

## ペプチド-DNA 複合体の合成と細胞内送達評価

○藤澤梨花<sup>1</sup>・富崎欣也<sup>1</sup>・山崎正幸<sup>2</sup> ( <sup>1</sup>龍谷大先端理工、<sup>2</sup>龍谷大農)

**Synthesis and cellular delivery of peptide-DNA complexes evaluation** (Department of Materials Chemistry, Ryukoku University<sup>1</sup>, Department of Food Science and Human Nutrition, Ryukoku University<sup>2</sup>) FUJISAWA, Rika<sup>1</sup>; YAMASAKI, Masayuki<sup>2</sup>; TOMIZAKI, Kin-ya<sup>1</sup>

近年、正常な核酸医薬を細胞核へ導入し、遺伝子の欠陥を修復し、がん細胞や遺伝子欠陥細胞のみを標的とし、アポトーシスする遺伝子治療の研究が期待されているが、核酸分子は細胞膜と電荷反発により核酸分子単体では細胞内への送達が困難である。本研究では、非ウイルス性ベクターであるペプチド集合体を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を核酸医薬モデルとし、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。

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

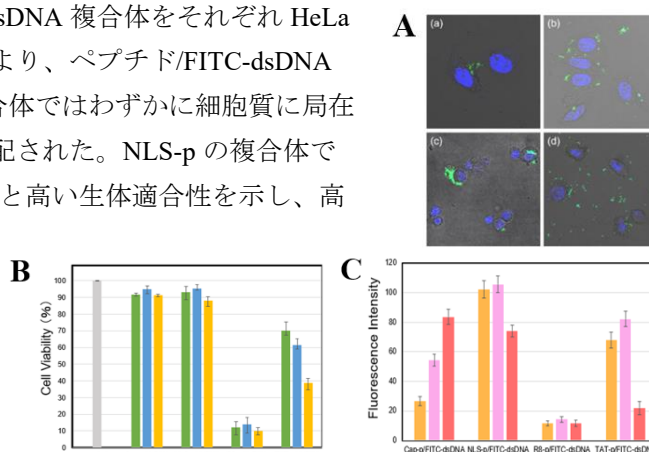
(Fig. 1)。また、細胞核移行性を有する核移行

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 Cap-p の N 末端に連結したペプチドを設計し、固相合成法により合成した (Fig. 1)。核酸の細胞内送達活性評価のため、ペプチド濃度 5-100  $\mu\text{M}$  のキャリアペプチドに二本鎖 DNA (dsDNA) 7 nM を加え、25°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、複合体形成を確認したところ、Zeta 電位測定により、ペプチド濃度が 25-75  $\mu\text{M}$  の時、Cap-p の複合体では -30 mV 付近、NLS-p、R8-p、TAT-p のそれぞれ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 600 nm 程度の径の粒子を形成していた。また、TEM 観察により、ペプチド/dsDNA 複合体はネットワーク状の集合体を形成していた。次に、ペプチド/dsDNA 複合体による細胞内導入評価を行った。ペプチド濃度が 25-75  $\mu\text{M}$  で、FITC 修飾された

dsDNA 濃度 7 nM で調製したペプチド/FITC-dsDNA 複合体をそれぞれ HeLa 細胞に添加し、共焦点レーザー走査顕微鏡により、ペプチド/FITC-dsDNA の細胞内局在を評価したところ、Cap-p の複合体ではわずかに細胞質に局在しているが、ほとんどは細胞膜内側表面に分配された。NLS-p の複合体では細胞質内に多く局在し、細胞生存率は 90 % と高い生体適合性を示し、高い細胞内取り込みを確認した。R8-p の複合体では細胞膜外側表面に凝集し、細胞毒性が非常に高かった。TAT-p の複合体でも細胞膜外側表面に多く吸着していたが、R8-p の複合体に比べて細胞毒性は低く、ペプチド濃度 25  $\mu\text{M}$  および 50  $\mu\text{M}$  の複合体では高い細胞内取り込みが確認された (Fig. 2)。以上より、3 つのシグナルペプチドの中で 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。

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-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-G-A-I-A-K-A-2Naf-K-I-A-NH<sub>2</sub>

**Fig. 1.** Amino acid sequence of carrier peptide



**Fig. 2.** Incubation 4 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, (A) Evaluation of peptide/FITC-dsDNA localization by confocal laser microscopy, peptide concentration = 50  $\mu\text{M}$ , dsDNA = 7 nM, Green: FITC-DNA, Blue: cell nucleus, (a) Cap/FITC-DNA, (b) NLS/FITC-DNA, (c) R8/FITC-DNA, (d) TAT/FITC-DNA. (B) Cytotoxicity Assessment, Peptide concentration = green: 25  $\mu\text{M}$ , blue: 50  $\mu\text{M}$ , yellow: 75  $\mu\text{M}$ ., dsDNA = 7 nM. (C) Cellular uptake evaluation, Peptide concentration = orange: 25  $\mu\text{M}$ , pink: 50  $\mu\text{M}$ , red: 75  $\mu\text{M}$ ., dsDNA = 7 nM.