

第 13 回バイオ関連シンポジウム

植松 裕太
Yuta UEMATSU

物質化学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は 2019 年 9 月 4 日から 6 日にかけて、東北大学青葉山東キャンパスにて開催された「第 13 回バイオ関連化学シンポジウム」に参加した。

そして、「遺伝子導入のためのペプチドキャリアの合成と評価」をテーマにポスター発表を行った。

2. 研究背景

核酸医薬は、異常な遺伝子および遺伝的欠陥を治療するための遺伝子治療に対して大きな期待を集めている。しかし、一般に核酸分子は代謝酵素等により分解されたり、細胞膜との電荷反発などにより、単体では細胞内へ送達することが困難である。そこで、核酸分子を保護し、効能を効果的に発揮させるための薬物放出制御や標的化を可能にするドラッグデリバリーシステム (DDS) が注目を集めている。薬剤キャリアとして、ウイルス性ベクターや高分子ミセル、リボソームなどが研究されている。

一方、我々はアミノ酸 9 残基からなるペプチドの N 末端に核移行シグナルや膜透過配列を連結したペプチドが効率よく細胞内へ薬剤を送達することをみいだした。

本研究では、細胞還元環境下での核酸放出機能向上を指向してジスルフィド結合を有するペプチドキャリアを用いて、FITC-dsDNA の細胞内取り込みと赤色蛍光タンパク質 (mCherry) の発現を試みた。

3. 実験方法

使用したペプチドはアミノ酸 9 残基からなる両親媒性ペプチドで、負電荷を持つ薬剤を内包するのに有用なリシン残基を疎水面に配置した (Figure 1)。このペプチドは超純水中で β シート構造を形成し、

分子間に水素結合および疎水性相互作用が働き、自己集合化することでディスク構造をとることがわかっている。

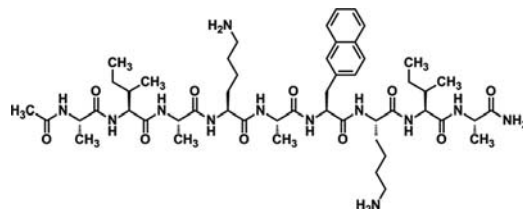


Figure 1 分子構造

このペプチドの機能化として、SV40 腫瘍抗原由来の核移行シグナルペプチド NLS-p として、より核酸の放出機能を向上させるために、構造の一部をリシン残基からジスルフィド結合を介してピリジン、pKa の異なるシステアミンに置き換えた。(Figure 2)

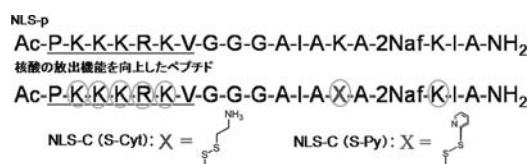


Figure 2 分子配列

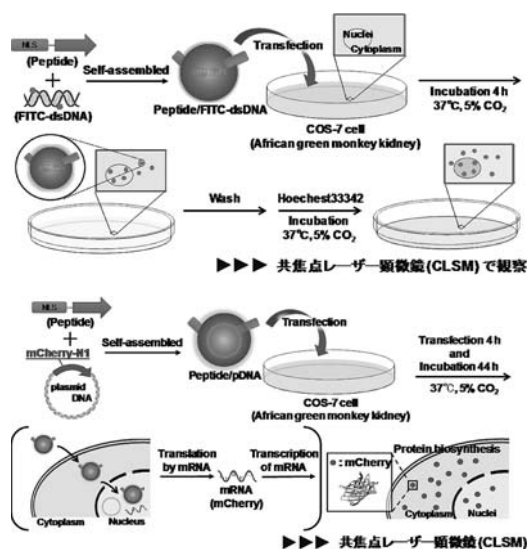


Figure 3 実験操作

細胞内への局在を FITC 標識をした dsDNA で確認した。また赤色蛍光タンパク質の発現を観察した (Figure 3)

4. 結果と考察

まず [Peptide] = 50 μ M, [dsDNA] = 7 nM, [DTT] = 10 mM の条件で、ジスルフィド結合の解離評価を HPLC と MALDI-TOF-MS で行った。(Figure 4)

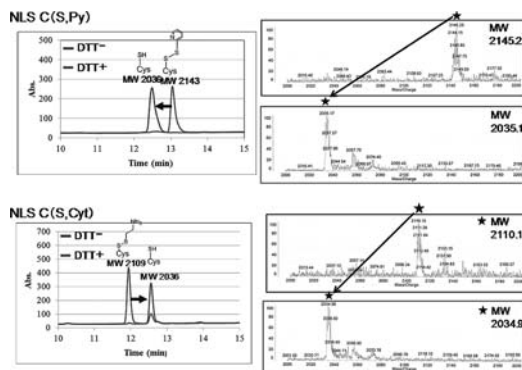


Figure 4 ジスルフィド結合の解離

細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また毒性評価についても行った。(Figure 5)

CLSM Image	NLS/FITC-dsDNA	NLS-C (S-Py) /FITC-dsDNA	NLS-C(S-Cyt) /FITC-dsDNA	Cap-p/FITC-dsDNA
Incubation 4 h ① Hoechst33342 ② FITC				
Cell viability	97 \pm 6%	98 \pm 8%	96 \pm 5%	96 \pm 3%

Figure 5 細胞内の dsDNA の局在

青色が細胞の核で緑色が dsDNA です。細胞質内に DNA が蓄積していることがわかりました。

続いて、赤色蛍光タンパク質を発現するプラスミド DNA を細胞内へ送達し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(Figure 6)

CLSM Image	NLS/pDNA	NLS-C (S-Py) /pDNA	NLS-C(S-Cyt) /pDNA	Cap-p/pDNA
Transfection 4 h Incubation 44 h ① Hoechst33342 ② mCherry				
Expression	++	+++	+++	+

Figure 6 タンパク質の発現

青色が細胞の核で赤色が発現したタンパク質です。

ジスルフィド結合を持っている二つの画像はより多くの赤色を示しています。

HeLa 細胞への dsDNA 送達を観察した。(Figure 7)

CLSM Image	NLS/FITC-dsDNA	NLS-C (S-Py) /FITC-dsDNA	NLS-C(S-Cyt) /FITC-dsDNA	Cap-p/FITC-dsDNA
Incubation 4 h ① Hoechst33342 ② FITC				

Figure 7 HeLa 細胞の dsDNA の局在

5. まとめ

新たに設計・合成したペプチドをキャリアにして COS7 細胞への遺伝子導入に成功し、毒性がないことも確認できた。今後は細胞内への導入経路の評価や発現したタンパク質を定量していきたいと思います。またがん細胞である HeLa 細胞での評価も行っていきたいと思います。

6. おわりに

まずはじめに、日頃からお世話になっている富崎先生、細胞実験でお世話になっている農学部の山崎先生、試薬提供していただいている(株)相互薬工様に感謝申し上げます。本学会で貴重なアドバイスを頂くことができました。今後は、学会で指摘された点や問題点を改善していきたいと思います。