

論文の内容の要旨

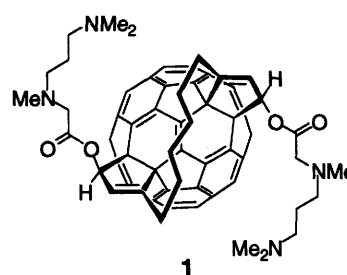
Studies on DNA-binding fullerenes for gene delivery

(DNA 結合性フラーレンを用いた遺伝子導入法に関する研究)

富田 直輝

細胞に対する外来遺伝子の導入（トランスフェクション）は、近年の分子生物学における重要な技術である。トランスフェクション技術の鍵となるのは遺伝子を運ぶ優れたベクターの開発である。これまで、正電荷脂質とよばれるカチオン性の残基を持つ脂質がベクターとして種々開発されてきたが、遺伝子導入効率や適用範囲の点で多くの問題が残されている。高い効率で広範に適用可能なトランスフェクション技術の開発に向け、新たな構造と物性を有するベクターの開発が必要である。

筆者の所属する研究室では最近、ジアミン側鎖を有するフラーレン **1** が DNA と結合し、DNA・フラーレン複合体を形成することが見いだされた。そこで筆者は、フラーレン **1** を初めとした種々の DNA 結合性フラーレンの、ベクターとしての機能を検証した。その結果、DNA 結合性フラーレン **1** が特に高い効率でトランスフェクション活性を示すことを見いだした。



初めに DNA 結合性フラーレン **1** を用いたトランスフェクションの条件の最適化を行った (Fig. 1). 緑色蛍光タンパク (GFP)の遺伝子を持つプラスミド DNA とフラーレン **1** を混合し、DNA・フラーレン複合体を調製した。COS-1 細胞（猿の腎細胞）に対しその複合体を添加し、無血清培地中で培養した。数時間後血清を含む培地に交換し、数日培養す

ると蛍光を持つ細胞が観察された。蛍光を持つ細胞の数を全細胞数で割ることでトランスフェクション効率とした。試薬と DNA 塩基対のモル比 (R 値), DNA 量, 二段階の培養時間 (トランスフェクション時間, インキュベーション時間) に関し条件の最適化を行った結果, 最高 14%の効率でトランスフェクションに成功した。トランスフェクション効率は R 値に特に大きく影響され, R = 10 というベクター過剰な条件が最適であった。これは DNA・フラレン複合体が正電荷を帯びていることが重要であることを示しており, 従来の正電荷脂質と同様, 細胞膜との親和性に影響していると思われる。DNA 量とトランスフェクション時間は, 細胞への傷害とのバランスによりそれぞれ 4 μ g, 6 時間が最適であった。インキュベーション時間の検討では, 5 日間のインキュベーション時間の後に発現が最大となった。従来の正電荷脂質によるトランスフェクションにおいては通常 2 日後に最高の発現が見られることが知られている。この違いは, フラレン 1 では複合体から DNA が数日かけて徐々に放出されていることによると思われる, 従来の正電荷脂質ベクターとは異なるフラレンの性質であると考えている。

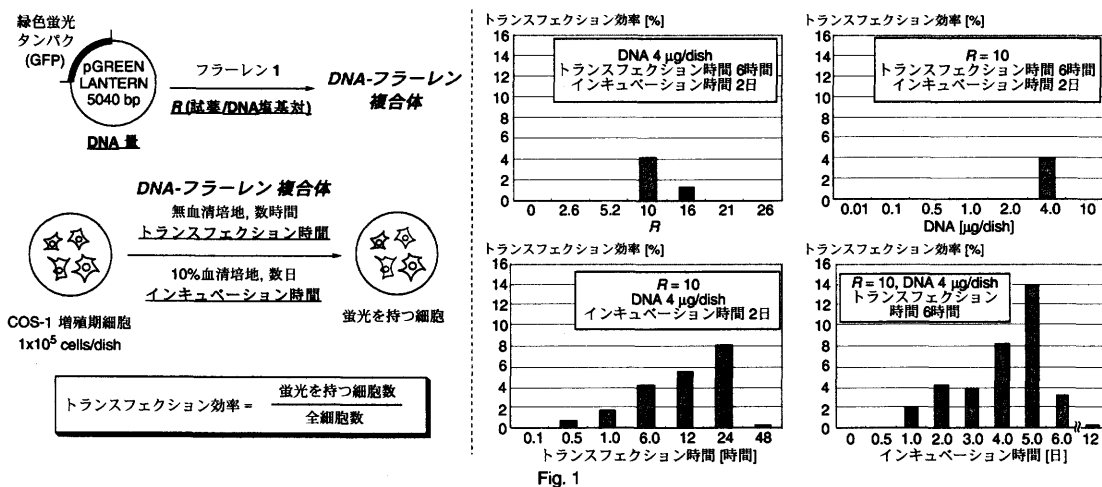


Fig. 1

従来の正電荷脂質を用いたトランスフェクションでは, 血清の存在下でのトランスフェクションが困難であることが知られており, 血清の障害を受けにくいベクターの開発が望まれている。そこで, フラレン 1 を用いた血清の存在下でのトランスフェクションの検討を行った (Fig. 2)。トランスフェクション時間における血清の濃度を種々変えて検討を行った結果, フラレン 1 をベクターとして用いた場合, 血清の存在により若干の効率低下が認められるものの, 30%の血清存在下でもトランスフェクション可能であることが分かった。それに対し, 正電荷脂質であるリポフェクチン 2 を用いた系では 10%の血清の存在によりトランスフェクションが著しく障害された。このことから, フラレン 1 は脂質に比べ血清の障害を受けにくいベクターであることがわかった。

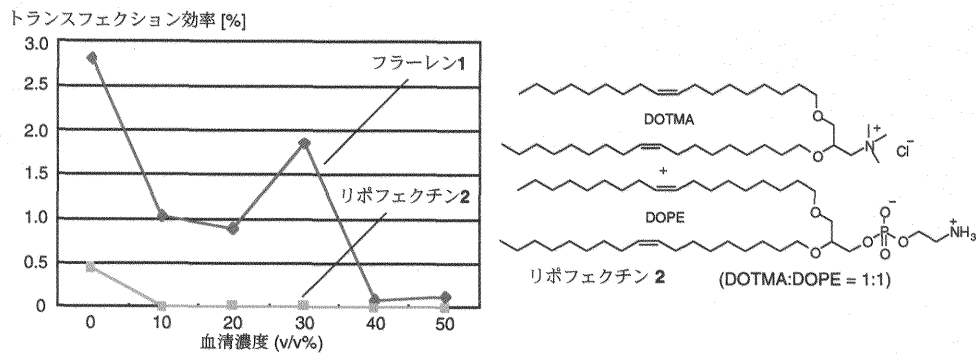


Fig. 2

フラレーン 1 をベクターとして用いたトランスフェクションが血清の障害を受けにくいということ、また導入遺伝子の発現が 5 日経っても持続するということから、フラレーン 1 の結合により DNA が外部から保護されていることが示唆される。そこで、フラレーン 1 の DNA 保護効果について検証した (Fig. 3)。プラスミド DNA に対しフラレーン 1 を加え複合体を調製した後、制限酵素 *Pst* I を作用させた。電気泳動により分析した結果、試薬を何も加えなかった DNA は完全に切断されたのに対し、フラレーン 1 を加えた DNA は全く切断されなかった。参照物質としてリポフェクチン 2 を加えた系では、その保護効果は弱く大部分の DNA が切断された。このことから、DNA 結合性フラレーンは高い DNA の保護効果をもつことがわかった。

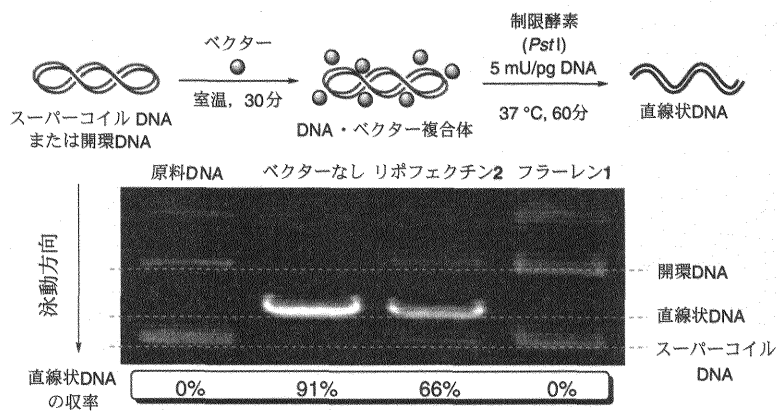


Fig. 3

フラレーン 1 が優れた DNA ベクターであることがわかったため、異なる構造を持つ DNA 結合性フラレーンを合成し構造活性相関を検証することにした。これまでに種々のフラレーン・アミン複合体が合成されているが、遺伝子導入ベクターとしての活性評価は全くなされていなかった。そこで、既知のフラレーン・アミン複合体 6, 7, 8 に加え、フラレーンの光アミノ化反応を新たに開発して新規アミノ化フラレーンフラレーン 4, 5, 9 を合成した (Fig. 4)。また連結部制御による二重環化付加を応用して 1 の親水性類縁体 3 を立体選択的に合成した。フラレーン 1 の親水性類縁体 3 を合成した。これらの DNA との結合能を臭化エチジウムの競合結合実験で検証した結果、いずれのフラレーン・アミン複合

体も 0.3 - 2.8 μM という低い C_{50} 値を示した. この値は DNA に強く結合することが知られるスベルミン 10 の C_{50} 値 (1.6 μM) に近く, ここに示した DNA・アミン複合体は全て高い DNA 結合能を持つことがわかった. そこでフラーレン・アミン複合体のトランスフェクション能力について検証した. COS-1 細胞あるいは NIH 3T3 細胞 (マウス胎児細胞) に対するトランスフェクションの結果, フラーレン 1 が最も高い効率を示した. フラーレン 3, 4, 5 がわずかな活性を示したものの, 多くのフラーレン・アミン複合体はトランスフェクション活性を全く示さなかった. 詳しい機序は不明だが, フラーレン・アミン複合体が高い遺伝子導入能を持つには, DNA に対する結合力だけでは不十分であり, アミン残基の構造や空間配置が重要であることが示唆された.

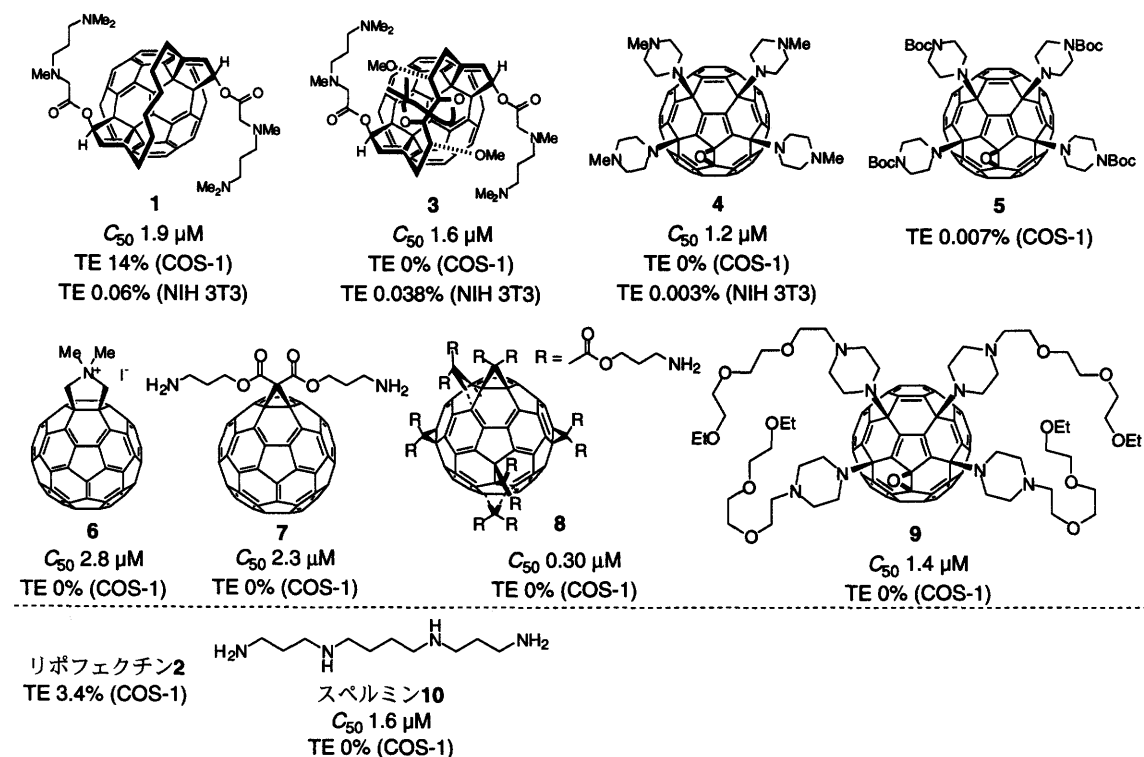


Fig. 4

筆者は DNA 結合性フラーレンの遺伝子導入ベクターへの応用を検討し, フラーレン誘導体が DNA ベクターとしての機能を示すことを初めて見いだした. 詳細な条件検討の結果, DNA 結合性フラーレン 1 が正電荷脂質 2 より高い効率を示すことを明らかにした. 1 は正電荷脂質では困難な血清の存在下でのトランスフェクションにも有効であった. この高い効率や血清に対する耐性は DNA 結合性フラーレンの高い DNA 保護効果によるものであることが示唆された. また種々のフラーレン・アミン複合体を用いた構造活性相関を行い, フラーレン・アミン複合体が高い DNA 結合能を示すことや, DNA 結合能は遺伝子導入効率と必ずしも相関しないことなどを明らかにした. DNA 結合性フラーレンは, 全く新しい DNA ベクターとして *in vivo* での使用などさらなる応用が期待される.