



Title	COPA and SLC4A4 are required for cellular entry of arginine-rich peptides(Digest_要約)
Author(s)	圓谷, 智之
Citation	
Issue Date	2014-02-28
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/29019
Rights	

COPA and SLC4A4 are Required for Cellular Entry of Arginine-Rich Peptides

(要約)

【背景】通常、細胞膜を通過することができない巨大分子や親水性物質を細胞内に導入する方法として、細胞透過性ペプチド(cell-penetrating peptides : CPP)の開発が進められている。しかし、CPPの細胞内侵入の分子機構の多くは不明である。カチオン性CPPの細胞内侵入の効率を高めるために、侵入に関与する遺伝子の同定と、その分子機構を解明することが必要とされる。今回、ゲノムワイドなsiRNAライブラリを用いて遺伝子抑制のスクリーニングを行い、CPPの一種である9-Arginine (9R)の細胞侵入に必要な遺伝子の系統的な同定を検討した。

【方法】(1)播種されたHeLaに、991種の膜関連遺伝子のsiRNAを各50nMの濃度でtransfectionし、遺伝子抑制を行った。72時間後、FITC-9Rを10uMの濃度で添加し、1時間後に共焦点顕微鏡にて蛍光強度を確認した。(2)(1)により同定されたCOPA、SLC4A4遺伝子に蛍光蛋白質を結合し、HeLaにおいて過剰発現させてその局在を確認した。また、それらの遺伝子が9Rと共局在するか確認した。(3)COPA、SLC4A4遺伝子が、既知のCPPであるTat protein transduction domain (TAT)においても細胞内侵入に関与するかを検討した。播種されたHeLaに、COPA、SLC4A4のsiRNAを各50nMの濃度でtransfectionし遺伝子抑制を行った。72時間後、FITC-9RおよびTATを10uMの濃度で添加し、1時間後に共焦点顕微鏡にて蛍光強度を確認した。

【結果】(1) siRNAライブラリによるスクリーニングの結果、COPAおよびSLC4A4を抑制した細胞において、9R顕著な取り込みの低下を認めた。(2) COPAおよびSLC4A4に蛍光タンパク質を融合させてHeLaにて過剰発現させたところ、それぞれ輸送小胞および膜蛋白質上に局在を認めた。また、それらの蛍光はFITC-9Rの局在と一致していた。(3) HeLaにおいてCOPA、SLC4A4の発現を阻害したところ、9RのみならずTATの取り込みの抑制も認めた。

【考察】今回、カチオン性CPPの細胞侵入に関与する遺伝子を同定するため、siRNAライブラリスクリーニングを行った。これにより、二つの膜関連遺伝子、COPAとSLC4A4を同定した。これらの遺伝子の抑制により、HeLa細胞への9RとTATペプチドの侵入は顕著に減少した。SLC4A4遺伝子は、ナトリウム重炭酸共輸送体(NBCE1)をコードする。細胞膜上のNBCE1は、カチオン性CPPが結合するために必要とされ得る。NBCE1はまた、原形質膜に局在し、エンドサイトーシスに関与することが以前の研究で示されている。これらの研究と今回の結果より、カチオン性ペプチドは細胞膜上でSLC4A4(NBCE1)に結合し、エンドサイトーシスにより細胞内に侵入することが示唆された。COPA遺伝子はB-COPI複合体の α サブユニットをコードする。最近の研究ではCOP複合体による膜輸送機能の調節を介して、エンドソームの成熟に関与することが示されている。今回の結果より、TATと9Rの細胞侵入のためには、これら二つの分子が協調していると考えられる。以上よ

り、9Rの細胞侵入にはエンドサイトーシス様の機構が必要、と結論付けた。