Synthesis of a peptide heterodimer labeled with different fluorescent dyes

田　中　かれん
Karen TANAKA
物質化学専攻修士課程　1 年

1. はじめに

2023 年 3 月 22 日から 25 日までの間，千葉県野田市にある東京理科大学　野田キャンパスで開催された日本化学会　第 103 春季年会に参加した．この学会で私は，「Synthesis of a peptide heterodimer labeled with different fluorescent dyes」というタイトルで発表を行った．

2. 実験内容

2.1 研究背景

近年，細胞小器官を標的としたドラックデリバリーシステムの研究が注目されている．しかし，薬剤がエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる際，エンドソームによる内包が細胞質送達への障壁となる．したがって，エンドソーム膜を乱すことで薬物のエンドソーム脱出が促進され，効率的な薬物送達が可能となる．

2.2 先行研究

先行研究では，エンドソームからの薬物の脱出を誘導するために，薬物キャリアペプチド（Cap-p）の N 末端に pH 応答性膜融合ペプチド（GALA peptide）および核移行シグナルペプチド（NLS）を修飾した 2 つのペプチドをヘテロ二量化し，ジスルフィド結合を介したペプチドヘテロダイマー（GALA-NLS）を合成した．

2.3 本研究

本研究では，GALA-NLS を二種類の蛍光色素で標識したペプチド（HC-GALA-NLS-FAM）を合成し（図 1），細胞内を模倣した還元環境下においてジスルフィド結合が解離することを，FRET を利用して評価した．

3. 実験操作

まず，固相合成法を用いて HC-GALA-NLS-FAM を合成した．（図 1）

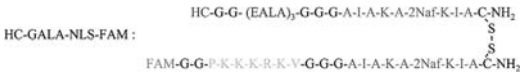

図 1　ペプチドの配列

次いで，集合化させたペプチド 10μM にジチオトレイトール（DTT）10mM を添加し，還元処理を行った．DTT 添加前後の HPLC および MALDI-TOF-MS の分析結果を図 2 および図 3 に示す．DTT 還元処理により HPLC での HC-GALA-NLS-FAM のピークが消失し，新たなピークが得られ，MALDI-TOF-MS によってジスルフィド結合解離後の分子量が得られた．以上のことから，DTT 還元処理によりジスルフィド結合が十分に解離していることが確認された．

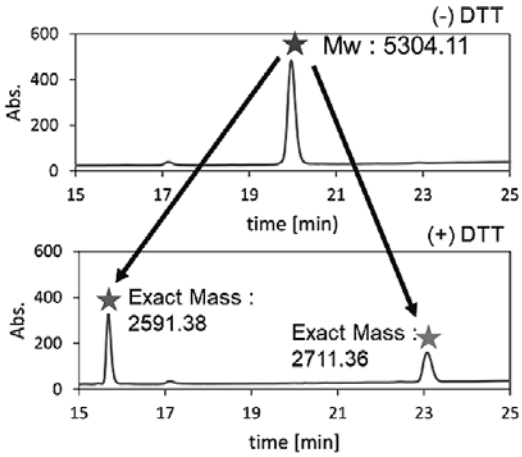

図 2　HPLC による DTT 添加前後の解離評価

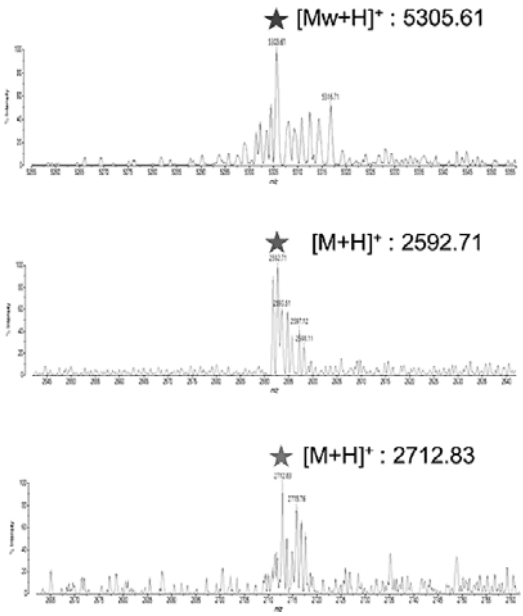

図 3　MALDI-TOF-MS による質量分析

また，DTT 添加前後のペプチドの蛍光スペクトル測定の結果を図 4 に示す．DTT 添加前の蛍光スペクトルでは，凝集によるものと考えられる消光が起きたため，正規化した蛍光スペクトルを図 5 に示す．DTT 添加後では DTT 添加前と比較して，FAM に由来するピーク（535nm）が減少し，HC に由来するピーク（453nm）が増加した．このことから，DTT 添加前では FRET により HC が消光し，DTT 添加後ではジスルフィド結合の解離により FRET が解消され HC の発光が増強したのだと考えられる．

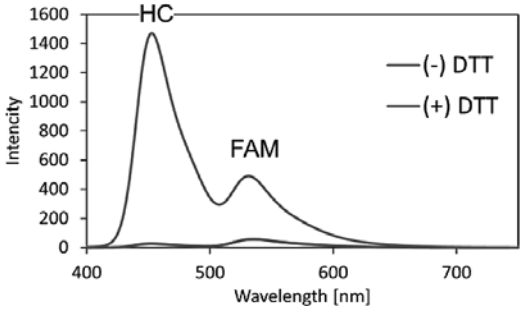

図 4　HC-GALA-NLS-FAM の蛍光スペクトル（λ_{ex}: 365nm）

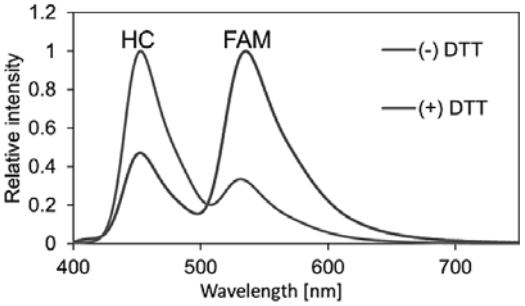

図 5　正規化した HC-GALA-NLS-FAM の蛍光スペクトル（λ_{ex}: 365nm）

4. おわりに

今回の学会発表は初めての発表であり，戸惑う場面が多々存在したが，対面開催ならではの学会の楽しみを感じることができた．同じ分野を研究している先生方や学生の方と意見交換を行うにとどまらず，日々の実験の課題や悩みを共有する経験はやはり対面開催の学会に参加することで得られた貴重な経験であると感じた．

最後に今回の発表を行うにあたりまして，丁寧な指導を頂きました富﨑欣也教授にこの場をお借りして厚く御礼申し上げます．