

非天然アミノ酸を含むヘテロ二量体化ロイシンジッパーを用いた機能性ペプチドの細胞内運搬

(近畿大学) ○中村 高大・井上 健・藤本 翔夢・北松 瑞生・宮澤 正顕・博多 義之
Intracellular delivery of functional peptides using heterodimeric leucine zippers containing unnatural amino acids (*Kindai University*) ○Takahiro Nakamura, Ken Inoue, Shomu Fujimoto, Mizuki Kitamatsu, Masaaki Miyazawa, Yoshiyuki Hakata

We have developed a method for delivering functional peptides into cells via a heterodimeric leucine zipper (E3 and K3). The peptides form a 1:1 hybrid that allows the functional peptide to be linked to the cell-penetrating peptide. In this work, we developed new zippering peptides (NapE3 and NapK3) consisting of unnatural amino acids, naphthyl alanine (Nap). The NapE3 and NapK3 were synthesized by Fmoc-based solid-phase peptide method. These NapE3 and NapK3 were modified with the fluorescent dyes Fam and Tmr, respectively. We measured fluorescence titration curves of NapK3 (modified with Fam) under constant concentration of NapE3 (Fig. 1). As the result, the fluorescence of Fam gradually decreased with the addition of NapK3. Furthermore, when NapK3 exceeded the equivalent, the fluorescence changed more gradual. In addition, when the same assess was performed for E3/K3 mixture as a control, the change of fluorescence intensity was moderately reduced compared with NapE3/NapK3 mixture. This result suggests that NapE3/NapK3 forms a more stable 1: 1 hybrid than E3/K3.
Keyword : Peptide, Leucine zipper, Intracellular delivery, Naphthyl alanine

我々はこれまでに機能性ペプチドの細胞内導入法としてヘテロ二量体化ロイシンジッパー (E3 : (EIAALEK)₃ および K3 : (KIAALKE)₃) を介した導入法を開発してきた。これらのペプチドは 1:1 のハイブリッドを形成し、これにより機能性ペプチドと細胞内運搬ペプチド (CPP) を連結することができる。今回の研究の中で、我々は E3 と K3 のハイブリッドの安定性をさらに制御する目的で、それらの分子内に非天然アミノ酸であるナフチルアラニン (Nap) を導入した新たなペプチドジッパー (NapE3 および NapK3) を開発した。

NapE3 および NapK3 は、ペプチド固相法により合成した。これらのペプチドにはそれぞれ蛍光基 Fam および Tmr を修飾した。次に、NapE3 の濃度を一定にして、徐々に NapK3 を加え、Fam の蛍光強度を測定した。そのプロットを Fig. 1 に示す。その結果、Fam の蛍光は NapK3 の添加により徐々に減少した。さらに NapK3 が当量を超えると、その減少は緩やかになった。また比較として E3 および K3 でも同様の評価を行ったところ、その蛍光強度は NapE3/NapK3 の場合で顕著に減少することがわかった。これは、NapE3/NapK3 が E3/K3 よりも安定な 1:1 ハイブリッドを形成することを示唆している。

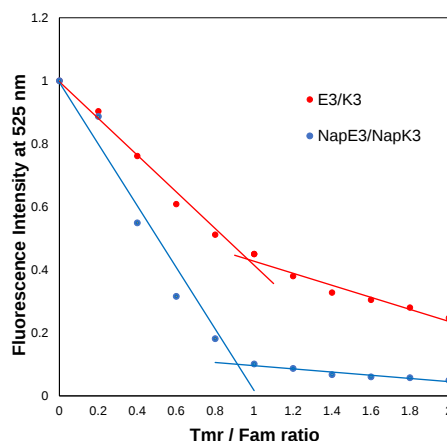


Fig. 1. E3/K3 および NapE3/NapK3 の蛍光滴定曲線 (Fam : 100 nM)。