

第9回バイオ関連化学シンポジウムに参加して

岸 岡 紘 平

Kohei KISHIOKA

物質化学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は2015年9月10日(木)から12(土)にかけて、熊本大学工学部・黒髪南キャンパスで開催された「第9回バイオ関連化学シンポジウム」に参加し、『細胞送達を目指したペプチド集合体の構造と機能評価』のテーマでポスター発表を行った。

2. 研究背景

生体システムにとって異物である薬物は、体内で吸収・分解されたり、副作用を引き起こしたりする。そこで、薬の効果を増強し、副作用を軽減するため、目的とする部位に薬を効果的かつ集中的に送り込ませるドラッグデリバリーシステム(DDS)が注目を浴びている。DDSは、放出制御・標的指向化・吸収促進といった薬物投与の最適化が求められる、リボソーム、ミセルなどをキャリアとしたDDS手法が研究されている。

本研究では、アミノ酸9残基からなるペプチド(Cap-p)の自己集合化能に着目し、非ウイルスベクターの核移行シグナルペプチド(NLS-p)をターゲティング素子とし、膜透過性を有するオクタアルギニンペプチド(R8-p)およびHIV-1由来のTAT配列ペプチド(TAT-p)をそれぞれCap-pのN末端に連結したペプチドを設計、合成、自己集合化させ、蛍光色素カルボキシテトラメチルローダミン(TMR)を薬剤モデルとする細胞送達に利用可能なキャリアであることを構造および機能の面から評価した。

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

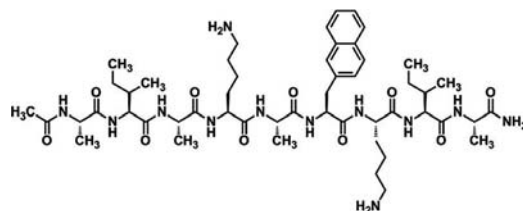


Figure 1 Chemical structure of synthesized peptide.

SV40腫瘍抗原由来の核移行シグナル

NLS-p: Biotin-G-G-P-K-K-R-R-K-V-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂

オクタアルギニンによる膜透過性

R8-p: H-R-R-R-R-R-R-R-R-R-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂

HIV-1Tat(47-60)由来の膜透過性

TAT-p: Ac-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R-P-P-Q-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂

蛍光色素TMRによる蛍光標識

TMR-p: TMR-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂



Figure 2 Chemical structure of synthesized peptides.

媒性とし、負電荷を持つ薬剤を内包するのに有用なLys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。

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)、膜透過性を有するオクタアルギニンペプチド(R8-p)およびHIV-1(47-60)由来のTAT配列ペプチド(TAT-p)、蛍光色素のカルボキシテトラメチルローダミンペプチド(TMR-p)を配置した(Figure 2)。これらのペプチドを自己集合体させ、ナノカプセルとした。またこれをHela細胞に添加し、細胞核への物質送達を顕微鏡観察で確認した。

4. 結果と考察

TEMおよびAFMより各ペプチド集合体の径は調製後6時間で約10-20nmの粒状であることが確認された(Figure 3)。

これらのペプチド集合体をHeLa細胞に添加し、共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、ペプチドナノカプセルをキャリアとする場合において、NLS-pによりTMR-pの核への送達が可能であることが

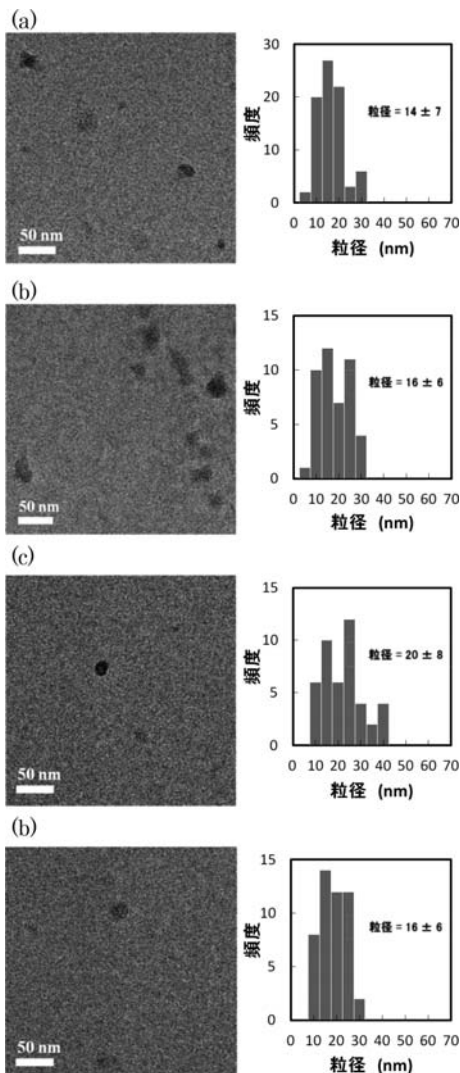


Figure 3 TEM image of peptides nanocapsules. (a) N, R, T-Cap (b) N-Cap (c) R-Cap (d) T-Cap.

確認された (Figure 4). また, 毒性試験を行った結果, 毒性のない非ウイルス性ベクターを作製することができた (Figure 5).

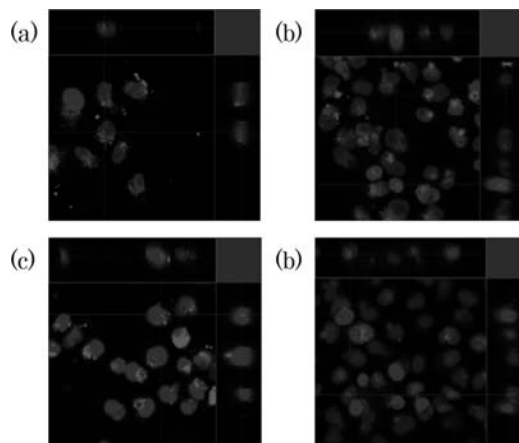


Figure 4 CLSM after nanocapsules transfection. (a) N, R, T-Cap (b) N-Cap (c) R-Cap (d) T-Cap.

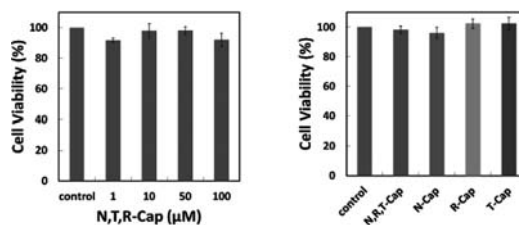


Figure 5 Toxicity test of nanocapsules.

5. まとめ

ペプチド集合体の径は調製後6時間で約10-20 nmの粒状となった。また, ペプチド集合体をHeLa細胞に添加したところ, ペプチドナノカプセルをキャリアとする場合において, NLS-pによりTMR-pの核への送達が可能であり, 毒性のない非ウイルス性ベクターを作製することができたと考えられる。今後, さらなる機能評価とタンパク質や核酸といった薬剤の導入を試みる。