

第 11 回バイオ関連化学 シンポジウムに参加して

片岡 駿 佑
Shunsuke KATAOKA
物質化学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は 2017 年 9 月 7 日から 9 日にかけて、東京大学弥生キャンパスで開催された「第 11 回バイオ関連化学シンポジウム」に参加し、『細胞核薬剤送達機能を有するペプチド-核酸複合体の形成と細胞内取り込み』をテーマにポスター発表を行った。

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、薬剤としての効果を示し、治療する「遺伝子治療」に応用されている。しかし、一般に医薬品となる核酸分子は生体内の代謝酵素により分解・排出されたり、細胞膜との電荷反発等により、そのままでは細胞内への送達効率が低い問題点が指摘されている。そこで、核酸分子を保護し、効能を効率的に発揮させるための薬物放出過程を制御するドラッグデリバリーシステム (DDS) が注目されている。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) と蛍光修飾二本鎖 DNA 分子との複合体を合成し、HeLa 細胞核への dsDNA 送達を試みた。

3. 実験方法

キャリア形成する、アミノ酸配列はアミノ酸 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

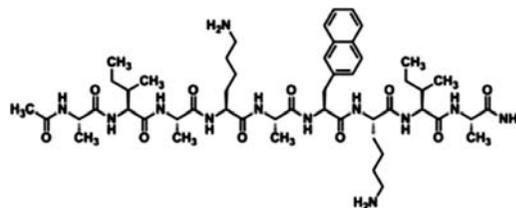


Figure 1 Chemical structure of synthesized peptide

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

Figure 2 Chemical structure of synthesized peptides

成し、分子間に水素結合及び疎水性相互作用が働き、自己集合化し、ディスク構造となることがわかっている。実際、使用したペプチドは、キャリア形成ペプチドに SV 40 腫瘍抗原由来の核移行シグナル (NLS-p)、膜透過性を有するオクタアルギニン (R8-p) および HIV-1 (47-60) 由来の TAT 配列 (TAT-p) を N 末端側に配置した (Figure 2)。これらの機能化ペプチドに対して、dsDNA を Cation (ペプチドのアミノ基数)/Anion (dsDNA 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-dsDNA 複合体合成を行った。そしてこれらを HeLa 細胞に添加し、細胞核への dsDNA 送達を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 結果と考察

NLS/DNA 複合体は、動的光散乱法により、Cation/Anion (C/A 比) = 1~2 ではゼータ電位が中性付近で 700 nm 程度の凝集体、一方 C/A 比 = 5~20 で +20~40 mV で 100 nm 程度の単分散した複合体の存在が示唆された (Figure 3)。また、C/A 比 = 10 の各機能化ペプチド/DNA 複合体を電子顕微鏡で観察すると、調製後 20 分で約 40 nm の球状となり (Figure 4)、これらの複合体を HeLa 細胞に添加すると、NLS-p と TAT-p では細胞核へ、R8-p では細胞質内への dsDNA 送達を確認された (Figure 5)。

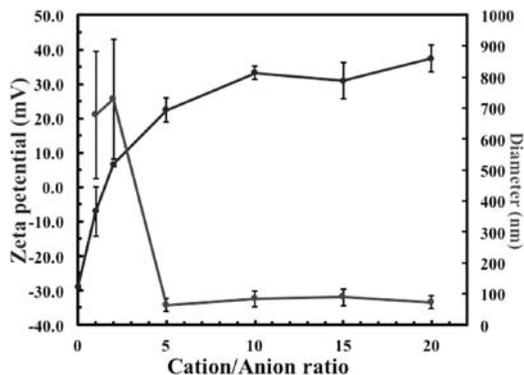


Figure 3 Zeta potential and diameter of NLS/DNA complexes

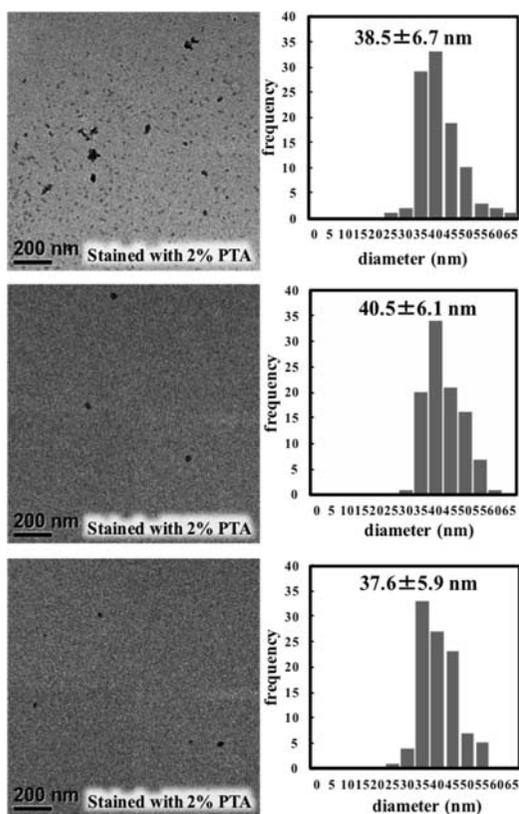


Figure 4 TEM image of Peptide/DNA complexes.
(a) NLS/DNA, (b) R8/DNA, (c) TAT/DNA

5. まとめ

今回、40 nm 程度の球状の Cation/Anion 比 = 10

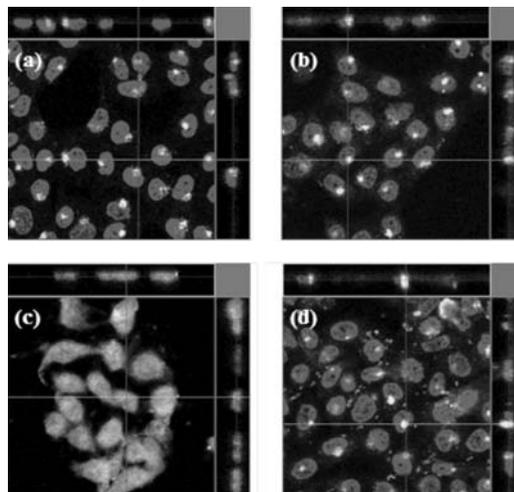


Figure 5 CLSM after Peptide/DNA complexes transfection.
(a) Cap/FITC-DNA, (b) NLS/FITC-DNA, (c) R8/FITC-DNA, (d) TAT/FITC-DNA

の機能化ペプチド-dsDNA 複合体による HeLa 細胞への dsDNA 導入に成功し、特に NLS-p と TAT-p による機能化によって、細胞核への核酸送達効率が向上したと考えられる。今後はさらなる機能性及び性質評価、毒性試験を行い、遺伝子発現するプラスミド DNA とのペプチド-DNA 複合体による緑色蛍光タンパク質の発現を目指す。

6. おわりに

ポスター発表ということで、興味を持っていただいた他大学及び企業の研究者の方々と濃密な議論及び意見をいただくことができ、今後検討していかねばならない新たな視点について、改めて考える機会となった。また、初見の方々にもより分かりやすく伝える技術に触れることができ、私自身も心がけたい。今後は、指摘された疑問や解明していく必要があるメカニズムについて検討し、掲げている目標に向けて、発展的な研究を進めていきたい。最後に、研究活動においてご指導いただいた富崎教授及び研究室メンバーには深く感謝しています。