

## 第 17 回バイオ関連化学 シンポジウムに参加して

藤 澤 梨 花

Rika FUJISAWA

物質化学専攻修士課程 2023 年度修了

### 1. はじめに

私は 2023 年 9 月 8 日から 10 日にかけて、東京理科大学野田キャンパス薬学部にて開催された「第 17 回バイオ関連化学シンポジウム」に参加し、『ペプチド-DNA 複合体の合成と細胞内送達評価』のテーマでポスター発表を行った。

### 2. 研究背景

「薬物制御放出」, 「吸収」および「標的化」を最適化し, 効果を改善し, 副作用を減少させるドラッグデリバリーシステム (DDS) が近年, 注目を浴びており, 特に, 正常な DNA や RNA を用いた核酸医薬品が細胞核へ導入し, 遺伝子の欠陥を修復, 修正し, 遺伝子欠陥のみを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, 細胞内送達が困難である。

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, 生体適合性の向上を試み, 二本鎖 DNA (dsDNA) を核酸モデルとし, ペプチドナノキャリアとの複合体および, 核酸の細胞内送達評価を行った。

### 3. 実験方法

ディスク型集合体を形成するペプチド (Cap-p) を核酸キャリアとして用いた。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)。ペプチドと核酸の複合体評価として, ペプチド濃度 5-100 $\mu$ 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 の細胞内局在評価, CCK-8 アッセイによる細胞毒性評価, フローサイトメトリーによる細胞内取り込み評価によって, 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。

Cap-p: Ac-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH<sub>2</sub>  
NLS-p: Ac-P-K-K-K-R-K-V-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH<sub>2</sub>  
R8-p: NH<sub>2</sub>-R-R-R-R-R-R-R-R-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH<sub>2</sub>  
TAT-p: Ac-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R-P-P-Q-G-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH<sub>2</sub>

図 1 キャリアペプチドのアミノ酸配列

### 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 25-75  $\mu$ M における異なる 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 2)。

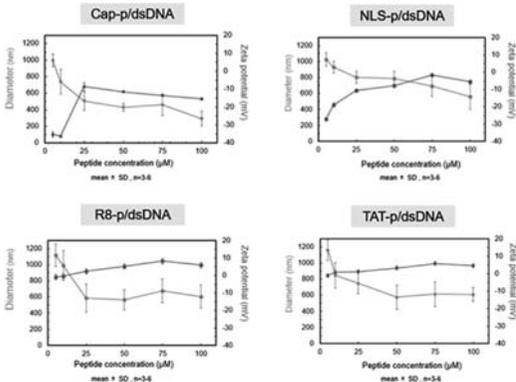


図2 ペプチド/dsDNA 複合体の Zeta 電位測定および DLS 測定

ペプチド濃度が50μM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。R8-pおよびTAT-pの複合体は細胞膜を大きく乱しており、多くの死細胞が見られた(図3)。

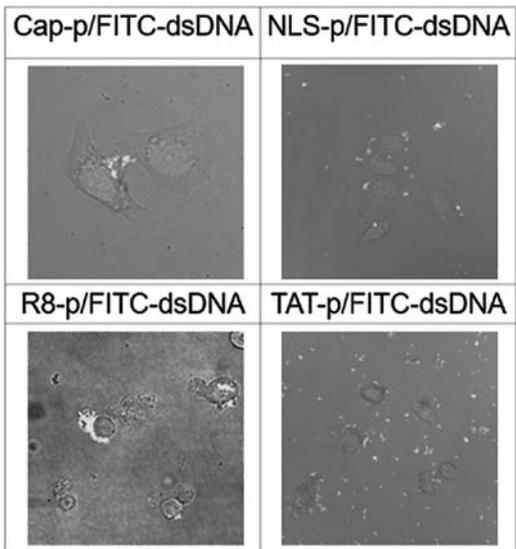


図3 共焦点レーザー顕微鏡によるHeLa細胞でのペプチド/FITC-dsDNA局在評価

細胞毒性評価から、Cap-pおよびNLS-pの複合体は細胞生存率が高く、R8-pの複合体は細胞毒性が高く、TAT-pの複合体では濃度上昇につれて、細胞毒性が高くなった。細胞取り込み評価の結果から、NLS-pの複合体の取り込みが最も高いことがわかった(図4)。

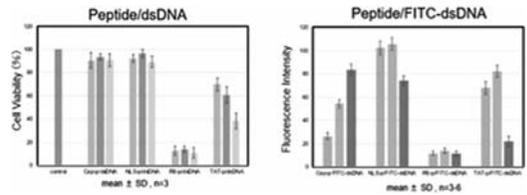


図4 ペプチド/dsDNA 複合体の細胞毒性評価および細胞内取り込み評価

## 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いた。今後の研究に活かせる。

最後に、研究指導いただいた富崎欣也教授、山崎正幸教授、研究室の皆様に厚くお礼申し上げます。