

「第 59 回ペプチド討論会」 に参加して

石 田 憲 稔

Kazutoshi ISHIDA

物質化学専攻修士課程 2022 年度修了

1. はじめに

2022 年 10 月 26 日から 28 日までの間、宮城県仙台市にあるトークネットホール仙台で開催された第 59 回ペプチド討論会に参加し、ポスター発表を行った。この学会で私は、「Synthesis and cellular delivery of nano-sized ribbon-shaped gold crystals tethering a nuclear localization signal sequence」というタイトルで発表を行った。

2. 研究内容

2.1 研究背景

近年、ナノサイズの高粒子を用いたバイオテクノロジーの研究が盛んに行われており、高い生体内安定性により医療分野へ利用されている。その中でも細長い形状をもつ金ナノロッドは近赤外光を吸収し熱へ変換する特有のフォトサーマル効果の性質をもつことで、腫瘍細胞を殺傷することができ、副作用の少ない治療法として期待されている。しかし、金ナノロッドは多段階の合成経路を要する他、合成段階で毒性物質である臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) を用いるため完全な除去が必要になるなどの課題解決が模索されている。

2.2 研究目的

そこで当研究室では、CTAB を用いることなく、薬剤送達のキャリアである Cap-p (Ac-AIAKA2 NafKI A-NH₂, 2Naf=L-2-naphthylalanine) の集合体内部に金イオンを取り込み還元することで、リボン状金ナノ結晶の合成に成功している (図 1)^[1]。そこで、本研究では金ナノリボンの特性を細胞内で活かすため、Cap-p ペプチドの N 末端に核移行シグ

ナルを修飾した NLS-p (Ac-PKKKRKVGGGAIKA 2NafKIA-NH₂) と金ナノリボンを複合化したドラッグデリバリーシステムの開発を行い、細胞内への金ナノリボン結晶の送達を試みた。

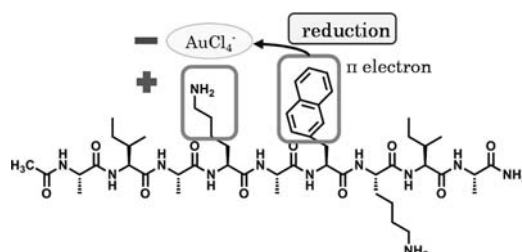


図 1 金ナノリボンの結晶化メカニズム

2.3 実験方法

ペプチドは Fmoc 固相合成法によって合成し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による精製及び MALDI-TOF-MS による分子量の同定を行った。塩化金酸 (Ⅲ) とペプチドは等濃度で混合させ、複合化を行った。紫外可視分光計 (UV-vis spectra) を用いて金還元評価を行った。透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、経時変化による金ナノリボンの形態評価を行った。細胞送達実験を行う際、ヒト子宮頸がん由来細胞 (HeLa 細胞) を使用した。トランスフェクション試薬として低血清培地 (Opti-MEM) による希釈によって終濃度を 50 μ M に調整し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による細胞送達評価を行った。

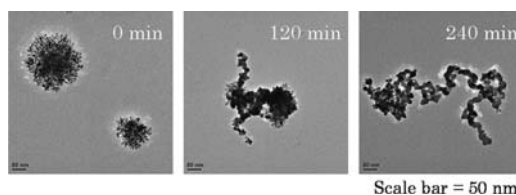


図 2 透過型電子顕微鏡による金ナノリボンの形態観察。NLS-p を 1% 含有した Cap-p を塩化金酸 (Ⅲ) と等濃度で混合させ、終濃度 50 μ M とした。

2.4 結果と考察

Cap-p に対して NLS-p の含有率を変化させ複合

化を行った。金の還元評価では粒状の金ナノ粒子が510nmに吸収を持つため着目したところ、NLS-pの含有率が増えるほど吸光度は低下した。金還元のメカニズムが π 電子の供給によるものだが、NLS-pのカチオン部に塩化金イオンが集積することで還元を阻害していると考えられた。そこでNLS-pの最低含有率1%を複合化の条件とした。形態観察評価では混合直後に50nmサイズの粒状金ナノ粒子が確認され、4時間の経過により500nmのリボン状に形態が変化したことが確認された(図2)。粒状のナノ粒子が数個集まり、ネットワーク状に集合化することで内部の金粒子がペプチドを鋳型とし、リボン状へと形状変化したと考えられる。

細胞への導入評価では、細胞核をHoechst33342によって青色染色を行い共焦面を細胞の底面から上面まで変化させて集積位置の特定を行った(図3)。細胞に添加し、4時間のインキュベーション後には金ナノリボンは細胞の上面に多く集積していることが確認された。

3. まとめ

核移行シグナルペプチドとしてNLS-pを含有した金ナノリボンの合成に成功した。金ナノリボン表面にシグナルを付与できたことで細胞への集積も可能になった。細胞への金ナノリボンの送達、近赤外光照射による発熱効果の検証へと繋がる結果となった。

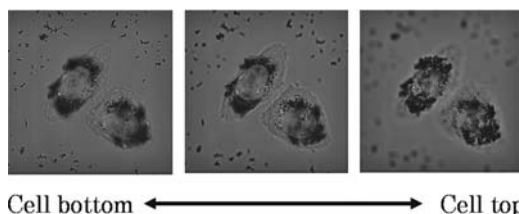


図3 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞送達評価。Hoechst33342により細胞核が青、黒い影が金ナノリボン。

4. 学会を通じて

今回は新型コロナウイルスによる制限が緩和され初めての対面でのポスター発表となった。今までオンライン発表が続き、相手の顔を見て話すことが出来ず意義のある議論かどうか疑問を抱くことがあった。しかし、対面発表ならではのコミュニケーションの取りやすさのお陰で、意見交換を今まで以上に行えたと感じた。本学会で得たことは、今後の研究活動において重要な経験となり、ますます実験に励むことが出来ると思う。

最後に、今回の発表を行うに当たりご指導いただいた富崎欣也教授、電子顕微鏡を用いた試料観察に助言を頂いた今井崇人先生、細胞実験に当たりご指導頂いた山崎正幸教授、そして対面での学会発表の機会を設けてくださいましたペプチド討論会の運営の方々にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Tomizaki, K.-Y. et. al., *Langmuir* 2014, 30, 846-856