

細胞膜透過性 caveolin-1 スキャフォールドリングドメイン

ペプチドによるファゴサイトーシスの活性化

萩原真^{1*}、松下健二²

エンドサイトーシスは、細胞膜が陥入することによって小胞を形成し細胞外から細胞内へと物質を取り込む機構である。低分子量 G タンパク質 Rab5 は、エンドサイトーシスに重要な因子であり、GDP が結合した不活性型と GTP が結合した活性型が存在し、この活性変化によって高度にエンドサイトーシスが制御されている。ファゴサイトーシスは、エンドサイトーシスの一種であり、マクロファージなどにおいて、生体外から侵入した細菌などの比較的大きな物質を取り込む機構である。筆者らは、ショウジョウバエの Antennapedia のホメオドメインに由来する細胞膜透過性ペプチド (Penetratin) と caveolin-1 のスキャフォールドリングドメイン (SD ドメイン) を融合させた細胞膜透過性 caveolin-1 SD ドメインペプチド (細胞膜透過性 CSD ペプチド) が、Rab5 を活性化させファゴサイトーシスを促進することを明らかにした。本稿では、カベオラと caveolin について概説した後、細胞膜透過性 CSD ペプチドによるファゴサイトーシス促進作用について紹介する。

キーワード： エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、カベオラ、Rab5、caveolin、細胞膜透過性ペプチド

はじめに

エンドサイトーシスは、細胞膜が陥入することによって小胞を形成し、細胞外から細胞内へと物質を取り込む機構である。細胞膜における物質取り込みにはトランスポーターによるものもあるが、この取り込みでは、小胞は形成されず、トランスポーターの構造が変化することによって結合した分子を細胞内側に移動させるので、エンドサイトーシスとは全く仕組みが異なる。真核細胞は、様々な物質をエンドサイトーシスによって細胞外から細胞内部へと取り込むが、その仕組みは単一ではなく、取り込みに関わるタンパク質、細胞装置、取り込み様式、取り込まれる物質の大き

さなどによって大別されている。その種類は、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシスなどが知られている¹⁻³⁾。ファゴサイトーシスはマクロファージなどの貪食細胞において、ファゴサイティックカップを形成し、大きな物質 (直径が 0.5 μm 以上) を取り込む機構である。生体外から侵入した細菌などの異物はファゴサイトーシスによって細胞内部に取り込まれリソソームで分解される³⁻⁵⁾。従って、この機構を活性化させることができれば、免疫力を上昇させることができると考えられる。

筆者らは、ショウジョウバエの Antennapedia のホメオドメインに由来する細胞膜透過性ペ

¹ 新潟県立大学人間生活学部健康栄養学科 ² 国立長寿医療研究センター口腔疾患研究部

* 責任著者 連絡先 : hagimako@unii.ac.jp

利益相反 : なし

チド (Penetratin) と caveolin-1 のスキヤフォールディングドメイン (SD ドメイン) を融合させた細胞膜透過性 caveolin-1 スキヤフォールディングドメインペプチド (細胞膜透過性 CSD ペプチド) が、エンドサイトーシスに重要な因子である Rab5 の活性を上昇させることによってファゴサイトーシスを促進することを明らかにした⁶⁾。本稿では、カベオラと caveolin について概説した後、細胞膜透過性 CSD ペプチドによるファゴサイトーシス促進作用について紹介する。

カベオラと Caveolin

カベオラは、細胞膜上に存在する直径 50-100 nm のフラスコ状の陥入した区画である⁷⁾。カベオラを脂質ラフトに含める場合と、カベオラとカベオラ以外の脂質ラフトを区別する場合があるが、いずれにせよカベオラの脂質組成は、他の脂質ラフトと同様に、コレステロールやスフィンゴ脂質に富んでいる^{7,8)}。カベオラの特徴としては、caveolin タンパク質が局在していることであり、caveolin のオリゴマーを骨格として構造が形成されている⁷⁾。カベオラ以外の脂質ラフトには caveolin が局在していないため、コレステロールやスフィンゴ脂質が豊富に存在しなおかつ caveolin が集積した細胞膜上の陥入構造が、カベオラと定義される⁸⁾。近年、カベオラの形成には、cavin タンパク質が重要であることが明かにされている^{9,10)}。

カベオラの主要なタンパク質である caveolin は、アイソフォームの存在が知られている。caveolin-1 (caveolin-1 α と caveolin-1 β のアイソフォームが存在) と caveolin-2 は内皮細胞、線維芽細胞、脂肪細胞など様々な細胞で発現しており、caveolin-3 は主に骨格筋や心筋で発現している。caveolin は、赤血球、血小板、リンパ球、Caco-2 細胞などでは発現していないとされている¹¹⁾。また、caveolin は、多くの神経細胞では発現していないとされているが、後根神経節などの一部の神経細胞では発現している¹²⁾。

caveolin-1 は、caveolin-1 α と caveolin-1 β のアイソフォームが存在するが、本論文では、caveolin-1 と記述した場合は、caveolin-1 α を指すものとする。caveolin-1 は、178 アミノ酸で構成される分子量約 22 kDa のタンパク質である。図 1A に、caveolin-1 の機能ドメインを示した。N 末端側と C 末端側は親水性が強く、中央には疎水性の強い部分がある。この特徴より、caveolin-1 は大きく 3 つのドメインより成り立っており、N 末端側より 1 番目から 101 番目のアミノ酸配列は N 末端細胞質ドメイン (N-terminal cytoplasmic domain: NC ドメイン)、102 番目から 134 番目のアミノ酸配列は膜貫通ドメイン (transmembrane domain: TM ドメイン)、135 番目から 178 番目のアミノ酸配列は C 末端細胞質ドメイン (C-terminal cytoplasmic domain: CC ドメイン) に分類される^{7,13,14)}。さらに、caveolin-1 の N 末端細胞質ドメインのうち 82 番目から 101 番目のアミノ酸配列は、スキヤフォールディングドメイン (scaffolding domain: SD ドメイン) と呼ばれ、様々な受容体やシグナル伝達タンパク質が結合することが知られている^{7,13,14)}。caveolin-1 SD ドメインは、重要なドメインであるため、進化の過程において、高度に保存されており、様々な生物において共通の配列である (図 1B)。この SD ドメインは、カベオラ依存性エンドサイトーシスや細胞内シグナル伝達などを介して様々な細胞の機能の調節に関わっている⁷⁾。

カベオラ依存的エンドサイトーシスによって、細胞内へと物質が取り込まれる時に、カベオラから出芽した小胞膜上には、カベオラ由来の caveolin が存在する。caveolin は細胞膜上のカベオラにのみ存在するのではなく、小胞と一緒に細胞内を移動し、様々なオルガネラやエキソサイトーシスによるオルガネラから細胞膜への輸送小胞膜上でも観察される^{7,9,15-17)}。さらに、サイトゾルにも局在し、可溶化型 caveolin の役割も報告されている¹⁶⁻¹⁸⁾。また、caveolin は細胞外へと分泌され血中や培養細胞の培地中から検出される

表1 様々な細胞膜透過性ペプチド

細胞膜透過性ペプチド	アミノ酸配列	由来	アミノ酸数
Penetratin	RQIKIWFQNRRMKWKK	ショウジョウバエの Antennapedia	16
TAT ₄₈₋₆₀	GRKKRRQRRRPPQ	1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1) TAT protein	13
ポリアルギニン	R8, R9, R10, R12	合成ペプチド	8-12
Transportin	GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	合成ペプチド	27
MAP17	QLALQLAQLQAALQLA	合成ペプチド	17
GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA	合成ペプチド	30
(PPR)n	(PPR)3, (PPR)4, (PPR)5, (PPR)6	合成ペプチド	9-18
Pep-7	SDLWEMMMVSLACQY	ファージクローンのCHL8ペプチド	15

細胞膜透過性CSDペプチド



図2 細胞膜透過性 CSD ペプチド

細胞膜透過性 CSD ペプチドは、Penetratin (ショウジョウバエの Antennapedia のホモドメインに由来する細胞膜透過性ペプチド (43-58 残基)) と caveolin-1 の SD ドメインを融合させたものである。

胞膜透過性ペプチドである²⁵⁻²⁷⁾。TAT₄₈₋₆₀ は、1型ヒト免疫不全ウイルス (HIV-1) の転写活性化タンパク質 TAT の部分配列である^{25,28,29)}。細胞膜透過性ペプチドを用いた細胞への導入技術は、タンパク質やペプチドだけではなく、siRNA の細胞内への導入にも応用され、薬剤としての利用が研究されている²⁵⁾。

筆者らは、HA 融合 caveolin-1 の欠失変異体 (deletion mutant) を培養細胞で発現させ、免疫沈降法によって SD ドメイン、TM ドメイン、CC ドメインが Rab5 と共免疫沈降することを明らかにした³⁴⁾。さらに、培養細胞を用いて caveolin-1 の Rab5 結合ドメインが Rab5 の活性を上昇させることをも明らかにしている³⁴⁾。また、同様に

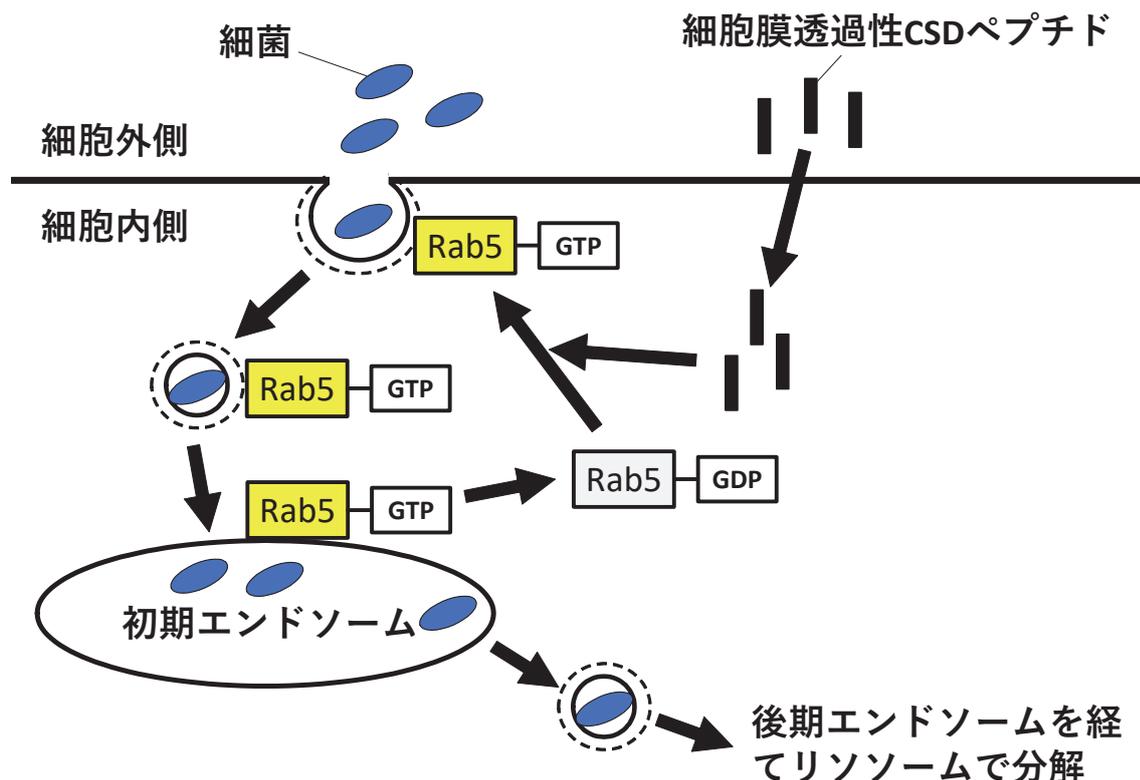


図 3 マクロファージなどの食食細胞における細胞膜透過性 CSD ペプチドによるファゴサイトーシス活性化

細胞膜透過性 CSD ペプチドは細胞膜をすり抜けて、細胞内へと入る。細胞膜透過性 CSD ペプチドは、Rab5 を活性化させる。活性化された Rab5 は、ファゴサイトーシスを促進し、細菌などの大きな粒子を細胞内へと取り込む。取り込まれた細菌は、初期エンドソーム（初期ファゴソーム）、後期エンドソームを経て、リソソームへと運ばれ分解される。

HA 融合 caveolin-1 の欠失変異体を培養細胞で発現させ、免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で観察したところ、SD ドメインを有する NC ドメインは初期エンドソームを強大化させたのに対し、SD ドメインを欠損させた NC ドメインでは初期エンドソームの巨大化は観察されなかった³⁵⁾。現在のところ理由はわからないが、培養細胞で HA 融合 TM ドメインと HA 融合 CC ドメインを発現させると Rab5 の活性を上昇させるのにもかかわらず、初期エンドソームの巨大化は観察されなかった³⁵⁾。これらの実験データから細胞膜透過性ペプチドと SD ドメイン、TM ドメイン、CC ドメインを融合させればエンドサイトーシスを活性化さ

せる薬剤として利用できるのではないかと考えられた。

すでに、細胞膜透過性ペプチドである Penetratin と caveolin-1 の SD ドメインを融合させた細胞膜透過性薬剤が報告されており^{36,41)}、その一方、細胞膜透過性ペプチドと TM ドメインや CC ドメインを融合させた薬剤は報告されていなかった。そこで、すでに研究が進んでおり、入手しやすい細胞膜透過性 CSD ペプチドを実験に用いることとした。Penetratin と caveolin-1 の SD ドメインを融合させた、細胞膜透過性 CSD ペプチド (AP-Cav、Pen-C1-SD、Cavtratin などの別名がある) は、抗炎症作用などが報告されている^{37,42)}。

図2に細胞膜透過性CSDペプチドのアミノ酸配列を示した。なお、細胞膜透過性CSDペプチドの細胞内への移行は、エンドサイトーシスによるものではない。

まず、細胞膜透過性CSDがエンドサイトーシスを促進するのかどうかについて調べるために、細胞膜透過性CSDペプチドを培養細胞に添加し、Rab5の活性測定を試みた。Rab5の活性を測定する方法としては、Rab5の相互作用因子であるRabaptin-5の活性型Rab5結合ドメインを利用したGST-R5BDプルダウン法が知られている^{34,43-51}。そこで、細胞膜透過性CSDペプチドがRab5の活性に及ぼす影響について、GST-R5BDプルダウン法で解析を行ったところRab5の活性が上昇することが明らかになった⁶。また、細胞膜透過性CSDペプチドを培養細胞に添加するとRab5と初期エンドソームマーカーであるEEA1との共局在が強まった⁶。次に、マクロファージ様細胞であるRAW264細胞を用いて、pHrodo Red *E. coli* BioParticles Conjugate for Phagocytosis (Thermo Fisher Scientific社)を指標としてファゴサイトーシスによる取り込みを測定したところ、細胞膜透過性CSDペプチドを添加した細胞では、ファゴサイトーシスが促進していた⁶。すなわち、細胞膜透過性CSDペプチドは免疫力を高める薬剤として有効である可能性が培養細胞レベルで示された。図3に細胞膜透過性CSDペプチドによるRab5活性化とファゴサイトーシスによる取り込みの概略を図示した。

結語

本稿では、カベオラとcaveolinや細胞膜透過性CSDペプチドによるファゴサイトーシス活性化作用について概説した。細胞膜透過性CSDペプチドによって、Rab5が活性化されファゴサイトーシスが促進することが明らかになったが、このファゴサイトーシスにカベオラが関与するのか、それともカベオラ非依存的なエンドサイトーシスによるものなのかなどメカニズムについては

不明な点が多く残されている。また、ファゴサイトーシスを活性化させることができれば細菌感染症の治療に応用できる可能性がある。肺炎や敗血症などの細菌感染症では死に至るケースもあるが、抗菌剤を使用しつつ、免疫力を活性化させることができれば、症状を軽減することができるかもしれない。細菌感染による疾患は、過剰な炎症反応によるサイトカインストームも問題となり死に至ることもある。細胞膜透過性CSDペプチドは、炎症も抑制することが報告されており^{37,42}、細胞膜透過性CSDペプチドは、少なくとも培養細胞を用いた実験では、炎症を抑えつつ免疫力を上げるのできる良い薬剤である。このように、細胞膜透過性CSDペプチドは、感染症の治療薬の候補になる可能性があるが、今後、様々な角度から検討していく必要がある。

倫理的配慮

本論文は、様々な学術的文献をまとめたものであり、倫理委員会等の審査は不要である。

文献

- 1) Doherty GJ, McMahon HT. Mechanisms of endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2009; 78: 857-902.
- 2) Kirkham M, Parton RG. Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1746: 349-63.
- 3) Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003; 422: 37-44.
- 4) Kinchen JM, Ravichandran KS. Phagosome maturation: going through the acid test. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9: 781-95.
- 5) May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 2001; 114: 1061-77.

- 6) Hagiwara M, Matsushita K. Synthetic cell-permeable caveolin-1 scaffolding domain peptide activates phagocytosis of *Escherichia coli* by regulating Rab5 activity. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2020; 75: 333-7.
- 7) Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, et al. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84: 1341-79.
- 8) Galbiati F, Razani B, Lisanti MP. Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell.* 2001; 106: 403-11.
- 9) Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013; 14: 98-112.
- 10) Kovtun O, Tillu VA, Ariotti N, et al. Cavin family proteins and the assembly of caveolae. *J Cell Sci.* 2015; 128: 1269-78.
- 11) Stan RV. Structure of caveolae. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1746: 334-48.
- 12) Galbiati F, Volonte D, Gil O, et al. Expression of caveolin-1 and -2 in differentiating PC12 cells and dorsal root ganglion neurons: caveolin-2 is up-regulated in response to cell injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 10257-62.
- 13) Schlegel A, Lisanti MP. A molecular dissection of caveolin-1 membrane attachment and oligomerization. Two separate regions of the caveolin-1 C-terminal domain mediate membrane binding and oligomer/oligomer interactions in vivo. *J Biol Chem.* 2000; 275: 21605-17.
- 14) Schlegel A, Schwab RB, Scherer PE, et al. A role for the caveolin scaffolding domain in mediating the membrane attachment of caveolin-1. The caveolin scaffolding domain is both necessary and sufficient for membrane binding in vitro. *J Biol Chem.* 1999; 274: 22660-7.
- 15) Pfeffer SR. Caveolae on the move. *Nat Cell Biol.* 2001; 3: E108-10.
- 16) Liu P, Rudick M, Anderson RG. Multiple functions of caveolin-1. *J Biol Chem.* 2002; 277: 41295-8.
- 17) Raudenska M, Gumulec J, Balvan J, et al. Caveolin-1 in oncogenic metabolic symbiosis. *Int J Cancer.* 2020; 147: 1793-807.
- 18) Head BP, Insel PA. Do caveolins regulate cells by actions outside of caveolae? *Trends Cell Biol.* 2007; 17: 51-7.
- 19) Albacete-Albacete L, Navarro-Lerida I, Lopez JA, et al. ECM deposition is driven by caveolin-1-dependent regulation of exosomal biogenesis and cargo sorting. *J Cell Biol.* 2020; 219.
- 20) Ariotti N, Wu Y, Okano S, et al. An inverted CAV1 (caveolin 1) topology defines novel autophagy-dependent exosome secretion from prostate cancer cells. *Autophagy.* 2020: 1-17.
- 21) Tas F, Karabulut S, Tilgen Yasasever C, et al. Clinical significance of serum caveolin-1 levels in melanoma patients. *Int J Dermatol.* 2016; 55: 558-62.
- 22) Zhu F, Huang J, Wang X, et al. The expression and significance of serum caveolin-1 in patients with Kawasaki disease. *Chin J Physiol.* 2020; 63: 90-4.
- 23) Cift T, Begum AM, Aslan Cetin B, et al. Serum caveolin-1 levels in patients with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2020; 33: 712-7.
- 24) Freeman MR, Yang W, Di Vizio D. Caveolin-1 and prostate cancer progression. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 729: 95-110.
- 25) Singh T, Murthy ASN, Yang HJ, et al. Versatility of cell-penetrating peptides for intracellular delivery of siRNA. *Drug Deliv.* 2018; 25: 1996-2006.
- 26) Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H, et al. Antennapedia homeobox peptide regulates

- neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88: 1864-8.
- 27) Derossi D, Joliot AH, Chassaing G, et al. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 1994; 269: 10444-50.
- 28) Vives E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 1997; 272: 16010-7.
- 29) Brooks H, Lebleu B, Vives E. Tat peptide-mediated cellular delivery: back to basics. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 559-77.
- 30) Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, et al. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem*. 2001; 276: 5836-40.
- 31) Pooga M, Hallbrink M, Zorko M, et al. Cell penetration by transportan. *FASEB J*. 1998; 12: 67-77.
- 32) Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today*. 2012; 17: 850-60.
- 33) Gao C, Mao S, Ditzel HJ, et al. A cell-penetrating peptide from a novel pVII-pIX phage-displayed random peptide library. *Bioorg Med Chem*. 2002; 10: 4057-65.
- 34) Hagiwara M, Shirai Y, Nomura R, et al. Caveolin-1 activates Rab5 and enhances endocytosis through direct interaction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 378: 73-8.
- 35) Dowler BC. Endocytosis : structural components, functions and pathways. Chapter 11 Rab5 Mediated Caveolae Endocytosis. Yuji Yamamoto, Tadahiro Tadokoro, Makoto Hagiwara,; Nova Science publishers; 2010: 211-221.
- 36) Zhu L, Schwegler-Berry D, Castranova V, et al. Internalization of caveolin-1 scaffolding domain facilitated by Antennapedia homeodomain attenuates PAF-induced increase in microvessel permeability. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286: H195-201.
- 37) Bernatchez PN, Bauer PM, Yu J, et al. Dissecting the molecular control of endothelial NO synthase by caveolin-1 using cell-permeable peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 761-6.
- 38) Jasmin JF, Mercier I, Dupuis J, et al. Short-term administration of a cell-permeable caveolin-1 peptide prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2006; 114: 912-20.
- 39) Shimizu H, Yamada K, Suzumura A, et al. Caveolin-1 Promotes Cellular Senescence in Exchange for Blocking Subretinal Fibrosis in Age-Related Macular Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020; 61: 21.
- 40) Bucci M, Gratton JP, Rudic RD, et al. In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 2000; 6: 1362-7.
- 41) Li Z, Wermuth PJ, Benn BS, et al. Caveolin-1 deficiency induces spontaneous endothelial-to-mesenchymal transition in murine pulmonary endothelial cells in vitro. *Am J Pathol*. 2013; 182: 325-31.
- 42) Jiang Y, Lin X, Tang Z, et al. Critical role of caveolin-1 in ocular neovascularization and multitargeted antiangiogenic effects of cavtratin via JNK. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114: 10737-42.
- 43) Liu J, Lamb D, Chou MM, et al. Nerve growth factor-mediated neurite outgrowth via regulation of Rab5. *Mol Biol Cell*. 2007; 18: 1375-84.

- 44) Hagiwara M, Shinomiya H, Kashihara M, et al. Interaction of activated Rab5 with actin-bundling proteins, L- and T-plastin and its relevance to endocytic functions in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 407: 615-9.
- 45) Hagiwara M, Komatsu T, Sugiura SS, et al. POT1b regulates phagocytosis and NO production by modulating activity of the small GTPase Rab5. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 439: 413-7.
- 46) Hagiwara M, Kokubu E, Sugiura S, et al. Vinculin and Rab5 complex is required [correction of requited]for uptake of *Staphylococcus aureus* and interleukin-6 expression. *PLoS One.* 2014; 9: e87373.
- 47) Hagiwara M, Matsushita K. Epigallocatechin gallate suppresses LPS endocytosis and nitric oxide production by reducing Rab5-caveolin-1 interaction. *Biomed Res.* 2014; 35: 145-51.
- 48) Leclerc EA, Gazeilles L, Serre G, et al. The ubiquitous dermokine delta activates Rab5 function in the early endocytic pathway. *PLoS One.* 2011; 6: e17816.
- 49) Qi Y, Liang Z, Wang Z, et al. Determination of Rab5 activity in the cell by effector pull-down assay. *Methods Mol Biol.* 2015; 1298: 259-70.
- 50) Qi Y, Marlin MC, Liang Z, et al. Distinct biochemical and functional properties of two Rab5 homologs from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *J Biol Chem.* 2014; 289: 28299-309.
- 51) Kato Y, Hagiwara M, Ishihara Y, et al. TNF-alpha augmented *Porphyromonas gingivalis* invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1. *BMC Microbiol.* 2014; 14: 229.

