

された (図3)。これらの結果は、腹腔内投与された PTD3 融合タンパク質が血液脳関

門を通過し、脳にまでデリバリーされたことを示している。

PTD3 融合タンパク質 コントロール

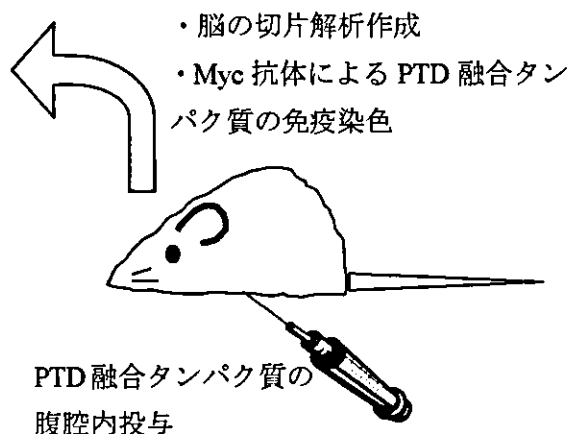
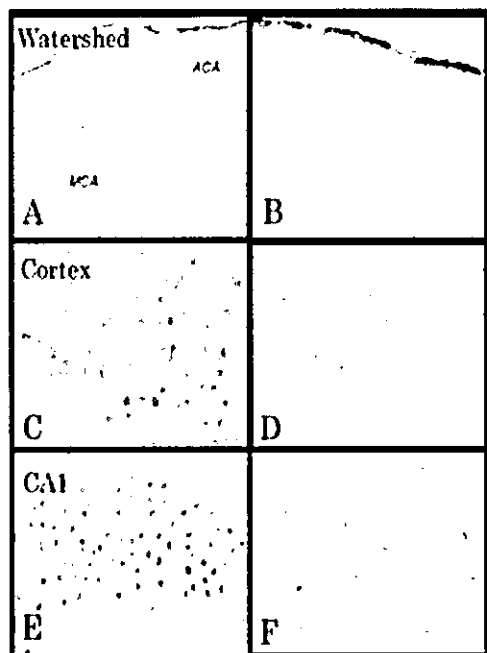


図3 PTD3 融合タンパク質の脳への移行

A で色のついている領域 (MCA; 中大脳動脈) は灌流域。ACA (前大脳動脈) 灌流域と両者の境界域 (Watershed) は PTD 融合タンパク質の染色を認めない。C は MCA 領域の大脳皮質の強拡大、E は海馬 CA1 領域の強拡大でいずれも細胞質・核への取り込みが認められる。B,D,F はそれぞれ A,C,E に対応し、いずれも PTD 融合タンパク質の染色が認められない。

C. 研究結果

今年度は、中空バイオナノ粒子を脳に導入するための準備段階という位置づけで研究を行った。

上記のような研究方法により得られた結果から、

1. 「PTD の設計とモデルタンパク質の構築」では、リジンとトリプトファンを組み合わせた新規 PTD 配列を持った PTD3 融合タンパク質を構築することができた。

2. 「培養細胞を用いた PTD 融合タンパク質の細胞内輸送の検証」では、構築した PTD3 融合タンパク質が効率に細胞内に PTD 融合タンパク質を導入でき、融合したタンパク質の機能を発揮できることが分かった。

3. 「動物実験での脳内輸送の検討」では、構築した PTD3 融合タンパク質をネズミの腹腔内に投与することで、血液脳関門を通過し、効率よくデリバリーされることがわかった。

4. 我々のグループで実際に検証して得られた上記の PTD の情報を基に、PTD3 を組み込んだ L 粒子をコードした遺伝子の構築を行った。この遺伝子を中空バイオナノ粒子を生産するグループに提供し、その粒子の作成する PTD を持った中空バイオナノ粒子を用いて、次年度の研究を進める予定である。

D. 考察

1. 達成度について

新規の PTD 配列を用いた PTD 融合タンパク質を全身投与で、脳に効率よく移行できた意義は大きいと考えられる。今後 PTD を融合させた中空バイオナノ粒子のデリバリー効率を検討することにより、細胞内または生体内で任意の組織、および脳に中空バイオナノ粒子内に納めた遺伝子、タンパク質、薬剤等をデリバリーすることが出来るように工夫することができると考えられ、新規 DDS を構築するために必要な準備がなされたと言える。

2. 今後の展望について

PTD を持った中空バイオナノ粒子を用いて、次のような研究を予定している。

- ① PTD-中空バイオナノ粒子内に EGFP 等のレポーター遺伝子を導入し、培養細胞へのレポーター遺伝子の導入をレポーター遺伝子発現でモニターすることにより検証する。
- ② PTD-中空バイオナノ粒子内に EGFP 等のレポータータンパク質を導入し、培養細胞へのレポータータンパク質の導入をレポータータンパク質をモニターすることにより検証する。
- ③ PTD-中空バイオナノ粒子内に EGFP

等のレポーター遺伝子またはタンパク質を導入し、マウスへのレポーター遺伝子の導入をレポーター遺伝子発現でモニターすることにより検証する。

以上の検証により、中空バイオナノ粒子に PTD を付加することにより、より効率の良いデリバリーや、普遍的なデリバリーが構築できるか否かの検証ができると考えられる。目的通りに PTD-中空バイオナノ粒子に普遍的なデリバリーを付加する事ができれば、DDS 研究に新たな可能性をもった材料を提供することが出来ることになり、多大な貢献ができると期待される。

E. 結論

PTD ペプチド自体がデリバリー機能を持つ極めて大きな可能性を持つ DDS 材料として注目されている。これに、中空バイオナノ粒子という運搬能力が優れた DDS 材料を組み合わせることで、より優れた DDS 材料を作り出すことを目指している。本年度の研究により、PTD ペプチドを中空バイオナノ粒子に導入する第一段階が完了した。今後、PTD-中空バイオナノ粒子を研究材料として検証することで、より目的に近づくことができると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liu J., Qu R., Ogura M., Shibata T., Harada H., **Hiraoka M.**, Real-time Imaging of Hypoxia-inducible Factor-1 activity in tumor xenografts. *J Radiat Res (Tokyo)* in press.
- 2) Ogura M., Shibata T., Yi J., Liu J., Qu R., Harada H., **Hiraoka M.** A tumor-specific

- Gene Therapy Strategy Targeting Dysregulation of the VHL/HIF Pathway in Renal Cell Carcinomas. *Cancer Sci.* 96(5), in press.
- 3) Hirota K., Fukuda R., Takabuchi S., **Kizaka-Kondoh S.**, Adachi T., Fukuda K., Induction of Hypoxia-inducible Factor 1 Activity by Muscarinic Acetylcholine Receptor Signaling. *J Biol Chem.* 279(40):41521-41528 (2004).
 - 4) Inoue M., Mukai M., Hamanaka Y., Tatsuta M., **Hiraoka M.**, **Kizaka-Kondoh S.**, Target hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites., *International Journal of Oncology* 25, 713-720 (2004).
 - 5) Nishihara H., Hwang M., **Kizaka-Kondoh S.**, Eckmann L., and Insel P. A. Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK. *J Biol Chem.* 279, 26176-83. (2004).
 - 6) Kasuno K., Takabuchi S., **Kizaka-Kondoh S.**, Fukuda K., Yodoi J., Semenza GL, Hirota K. Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 2550-8. (2004).
 - 7) Matsuo S, Nishinaka Y, Suzuki S, Kojima M, **Kizaka-Kondoh S.**, Kondo N, Son A, Sakakura-Nishiyama J, Yamaguchi Y, Masutani H, Ishii Y, Yodoi J. TMX, a human transmembrane oxidoreductase of the thioredoxin family: the possible role in disulfide-linked protein folding in the endoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 423, 81-7 (2004).
 - 8) 近藤科江、原田浩、平岡真寛 革新的診断・治療へのアプローチ—膜透過性・標的特異性を有する融合タンパク質を用いたイメージング・ターゲティング, *BIO Clinica* 20. 53-58 (2005).

厚生労働科学研究費補助金 (萌芽的先端医療技術推進研究事業)
分担研究報告

量子ドットの中空ナノ粒子によるピンポイント
薬剤伝達システムへの応用

分担研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・副所長

研究要旨

本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、ピンポイント薬剤伝達システムの開発に蛍光プローブとして利用できるように、表面加工および表面修飾し、などの開発を目的にしている。またそれに伴い、半導体などナノ粒子の細胞毒性などの安全性について検討すると同時に一桁ナノ粒子の持つ細胞内小器官伝達システムと結合し臓器から細胞内に至る伝達システムを開発することを含めて検討する。

A. 研究目的

本研究は、B 型肝炎ウイルス表面抗原を用いて製造された、中空ナノ粒子を用い、生体肝細胞にピンポイントに薬剤を伝達するシステムを開発することを目的として、半導体ナノ粒子を用いてその生体内トレーシングを行うことを目的としている。本薬剤伝達システムは、副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたって QOL の向上を目指すことができる。

また半導体ナノ粒子は、量子サイズ効果によって、強力な蛍光を出すことが可能であるため、細胞内レベルから生体レベルまで、その動体を追跡することが可能である。そのため、中空ナノ粒子に結合された量子ドットを体外から追跡することも可能であり、副作用や安全性について詳しく検討することが可能である。

本年度は、その準備段階で B 型肝炎ウイルス表面抗原を用いて製造された、中空ナ

ノ粒子に対する最適な表面加工について検討する。

B. 研究方法

1. 量子ドットの合成と表面加工

研究に用いている半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核、硫化亜鉛を殻とするコア・シェル型ナノ粒子である。この粒子は効果を持っているためこのように非常に均質な粒子直径を持つように製造される必要性がある。

前述の記述のようにして合成された量子ドットは、疎水性化合物であるが、11-メルカプトウンデカン酸と硫化亜鉛とを結合させて粒子表面にカルボキシル基を出させることによって親水性粒子としている。更に現在ジペプチドなどで量子ドット表面を覆うことによって、水溶液中に分散できるように研究開発を行っている。

2. 薬物 B 型肝炎ウイルス表面抗原を用いて製造された、中空ナノ粒子との結合

上記のようにして表面加工された量子ドットは、水によく分散する。そこで現在のところエレクトロポレーション法により導入することを考慮中である。

3. 細胞内小器官への薬剤伝達

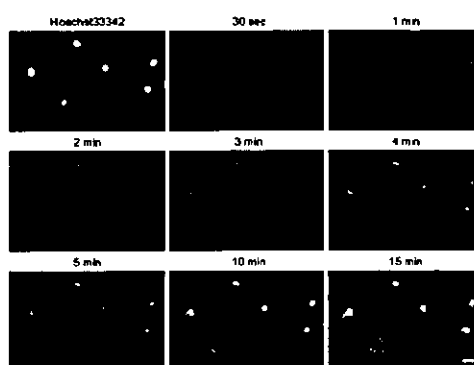
細胞内小器官への伝達については、アルブミンとの結合より、ライソゾームへの伝達に成功している。また昨年リポソームにより細胞質への伝達が可能と成った。本年度は、まず、上記のようにして得られた量子ドットに、アダプター分子を作成し、それを介してシグナルペプチドを結合させることを行っている。この方法により、安定に量子ドットとシグナルペプチドが結合され、また水溶液中にて分散可能となった。

C. 研究結果

1. 細胞内小器官への伝達

細胞小器官に特異的なシグナルペプチドを用い量子ドットを表面加工し Vero 細胞に導入した。

下の図は、経時的に観察した蛍光顕微鏡画像である。左上は核を DAPI で染色している。時間と共に核に赤色の量子ドットが局在化するのが見える。



2. 安全性についての検討

安全性についての検討は、本年度 MTT アッセイ法を用いてミトコンドリアの呼吸能力を計測することにより行った(A. Shiobara et al., *Microbiol. Immunol* 2004)。この研究により、細胞毒性については、閾値が存在することを明らかにした。これにより安全基準を設定することが可能となり、医療応用および産業化において重要な一歩をクリアしたことになった。また本年度さらにこの細胞毒性は、ナノ粒子の表面加工に深く依存し様々な表面加工により生物・医療応用に最適な表面加工およびその製造過程を明らかにした(A. Hoshino et al., *Nano Letters* (2004)。

D. 考察

1. 達成度について

本年、我々は、核移行、或は、ミトコンドリア移行のシグナルペプチドを用いて量子ドットに結合させると、非常に高い効率で細胞内に侵入し、各々、ミトコンドリア、核に局所的に集積したことから、この量子ドットを用いて薬物を細胞内小器官特異的に伝達するシステムを開発する。特に核移行シグナルを用いて核特異的に薬物を伝達できるシステムについては、DNA を結合させることによってこの DNA を核まで伝達することができる可能性がある。核内に集積する DNA 量を評価し高濃度ならば、遺伝子治療人工ベクターとしての役割を荷なうことができる可能性があり現在開発計画中である

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究は、B 型肝炎ウイルス表面抗原を用

いて製造された、中空ナノ粒子を用い、特異的臓器、この場合は、肝臓をターゲットとして薬物を輸送し、次に肝臓細胞内の小器官をターゲットに特異的に表面加工した量子ドットを用いて、例えば核に効率を高く薬物を輸送することを計画している。このように生体内細胞およびその細胞内小器官にまでピンポイントに輸送するシステムは、これまでには、存在しない。そのため、遺伝子治療を含め本研究の成果が期待できる。

3. 今後の展望について

本年度は、細胞レベルでのミトコンドリアの機能におよぼす影響およびアポトーシスについて詳しく検討した。

また本年、我々は、核移行、或は、ミトコンドリア移行のシグナルペプチドを用いて量子ドットに結合させると、非常に高い効率で細胞内に侵入し、各々、ミトコンドリア、核に局所的に集積したことから、この量子ドットを用いて薬物を細胞内小器官特異的に伝達するシステムを開発する。特に核移行シグナルを用いて核特異的に薬物を伝達できるシステムについては、DNAを結合させることによってこのDNAを核まで伝達することができる可能性がある。核内に集積するDNA量を評価し高濃度ならば、遺伝子治療人工ベクターとしての役割を荷なうことができる可能性があり現在開発計画中である。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子によって細胞内小器官であるライソゾーム、サイトゾル、ミトコンドリア、核

に伝達できる量子ドットドットキャリアを開発した。B型肝炎ウイルス表面抗原を用いて製造された、中空ナノ粒子に結合することにより効率良く、生体肝臓の肝細胞に、またその肝細胞の細胞内小器官にピンポイントで薬剤伝達可能なシステムを構築した。今後この両者を組み合わせ統一的なシステムを構築することを目的に進める予定である。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Akiyoshi Hoshino, Kouki Fujioka, Taisuke Oku, Masakazu Suga, Yu F. Sasaki, Toshihiro Ohta, Masato Yasuhara, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification, *Nano Letters* 2004, 4(10), 2163-2169
- 2) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K. Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells. *Microbiol Immunol.* 2004, 48, 985-994
- 3) Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto; Application of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 314 (2004) 46-53
- 4) Amane Shiohara, Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji

- Yamamoto; On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots, *Microbiol. Immunol.*, 48(9)(2004), 669-675
- 5) Kenji Yamamoto and Noriyoshi Manabe, Randomness and Organization of the Bio-Nano-Particles into the Functional Structure. *Applied Mechanics, Science Council of Japan, Theoretical and applied Mechanics, Japan (Vol.53)*, 111-114.
- 6) A. Aringazin A.K., Dahnovsky Yu., Krevchik V.D., Semenov M.B., Veremyev V.A., Ovchinnikov A. A., Yamamoto K. Two-dimensional tunnel bifurcations with dissipation, *Hadronic Journal*. - 2004, - v. 27, N 2. - P. 115-150
- 7) Yayoi Otsuka, Ken-ichi Hanaki, Jizi Zhao, Ryuuji Otsuka, Kiminori Toyooka, Hiroshi Yoshikura, Tadatashi Kuratsuji, Kenji Yamamoto, Teruo Kirikae, Detection of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin using Quantum Dot immuno-conjugates. *Jpn. J. Infect. Dis.* 57 (2004) 183-184
- 8) Kenji Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Randomness and organization of the bio-nano-particles into the functional structure. *Theoretical and Applied Mechanics Japan* 53 (2004) 111-114.
- (総説)
- 1) 星野彰芳、山本健二、カンタムドットナノ粒子を用いた蛍光イメージング素材の開発「医学のあゆみ」2004:210(3), 183-186
- 2) 星野昭芳、山本健二 量子ドット蛍光を用いた細菌毒素の1分子抗原抗体反応検出システム *BioClinica*2005:20(1), 23-262.
- 3) 山本健二、山屋俊一、「一般細菌以外の培養同定困難な菌」臨床検査データブック 2005-2006 高久史監修、医学書院 (2005)
- 4) 山屋俊一、山本健二 広範囲血液・尿化学検査免疫学的検査(ノイラミン酸・シアル酸) *日本臨床* 62 (2004)
- 5) 山本健二、「治療技術の進歩」最近の化学工学 56:先端医療における化学工学、化学工学会 (2004) p1-p8.
2. 学会発表
(国内学会)
- 1) 真鍋法義, 星野昭芳, 梁一強, 後藤知将, 加藤規弘, 山本健二 Quantum dots と薬剤の結合による *in vivo* での効果、日本薬学会第125年会 (2005年3月、東京)
- 2) 二村 泰弘、後藤 知将、山本 健二 アミノ酸からの蛍光物質の水熱合成 化学工学会第70年会 (2005年3月、名古屋)
- 3) 星野昭芳、村山研、大川原明子、三浦典子、大野尚仁、安原真人、山本健二、鈴木和男:血管炎発症に関わる活性化好中球MPO分子の蛍光ナノ粒子による検出 第13回バイオイメージング学会学術集会 京都医科大学 (2004年11月)
- 4) 道尊宇遠、二村泰弘、山本健二、河合剛太 RNAの二次構造予測, デザインおよびフォールディングダイナミクスへの新しいアプローチ、第6回日本RNA学会年会 (2004年8月、熊本)
- 5) 後藤 知将、二村 泰弘、山口 由岐夫、山本 健二 断熱膨張を用いた亜臨界・超臨界水リアクターによるアミノ酸の縮

- 合反応 化学工学会第69年会 (2004年4月、大阪)
- 6) Hoshino A, Toyama-Sorimachi N, Dohi T: Specific recruitment of peritoneal macrophages into perforating ulcers in murine trinitrobenzen sulfonic acid (TNBS)-induced colitis. 第34回日本免疫学会総会(札幌, 2004.12)
 - 7) Kazumi Omata, Kenji Yamamoto. Theoretical study on the structure of super critical fluids、第54回力学応用講演会 (2004年1月東京)
 - 8) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto. Applying the principles of chaperons to material designs in nanotechnology applications、第54回力学応用講演会 (2004年1月東京)
 - 9) Fumihiko Takeuchi, Kenji Yamamoto. Effectiveness of vaccination strategies for infectious diseases according to human contact networks 第 54 回力学応用講演会 (2004年1月東京)
- (国際学会)
- 1) Kazumi Omata, Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto, SUPERCRITICAL FLUIDS STUDIED BY MONTE CARLO SIMULATIONS, The 3rd International CIMTEC Conference "COMPUTATIONAL MODELING AND SIMULATION OF MATERIALS" (May, 2004, Acireale, Sicily, Italy).
 - 2) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Synthesis of Oligopeptide under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling" The 5th Green & Sustainable Chemistry Symposium (Mar, 2005, Tokyo)
 - 3) Yasuhiro Futamura, Tomomasa Goto, Kenji Yamamoto, "Prebiotic Biopolymer Synthesis under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling: Volcanic Eruption from Hydrothermal Environment into the Atmosphere" The 1st International Symposium (MISASA-1): Origin Evolution and Dynamics of the Earth (Mar. 2005 Misasa, ToTTori)
 - 4) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto, "Reaction of amino acids in a subcritical and supercritical water flow reactor with adiabatic expansion cooling" The 10th Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering (APCChE) Congress (Oct. 2004, Kita-Kyushu)
 - 5) Kenji Yamamoto, Toward the cell delivery system with the quantum dots (No. 29-5P10): The 4th International Peroxidase Meeting, Oct. 2004, Kyoto, Japan
 - 6) Akiyoshi Hoshino, Ken Murayama, Akiko Ishida-Okawara, Toshiko Ito-Ihara, Eri Muso, Noriko N. Miura, Naohito Ohno, Masato Yasuhara, Kenji Yamamoto, and Kazuo Suzuki MPO. Expressed on the Surface of Activated Neutrophils with Quantum Dot-conjugated Antibody. 4th International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
 - 7) Akiyoshi HOSHINO, Masato YASUHARA, Taeko DOHI, Kazuo SUZUKI, and Kenji YAMAMOTO. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal

- quantum dots. 4th International Peroxidase Meeting, Palulu Plaza Kyoto, Kyoto (2004.10)
- 8) N. Manabe, A. Hoshino, Y. Q. Liang, T. Goto, N. Kato and K. Yamamoto. Quantum dots conjugated with captopril while remained effect in vivo. The International Society for Optical Engineering (Jan. 2005 U.S.A.)
- 9) A. Hoshino, K. Fujioka, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, K. Yamamoto. Fluorescent labeling of cells and biomolecules with nanocrystal quantum dots. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center, San Jose, CA (2005.01)
- 10) Kenji Yamamoto, The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing. SPIE Biomedical Optics Meeting, San Jose Intl. Convention Center, San Jose, CA (2005.01)
- 11) Hoshino A, Yamamoto K. Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots for Medical Applications 5th International Symposium on Future Medical Engennering based on Bio-Nanotechnology. Tohoku University School of Medicine, Sendai (2005.2)
- 12) Noriyoshi MANABE, Akiyoshi HOSHINO, Yi-qiang LIANG, Tomomasa GOTO, Norihiro KATO and Kenji YAMAMOTO. Quantum dots conjugated with captopril while remained effective in vivo. The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005)
- 13) Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe and Kenji Yamamoto. Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its charcters, The Second International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology. Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .
- 14) Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, "Process of Novel Hydrothermal Flow-Reactor with Adiabatic Expansion Cooling: Toward Production of Functional Biopolymer" International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (AMN-2) Queenstown, New Zealand (Feb. 2005) .
- 15) Wayne Dawson, Kenji Yamamoto Kazuo Suzuki. 3D-Structural Model Building of LECT2 by Way of a Hybrid Experimental and Theoretical Strategy, GIW, Tokto (Dec. 2004)
- H. 知的所有権の出願・取得状況
1. 特許
なし
 2. その他なし

研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
近藤昭彦	中空バイオナノ粒子によるピンポイント DDS	ファルマシア	40(11)	1013-1017	2004
Tanino, T., Matsumoto, T., Fukuda, H., and Kondo, A.	Construction of System for Localization of Target Protein in Yeast periplasm Using Invertase	Journal of Molecular Catalysis B	28(4-6)	259-264	2004
Matsumoto, T., Ishikawa, S., Fukuda, H., and Kondo, A.	Construction of Ethanol-Tolerant Yeast Strains with Combinatorial Library-Selected Peptides.	Journal of Molecular Catalysis B	28(4-6)	253-257	2004
Lin, Y., Shiraga, S., Tsumuraya, T., Fujii, I., Matsumoto, T., Kondo, A., Ueda, M.	Isolation of Novel Catalytic Antibody Clones from Combinatorial Library Displayed on Yeast-Cell Surface.	Journal of Molecular Catalysis B	28(4-6)	247-251	2004
Kondo, A., Ueda, M.	Yeast Cell Surface Display-Application of Molecular Display.	Applied Microbiology and Biotechnology	64	28-40	2004
Yamada, T., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.	Novel Tissue and Cell Type-specific Gene Delivery System Using Surface Engineered Hepatitis B Virus Nanoprotein Particles.	Current Drug Targets: Infectious Disorders	4(2)	163-167	2004
Yamada, T., Seno, M., Kondo, A., Ueda, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S.	Pinpoint Drug Delivery System Using Hollow Bio-Nanoparticles.	高分子論文集	61(12)	606-612	2004
黒田俊一、妹尾昌治 近藤昭彦、上田政和 谷澤克行	中空バイオナノ粒子が拓く新しい医療技術	化学工業	55(12)	40-46	2004
Strizzi L, Bianco C, Normanno N, Seno M, Wechselberger C, Wallace-Jones B, Khan NI, Hirota M, Sun Y, Sanicola M, Salomon DS.	Epithelial mesenchymal transition is a characteristic of hyperplasias and tumors in mammary gland from MMTV-Cripto-1 transgenic mice.	J Cell Physiol.	201(2)	266-276	2004

Ogata, T, Park KY, Seno, M, Kojima, I	Reversal of streptozotocin-induced hyperglycemia by transplantation of pseudoislets consisting of beta cells derived from ductal cells.	Endocr J	51(3)	381-386	2004
Tada, H, Onizuka, M, Muraki, K, Masuzawa, W, Futami, J, Kosaka, M, Seno, M, Yamada, H	Insertional -fusion of basic fibroblast growth factor endowed ribonuclease I with enhanced cytotoxicity by steric blockade of inhibitor interaction	FEBS Lett.	568(1-3)	39-43	2004
Li L, Yi Z, Seno, M, Kojima, I.	Activin A and betacellulin: effect on regeneration of pancreatic beta-cells in neonatal streptozotocin-treated rats.	Diabetes	53(3)	608-615.	2004
Suzuki, K., Aiura, K., Ueda, M., Kitajima, M.	The influence of platelets on the promotion of invasion by tumor cells and inhibition by antiplatelet agents	Pancreas	29(2)	132-140	2004
Takeuchi, H., Ozawa, S. Shin, C.H., Ando, N., Kitagawa, Y., Ueda, M., Kitajima, M.	Loss of p16 expression is associated with vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinoma of the esophagus.	Int. J. Cancer	109	483-490	2004
Kitagou, M., Ueda, M., Aiura, K., Kitajima, M	Comparison of K-ras point mutation distributions in intraductal papillary-mucinous tumors and ductal adenocarcinoma of the pancreas.	Int. J. Cancer	110	177-182	2004
Suzuki, K., Aiura, K., Ueda, M., Kitajima, M.	Platelets counts closely correlated with the disease-free survival interval of pancreatic cancer patients.	Hepato-Gastro enterology	51	847-853	2004
Takigawa, Y., Akiyama, Y., Maruyama, K., Sugiyama, K., Uchida, E., Kosuge, T., Ueda, M., Kitajima, M., Yamaguchi, K.	Antitumor effect induced by dendritic cell(DC)-based immunotherapy against peritoneal dissemination of the hamster pancreatic cancer.	Cancer Letters	215	179-186	2004

Ohashi, Y., Ueda, M., Kawase, T., Kawakami, Y., Toda, M.	Identification of an epigenetically silenced gene4, RFX, in human glioma cells using restriction landmark genomic scanning.	Oncogene	23	7772-7779	2004
Yagi, H., Ueda, M., Kawachi, S., Tanabe, M., Aiura, K., Wakabayashi, G., Shimazu, M., Sakamoto, M., Kitajima, M.	Squamous cell carcinoma of the liver originating from non-parasitic cysts after a 15 year follow-up	Eur. J. Gastroenterol Hepatol	16	1051-1056	2004
Hirota, K., Fukuda, R., Takabuchi, S., Kizaka-Kondoh, S., Adachi, T., Fukuda, K.,	Induction of Hypoxia-inducible Factor 1 Activity by Muscarinic Acetylcholine Receptor Signaling	J. Biol. Chem.	279(40)	41521-41528	2004
Inoue, M, Mukai, M, Hamanaka, Y, Tatsuta, M, Hiraoka, M., Kizaka-Kondoh, S.	Targeting hypoxic cancer cells with a protein prodrug is effective in experimental malignant ascites	International Journal of Oncolog	25	713-720	2004
Nishihara, H., Hwang, M., Kizaka-Kondoh, S., Eckmann L., and Insel P. A..	Cyclic AMP promotes cAMP-responsive element-binding protein-dependent induction of cellular inhibitor of apoptosis protein-2 and suppresses apoptosis of colon cancer cells through ERK1/2 and p38 MAPK.	J. Boil. Chem.	279	26176-26183	2004
Kasuno, K., Takabuchi, S., Kizaka-Kondoh, S., Fukuda, K., Yodoi, J., Semenza GL, Hirota, K.	Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling.	J. Biol. Chem.	279	2550-2558	2004

Matsuo, S., Nishinaka, Y., Suzuki, S. Kojima, M., Kizaka-Kondoh, S., Kondo, N., Son, A., Sakakura-Nishiyama, J., Yamaguchi, Y., Masutani, H., Ishii, Y., Yodoi, J.	TMX, a human transmembrane oxidoreductase of the thioredoxin family: the possible role in disulfide-linked protein folding in the endoplasmic reticulum.	Archives of Biochemistry and Biophysics.	423	81-87	2004
近藤科江、原田浩、 平岡真寛	革新的診断・治療へのアプローチ —膜透過性・標的特異性を有する 融合タンパク質を用いたイメー ジング・ターゲティング	BIO Clinica	20	53-58	2005

中空バイオナノ粒子によるピンポイント DDS

近藤 昭彦
Akihiko KONDO
神戸大学工学部教授

1 はじめに

薬剤の安全かつ効果的な投与を行う技術として、ドラッグデリバリーシステム(DDS)への関心が高まっている。DDSの中核技術として、標的化(ターゲティング)があげられる。これは生体内において薬物を細胞及び組織特異的に送達すること(ピンポイント DDS)で、薬物の副作用を最小限に抑えて本来の効能を発揮させようとする試みである。

DDS技術で標的化を行うための薬物や遺伝子の運搬体(キャリア)としては、リポソームや高分子ナノミセル等、各種のものが開発されてきた。特に近年のナノテクノロジーの進展に伴い、ナノスケールで精密設計された高機能化キャリアの開発が精力的に行われている。しかしながら、特定の臓器や組織に効率よく標的化することは未だに難しい。筆者らは、従来のものとは全く異なるタイプのキャリアとして、ウイルス由来のタンパク質を利用した中空バイオナノ粒子を考案した。ウイルスの中でも、B型肝炎ウイルスが肝臓のみに特異的かつ効率よく感染する能力を有することに着目し、B型肝炎ウイルス表面抗原からなるタンパク質のナノ粒子(中空バイオナノ粒子と呼ぶ)を目的臓器へのピンポイント DDS用のナノキャリアに利用することを試みている。本稿では、中空バイオナノ粒子の概念、その製造や物性と遺伝子治療をはじめとする DDSへの応用について紹介する。

2 遺伝子治療

新しい治療法として注目を集めている遺伝子治療では、目的臓器以外に遺伝子が導入されると思われぬ副作用が生じる可能性があるため、ピンポイントな送達が不可欠である。ところが現在、実験的に行われている遺伝子治療の多くは、アデノウイルスやレトロウイルスのウイルスゲノムに目的の遺伝子を組み込んだ感染性ウイルスを利用するため、¹⁾ 組織・細胞に対して非特異的に感染してしまう。このため、目的臓器に送達するために手術等により患部に直接投与する必要があり、患者への負担が大きい。またウイルスを利用すると、そのゲノムを患者の染色体に導入する可能性があり、予測不可能な副作用の危険性がある。実際、アメリカやフランスで臨床試験中の事故が報告されるなど、ウイルスベクターの安全性への懸念が広がっている。^{2,3)} さらに、その製造においても安全性の確保が大きな問題となる。こうしたことから、高機能で安全な非ウイルス性の人工的なキャリアの開発が強く求められている。人工キャリアとして検討されてきた代表的なものとしては、正電荷を持ったリポソームがあげられる。⁴⁾ この場合、負電荷を持った遺伝子を正電荷リポソームに結合させて導入するが、遺伝子の導入効率はウイルスベクターに比べて低いのが現状である。

近年、ヒトゲノムの概要が明らかにされており、遺伝子治療に利用可能な遺伝子群が多数みだされると予想され、安全で有効な遺伝子治療法を早急に確立する必要がある。

3

中空バイオナノ粒子

図1Aは、B型肝炎ウイルス(hapatitis B virus, 以下HBV)の構造を示す。HBVは、そのゲノムがタンパク質(ウイルス表面抗原タンパク質という：図では楕円形で示す)と、脂質からできた外殻(タンパク質間を宿主由来の脂質の膜が埋める形で形成されたカプセル)で包まれた構造をとっている。ウイルスで外殻を持つものは他にもあるが、HBVのように表面抗原タンパク質(Lタンパク質と呼ばれる)が脂質二重膜を含む形で外殻を形成するものは知られていない。HBVは、Lタンパク質の標的細胞への結合と、引き続いての標的細胞との膜融合によって感染する。Lタンパク質は、226アミノ酸残基のSタンパク質のN末端側にpre-S領域(55アミノ酸残基のpre-S2領域と、108または119アミノ酸残基のpre-S1領域からなる)が付加した形になっており、分子量約52kDaの糖タンパク質である。pre-S1については、肝細胞と特異的に結合して感染する際に中心的な役割を担っていることが明らかになっている。^{5,6)} ウイルスは、その構造や感染から複製といった機能を見ると、極めて精巧なナノマシンを連想させる。微量のB型肝炎患者血液を指に刺しただけで感染することでも分かるように、HBV

は極少量のウイルス粒子でもヒト肝臓に到達して選択的に感染して複製する優れた能力を持つ。

中空バイオナノ粒子とは、HBVのLタンパク質と脂質からなる外殻のみを、人工的かつ安全なかたちで生産したナノカプセルである(図1B:L粒子と呼ばれる)。Lタンパク質は肝臓を分子認識するpre-S1領域を持つため、この粒子はウイルスが本来持つ肝臓への高い感染力を保持すると考えられる。したがって、感染特異性の高いウイルス表面抗原タンパク質から作られる中空バイオナノ粒子に薬物や遺伝子を包含させることで、目的の臓器・組織にピンポイントで効率よく送達することが可能となると期待される。このように、中空バイオナノ粒子は、最もシンプルで安全なバイオナノマシンともいえる。

HBVのLタンパク質遺伝子を酵母細胞で発現させると、Lタンパク質は互いに分子認識を行い、小胞体膜に集積し、出芽形式で小胞体ルーメン側に粒子として放出される(図2)。形成されたL粒子は、酵母内のトランスゴルジネットワーク上の膜状器官内に顕著に蓄積する。⁷⁾ この酵母細胞を破碎し、細胞破碎物等を遠心分離で除去した後に、セシウム及びスクロースを利用した密度勾配超遠心分離を繰り返すと、高純度のL粒子を精製できる。収量としては、酵母の培養液1l当たり約20mg程度である。L粒子は球状であり、50~500nm程度の粒径を持つ

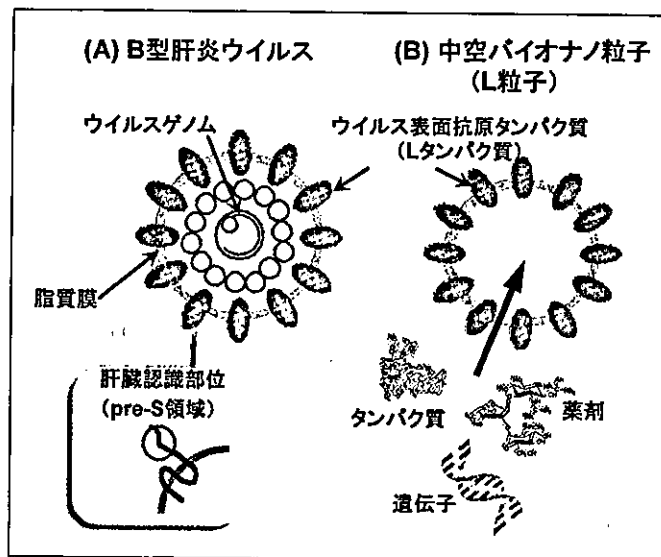


図1 B型肝炎ウイルス(A)と中空バイオナノ粒子(B)

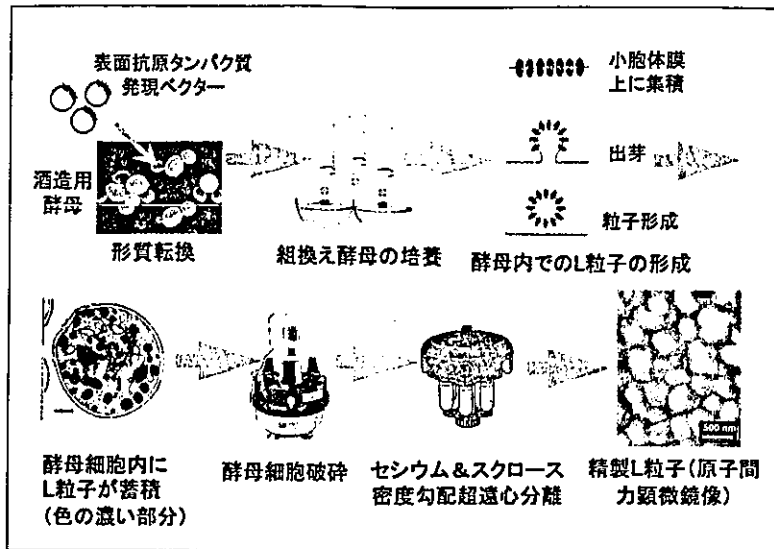


図2 中空バイオナノ粒子の生産法

ち、中空であることが確認されている。この粒子の平均的な粒径は80 nmであり、約110個のLタンパク質から構成される。⁹⁾ また、L粒子の組成は80% (重量比) がタンパク質、10% が糖質、残り10% がリン脂質 (酵母小胞体膜由来) である。

4 中空バイオナノ粒子を用いた遺伝子のピンポイントデリバリー⁹⁻¹¹⁾

精製された中空バイオナノ粒子への遺伝子の封入は、現在のところエレクトロポレーションで行っている。エレクトロポレーションでは、高電圧パルスを加えることで、粒子膜の構造を瞬間乱して遺伝子を粒子内に取り込ませる。遺伝子封入L粒子による特異的な遺伝子導入について、まずモデル系としてクラゲの緑色蛍光タンパク質 (GFP: 遺伝子導入によりタンパク質が生産されると緑色蛍光が観察できるため、判定がしやすい) の遺伝子を用いて検討した。遺伝子封入L粒子を各種の培養細胞に血清存在下で添加して導入実験を行ったところ、ヒト肝細胞培養株及びヒト肝がん由来細胞株 (HepG2) のみ、GFPの発現による緑色蛍光が観察された。この際のHepG2へのL粒子による遺伝子導入効率は、従来の遺伝子導入試薬であるカチオン性リン脂質 (商標名: FuGene 6) に比べて、単位DNA量当たりで100倍以上であった。このようにL粒子は、

肝細胞特異的かつ高効率な遺伝子導入を行えることが明らかとなった。

そこで、生体内においてもL粒子が遺伝子のピンポイントデリバリーが可能か、実験動物を用いて検討した。すなわち、1匹のヌードマウス背部皮下にヒト肝細胞がん由来の細胞株 (NuE: 標的) とヒト大腸がん由来細胞株 (WiDr: 対照) を1つずつ移植し、GFP遺伝子封入L粒子を尾静脈より注射して (局注でなく経静脈的な投与を行うことで、遺伝子封入L粒子の標的化能力を明らかにするため)、L粒子が移植ヒト肝細胞がんの特異的に遺伝子導入できるかを蛍光観察により判定した。投与2週間後に、腫瘍を切除して組織内の蛍光を観察すると、ヒト肝細胞がん由来の組織内においてGFPに由来する緑色蛍光が観察された。一方、移植した大腸がん組織やヌードマウスの正常組織では、緑色蛍光は一切観察されなかった。こうした結果は、中空バイオナノ粒子が生体内で、HBVのようにヒト肝細胞を特異的に認識していることを示す。また移植した腫瘍は、本来の肝臓の存在位置とは別の部分に存在するにもかかわらず標的化できたことから、遠方からの能動的な標的化が可能であると考えられる。

上記の基礎的な知見を基に、具体的な治療への適用例として、遺伝病である血友病を取り上げて検討した。血友病にはA型とB型があるが、それぞれ

血液凝固因子8もしくは9の投与で治療できることが分かっている。そこで血友病B型の遺伝子治療を想定して、血液凝固因子9を発現するベクターをL粒子に封入し、ヒト肝細胞がんを移植したヌードマウスに投与した。経時的に採血して血中の血液凝固因子9の濃度をELISA法で測定したところ、重度血友病Bの治療が可能なレベルの発現が1か月にわたり確認された。そもそも、血友病の治療遺伝子は巨大なものが多いので、標準的なアデノウイルスベクターに搭載することが難しい。このような大きな遺伝子でも中空バイオナノ粒子が効率よく標的化できたことは、その有効性を強く示す成果といえる。今回は、本来肝臓で作られる血液凝固因子9を肝臓で作らせたが、他の臓器由来のタンパク質でも、血中に分泌されて機能するものであれば、肝臓に発現させて治療を行うことが可能であろう。

中空バイオナノ粒子を用いた治療を従来技術と比較すると、中空バイオナノ粒子はウイルスと同様な高い遺伝子導入効率を示すとともに、人工系であることからリボソームと同様に安全であり、両者の良い点を併せ持つといえる。量産化に関しては、既に実績を持つ。さらに高い標的化能力を持つことから、遺伝子治療において待ち望まれていたキャリアである。

5

中空バイオナノ粒子の薬剤やタンパク質デリバリーへの利用

以上、中空バイオナノ粒子の利用に関して、遺伝子治療を例に述べてきた。粒子内には、条件を工夫することで薬剤も封入可能であることから、治療効果は高いが副作用が強い医薬品の患部へのピンポイント投与に応用できると考えられる。実際に蛍光物質カルセインを封入したL粒子は、肝細胞にのみ選択的に取り込まれ、カルセインを細胞内に導入可能であった。⁹⁾ 例えば、抗がん剤などでは、がん細胞以外の全身で副作用が出るため、投薬濃度を抑えざるをえず、限定的な効果になっている。もしピンポイントな投薬が可能になれば、標的がん細胞における薬剤濃度のみを上げることが可能となるため、注射のみで飛躍的な治療効果を得ることができると期待される。

またタンパク質を封入する場合には、送達したい

タンパク質をLタンパク質のC末端側に遺伝子レベルで融合して発現するアプローチもとれる。例えば、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質であるEGFPをLタンパク質のC末端側に融合して発現させると、EGFPを粒子内部に包含する形で中空バイオナノ粒子が形成された。培養細胞を用いた実験で、このEGFP融合粒子は肝細胞特異的に取り込まれることが明らかとなった。こうしたことから、医薬タンパク質をC末端側に融合した中空バイオナノ粒子の利用も有効であろう。特に全身投与では副作用が出る医薬タンパク質の場合、その副作用を大きく低減できるであろう。

6

中空バイオナノ粒子のリターゲッティング

中空バイオナノ粒子を任意の臓器に標的化するように改造する(リターゲッティングという)試みも進んでいる。つまり図1に示すように、Lタンパク質において肝臓細胞を分子認識する部位がpre-S1領域にあることが分かっているため、そこを他の臓器を特異的に認識する分子に置き換えることで、任意の臓器に遺伝子や薬剤を標的化することが可能となる。まず、pre-S1領域をヒトEGF(epidermal growth factor)と置き換えて酵母で発現させたところ、中空バイオナノ粒子が形成され、L粒子と同様な手法で精製できた。得られた粒子にエレクトロポレーションでカルセインを封入し、ヒト肝がん由来細胞株及び扁平上皮がん細胞株A431(EGFレセプターを大量に発現している)に加えたところ、A431細胞においてのみ著しい蛍光が観察された。⁹⁾ この結果は、pre-S1領域をEGFに変換した粒子は、肝細胞への特異性を失ってA431への特異性を獲得したことを示す。したがって、分子認識部位を置換することで、中空バイオナノ粒子のターゲットを変更できる、すなわちリターゲッティングが可能であることを実証できたものといえる。

より一般的な意味で、現在、リターゲッティング技術の開発が進んでいる。図3に示すように、各種のサイトカイン、抗体分子、抗体結合分子(各種細胞や組織に特異的な抗体を粒子に結合できる)を用いたリターゲッティングが期待されるが、これらに関し

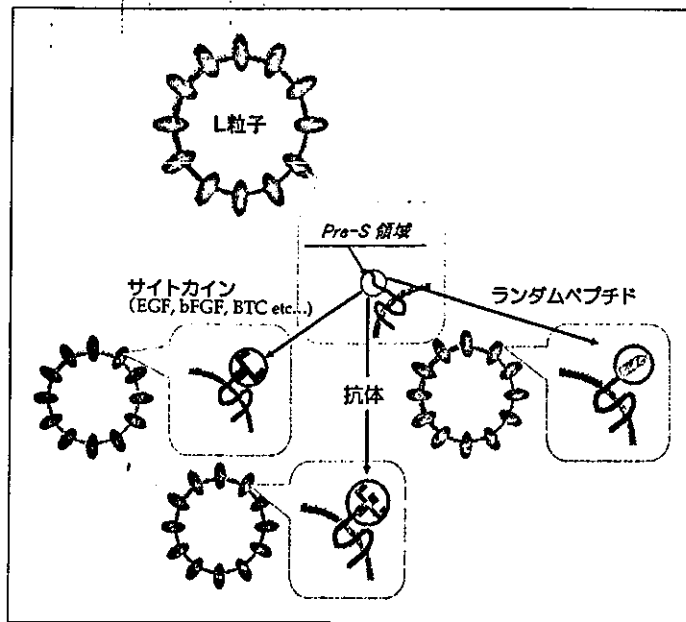


図3 中空バイオナノ粒子のリターゲッティング

でも筆者らは既に成功している。さらに最近、短いペプチドでも細胞や組織特異性を持つことが示されたことから、¹²⁾ その利用も有望である。特異性を示す「荷札」となる新しい分子を効率よく探索する上では、最近大きな進展を見せているコンビナトリアル・バイオエンジニアリング*の手法が極めて有効であろう。¹³⁾ L粒子をリターゲッティングした中空バイオナノ粒子を用いれば、望みの臓器・組織へのピンポイントな遺伝子・薬剤の送達ができると期待される。

7 おわりに

中空バイオナノ粒子は、ウイルス表面抗原タンパク質の自己組織化によって形成される中空ナノ粒子を利用する、という新しい概念による革新的なDDS用キャリアである。特にHBVの表面抗原タンパク質が形成する中空バイオナノ粒子は、脂質膜と糖タンパク質からなる柔軟な構造を有していることから、薬剤、遺伝子、タンパク質と、広範囲な物質のピンポイントDDSに利用できる。ただし、未解決の問題も残されている。最大の問題点は、ウイルス感染やワクチンによって、B型肝炎ウイルスに対す

る抗体を既に持っている人への中空バイオナノ粒子の投与が現状では難しいことである。この点を解決するため、現在、免疫系に認識されないよう粒子をステルス化することを試みているが、有望な結果を得つつある。このようなことから、中空バイオナノ粒子を用いたDDSは、画期的な先進医療技術に発展すると考えている。このため筆者らは、中空バイオナノ粒子に関する基礎的な研究に加えて、その実用化に向けた研究開発についても(株)ピークルを設立して進めている。

本稿で紹介した内容は、黒田俊一(阪大産業科学研)、谷澤克行(阪大産業科学研)、妹尾昌治(岡山大院自然科学)、上田政和(慶応大医)の各氏との共同研究成果である。

引用文献

- 1) Verma I.M., Somia N., *Nature*, 389, 239(1997).
- 2) Marshall E., *Science*, 298, 34(2002).
- 3) Savulescu J., *J. Med. Ethics*, 27, 148(2001).
- 4) Gao X., Huang L., *Gene Ther.*, 2, 710(1995).
- 5) Neurath A.R. et al., *Cell*, 46, 429(1986).
- 6) Le S. J. et al., *J. Virol.*, 73, 2052(1999).
- 7) Kuroda S. et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 1953(1992).
- 8) Yamada T. et al., *Vaccine*, 19, 3154(2001).
- 9) Yamada T. et al., *Nature Biotechnol.*, 21, 885(2003).
- 10) Lawrence D., *Lancet*, 362, 48(2003).
- 11) Russel S.J., *Nature Biotechnol.*, 21, 872(2003).
- 12) Arap W. et al., *Nature Med.*, 8, 121(2002).
- 13) 植田充英, 近藤昭彦(編), “コンビナトリアル・バイオエンジニアリング,” 化学同人, 京都(2003).

* コンビナトリアル・バイオエンジニアリングについての用語解説は、1012頁参照。



Construction of system for localization of target protein in yeast periplasm using invertase

Takanori Tanino^a, Takeshi Matsumoto^b, Hideki Fukuda^b, Akihiko Kondo^{a,*}

^a Department of Chemical Science and Engineering, Faculty of Engineering, Kobe University, 1-1 Rokkodaicho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

^b Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, 1-1 Rokkodaicho, Nada-ku, Kobe 657-8501, Japan

Received 23 October 2003; received in revised form 27 November 2003; accepted 21 December 2003

Abstract

We constructed a novel system for periplasmic localization of target proteins, using yeast external invertase (INV) as anchor protein, in which the C- or N-terminal of the target protein was fused to the invertase and the fusion proteins expressed under the control of the constitutive glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter (GAPDH). Unlike in conventional cell-surface display, the system enables the target fusion protein to localize in yeast periplasm in a free state. As a model, enhanced green fluorescence protein (EGFP) was localized in yeast periplasm using the new system. Yeast-periplasm localization of INV-EGFP and EGFP-INV fusion proteins was confirmed by fluorescence microscopy and immunoblotting: green fluorescence was observed at the cell outline and, in western blot analysis, most fusion proteins were detected in the cell-surface fraction, indicating that the fusion proteins had been transported to the cell-surface layer. In addition, in both C- and N-terminal fusion, invertase showed activity, indicating dimer formation. These results demonstrate that invertase is a useful anchor for localizing target protein in the yeast periplasm.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*; Periplasm; Invertase; Enhanced green fluorescence protein; Fusion protein

1. Introduction

Cells that display enzymes on their surface can be used as whole-cell biocatalyst, and systems for display of heterologous proteins on the yeast cell-surface have therefore recently been widely studied [1–5]. By combining the displayed enzymes with a metabolic pathway, it is possible to catalyze sequential reactions. For example, a yeast displaying endoglucanase II and β -glucosidase on the cell-surface can produce ethanol directly from cellulosic material [5]. Yeast-based cell-surface display systems have the advantages of safety, simplicity of genetic manipulation, and rigidity of cell-surface structure.

In widely used cell-surface display systems, the target protein is immobilized on the cell wall using the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor attachment signal sequence [6] or the flocculation functional domain

of the Flo1 gene [3]. In addition to the cell wall, the periplasm, which is the space between the cell wall and the plasma membrane, is also advantageous for localizing target proteins. For instance, a whole-cell biocatalyst can achieve high activity through accumulation of enzyme in the periplasm layer, as such an arrangement circumvents the problem of substrate diffusion through the periplasm membrane. Moreover, by combining this novel periplasmic localization system with widely used cell-surface display systems, it will be possible to localize more enzymes in the cell-surface layer, namely outside of the plasma membrane.

In the present study, we developed a novel cell-surface localization system based on the invertase (β -D-fructofuranoside fructohydrolase, E.C.3.2.1.26; INV) from *Saccharomyces cerevisiae*. Since yeast external invertase localizes in the periplasm [7,8], it is possible to localize target protein in the periplasm using invertase as an anchor protein. Enhanced green fluorescence protein (EGFP) was chosen as the target protein, as it allows localization to be visualized. EGFP was fused to the N- or C-terminal of invertase

* Corresponding author. Tel.: +81-78-803-6196; fax: +81-78-803-6206.

E-mail address: kondo@cx.kobe-u.ac.jp (A. Kondo).

to investigate whether these latter could be used to achieve periplasmic localization of the protein.

2. Experimental

2.1. Strains and media

Escherichia coli NovaBlue (Novagen Inc., Madison, WI, USA) was used as the host strain for recombinant DNA manipulation. The *SUC2* gene was cloned from *S. cerevisiae* ATCC60715 (*MATa FLO8 his4 leu2-3 leu2-112 STA1*). *S. cerevisiae* MT8-1 (*MATa ade his3 leu2 trp1 ura3*) was used for production of INV/EGFP fusion proteins. *E. coli* was cultivated in LB medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, and 0.5% sodium chloride) containing 100 µg/ml ampicillin. Yeasts were grown in complete medium (YPD: 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or selective medium (SD: 0.67% yeast nitrogen base supplemented with appropriate amino acids and nucleotides, 0.5% glucose). For plate medium, 2% agar was added.

2.2. Construction of expression plasmids

2.2.1. Construction of plasmid pWGP3-SUC2 for expression of *SUC2*

SUC2 was amplified from *S. cerevisiae* ATCC60715 chromosomal DNA by polymerase chain reaction (PCR) with the following primers: SUC2-fw-*SacI* (5'-atcggagctcATGCTTTTGCAAGCTTTCCTTTTCTTTTG-3') and SUC2-rev-*SalI* (5'-cgatgctgacCTATTTTACTTCCCTTACTTGG-

AACTTGTC-3'). PCR was carried out using *pfu* hotstart turbo polymerase (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA). The amplified fragment was digested with *SacI* and *SalI* and inserted into the *SacI* and *SalI* site of pWGP3 [9] (Fig. 1a). The resulting plasmid was named pWGP3-SUC2 (Fig. 1b).

2.2.2. Construction of plasmid pWGP3-ES for expression of EGFP-INV fusion protein

The secretion signal sequence and mature region of *SUC2* were amplified from *S. cerevisiae* ATCC60715 chromosomal DNA by PCR with the following primers: SUC2-fw-*SacI* and SUC2(signal)-rev-*BglIII-ctc-salI* (5'-cgatgctgacgagagatctTGATGCAGATATTTTGGCTGC-3') for the secretion signal of *SUC2*; and SUC2(mature)-fw-*salI* (5'-atcggctgacATGACAAACGAAACTAGCGATAGACCTTTG-3') and SUC2-rev-*sphI-XhoI* (5'-cgatctcgaggcatgcCTATTTTACTTCCCTTACTTGGAA-3') for the mature region of *SUC2*. The amplified fragments were digested with *SacI* and *SalI*, and with *SalI* and *XhoI*, respectively. First the fragment encoding the secretion signal sequence of *SUC2* was inserted into the *SacI* and *SalI* site of pWGP3 (named pWGP3-S), and then the fragment encoding the mature region of *SUC2* into the *SalI* and *XhoI* site of the plasmid. The resulting plasmid was named pWGP3-SS. The gene encoding EGFP (*EGFP*) was amplified from pEGFP (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA, USA) by PCR with the following primers: EGFP-fw-*BglIII* (5'-atcgagatctATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC-3') and EGFP(n)-rev-*SalI* (5'-cgatgctgacCTTGTACAGCTCGTCATGCCGAGAGTGAT-3'). The amplified fragment was

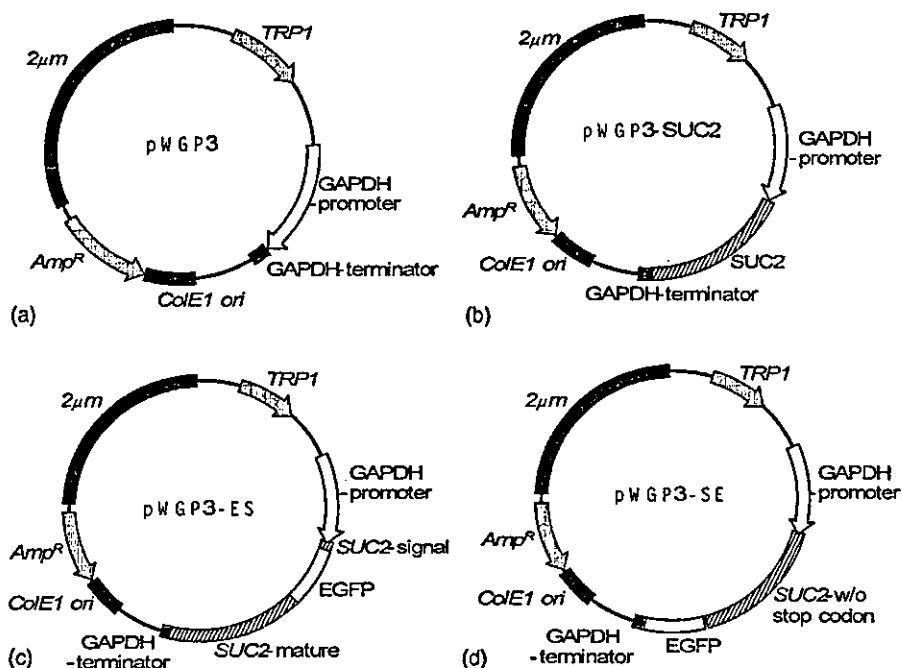


Fig. 1. Control plasmid (a, pWGP3) and plasmids for expression of INV (b, pWGP3-SUC2), EGFP-INV fusion protein (c, pWGP3-ES), and INV-EGFP fusion protein (d, pWGP3-SE).