

論文

新規合成ペプチドによるsiRNAの無毒性細胞導入と遺伝子サイレンシング Non-Toxic Transfection of siRNA by Novel Synthetic Peptides and Gene Silencing

新貝 恭広¹⁾

Yasuhiro Shinkai

柏原 慎一²⁾

Shinichi Kashihara

藤井 政幸³⁾

Masayuki Fujii

Abstract:

In the present study, we investigated the intracellular delivery of siRNA using synthetic peptides as transfection reagents and the silencing effect of siRNA targeting hTERT mRNA in 3 human cancer cell lines, Jurkat, HeLa and K562. The complex of siRNA and a specific amphiphilic peptide could be effectively taken up into cells. The complex also showed a high silencing effect against hTERT mRNA. Moreover, the combination of siRNA-NES conjugates and the amphiphilic peptides improved silencing effects up to 95.2 %. The amphiphilic peptides and their hybrids showed almost no cyto-toxicity and protected siRNA against intracellular nuclease digestion in 10% FBS (half life time was over 48h).

キーワード :**Key words :** siRNA, transfection, synthetic peptide, gene silencing**イントロダクション**

DNA結合モチーフとしてヘリックスターンヘリックス、ロイシンジッパー、ジンクフィンガーなどが知られている。我々のグループは二重鎖DNA、三重鎖DNAを安定化するペプチドを探索する中で、逆平行 β シート構造が二重鎖DNAおよび二重鎖RNAのらせん構造と相補性が高く、グループに沿って巻きつくように結合することを知らに至った。^{1,2)} Kraut等の計算結果によれば、核酸塩基対の間隔は逆平行 β シート構造のアミノ酸2残基分にはほぼ等しく、核酸塩基またはリン酸骨格とアミノ酸残基が連続して広い領域

にわたってコンタクトできる構造であることが示されている。そして、我々は(KL)_nまたは(RL)_n配列を有するペプチドが二重鎖DNA存在下に、逆平行 β シート構造をとることを見出した。本研究では、核酸医薬として期待されるsiRNAの細胞導入に応用できるかに興味を持ち、検討することとした。

結果と考察

検討の結果、アルギニン(R)とロイシン(L)の繰り返し配列を持つペプチドが二重鎖DNAおよびRNAと静電相互作用により複合体を形成するとき、ペプチドは逆平行 β

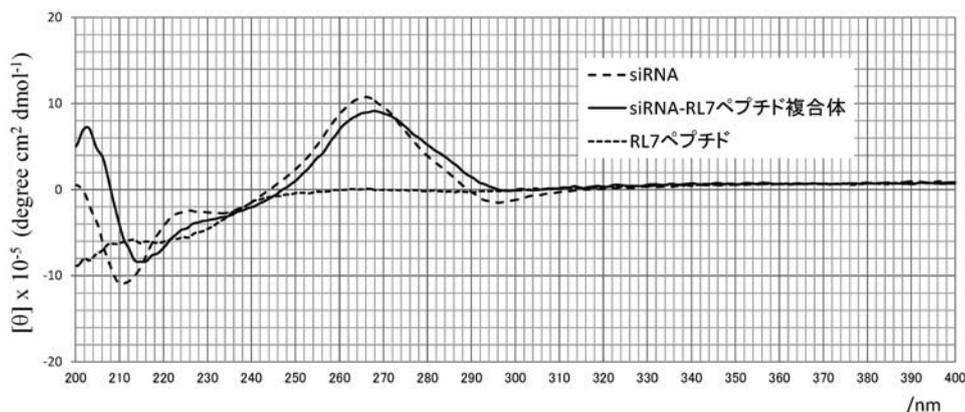


図1. CD Spectra of RL7-siRNA Complex

1)、2) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科

3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授 fuji@fuk.kindai.ac.jp

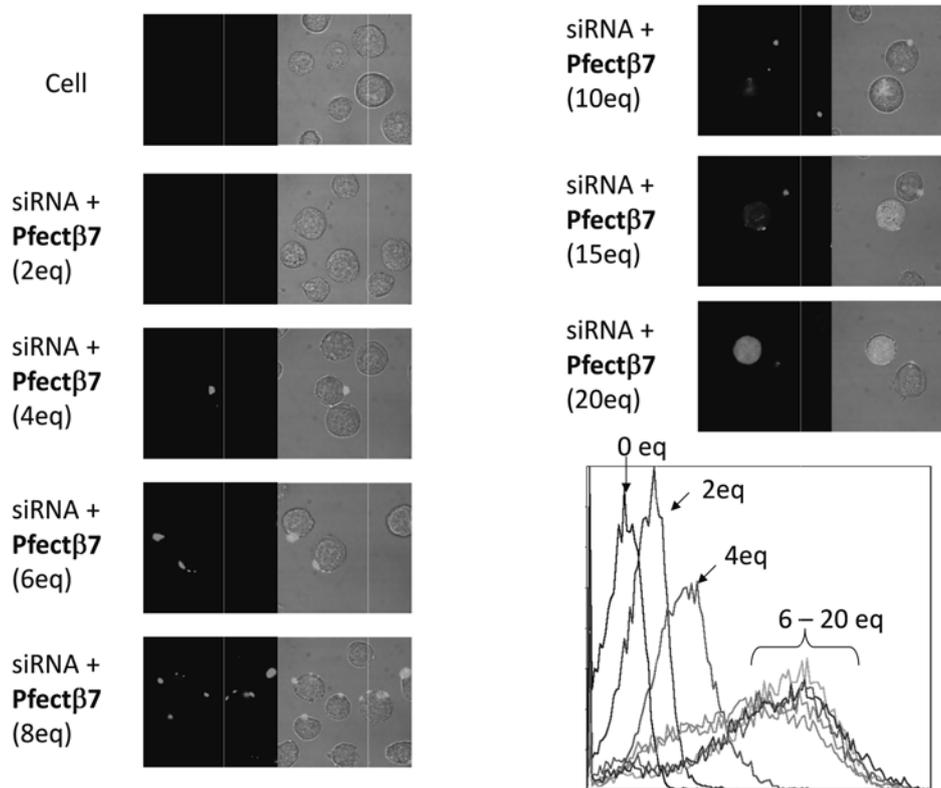


図2. Cellular Uptake of siRNA-RL7 Complex (Jurkat, 4h)

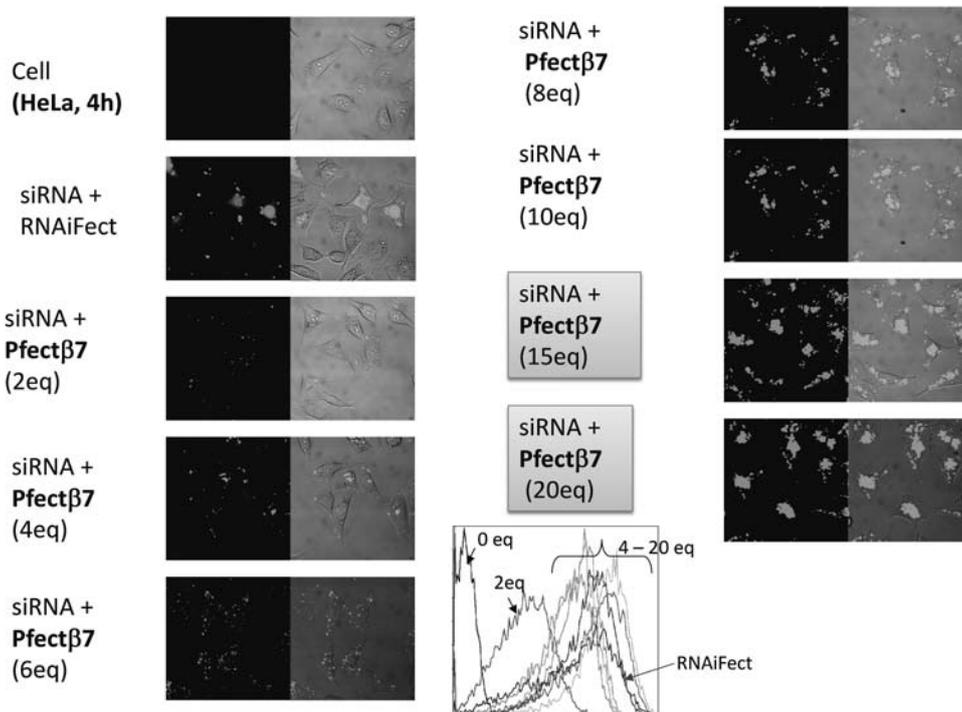


図3. Cellular Uptake of siRNA-RL7 Complex

シート構造を取り、アルギニン側鎖はRNAのリン酸と静電相互作用により引き合い、ロイシン側鎖は複合体の外側の面に並ぶため、複合体は疎水性表面を形成することを見出し

た。siRNA存在下にペプチドRL7が逆平行βシート構造をとることを示す円二色性スペクトルを図1に示した。³⁾ siRNA単独のCDスペクトルを破線で、**RL7**単独のスペクトルは点

表1. siRNA-RLnの10%FBS中半減期

Sample	Half-life $t_{1/2}$ (h)
siRNA	2.5 h
siRNA + RNAiFect	1 h
siRNA + RL5	1.8 h
siRNA + RL6	1 h
siRNA + RL7	>>48 h
siRNA + RL8	32 h
siRNA + RL9	9.5 h
siRNA + RL10	7 h

線で示すが、実線で示した両者の混合溶液のスペクトルでははっきりと215nm付近に強い負の極大が見られるようになり、逆平行βシート構造を取っていることが示された。

siRNA-RL7の細胞導入効率

その複合体をJurkat細胞およびHeLa細胞の培養液に添加したところ、その複合体は細胞膜透過性を有し、siRNAに対してRL7を20当量を用いると、市販導入試薬と同等のトランスフェクション効率を有することが分かった。

図2の写真はJurkat細胞に対して4時間後の導入を共焦点レーザー顕微鏡で観察したものである。

同様に、図3ではHeLa細胞に対して4時間後の導入を共

焦点レーザー顕微鏡で観察したものである。HeLa細胞へも効率よくトランスフェクションされ、15当量から20当量のペプチドRL7を使用することにより、導入効率が向上していることが分かった。

siRNA-RL7複合体のヌクレアーゼ耐性

また、この複合体は10% FBS中での酵素分解からsiRNAを保護し、半減期を48時間以上に伸ばすことも確認された。siRNA のみの場合やRNAiFect存在下でもsiRNAは数時間以内に分解されてしまったが、RL7,RL8,RL9,RL10とsiRNAとの複合体ではヌクレアーゼによる分解が阻害され、RL7の場合には半減期が48時間以上に伸びた。(表1)

siRNA-RL7複合体の細胞毒性

さらに、RL7-siRNA複合体は細胞毒性がほとんどなく、市販導入試薬に比べてかなり高濃度でも毒性を示さないことが証明された。

図4の縦の点線は、それぞれの使用濃度を示すが、市販導入試薬では使用範囲内で濃度依存的に毒性を示したのに対して、ペプチド(RL)nはかなりの高濃度でもほとんど毒性を示さなかった。

siRNA-RL7複合体によるhTERT遺伝子サイレンシング

RL7-siRNA複合体を用いてhTERT遺伝子のサイレンシング効果を評価した。(図5) siRNA濃度を200nMをRNAiFect

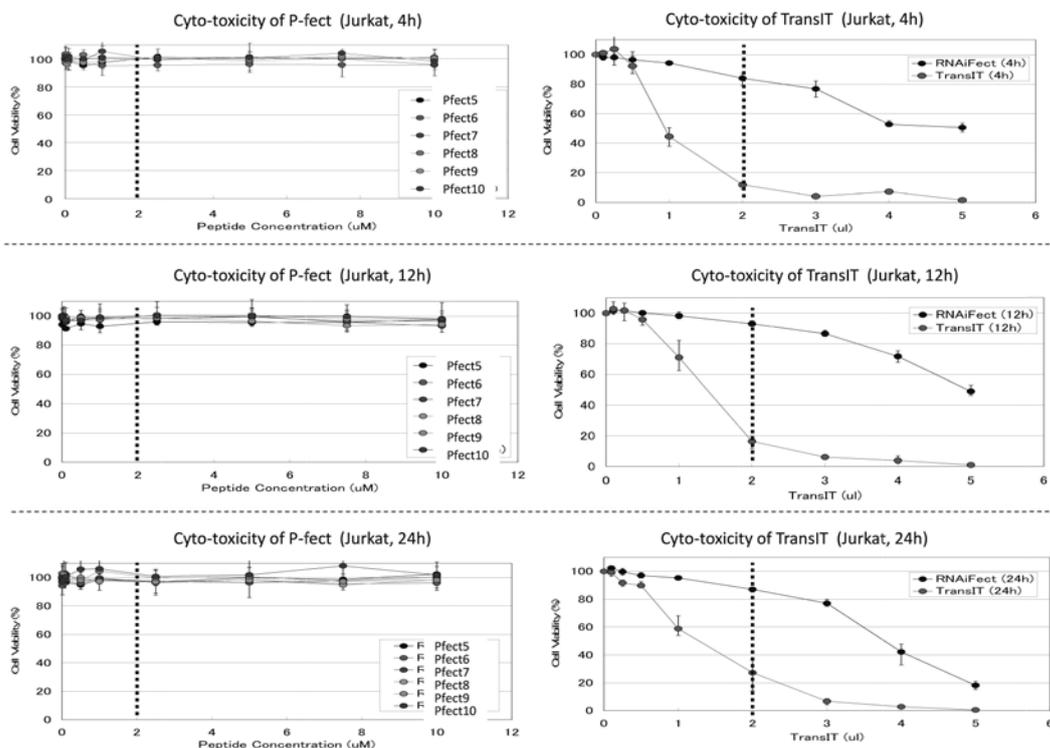


図4. Cyto-toxicity siRNA-RL7 Complex (Jurkat)

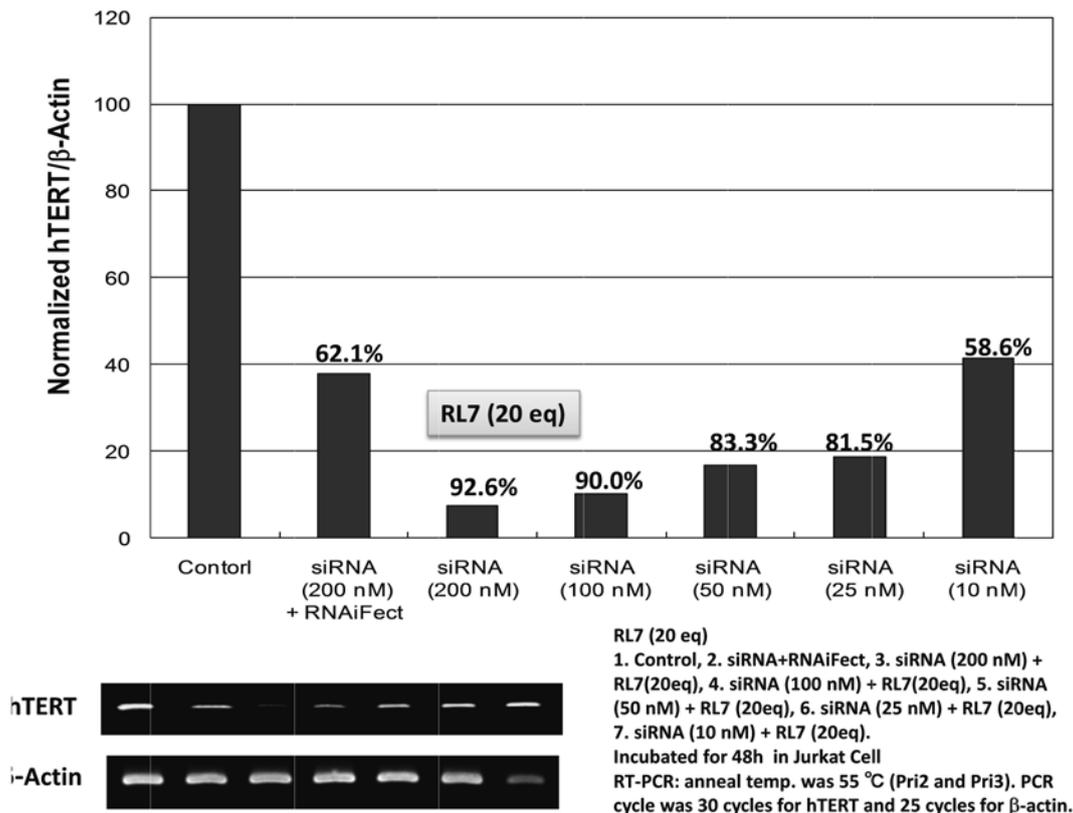


図5. Silencing of hTERT by siRNA/RL7 Complex in Jurkat

を用いて導入した場合には62.1%のサイレンシングであったが、RL7を20当量用いて導入した場合には92.6%のサイレンシング効果を示した。

結論

以上のとおり、デザインペプチドRL7により siRNAを毒性なく細胞内に導入することができた。今後、生物学的分子基盤に立脚した化学修飾、多機能コンジュゲート、複合体を組み合わせを探求して、siRNAを核酸医薬として応用するためのベストミックスを見出すことを目指したい。

参考文献

1. CHARLES W. CARTER, JR. AND JOSEPH KRAUT (1974) A Proposed Model for Interaction of Polypeptides with RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **71**(2) 283-287.
2. GEORGE M. CHURCH, JOEL L. SUSSMAN, AND SUNG-HOU KIM (1977) Secondary structural complementarity between DNA and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**(4) 1458-1462.
3. MASAYUKI FUJII, SHUTARO FUJIAKI, and JUNICHI OBATA (2012) Non-toxic Cellular Uptake of siRNA by Small Peptides. *Peptide Science*, **2012**, 233-234.