

論文の内容の要旨

氏名：木原 慶彦

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：細胞への外来因子の特異的導入法に関する研究

近年、薬剤や遺伝子などの外来因子の細胞への導入は、癌の治療・遺伝子治療などの医療への応用や、合成の難しいタンパク質や薬物などの有用物質生産を目的として研究が行われている。医療においては薬剤送達システム（DDS）が注目されており、治療に用いる薬剤などを目的の部位に送達することにより、副作用を抑え、効率よく治療が行えることから、多種多様な細胞特異性を有する薬物キャリアの開発が進められている。細胞特異性の付与には、標的細胞に特異的に結合する分子をキャリアに連結した例が報告されており、様々な細胞へのターゲティング分子をキャリアに対して簡便かつ特異的に導入することが出来れば、細胞特異性を有する DDS キャリアとして非常に有用であると期待される。さらに、細胞に送達した外来遺伝子を効率よくゲノム中に組み込むことが、遺伝子治療、有用物質生産において必要となる。外来遺伝子のゲノム DNA への挿入にはランダム挿入や相同組換えが多く利用されているが、効率が低いという問題点がある。また、特に有用物質生産には長鎖 DNA が必要であることが多いが、このような長鎖 DNA はゲノム中に安定して組み込むことは難しい。ファージ・インテグラーゼはファージと宿主ゲノム上の特定配列（アタッチメント・サイト）間で厳密な一方方向の部位特異的組換え反応を触媒する酵素である。そのため、ファージ・インテグラーゼを用いた遺伝子組換え法に関する研究は微生物ゲノム工学において、薬効を示す二次代謝産物を合成する長鎖遺伝子クラスターなどの長鎖 DNA を多種多様な細胞種のゲノムに効率的に導入するために有用であると考えられる。

本論文は「Study on Methods for Targeted Introduction of Exogenous Factors into Cells」、和文題目「細胞への外来因子の特異的導入法に関する研究」と題し、全四章で構成される。

第一章は序論であり、細胞への外来因子導入、薬物送達システム（DDS）、ポリシロキサン特性、クリック反応、外来 DNA のゲノムへの導入について概説し、本論文の目的、意義および構成について述べている。

第二章では、まず、アルキンにより機能化されたカチオン性ポリシロキサン誘導体の合成、および作製した各種ポリマーを用いてサブミクロンサイズのエマルジョンであるナノエマルジョンの作製を行うとともに、標的特異性薬物キャリアとして利用可能であるかを検討した結果について述べている。ポリシロキサンは疎水性を有する高分子であるが、イミダゾールの四級化反応によりカチオン性を付加し、親水性となることが既に報告されている。この際、アルキンを有するイミダゾールを用いれば、アジド化したターゲティング分子をクリック反応により高い密度で導入することが可能となる。それにより対象細胞との相互作用が強化され、高い細胞特異性を有する薬物キャリアとなると考えた。また、ポリシロキサン誘導体は、表面張力の低下において優れた能力を有していることが報告されていることから、作製したカチオン性ポリシロキサン誘導体は優れた薬物キャリアとなると考えた。

シロキサン骨格をアニオン開環重合により合成した後、アルキンを有するイミダゾール誘導体の四級化反応を行うことで、目的とする単一重合体（**P1m1**）、およびブロック共重合体（**P1m2**）をそれぞれ合成した。分子量と重合度から推定される **P1m1**、**P1m2** の四級化率は、それぞれ 96%、32%であった。得られたポリマーはいずれも極性溶媒へ優れた溶解性を示した。また、**P1m2** はクロロホルムやジクロロメタンといった非極性溶媒においても可溶であった。また、示差走査熱量（DSC）測定により **P1m1** のガラス転移温度（ T_g ）は 17° C と求められた。従って、このポリマーにより形成されたエマルジョンは、体温以下で薬剤を放出しやすい柔軟な構造をとると期待される。

作製したポリマーは主鎖であるポリシロキサン鎖が疎水性部、側鎖であるイミダゾリウム塩が親水性部として機能するため、水中にて大豆油と共にソニケーションを行うことにより、o/w 型エマルジョンを形成した。作製したエマルジョンの粒径は ~150 nm であった。さらに、CuAAC 反応により、表面にアジド化した蛍光標識分子、または緑色蛍光タンパク質で標識したエマルジョンの作製を行った。CuAAC 反応には触媒と

して銅 (I) を用いるが、銅は細胞毒性を有していることから、EDTA 水溶液にて透析を行うことにより銅を除去した。作製したエマルジョンが蛍光標識されていることを蛍光顕微鏡観察により確認した。蛍光分子により標識したエマルジョンのうち、Alexa Fluor 488 および緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を用いたエマルジョンでは蛍光分子が負電荷を有していることから、正電荷を有するエマルジョン表面にイオンの結合し、銅触媒を加えていないものに関して蛍光が観測された。一方、正電荷を有する蛍光分子である Cy3 ではこのような吸着が見られなかった。そこで、負電荷を有する蛍光分子で標識した後、陰イオン交換樹脂に蛍光分子を吸着させることにより、エマルジョンに吸着した蛍光分子の除去を行ったところ、銅触媒を加えた場合のみ蛍光が観測された。以上の結果から、CuAAC 反応により蛍光分子が付加されたことを確認した。また、モデル薬物としてナイルレッドを溶解した大豆油を用いてエマルジョンの形成に成功した。さらに、肝細胞へのターゲティング分子であるラクトースを付加したナノエマルジョンは、ラクトースを付加していないものに比べて、肝細胞へ多く取り込まれることを明らかにしている。

続いて、ポリシロキサン四級イミダゾリウム塩がカチオン性を有していることから、DNA デリバリーへの応用を検討している。まず、このポリマーが DNA と複合体を形成することを明らかにしている。さらにラクトースを連結したポリマーと DNA の複合体は、ラクトースを付加していないものに比べて、肝細胞に多く取り込まれることを明らかにしている。しかしながら、ラクトースの受容体を発現していない他の細胞 (CHO 細胞) でも同様な結果が得られたことから、ラクトース付加による **Pim1** の肝細胞への取り込み促進には、ラクトースの受容体との結合以外の要因が大きく作用していると考えられる。

以上の結果から、作製したポリマーがさまざまな分子で標識可能であり、細胞標的分子を導入して作製したエマルジョンや DNA 複合体は細胞特異性を有する薬物・DNA キャリアとして有用であると期待される。

第三章では、放線菌 TG1 ファージ・インテグラーゼを用いたゲノム DNA への遺伝子導入法について検討した。TG1 インテグラーゼは、ファージと宿主細胞ゲノム中の *attP* と *attB* の二つのアタッチメント・サイト間で一方向を示す部位特異的組換えを触媒するセリタイプ・インテグラーゼであり、これらのインテグラーゼと DNA の対象部位は異種細胞中であっても効率的に機能するため本研究で用いている。まず、大腸菌において、*att* 部位を導入した 2 個のプラスミド DNA 間、または *att* 部位を導入したプラスミド DNA と大腸菌のゲノム DNA 間における部位特異的組換えシステムについて検討した。その結果、TG1 インテグラーゼを発現している細胞では TG1 インテグラーゼを発現していない細胞と比較して、組み換え効率が $\sim 10^{1-3}$ 倍に増加した。生体外において補助的な宿主因子なしで TG1 インテグラーゼが効率的に機能することが報告されており、本研究の結果は生体内においても TG1 インテグラーゼによって *attB* 含有環状 DNA を部位特異的かつ非可逆的に多くの細菌種の *attP* 挿入ゲノムへ効率的に導入できることを示すものである。

また、様々なゲノムの位置に挿入した *att* 部位への、対応する *att* 部位を有する ~ 10 kbp のプラスミド DNA の挿入について検討したところ、 $\sim 10^4$ colonies/ 1 μ g DNA の形質転換効率でプラスミド DNA がゲノム中に導入された。また、TG1 インテグラーゼの発現量を多くした場合に導入効率が向上した。さらに、*attP* を挿入した大腸菌ゲノムへの *attB* 含有プラスミド DNA の組換えは、*attB* を挿入した大腸菌ゲノムへの *attP* 含有プラスミド DNA の組換えよりも効率的であった。その理由として、大腸菌ゲノム上の *att* 部位への TG1 インテグラーゼの結合が組換えの効率に大きく影響し、TG1 インテグラーゼは *attB* 部位よりも *attP* 部位に結合しやすいためと考えられる。また、複製起点である *oriC* と大腸菌のセントロメア様配列の *migS* の近辺に挿入された *attP* を標的とする組換えは、他のゲノム領域に *attP* を挿入したものより効率的であった。その理由として、*oriC* と *migS* に近いゲノム領域は染色体分離の際に細胞両極に移動するため、*oriC*-*migS* 領域は大腸菌核様体の他の領域よりもアクセスしやすいためと考えられる。従って、導入する *attB* 含有 DNA に対して事前に挿入した *attP* が接近しやすいことが異種細胞におけるセリタイプ・インテグラーゼの組換え効率に重要であると考えられる。以上により得られた知見は、セリタイプ・インテグラーゼによる遺伝子組換えシステムの発展に有益であると考えられ、このような組換えシステムは、薬効を有する二次代謝産物を合成する長鎖遺伝子クラスターなどの長鎖 DNA を多種多様な細菌類のゲノムへ効率的に導入するために有用であると期待される。

第四章は本論文の総括であり、作製したアルキンを有するカチオン性ポリシロキサン誘導体の DDS キャリアとしての概要、およびセリタイプ TG1 インテグラーゼによる微生物ゲノムへの長鎖 DNA の部位特異的遺伝子導入についての概要を述べている。本研究は、様々な細胞を対象として外来因子を特異的に導入することにより、疾患の治療や有用物質を生産する目的に対しての将来性について示したものである。