

第 59 回ペプチド討論会 に参加して

藤 澤 梨 花

Rika FUJISAWA

物質化学専攻修士課程 2年

1. はじめに

私は 2022 年 10 月 26 日から 28 日にかけて、トークネットホール仙台にて開催された「第 59 回ペプチド討論会」に参加し、『Uptake cellular of peptide-DNA complexes into cancer cells』のテーマでポスター発表を行った。

2. 研究背景

近年、「薬物制御放出」, 「吸収」および「標的化」を最適化させ効果を改善し、副作用を減少させると期待されるドラッグデリバリーシステム (DDS) が注目を浴びており、特に、核酸医療の遺伝子の欠陥を修復、修正し、アポトーシスを誘発する遺伝子治療の研究が期待されている。しかし、核酸分子単体では細胞膜との電荷反発により、細胞内へ送達することが困難である。

本研究では、ペプチドの自己集合化能に着目し、非ウイルス性ベクターであるペプチド集合体を核酸キャリアとすることで、生体適合性の高いペプチドと二本鎖 DNA (dsDNA) の複合体の形成と核酸の細胞内送達の評価を行った。

3. 実験方法

核酸キャリアとして、ディスク型集合体を形成するペプチド (Cap-p) を用いた。また、Cap-p の N 末端に、細胞核移行性を有する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)、HIV-1 由来の TAT 配列を有する細胞膜透過性 TAT ペプチド (TAT-p) をそれぞれの連結したペプチドを設計し、固相合成法により合成した (図 1)。核酸の細胞内送達活性評価のた

めに、ペプチド濃度 5-100 μ M のキャリアペプチドに二本鎖 DNA (dsDNA) を 7nM を加え、25 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベートし、ペプチド/dsDNA 複合体を合成した。DLS 測定および Zeta 電位測定により、複合体形成を確認した。また、ペプチド/FITC-dsDNA 複合体をヒト子宮頸がん細胞である HeLa 細胞に添加し、Hoechst33342 で核を染色、共焦点レーザー走査顕微鏡によってペプチド/FITC-dsDNA の細胞内局在を評価し、異なる 3 つのシグナルペプチド-核酸複合体より、がん細胞内導入に適したペプチドキャリアの開発を行うことを目的とし、行った (図 2)。

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

図 1 キャリアペプチドのアミノ酸配列

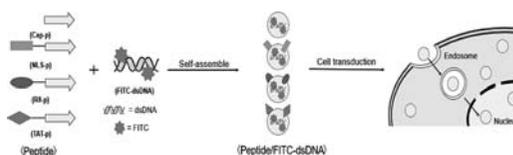
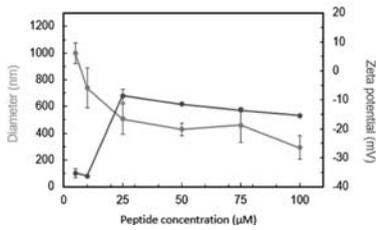


図 2 シグナルペプチドと FITC 修飾二本鎖 DNA (dsDNA) の複合体による細胞内送達

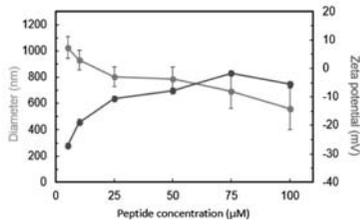
4. 結果, 考察

異なる 4 つのキャリアペプチドと dsDNA 複合体について Zeta 電位測定より、ペプチド濃度が 75 μ M の時、Cap-p の複合体では -31.6mV, NLS-p の複合体では -1.6mV, R8-p の複合体では +8.2mV, TAT-p の複合体では +5.8mV となり、異なる 3 つのシグナルペプチド NLS-p, R8-p, TAT-p の複合体の表面電荷は中性からやや正の値を示し、DLS 測定より 600nm 程度の径の粒子を形成していることがわかった (図 3)。

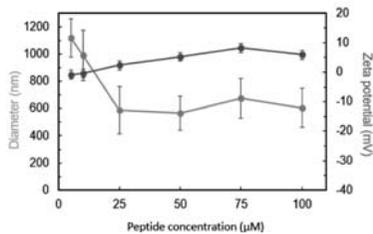
(a) Cap-p



(b) NLS-p



(c) R8-p



(d) TAT-p

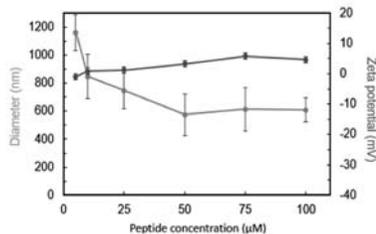
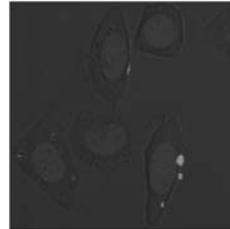


図3 ペプチド/dsDNA 複合体の Zeta 電位測定および DLS 測定

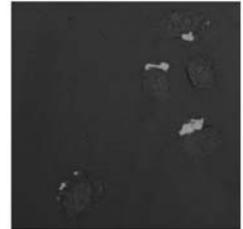
ペプチド濃度が75μMでFITC修飾されたdsDNA濃度7nMで調製したペプチド/FITC-dsDNA複合体をそれぞれHeLa細胞に添加すると、Cap-pの複合体ではわずかに細胞質に送達したが、ほとんどは細胞膜表面に分配された。一方、NLS-pの複合体では細胞質に、R8-pの複合体では細胞膜表面

に、TAT-pの複合体では細胞質および細胞膜表面の両方にFITC-dsDNA分子が送達された(図4)。しかし、R8-pおよびTAT-pの複合体は細胞膜を大きく乱しており、細胞毒性が高いのではないかと考えられる。

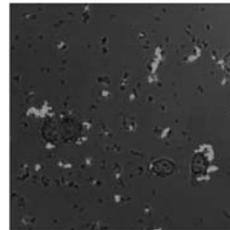
(a) Cap-p



(b) NLS-p



(c) R8-p



(d) TAT-p

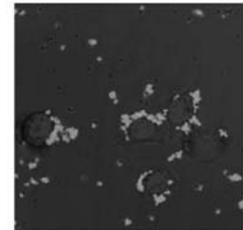


図4 共焦点レーザー顕微鏡によるHeLa細胞でのペプチド/FITC-dsDNA局在評価

5. まとめ

3つのシグナルペプチドのうちNLS-pが遺伝子導入において生体適合性に優れた核酸キャリアであると考えられる。今後の展望として、細胞毒性評価や細胞内取り込み評価、赤色蛍光タンパク質(mCherry)による発現を行い、ペプチドを用いた遺伝子治療への応用に取り組む。

6. おわりに

多くの方にポスターを見ていただき、その中で、新たなアイデアを頂き、反省すべき点も見つかった。今後の研究の糧となるように、深く受け止めた。最後に、研究指導いただいた富崎欣也教授、山崎正幸教授、研究室の皆様には厚くお礼申し上げます。