

# 10<sup>th</sup> International Peptide Symposium (第 55 回ペプチド討論会)

植松 裕太

Yuta UEMATSU

物質化学専攻修士課程 2年

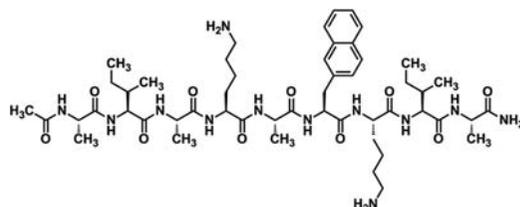


Figure 1 分子構造

## 1. はじめに

私は2018年12月3日から7日にかけて、ロームシアター京都及びみやこめっせにて開催された「10<sup>th</sup> International Peptide Symposium (第55回ペプチド討論会)」に参加した。

そして、「Complexation of Nucleic Acids and Carrier Peptide to Improve Nucleic Acids Release Activity for Intracellular Drug Delivery.」をテーマにポスター発表を行った。

## 2. 研究背景

一般的に治療薬である薬物は、あらゆる生体システムにとって異物であるため、体内で分解されたり、副作用を引き起こしたりする。そこで、必要最低限の薬物を、必要な場所に必要な時に到達させるドラッグデリバリーシステム (DDS) が注目を集めている。薬剤を運ぶキャリアとして、ウイルス性ベクターや高分子ミセル、リポ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、細胞内還元環境下での核酸放出機能の向上を指向して、ジスルフィド結合を有するペプチドキャリアを合成し、核酸との複合化および還元環境下における構造変化挙動を評価した。

## 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

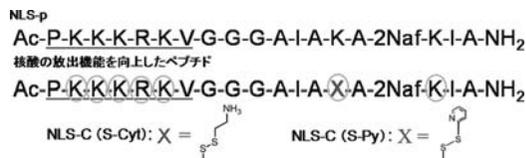


Figure 2 分子配列

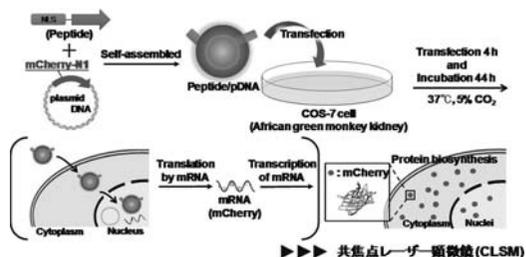
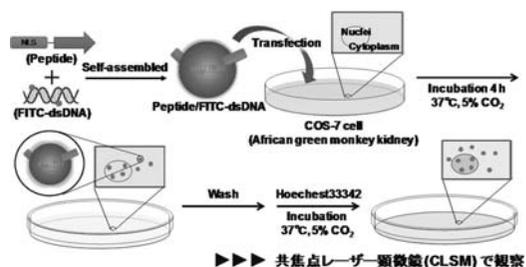


Figure 3 実験操作

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  $\beta$  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 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)

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 (Figure 3)

#### 4. 結果と考察

まず [Peptide] = 100  $\mu$ 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)

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)

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。

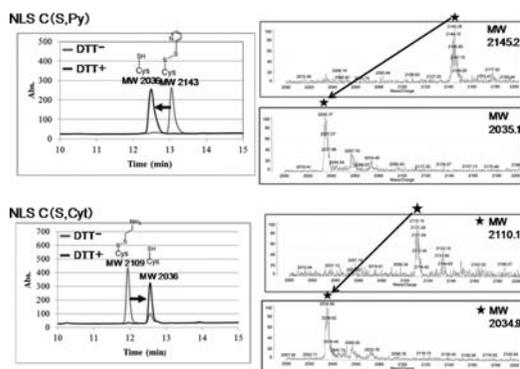


Figure 4 ジスルフィド結合の解離

| CLSM Image                                 | NLS/FITC-dsDNA | NLS C(S,Cyt) /FITC-dsDNA | NLS-C(S-Py) /FITC-dsDNA |
|--|----------------|--------------------------|-------------------------|
| Incubation 4 h<br>● Hoechst33342<br>● FITC |                |                          |                         |
| $\zeta$ potential (mV)                     | +33            | +10                      | +15                     |
| Cell viability                             | 97 $\pm$ 6%    | 96 $\pm$ 5%              | 98 $\pm$ 8%             |

Figure 5 細胞内の DNA の局在

| CLSM Image  | NLS/pDNA | NLS C(S,Cyt) /FITC-dsDNA | NLS-C(S-Py) /FITC-dsDNA |
|---|----------|--------------------------|-------------------------|
| Transfection 4 h<br>↓<br>Incubation 44 h<br>● Hoechst33342<br>● mCherry |          |                          |                         |
| Expression  | +        | ++                       | ++                      |

Figure 6 タンパク質の発現

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)

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。

#### 5. まとめ

今回、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。今後はさらなる機能評価と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。今回初めての国際学会で、外国の方と英語で話すことができ、いい経験になりました。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。