

利用成果報告書

- 1 課題番号 H30-003
- 2 報告者 山崎裕一 東京大学大学院工学系研究科
- 3 利用区分 成果公開有償利用
- 4 利用課題名 PEG化ペプチド遺伝子ベクターの開発
- 5 使用装置名 microTOF (Bruker ESI-TOF MS)
- 6 利用期間 平成 30 年 5月 11日 ~ 平成 31年 3月 31日
- 7 利用成果・実績の概要 別紙にて提出
- 8 社会・経済への波及効果
- 9 学会等における口頭・ポスター発表 該当無し
- 10 学会誌・雑誌等における論文掲載 該当無し

PEG 化ペプチド遺伝子ベクターの開発 (システイン導入 PEG 化オリゴリシンによる配列依存的遺伝子発現) 東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻・准教授 山崎 裕一

1. 緒言

遺伝子治療の要素技術として注目される遺伝子デリバリーでは、治療用遺伝子を搭載するプラスミド DNA (pDNA) とポリカチオンとの複合体を人工遺伝子ベクターとする。ポリカチオンには、塩基性アミノ酸であるリシンの重合体を基盤に異種アミノ酸の導入や側鎖構造の変換などにより、高機能化を図る試みが多い。重合体の調製には保護リシン NCA の開環重合とペプチド固相合成が代表的であり、NCA 重合では重合度分布のある試料が得られ、側鎖構造の変換も平均値で規定されるが、固相合成ではアミノ酸配列は一義的に規定される。

著者はポリカチオンによる遺伝子ベクター開発でのポリカチオンの構造機能相関を重視し、15 残基と 20 残基からなる PEG 化オリゴリシンにシステイン 2 残基を導入し、システインの導入位置と遺伝子発現能との関連を評価したところ、Fig.1 に示される配列依存的遺伝子発現を確認した。

2. 実験方法

2.1 PEG 化ペプチドの合成

ペプチドは Fmoc 法に基づく固相合成でダブルカップリング法により得た後、ESI-MS で m/z 値を確認した。合成用樹脂には、側鎖の保護基が結合した状態でペプチドを樹脂から切断できる 2-クロロトリチル樹脂を用いた。保護ペプチドを PEG 化した後、ペプチド側鎖を脱保護し、過剰なペプチドは水系分取 GPC で除いた。¹H-NMR にて PEG α 末端の MeO 基に対してペプチドの各ピークの積分比を確認した。

2.2 PEG 化ペプチド/pDNA 複合体の調製

複合体は 10 mM のジチオスレイトール(DTT)を含む 10 mM Tris-HCl または 10 mM HEPES (共に pH7.4, 150 mM NaCl) 中で PEG 化ペプチドと pDNA を混和させ、透析により DTT を除去することにより調製した。ジスルフィド架橋の形成は Ellman 法で確認した。

2.3 PEG 化ペプチド/pDNA 複合体の特性解析

複合体の形成はエチジウムブロマイド(EtBr)による色素排除試験、ゼータ電位測定、TEM による形態観察、アガロースゲル電気泳動により確認した。

2.4 PEG 化ペプチド/pDNA 複合体の遺伝子発現能の評価

naked pDNA で最適化されているウサギ網状赤血球抽出液を用いる無細胞蛋白質発現評価系(Promega)にて pT7-Luc2 pDNA の発現を評価すると共に、HeLa 細胞にて pCAG-Luc pDNA の発現を評価した。

3. 実験結果および考察

3.1 PEG 化ペプチド/pDNA 複合体の特性解析

EtBr 色素排除試験とゼータ電位測定からカチオンとリン酸基の電荷比(N/P 比)2.0 にて、電荷中和された複合体の形成を確認した。TEM 観察にて複合体はロッド状に折り畳まれた単一 pDNA 複合体と示唆され、ロッド長分布はシステイン残基の導入位置により変調した。DTT を含まない試料の電気泳動から複合体の安定性がシステイン導入位置により変調することが示唆された。DTT を含む試料の電気泳動にて複合体からの還元環境応答的 pDNA 放出を確認した。

3.2 PEG 化ペプチド/pDNA 複合体の遺伝子発現能の評価

無細胞系で得られた結果を Fig. 1 に示す。15 残基(左)と 20 残基(右)からなる PEG 化ペプチドによる遺伝子発現は共に、PEG との連結部とペプチド鎖中央部にシステインを含む PEG-CK₆CK₇, PEG-CK₉CK₉ で、システインを導入していない PEG-K₁₅, PEG-K₂₀ に匹敵する高い遺伝子発現能を示した。他の配列の PEG 化ペプチドでは遺伝子発現能はいずれも低く、顕著な配列依存性が確認された。HeLa 細胞による評価では、15 残基からなる PEG 化ペプチドでは有意な発現は得られず、PEG-CK₁₈C のみが PEG-K₂₀ の 30 倍もの高い発現を誘導した。PEG-CK₁₈C が最も小さな pDNA 複合体を生起したことが TEM 観察より確認された為、無細胞系の結果との違いは主に細胞内取り込み効率に起因すると考えられる。

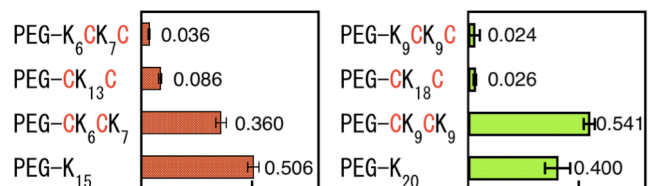


Fig.1 Sequence-dependent gene expression of PEG-peptide pDNA complexes in cell-free system (relative to naked pDNA).