

## 論文内容の要旨

論文題目 New Transfection Method Based on Cationic Fullerene Assembly

[カチオン性フラーレン集合体による新規遺伝子導入法の開発]

氏名 中西 和嘉

細胞への外来遺伝子の効率的導入は、遺伝子治療の発展において改善されるべき重要な課題である。現在、安全性の高い非ウイルス性遺伝子導入剤の開発が注目されており、リポフェクチン(Fig. 1) に代表されるように、カチオン性の脂質類似の分子を中心に研究が進められている。最近、球状の疎水性基であるフラーレンを利用した遺伝子導入剤**1** (Fig. 1) が報告されており、フラーレンを用いた新しい遺伝子導入剤の開発が可能である事が見いだされている。

本論文では、アミノフラーレン **1** が血清存在下で効率的な遺伝子安定性発現が可能であり、リポフェクチンより優れていることを報告している。また、アミンからの基底状態のフラーレンへの電子移動を鍵とした高効率アミノ化反応を開発している。この反応は、単工程で4つのアミンを導入でき、様々な官能機を有するアミノフラーレンを合成する事に成功している。この反応を用いる事により、C<sub>60</sub>を二工程の反応操作により高い遺伝子導入機能をもつ分子（アミノフラーレン **2**, Fig. 1) に変換できる事を見いだしている。本論文は、研究の概要と、以下に要約される6章よりなる。

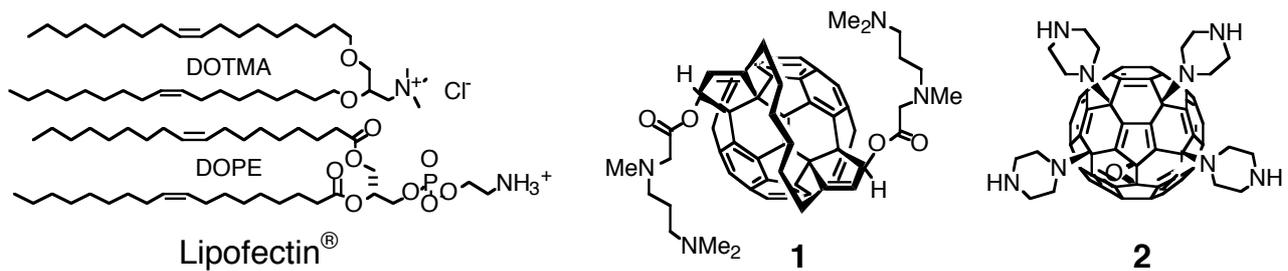


Fig. 1 Structures of Lipofectin, aminofullerene 1 and 2.

第1章ではフラーレン、カーボンナノチューブの生物学的応用についての背景を述べている。フラーレン、カーボンナノチューブは生体内に類を見ない特異な構造と性質を持ち、その応用が注目されている。現在までに報告されている主な生物学的応用例において、その利点と問題点を挙げている。

第2章ではアミノフラーレン1による遺伝子導入の特徴と、導入機構の解明について述べている。アミノフラーレン1はDNAと安定な複合体を形成し、酵素による切断や血清による会合阻害の影響を受けず、さらに遺伝子安定性発現が可能である事を見いだしている。試験管内実験により、アミノフラーレン1と結合したDNAは保護され、酵素存在下で分解されない事を示している。また、細胞内においてもアミノフラーレン1と結合したDNAは保護されていることを示している。このことは、細胞内でのDNAの分解が抑えられ、遺伝子導入効率を向上させる事で知られているリソソーム阻害剤（クロロキシン）の効果がない事から結論している。また、エンドサイトーシス阻害剤（サイトカラシンB）により、遺伝子導入効率が低下したことから、DNAはエンドサイトーシスにより細胞内に導入されることを示している。血清は細胞の成長に必須であるが、脂質系の遺伝子導入剤において、血清存在下では遺伝子導入能が低下し、問題となっている。本研究では、アミノフラーレン1による遺伝子導入時に血清を存在させると逆に導入効率が向上することを見いだしている。脂質系試薬では血清中に含まれる生体分子が、脂質集合体とDNAとの会合を阻害するが、DNA-フラーレン複合体はより高い安定性をもっているため、会合阻害を受けない事が示唆されている。また、血清を添加することによりDNA-フラーレン複合体のサイズが小さく均一化されている事も見いだしており、血清存在下ではエンドサイトーシスに有効なサイズの複合体が多く生成したと結論している。さらに、アミノフラーレン1により高い効率で安定性遺伝子導入が可能である事を見いだしている (0.73%)。リポフェクチンでは遺伝子安定性発現が見られたのはわずか0.039%である。血清存在下の一過性遺伝子導入実験ではアミノフラーレン1はリポフェクチンの約4倍の遺伝子導入効率であったのに対し、遺伝子安定性発現では差が大きく見られ、アミノフラーレン1による遺伝子安定性発現はリポフェクチンの19倍であった。このこと

から、アミノフラレン**1**による遺伝子導入が、遺伝子安定性発現に対して効果的な機能をもっていることが示されている。

第3章では、フラレンのアミノ化反応について述べている。DMSO 混合溶媒中で、アミンから基底状態のフラレンへ一電子移動が起こり、一工程によりフラレンに対するアミン四重付加反応が進行する事を見いだしている。DMSO 混合溶媒中では、アミンからフラレンへの一電子移動により C<sub>60</sub> ラジカルアニオンが生成し、アミンとのラジカルイオンペアとして安定に存在することが近赤外線吸収から確認されている。DMSO を添加しない系では、ラジカルアニオン由来の吸収は観測されないことから、DMSO によりラジカルイオンペアが安定化されていることを示している。これまでに、36 当量という、大過剰のアミン存在下、フラレンの光励起によりアミン四重付加反応が進行する事が報告されているが、本研究では、光励起を必要とせず反応が進行し、さらにアミンを 6 当量に減らすことができる事を見いだしている。さらに、酸化剤としてクメンヒドロペルオキシド(CHP)を用いることでも、光励起を必要とせず反応が進行することを見いだしている。これら光を必要としないアミン四重付加反応は様々な第二級アミンにおいて進行し、種々官能基を有するアミノフラレンを C<sub>60</sub> から 1 工程で合成する事に成功している。

第4章では第3章で開発した高効率アミノ化反応を用い、アミノフラレンを種々合成し、それらの DNA 結合能・遺伝子導入能について述べている。第2章でフラレンを用いた遺伝子導入法がこれまでの試薬とは異なった利点をもつことを明らかとしたが、アミノフラレン**1**は複雑な合成工程を要し、100 mg 程度の合成が限度であり実用試薬としての展望は極めて限られたものであった。本研究では、合成したアミノフラレンの中から、遺伝子導入試薬として有効であり、かつキログラム単位で合成可能な化合物 **2** を開発している。合成したアミノフラレンの中で、カチオン性のアミンを有するものは全て高い DNA 結合能を有した。さらに、一過性の遺伝子導入能をアミノフラレン **1** と比較することにより、第二級アミンを有する **2** が **1** と同程度の高い遺伝子導入能を持つことを見いだしている。構造活性相関により、中程度から高度の遺伝子導入活性をもつアミノフラレンは、細胞内でのアシル化や加水分解によりカチオン性のアミンを失い、DNA を細胞内で放出できる構造を持つことを示している。また、DNA-フラレン複合体のサイズを動的光散乱法により求めた結果、複合体形成時に用いる緩衝液により複合体のサイズに変化が生じる事を見いだしている。千ナノメートル以上の大きい複合体が形成された時、遺伝子導入効率が低下することが見いだされている。数百ナノメートル以上のサイズをもつ物質はエンドサイトーシスにより効率的に取りこまれないため、大きい

複合体では遺伝子導入効率が低下すると結論している。以上により、アミノフラレンが高い遺伝子導入能を持つためには、DNA との結合能だけでなく、細胞内での DNA の放出能を持つ事、複合体のサイズを数百 nm 以下に制御することが重要であることを見いだしている。

第 5 章ではフラレンへの五重付加反応にも用いられる有機銅の反応性を、理論化学計算により解明した結果を述べている。フラレン遺伝子導入剤を開発する手法として、3 章で述べたアミン四重付加反応以外に、定量的に進行する五重付加反応を挙げている。この反応では有機銅試薬が用いられている。このように有機銅試薬を用いた有用な反応例が数多く報告されているが、同族の銀・金ではそのような反応例は珍しい。中心金属による反応性の違いを、有機銅の反応をモデルとして、それぞれ反応性を比較している。一価有機金属の求核性について、また、三価有機金属中間体の安定性について中心金属による影響を比較した結果、有機銅化合物は求核性が高く、不安定であるため反応性が高い事を見いだしている。これらの反応性の違いは、d 軌道のエネルギーレベルの違いや、相対論効果により生じる事が結論付けられている。

第 6 章ではフラレン遺伝子導入剤について総括し結論を述べている。アミノフラレン **1** による遺伝子導入は、血清存在下で DNA との複合体が均一な粒子となり、遺伝子安定性発現を効率的に行うことが可能であることを見いだしている。さらに多様なライブラリ構築の可能とするアミン四重付加反応を開発し、C<sub>60</sub> を二工程の反応操作により効率的に高い遺伝子導入機能をもつフラレン遺伝子導入剤 **2** を開発した。フラレン遺伝子導入剤において高効率な遺伝子発現を実現するためには、DNA との結合能を有するだけでなく、DNA との複合体を細胞に取り込みやすいサイズに制御し、さらに細胞内で DNA を放出可能な設計が必要である事を見いだしている。また、新たなフラレン遺伝子導入剤を開発する手法として、定量的に進行する五重付加反応を挙げている。この反応では有機銅試薬の反応性が鍵であり、有機銅の反応性を理論化学的に解明している。

報文

"Reactivity and Stability of Organocopper(I), Silver(I) and Gold(I) Ate Compounds and Their Trivalent Derivatives" Nakanishi, W.; Yamanaka, M.; Nakamura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 1446-1453.