

200812008A

200812008B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究

平成20年度 総括報告書

平成18～20年度 総合研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成21(2009)年4月

目次

総括研究報告書

- I. 総括研究報告
抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究
角田慎一 1
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 14
- III. 研究成果の刊行物・別刷 15

総合研究報告書

- I. 総合研究報告
抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究
角田慎一 46
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 65
- III. 研究成果の刊行物・別刷 68

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究

平成20年度 総括研究報告書

研究代表者 角田 慎一

平成21(2009)年 4月

抗体ライブラリを活用した疾患関連蛋白質可視化解析技術の研究

研究代表者 角田 慎一
独立行政法人医薬基盤研究所 基盤的研究部 サブプロジェクトリーダー

研究要旨

本研究では、細胞内で機能する一本鎖化Fv(scFv)抗体、あるいは細胞内発現型抗体（イントラボディ）を創出し、疾患関連蛋白質の機能解析・機能制御に応用することを目的に、①簡便かつ迅速に、微量の抗原蛋白質に対する抗体を創製可能な抗体ライブラリおよび、そのスクリーニング法の確立、②それら抗体と蛍光蛋白等との結合体を用い、蛍光分子イメージング技術を活用することで、細胞内疾患関連蛋白質の動態や蛋白間相互作用等を効率よく解析できる技術の開発を目指すものである。本研究により、イントラボディ創出方法の最適化、細胞内疾患関連蛋白質の動態解析による疾患分子病態の解明、治療標的の探索、細胞内分子標的治療薬（細胞内抗体医薬）創出等への展開が期待される。

研究代用者らは、これまでにプロテオミクスによる解析で得られる微量蛋白質抗原から抗体をダイレクトに創製しうる技術を確立してきた。そこで本年度は、その実証を試みた。まず、本技術を用いて癌関連蛋白質の同定を試みたところ、20種類の候補蛋白質を2D-DIGEにより見出した。2D-DIGEゲルから回収した蛋白質の一部を用いて、質量分析により蛋白質を同定し、同時に抗体の単離を試みたところ、全ての候補蛋白質に対する抗体を取得することに成功した。このように、プロテオミクスで同定できる多数の蛋白質に対し、わずか数週間で網羅的に抗体を創製可能な本技術は、極めて有用であると考えられる。さらに、同定した蛋白質の中の機能未知分子の解析を目的に、取得したscFv抗体を蛍光蛋白質との融合蛋白質をとして細胞内で発現させ、蛍光イメージング解析を試みたところ、細胞内の当該標的分子を可視化できる可能性が示唆された。今後、さらなる最適化等が必要であるが、本研究で開発した技術は、疾患プロテオミクスによる創薬ターゲット、バイオマーカー候補の探索から、可視化機能解析までの絞り込みを効率化し、創薬研究を大きく加速するものと期待される。

A. 研究目的

細胞の中で遺伝子(ゲノム)の機能を具現する主たるものは、蛋白質(プロテオーム)である。また多くの蛋白質は翻訳後修飾を受けた後、種々生体分子と相互作用することによって機能発現するため、mRNAと蛋白質との間に量的相関関係が成立しない

場合も多く、トランスクリプトームレベルの発現解析だけでは生命現象の解明に十分な情報を得ることができない。そのため、疾患プロテオミクスのアプローチにより、疾患の発症や悪化、治癒に至る分子メカニズムを解明し、「創薬ターゲットとなる蛋白質」や「医薬品シーズとなる蛋白質」を同定しようとする試みが世界規模で進展中である。しかし、

疾患プロテオミクス研究の成果に基づき、疾患メカニズムの解明や医薬品開発に成功した例は未だ乏しいのが現状である。これは、一般に健常状態と比較して疾患状態で発現変動している疾患関連蛋白質の候補が数百以上も存在しているため、蛋白質の生体内・細胞内挙動の解析をはじめとする各種機能解析に多大な時間と労力を要することに大きく起因している。即ち、質量分析機器やその周辺の研究環境（データベース等）の著しい進歩によって疾患関連蛋白質の網羅的探索効率や探索精度が向上したものの、数多くの疾患関連蛋白質の中から疾患の発症や悪化、治癒の鍵となる蛋白質を絞り込むための技術が未成熟であるため、医療に有用なターゲットを同定できていないのである。したがって、多種多様な疾患関連蛋白質の中から「創薬ターゲット」や「医薬品シーズ」を絞り込もうと考えた場合、個体レベルおよび細胞レベルで“いつ”、“どこで”、“どの蛋白質”が、“どのようにして”、疾患の発症や悪化、治癒に関わっているのかという情報を簡便に集積できる基盤技術が必要不可欠となっている。本観点から当該研究課題においては、抗体ライブラリ法を有効活用することにより、細胞内での疾患関連蛋白質の効率よい挙動解析技術の確立を目指す。具体的には、まず微量の疾患関連蛋白質に対する抗体を迅速・網羅的に創製する独自技術の確立を行い、さらに、得られた抗体による細胞内蛋白質の機能制御、あるいは細胞内機能型抗体（イントラボディ）をプローブとする新規蛍光イメージング技術の確立を試みる。本研究はプロテオミクスの成果を有効活用するものであり、疾患原因の解明や効率的な医薬品開発に寄与するものと期待される。

B. 研究方法

B-1 抗体プロテオミクスによる乳癌関連蛋白質の

探索

2D-DIGE

ディッシュ上で培養した乳がん細胞株 SKBR3 と乳腺上皮細胞株 184A1 を、細胞溶解液（7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS、10 mM Tris-HCl (pH 8.5)）で溶解し、2D Quant Kit (Amersham) を用いて蛋白質の濃度を測定した。乳腺細胞、乳がん細胞由来蛋白質、および内部標準用として各細胞由来蛋白質の等量混合サンプル各 50 μ g を、それぞれ 400 pmol のラベル化試薬 Cy3、Cy5 Cy2、(Amersham) と混合し、氷上で 30 分間反応させ、その後 10 mM lysine を加え、氷上で 10 分間静置することで反応停止させた。標識されたサンプルを全て混合し、sample buffer (2% DTT、2% pharmalyte (Amersham Biosciences)、7 M urea、2 M thiourea、4% CHAPS) で 450 μ l にメスアップした。一方、二次元電気泳動後に蛋白質を回収するためのピックゲル用に、ラベル化しない蛋白質サンプルも同様に混合調製した。等電点泳動専用ホルダーにサンプルを注入して、IPG-gel (pH 5-6) スリップ (Amersham) を入れ、乾燥防止用オイルを重層した後、泳動を行った。泳動終了後、IPG-gel を平衡化 buffer A (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、10 mg/ml DTT) と平衡化 buffer B (Tris-HCl (pH 6.8)、6 M urea、30% glycerol、2% SDS、0.002% BPB、25 mg/ml iodoacetamide (Sigma)) に各 15 分間浸し、平衡化を行った。二次元目泳動には、後のステップでゲルの溶解が可能な SDS-PAGE 用ゲル (10% polyacrylamide and 2.7% N,N'-diallyltartardiamide gels) に IPG-gel スリップをセットし、アガロースで封入後、電気泳動槽 Ettan Daltsix Electrophoresis System (Amersham) を用いて、2 次元目の電気泳動を行った。定量解析用ゲルはそのまま蛍光スキャンを行い、ピック用ゲル

ルは Deep Purple Total Protein Stain を用いて一晩染色し、脱色液により脱色を行った後にスキャンに供した。解析には、Typhoon scanner、および Ettan DIGE softwares を使用し、スポットピックには Ettan Spot Picker (Amersham) を使用した。ファージ抗体作製の抗原蛋白質抽出には、ピックしたゲルに 88 mM NaIO₄ を加えて室温で 30 分インキュベーションすることでゲルを溶解し、蛋白質を抽出した。

ファージ抗体ライブラリの作製

scFv ライブラリ遺伝子を組み込んだファージミドベクターを大腸菌 TGI 株にエレクトロポレーションし、その適量を 50 μ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 LB プレートに播種し、37° C で一晩培養した。50 μ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地を加えてコロニーを全て回収し、250 rpm、37° C で OD₆₀₀ = 0.3~0.6 まで培養した。M13K07 ヘルパーファージ (Invitrogen) を添加し、110 rpm、37° C で 30 分間、250 rpm、37° C で 30 分間培養後、2000 rpm で 10 分間遠心し、得られたペレットに対して 100 μ g/ml ampicillin、50 μ g/ml kanamycin 含有 2YT 培地を添加して 6 時間培養した。4° C、2000 rpm で 10 分間、更に 10000 rpm で 15 分間遠心し、回収した上清に氷冷した 20% PEG-6000、2.5 M NaCl を 1/5 volume 加え、激しく混和して氷上で 1 時間静置した。15000 rpm で 10 分間遠心して得られたペレットを NTE buffer (100 mM NaCl、10 mM Tris、1 mM EDTA) に懸濁し、0.45 μ m の Millex-HV (MILLIPORE) を用いてフィルターろ過し、ファージを回収した。

ファージ抗体ライブラリを用いた dot blot バンニング

2D-DIGE から回収されたスポットゲル由来のタンパク質の 1/10 量をドットプロット装置 (Bio-Dot Microfiltration Apparatus) を用い、ニトロセルロース膜上に固相化した。前年度確立した dot blot バンニング法にバンニングを行った後、output ファージ溶液に 2% Glucose 含有 2YT 培地を加え、その一部を Petrifilm に播種し、37° C で一晩培養し、得られた形質転換コロニー数を計測した。残りのファージを大腸菌 TGI 株に感染させ、増殖させた後、ファージを産出し、バンニング操作を 4 回繰り返し行った。

Dot Blot を用いたスクリーニング

バンニング後に回収したファージを TGI に感染させ、生じたコロニーを 96 well プレートにピックアップした。各ウェルが OD₆₀₀ = 0.3~0.6 に達するまで培養した後、100 μ g/ml ampicillin、2% glucose 含有 2YT 培地で 10 倍希釈した M13K07 ヘルパーファージ溶液を 20 μ l/well で添加した。37° C で 1 時間静置培養した後、2000 rpm で 10 分間遠心し、上清を除去した。100 μ g/ml ampicillin、50 μ g/ml kanamycin 含有 2YT 培地を 200 μ l 加えて 37° C で一晩培養し、2000 rpm で 10 分間遠心し、回収された上清を以下のスクリーニング実験に用いた。2D-DIGE 解析から得られた抽出蛋白質を Bio-Dot Microfiltration Apparatus を用い、TBS に浸したニトロセルロース膜上に固相化した。各 well に blocking buffer (10% skim milk & 25% glycerol) を 200 μ l ずつ添加して、室温で 2 時間静置してブロッキングを行った。TBS で 1 回洗浄後、blocking buffer で希釈した精製ファージを 200 μ l/well 添加し、室温で 2 時間静置した。TBST (0.1% Tween 20 を含む TBS) と TBS で 5 回洗浄後、blocking buffer で 1000 倍希釈した HRP/anti-M13

monoclonal antibody を 200 μ l/well 添加した。TBST と TBS で 3 回洗浄後、メンブレンを ECL plus Western Blotting Detection System で処理し、発光像を LAS-3000 を使用して撮影した。

MS による蛋白質の同定

ビックしたゲル片に 100 μ l の脱色液 (25 mM ammonium bicarbonate (Nacalai Tesque) / 50% acetonitrile (Nacalai Tesque)) を加え、室温で 10 分振とうさせた後、液を除去することで脱色した。続いて 200 μ l の acetonitrile を加え、ゲル片が白濁した後取り除き、遠心濃縮器 (CENTRIFUGAL CONCENTRATOR, TOMY) によって乾燥させた。脱水したゲル片に 5 μ l の trypsin 溶液 (20 μ l/ml trypsin (Promega) / 50 mM ammonium bicarbonate) を加え、37°C で 16 時間反応させることで、ゲル内の蛋白質を消化した。その後、ゲル片に抽出液 (1 回目は 50 μ l の 50% acetonitrile / 5% TFA 溶液、2 回目は 50 μ l の 80% acetonitrile / 5% TFA 溶液、3 回目は 50 μ l の 100% acetonitrile) を加え、3 分間ソニケーションし、更に 30 分間ボルテックスした後の抽出液を回収するという操作を 3 回行うことでペプチドを抽出した。ペプチド抽出液は遠心濃縮器によって濃縮し、ZipTip C18 チップ (Millipore) を用いて精製し、これをサンプル溶液とした。サンプル溶液 1 μ l を Prespotted AnchorChip for Proteomics (BRUKER DALTONICS) に滴下し、乾燥させ、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF/MS/MS, autoflex II, BRUKER DALTONICS) により解析した。

ファージ ELISA

各種抗原タンパク質 (TRAIL-R2, KDR, TNFR1, caspase-8, importin- α) を 1 μ g/ml に希釈

し、常温で 96 穴プレート上に 8 時間固相化後、4% BSA でブロッキングした。PBS で 1 回洗浄後、サンプルを添加し、室温で 2 時間培養した。PBST で 3 回洗浄後、HRP/anti-M13 monoclonal antibody を添加し、室温で 1 時間静置した。その後、PBST で 3 回洗浄し、基質溶液を加え発色を行い、吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

ファージ抗体を用いた組織アレイ解析

市販のヒト正常・乳がん組織アレイ (US Biomax) と multi 組織アレイ (US Biomax) を使い、まず、キシレン・エタノールを使用して脱パラフィン処理を行った。脱パラフィンした組織アレイに DAKO Target Retrieval Solution pH 9 (DAKO) を浸して、125°C で 30 秒、90°C で 30 秒処理することで抗原賦活化を行った。組織アレイ染色の一連の操作には自動染色装置 DAKO AutoStainer (DAKO) を使用した。ブロッキングには DAKO Peroxidase-Blocking Reagent (DAKO) を 5 分及び 10% BSA を 30 分 インキュベーションすることで行った。その後 10^{13} CFU/ml ファージを添加し、室温で 1 時間静置した。TBST (0.05% Tween 20 を含む TBS) で 5 回洗浄後、anti-mouse M13 monoclonal Ab (100 倍希釈) を添加し、30 分静置した。(IgG 型抗体の検討ではファージ抗体および anti-mouse M13 抗体の代わりに、50 倍希釈した anti-TRAIL-R2 Ab (R&D systems) を使用) TBST (0.05% Tween 20 を含む TBS) で 3 回洗浄後、ENVISION+ Dual Link (DAKO) を添加した。TBST で 3 回洗浄後、DAB+ liquid (DAKO) を用いて発色させた。組織アレイの染色度合いに基づいた抗原発現レベルのスコア化に関しては、組織中のがん細胞領域で何割程度発現しているかを 2 段階で、発現の強度を 3 段階でスコア化し、両者の合計スコアが 2 以下の場合にネガティブ、3 以上の場合にポジティブとして

判定した。臨床情報との相関に関する統計解析には、ソフトウェア StatView を使用した。

B-2 イントラボディによる可視化解析

anti-RREB1 scFvの哺乳類発現ベクターの構築

anti-RREB1 scFv遺伝子が組み込まれたファージミドベクターpCANTAB5Eを、制限酵素Nco I、およびNot Iで処理した。次いで、Venus (YFP mutant、理化学研究所 宮脇教史博士より供与いただいた)があらかじめ組み込まれた哺乳類細胞用発現ベクターpTriExをNco I、およびNot Iで処理し、DNA Ligation Kit ver. 2.1を用いて、anti-RREB1 scFv遺伝子と16°C、30分間ライゲーション反応を行った。これにより、anti-RREB1 scFv-Venus融合蛍光蛋白質を哺乳類細胞内で発現するpTriEx aRREB1-Venusを得た。

anti-RREB1 scFvの細胞への遺伝子導入

12 well tissue culture plateを用い、2 X 10⁵ cells/wellにてヒト293-T細胞株を播種し、24時間培養した。1 μg のpTriEx aRREB1-Venusプラスミドを、50 μLの無血清培地Opti-MEM (Invitrogen)で希釈した後、2.5 μLの遺伝子導入試薬FUGENE HD (ロッシュダイアグノスティクス)と複合体を形成させ、トランスフェクションを行った。

scFvの細胞内発現によるイメージング

上記方法により遺伝子導入した24時間後の細胞を、蛍光顕微鏡を観察し、蛋白質の局在の解析を行った。

C. 研究結果・考察

C-1 微量疾患関連タンパク質に対する抗体作製技

術の確立

疾患プロテオミクス研究の進展により、多数の疾患関連蛋白質候補が見いだされつつあり、この中から真に価値のある創薬バイオマーカー蛋白質(診断マーカー蛋白質)を見つけ出すこと、およびその技術開発が、今後の創薬研究における最重要課題と言える。本目的において、疾患関連蛋白質候補に対するモノクローナル抗体は最も有用なツールの一つであり、迅速にモノクローナル抗体を得るための技術が大いに期待されている。本研究では、プロテオミクス等で見出される多数の疾患関連候補蛋白質について、特に細胞内蛋白質に着目し、有用な創薬ターゲット等の絞り込み技術に抗体を活用することを考案し、前年度までに、質の高いファージ抗体ライブラリの構築と、2D-DIGE法によって検出された疾患関連蛋白質候補に対して迅速かつ網羅的に抗体が作製可能なシステムを確立した(図1)。

本年度は、まず抗体プロテオミクス技術を実証し、イントラボディによる解析対象を見出す目的で、乳がん関連蛋白質の探索を行った。乳腺細胞株から調製した蛋白質を対照サンプルに乳がん細胞株から調製した蛋白質を疾患サンプルとして2D-DIGE法を試みた(図2)。定量的解析を行い、特に発現変動レベルの大きかった20個のspotに対して、ゲルspotをピッキングし、過ヨウ素酸処理によりゲルを溶解することで蛋白質を抽出・回収した。spotから抽出した蛋白質の一部をMS解析による蛋白質の同定を行い、一部をニトロセルロース膜にblotし、Dot Blotを用いた抗体ライブラリのパンニングを行った。同定した蛋白質の中で、乳がんに関連するマーカーとして既に報告があるものはspot 8 (TRAIL-R2)だけであり、それ以外の蛋白質については、乳がんとの関連は不明であった。

同定した蛋白質の中で、まずspot 8 (TRAIL-R2)

について抗体ライブラリからの抗体単離を試みた。inputファージ数に対するoutputファージ数の割合 (Ratio) を各パンニングラウンドで評価した結果、1st パンニング後と比較して4thパンニング後では、当該spot蛋白質に親和性を示すファージが約1000倍に濃縮されていると考えられた(図3A)。さらに目的抗原に対する抗体を単離するため、濃縮後のライブラリをモノクローン化し、TRAIL-R2に対する親和性をファージクローンごとにDot Blot ELISAにより評価した(図3B)。その結果、4thパンニング後のクローンから、多数のTRAIL-R2に対する抗体が単離できた。また、得られたファージ抗体の特異性を評価するため、ファージ抗体を用いたWestern Blotと免疫染色により評価したところ、単離したファージ抗体はTRAIL-R2特異的に結合し、Western Blotや免疫染色などのアプリケーションに使用可能な汎用性の高い抗体であることが示唆された(図4)。以上の抗体単離のプロセスは約2週間で完了しており、本抗体創製技術が、微量で多数の候補蛋白質に対する抗体の迅速・簡便な単離技術として極めて有用であることが示された。

次に、同定した候補蛋白質の中から有用な癌関連蛋白質の絞り込みを行うため、上記で作製したファージ抗体を用い、189症例の乳がん組織と15症例の正常の乳腺組織が搭載された組織アレイの免疫染色を試みた(表2)。その結果、SPATA5 protein、beta-actin variant、FLJ31438 protein、hPAK65、XRNI proteinに関しては正常乳腺組織、および、がん組織において全く染色が認められなかった。一方で、RREB1は約40%の症例に共通して発現していることが判明した。

C-1 イントラボディによる可視化解析

上記で見出したRREB1は細胞内の転写関連因子と

考えられているが、その詳細な機能は不明な分子である。そこで、RREB1に対する蛍光標識scFv抗体をイントラボディとして細胞内で発現させ、イメージングによる解析を試みた。同時に、p53に対するscFv遺伝子も用いた。293T細胞に蛍光蛋白質Venusを融合させた抗RREB1-scFvおよびp53-scFv遺伝子をトランスフェクションするにより発現させ、24時間後に蛍光顕微鏡観察を行った(図5)。対照としては、Venusのみ発現させた。その結果、Venus単独およびRREB1-scFv-Venusは細胞質に広く拡散して発現していたのに対し、p53-scFv-Venusは核付近に集積していた(図6)。細胞内でscFv抗体と標的分子との結合性など、さらに詳細な検討は必要であるが、異なった標的分子に対するscFv抗体-Venusが異なった局在性を示したことから、本解析法が標的分子のイメージングできているものと考えられた。すなわち、scFv抗体をイントラボディとして細胞内に発現・機能させることにより、標的蛋白質の局在等を迅速に解析しうることが明らかとなり、本研究で確立した疾患関連蛋白質の可視化解析技術の有用性が示唆された。

D. 結論

本研究では、抗体ライブラリを利用することにより、疾患プロテオミクス研究で汎用される二次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)解析によって同定・回収される、微量の疾患関連蛋白質を抗原として、ダイレクトに抗体を創製しうる技術を確立した。本技術では、わずか0.5ngという極微量の蛋白質を用意できれば、それらに対する抗体を一挙に、かつ短期間で作製可能であることを明らかとした。さらに、本抗体創製技術を用いて癌関連蛋白質の同定を試みたところ、20種類の候補蛋白質を2D-DIGE

により見出した。2D-DIGEゲルから回収した蛋白質の一部を用いて、質量分析により蛋白質を同定し、同時に抗体の単離を試みたところ、全ての候補蛋白質に対する抗体を取得することに成功した。このように、プロテオミクスで同定できる多数の蛋白質に対し、わずか数週間で網羅的に抗体を創製可能な本技術は、極めて有用であると考えられる。さらに、同定した蛋白質の中の機能未知分子の解析を目的に、取得したscFv抗体を蛍光蛋白質との融合蛋白質をとって細胞内で発現させ、蛍光イメージング解析を試みたところ、細胞内の当該標的分子を可視化できる可能性が示唆された。今後、さらなる最適化等が必要であるが、本研究で開発した技術は、疾患プロテオミクスによる創薬ターゲット、バイオマーカー候補の探索から、可視化機能解析までの絞り込みを効率化し、創薬研究を大きく加速するものと期待される。

E. 健康危険情報

該当なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction., *Br. J. Pharmacol.*, 153(6):1143-52, 2008.
- 2) Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y.,

Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain: Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus., *J. Mol. Biol.*, 380(5):777-782, 2008.

- 3) Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system., *Pharmazie*, 63(10):760-764, 2008.
- 4) Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library., *Pharmazie*, in press.
- 5) Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains., *Biomaterials*, in press.
- 6) 角田慎一、癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究、*Pharma Vision News*, 13: 32-36, 2009.

2. 学会発表

- 1) 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央: プロテオミクス創薬を志

- 向した疾患関連蛋白質抗体の迅速単離システムの開発., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
- 2) 山下琢矢, 宇都口直樹, 鈴木 亮, 長野一也, 角田慎一, 堤 康央, 丸山一雄 : フェージ表面提示法を用いた抗腫瘍組織血管抗体の創製., 遺伝子・デリバリー研究会 第8回シンポジウム., 大阪, 2008年5月.
 - 3) Shin-ichi Tsunoda, Kazuya Nagano, Tomoaki Yoshikawa, Yasuo Yoshioka, Shinsaku Nakagawa, Yasuhiro Abe, Haruhiko Kamada, Yasuo Tsutsumi : Antibody-based proteomics for efficient discovery and validation of tumor biomarkers., 第67回日本癌学会学術総会, 東京, 2008年10月.
 - 4) 岡村賢孝, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによる乳がんマーカーの探索., ファーマバイオフォーラム 2008, 東京, 2008年11月.
 - 5) 吉田康伸, 今井 直, 長野一也, 岡村賢孝, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによるがんリンパ節転移マーカーの探索., 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2008年12月.
 - 6) 岡村賢孝, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 阿部康弘, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによる乳癌バイオマーカーの探索., 日本薬学会第129年回, 京都, 2009年3月.
 - 7) Imai S., Tsunoda S., Yoshida Y., Nakagawa S., Fukuoka J., Tsutsumi Y. : A novel system for efficiently screening tumor-related proteins using antibody proteomics, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam, 16 - 20 August, 2008.
 - 8) Yoshida Y., Imai S., Yoshikawa T., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Proteomic profiling of human lymphatic endothelial cells for analyzing lymphangiogenesis, HUPO 7th Annual World Congress Amsterdam 2008, Amsterdam, 16 - 20 August, 2008.
 - 9) Nagano K., Yoshikawa T., Sugita T., Nabeshi H., Imai S., Suzuki K., Fukuoka J., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Relationship between regulatory T cell infiltration and progression of different tumors assessed by high-density tissue microarray., 7th Joint Conference of the International Society for Interderon and Cytokine Research and International Cytokine Society., Canada, 12-16 October, 2008.
 - 10) 角田慎一 : 癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲット技術の研究, 第10回創薬ビジョンシンポジウム, 東京, 2008年12月.
 - 11) 長野一也, 今井 直, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 疾患プロテオミクスからバイオマーカーの創出へ - 抗体プロテオミクス技術の確立とがん関連マーカーの探索 -, 日本薬学会第129年回大学院生シンポジウム, 京都, 2009年3月.
- G. 知的財産権の出願・登録状況**
- 角田慎一, 堤 康央, 新規腫瘍マーカーを用いた乳がんの検査方法, 特願 2009-060706.

H. その他

角田慎一、日本薬学会創薬ビジョン部会賞、癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究、2008年12月。

I. 協力研究者

堤 康央 独立行政法人医薬基盤研究所

創薬プロテオミクスプロジェクト
プロジェクトリーダー

鎌田春彦 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト
主任研究員

阿部康弘 独立行政法人医薬基盤研究所
創薬プロテオミクスプロジェクト
プロジェクト研究員

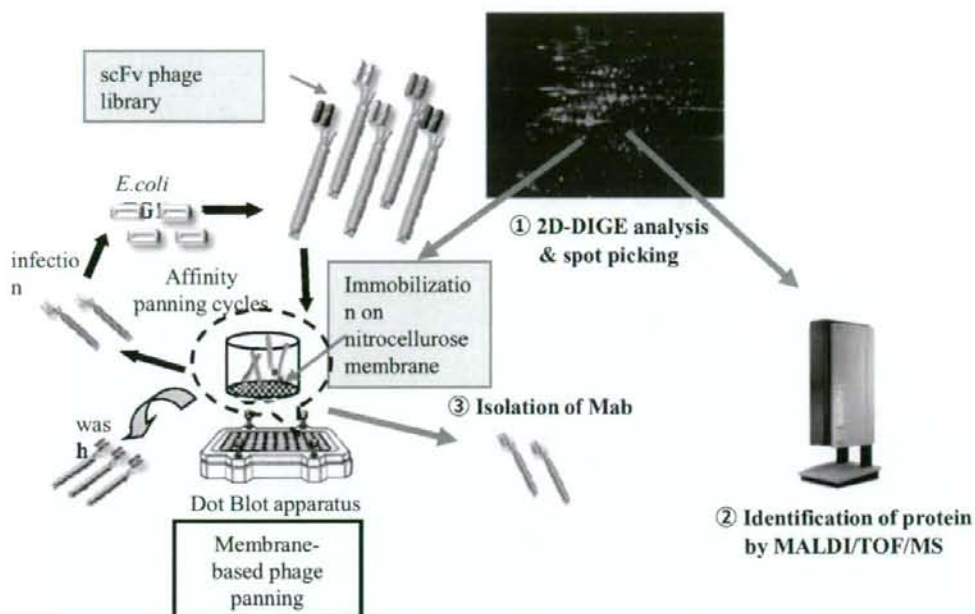


図1 抗体プロテオミクス技術の概要

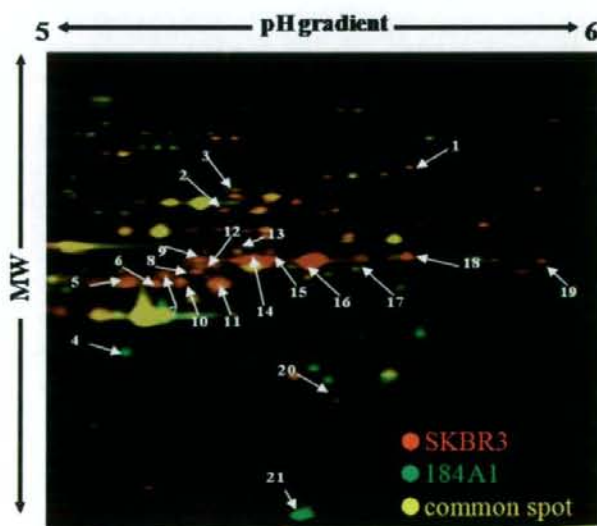


図2 乳腺および乳がん細胞の二次元蛍光差分ゲル電気泳動

Mammary gland cell (184A1) and breast cancer cell (SKBR3) were labeled using cy3 and cy5, respectively, before 2D-electrophoresis. Spots of red, green and yellow color show elevated expression level in breast cancer cell, mammary gland cell and no expression difference, respectively. The spots indicated by arrows are the proteins identified by MALDI-TOF/MS.

表1 MALDI-TOF/MSによる乳癌関連蛋白質

spot	MW	pI	protein volume (ng)	cancer / normal
#1	84649	5.87	119	6-fold ↑
#2	62872	5.52	104	6-fold ↑
#3	75580	5.55	94	7-fold ↑
#4	36938	5.28	610	11-fold ↓
#5	41694	5.29	99	15-fold ↑
#6	47820	5.39	100	18-fold ↑
#7	47305	5.34	99	12-fold ↑
#8	47820	5.39	95	16-fold ↑
#9	51563	5.32	109	10-fold ↑
#10	51333	5.41	126	23-fold ↑
#11	48029	5.34	497	13-fold ↑
#12	51333	5.41	122	24-fold ↑
#13	52992	5.49	126	35-fold ↑
#14	51312	5.5	406	36-fold ↑
#15	54880	5.69	677	8-fold ↑
#16	53529	5.52	694	32-fold ↑
#17	53540	5.52	1143	72-fold ↑
#18	53784	5.75	353	8-fold ↑
#19	50678	5.95	130	22-fold ↑
#20	32130	5.66	119	9-fold ↑
#21	23159	5.42	119	53-fold ↓

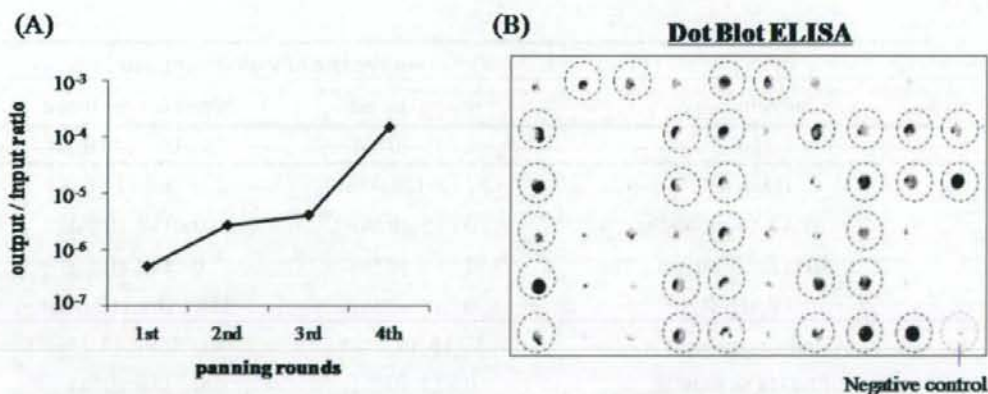


図3 ドットプロットパンニングを用いたscFvライブラリからのspot #8 蛋白質に対する抗体の単離

Affinity panning was performed on a membrane blotted protein spot #8. The scFv phage library reacted to spot #8 immobilized on the membrane. After binding step, the membrane was washed ten times with 0.1 % TBST. The bound phage was eluted with triethylamine. (A) The ratio was calculated as follows ; (output phage titer) / (input phage titer). (B) The binding properties of selected clones were measured by Dot Blot ELISA. : positive clone (dot-line circle)

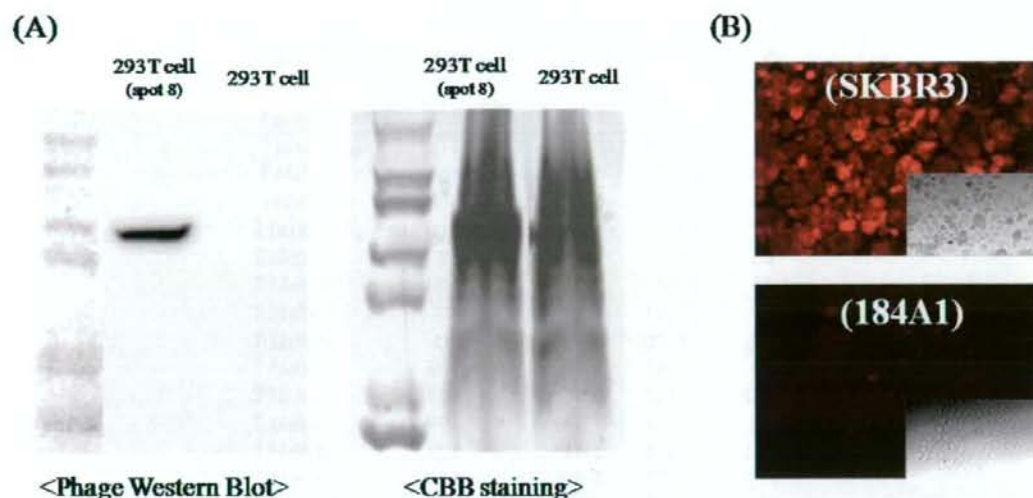


図4 抗spot 8 scFv ファージ抗体の特性

The specificity of anti-spot 8 scFv phage antibody was examined by phage Western Blot and immuno fluorescence staining. Cell lysates derived from spot 8 over-expression 293T cell and 293T parental cells were applied to 10-20% SDS-polyacrylamide gel, and transferred to PVDF membrane, and detected anti-spot 8 scFv phage antibody (A). Left : Phage Western Blot, Right : CBB staining (B) Mammary gland cells (184A1) and breast cancer cells (SKBR3) were immobilized, and detected anti-spot 8 scFv phage antibody. Fluorescence images were observed using fluorescence microscope.

protein name	positive rate of various antigens	
	normal tissue	breast cancer tissue
Her-2	0 / 15 (0%)	53 / 189 (28.0%)
IkappaBR	3 / 15 (20.0%)	22 / 189 (11.6%)
SPATA5 protein	0 / 15 (0%)	0 / 189 (0%)
Beta actin variant	0 / 15 (0%)	0 / 189 (0%)
TRAIL-R2	0 / 15 (0%)	119 / 189 (63.0%)
Candidate protein A	1 / 15 (6.7%)	83 / 189 (43.9%)
FLJ31438 protein	0 / 15 (0%)	0 / 189 (0%)
HPAK65	0 / 15 (0%)	0 / 189 (0%)
Candidate protein B	0 / 15 (0%)	137 / 189 (72.5%)
XRN1 protein	0 / 15 (0%)	0 / 189 (0%)
Jerky protein homolog-like	0 / 15 (0%)	0 / 189 (0%)
Candidate protein C	0 / 15 (0%)	93 / 189 (49.2%)

表2 Expression profiling of normal & breast tumor microarray using phage antibodies

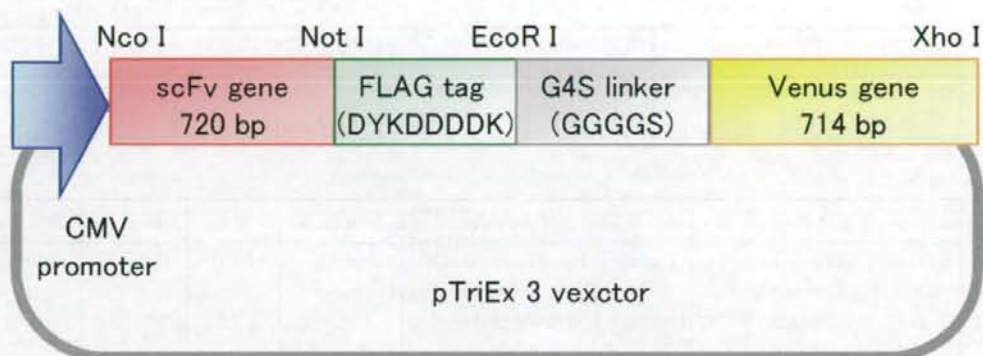
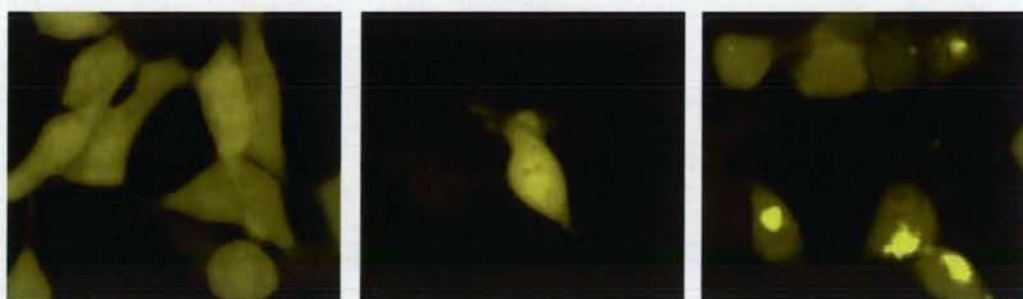


図5 scFv-Venus発現ベクター



Venus(GFP変異体)単独

Anti-RREB1-Venus

Anti-p53-Venus

図6 scFv-Venusの発現による蛋白質の可視化解析

293T細胞にVenus単独、抗RREB1scFv-Venus、抗p53 scFv-Venus発現プラシドをトランスフェクトし、24hr後に蛍光顕微鏡により観察した。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Comparative Study of the Protein Transduction Domains-Mediated Molecular Transduction.	Br. J. Pharmacol.	153(6)	1143-52	2008
Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Organelle-targeted delivery of biological macromolecules using the protein transduction domain Potential applications for peptide aptamer delivery into the nucleus.	J. Mol. Biol.	380(5)	777-782	2008
Imai S., Mukai Y., Takeda T., Abe Y., Nagano K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	The effect of protein properties on display efficiency using the M13 phage display system.	Pharmazie.	63(10)	760-764	2008
Nagano K., Imai S., Mukai Y., Nakagawa S., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	Rapid isolation of intrabody candidates by using an optimized non-immune phage antibody library.	Pharmazie	64(4)	238-241	2009
角田慎一	癌治療最適化のための細胞内薬物ターゲティング技術の研究	Pharma Vision News	13	32-36	2009
Yoshikawa T., Sugita T., Mukai Y., Yamanada N., Nagano K., Nabeshi H., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.	The augmentation of intracellular delivery of peptide therapeutics by artificial protein transduction domains.	Biomaterials			in press



RESEARCH PAPER

Comparative study on transduction and toxicity of protein transduction domains

T Sugita^{1,2}, T Yoshikawa¹, Y Mukai^{1,2}, N Yamanada^{1,2}, S Imai^{1,2}, K Nagano^{1,2}, Y Yoshida^{1,3}, H Shibata¹, Y Yoshioka^{1,4}, S Nakagawa², H Kamada^{1,4}, S-i Tsunoda^{1,4} and Y Tsutsumi^{1,3,4}

¹Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), Ibaraki, Osaka, Japan;

²Department of Biotechnology and Therapeutics, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka, Japan;

³Department of Biomedical Innovation, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Suita, Osaka, Japan and ⁴The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics, Osaka University, Suita, Osaka, Japan

Background and purpose: Protein transduction domains (PTDs), such as Tat, antennapedia homeoprotein (Antp), Rev and VP22, have been extensively utilized for intracellular delivery of biologically active macromolecules *in vitro* and *in vivo*. There is little known, however, about the relative transduction efficacy, cytotoxicity and internalization mechanism of individual PTDs.

Experimental approach: We examined the cargo delivery efficacies of four major PTDs (Tat, Antp, Rev and VP22) and evaluated their toxicities and cell internalizing pathways in various cell lines.

Key results: The relative order of the transduction efficacy of these PTDs conjugated to fluorescein was Rev > Antp > Tat > VP22, independent of cell type (HeLa, HaCaT, A431, Jurkat, MOLT-4 and HL60 cells). Antp produced significant toxicity in HeLa and Jurkat cells, and Rev produced significant toxicity in Jurkat cells. Flow cytometric analysis demonstrated that the uptake of PTD-fluorescein conjugate was dose-dependently inhibited by methyl- β -cyclodextrin, cytochalasin D and amiloride, indicating that all four PTDs were internalized by the macropinocytotic pathway. Accordingly, in cells co-treated with 'Tat-fused' endosome-disruptive HA2 peptides (HA2-Tat) and independent PTD-fluorescent protein conjugates, fluorescence spread throughout the cytosol, indicating that all four PTDs were internalized into the same vesicles as Tat.

Conclusions and implications: These findings suggest that macropinocytosis-dependent internalization is a crucial step in PTD-mediated molecular transduction. From the viewpoint of developing effective and safe protein transduction technology, although Tat was the most versatile carrier among the peptides studied, PTDs should be selected based on their individual characteristics.

British Journal of Pharmacology advance online publication, 28 January 2008; doi:10.1038/sj.bjp.0707678

Keywords: protein transduction domains; Tat; antennapedia; Rev; VP22; macropinocytosis

Abbreviations: PTD, protein transduction domain; Antp, antennapedia

Introduction

A strong focus of research in the post-genomic era is the development of effective therapies for refractory diseases such as cancer and neurodegenerative syndromes (Rhodes and Chinnaiyan, 2005; Brusic *et al.*, 2007; Drabik *et al.*, 2007). Because the therapeutic targets of these diseases generally exist inside the cell, it is necessary to establish drug delivery methods that transfer macromolecules, such as therapeutic proteins or peptide-based drugs, across the cellular membrane (Nori and Kopecek, 2005; Murriel and Dowdy, 2006; Borsello and Forloni, 2007).

Protein transduction is a recently developed method for delivering biologically active proteins directly into mammalian cells with high efficiency (Hawiger, 1999; Schwarze *et al.*, 2000). Recombinant technology is used to modify the biophysical properties of proteins and peptides, particularly with respect to their cell permeability, using the so-called protein transduction domains (PTDs) (Nagahara *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 1998; Schwarze *et al.*, 1999). The HIV-1-derived Tat peptide renders various macromolecules cell permeable. Although the initial reports suggested that protein transduction is energy and temperature independent, these characteristics are now mostly attributed to phenomena such as fixation artefacts (Richard *et al.*, 2003). More recent data indicate that basic PTDs such as Tat enter the cells through a macropinocytotic pathway that is universally active in all cells (Wadia *et al.*, 2004; Kaplan *et al.*, 2005). A series of events involves Tat attachment to an anionic cell surface,

Correspondence: Dr S-i Tsunoda, Laboratory of Pharmaceutical Proteomics, National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO), 7-6-8 Saito-Asagi, Ibaraki, Osaka 597-0085, Japan.
E-mail: tsunoda@nibio.go.jp

Received 9 November 2007; accepted 4 December 2007

followed by the association of these complexes with lipid rafts, which triggers dynamin-independent macropinocytosis. After internalization, the endosome pH falls and Tat apparently destabilizes the membranes, which results in a small amount of the endosome contents escaping into the cytosol. The released fraction of Tat can then exert its biologic activity. Consistent with this model, Tat delivery is enhanced by the influenza virus haemagglutinin fusogenic motif, which further destabilizes endosomal membranes at a low pH (Han *et al.*, 2001; Skehel *et al.*, 2001). In cells cotreated with Tat-conjugated HA2 (HA2-Tat), a greater proportion of endocytosed Tat-fused Cre recombinase escapes into the cytoplasm (Wadia *et al.*, 2004). Other studies suggest that certain cell types might incorporate Tat constructs by clathrin- or caveolin-dependent endocytosis, raising the possibility that transport varies according to the cargo or cell type (Ferrari *et al.*, 2003; Fittipaldi *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2005). In addition to the basic Tat peptide, there are other proteins (fragments), such as antennapedia (Antp), Rev and VP22, that enhance cellular uptake of proteins (Table 1) (Derossi *et al.*, 1994; Elliott and O'Hare, 1997; Futaki *et al.*, 2001; Joliot and Prochiantz, 2004). These four well-known PTDs facilitate the delivery of various biomacromolecules into the cell, but few studies have examined their relative efficacy.

In the present study, we evaluated the potency and internalizing pathway of four major PTDs to optimize protein transduction technology and to clarify the mechanisms of action. We also evaluated the cytotoxicity of these four PTDs as this is crucial to their utility as effective biomacromolecule carriers. These analyses may help not only to elucidate the mechanism by which the four peptides facilitate the cellular uptake of biomacromolecules, but also provide criteria for their proper use.

Materials and methods

Cell lines

HeLa cells (human cervical carcinoma cells) and A431 cells (human epithelial carcinoma cells) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). HaCaT cells (human keratinocyte cells) were kindly provided by Dr S Inui, Osaka University. Jurkat cells (human leukaemia cells) and MOLT-4 cells (human leukaemia cells) were kindly provided by Hayashibara Biochemical Laboratories Inc. (Okayama, Japan). HL60 cells (human promyelocytic leukaemia cells) were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB; Osaka, Japan). HeLa cells were cultured in minimal essential medium (MEM α ; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. A431 cells and HaCaT cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Wako Pure Chemicals) supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine and antibiotics. Jurkat cells and MOLT-4 cells were maintained in RPMI-1640 medium (Wako Pure Chemicals) supplemented with 10% FBS and antibiotics. HL60 cells were maintained in RPMI-1640 medium (Wako Pure Chemicals) supplemented with

Table 1 Protein sequences of the PTDs evaluated

PTD	Origin	Sequence	<i>pI</i>
Tat	HIV-1	<u>GRKKRRQRRRPPQ</u>	12.70
Antp	<i>Drosophila</i>	<u>RQIKIWQNRRMKWKK</u>	12.31
Rev	HIV-1	<u>TRQARRNRRRRWRERQF</u>	12.60
VP22	HSV	<u>NAKTRRHERRRKLAIER</u>	12.01

The basic amino acids in each sequence are shown in bold.

20% FBS and antibiotics. All cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂.

Synthetic peptides

All peptides used in this study were purchased from the Toray Research Center Inc. (Tokyo, Japan) and had purities above 90%, which was confirmed by high-performance liquid chromatography analysis and mass spectroscopy. The sequences of these peptides were GRKKRRQRRRPPQ-FAM (FAM = carboxyfluorescein) for Tat-conjugated FAM (Tat-FAM), RQIKIWQNRRMKWKK-FAM for Antp-conjugated FAM (Antp-FAM), TRQARRNRRRRWRERQK-FAM for Rev-conjugated FAM (Rev-FAM), NAKTRRHERRRKLAIER-FAM for VP22-conjugated FAM (VP22-FAM), YGRKKRRQRRR-biotin for Tat-conjugated biotin, RQIKIWQNRRMKWKK-biotin Antp-conjugated biotin, TRQARRNRRRRWRERQK-biotin for Rev-conjugated biotin, NAKTRRHERRRKLAIER-biotin for VP22-conjugated biotin and GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWY YGRKKRRQRRR for HA2-conjugated Tat (HA2-Tat). The individual PTD sequences are underlined.

Flow cytometric analysis

HeLa cells, HaCaT cells and A431 cells were cultured in 24-well plates (Nalge Nunc International, Naperville, IL, USA) at 5.0×10^4 cells per well in culture medium and incubated for 24 h at 37 °C. Jurkat cells, MOLT-4 cells and HL60 cells were cultured in 24-well plates (Nalge Nunc International) at 1.0×10^5 cells per well in Opti-MEM 1 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After aspirating the media, FAM-conjugated PTD (PTD-FAM) (10 μ M) was added to the cells in Opti-MEM 1 and the culture dishes were incubated for an additional 3 h. Following incubation, the cells were washed with phosphate-buffered saline and incubated for 5 min with 0.1% trypsin to detach them and to remove surface-bound peptides. After incubation, 2 vol of 10% FBS-containing culture medium was added to stop the trypsin activity and to detach the cells completely. The cell suspension was centrifuged at 800g, washed with phosphate-buffered saline, centrifuged again and resuspended in 500 μ l of 0.4% paraformaldehyde. Fluorescence was analysed on a FACSCalibur flow cytometer, and data were analysed using CellQuest software (both from Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). In the low-temperature uptake experiment, cells were preincubated at 4 °C for 1 h in Opti-MEM 1 prior to adding the PTDs, and all buffers and solutions were equilibrated to 4 °C. To analyse the internalization mechanism, HeLa cells were pretreated for 30 min in Opti-MEM 1 medium with 0–5 mM methyl- β -cyclodextrin, 0–2.5 μ M

cytochalasin D or 0–5 mM amiloride (all from Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). After the PTD-FAMs were added, cells were maintained for 1 h (30 min for amiloride) in the presence of inhibitors and washed several times with phosphate-buffered saline. As a control, the cellular uptake of transferrin fluorescein isothiocyanate (Invitrogen) was also monitored.

Cell proliferation assay

Cell viability was determined using a WST-8 assay kit (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) according to the manufacturer's instructions. The assay is based on the cleavage of the tetrazolium salt WST-8 to formazan by cellular mitochondrial dehydrogenase. HeLa cells were cultured in 96-well plates (Nalge Nunc International) at 5.0×10^3 cells per well in MEM α and incubated for 24 h at 37 °C. Jurkat cells were cultured in 96-well plates at 1.0×10^4 cells per well in Dulbecco's modified Eagle's medium. The cells were treated with various concentrations of PTD-biotin. After 24 h incubation, cell viability was measured using the WST-8 assay kit.

Membrane integrity assay

The lactate dehydrogenase (LDH) leakage assay was used to quantify the membrane integrity of the PTD-treated cells. This assay detects the amount of LDH released into the culture media as a result of plasma membrane disruption after PTD treatment. HeLa cells were cultured in 96-well plates (Nalge Nunc International) at 5.0×10^3 cells per well in MEM α and incubated for 24 h at 37 °C. Jurkat cells were cultured in 96-well plates at 1.0×10^4 cells per well in Dulbecco's modified Eagle's medium. Each cell type was treated with various concentrations of PTD-biotin. After 3 h incubation, the LDH release activity of the peptides was measured using an LDH cytotoxicity test (Wako) according to the manufacturer's instructions.

Expression and purification of PTD-fused Venus protein

The Venus (variant of yellow fluorescent protein) DNA sequence was kindly provided by Dr A Miyawaki (RIKEN Brain Science Institute). The Tat-Venus DNA sequence was amplified by PCR. At the 5' end, the primer sequence 5'-TTTAAAGAAGGAGATATACATATGGCTTACGGTTCGTAATAA CGTCGCCAGCGTCCCGTGGTGGCGGCGGTTCCCTCGA GCACCACCATCACCCACCATGTGAGCAAGGGCGAGGAGC TGTTCAC-3' introduced an *Nde* I site and Tat sequence and at the 3' end, the primer sequence 5'-GCTTTGTTAGCAG CCGAATCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGA TC-3' introduced an *Eco* RI site. The PCR product was digested with *Nde* I and *Eco* RI and inserted into a protein expression plasmid. Other plasmids expressing Antp-, Rev- or VP22-Venus recombinant proteins were constructed by replacing the Tat-coding region in the Tat-Venus plasmid with the Antp, Rev or VP22 sequences using the *Nde* I and *Xho* I restriction sites. These sequences were obtained by annealing the following oligonucleotides with protruding single-strand DNA corresponding to the *Nde* I and *Xho* I sites:

Antp sense, 5'-TATGGCTCGTCAGATCAAAATCTGGTTCCA GAATCGTCGTATGAGTGGAAAAAGGTGGCGGCGGTTCC-3'; Antp antisense, 5'-TCGAGGGAACCGCCGCCACCTT TTTTCCACTTCATACGACGATTCTCGAACGATTTTGATC TGACGAGCCA-3'; Rev sense, 5'-TATGGCTACCCGTCAGGC TCGTCGTAATCGTCGTCGTCGTTGGCGTGAACGTCAGCGT GGTGGCGGCGGTTCC-3'; Rev antisense, 5'-TCGAGGGA ACGCCGCCACCGTCGACGTTACGCGCAACGACGACGA CGATTACGACGAGCCTGACGGGTAGCCA-3'; VP22 sense, 5'-TATGGCTAACGCTAAAACCCGTCGTCAGAACGTCGTCG TAAACTGGCTATCGAACGTTGGTGGCGGCGGTTCC-3'; VP22 antisense, 5'-TCGAGGGAACCGCCGCCACCGTCGATAG CCAGTTTACGACGACGTTCTGTCGACGCGGTTTTCAGCGT TAGCCA-3'. The plasmids, except for the Antp-Venus expression vector, were transformed into *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) (Invitrogen). The Antp-Venus-expressing vector was transformed into BL21 Star (DE3), in which the plasmid-expressing chaperone (pGro7) was pretransformed. Transformed *E. coli* was cultured and the cell paste was suspended in BugBuster Master Mix (Novagen, Darmstadt, Germany) and centrifuged. PTD-Venus was recovered in the supernatant and purified by His-tag affinity purification and gel filtration chromatography.

Confocal laser scanning microscopy analysis

HeLa cells were cultured on Lab-Tek II Chambered Coverglass (Nalge Nunc International) at 3.0×10^4 cells per well in MEM α supplemented with 10% FBS and incubated for 24 h at 37 °C. Internalization of PTD-FAM or PTD-Venus was performed as follows: HeLa cells were treated with PTD-FAM or PTD-Venus (10 μ M) in Opti-MEM I containing 100 ng ml⁻¹ Hoechst 33342 (Invitrogen) and 6 μ g ml⁻¹ FM4-64 (Invitrogen). After incubation at 37 °C for 3 h, the medium was exchanged with fresh medium and fluorescence was observed by confocal laser scanning microscopy (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) without cell fixation. For cotreatment with HA2-Tat, HeLa cells were cotreated with PTD-FAM (10 μ M) and HA2-Tat (2 μ M) in Opti MEM I containing 100 ng ml⁻¹ Hoechst 33342. After incubation at 37 °C for 3 h, the medium was exchanged with fresh medium and fluorescence was observed by confocal laser scanning microscopy without cell fixation.

Results

Comparison of transduction efficiency and cytotoxicity of four PTDs

To confirm the intracellular translocation activity of the four selected PTDs, we evaluated the transduction efficiency of Tat-, Antp-, Rev- and VP22-FAM in six cell lines (adherent: HeLa, HaCaT and A431 cells; nonadherent: Jurkat, MOLT-4 and HL60 cells) using flow cytometric analysis (Figure 1). These PTDs contain a large number of basic amino acids (Table 1) and their cationic properties are thought to be important for cell membrane penetration (Futaki *et al.*, 2001; Chauhan *et al.*, 2007). Their positive charge, however, causes them to adsorb nonspecifically to negatively charged cell