



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  $\mu\text{g}$ , 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。

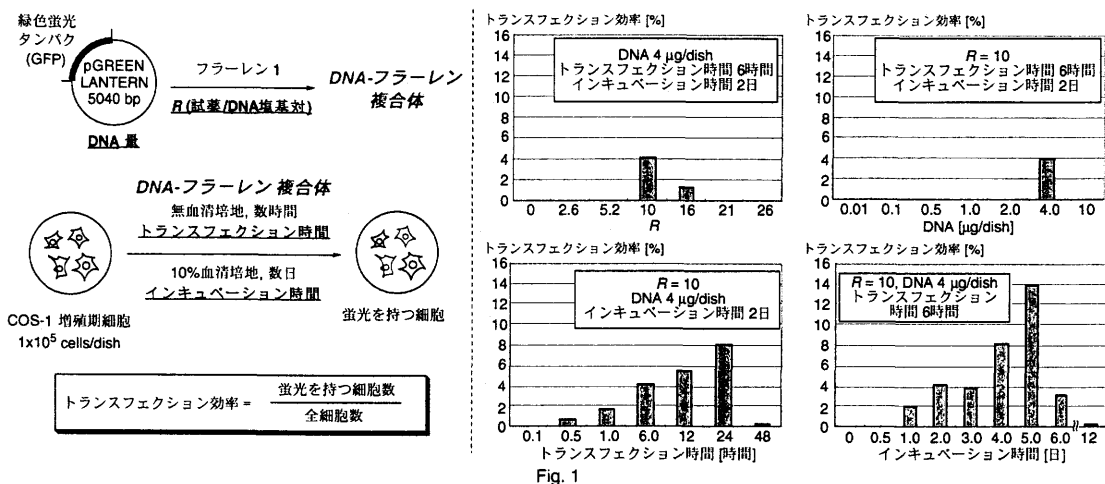


Fig. 1

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。

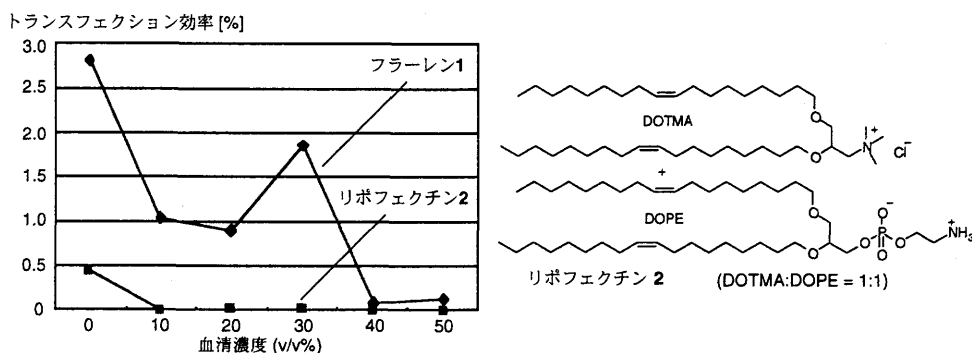


Fig. 2

フラーレン 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阻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、フラーレン 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、フラーレン 1 の DNA 保護効果について検証した (Fig. 3)。プラスミド DNA に対しフラーレン 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、フラーレン 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 結合性フラーレンは高い DNA の保護効果をもつことがわかった。

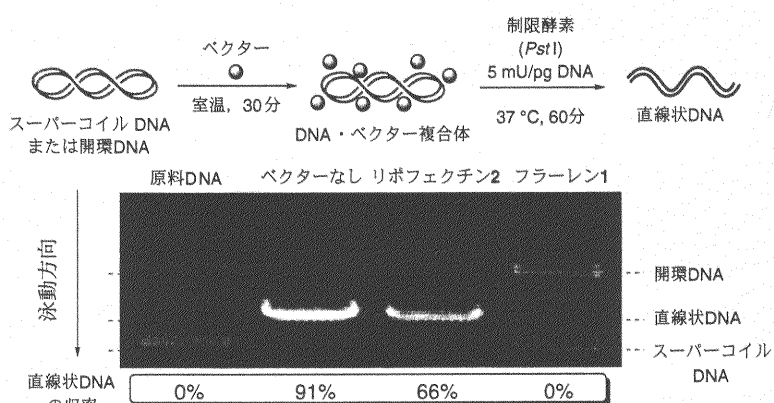


Fig. 3

フラーレン 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 結合性フラーレ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ーレン・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、既知のフラーレン・アミン複合体 6, 7, 8 に加え、フラーレ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ーレンフラーレン 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。フラーレン 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、いずれのフラーレン・アミン複合体も 0.3 - 2.8  $\mu$ M 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perlミン 10 の  $C_{50}$  値 (1.6  $\mu$ M) 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。

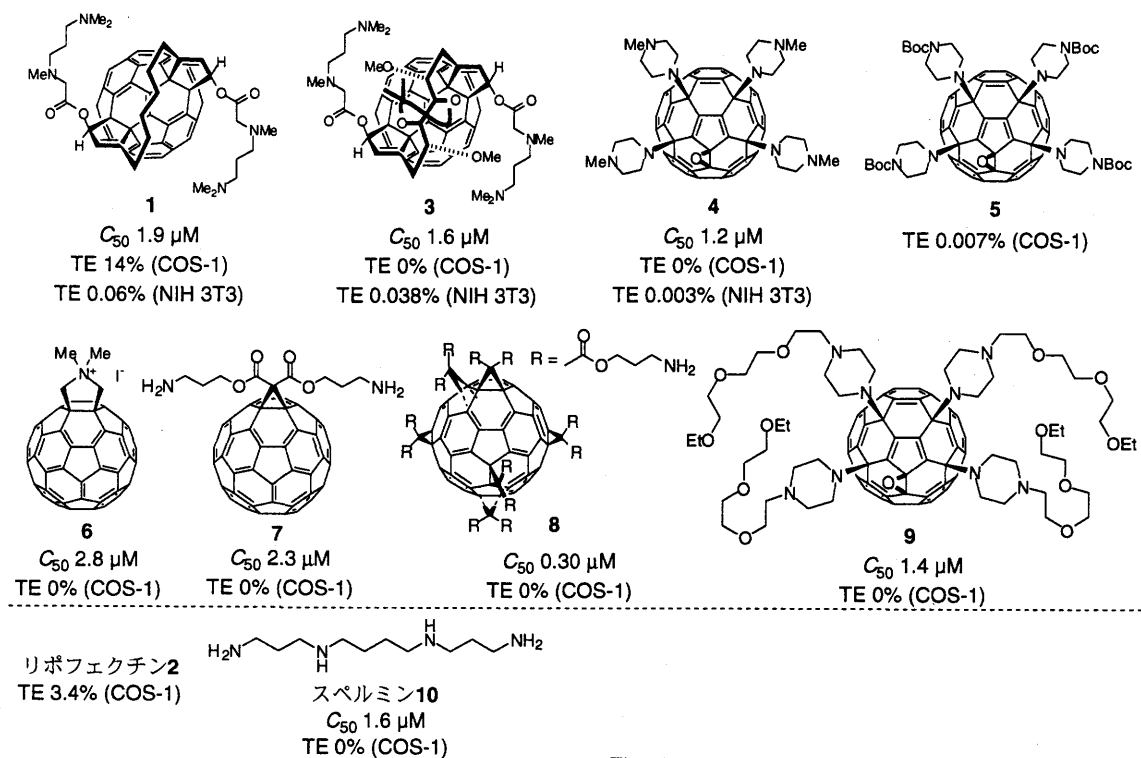


Fig. 4

本研究では 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。

なお、本稿は本学医学部岡山研究室との共同研究であるが、論文提出者が主体となって、実験、分析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

従って博士（理学）の学位を授与できると認める。