

日本化学会第 97 春季年会 に参加して

片岡 駿 佑
Shunsuke KATAOKA
物質化学専攻修士課程 2年

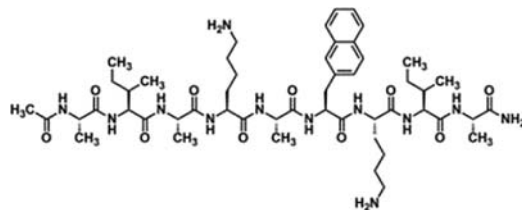


Figure 1 Chemical structure of synthesized peptide.

Cap-p : Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂
NLS-p : Ac-P-K-K-K-R-K-V-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂
R8-p : H-R-R-R-R-R-R-R-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂
TAT-p : Ac-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R-P-P-Q-G-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH₂
2Naf = 2-naphthylalanine

Figure 2 Chemical structure of synthesized peptide.

1. はじめに

私は 2017 年 3 月 16 日から 19 日にかけて、慶應義塾大学理工学部日吉キャンパスで開催された「日本化学会第 97 春季年会」に参加し、『ペプチド-核酸複合体の細胞内への取り込み挙動解析』をテーマに口頭発表を行った。

2. 研究背景

近年、核酸医薬品は癌や白血病等を発病している細胞が有する異常な遺伝子に作用し、遺伝子の欠陥を修復し治療する遺伝子治療に応用されている。しかし、一般に核酸分子は代謝酵素などによって分解されたり、細胞膜との電荷反発などにより、そのまま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、効能をより効果的に発揮させるための薬物放出過程の制御を可能にするドラッグデリバリーシステム (DDS) が関心を集めている。そこで、本研究では、ペプチド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) または膜透過性を有するオクタアルギニンペプチド (R8-p)、HIV-1 由来の TAT 配列ペプチド (TAT-p) と蛍光修飾 DNA 分子との複合体を合成し、HeLa 細胞核への DNA 送達を試みた。

3. 実験方法

キャリア形成ペプチドはアミノ酸 9 残基からなる両親媒性とし、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。実際、使用したペプチドは SV 40 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) を配置した。(Figure 2)。これらの機能化ペプチドに対して、DNA を Cation (ペプチドのアミノ基数)/Anion (DNA のリン酸基数) 比 = 1~20 となるように加え、25°C で 20 分間インキュベートすることで、ペプチド-DNA 複合体を行った。そしてこれらを HeLa 細胞に添加し、細胞核への DNA 送達を顕微鏡観察で観察した。

4. 結果と考察

各機能化ペプチド-DNA 複合体の径は、Cation/Anion 比 = 10 の複合体は調製後 20 分で約 40 nm の球状となった (Figure 3)。

これらの複合体を 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、NLS-p と TAT-p による複合体において細胞核へ、R8-p では細胞質内への DNA 送達が可能であることが確認された (Figure 4)。

5. まとめ

今回、40 nm 程度の球状の機能化ペプチド-DNA 複合体による HeLa 細胞への DNA 導入に成功し、特に NLS-p と TAT-p による機能化によって細胞核

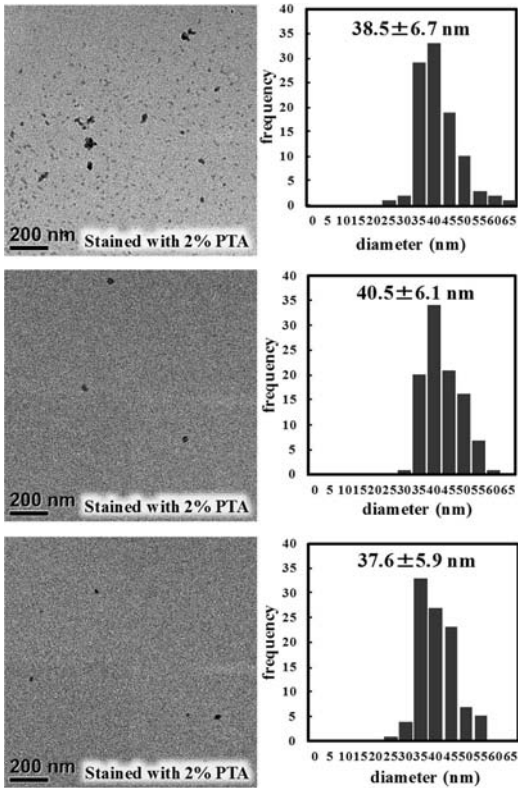


Figure 3 TEM image of Peptide/DNA complexes. (a) NLS/DNA, (b) R8/DNA, (c) TAT/DNA

への送達が可能となったと考えられる。今後はさらなる機能評価及び毒性試験と、プラスミド DNA との複合体による緑色蛍光タンパク質の発現を目指

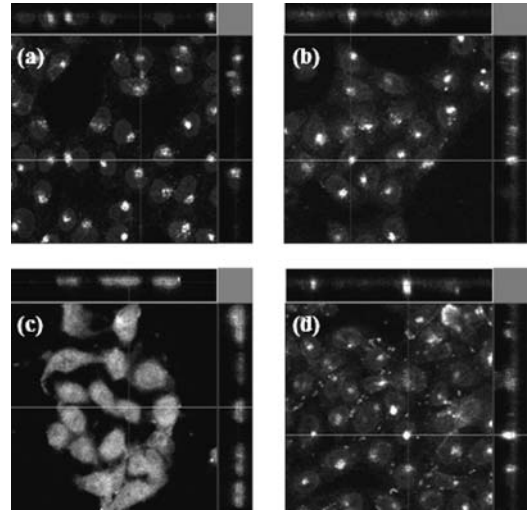


Figure 4 CLSM after Peptide/DNA complexes transfection. (a) Cap/FITC-DNA, (b) NLS/FITC-DNA, (c) R8/FITC-DNA, (d) TAT/FITC-DNA

す。

6. おわりに

2度目の口頭発表ということで、適度な緊張感をもって発表できた。また、普段接することのない他大学の研究発表を聞くことによって、分かりやすい伝え方についても学ぶことができた。今後は、指摘された疑問や問題点について検討し、掲げている目標に向けて、より発展的な研究を進めていきたい。