endotoxin removal and intracellular delivery. *Biochim Biophys Acta – Biomembr*, 1798: 2249–2257, 2010.
- 21) Kosuge M, Takeuchi T, Nakase I, Jones AT and Futaki S: Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans. *Bioconjug Chem*, 19: 656–664, 2008.
- 22) Tanaka G, Nakase I, Fukuda Y, Masuda R, Oishi S, Shimura K, Kawaguchi Y, Takatani-Nakase T, Langel U, Gräslund A, Okawa K, Matuoka M, Fujii N, Hatanaka Y and Futaki S: CXCR4 stimulates macropinocytosis: implications for cellular uptake of



## 生 物 試 料 分 析

- arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem Biol*, 19: 1437–1446, 2012.
- 23) Sun Y, Cheng Z, Ma L and Pei G:  $\beta$ -Arrestin2 is critically involved in CXCR4-mediated chemotaxis, and this is mediated by its enhancement of p38 MAPK activation. *J Biol Chem*, 277: 49212–49219, 2002.