

博士学位論文

細胞への外来因子の特異的導入法に
関する研究

Study on Methods for Targeted
Introduction of Exogenous Factors
into Cells

平成 27 年 2 月

日本大学大学院工学研究科

物質化学工学専攻

木原慶彦

目次

第一章 序論	
1.1 本研究の背景	
1.1.1 細胞への外来因子の導入について	4
1.1.2 薬物送達システムについて	4
1.1.3 ポリシロキサンについて	5
1.1.4 クリック反応について	6
1.1.5 外来 DNA のゲノムへの導入について	7
1.2 本研究の目的と論文の構成	8
1.3 参考文献	9
第二章 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 および薬物送達システムへの利用	
2.1 目的	11
2.2 結果と考察	
2.2.1 ポリマーの合成	12
2.2.2 ポリマー側鎖への四級化反応	17
2.2.3 ポリマーの熱物性	20
2.2.4 蛍光標識ナノエマルジョンの作製およびその物性	21
2.2.5 CuAAC 反応によるラクトースの付加	24
2.2.6 細胞生存試験	26
2.2.7 HepG2 細胞へのナノエマルジョンの取り込み	27
2.2.8 ラクトース結合ポリマーを用いた細胞への遺伝子送達	28
2.3 結論	31
2.4 実験項	32
2.5 参考文献	40

第三章 セリンタイプ 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	
3.1 目的	45
3.2 結果と考察	
3.2.1 プラスミド DNA 上の <i>att</i> 部位間での <i>in vivo</i> 部位特異的組換え	46
3.2.2 ゲノム DNA 上の <i>att</i> 部位を標的とした <i>in vivo</i> 部位特異的 組換え	51
3.2.3 微生物ゲノム上の <i>att</i> 部位を標的とした <i>in vivo</i> 部位特異的 組換えにおける DNA の長さの影響	54
3.2.4 微生物ゲノム上へ挿入された <i>att</i> 部位の位置	61
3.2.5 プラスミド DNA 上の <i>att</i> 部位を標的とした <i>in vivo</i> 部位特異的 組換えにおけるプラスミド DNA のコピー数の影響	63
3.3 結論	65
3.4 実験項	66
3.5 参考文献	70
第四章 総括	74
論文発表	78
略号	79
謝辞	80

第一章

序論

1.1 本研究の背景

1.1.1 細胞への外来因子の導入について

細胞への外来因子の導入は、細胞機能の解明を目指した基礎研究から、疾患の治療や有用物質の生産など医療や産業への応用に至るまで、生物学・医学・薬学・工学分野を始めとする様々な分野において幅広く用いられる基盤技術である。具体的には、細胞への外来遺伝子の導入は、原核細胞・真核細胞を問わず遺伝子の機能解析などの生命現象解明のための基本的な実験手法として用いられてきた。また、タンパク質などの生体分子をマイクロインジェクションやリポソームを用いて細胞に導入するなどの方法も用いられている。さらに、外来遺伝子を異種細胞で機能させることにより、細胞機能の改変や機能の付与、有用物質生産などへの応用が広がっており、トランスジェニック動物による医薬品生産、ヒト化抗体生産マウス、遺伝子組換え作物、iPS細胞、バイオエタノール生産大腸菌などが実現している。このような応用には、長大な遺伝子クラスターを安定的に発現させることが必要なことが多く、そのために長鎖DNAをゲノムDNAに組み込む手法の開発も重要となっている。さらに、細胞への遺伝子導入の応用として、遺伝性の疾患などの治療を目的とした遺伝子治療が期待されている。しかしながら、遺伝子治療はまだ確立した治療法となるには至っておらず、細胞選択的に対象遺伝子を送達する技術や、細胞内で対象遺伝子を効率的に発現する技術の開発が課題となっている。遺伝子に加えて、抗癌剤などを標的細胞に選択的に送達する薬剤送達システム (drug delivery system: DDS) は、効果的に薬効を発揮し副作用を低減する方法として有効であり、現在もその改良を目指した研究が活発に続けられている。従って、遺伝子や薬剤などの外来因子の細胞への導入に関する研究は、これらの分野の更なる発展において必要不可欠である。

1.1.2 薬物送達システムについて¹⁾

薬剤送達システム (drug delivery system: DDS) とは、疾患の効率的な治療を行うために治療薬を送達するための技術というだけでなく、予防や診断などに使われる物質を含めたさまざまな物質を材料により修飾し、組み合わせることで、物質の作用を高めるための方法論であり、材料の研究開発だけでなく、材料と物質の組み合わせやその利用技術・方法論などの開発を含めた広い研究領域である。そのため、DDSの目的は、物質の作用を最大限に発揮させ、かつ不必要な作用を軽減することであり、細胞学や分子生物学といった基礎生物学、治療・予防・診断などの医療分野、さらにはヘルスケアや機能材料といった幅広い分野においてDDSの技術や方法論が応用可能である。

疾患に対する治療薬は経口・非経口などの違いはあるものの、投与された薬

剤が、病原である細胞に到達し、効果を発揮しなければ薬効は得られない。しかし、実際には投与した薬の大部分は作用部位に到達できずに排泄、あるいは正常細胞に作用して副作用の原因となる。そのため、薬剤の分子を必要な細胞に、必要な量だけ、必要な時に送り込むことが重要となる。このための技術が DDS であり、そのための方法論として、薬剤の除放、薬物の長寿命化、難水性の薬剤の水可溶化、薬物の吸収促進、薬物のターゲティングなどが挙げられる。

DDS には薬物だけでなく、それと組み合わせる物質が必要であり、従来までの薬剤学においてもさまざまな物質が用いられてきた。その多くは、乳糖、脂肪、界面活性剤などの低分子化合物や、ゼラチン、デンプン、セルロース誘導体、アラビアゴムなどの天然高分子であり、結合剤、賦形剤、増量剤として現在も多く使用されている。しかし、治療効果を高めるためには、これらの材料を従来の処方どおりに用いるだけではより精度の高い DDS には対応できないことから、新規材料の開発が求められてきた。そのため現在では、高分子、低分子、金属、セラミックス、ウイルスなどのさまざまな材料を利用し、DDS を目的に研究されている。本研究は、このような新規 DDS 材料のひとつとしてポリシロキサンの利用を試みたものである。

1.1.3 ポリシロキサンについて

有機ケイ素ポリマーの一つである線状ポリシロキサンは、1940 年代に工業的に合成されるようになって以来、無機系の主鎖を有する代表的な高分子としてさまざまな分野で利用されている。

ポリシロキサンは主鎖の分子構造に起因するさまざまな特性を有している。ケイ素は炭素と比較して電氣的に陽性であり、シロキサンを構成する Si-O 結合は 50% のイオン結合性を有しており、炭素の C-O 結合の 22% と比較して高いことから、ポリシロキサンの特徴の一つとなっている。また、Si-O の結合エネルギーは 452 kJ/mol であり、C-O の 360 kJ/mol と比較して 1.25 倍大きく、中性条件下で高い熱安定性が期待される。さらに、Si-O 結合の高いイオン結合性は、Si-O-Si 結合の結合角にも大きく影響を与えており、C-O-C の結合角が 110° であるのに対し、Si-O-Si 結合の結合角は 130°~160° の間で変化する。数あるポリシロキサンのうち、代表的なポリシロキサンとしてポリ（ジメチルシロキサン）が挙げられる (Fig. 1-1)。

ポリ（ジメチルシロキサン）の主鎖は、Si-O-Si の結合角が大きいため、ポリマー鎖の平均的広がりが大きく、そのイオン性、結合の自由回転性と共にポリシロキサン鎖の柔軟性として特徴付けられている。また、ポリ（ジメチルシロキサン）は、メチル基が Si-O 結合を軸に回転することに起因する、75.5 cm³/mol と大きなモル体積および小さな凝集エネルギーを有している。さらに、ポリ（ジ

メチルシロキサン)はコイル構造をとることが知られている。ポリ(ジメチルシロキサン)がコイル構造をとる際、側鎖のメチル基などの疎水性基はコイルの外側に配置されることにより、ポリ(ジメチルシロキサン)は優れた耐熱性、化学安定性、耐候性などの特性を有し、疎水性基である側鎖のメチル基の疎水性相互作用により低い分子間力を示す。さらに、ポリ(ジメチルシロキサン)は小さな分子間相互作用、および主鎖の柔軟性に起因する低いガラス転移温度(-123℃)、小さな表面張力および表面自由エネルギー、低誘電率などの性質が知られており、高い気体透過性、疎水性、界面活性、電気絶縁性、生理学的親和性などのさまざまな特徴から、化学、電気、電子、自動車、繊維、紙・パルプ、建設、食品、化粧品、医薬品などの極めて広い分野において、汎用あるいは特殊材料として用いられている。一方、低い分子間力を有することにより、単独での成膜性や、成型加工性への機能発現が低いことが難点であり、新たな特性の寄与や改質を目的とし、新規ポリシロキサンの開発ならびに応用研究が精力的に行われている。本研究ではポリシロキサンに両親媒性を付与することにより DDS 材料としての利用を目指して研究を行った。さらに、蛍光標識や細胞へのターゲット分子をクリック反応により簡便に付加できるようにして、より有用性を高めることを目指した。

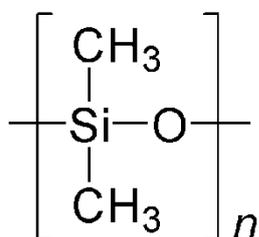


Fig. 1-1 Structure of poly(dimethyl siloxane).

1.1.4 クリック反応について

クリック反応は 1998 年に Sharpless によって名付けられ、2001 年に Sharpless らによって初めて完全に報告された反応であり²⁾、単純な部分構造を有する分子同士をヘテロ原子結合を形成することにより、新たな機能性分子を作り出すために作製された用語である。この反応は、広い適用範囲・高収率・無害な副産物のみの生成・立体特異性・生理学的安定性・大きな反応エネルギー(84 kJ/mol)を有し、反応条件・原料の入手・溶媒の除去・精製が容易である必要があるとしている。Sharpless らはさまざまな反応をクリック反応として

挙げているが、中でもアルキンとアジドを用いた 1,3-双極子付加環化反応であるフイスゲン反応が代表的なクリック反応として用いられている。

フイスゲン反応はアジドとアルキンが付加環化反応を起こし、1,2,3-トリアゾール環を形成する反応で、1961年に Huisgen によって報告されている³⁾ (Fig. 1-2)。アジドおよびアルキンは多くの有機化合物に導入可能な官能基であり、他の官能基とほとんど反応せず、安定なトリアゾール環を生成し、溶媒を問わず、高収率で反応が進行することが知られている。これらの特徴から、アジド-アルキン付加環化反応は生化学分野をはじめとしたさまざまな分野で用いられている。

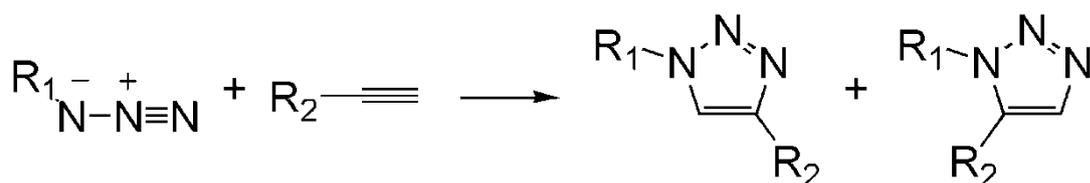


Fig. 1-2 1,2,3-Triazole formation *via* Huisgen 1,3-dipolar cycloaddition.

1.1.5 外来 DNA のゲノムへの導入について

近年、生物のゲノムを操作することにより生命現象の解明や医学・工学への応用を目指す研究が多く行われるようになってきている。基礎研究においてノックアウトマウスやトランスジェニックマウスの作成は、遺伝子機能の解明の常套手段となっている。これにはゲノムへ外来 DNA を導入することが必要であり、これまでランダム挿入や相同組換えが多く用いられてきた。しかしながら、これらの手法は導入効率が低く、ランダム挿入では挿入部位が不特定となるという難点があった。最近、ZFN、TALEN や CRISPER/Cas 法が開発され、ゲノム DNA の特定部分を切断することにより、簡便かつ効率的に遺伝子欠失や遺伝子挿入を行うことが可能となった⁴⁾。しかしながら、数十 bp 以上の長鎖 DNA を効率的に導入することは依然として困難である。ところが、トランスジェニック動植物を用いた有用タンパク質生産や遺伝子治療では、細胞に導入した遺伝子が安定に発現し続けるために、遺伝子をゲノム DNA に組み込むことが望ましい。さらに、抗生物質などの複数の遺伝子産物が反応に関与する代謝経路遺伝子群の異種微生物への導入においては、長大な外来遺伝子を異種細胞ゲノムへ高効率に組込む技術が特に重要となる。このため、部位特異的組換え反応を触媒する組換え酵素（リコンビナーゼ）を利用した遺伝子導入技術が広く研究されている⁵⁾。近年セリタイプ・ファージ・インテグラーゼが認識部位 (*att*

部位) 間での挿入のみ一方向の組換え反応を触媒し, これを利用してゲノムへ効率的に部位特異的 DNA 導入が行えることが報告されている。本研究は, その一つである TG1 ファージ・インテグラーゼが, 長鎖 DNA のゲノムへの挿入に有用であることを示したものである。

1.2 本研究の目的と論文の構成

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。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, 遺伝子治療や有用物質生産において必要となる。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間で厳密な一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, 本酵素を用いた遺伝子導入法の開発は, 多種多様な細胞種のゲノムに対して, 植物の薬効成分を合成する遺伝子クラスターなどの長鎖 DNA を効率的に導入するために有用であると考えられる。本論文では, 様々な細胞を対象にした外来因子の部位特異的導入を目的とし, アルキンにより機能化された四級イミダゾリウム塩を有するポリシロキサン誘導体を合成するとともに, クリック反応により様々な分子による機能化を行い, 細胞特異的薬物・遺伝子キャリアとして有用であることを示している。さらに, 放線菌 TG1 ファージ・インテグラーゼを用いて, 多種多様な細菌種のゲノムに長鎖外来 DNA を効率的に導入することが可能であることを示している。

本論文は四章から構成されている。

第一章は, 序論であり, 研究の背景, 目的, 意義および構成について述べている。

第二章は, アルキンを有するポリシロキサン四級イミダゾリウム塩の合成とその物性について述べている。続いて, このポリマーが薬剤モデルのナイルレッドを内包してナノエマルジョンを形成できることを述べている。さらにクリック反応によりアジドを有する蛍光分子や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および DNA 複合体の作製, およびその肝細胞への取り込みについて検討した結果を述べている。

第三章は, 放線菌 TG1 ファージ・インテグラーゼにより, 長鎖 DNA を異種微生物ゲノムへ部位特異的かつ効率的に導入する方法の開発について検討した結果を述べている。そして, ゲノムの複製開始点付近に導入する場合に導入効

率が高いこと、TG1 インテグラーゼの発現量を多くした場合に長鎖の DNA の導入効率が向上することを述べている。

第四章は、本研究で得られた結果を総括して述べている。

1.3 参考文献

1) 田畑泰彦編：遺伝子医学 MOOK 別冊 絵で見てわかるナノ DDS マテリアルから見た治療・診断・予後・予防、ヘルスケア技術の最先端，メディカル ドゥ，2007.

2) Kolb, H. C., Finn, M. G., and Sharpless, K. B. Click chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **40**, 2004-2021 (2001).

3) Husgen, R. Centenary lecture – 1,3-dipolar cycloadditions. *Proc. Chem. Soc., London.* 357-396 (1961).

4) Thomas Gaj, T., Gersbach, C. A., and Barbas III, C. F., ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering, *Trends Biotechnol.* **31**, 397-405 (2013).

5) Hirano N., Muroi T., Takahashi H., and Haruki M., Site-specific recombinases as tools for heterologous gene integration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 227-239 (2011).

第二章

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
合成および薬物送達システムへの利用

2.1 目的

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は、水層中で界面活性剤のような両親媒性分子と有機層が分散して形成される。このナノエマルジョンは経口・非経口の局所作用薬剤として利用できることから、医学・薬学の分野において薬物キャリアとして高い注目を集めている¹⁾。また、ナノエマルジョンは親油性の抗がん剤の送達において、エマルジョンの有機層に親油性の薬剤を溶解させられる点で有利である¹⁾。

薬剤として利用するにあたり、エマルジョンは物理的に安定であることが求められる。しかし、エマルジョンは熱力学的に安定ではなく、時間の経過とともに凝集や層分離などが引き起こされる可能性がある²⁾。エマルジョンの安定性には、粒子径、表面電荷、表面張力などさまざまな要因に影響されることが知られている³⁾。

一章で述べたように、ポリ（ジメチルシロキサン）は高い耐熱性、耐酸化性、生物学的親和性、化学的不活性といった特徴を有するポリマーであり、薬学をはじめとするさまざまな分野で利用されている^{4,5)}。親水性・疎水性それぞれのポリシロキサン誘導体を含む両親媒性ポリシロキサン共重合体は、界面活性剤として広く利用されている⁶⁾。中でも、四級アンモニア基で修飾されたポリシロキサンが合成され、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ほか⁷⁻⁹⁾、両親媒性ポリシロキサンによるナノ粒子の形成や^{10, 11)}、両親媒性アゾポリシロキサンを用いた光感応性ミセルなども報告されている^{12, 13)}。このようなミセル形成能力は、ポリマー鎖の親水性・疎水性基の互いに逆方向への配置を可能にするポリシロキサン鎖の柔軟性に起因するものである。さらに、ポリ（ジメチルシロキサン）-ポリ（2-メチルオキサゾリン）ブロック共重合体を用いたポリマーソームは、細胞への効率的な薬剤送達剤として報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。

健康な組織へのダメージが付随して引き起こされることを避け、薬物送達効率を上昇させるために、対象細胞へ特異的に薬剤を送達することが薬物キャリアには求められている。このような輸送を達成するため、細胞へのターゲティング能力を有するキャリアの研究が広く行われている。一例として、ヒト肝細胞に特異的なウイルスであるB型肝炎ウイルス（HBV）の肝細胞ターゲティング能力が利用されている。HBVをもとに、ヒト肝細胞上のレセプターに特異的に結合するリガンドペプチドをディスプレイした中空ナノ粒子が酵母細胞から作製され、ヒト肝細胞に対しての有効性、および遺伝子または薬剤の特異的な送達が実証されている¹⁷⁾。このような送達を行う際に、標的分子を簡単に、かつ特異的に薬物キャリアの表面に修飾することが出来れば、様々な細胞特異性を有する薬物キャリアの開発には非常に有利である。一章で述べたクリック反

応はこの目的に適した反応であり、さらにミセル形成後にさまざまな分子の導入を行うことも可能である^{18, 19)}。実際、末端にアジドまたはアルキンをも有する両親媒性高分子が合成され、クリック反応可能なポリマーソームとして報告されている^{20, 21)}。また、ポリ(ジメチルシロキサン)-ポリ(2-メチルオキサゾリン)ブロック共重合体をアルキンで機能化したポリマーソームに、クリック反応によりポリグアニル酸をリガンドとして結合し、マクロフェージ表面に過剰発現したスカベンジャー受容体への薬物送達を行った報告もある¹⁶⁾。これらのポリマーはいずれも親水性ブロックの末端にアルキンを導入したものである。末端機能化ブロック共重合体と比較して、ポリマー骨格の側鎖の機能化は高い密度で対象分子を導入することが可能となり、それにより対象細胞との相互作用が強化される。イミダゾールの四級化反応はポリシロキサンへ親水性部位を導入する際に用いられており^{7-9, 12, 13)}、またイミダゾールにアルキンを導入しておくことにより、同時にアルキンによるポリマーの機能化も行えることから、本研究ではアルキンを有するイミダゾール誘導体を用いてポリマーへの親水性基の導入を行った。

以上の背景より、本章ではアルキンで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クリック反応を用いた機能性ナノエマルジョンの作製、および細胞特異的薬物送達を目的とした。

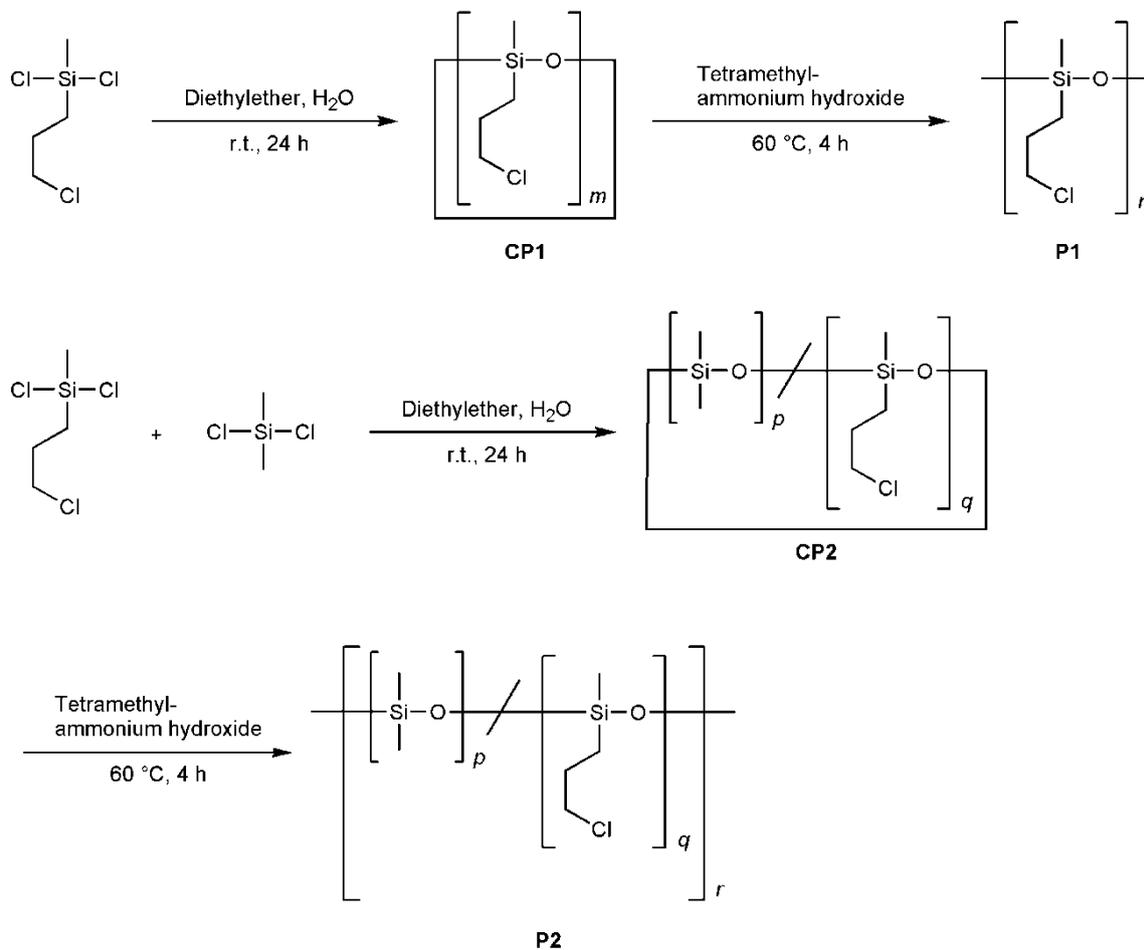
2.2 結果と考察

2.2.1 ポリマーの合成

P1 および **P2** の合成経路を Scheme 2-1 に示す。**P1**, **P2** はそれぞれ水酸化テトラメチルアンモニウム (10%メタノール溶液) を開始剤として用いた **CP1**, **CP2** のアニオン開環重合により得た²²⁾。また、**CP1** は 3-クロロプロピルジクロロメチルシラン、**CP2** はジクロロジメチルシランと 3-クロロプロピルジクロロメチルシランの加水分解および環化反応より得た。

P1 および **P2** は ¹H NMR, ¹³C NMR および IR スペクトルにより構造を確認した。**CP1** および **CP2** のアニオン開環重合の結果を Table 2-1 に示す。**P1** および **P2** は THF, クロロホルム, ジクロロメタン, トルエンなどの汎用有機溶媒に可溶であった。**CP1**, **CP2**, **P1** および **P2** は GPC および NMR により構造を確認した。**P1** および **P2** の数平均分子量は **CP1**, **CP2** の数平均分子量よりそれぞれ大きかったことから、重合が進行したことを確認した。**P1** および **P2** の重合の後、メタノールで再沈殿を行うことにより、低分子量の誘導体である環状二量体や三量体が完全に除去できていることを GPC スペクトルから確認した。**CP1/P1** および **CP2/P2** の ¹H NMR, ¹³C NMR スペクトルを Fig. 2-1, 2-2 に示す。**P1** および **P2** の ¹H NMR, ¹³C NMR スペクトルはそれぞれ **CP1** および **CP2**

のスペクトルと酷似しており、また、それぞれのシグナルおよび積分比は Fig 2-1, 2-2 に示したように帰属された。これらの結果から、アニオン開環重合の際に副反応が起きていないことが示された。



Scheme 2-1 Synthetic pathways of **P1** and **P2**.

Table 2-1 Results of polycondensation and thermal properties of **CP1**, **CP2**, **P1**, **P2**, **Plm1**, **Plm2**.

Results of polycondensation and thermal properties of **P1**, **P2**, **Plm1**, **Plm2**.

Polymer	Yield (%)	Functionality		M_n	M_w / M_n^b	T_g (°C) ^c
		(%) ^a				
CP1	91	-		940, 1800	1.05, 1.07	-
CP2	96	-		1700, 3900	1.09, 1.04	-
P1	78 ^d	-		28000	1.17	-
P2	45 ^d	-		58000	1.36	-
Plm1	89 ^e	96		64000 ^f	-	17
Plm2	59 ^e	32		75000 ^f	-	- ^g

^a Functionality ratio of quaternization.

^b Estimated from SEC eluted with THF based on polystyrene standards.

^c Glass transition temperature determined by differential scanning calorimetry (DSC) at a heating rate of 10 °C min⁻¹ under a nitrogen atmosphere.

^d Insoluble part in methanol.

^e Insoluble part in diethyl ether.

^f Estimated from M_n of **P1** or **P2** and Functionality ratio.

^gNot observed from -50 °C to 400 °C.

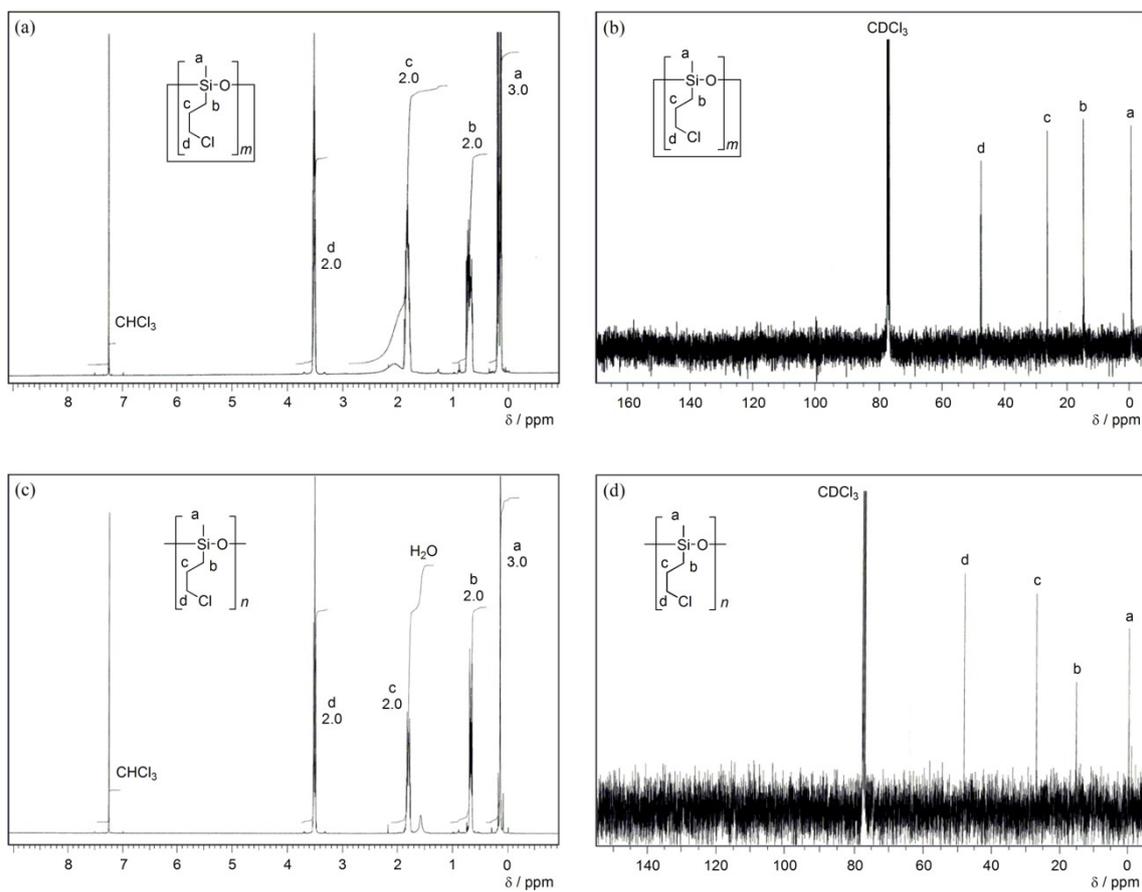


Fig. 2-1 ^1H NMR (400 MHz) spectra of (a) **CP1** and (b) **P1** and ^{13}C NMR (100 MHz) spectra of (c) **CP1** and (d) **P1** in CDCl_3 at ambient temperature.

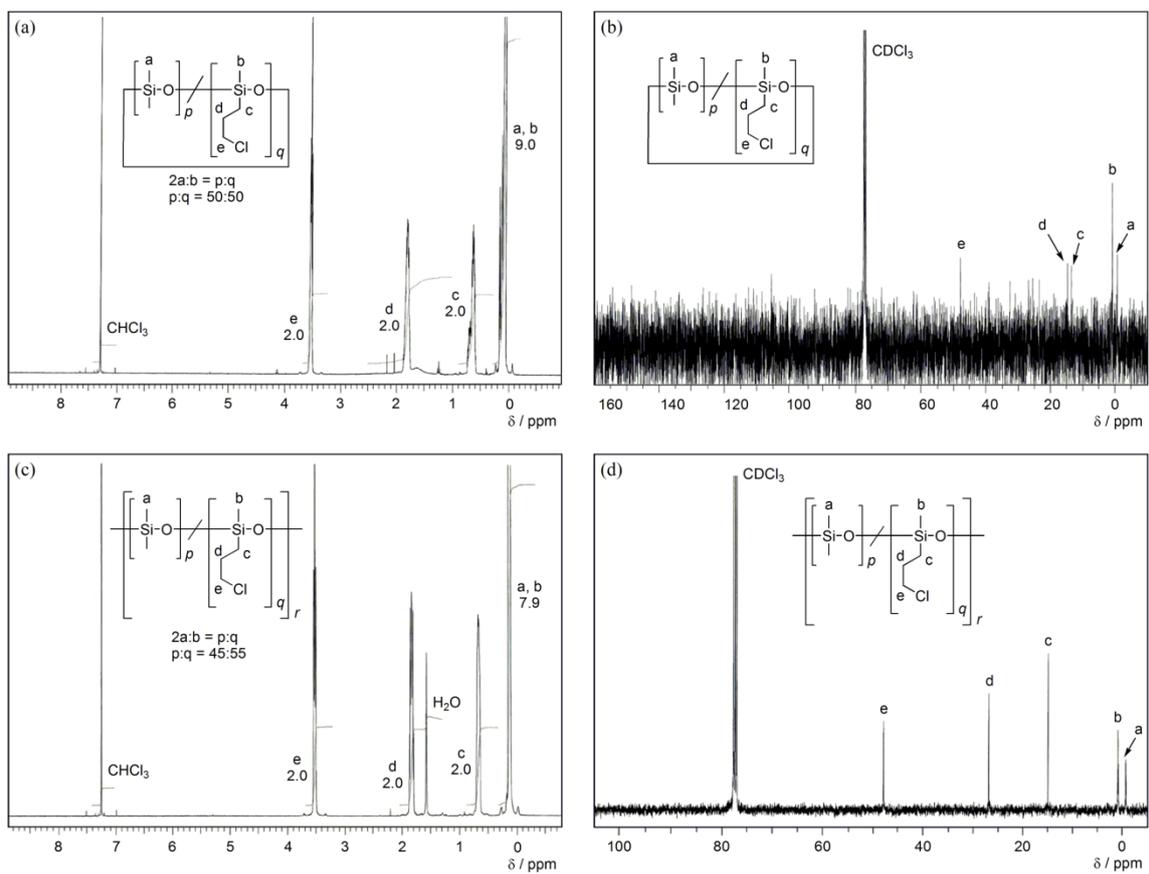
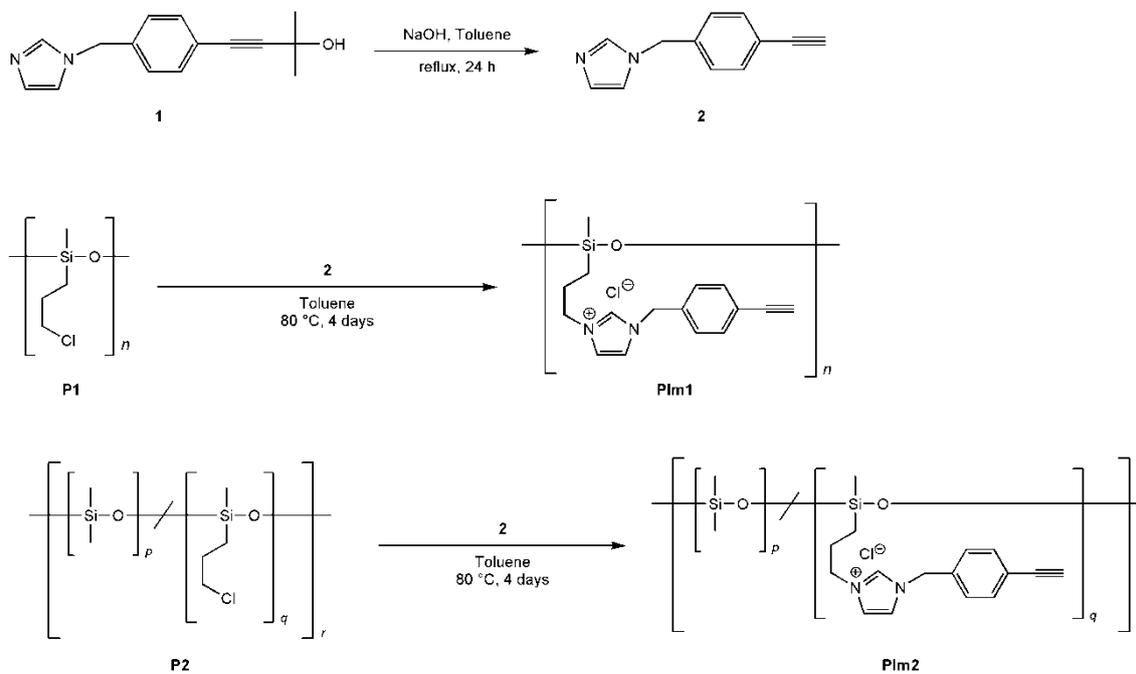


Fig. 2-2 ^1H NMR (400 MHz) spectra of (a) **CP2** and (b) **P2** and ^{13}C NMR (100 MHz) spectra of (c) **CP2** and (d) **P2** in CDCl_3 at ambient temperature.

2.2.2 ポリマー側鎖への四級化反応

Scheme 2-2 に示したように、**P1** および **P2** の側鎖の塩素に対して、作製したイミダゾール誘導体 (**2**) を用いた四級化反応により機能化を行った。四級化反応の進行の確認は、 ^1H NMR および ^{13}C NMR により行った。中でも、**P1** の ^1H NMR における $-\text{CH}_2\text{Cl}$ に起因する 3.51 p.p.m. のシグナルが消失し、**P1m1** の $-\text{CH}_2$ -イミダゾールに起因する 4.33 p.p.m. のシグナル (Figure 2-3a, signal d) が確認された。同様に、**P2** における 3.50 p.p.m. のシグナルが消失し、**P1m2** では 4.16 p.p.m. のシグナル (Figure 2-3c, signal i) が確認された。**P1m1** および **P1m2** の四級化率はそれぞれ ^1H NMR の 3.51 p.p.m. における積分値である $\delta = 4.33$, および 3.50 p.p.m. における積分値である $\delta = 4.16$ から算出した。また、**P2** の ^{13}C NMR (Figure 2-3b, d) では未反応のプロピル基に起因する 51.6, 26.4, 14.5 p.p.m. のシグナルが観測された。Table 2-1 に四級化率から算出した各ポリマーの数平均分子量を示す。**P1m1** と比較して、**P1m2** の四級化率は著しく低かった。この原因として、**P1** は (3-クロロプロピル) シロキサンユニットから成るホモポリマーであり、**P1** のいずれのユニットへも四級化が行えたことが挙げられる。そのため、イミダゾリウム塩の正電荷が高い密度で導入され、正電荷による電気斥力が働き、ポリマー鎖の構造の伸長と官能基の脱離が誘発されたことにより、四級化反応の進行を促進し、高い四級化率につながったと考えられる。その一方、(3-クロロプロピル) シロキサンとジクロロジメチルシランから成る **P2** ではユニットの半分でしか四級化反応が進行していない。この場合、イミダゾリウム塩の正電荷が低い密度で導入されるため、ポリマー鎖の構造の伸長が不十分であったと考えられる。その結果、四級化反応が促進されず、低い四級化率へと繋がったと考えられる。

P1m1 はメタノール、DMSO、DMF、水などの極性溶媒に可溶であった。一方、**P1m2** は極性溶媒だけでなく、クロロホルムやジクロロメタンなどの有機溶媒にも可溶であった。これらの結果は、**P1m1** が **P1m2** と比較して高い密度で四級化した結果と一致する。



Scheme 2-2 Synthetic pathways of **2** and quaternization pathways of **P1** and **P2**.

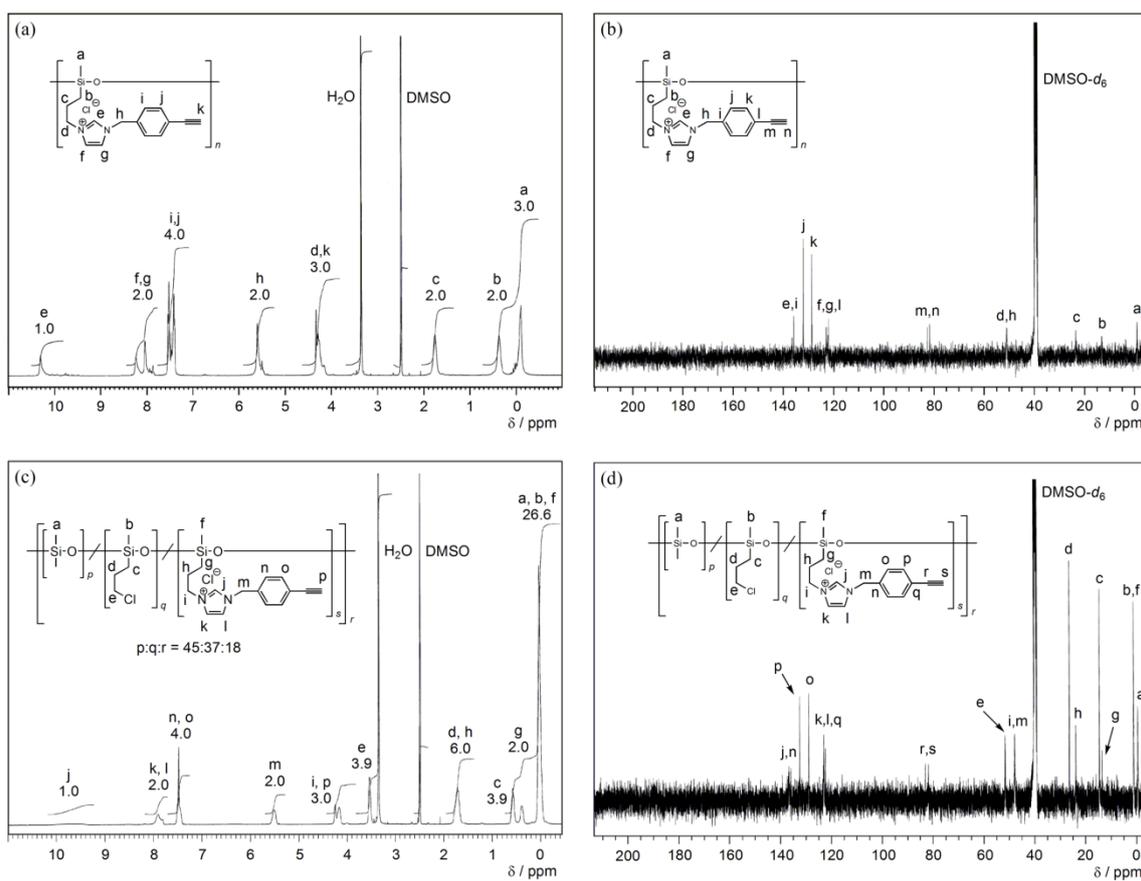


Figure 2-3 ^1H NMR (400 MHz) spectra of (a) **Plm1** and (b) **Plm2** and ^{13}C NMR (100 MHz) spectra of (c) **Plm1** and (d) **Plm2** in CDCl_3 at ambient temperature.

2.2.3 ポリマーの熱物性

Table 2-1 に DSC により測定した **Plm1** および **Plm2** のガラス転移温度 T_g を示す。また、Figure 2-4 に窒素雰囲気下、 $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ の加熱速度における **Plm1** および **Plm2** の 2 回目の DSC 測定結果を示した。**Plm1** の T_g は $17\text{ }^\circ\text{C}$ であったが、**Plm2** では T_g が観測されなかった。しかし、室温における **Plm2** は **Plm1** と同程度の粘着性を有していることから、**Plm1** の T_g と大きく異ならないと考えられる。また、**Plm2** は吸湿性を有していることから、 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 付近の水の固体-液体遷移による吸熱変化との混在が予想される。ポリマーの T_g は薬剤放出に強く影響するという報告があり²³⁾、ガラス状態と比較し、ゴム状態であるポリマーの薬剤拡散率ははるかに高いことから、体温より低い **Plm1** および **Plm2** の T_g は薬剤放出に適していると考えられる。さらに、**Plm1** および **Plm2** の融点は DSC では観測されなかったことから、**Plm1** および **Plm2** は非晶質ポリマーであることが示唆される。そのため、非晶層のみで形成されるナノ粒子は薬剤分子に適合し、薬剤を封入する際に有利に働くと考えられる²⁴⁾。

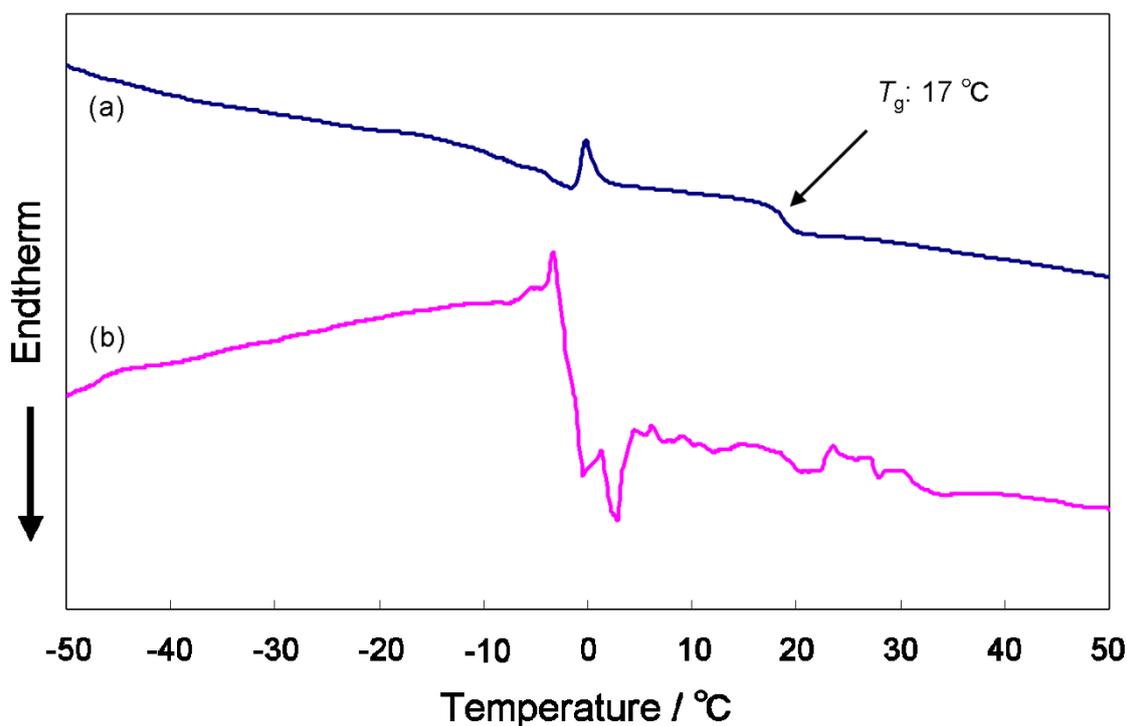


Figure 2-4 DSC traces of (a) **Plm1** and (b) **Plm2** on a second heating scan at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ under a N_2 flow rate of 10 mL min^{-1} .

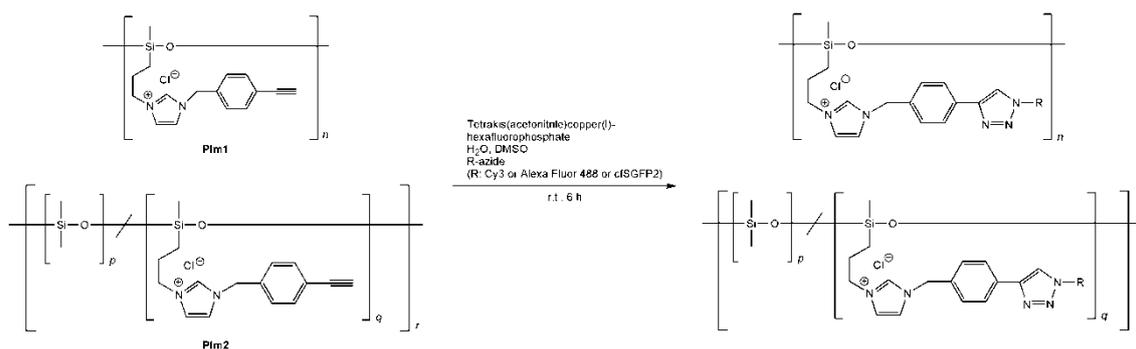
2.2.4 蛍光標識ナノエマルジョンの作製およびその物性

蛍光ラベル分子 (2.0 mol equiv. per polymer) を用いて CuAAC 反応を行った。また、触媒として Cu(I)との複合体である TACH を最終濃度 33.3 μM で加え、CuAAC 反応を促進するトリス-トリアゾール配位子であるトリス-[(1-ベンジル-1-H-1,2,3-トリアゾール-4-イル) メチル] アミンは TACH の 10 等量添加した。Scheme 2-3 に **P1m1** および **P1m2** を用いたラベル化ポリマーの合成経路を示す。また、コントロールとして TACH を加えていないものも作製した。

疎水性であるポリシロキサン鎖と親水性であるイミダゾリウム塩を有するこれらのポリマーは、水中でエマルジョンを形成すると考えられる。実際に大豆油を用い、ポリマーを乳化剤として水中でソニケーションすることにより、o/w 型エマルジョンを形成した。また、未反応のラベル分子および Cu(I)は 0.55 mM EDTA 水溶液により透析することにより除去した。作製したエマルジョンの粒径は~150 nm であった。ポリマーとリガンドの共有結合形成は、一般的にはクリック反応により生成したトリアゾール環の検出で確認することができる。しかしながら今回の場合は、UV または IR スペクトルではトリアゾール環とイミダゾール環に由来するシグナルが重なっていることから確認ができなかった。また、NMR スペクトルでは十分な量を得ることが出来ないことから測定が行えなかった。そこで、エマルジョン表面に結合した蛍光分子を蛍光顕微鏡により観測することで確認した。Figure 2-5 に **P1m2** から形成したエマルジョンの画像を示す。また、**P1m1** を用いた場合も、同様にエマルジョンを形成した。ラベル分子として Cy3 および cfSGFP2 を用いた場合、エマルジョン表面に蛍光が確認された (Figure 2-5a, c)。一方、コントロールである Cu(I)触媒 (TACH) が不在状態で各ポリマーとアジド化蛍光分子を反応させた場合はエマルジョンの蛍光は観測されなかったことから、蛍光ラベルがポリマーへ物理的に吸着していないことが示唆された。これらの結果から、エマルジョン表面に蛍光ラベル分子が共有結合していることが示唆された²⁰⁾。Alexa Fluor 488 を結合した場合は、TACH の有無に関係なく蛍光が観測された。これはポリマー中のイミダゾリウム塩の正電荷に対して、多価の負電荷を有する Alexa Fluor 488 がイオン間相互作用により結合したと考えられる。そこで CuAAC 反応の後、陰イオン交換樹脂を用いて未反応のラベル分子を除去したところ、TACH を加えたもののみ Alexa Fluor 488 の蛍光が観測された (Figure 2-5b)。また cfSGFP2 を結合する際に、ポリマーとタンパク質間の疎水性相互作用によると考えられるタンパク質の凝集が見られたが、最終濃度 20 % v/v のグリセロールを加えることにより、凝集が解消された。

エマルジョンの薬剤封入能力についてはナイルレッドをモデル薬物として用いることにより評価した。ナイルレッドはソルバトクロミックな色素であり、

無極性溶媒中で強い蛍光を示す。ナイルレッドを大豆油に溶解して **PIm2** により乳化したところ、無極性溶媒中のナイルレッドに起因する蛍光が観測されたことから、エマルジョン中にナイルレッドが封入されていることが示された (Figure 2-6)。また、将来的に薬剤積載能力、安定性、対象細胞への輸送、エマルジョンの薬剤放出挙動の解明を行うことに焦点を当てていきたいと考える。



Scheme 2-3 The CuAAC reaction of **PIm1** and **PIm2** with azide-functionalized fluorescent molecules.

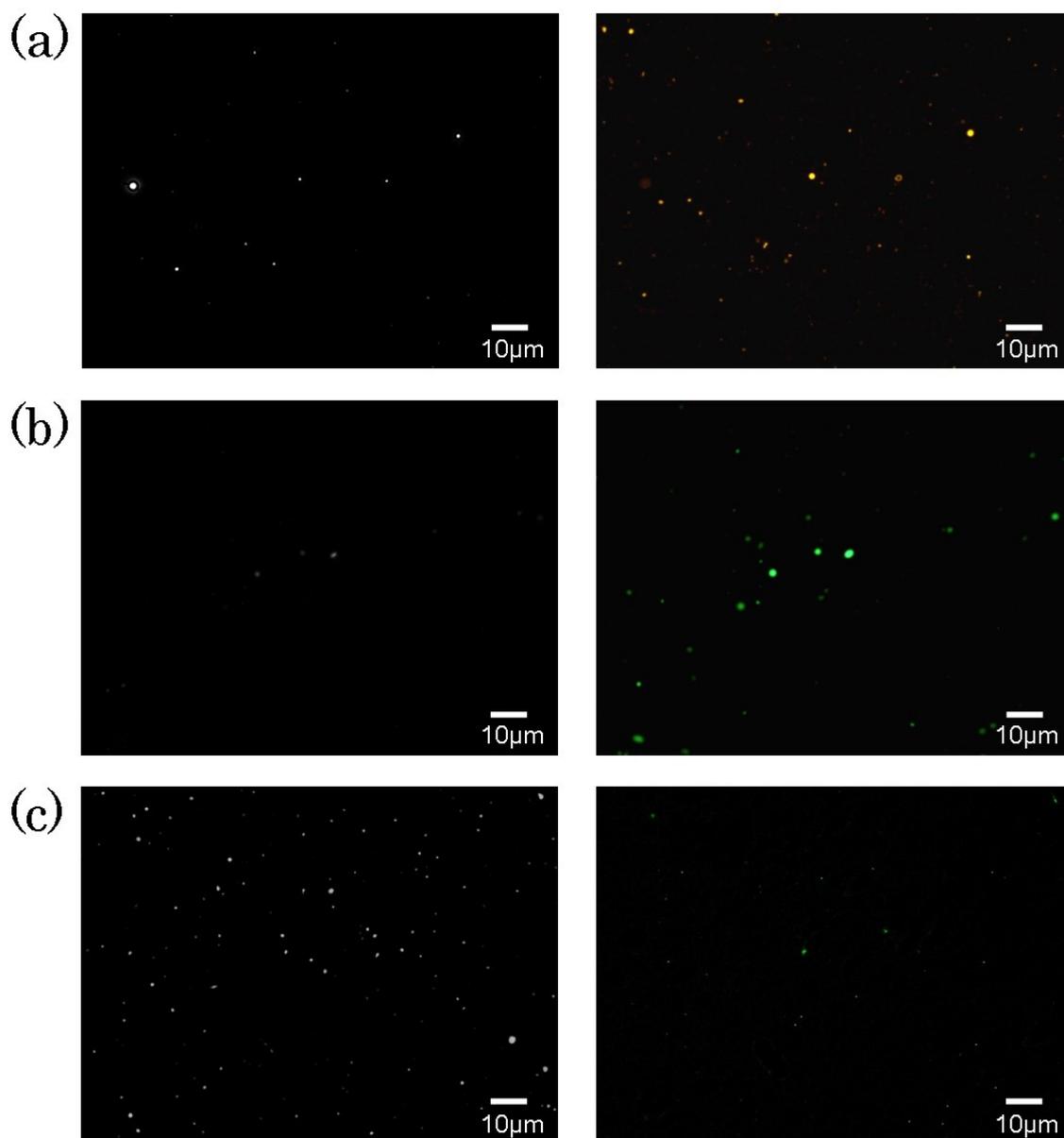


Figure 2-5 Transmission (left) and fluorescence (right) microscopy images ($\times 400$) of (a) Cy3-, (b) Alexa Fluor 488- and (c) cfSGFP2-functionalized emulsions.

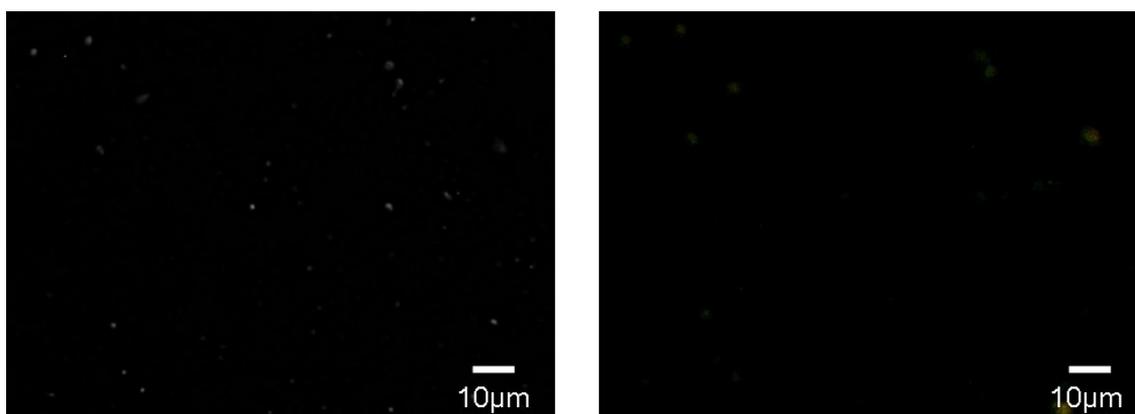


Figure 2-6 Transmission (left) and fluorescence (right) microscopy images ($\times 400$) of emulsion encapsulating Nile red.

2.2.5 CuAAC 反応によるラクトースの付加

作製したナノエマルジョンを薬物キャリアに利用するためのモデルとして、肝細胞を用いて細胞への取り込みを評価した。ガラクトースや、ラクトースなどのガラクトースを含む糖鎖は、肝細胞表面に発現しているアシアロ糖タンパク質レセプターに結合することが知られていることから²⁵⁾、ラクトース結合ポリマーの作製を行った。**P1m1** と 1-アジド-1-デオキシ- β -D-ラクトピラノシド (2.0 mol equiv. per polymer) を用いた CuAAC 反応の合成経路を Fig. 2-7 に示す。ラベル分子を用いた CuAAC 反応と同様に、触媒である Cu(I)複合体の TACH および CuAAC 反応の進行を促進するトリス-トリアゾール配位子である TBTA を最終濃度 333 μ M で用い、未反応のラベル分子および Cu(I)は 0.55 mM EDTA 水溶液にて透析することにより除去した。**P1m1** とラクトースの結合により生成するトリアゾール環は、UV および IR スペクトルではイミダゾール環のシグナルと重なり合うために検出できず、また NMR では十分な量を得ることが出来ないことから確認することが出来なかった。そのため、**P1m1** とラクトースの結合は、オリゴ糖側鎖のガラクトースまたは GalNac 残基と結合するピーナッツレクチン-HRP を用いた Enzyme-Linkd Lectin Assay (ELLA) により確認した。**P1m1** およびビオチン化 DNA の複合体をストレプトアビジンでコートしたマイクロタイタープレート上に固定化し、ラクトース結合 **P1m1** をピーナッツレクチン-HRP を用いた比色分析により測定したところ、**P1m1** と比較してラクトースを結合した **P1m1** (**P1m1-Lac1**) では、著しい発色が確認された (Fig. 2-8)。さらに、ラクトース存在下では、**P1m1** に対するレクチンの結合量に変化は見られなかったが、**P1m1-Lac1** ではレクチンの結合量が減少した (Fig. 2-8)。以上の

結果から, **P1m1** へのラクトース付加を確認することができた。

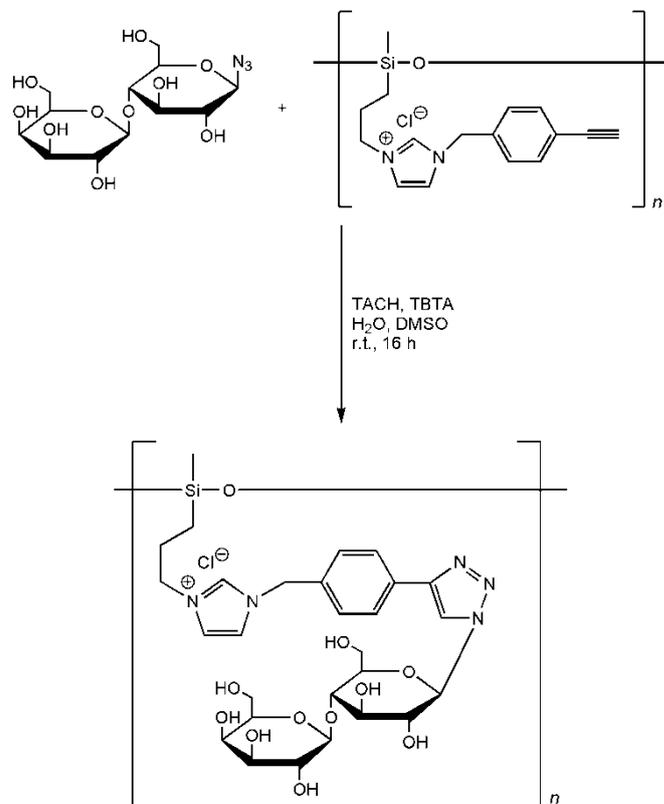


Fig. 2-7 The CuAAC reaction of **P1m1** with azide-functionalized lactose molecules.

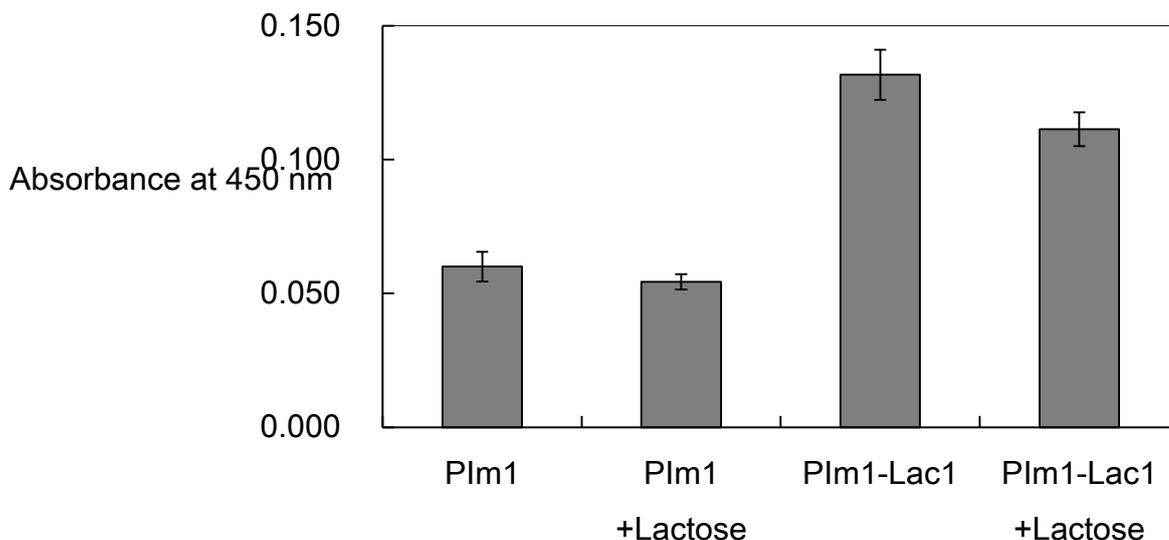


Fig. 2-8 Enzyme-linked lectin assay (ELLA) of **Plm1** conjugated with lactose. Data represent the mean value from $n = 3$, and the standard error from the mean.

2.2.6 細胞生存試験

ポリマーを薬物キャリアとして用いるにあたり細胞毒性は重要である。一般的に遊離のポリマーは、ナノエマルジョンより高い細胞毒性を有する。そこで、MTT 試験を行って細胞生存率を求めることにより、HepG2 細胞に対する **Plm1** および **Plm1-Lac1** の細胞毒性を算出した (Fig. 2-9)。5 時間のインキュベーションでは両方のポリマーで~80%以上の高い生存率を示し、細胞毒性が低い、あるいは無いことが示された。一方、24 時間のインキュベーションでは **Plm1** 濃度が $4.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ であっても~60%の細胞生存率となり、比較的高い細胞毒性が認められた。ポリマーにおける高い正電荷の濃度により、強い細胞毒性に結びつくことが報告されており²⁸⁾、四級化率が 96%の **Plm1** の細胞毒性は、完全に四級化されたポリ (4-ビニルピリジン) を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ より高い濃度で加えて 24 時間インキュベートした場合の細胞毒性²⁹⁾と同程度であった。一方、**Plm1-Lac1** を濃度 $4.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ で、24 時間のインキュベーションを行った場合には有意な細胞毒性は見られなかった。これらの結果はラクトースを結合したことで **Plm1** の細胞毒性が減少したことを示唆している。これは、ラクトースの結合により細胞毒性を引き起こすと思われるポリマーの正電荷と細胞膜の負電荷間の相互作用を阻害したことが原因であると考えられる²⁸⁾。しかしながら、 $4.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ よりも高い濃度では比較的高い細胞毒性がみられたので、薬物キャリアとして

用いるにあたって、細胞毒性をさらに低下させるために、PEI の細胞毒性を低下するために用いられるポリエチレングリコールなどの非イオン性かつ親水性のポリマーと共有結合することが挙げられる³⁰⁾。

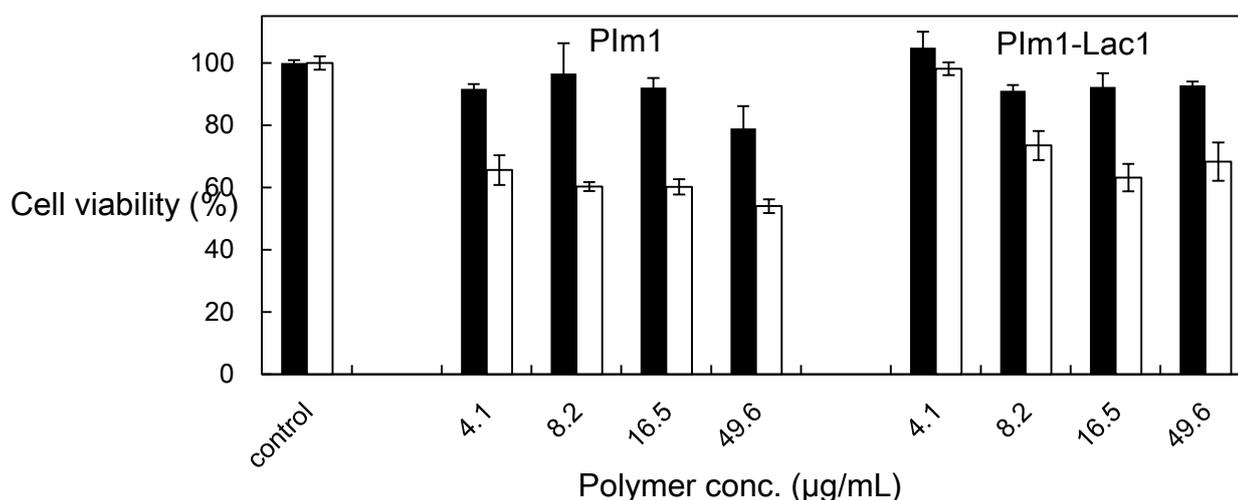


Fig. 2-9 HepG2 cell viability at various polymer concentrations. The cells were cultured for 5 h (closed bars) or 24 h (open bars) in the presence of different concentrations of the polymer.

2.2.7 HepG2 細胞へのナノエマルジョンの取り込み

作製した **Plm1-Lac1** および **Alexa Fluor 488-Plm1** を 1:1 で混合した後、エマルジョンの作製を行った後、得られたエマルジョンを用いてヒト肝臓癌細胞である HepG2 細胞への細胞特異的薬剤送達が行えるかを蛍光顕微鏡により観測することで検討を行った。その結果、**Plm1-Lac1** および **Alexa Fluor 488-Plm1** から作製したエマルジョンは Alexa Fluor 488 に由来する蛍光を細胞内で観測することが出来た一方、**Alexa Fluor 488-Plm1** のみから作製したエマルジョンでは特徴的な蛍光は見られなかった (Fig. 2-10)。この結果から、**Plm1** にラクトースを付加することにより、HepG2 細胞への導入が促進されることが示された。

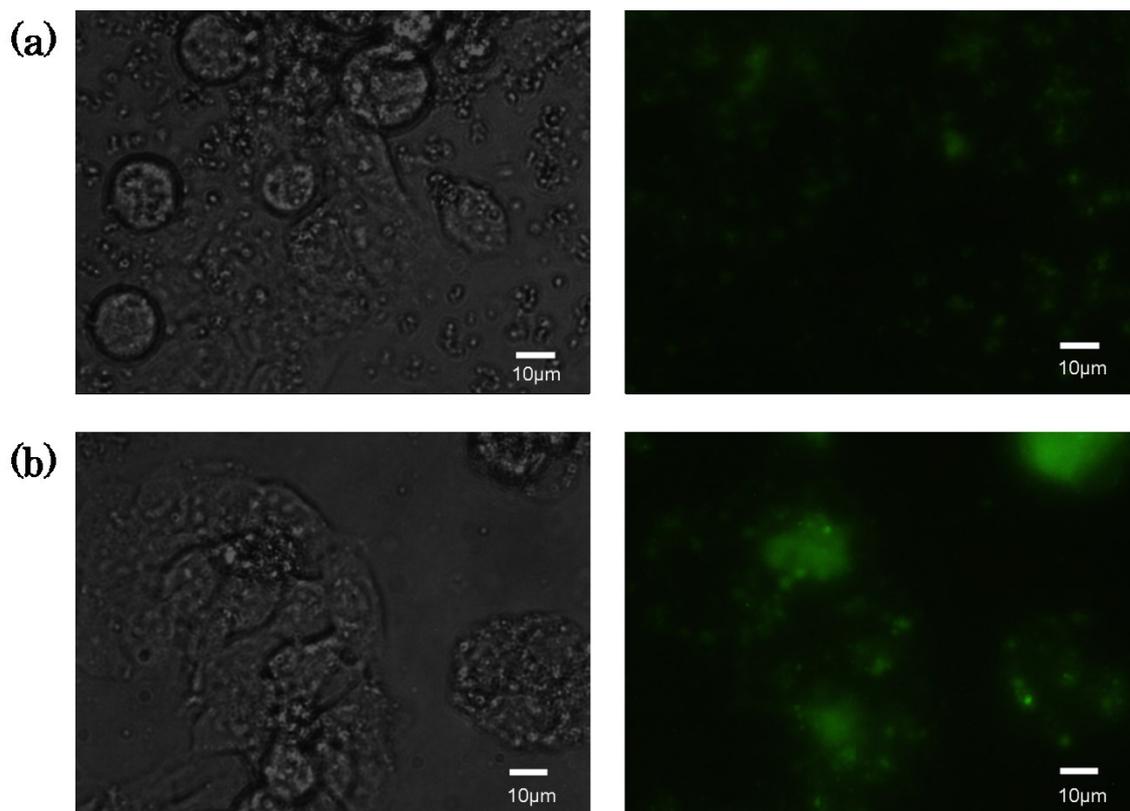


Fig. 2-10 Transmission (left) and fluorescence (right) microscopy images ($\times 400$) of (a) Alexa Fluor 488- and (b) Alexa Fluor 488- and Lactose-functionalized emulsions.

2.2.8 ラクトース結合ポリマーを用いた細胞への遺伝子送達

疾患の治療を目的とした細胞特異的な送達システムには、薬物だけでなく遺伝子治療を目的とする遺伝子の送達に関する研究も頻繁に行われている。遺伝子送達に用いられるキャリアとしてウイルス性ベクターと非ウイルス性ベクターが挙げられ、非ウイルス性ベクターは低い免疫原性、病原性の欠如、高い遺伝子積載効率からウイルス性ベクターより優れているものの、遺伝子送達効率が低いことから臨床応用のために改善が必要である³¹⁾。このような非ウイルス性ベクターとして、ポリエチレンイミン (PEI)^{32, 33)}をはじめとする様々なカチオン性ポリマーが用いられている。本研究で作製した **P1m1** にはイミダゾリウム基が含まれていることからカチオン性を有しており、また様々な分子をポリマー上に修飾することが可能であることから、細胞特異的遺伝子キャリアとしても用いることが出来ると考えられる。そこでまず、**P1m1** とそのラクトース結合誘導体が DNA と結合することを、アガロースゲル電気泳動を用いたゲルシフト

アッセイにより確認した。

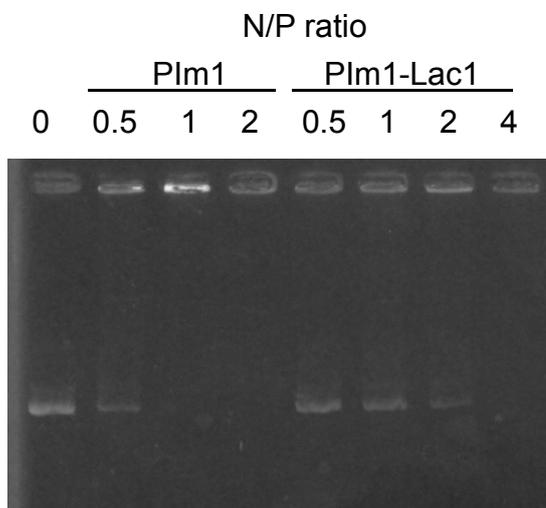


Fig. 2-11 Agarose gel shift assay of the formation of the complex between pDNA and the polymers. Polymer/pDNA mixtures at different unit ratios relative to imidazole groups of polymer per phosphate group of DNA (N/P ratio) were analyzed by gel electrophoresis through 1% (w/v) agarose, followed by staining with ethidium bromide.

その結果、**Plm1** は、ポリマーのイミダゾリウム基と DNA のリン酸基の比率 (N/P 比) が 1 以上の場合に完全にシフトしてバンドが消失した (Fig. 2-11)。したがって、このような場合に **Plm1** と DNA が複合体を形成することが示された。これに対し、**Plm1-Lac1** の場合には N/P 比が 4 以上の場合に完全にシフトしてバンドが消失した (Fig. 2-11)。このことは、**Plm1-Lac1** は **Plm1** に比べて DNA との結合が弱いことを示唆している。これは、ラクトースの付加により立体障害が生じ、ポリマーと DNA の結合が阻害されたためと考えられる。

次に、**Cy3-Plm1** および **Plm1-Lac1**、または **Cy3-Plm1** および **Plm1** を混合し、DNA との複合体を形成した後、HepG2 細胞に加えて蛍光顕微鏡にて Cy3 由来の蛍光を観測することにより、細胞内への取り込みが行われるか検討を行った。その結果、**Plm1-Lac1** および **Cy3-Plm1** から作製した DNA 複合体では Cy3 に起因する蛍光が細胞内で多くみられたのに対し、**Plm1** および **Cy3-Plm1** から作製した DNA 複合体では Cy3 に起因する蛍光は細胞内にはあまりみられなかった (Fig. 2-12)。このことから、**Plm1** にラクトースを付加することにより、HepG2 細胞への導入が促進されることが示された。しかしながら、アジア

ロ糖タンパク質レセプター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（data not shown），ラクトース付加による **Plm1** の HepG2 細胞への取り込み促進には，アシアロ糖タンパク質レセプター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。その要因の解明については今後の課題である。

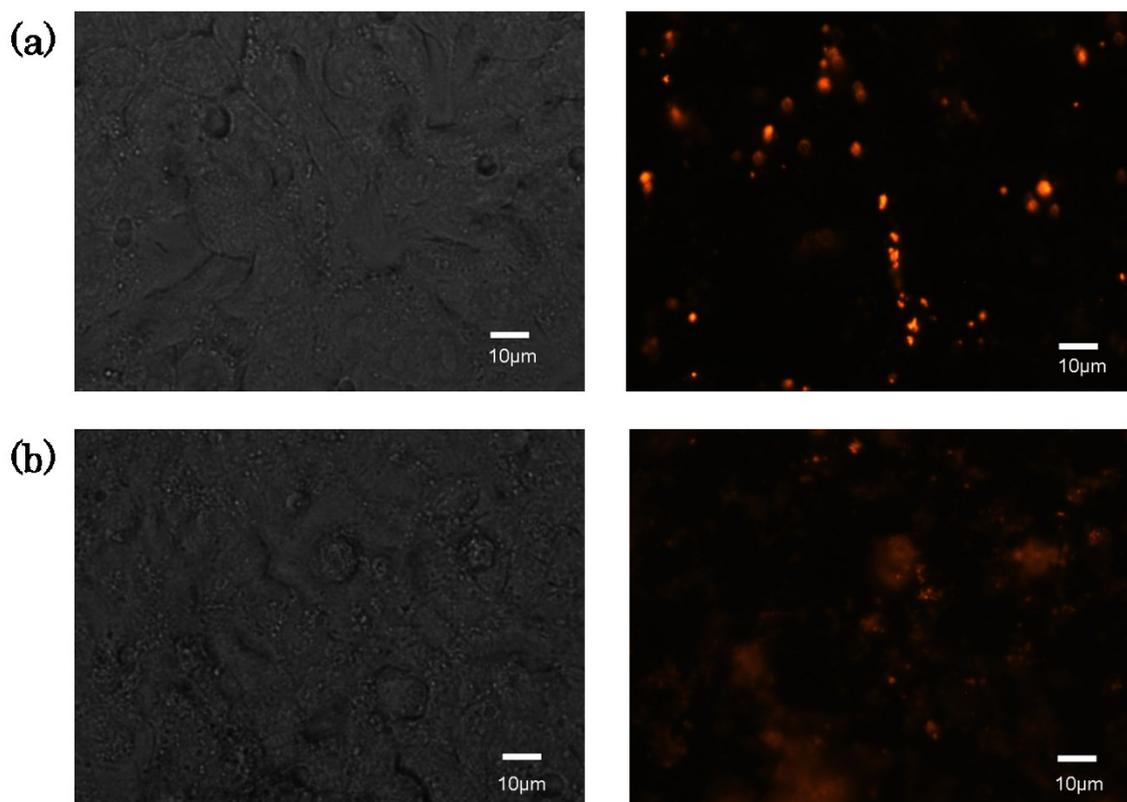


Fig. 2-12 Transmission (left) and fluorescence (right) microscopy images ($\times 400$) of (a) Cy3- and (b) Cy3- and Lactose-functionalized DNA complexes.

2.3 結論

これまでに、アルキンで機能化されたポリ（ジメチルシロキサン）-ポリ（2-メチルオキサゾリン）ブロック共重合体が合成され、クリック反応可能なポリマーソームとして報告されている¹⁶⁾。このポリマーは、それぞれの末端にアルキン基が導入されている。一方、本研究で作製したポリマーは多くのアルキン基により機能化されている。これにより、形成したエマルジョン中に高い密度で標的分子や蛍光分子を導入でき、標的細胞への薬剤送達や生体内での検出を可能にすると考えられる。高密度なアルキンの機能化として、親水性部であるポリアクリル酸ブロックの側鎖に、カルボジイミドカップリング反応によりアルキン誘導体を結合した例が報告されている¹⁸⁾。本研究で得られた、アルキンで機能化された両親媒性高分子は、四級化反応によりアルキンでの機能化と親水性の導入を同時に導入することでより簡易に得ることが出来ることから、大きなスケールで薬物キャリアの合成を行うのに有利である。また、作製したポリマーに蛍光分子およびラクトースを CuAAC 反応により付加して形成したナノエマルジョンおよび DNA 複合体を肝細胞に導入することが出来た。今回行ったラクトース付加は、肝細胞への特異的送達へは不十分であると考えられ、今後さらなる検討が必要である。しかしながら、CuAAC 反応によりターゲティング分子を付加出来る薬剤送達用ポリマーを開発するという本研究の目的は十分達成されたと判断される。以上のことから、本研究で得られた四級化イミダゾリウム塩を有するポリマーは将来性が期待される薬物キャリアであると考えられる。

2.4 実験項

試薬

N-(4-Bromobenzyl)imidazoleおよび4-bromobenzylbromideは既報に従い合成した³⁴。Tetrahydrofuran, diethyl etherおよびtoluene (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) はナトリウムを用いた蒸留の後使用した。Dimethyl sulfoxide (Kanto Chemical) は水酸化カルシウムを用いた蒸留の後使用した。Imidazole (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan), potassium hydroxide, triphenylphosphine, triethylamine, sodium hydroxide (Kanto Chemical), 1-butyn-3-methyl-3-ol, copper (I) iodide, 大豆油, Nile red (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan), 4-bromobenzylbromide, bis(triphenylphosphine)palladium (II) dichloride, 3-chloropropylmethyldichlorosilane, tetramethylammonium hydroxide solution in methanol and dichlorodimethylsilane (Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan), tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine, tetrakis(acetonitrile)copper (I) hexafluorophosphate (TACH), 1-azido-1-deoxy- β -D-kactopyranoside (Sigma-Aldrich Japan, Tokyo, Japan), Alexa Fluor 488 azide, Cy3 azideおよび3-(azidotetra(ethyleneoxy))propionic acid succinimidyl ester (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), Triton X-100 (MP Bio Japan K.K., Japan), Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS) (Life Technologies Japan, Japan), およびstreptavidin (Vector Laboratories Inc., USA) は購入した試薬を実験に使用した。試薬は研究用グレードものを使用した。

測定方法

¹H および ¹³C NMR スペクトルは室温下, deuterated chloroform (CDCl₃) または dimethyl sulfoxide ((CD₃)₂SO) 中で Bruker AVANCE 400F spectrometer (Ettlingen, Germany) により測定した。IR スペクトルは Perkin-Elmer Spectrum One Fourier transform-IR spectrometer (Waltham, MA, USA) により測定した。融点およびガラス転移温度 (T_g) は differential scanning calorimetry (DSC) により, Rigaku ThermoPlus DSC 8230 (Tokyo, Japan) を用いて窒素流量 10 ml min⁻¹, 加熱速度 10 °C min⁻¹ で測定した。数平均分子量および重量平均分子量は size-exclusion chromatography により, テトラヒドロフラン中, 移動層として polystyrene gel columns (a pair of Shodex GPC LF-804) を用い, Showa Denko Shodex GPC-101 system (Tokyo, Japan) により測定した。また, スタンダードとしてポリスチレンを用いた。Gas chromatography-mass spectroscopy は Agilent 6890/5973 instrument (Santa Clara, CA, USA) により測定した。エマルジョンの蛍光挙動は励起波

長 488 nm (Alexa Fluor 488 および cfSGFP2) または 550nm (Cy3 および Nile red) で, Olympus Inverted microscope IX71 (Tokyo, Japan) により観測した。吸光度は iMark Microplate reader (BIO-RAD, USA) および UV-VIS spectrophotometer (JASCO Corp., Japan) によって測定した。

アジドで機能化された緑色蛍光タンパク質の作製

システインフリーな緑色蛍光タンパク質であるcfSGFP2は*E. coli* DH5 α 細胞中で発現を行い, 既報に従い精製した³⁵⁾。また, cfSGFP2発現プラスミドは福島県立医大 和田郁夫 先生から寄贈されたものである。室温下, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で0.4 mM cfSGFP2, 10 mM 3-(azidotetra(ethyleneoxy)) propionic acid succinimidyl esterを1時間反応することにより, アジド基をcfSGFP2のN末端のアミノ基に導入した。未反応のsuccinimidyl esterはPBSを用いて一晩透析することにより除去した。

N-(4-[3-hydroxy-3-methyl-1-butynyl]benzyl)imidazole (1) の合成

窒素雰囲気下, tetrahydrofuran 50 ml中で, *N*-(4-bromobenzyl)imidazole (1.8 g, 7.6 mmol) , bis(triphenylphosphine)palladium dichloride (270 mg, 0.38 mmol) , triphenylphosphine (50 mg, 1.9 mmol) , 1-butyn-3-methyl-3-ol (1.2 ml, 12 mmol) , およびtriethylamine (1.6 ml) を室温にて20分攪拌した³⁶⁾。次に, 反応溶液中にcopper (I) iodide (18mg, 97 mmol) を加え, 70 °Cで24時間攪拌した。

その後, 反応溶液をセライトろ過し, 減圧乾燥を行った。残渣をクロロホルム中に溶解し, 飽和食塩水にて何度か洗浄を行った後, 無水硫酸ナトリウムにて脱水, ろ過した。ろ液を減圧乾燥し, さらにクロロホルム/メタノール混合溶媒 (v/v = 16:1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー, およびクロロホルム/ヘキサン混合溶媒にて再結晶を行うことにより精製したところ, 白色結晶である **1** を 1.20 g (66 %) で得た。¹H および ¹³C-NMR スペクトルを Fig. S1 に示す。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ (p.p.m.) = 7.55 (s, 1H, imidazole proton), 7.36 (d, J = 8.3, 2H, phenyl protons), 7.10 (s, 1H, imidazole proton), 7.04 (d, J = 8.4, 2H, phenyl protons), 6.87 (s, 1H, imidazole proton), 5.09 (s, 2H, Ph-CH₂-imidazole), 3.33 (br s, 1H, -OH), 1.62 (s, 6H, -CH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ (p.p.m.) = 137.4, 136.0, 132.2, 129.8, 127.1, 123.0, 119.3, 95.0, 81.1, 65.3, 50.5, 31.5. IR (KBr, cm⁻¹): 3350 (-OH).

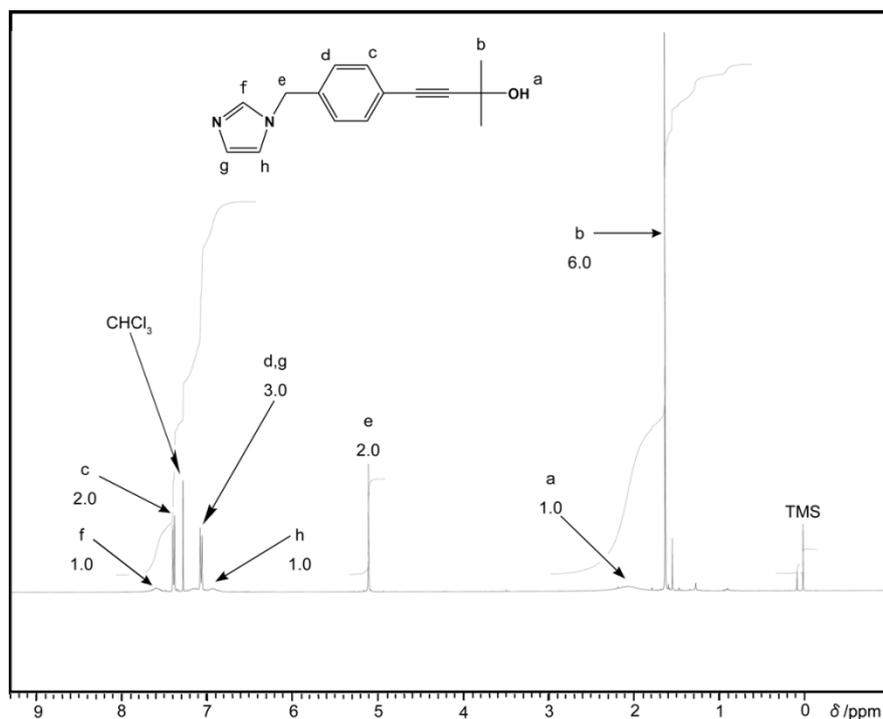


Fig. S1 ^1H -NMR (solvent: CDCl_3 , 400 MHz) of **1** at ambient temperature.

N-(4-ethynylbenzyl)imidazole (**2**) の合成

窒素雰囲気下、**1** (1.2 g, 5.0 mmol) をトルエン25 mlに溶解し、sodium hydroxide (0.19 g, 4.8 mmol) を加えた後、懸濁液を20時間還流した。反応溶液を水中に加え、クロロホルムにより抽出を行った後、有機層を飽和食塩水にて何度か洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて脱水、ろ過した。ろ液を減圧乾燥し、さらにクロロホルム/メタノール混合溶媒 (v/v = 16:1) を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィー ($R_f = 0.57$)、およびクロロホルム/ヘキサン混合溶媒にて再結晶を行うことにより精製したところ、白色結晶である**2**を0.74 g (82%) で得た。 ^1H および ^{13}C -NMRスペクトルをFig. S2に示す。

^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ (p.p.m.) = 7.56 (s, 1H, imidazole proton), 7.48 (d, $J = 8.2$, 2H, phenyl protons), 7.10 (d, $J = 8.2$, 2H, phenyl protons), 7.06 (s, 1H, imidazole proton), 6.89 (s, 1H, imidazole proton), 5.12 (s, 2H, Ph- CH_2 -imidazole), 3.09 (s, 1H, -CH). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ (p.p.m.) = 137.0, 136.3, 132.2, 129.5, 126.6, 121.6, 116.7, 82.3, 77.5, 49.9. IR (KBr, cm^{-1}): 3200 (alkyne C-H), 2100 (alkyne C-C).

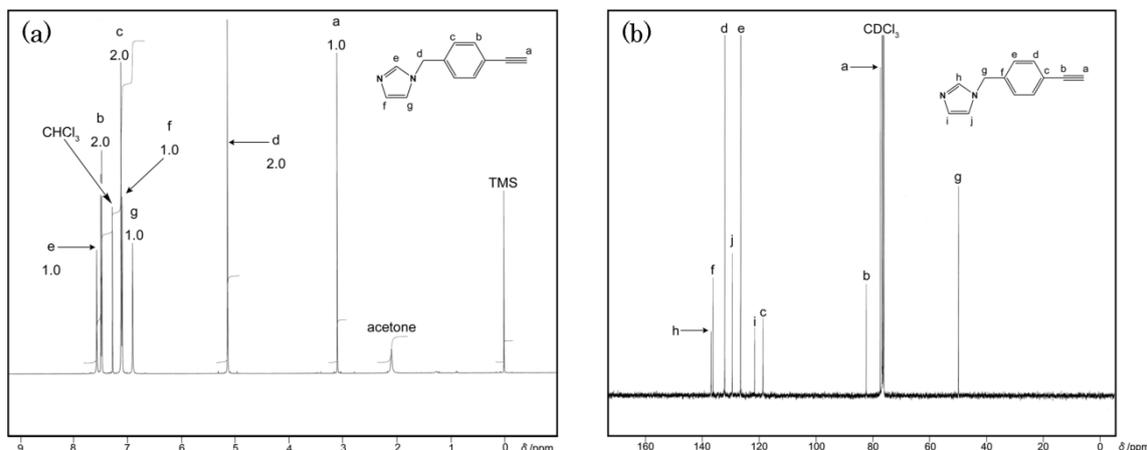


Fig. S2 (a) ¹H-NMR (solvent: CDCl₃, 400 MHz) and (b) ¹³C-NMR (solvent: CDCl₃, 100 MHz) of **2** at ambient temperature.

Cyclic oligomer (CP1) の合成

窒素雰囲気下，0 °Cにてジエチルエーテル 36mlに溶解した 3-chloropropyldichloromethylsilane (6.0 ml, 38mmol) を水 (36 ml) に滴下した²¹⁾後，混合溶液を室温にて24時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルにより抽出を行った後，有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて何度か洗浄し，無水硫酸ナトリウムにて脱水，ろ過した。ろ液を減圧乾燥したところ，無色の液体である**CP1**を4.7 g (91 %) で得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ(p.p.m.) = 3.53 (m, 2H, Si(CH₂)₂CH₂Cl), 1.83 (m, 2H, SiCH₂CH₂-), 0.72 (m, 2H, SiCH₂-), 0.12 (m, 3H, SiCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ(p.p.m.) = 47.6, 26.4, 14.6, -0.5. IR (NaCl, cm⁻¹): 1080 (Si-O).

Homopolymer (P1) の合成

窒素雰囲気下，**CP1** (5.2 g, 38 mmol) にtetramethylammonium hydroxide (10 %メタノール溶液) を5滴加え，60 °C，4時間攪拌した。反応溶液を少量のクロロホルムに溶解し，メタノール (150 ml) に加えて再沈殿を行うことにより，無色の沈殿として**P1**を4.0 g (78 %) で得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ(p.p.m.) = 3.51 (m, 2H, Si(CH₂)₂CH₂Cl), 1.78 (m, 2H, SiCH₂CH₂-), 0.67 (m, 2H, SiCH₂-), 0.12 (m, 3H, SiCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ(p.p.m.) = 47.6, 26.7, 15.0, 0.3. IR (NaCl, cm⁻¹): 1080 (Si-O).

Quaternized homopolymer (P1m1) の合成

Dimethyl sulfoxide 1.8 mlに溶解した**P1** (0.15 g, 1.5 mmol) および *N*-(4-ethynylbenzyl) imidazole (**2**) (0.44 g, 2.4 mmol) を10 mlのナスフラスコに入れ、ナスフラスコを密封した。凍結-溶解を三度行うことにより脱気を行い、減圧下、混合溶液を80 °Cで4日間攪拌した。反応溶液を少量のメタノールに溶解し、ジエチルエーテル中に加えて再沈殿を行うことにより、茶色の沈殿として**P1m1**を0.33 g (89 %) で得た。

¹H NMR ((CD₃)₂SO, 400 MHz): δ(p.p.m.) = 10.29 (s, 1H, imidazole proton), 8.23 (s, 1H, imidazole proton), 8.04 (s, 1H, imidazole proton), 7.52 (d, *J* = 7.6, 2H, phenyl protons), 7.40 (d, *J* = 7.5, 2H, phenyl protons), 5.60 (s, 2H, benzyl protons), 4.33 (s, 2H, Si(CH₂)₂CH₂-), 4.17 (s, 1H, alkynyl proton), 1.76 (s, 2H, SiCH₂CH₂-), 0.38 (s, 2H, SiCH₂-), 0.10 (s, 3H, SiCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ(p.p.m.) = 135.8, 132.1, 132.0, 128.7, 122.9, 122.3, 122.0, 82.7, 81.7, 51.1, 41.2, 23.6, 13.3, -0.8. IR (NaCl, cm⁻¹): 3290 (alkyne C-H), 2100 (alkyne C-C), 1080 (Si-O).

Cyclic co-oligomer (CP2) の合成

窒素雰囲気下, 0 °Cにてジエチルエーテル 13 mlに溶解した 3-chloropropyldichloromethylsilane (4.1 ml, 26 mmol) および dichlorodimethylsilane (3.1 ml, 26 mmol) を水 (20 ml) に滴下した後、混合溶液を室温にて24時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルにより抽出を行った後、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて何度か洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて脱水、ろ過した。ろ液を減圧乾燥したところ、無色の液体である**CP2**を 5.25 g (96 %) で得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ(p.p.m.) = 3.54 (m, 2H, Si(CH₂)₂CH₂), 1.81 (m, 2H, -SiCH₂CH₂-), 0.65 (m, 2H, -SiCH₂-), 0.09 (m, 9H, SiCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ(p.p.m.) = 47.6, 14.6, 13.4, 0.7, -0.7. IR (NaCl, cm⁻¹): 1079 (Si-O).

Random copolymer (P2) の合成

P2は**P1**と同様の方法で**CP2** (5.3 g, 25 mmol) を用いて合成を行った。その結果、**P2**を茶色の沈殿として2.32 g (45 %) で得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ(p.p.m.) = 3.50 (m, 2H, Si(CH₂)₂CH₂), 1.80 (m, 2H, -SiCH₂CH₂-), 0.64 (m, 2H, -SiCH₂-), 0.09 (m, 9H, SiCH₃). ¹³C NMR (CDCl₃, 100 MHz): δ(p.p.m.) = 47.3, 26.4, 14.7, 0.8, -0.8. IR (NaCl, cm⁻¹): 1080 (Si-O).

Quaternized copolymer (Plm2)の合成

Plm2はPlm1と同様の方法でP2 (5.3 g, 25 mmol) および2を用いて合成を行った。その結果、Plm2を茶色の沈殿として2.32 g (45 %) で得た。

^1H NMR ($(\text{CD}_3)_2\text{SO}$, 400 MHz): $\delta(\text{p.p.m.}) = 9.7$ (br, 1H, imidazole proton), 7.90 (m, 1H, imidazole proton), 7.80 (m, 1H, imidazole proton), 7.47 (m, 4H, phenyl protons), 5.50 (s, 2H, benzyl protons), 4.24 (s, 1H, alkynyl proton), 4.16 (s, 2H, $\text{Si}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{N}^-$), 3.53 (s, 2H, $\text{Si}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{Cl}$), 1.71 (m, 4H, $\text{SiCH}_2\text{CH}_2^-$), 0.58 (s, 2H, $\text{SiCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{Cl}$), 0.39 (s, 2H, $\text{SiCH}_2(\text{CH}_2)_2\text{N}^-$), 0.03 (s, 12H, SiCH_3). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): $\delta(\text{p.p.m.}) = 136.7, 135.9, 132.4, 128.8, 122.9, 122.9, 122.3, 83.0, 81.9, 51.6, 47.8, 47.8, 26.4, 23.8, 14.5, 13.5, 1.1, -0.6, -0.6$. IR (NaCl , cm^{-1}): 3290 (alkyne C-H), 1080 (Si-O).

CuAAC反応およびエマルジョンの作製

Cy3を結合するため、Plm1 (9.8 nmol) , Cy3アジド誘導体 (20 nmol) , tris[(1-benzyl-1-H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (50 nmol) , およびTACH (5.0 nmol) を0.15 mlのイオン交換水/dimethyl sulfoxide (v/v = 3:1) の混合溶媒中に加え、混合溶液を27 °C, 6 時間攪拌した。また、Alexa Fluor 488も同様の方法で反応を行い、未反応のラベル分子を除去するために20 mM Tris-HCl緩衝液で平衡化したDE-52アニオン交換樹脂を用いて室温下で12時間のインキュベーションを3回行った。次に、イオン交換水 (1.0 ml) および大豆油 (5.0 μl) を反応溶液に加え、30分間超音波処理を行った。エマルジョン溶液を0.55 mM EDTA溶液にて一晩透析し、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (molecular weight cutoff: 100 kDa, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) にて濃縮した。cfSGFP2の結合には、Plm1 (9.8 nmol) , cfSGFP2アジド誘導体 (20 nmol) , tris[(1-benzyl-1-H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (50 nmol) , およびTACH (5.0nmol) を0.15 mlの20 mM Tris-HCl緩衝液 (25% v/v dimethyl sulfoxide, 20 % v/v glycerol) の混合溶媒中に加え、混合溶液を27 °C, 6 時間攪拌した。反応溶液を0.55 mM EDTA溶液にて一晩透析し、イオン交換水 (1.0 ml) および大豆油 (5.0 μl) を加え、30分間超音波処理を行った。エマルジョン溶液を2000 g, 15分間遠心分離し、溶液上層のエマルジョン層を回収した後、回収したエマルジョンに0.5 mlのイオン交換水を加え、再度遠心分離を行う操作を3回繰り返した。Plm2 (16 nmol, 2.9 nmol equiv. of alkyne) と各種アジド誘導体 (5.7 nmol) を用いたCuAAC反応、およびエマルジョンの精製は同様の方法で行った。ナイルレッドのエマルジョン中への封入は、アセトンに溶解したナイルレッド 5.62 mg ml^{-1} を大豆油に等量加え、この混合溶液をエマルジョンの形成に使用した。

平均粒径の測定

Plm1から作製したエマルジョンの平均粒径は、25 °Cにてparticle size analyzer (SZ-100, Horiba, Kyoto, Japan)を用いた動的光散乱により測定した。散乱光強度は入射光に対して90度で検出した。

ラクトースを用いたCuAAC反応

Plm1およびラクトースのアジド誘導体を用い、アルキン:ラクトース = 100:1 (2.0 mol equiv. lactose per polymer)の比率でCuAAC反応を行い、**Plm-Lac1**を合成した。CuAAC反応は、**Plm1** (19.5 nmol), 1-azido-1-deoxy- β -D-lactopyranoside (39 nmol), tris[(1-benzyl-1-H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine (50 nmol), およびTACH (50 nmol)を0.15 mlのイオン交換水/dimethyl sulfoxide (v/v = 3:1)の混合溶媒中に加え、混合溶液を27 °C, 6時間攪拌することで行った^{37, 38}。反応溶液を0.55 mM EDTA溶液にて一晩透析 (MWCO: 30 kDa)した。**Plm1**へのラクトースの結合はマイクロプレート上でpolymer/DNA複合体を固定化したenzyme-linked lectin assay (ELLA)により求めた。96ウェルマイクロタイタープレートに0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.4)を用いて1 μ g/ μ lに調整したストレプトアビジンを100 μ l/wellに加え、4°C, 一晩インキュベーションした。ウェルをPBSにて3回洗浄し、PBSを加えた1×Carbo-Free Blocking Solution (blocking buffer) (Vector Laboratories Inc., USA)を各ウェルに加え、37 °C, 2時間インキュベーションした。ウェルをPBSにて3回洗浄し、1 μ M ビオチン化DNA (5' biotin- CCTCTCGGAAAGTCCCCTCTGAAG-G-3')および**Plm1**のblocking buffer溶液を各ウェルに加え、室温にて1時間インキュベーションした。ウェルをPBSにて3回洗浄し、peanut lectin-HRP conjugate (Seikagaku Biobusiness, Japan) (2 μ g/ μ l in blocking buffer)を加え、室温にて1時間インキュベーションした。次に、tetramethyl benzidine substrate (TMB) (Bio-Rad Laboratories Inc., USA)を100 μ lに加え、室温にて5分間インキュベーションをした。ペルオキシダーゼの反応を0.3 M H₃PO₄を100 μ l加えることにより停止し、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmにおける吸光度を測定した。

細胞の培養

ヒト肝臓癌細胞であるHepG2細胞 (Riken Bioresource Center, Japan)は10 % fetal bovine serum (FBS) (American Type Culture Collection, USA), 50 U/mL penicillin/streptomycin (Life Technologies Japan, Japan)を含むDulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies Japan, Japan)にて37 °C, 5 % CO₂下においてCO₂インキュベーター中で培養した。

細胞の生存率測定

ポリマーの細胞毒性はHepG2細胞およびMTT assay kit (Funakoshi Co., Ltd., Japan) を用いて測定した²⁸⁾。細胞は10% FBS および抗生物質を含んだDMEM 100 μ Lを用いて濃度 1×10^3 cells/wellに調整し、96ウェルプレートに加えた後、37 $^{\circ}$ C , 5 % CO₂下においてCO₂インキュベータで24時間培養した。培地を様々な濃度に調整したポリマーを含んだDMEM 100 μ Lに交換し、5時間、または24時間インキュベーションを行った。その後、培地をDMEM 80 μ Lに交換し、Cell Quanti-MTT reagent 15 μ Lを各ウェルに加えた。37 $^{\circ}$ C で4時間インキュベーションした後、MTT Solubilization Solution 100 μ Lを各ウェルに加えた。37 $^{\circ}$ C で1時間インキュベーションした後、マイクロプレートリーダーを用いて595 nmにおける吸光度を測定した。細胞生存率 (%) はポリマーを加えていないものを100 %とし、 $OD_{595}(\text{samples})/OD_{595}(\text{control}) \times 100$ にて算出した。

P1m1-Lac1 エマルジョンを用いた細胞特異的薬物送達

Alexa Fluor 488 またはラクトースを結合したポリマー溶液を 1:1 で混合した混合溶液 150 μ L にイオン交換水 1.0 ml および大豆油 5 μ L を加え、30 分間超音波処理を行った。エマルジョン溶液を 0.55 mM EDTA 溶液にて一晩透析し、Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Units (molecular weight cutoff: 100 kDa, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) にて濃縮した。細胞特異的薬物送達に用いる HepG2 細胞は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 500 μ L を用いて濃度 1×10^4 cells/well に調整し、24 ウェルプレートに加えた後、37 $^{\circ}$ C , 5 % CO₂ 下において CO₂ インキュベータ中で 24 時間培養した。培地を 40 μ L のエマルジョン溶液を含んだ DMEM 500 μ L に交換し、5 時間のインキュベーションを行った。

ゲルシフトアッセイによるポリマー-DNA 複合体形成の解析

ポリマー溶液および pEGFP-N2 プラスミド (Clontech Laboratories, Inc., USA) 0.33 μ g を、ポリマー中のイミダズリウム塩と DNA のリン酸基の比 (N/P 比) が 1~4 となるように PBS 緩衝液に加えて混合し、室温で 30 分間インキュベーションを行うことでポリマー-DNA 複合体を作製した。これを 1%アガロースゲルを用いて TAE 緩衝液中で電気泳動し、エチジウムブロマイドにより染色後、UV トランスイルミネーターを用いて観察した。

P1m1-Lac1 を用いた細胞特異的遺伝子送達

Cy3 またはラクトースを結合したポリマー溶液および 0.8 μ g pEGFP-N2 プ

ラスミドを、N/P 比が 36 (Lac1: Cy3 = 35:1):1 になるよう混合し、室温で 30 分間インキュベーションを行うことでポリマー-DNA 複合体を作製した。細胞特異的遺伝子送達に用いる HepG2 細胞は 10% FBS および抗生物質を含んだ DMEM 500 μ L を用いて濃度 1×10^4 cells/well に調整し、24 ウェルプレートに加えた後、37 $^{\circ}$ C , 5% CO₂ 下において CO₂ インキュベータ中で 24 時間培養した。次に、培地を 50 μ L のポリマー-DNA 複合体溶液を含んだ DMEM 500 μ L に交換し、5 時間のインキュベーションした後、蛍光顕微鏡により観察した。

2.5 参考文献

- 1) Lovelyn, C. & Attama, A. A. Current state of nanoemulsions in drug delivery. *J. Biomater. Nanobiotechnol.* **2**, 626–639 (2011).
- 2) Washington, C., Athersuch, A. & Kynoch, D. J. The electrokinetic properties of phospholipid stabilized fat emulsions. IV. The effect of glucose and of pH. *Int. J. Pharm.* **64**, 217–222 (1990).
- 3) Abdel-Raouf, M. E.-S. in *Crude Oil Emulsions-Composition Stability and Characterization* (ed. Abdul-Raouf, M. E.-S.) 183–204 (InTech, New York, NY, USA, 2012).
- 4) Clarson, S. J. in *Synthesis and properties of silicones and silicone-modified materials* (eds Clarson, S. J., Fitzgerald, J. J., Owen, M. J., Smith, S. D. & Van Dyke, M. E.) 1–10 (American Chemical Society, Washington, DC, USA, 2003).
- 5) Mark, J. E. in *Silicones and Silicone-Modified Materials* (eds Clarson, S. J., Fitzgerald, J. J., Owen, M. J. & Smith, S. D.) 1–10 (American Chemical Society, Washington, DC, USA, 2000).
- 6) Liu, M., Ragheb, A., Zelisko, P. & Brook, M. A. in *Colloidal Biomolecules, Biomaterials, and Biomedical Applications* (ed. Elaissari, A.) 309–327 (CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 2003).
- 7) Fortuniak, W., Rozga-Wijas, K., Chojnowski, J., Labadens, F. & Sauvet, G. Reactions of tertiary hydroxyalkylamines with 3-halogenopropyl substituted polysiloxanes: a route to water soluble and amphiphilic silicones. *React. Funct. Polym.* **61**, 315–323 (2005).
- 8) Hou, A. & Shi, Y. Polymerization and surface active properties of water-soluble amphiphilic polysiloxane copolymers modified with quaternary ammonium salts and long-carbon chain groups. *Mater. Sci. Eng. B* **163**, 99–104 (2009).

- 9) Xie, K.-L., Hu, K. & Chen, Y. Synthesis of amphiphilic polysiloxanes modified with multi-cationic groups to improve wettability of polyester materials. *Iran. Polym. J.* **19**, 447–455 (2010).
- 10) Beppu, K., Kaneko, Y., Kadokawa, J., Mori, H. & Nishikawa, T. Synthesis of sugarpolysiloxane hybrids having rigid main-chains and formation of their nano aggregates. *Polym. J.* **39**, 1065–1070 (2007).
- 11) Iwakiri, N., Nishikawa, T., Kaneko, Y. & Kadokawa, J. Synthesis of amphiphilic polysiloxanes and their properties for formation of nano-aggregates. *Colloid Polym. Sci.* **287**, 577–582 (2009).
- 12) Prisacaru, A.-I., Grama, S., Durdureanu-Angheluta, A. M., Pinteala, M. & Hurduc, N. Azo-polysiloxane micelles charged with nifedipine. *Cent. Eur. J. Chem.* **11**, 1431–1438 (2013).
- 13) Moleavin, I., Grama, S., Carlescu, I., Scutaru, D. & Hurduc, N. Photosensitive micelles based on polysiloxanes containing azobenzene moieties. *Polym. Bull.* **65**, 69–81 (2010).
- 14) Broz, P., Benito, S. M., Saw, C., Burger, P., Heider, H., Pfisterer, M., Marsch, S., Meier, W. & Hunziker, P. Cell targeting by a generic receptor-targeted polymer nanocontainer platform. *J. Control. Release* **102**, 475–488 (2005).
- 15) Broz, P., Ben-Haim, N., Grzelakowski, M., Marsch, S., Meier, W. & Hunziker, P. Inhibition of macrophage phagocytotic activity by a receptor-targeted polymer vesiclebased drug delivery formulation of pravastatin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **51**, 246–252 (2008).
- 16) Egli, S., Fischer, B., Hartmann, S., Hunziker, P., Meier, W. & Rigler, P. Towards targeted drug delivery by covalent ligand-modified polymeric nanocontainers. *Macromol. Symp.* **296**, 278–285 (2010).
- 17) Yamada T., Iwasaki Y., Tada H., Iwabuki H., Chuah M. K., VandenDriessche T., Fukuda H., Kondo A., Ueda M., Seno M., Tanizawa K., and Kuroda S., Nanoparticles for the delivery of genes and drugs to human hepatocytes, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 885-890 (2003).
- 18) O'Reilly, R. K., Joralemon, M. J., Hawker, C. J. & Wooley, K. L. Facile syntheses of surface-functionalized micelles and shell cross-linked nanoparticles. *J. Polym. Sci. Polym. Chem.* **44**, 5203–5217 (2006).
- 19) Lee, S.-M., Chen, H., O'Halloran, T. V. & Nguyen, S. B. T. 'Clickable' polymer-caged nanobins as a modular drug delivery platform. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9311–9320 (2009).

- 20) Opsteen, J. A., Brinkhuis, R. P., Teeuwen, R. L.M., Loewik, D.W. P.M. & vanHest, J. C. M. 'Clickable' polymersomes. *Chem. Comm.* **30**, 3136–3138 (2007).
- 21) van Dongen, S. F. M., Nallani, M., Schoffelen, S., Cornelissen, J. J. L. M., Nolte, R. J. M. & van Hest, J. C. M. A block copolymer for functionalisation of polymersome surfaces. *Macromol. Rapid Commun.* **29**, 321–325 (2008).
- 22) Niino, M., Ueno, Y., Araki, T. & Sekine, Y. Binding of methyl orange by water-soluble synthetic polyorganosiloxanes. *Polym. Commun.* **24**, 124–128 (1983).
- 23) Yin, J., Noda, Y. & Yotsuyanagi, T. Properties of poly(lactic-co-glycolic acid) nanospheres containing protease inhibitors: camostat mesilate and nafamostat mesilate. *Int. J. Pharm.* **314**, 46–55 (2006).
- 24) Chen, C., Yu, C. H., Cheng, Y. C., Yu, P. H. & Cheung, M. K. Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. *Biomaterials* **27**, 4804–4814 (2006).
- 25) Chiu, M. H., Tamura, T., Wadhwa, M. S., and Rice, K. G., *In vivo* targeting function of N-linked oligosaccharides with terminating galactose and N-acetylgalactosamine residues, *J. Biol. Chem.*, **269**, 16195-16202 (1994).
- 26) U. S. Food and Drug Administration, Guidance for industry: nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients, U. S. Department of Health and Human Services, Washington, D. C. (2005).
- 27) Benito-Alifonso, D., Tremel, S., Hou, B., Lockyear, H., Mantell, J., Fermin, D. J., Verkade, P., Berry, M., and Galan, M. C., Lactose as a “Trojan Horse” for quantum dot cell transport, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **53**, 810-814 (2014).
- 28) Zou, W., Liu, C., Chen, Z., and Zhang, N., Preparation and characterization of cationic PLA-PEG nanoparticles for delivery of plasmid DNA, *Nanoscale Res. Lett.*, **4**, 982-992 (2009).
- 29) Allen M, H., Green, M. D., Getaneh, H. K., Miller, K. M., and Long, T. E., Tailoring charge density and hydrogen bonding of imidazolium copolymers for efficient gene delivery, *Biomacromolecules*, **12**, 2243-2250 (2011).
- 30) Wen Y., Pan S., Luo X., Zhang W., Shen Y., and Feng M., PEG- and PDMAEG-graft-modified branched PEI as novel gene vector: synthesis, characterization and gene transfection, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **21**,

1103-1126 (2010).

31) Medina-Kauwe, L. K., Xie, J., and Hamm-Alvarez, S., Intracellular trafficking of nonviral vectors, *Gene Ther.*, **12**, 1734-1751 (2005).

32) Godbey, W. T., Wu, K. K., and Mikos, A. G., Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery, *J. Control. Release*, **60**, 149-160 (1999).

33) Davies, L. A., Hyde, S. C., Nunez-Alonso, G., Bazzani, R. P., Harding-Smith, R., Pringle, I. A., Lawton, A. E., Abdullah, S., Roberts, T. C., McCormick, D., Sumner-Jones, S. G., and Gill, D. R., The use of CpG-free plasmids to mediate persistent gene expression following repeated aerosol delivery of pDNA/PEI complexes, *Biomaterials*, **33**, 5618-5627 (2012).

34) Wan, Y., Wallinder, C., Plouffe, B., Beaudry, H., Mahalingam, A. K., Wu, X., Johansson, B., Holm, M., Botoros, M., Karlen, A., Pettersson, A., Nyberg, F., Fandriks, L., Gallo-Payet, N., Hallberg, A. & Alterman, M. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *J. Med. Chem.* **47**, 5995–6008 (2004).

35) Suzuki, T., Arai, S., Takeuchi, M., Sakurai, C., Ebana, H., Higashi, T., Hashimoto, H., Hatsuzawa, K. & Wada, I. Development of cysteine-free fluorescent proteins for the oxidative environments. *PLoS One* **7**, e37551 (2012).

36) Cheng, J., Sun, Y., Wang, F., Guo, M., Xu, J. H., Pan, Y. & Zhang, Z. A copper- and amine-free Sonogashira reaction employing aminophosphines as ligands. *J. Org. Chem.* **69**, 5428–5432 (2004).

37) Yu, H., Nie, Y., Dohmen, C., Li, Y., and Wagner, E., Epidermal growth factor-PEG functionalized PAMAM-pentaethylenehexamine dendron for targeted gene delivery produced by click chemistry, *Biomacromolecules*, **12**, 2039-2047 (2011).

38) Gebhart, C. L. and Kabanov, A. V., Evaluation of polyplexes as gene transfer agents, *J. Control. Release*, **73**, 401-416 (2001).

第三章

セリンタイプ 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

3.1 目的

ファージ・インテグラーゼはファージゲノム上のアタッチメント・サイト (*attP* 部位) と宿主ゲノム上のアタッチメント・サイト (*attB* 部位) 間で厳密な一方向の部位特異的組換え反応を触媒する酵素である。この酵素は溶原性ファージが宿主細胞へ感染した際に, *attP* および *attB* 中央の相同なコア配列で組換えられた *attL* および *attR* の二つの組換え産物を形成し, ファージゲノムが宿主ゲノム中の *attL-attR* 配列間に組み込まれる。また, ファージの増殖の際には *attL* と *attR* 間でファージゲノムの切り出し反応が起こることにより, 組換え配列は元の *attP* & *attB* 配列に戻る^{1, 2)}。

ファージ・インテグラーゼは触媒残基のアミノ酸によりチロシンタイプ・インテグラーゼとセリンタイプ・インテグラーゼの二種類に分類される^{3, 4)}。大腸菌 λ ファージ・インテグラーゼに代表されるチロシンタイプ・インテグラーゼは宿主細胞中で一方向の部位特異組換えを触媒するが, 異種細胞中では双方向のリコンビナーゼとして働くことから, 異種細胞での遺伝子組換えシステムで利用することは難しい^{4, 5)}。その一方, チロシンタイプ・シンプルリコンビナーゼは双方向の組換えを触媒するが, "recombinase-mediated cassette exchange (RMCE)" や "left or right element (LE/RE)" 変異部位システムにより, 異種ゲノム中での遺伝子組換え法として広く利用されている^{5, 6, 7)}。また, チロシンタイプ・インテグラーゼは組換え反応の中間体としてホリデイ構造を形成するが, 放線菌 ϕ C31 ファージ・インテグラーゼに代表されるセリンタイプ・インテグラーゼは, 切断された *att* 配列を回転して再結合するリゾルバーゼ/インベルターゼ・ファミリーと同様なメカニズムをとる^{8, 9)}。すなわち, 2本のDNAの両方の鎖が切断された後, 触媒のセリン残基のヒドロキシル基と中心ジヌクレオチドの間に5'ホスホジエステル結合が形成され, 2本のDNAが切断部位で回転して入れ替わった後, 切断された *att* DNAの5'リン酸との間で共有結合を形成することによって再結合が行われる^{3, 4, 10)}。また, チロシンタイプ・インテグラーゼとセリンタイプ・インテグラーゼは *att* 部位の構成や部位特異的組換えのための条件が異なっている。チロシンタイプ・インテグラーゼである λ インテグラーゼによる組換えには 25 bp の *attB*, 240 bp の *attP*, およびシス作用性組換えエンハンサー配列や負のスーパーコイル DNA といった宿主因子が必要である^{3, 4, 5, 11, 12)}。一方, セリンタイプ・インテグラーゼによる組換えでは 40 bp の *att* 部位のみを必要とし, 宿主因子は不要である^{4, 5)}。

セリンタイプ・インテグラーゼである放線菌 R4 ファージ・インテグラーゼ⁹⁾の発見以来, Bxb1¹⁴⁾, ϕ BT1¹⁵⁾, ϕ C31¹⁶⁾, ϕ MR11¹⁷⁾, ϕ Rv1¹⁸⁾, R4¹⁹⁾, TP901-1²⁰⁾ インテグラーゼなどのセリンタイプ・インテグラーゼにより, 哺乳類細胞ゲノム中に導入した *att* 部位に, 対応する *att* 部位含有プラスミド DNA を部位特異

的組換えにより導入できることが報告されている。しかし、異種微生物に対するセリントタイプ・インテグラーゼによる遺伝子組換えシステムについては殆ど報告されていない。セリントタイプ・インテグラーゼは特に C 末端 DNA 結合ドメインのアミノ酸配列が多様であり^{3, 4)}、配列特異的な DNA 結合を示すことにより、*att*-インテグラーゼの組み合わせが一意的となる^{21, 22, 23)}。従って、セリントタイプ・インテグラーゼによる複数の異なる部位特異的組換えシステムを用いることにより、単一の細菌ゲノム上の複数のサイトに複数の外来 DNA を同時に導入することが容易に出来ると期待される。さらに、相同組換えは様々な細菌ゲノム中に外来 DNA を部位特異的に導入するために用いられているが、相同組換えの効率は宿主細胞に依存し、人為的操作によってほとんど改善されない。そのため、セリントタイプ・インテグラーゼによる部位特異的遺伝子導入システムはゲノム工学に有益であると期待される。このようなセリントタイプ・インテグラーゼによる組換えシステムを確立させるために、放線菌 TG1 フェージ由来のセリントタイプ・インテグラーゼの特性解析^{22, 23)}や、異種微生物細胞中の単一プラスミド DNA に効率的に作用する細胞内部位特異的組換えシステムが報告されている²³⁾。微生物ゲノム工学で TG1 インテグラーゼ・システムを幅広く利用するためには、TG1 インテグラーゼによる異種微生物ゲノム中への外来 DNA の部位特異的組換えの実証などの幾つかの問題を解決する必要がある。そこで本研究では、異種微生物細胞中へ長鎖 DNA を効率的に、かつ部位特異的に導入する方法の開発を目的としている。

3.2 結果と考察

3.2.1 プラスミド DNA 上の *att* 部位間での *in vivo* 部位特異的組換え

TG1 インテグラーゼは *attP* および *attB* 間で一方向性を示す部位特異的組換えを触媒し、組込み反応の際に中心のジヌクレオチド (5'-TT-3') を再結合し、*attP* および *attB* 中央の相同なコア配列で組換わった *attL* および *attR* 間にフェージゲノムを組み込む (Fig 3-1)。TG1 インテグラーゼによる *in vivo* 部位特異的組換えシステムは、異種大腸菌細胞中の単一プラスミド DNA 上の *attP* & *attB* 間で効率的に働くことが報告されている²³⁾。TG1 インテグラーゼによる *in vivo* 分子間部位特異的組換えシステムの開発のため、大腸菌細胞中の外来の自己複製できないプラスミド DNA と内在するプラスミド DNA の *att* 部位間での分子間部位特異的組換え効率について調査した。

実験項に記載したように、TG1 インテグラーゼ発現プラスミドである pACYCplacTG1*int*、および *att* 部位含有アクセプタープラスミドである pUC*attP* (Fig 3-2a) または pUC*attB* (Fig 3-2b) を有している *E. coli* EC100 細胞を、それぞれに対応する *att* 部位を挿入した自己複製できないドナープラス

ミドである pMOD*attB*Km^r (Fig 3-2a) または pMOD*attP*Km^r (Fig 3-2b) によって形質転換し、形質転換体を LB-Amp-Cm-Km プレート上で培養した。*E. coli* EC100 (*pir*) 細胞は pMOD プラスミド上の R6K_Y オリジンからの複製を完全に抑制し、pUC および pMOD プラスミド上の *Amp^r* 遺伝子間の相同組換えを抑制する *recA1* 変異を含んでいるため、プレート上で生育した形質転換体は TG1 インテグラーゼによる組換えで生じたドナープラスミドとアクセプタープラスミドの融合プラスミドを有していると期待される。

用いた *attB* または *attP* 含有 pMOD ドナープラスミド (Fig. 3-2a, b) に関わらず、TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有する細胞はインテグラーゼを発現しない細胞より ~10² 倍多いコロニーを形成し (Table 3-1), 融合プラスミドの形成は TG1 インテグラーゼに依存していることが示された。

さらに、TG1*int* 遺伝子を有している細胞は、コロニーPCR 法による組換え産物の増幅によって期待されるサイズ (1254 bp) の PCR 断片を生じたが、TG1*int* 遺伝子欠損株では断片は生じなかった (Fig 3-2c, d)。また、増幅された PCR 断片は TG1 インテグラーゼによる組換え産物である *attR* (Fig 3-2a) および *attL*

(Fig 3-2b) の配列を有していた。IPTG の添加により TG1 インテグラーゼの発現を誘導した場合にも、コロニーの数や宿主細胞の成長に大きな違いが見られなかったことから、細胞中での組換え反応を触媒するためには微量の TG1 インテグラーゼで十分であり、また TG1 インテグラーゼによる宿主細胞の成長への影響が無かったことが示された。以上の結果から、TG1 インテグラーゼによって異種細胞中の外来プラスミドと内在するプラスミド上の *att* 部位間での *in vivo* 分子間部位特異的組換えが効率的に触媒されることが示された。

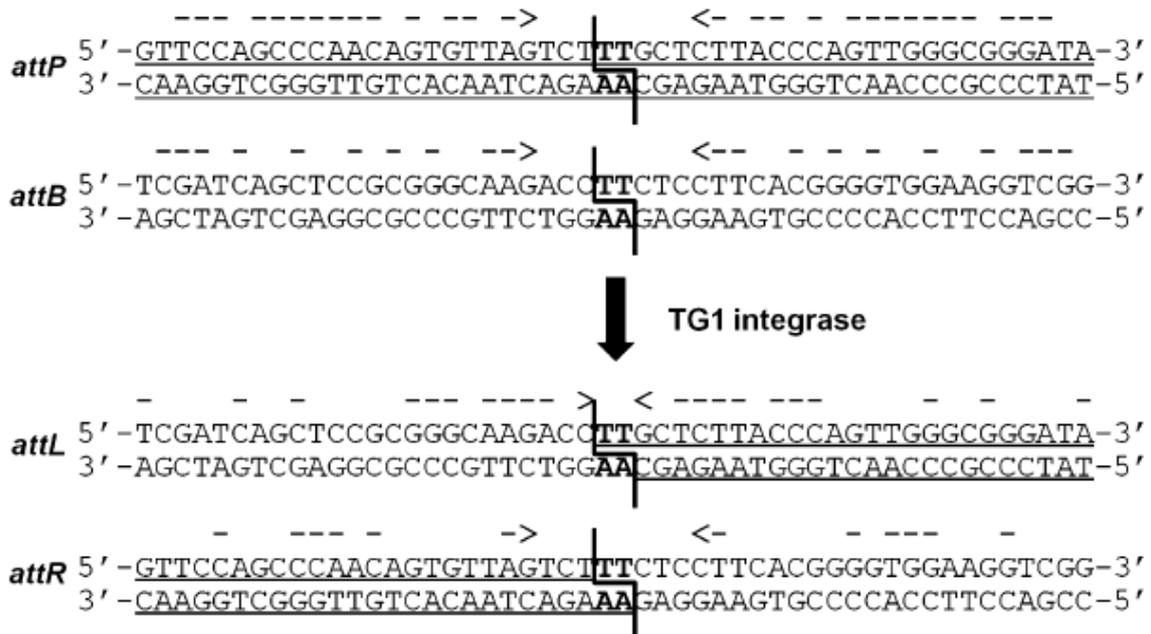


Fig. 3-1 Site-specific recombination by actinophage TG1 integrase.

Nucleotide sequences of the attachment sites for TG1 integrase are shown. TG1 integrase catalyzes unidirectional site-specific recombination between *attP* (*underlined*) and *attB* to generate *attL* and *attR*; the recombined central dinucleotides (5'-TT-3') are shown in *bold*, and the positions of TG1 integrase-mediated cleavage are indicated. The nucleotide sequences originating from *attP* are *underlined*, and imperfect inverted repeats are indicated by *dashed arrows* over the *att*-site sequences.

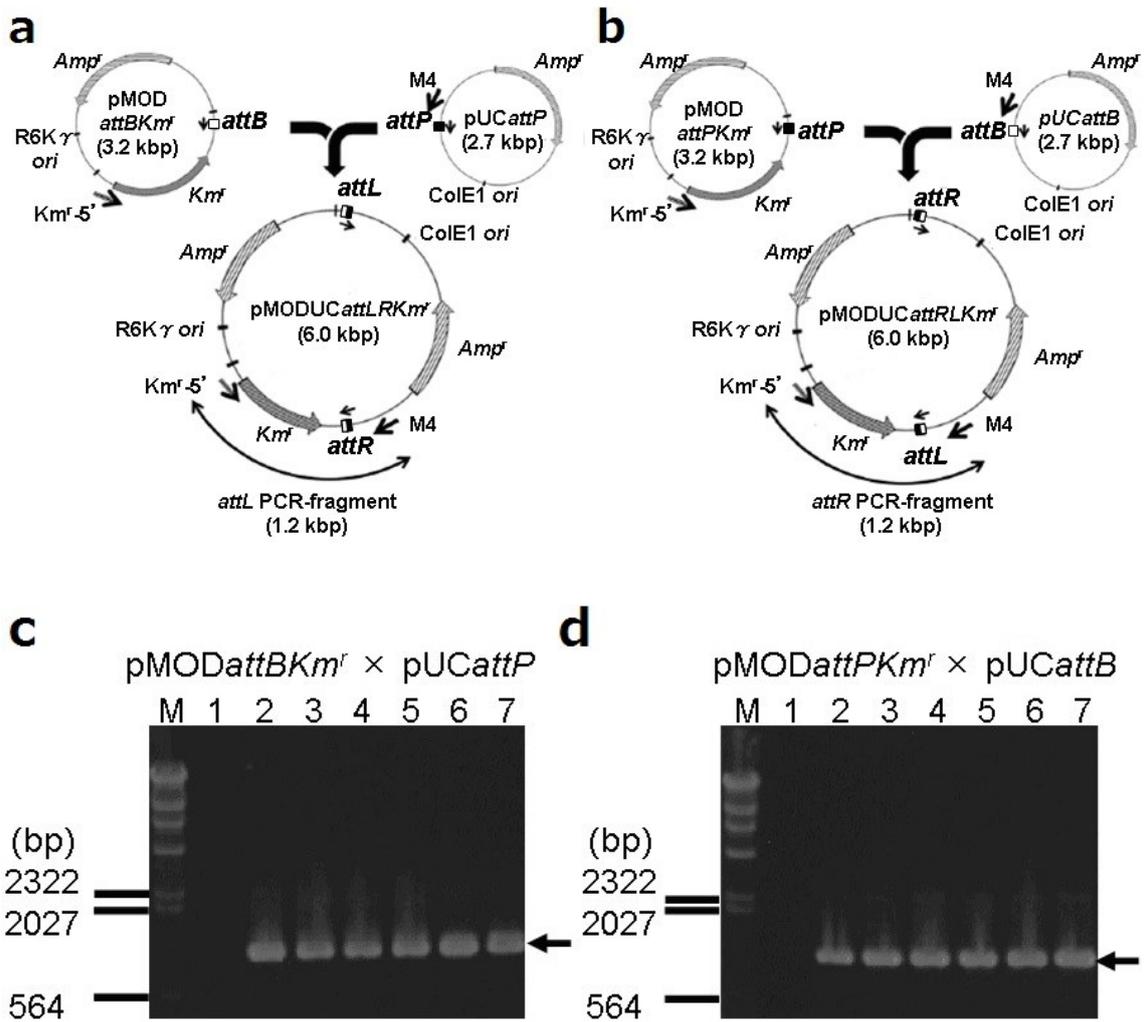


Fig. 3-2 Inter-molecular site-specific recombination by TG1 integrase between two plasmid DNAs *in vivo*.

Schematic representations of the substrates and product of inter-molecular, site-specific recombination between pMODattBKm^r and pUCattP (**a**) and between pMODattPKm^r and pUCattB (**b**) are shown. The attP and attB sites are indicated by *filled* and *open boxes*, respectively, and *thin arrows* along the att sites indicate the direction of attachment site. *Short thick arrows* along the plasmid maps indicate the positions of M4 and Km^r-5' primers specific for the pMOD and pUC plasmids, respectively, which were used to confirm the formation of the fusion plasmid (5,974 bp) converted from the donor (3,244 bp) and acceptor (2,730 bp) plasmids by the TG1 integrase-dependent recombination, and the expected size (1,254 bp) of PCR product is indicated. Agarose gel electrophoresis of the colony-PCR products

amplified from transformants yielded by the inter-molecular recombination between pMOD*attBKmr* and pUC*attP* (c) and between pMOD*attPKmr* and pUC*attB* (d) are shown: *lane 1* a transformant of the EC100 cells lacking the TG1 integrase-expressing plasmid, *lanes 2-7* six transformants of EC100 cells expressing the TG1 integrase, *lane M* size marker.

Table 3-1 Efficiency of inter-molecular site-specific recombination *in vivo* by TG1 integrase.

Donor plasmid	Acceptor plasmid or genome	TG1 integrase expression vector	Number of colonies	TG1 integrase-dependent integration efficiency
pMOD <i>attBKmr</i>	pUC <i>attP</i>	pACYCplacTG1 <i>int</i>	1,377	197
pMOD <i>attBKmr</i>	pUC <i>attP</i>	None	7	1
pMOD <i>attPKmr</i>	pUC <i>attB</i>	pACYCplacTG1 <i>int</i>	5,147	257
pMOD <i>attPKmr</i>	pUC <i>attB</i>	None	20	1
pMOD <i>attB</i>	<i>dinD::Tn5attPKmr</i>	pACYCplacTG1 <i>int</i>	2,015	>2,015
pMOD <i>attB</i>	<i>dinD::Tn5attPKmr</i>	None	0	1
pMOD <i>attB</i>	<i>fecA::Tn5attPKmr</i>	pACYCplacTG1 <i>int</i>	725	>725
pMOD <i>attB</i>	<i>fecA::Tn5attPKmr</i>	None	0	1
pMOD <i>attB</i>	Unmodified	pACYCplacTG1 <i>int</i>	0	-
pMOD <i>attP</i>	<i>xdhD::Tn5attBKmr</i>	pACYCplacTG1 <i>int</i>	375	94
pMOD <i>attP</i>	<i>xdhD::Tn5attBKmr</i>	None	4	1
pMOD <i>attP</i>	<i>tnaB::Tn5attBKmr</i>	pACYCplacTG1 <i>int</i>	44	44
pMOD <i>attP</i>	<i>tnaB::Tn5attBKmr</i>	None	1	1
pMOD <i>attP</i>	Unmodified	pACYCplacTG1 <i>int</i>	0	-

Efficiency of *in vivo* inter-molecular site-specific recombination by TG1 integrase in *E. coli* EC100 cells was examined as described in “Materials and Methods” section: cells harboring the TG1 integrase expression vector were spread on LB-Amp-Cm-Km plates, cells lacking the expression vector were spread on Lm-Amp-Km plates, and cells lacking an acceptor *att* site were spread on LB-Amp-Cm plates. Addition of 1 mM dependent integration efficiency for each substrate configuration was calculated by dividing the number of colonies formed by the cells containing the TG1*int* gene by that formed by the cells lacking the TG1*int* gene, in which the number of colonies was calculated as <1 for the cells did not yield colonies. Data are means from three independent experiments.

3.2.2 ゲノム DNA 上の *att* 部位を標的とした *in vivo* 部位特異的組換え

次に、外来の自己複製できないプラスミド DNA の *att* 部位と、大腸菌細胞のゲノム DNA に挿入された対応する *att* 部位間での、TG1 インテグラーゼによる分子間部位特異的遺伝子組換えの効率を調査した。実験項に記載したように、EZ-Tn5 トランスポゾーム複合体を用いたエレクトロポレーションにより *E. coli* EC100 のゲノム中に *attP* または *attB* 部位をランダムに挿入し、Tn5 トランスポゾン中の *Km^r* 遺伝子を標的にショットガンクローニングを行うことにより、ゲノム内に挿入された *att* 部位の位置を決定した。Tn5 トランスポゾンとゲノム DNA の間の結合部位の塩基配列により、*attP* 部位が *E. coli* ゲノム上の DNA 損傷応答タンパク質をコードしている *dinD* 遺伝子 (82.24 min)、またはクエン酸鉄トランスポーターをコードしている *fecA* 遺伝子 (97.26 min) 内に、*attB* 部位が酸化還元酵素をコードしていると推測される *xdhD* 遺伝子 (65.08 min) またはトリプトファントランスポーターをコードしている *tnaB* 遺伝子 (83.80 min) 内に挿入されていることが示された。また、ゲノムに *att* 部位を挿入した細胞の成長は親株と大きく異ならなかったことから、これらの細胞を *att* 部位挿入宿主細胞として使用した。

TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有する *att* 部位挿入 EC100 細胞である EC100 (*dinD::Tn5attPKm^r*), EC100 (*fecA::Tn5attPKm^r*) (Fig 3-3a), EC100 (*xdhD::Tn5attBKm^r*), EC100 (*tnaB::Tn5attBKm^r*) (Fig 3-3b) を、対応する *att* 部位を有する自己複製できないプラスミドである pMOD*attB* (Fig 3-3a) または pMOD*attP* (Fig 3-3b) によって形質転換した (Table 1)。アンピシリン耐性は自己複製できないドナープラスミドに由来し、カナマイシン耐性はアクセプターゲノムに由来することから、選択プレート上においてアクセプターゲノム中に自己複製できないドナープラスミドが挿入された形質転換体が生育すると考えられる。その結果、TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有している細胞は TG1 インテグラーゼ欠損株よりも $\sim 10^{1-3}$ 倍のコロニーを形成し (Table 1)、アクセプターゲノム中へのドナープラスミドの導入は TG1 インテグラーゼに依存していることが示された。TG1 インテグラーゼによる組換えは、組換え産物の PCR 法による増幅 (Fig 3-3c, d)、および PCR 産物の配列解析により確認した。興味深いことに、Table 3-1 に示すように TG1 インテグラーゼによる組換え効率を比較することによって評価した際、大腸菌ゲノム上への *att* 部位の挿入位置に関わらず、*attP* 挿入ゲノムへの *attB* 含有プラスミドの組換えは、逆の場合より平均的に ~ 20 倍高い効率であった。さらに、*att* 部位の挿入を行っていない EC100 細胞を *att* 部位含有ドナープラスミドにより形質転換した場合には、TG1 インテグラーゼを発現している細胞であってもコロニーを形成しなかったことから (Table 3-1)、*E. coli* ゲノム中において TG1 インテグラーゼによって

基質と認識される他の配列は、もし存在していたとしても非常に少ないことが示唆された。以上の結果から、非特異的な組換えが起こらず、異種大腸菌細胞内のゲノム DNA 中に挿入された *att* 部位に対応する *att* 部位含有プラスミド DNA との間で TG1 インテグラーゼによって分子間部位特異的組換えが効率的に触媒されたことを示している。さらにこれらの結果から、TG1 インテグラーゼによる異種のゲノム DNA に挿入された *attP* 部位に対する *attB* 含有環状 DNA の組換えは、逆の場合より効率的であると考えられる。同様に、ヒトゲノム中に挿入された *attP* 部位および *attB* 含有環状 DNA の ϕ C31²⁴ および R4¹⁹ インテグラーゼによる組換えが、ヒトゲノム上の似た位置に逆の *att* 部位を導入した場合より効率的であることが報告されている。したがって、微生物細胞や哺乳類細胞などの全く異なる細胞種にも関わらず、ゲノム DNA 上に挿入された *attP* 部位へ *attB* 含有 DNA の組換えがより効率的に行われることは、異種細胞におけるセリントタイプ・インテグラーゼによる遺伝子組換えに共通する性質である可能性がある。ゲノム内の *attP* と *attB* を標的とする組換え効率が異なる理由は不明であるが、*in vitro* での実験で報告されているように、TG1 インテグラーゼによる結合は *attB* よりも *attP* の方がより効率的であることが原因であると考えられる。TG1 インテグラーゼは大腸菌ゲノム中の標的の *attP* 部位を *attB* 部位よりも優先して結合し、細胞中に導入される DNA の対応する *att* 部位とシナプス複合体との効率的な形成をもたらすと考えられる。

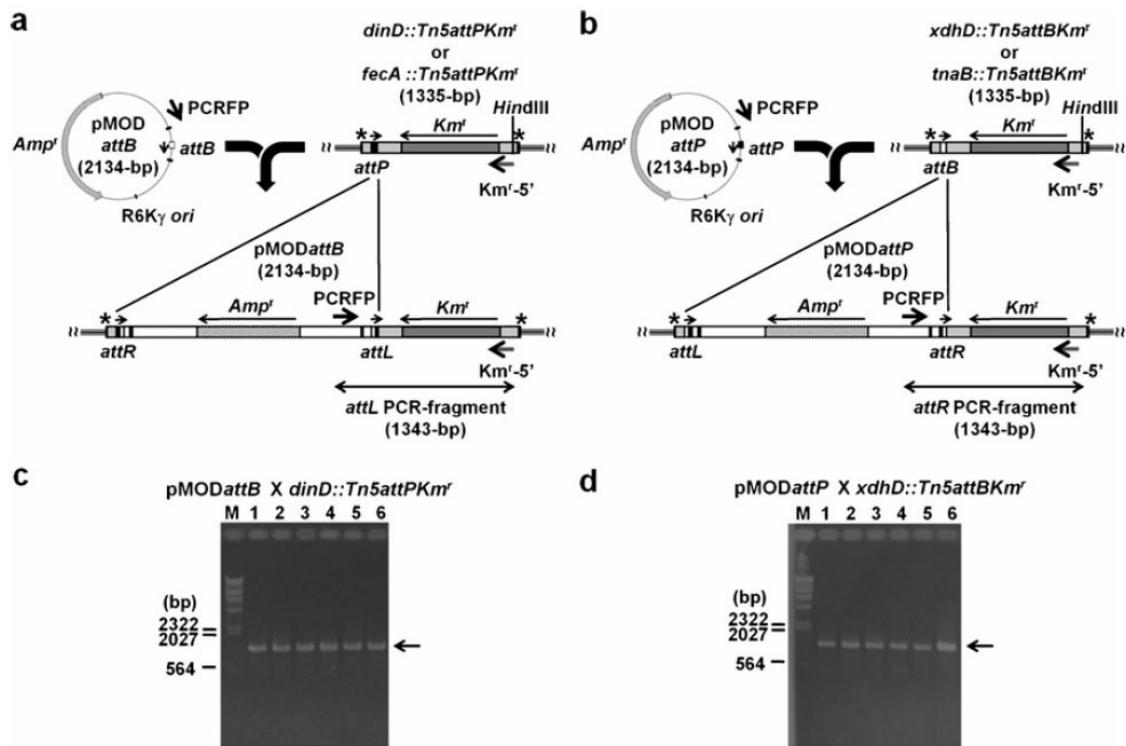


Fig. 3-3 Inter-molecular site-specific recombination by TG1 integrase between plasmid and genomic DNAs *in vivo*.

Schematic representations of the substrates and products of inter-molecular site-specific recombination between *pMODattB* and the EC100 (*dinD::Tn5attPKm^r*) or EC100 (*fecA::Tn5attPKm^r*) genome (a) and between *pMODattP* and the EC100 (*xdhD::Tn5attBKm^r*) or EC100 (*tnaB::Tn5attBKm^r*) genome (b) are shown. Tn5 transposon DNA (1,335 bp) was inserted into the EC100 genome with the EZ-Tn5 transposome complex as described in the “Materials and methods” section. The junction sites between Tn5 transposon and genomic DNAs are indicated by an *asterisk*, and the position of the *HindIII* site used to identify the location of inserted *att* site with the shotgun cloning is indicated. *Thick arrows* along the plasmid and genomic maps indicate the positions of PCRFP and *Km^r-5'* primers specific for the *pMOD* plasmid and Tn5 transposon, respectively, which were used to confirm the insertion of donor plasmid (2,134 bp) into the acceptor genome by the TG1 integrase-dependent recombination, and the expected size (1,343 bp) of PCR products amplified from genomic DNA extracted from transformants yielded by the inter-molecular recombination between *pMODattB* and EC100 (*dinD::Tn5attPKm^r*) genome (c) and between

pMOD*attP* and EC100 (*xdhD::Tn5attBK^{nr}*) genome (d) are shown as representatives: lanes 1-6 six transformants of the *att* site-inserted EC100 cells harboring the TG1 integrase-expressing plasmid, lane M size marker.

3.2.3 微生物ゲノム上の *att* 部位を標的とした *in vivo* 部位特異的組換えにおける DNA の長さの影響

次に、TG1 インテグラーゼによる長鎖 DNA (2 kbp 以上) の部位特異的組換えに適切な大腸菌ゲノム中における位置を調査するため、様々なゲノムの位置に事前に挿入した *att* 部位と~2 kbp または~10 kbp の非複製ドナープラスミドの対応する *att* 部位間での部位特異的組換え効率を求めて比較した (Fig 3-4)。

*attP*あるいは *attB* 部位は Tn5 トランスポゾンにより大腸菌 EC100 のゲノム中にランダムに挿入され、*att* 部位を含む 24 の形質転換体 (うち 12 個が *attP* 部位, 12 個が *attB* 部位を含む) が得られた。TG1 インテグラーゼ発現プラスミドまたはコントロールの複製できるプラスミドである pUC19 プラスミドで形質転換した際、24 個それぞれの *att* 部位が挿入された形質転換体の成長と形質転換効率 (~10⁵ colonies/0.1 µg pUC19) は親株と大きく異ならなかったことから (Table 3-2), これらの株を *att* 部位含有宿主細胞として用いた。次に、アクセプターゲノムの *att* 部位への、自己複製できないドナープラスミドによる組換え効率を算出した (Fig. 3-4, Table3-2)。TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有している *att* 部位含有 EC100 細胞を、対応する *att* 部位を有する自己複製できないドナープラスミドである~2 kbp の pMOD*attP*, pMOD*attB* (Fig. 3-4a), ~10 kbp の pMOD*attPlac*, pMOD*attBlac* (Fig. 3-4b) でそれぞれ形質転換した。形質転換体は pACYC*placTG1int* の *lac* プロモーターからの TG1 インテグラーゼの発現を誘導する IPTG が含まれる LB-Amp-Cm-Km プレートと IPTG を含まないプレート上で培養した。大腸菌 EC100 (*pir*^r) 細胞が pMOD ドナープラスミドの R6K_γ オリジンからの複製を抑制し、形質転換体のアンピシリンおよびカナマイシン耐性は自己複製できないドナープラスミドに由来していることから、セレクトションプレート上の形質転換体にはアクセプターゲノム中に非複製ドナープラスミドが導入されていると期待される。各株の形質転換体のほとんどは組換え産物を増幅するプライマーを用いたコロニーPCR 法によって期待されるサイズ (1343 bp) の PCR 断片を生じ (Fig. 3-4c), 得られた PCR 断片は TG1 インテグラーゼによる組換え産物である *attL* および *attR* の配列を含んでいた。また、4 つの形質転換体 (B4, B10, P7, P8) では PCR 断片を生じなかった (Fig. 3-4c)。これは、Tn5 トランスポゾンにより挿入した配列がドナープラスミドにも存在するため、ゲノムへ相同組換えにより導入されたものと

推測される。これまでの研究からも、TG1 インテグラーゼによりドナープラスミドをアクセプターゲノムへ効率的に導入できることが示されている。すなわち、~2 kbp の非複製ドナープラスミドによる形質転換の際に、TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有する 4 つの *att* 部位含有株 (B2, B12, P5, P11) は TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有していない株の~ 10^{2-3} 倍のコロニーを形成しており、さらに pMOD ドナープラスミドが EC100 細胞中に存在していないことも確認している。さらにこの実験において、B4, B10, P7, P8 のようにコロニーを殆ど形成していない株の形質転換体は PCR 断片を生じていないのに対し、P1, P2, P3, P4, P5, P10, P11 のように多くのコロニーを形成する株の形質転換体は期待されるサイズ (1343 bp) の PCR 断片を生じたことから、この組換え法による形質転換体の殆どが TG1 インテグラーゼによる組換えにより生成したことが示唆される。

~2 kbp のドナープラスミドを使用した際に IPTG の添加によって生じるコロニーの数に大きな違いはみられなかったが、~10 kbp のプラスミド DNA を用いた際には IPTG の添加によってコロニーの数に大きな違いを生じた。このことから、~2 kbp のプラスミド DNA の組換えを触媒するのに少量の TG1 インテグラーゼで十分である一方、~10 kbp のプラスミド DNA の組換えを触媒するためには大量のインテグラーゼが必要であることが示された。~2 kbp と~10 kbp の分子量の違いを補正した 0.1 pmol DNA あたりの形質転換効率の比較を行った場合、各株に対する~10 kbp のプラスミド DNA の組換えは、IPTG を添加した~2 kbp のプラスミド DNA の組換えよりも幾分効率的であった (Table 3-2)。さらに、IPTG の存在下で *lacZ* 含有~10-kbp ドナープラスミドによる形質転換を行った際、0.1 μ g の DNA あたり $>10^{-2}$ のコロニーを形成した *attP* 含有株 (P2, P3, P4, P5, P10, P11) では、IPTG と X-gal を含んだセレクションプレート上で青色のコロニーだけを形成した。このことから、長鎖 DNA が安定にゲノム上に保持されることが示唆された。興味深いことに、全ての *attB* 含有株を~10 kbp のドナープラスミドによって形質転換した際に極めて低い効率 ($<10^{-1}$ colonies/0.1 μ g DNA) で形質転換体を得られたが、*attP* 含有株では~10 kbp のドナープラスミドによって形質転換した際に大きく異なる効率 (0- 10^3 colonies/0.1 μ g DNA) で形質転換体を得られた。一例として、~10 kbp のドナープラスミドで形質転換した際、5 つの *attP* 挿入株 (P2, P3, P5, P10, P11) では~ 10^{2-3} colonies/0.1 μ g DNA を形成し、2 つの *attP* 挿入株 (P1, P4) では 10^{1-2} colonies/0.1 μ g DNA を形成したが、他の 5 つの株 (P6, P7, P8, P9, P12) では IPTG の添加により TG1 インテグラーゼの発現を誘導していた時であっても $<10^1$ colonies/0.1 μ g DNA であった。24 の *att* 部位含有株の中では、P10 株が IPTG 存在下で~10-kbp DNA による形質転換効率が最も高く (2.42×10^3

colonies/0.1 μ g DNA), コントロールである pUC19 プラスミドによる形質転換効率 (3.01×10^5 colonies/0.1 μ g DNA) の~0.8%の効率であった。これらの結果は, TG1 インテグラーゼによる部位特異的組換えにおいて高い組換え効率を有する *attP* 含有株は, 高い組換え効率を有する *attB* 含有株より容易に得られるという結果と一致しており, TG1 インテグラーゼによる部位特異的組換えに適切であると考えられるゲノムの位置に~10 kbp の DNA を効率的に導入できることを示している。

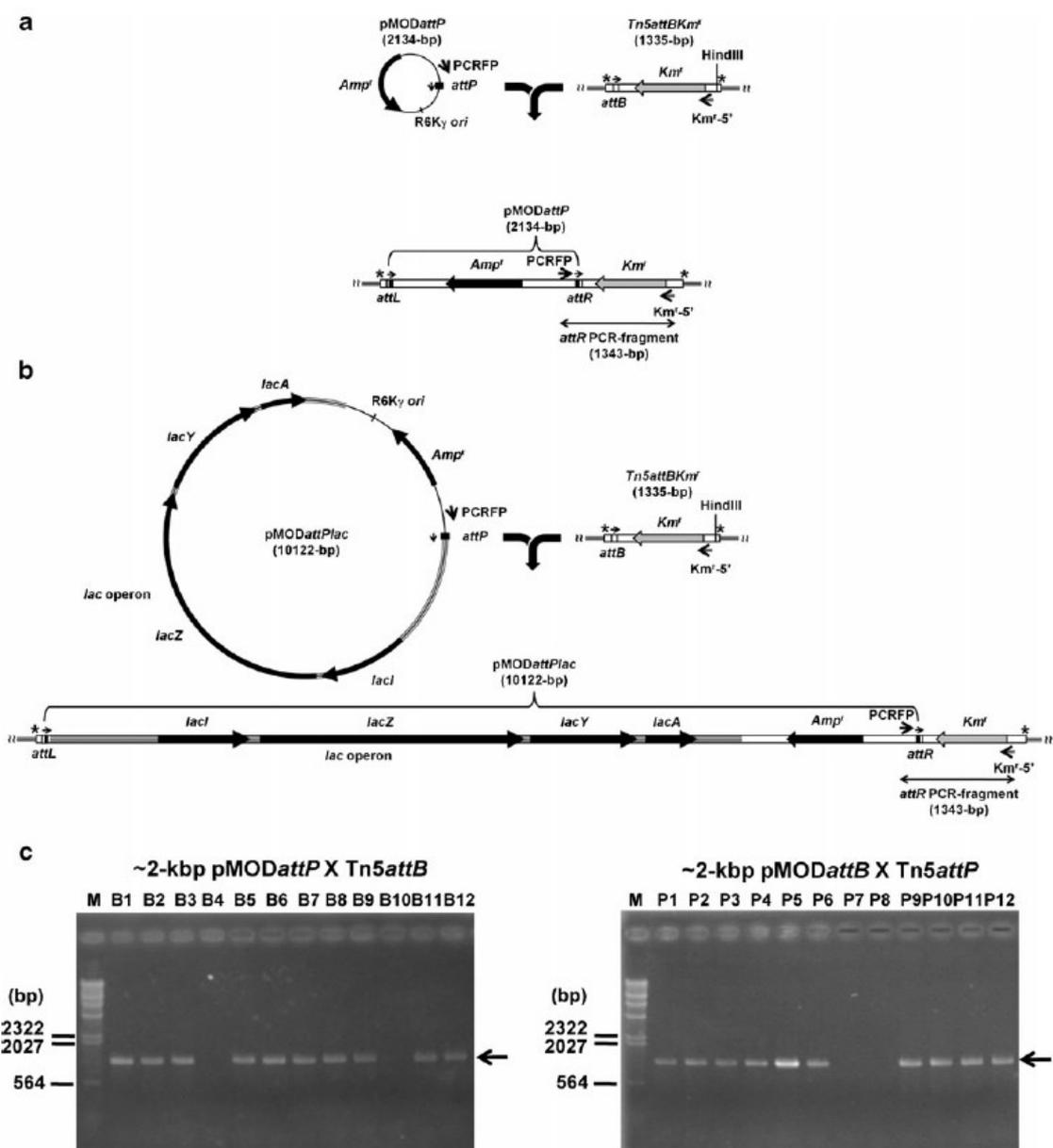


Fig. 3-4 TG1 integrase-mediated site-specific genomic integration.

Schematic representations of the substrates and products of site-specific recombination between pMODattP (2,134 bp) and the attB-inserted genome (a) and between pMODattPlac (10,122 bp) and the attB-inserted genome (b) are shown. Tn5 transposon DNA (1,335 bp) was inserted into the *E. coli* EC100 genome, as described in the “Materials and methods”. The attP and attB sites are indicated by filled and open boxes, respectively, and thin arrows along the att sites indicate the direction of attachment site. The junction sites between Tn5 transposon and genomic DNAs are indicated by

asterisk, and the position of the *Hind*III site used to identify the location of inserted *att* site with the shotgun cloning that targets the *Km^r* gene is indicated. *Thick arrows* along the plasmid and genomic maps indicate the positions of PCRFP and *Km^r-5'* primers specific for the pMOD plasmid and Tn5 transposon, respectively, which were used to confirm the insertion of donor plasmid into the acceptor genome by the TG1 integrase-dependent recombination, and the expected size (1,343 bp) of PCR product is also indicated. (c) Agarose gel electrophoresis of the PCR products amplified from genomic DNA extracted from transformants that resulted from site-specific integrations of pMOD*attP* into the genomes of *attB*-inserted strains, B1-B12, and those of pMOD*attB* into the genomes of *attP*-inserted strains, P1-P12, in the absence of IPTG are shown.

Table 3-2 Efficiency of the TG1 integrase-mediated site-specific genomic integration (\pm SD of data (more than ten colonies) ranged from $\pm 7\%$ to $\pm 76\%$ of the number of colonies)

Strain	Locus	(Min)	Gene product	pUC19-IPTG The number of colonies/0.1 μ g DNA (transformation efficiency)								
				-2 kbp pMODarrP or pMODarrB	-10 kbp pMODarrP/ase or pMODarrB/ase	-IPTG	+IPTG	-IPTG	+IPTG			
B1				2.99×10^5	9	(1×10^3)	7	(1×10^3)	1	(7)	2	(1×10^3)
B2	<i>xdhD</i>	65.06	Possible hypoxanthine oxidase xdhD	6.19×10^5	3.75×10^{2b}	(5.28×10^7)	8.5×10^3	(1.2×10^7)	0	(0)	2	(1×10^3)
B3				5.08×10^5	1.4×10^3	(1.5×10^7)	1.1×10^3	(1.5×10^7)	1	(7)	1	(7)
B4	<i>mxaA</i>	64.94	Molybdopterin cytidylyltransferase	6.01×10^5	1.4×10^3	(2.0×10^7)	1.3×10^3	(1.8×10^7)	0	(0)	1	(7)
B5				5.09×10^5	7.2×10^3	(1.0×10^7)	6.6×10^3	(9.3×10^7)	0	(0)	2.5×10^3	(1.7×10^5)
B6				4.88×10^5	1.8×10^3	(2.5×10^7)	8	(1×10^7)	0	(0)	5	(8×10^3)
B7				4.70×10^5	8	(1×10^7)	4	(6)	1	(7)	1	(7)
B8				5.53×10^5	4	(6)	3	(4)	0	(0)	0	(0)
B9				5.38×10^5	5.5×10^3	(7.7×10^7)	6.4×10^3	(9.0×10^7)	0	(0)	7	(6×10^3)
B10	<i>purZ</i>	57.97	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase	8.41×10^5	5	(7)	3	(4)	0	(0)	1	(7)
B11				5.80×10^5	3.7×10^3	(5.2×10^7)	3.1×10^3	(4.4×10^7)	1	(7)	3	(2×10^3)
B12	<i>tnsB</i>	83.80	Low affinity tryptophan permease	5.62×10^5	4.4×10^3	(6.2×10^7)	3.8×10^3	(5.4×10^7)	1	(7)	1.0×10^3	(6.7×10^3)
Unmodified ^f				4.51×10^5	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
P1				7.20×10^5	4.20×10^2	(5.92×10^7)	4.28×10^2	(6.03×10^7)	2	(1×10^3)	2.9×10^3	(1.9×10^5)
P2	<i>yabP</i>	1.26	Hypothetical protein yabP	4.56×10^5	4.18×10^2	(5.89×10^7)	2.04×10^2	(2.87×10^7)	3.5×10^3	(2.3×10^3)	6.26×10^2	(4.18×10^3)
P3	<i>yggA</i>	86.50	Putative carboxy methylglutaredioxase	5.63×10^5	6.29×10^2	(8.66×10^7)	5.56×10^2	(7.83×10^7)	3.60×10^2	(2.40×10^3)	2.37×10^2	(1.56×10^3)
P4				6.45×10^5	3.24×10^2	(4.56×10^7)	1.36×10^2	(1.92×10^7)	4.8×10^3	(3.2×10^3)	9.8×10^2	(6.5×10^3)
P5	<i>fecA</i>	97.26	Iron(III) dicitrate transport protein fecA precursor	9.17×10^5	7.25×10^{2b}	(1.02×10^8)	5.76×10^2	(8.11×10^7)	2.3×10^3	(1.5×10^3)	1.91×10^2	(1.28×10^3)
P6	<i>dysB</i>	14.04	Hypothetical protein ydaM	7.48×10^5	2	(3)	1	(1)	0	(0)	2	(1×10^3)
P7	<i>hrrE</i>	3.29	Cold shock-like protein	4.63×10^5	1	(1)	0	(0)	3	(2×10^3)	1	(7)
P8	<i>ydaM</i>	30.27	Hydrogen peroxide-inducible genes activator	6.12×10^5	1	(1)	1	(1)	3	(2×10^3)	1	(7)
P9	<i>csnH</i> vsnG ^d	22.64	DNA-damase-inducible protein D	3.29×10^5	1.8×10^3	(1.8×10^7)	5	(7)	1	(7)	4	(3×10^3)
P10	<i>oxyR</i>	89.59		3.01×10^5	5.03×10^3	(7.11×10^7)	7.49×10^3	(1.05×10^8)	4.80×10^2	(2.87×10^3)	2.42×10^3	(1.61×10^4)
P11	<i>dinD</i>	82.24		3.75×10^5	2.02×10^{2b}	(2.84×10^7)	1.24×10^3	(1.75×10^7)	2.3×10^3	(1.5×10^3)	1.50×10^2	(1.00×10^4)
P12				5.60×10^5	1	(1)	0	(0)	2	(1×10^3)	0	(0)
Unmodified ^f				4.51×10^5	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)

Efficiency of the TG1 integrase-mediated genomic integration in *att* site-inserted *E. coli* EC100 (*pir*^r) cells was examined as described in “Materials and methods”. The CaCl₂-treated 1 mL cultured EC100 cells that contained a Tn5 transposon in the genome, either *Tn5attBKm*^r or *Tn5attPKm*^r (*Km*^r), and harbored the TG1 integrase expression vector, pACYCplacTG1*int* (*Cm*^r), were transformed with a replicative control plasmid, 0.1 µg pUC19 (*Amp*^r), or a corresponding *att* site-containing non-replicative donor plasmid, 0.1 µg pMOD*attP* or pMOD*attB* (*Amp*^r) (2,134 bp) or 0.1 µg pMOD*attPlac* or pMOD*attBlac* (*Amp*^r) (10,122 bp); cells were spread on LB-Amp-Cm-Km plates containing 0.2 mM X-Gal in the absence or presence of 1 mM IPTG. Unmodified cells, which did not contain an *att* site insertion, harboring the expression vector were transformed with the control or donor plasmid and spread on LB-Amp-Cm plates. Transformation efficiency, which was corrected for the difference in molecular weight between the ~2 and ~10 kbp donor plasmids, is shown in parenthesis following the number of colonies/0.1 µg DNA. Data are means from three independent experiments.

^a Transformation efficiency was calculated as the number of colonies yielded by 0.1 pmol of plasmid DNA in a transformation reaction.

^b The number of colonies formed by the cells containing an *attB* site in the *xdhD* or *tnaB* gene or an *attP* site in the *fecA* or *dinD* gene when those transformed with the ~2 kbp pMOD*attP* or pMOD*attB* plasmid in the absence of IPTG filled Table 3-1.

^c Unmodified cells did not contain an *att* site insertion.

^d The *attP* site was inserted into a non-coding region between the *cspH* and *cspG* genes.

3.2.4 微生物ゲノム上に挿入された *att* 部位の位置

Tn5 トランスポゾンの *Km^r* 遺伝子を標的としたショットガンクローニングにより、13 個の *att* 部位含有株のゲノムに挿入された *att* 部位の位置を確認した。挿入された *att* 部位の配列を有するゲノム DNA および Tn5 トランスポゾン間の塩基配列によって 13 株の 4.6 Mbp の大腸菌ゲノム中での *att* 部位の位置を特定した (Table 3-2, Fig. 3-5)。IPTG 存在下で~10-kbp DNA ドナープラスミドによる高い組換え効率 (~10²⁻³ colonies/0.1 μg DNA) を有する P2, P3, P5, P10, P11 株の *attP* 部位は、複製起点である *oriC* (84.57 min) と *oriC* の細胞両極性移動に関わるシス配列である *migS* (89.10 min) を含む *dinD-yabP* 領域 (82.24-1.26 min) に挿入されていることが示された。一方、IPTG 存在下であっても~10 kbp のドナープラスミドによって形質転換した際にコロニーをほとんど形成しない P6, P7, P8, P9 株の *att* 部位は *dinD-yabP* 領域の外側に挿入されていた。これらの結果は、大腸菌ゲノム中の他の領域に挿入された *attP* 部位より、*oriC-migS* 領域の近くに挿入された *attP* 部位を標的とする TG1 インテグラーゼによる組換えはより効率的であることを示している。一方、12 株全ての *attB* 挿入株は IPTG の存在下であっても~10-kbp ドナープラスミドによる形質転換においてコロニーをほとんど形成しなかった (<10⁻¹ colonies/0.1 μg DNA)。B2, B4, B10 株の *attB* 部位は *dinD-yabP* 領域の外のゲノム領域に挿入されていたが、B12 株の *attB* 部位は *dinD-yabP* 領域の *tnaB* 遺伝子 (83.80 min) に挿入されていた (Fig. 3-5) ことから、TG1 インテグラーゼによる *attB* 部位を標的とする組換えは、ゲノム中の *attB* 部位の挿入位置を問わず、大腸菌細胞においては効率的でないことが示された。これらの結果は、複製起点である *oriC* と大腸菌のセントロメア様配列である *migS* に最も近い領域に挿入した *attP* 部位に対する *attB* 含有プラスミドの組換えが、他の領域に *attP* 部位を挿入した組換えや、どの領域であっても *attB* 部位を挿入した組換えよりも効率的であることを示している。宿主細胞が単純な原核生物細胞であっても染色体にはプラスミドほど接近出来ないと考えられることから、染色体へのアクセスのしやすさが細胞内における TG1 インテグラーゼによる遺伝子組換え効率に影響したと考えられる。実際、挿入した *attP* 部位の組換え効率が高い *oriC-migS* 領域は染色体分離の際に細胞両極に移動するため^{25, 26)}、染色体のこの領域は大腸菌核様体の他の領域より細胞質に露出していると考えられる。従って、DNA の複製に加えて動的な構造の変化が起きる *oriC-migS* 領域は、大腸菌ゲノムの他の領域よりプラスミドの *att* 部位に接近しやすいと考えられる。以上の結果から、導入したプラスミドの *attB* 部位に対して事前に挿入した *attP* 部位が接近しやすいことが、異種細胞における TG1 インテグラーゼによる組換え効率において重要であることが示唆された。

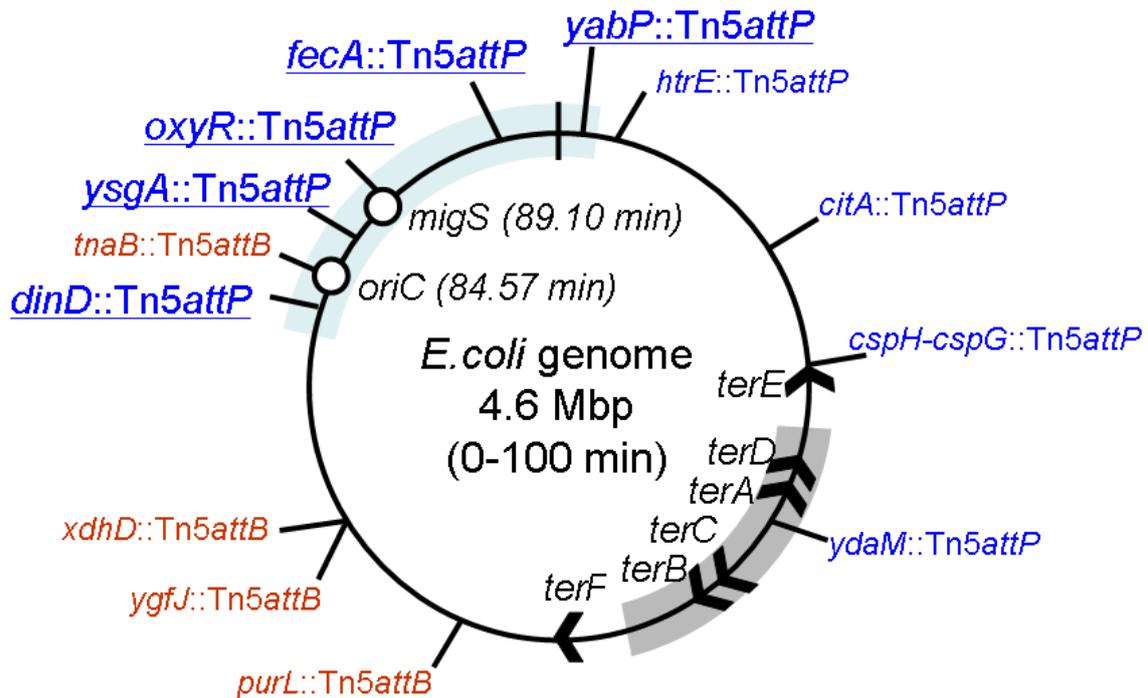


Fig. 3-5 The genomic locations of *att* sites inserted into the *E. coli* genome. The locations of *att* sites inserted into the *E. coli* EC100 genome by Tn5 transposon are indicated in the genomic map. The locations of inserted *attP* and *attB* sites are indicated by *blue* and *red letters*, respectively. The locations of replication origin (*oriC*), *E. coli* “centromere” analogue (*migS*), and replication termini (*terA-terF*) are indicated. The *attP*-inserted sites yielding high recombination efficiencies ($\sim 10^{3-4}$ transformants/ μ g DNA) for the integration of pMOD*attBlac* (10,122 bp) are *underlined*. The *dinD-yabP* region (82.24-1.26 min) were the inserted *attP* sites yielded high recombination efficiencies is indicated in *blue*.

3.2.5 プラスミド DNA 上の *att* 部位を標的とした *in vivo* 部位特異的組換えにおけるプラスミド DNA のコピー数の影響

一般的に野生型大腸菌細胞は DNA 複製を同時に開始するため 1 細胞あたり 4 つまたは 8 つの *oriC* サイトを含んでおり^{27, 28}、大腸菌 EC100 細胞がゲノム中に *dinD-yabP* 領域のコピーを他の領域よりも多く有していると考えられる。TG1 インテグラーゼによって触媒される組換え効率のアクセプター *att* 部位のコピー数の影響を調査するため、高コピー数のプラスミドである pUC (~10² copies/cell) または低コピー数のプラスミドである pMW (~1 copy/cell) の *att* 部位を標的とした TG1 インテグラーゼによる部位特異的組換え効率を比較した (Table 3-3)。大腸菌 EC100 (*pir*) 細胞は、アクセプタープラスミドの *Amp^r* 遺伝子または自己複製できないドナープラスミドの *Km^r* 遺伝子間での相同組換えを抑制する *recA1* 変異を有しているため、セレクトションプレート上で培養された形質転換体は TG1 インテグラーゼによってアクセプタープラスミドとドナープラスミドが融合したプラスミドを有していると期待される。融合プラスミドの配列は、コロニー PCR 法および PCR 産物の配列解析により求めた。さらに、TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有していない細胞において pMOD ドナープラスミドは複製されず、またプラスミドの形で存在していないことを確認した。その結果、pMOD ドナープラスミドが *attP*・*attB* 部位のどちらを含む場合も、*att* 部位含有アクセプタープラスミドが高コピー数・低コピー数に関係なく、TG1 インテグラーゼ発現プラスミドを有する細胞は TG1 インテグラーゼを発現しない細胞よりも >10² 倍多くのコロニーを形成した (Table 3-3)。このことから、内在する *att* 部位のコピー数は TG1 インテグラーゼの組換え効率に影響しないことが示された。以上の結果により、TG1 インテグラーゼの組換え効率にはゲノムに挿入された *attP* 部位のコピー数による影響はないと考えられる。

Table 3-3 Efficiency of the TG1 integrase-mediated inter-plasmid site-specific recombination

Donor plasmid	Acceptor plasmid or genome	Expression vector	The number of colonies/0.1 ug DNA	TG1 integrase-dependent integration efficiency ^a
pMODattPKm ^r	pUCattB	pACYCplacTG1int	5.147 ^b	257
pMODattPKm ^r	pUCattB	None	20 ^b	1
pMODattPKm ^r	pMWattB	pACYCplacTG1int	935	>935
pMODattPKm ^r	pMWattB	None	0	1
pMODattPKm ^r	-	pACYCplacTG1int	0	-
pMODattBKm ^r	pUCattP	pACYCplacTG1int	1.377 ^b	197
pMODattBKm ^r	pUCattP	None	7 ^b	1
pMODattBKm ^r	pMWattP	pACYCplacTG1int	805	>805
pMODattBKm ^r	pMWattP	None	0	1
pMODattBKm ^r	-	pACYCplacTG1int	0	-

Efficiency of *in vivo* inter-molecular site-specific recombination between the donor pMODattPKm^r or pMODattBKm^r (Amp^r, Km^r) (3,244 bp) plasmid and the acceptor pUCattB or pUCattP (Amp^r) (2,730 bp) plasmid or acceptor pMWattB or pMWattP (Km^r) (3,967 bp) plasmid, respectively, by the TG1 integrase in *E. coli* EC100 (*pir*) cells was examined as described in “Materials and methods”; cells harboring the TG1 integrase expression vector, pACYCplacTG1int (Cm^r), were spread on LB-Amp-Cm-Km plates, cells lacking the expression vector were spread on LB-Amp-Km plates, and cells lacking the acceptor plasmid were spread on LB-Amp-Cm-Km plates. In this inter-plasmid site-specific recombination assay, addition of 1 mM IPTG in the selection plates did not yield a substantial difference in the number of colonies. Data are means from three independent experiments.

^a TG1 integrase-dependent integration efficiency for each substrate configuration was calculated by dividing the number of colonies formed by the cells containing the TG1int gene by the number of colonies formed by the cells lacking the TG1int gene; the number of colonies was calculated as <1 for the cells did not yield colonies

^b The number of colonies formed by the cells harboring pUCattB or pUCattP as an acceptor plasmid fill Table 3-1.

3.3 結論

様々な哺乳類細胞を対象とした非ウイルス性遺伝子治療のために、Bxb1²⁹⁾, ϕBT1¹⁵⁾, ϕC31³⁰⁾, R4¹⁹⁾インテグラーゼなどのセリタイプ・インテグラーゼを用いた *in vivo* 分子間部位特異的遺伝子組換えシステムが報告されている。しかし、セリタイプ・インテグラーゼによる異種微生物細胞に対する遺伝子組換えシステムはほとんど報告されていない。本章では、外来 DNA を多種多様な細菌種のゲノムに効率的に導入する方法を確立するため、TG1 インテグラーゼによる異種細胞における分子間部位特異的遺伝子組換えシステムについて検討を行った。

相同組換えは一般的に微生物ゲノム中への外来 DNA の部位特異的導入のために適しているとされているが、セリタイプ・インテグラーゼによる部位特異的遺伝子組換えシステムは、低頻度な相同組換えをする微生物には有利である。さらに EZ-Tn5 トランスポゾームは宿主細胞のゲノム上に外来 DNA をランダムに挿入することから³¹⁾、セリタイプ・インテグラーゼと EZ-Tn5 トランスポゾームを組み合わせることにより、生合成遺伝子クラスターなどの長鎖 DNA の保持や過剰発現に適した位置に組み込んだ *attP* 部位に *attB* 含有環状 DNA を導入することを容易にすると期待される。本研究において、TG1 インテグラーゼによる組換えで高い効率を示す *oxyR::Tn5attP* や *dinD::Tn5attP* などの *att* 部位含有株が、挿入された外来 DNA を維持するのに適切であるかは不明であるが、*LacZ* を含んだ ~10-kbp DNA を導入した継代細胞は IPTG および X-gal を含むセレクションプレート上でほとんど青コロニーだけを形成したことから、長鎖 DNA の導入に耐えうる位置であると示唆される。また、本研究において、0.1 pmol DNA あたりの形質転換効率の比較をしたところ、IPTG 存在下での大腸菌ゲノムへの ~10-kbp DNA の組換え効率は、~2-kbp DNA の組換え効率と同程度、または僅かに高い効率を示したことから、TG1 インテグラーゼによる遺伝子組換えシステムは ~10 kbp 以上の長鎖 DNA を異種細菌ゲノム上に効率的に導入することが出来る可能性があることが示唆された。さらに、大腸菌ゲノムの *attB* 部位の位置を問わず、*attB* 部位を標的とする TG1 インテグラーゼによる組換えは効率的でないことが示唆された。

また、本研究は大腸菌ゲノム中の *dinD-yabP* 領域（複製起点の *oriC* や大腸菌のセントロメア様配列である *migS*）に挿入された *attP* 部位を標的とした TG1 インテグラーゼによる組換えが、他の領域に *attP* 部位を挿入した場合よりも効率的であったことも示した。さらに、アルファプロテオバクテリアのアミノトランスフェラーゼ遺伝子（*dapC* 関連遺伝子）中に存在する配列が、*in vivo* における TG1 インテグラーゼの標的部位として機能することが報告されている³²⁾。

以上の知見は、セリタイプ・ファージ・インテグラーゼによる遺伝子組換え

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多種多様な細菌類のゲノムへ、薬効を有する二次代謝産物を生合成する長鎖遺伝子クラスターなどの長鎖 DNA を効率的に導入するために有用であると期待される。

3.4 実験項

細胞およびプラスミド

放線菌 TG1 ファージインテグラーゼによる *in vivo* 分子間部位特異的組換え法の宿主として大腸菌 EC100 株 [*F*, *mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, Δ *lacX74*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara, leu*)7697, *galU*, *galK*, λ , *rpsL*, *nupG*] (Epicentre, USA) を用いた。また、大腸菌 DH5 α (Takara, Japan) および EC100D (*pir*⁺) (Epicentre) をクローニング用宿主として用いた。pUC19 プラスミド (Takara) および pMOD4 (Epicentre) を att 部位挿入プラスミド作製に用い、pACYC184 (Nippon gene, Japan) を TG1 インテグラーゼ発現ベクタープラスミドの作製に用いた。また、pETGST-Int は TG1 インテグラーゼの遺伝子をコードしている TG1*int* 遺伝子を有するプラスミドである²²⁾。実験に用いた PCR プライマーを Table S1 に示す。

lac プロモーターから TG1 インテグラーゼを発現するプラスミドである pACYCplacTG1*int* の作製は以下の通りである。pUC19 由来 *lac* プロモーターおよび pETGST-Int 由来 TG1*int* 遺伝子を、それぞれ pLac-5', pLac-3' プライマー、および TG1Int-5', TG1Int-3' プライマーを用いた PCR により増幅した。増幅した DNA 断片をアガロースゲル電気泳動により精製、混合した後、pLac-5' および TG1Int-3' プライマーを用いた 2nd PCR を行った。2nd PCR で得られた断片を pACYC184 の *EcoRV*-*Bam*HI サイトに挿入した pACYCplacTG1*int* を用いて DH5 α 細胞を形質転換した。

分子間部位特異的組換えに用いた att 部位挿入 pMOD4 および pUC19 誘導体の作製は以下の通りである。本研究では、放線菌 TG1 ゲノム由来の 50 bp の att*P* 配列および *Streptomyces avermitilis* ゲノム由来の 50 bp の att*B* 配列を用いた^{33, 34)}。合成した 70 bp の相補的なオリゴヌクレオチド 2 種 (Table S1) をアニーリングすることにより得られた att*P* および att*B* の DNA 断片を、pMOD4 あるいは pUC19 の *Bam*HI-*Sa*I サイトにそれぞれ挿入することにより、pMODatt*P*, pMODatt*B*, pUCatt*P*, pUCatt*B* を得た。EZ-Tn5 <T7/KAN-2> Transposon DNA (Epicentre) 由来のカナマイシン耐性 (*Km*^r) 遺伝子は *Km*^r-5' および *Km*^r-3' プライマーを用いた PCR により増幅し、増幅した DNA 断片を pMODatt*P* および pMODatt*B* の *Hind*III-*Pst*I サイトに挿入することにより、pMODatt*P**Km*^r および pMODatt*B**Km*^r を得た。pMOD4 中の R6Ky オリジンの複製は *pir* 遺伝子産物である複製開始タンパク質 Π に依存し、*pir* 遺伝子はほとんどの微生物種が有して

いないことから、作製したpMOD4およびpUC19誘導体は大腸菌EC100D (*pir⁺*) およびDH5 α によりそれぞれクローニングを行った。また、EZ-Tn5 transposome kit (Epicentre) により *att*部位を挿入した大腸菌EC100を得た。

pMOD*attPKm^r*およびpMOD*attBKm^r*を鋳型とし、PCRFPおよびPCRRPプライマーを用いてPCR増幅することにより、*attP-Km^r*および*attB-Km^r*遺伝子断片をそれぞれTn5トランスポザーゼの2つの認識配列間に挿入したTn5トランスポゾンDNAを作製し、説明書に従い大腸菌EC100ゲノム中にランダムに導入した。形質転換体は30 μ g/mLのkanamycin (Km) を含むLuria-Bertani (LB) 寒天培地 (LB-Km) 上で培養を行った。単一形質転換体を採取し、EC100ゲノム上に挿入された*att*部位の位置をTn5トランスポゾンDNA中のKm^r遺伝子を標的としたショットガンクローニングにより特定した。*att*部位含有EC100細胞から採取したゲノムDNAはHindIIIを用いた制限酵素処理を行った。3,000-6,000 bp前後のDNA断片をアガロースゲル電気泳動により精製し、pUC19のHindIIIサイトに導入したゲノムライブラリーを作製し、DH5 α の形質転換を行った。形質転換体は50 μ g/mL ampicillinを含んだLB-Kmプレート (LB-Amp-Km) 上で培養し、蛍光色素ターミネーターによるジデオキシチェンターミネーション法を用いて、ABI PRISM 310 sequencer (Perkin-Elmer) で測定することによりTn5 transposonとゲノムDNA間の結合部位のヌクレオチド配列を決定した。

PCRはTakara PCR Thermal Cycler Dice TP-650により、PrimeSTAR HSまたはTaq DNA polymerase (Takara) を用いて、25サイクル、96 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 60 s/1 kbpの条件で行った。また、全てのプライマーはGreiner Japanに合成を依頼した。

pSC101オリジンを有するpMW218プラスミド (Nippon gene) を用いて*att*部位含有低コピー数プラスミドである*att*部位含有pMW218誘導体pMW*attP*およびpMW*attB*を、それぞれpUC*attP*およびpUC*attB*と同様の方法で作製し、大腸菌DH5 α を用いてクローニングを行った。また、分子間部位特異的組換えに用いた*att*部位および*lac*オペロンを有するpMOD4誘導体であるpMOD*attPlac*およびpMOD*attBlac*は、以下の方法で作製した。*lacI-lacZ-lacY-lacA*領域からなる*lac*オペロンは大腸菌HB101 (Takara) のゲノムDNAに由来し、Lac-5'およびLac-3'プライマーを用いたPCRにより増幅し、得られた~8 kbpのDNA断片を~2 kbpのpMOD*attP*またはpMOD*attB*のHindIII-SaIサイトに挿入することで、~10 kbpのpMOD*attPlac*またはpMOD*attBlac*プラスミドを得た。得られたpMOD4誘導体は大腸菌EC100D (*pir⁺*)を用いてクローニングを行った。また、PCRはTakara PCR Thermal Cycler Dice TP-650により、PrimeSTAR HSまたはGXL DNA polymerase (Takara) を用いて、25サイクル、96 °C 30 s, 55 °C 30

s, 72 °C 60 s/1 kbpの条件で行った。*att*部位が挿入された位置はProfiling of *E. coli* Chromosomesのデータベースを検索することで決定した。

*in vivo*分子間部位特異的組換え

大腸菌EC100細胞中のTG1インテグラーゼによる*in vivo*分子間部位特異的組換え効率には以下の方法で求めた。2つのプラスミドDNA間での部位特異的組換えには、宿主細胞中のpUC*attP*またはpUC*attB*をアクセプタープラスミドとして、pMOD*attPKm^r*またはpMOD*attBKm^r*をドナープラスミドとして用いた。EC100細胞はpACYCplacTG1*int*およびpUC*attP*またはpUC*attB*を有しており、0.1 µg pMOD*attBKm^r*または0.1 µg pMOD*attPKm^r*でそれぞれ形質転換を行った。また、プラスミドとゲノムDNA間での部位特異的組換えには、ゲノムDNAに*att*部位を挿入したEC100細胞をアクセプターゲノムとして、pMOD*attP*またはpMOD*attB*をドナープラスミドとして用いた。pACYCplacTG1*int*を有し、*att*部位を挿入したEC100細胞であるEC100 (*Tn5attPKm^r*)またはEC100 (*Tn5attBKm^r*)は0.1 µg pMOD*attB*または0.1 µg pMOD*attP*によりそれぞれ形質転換した。ドナープラスミドはEC100細胞をCaCl₂処理したコンピテントセルに導入し、形質転換体は34 µg/mL chloramphenicol (Cm)に加え、1 mM isopropyl thiogalactopyranoside (IPTG)を含むLB-Amp-Kmプレート (LB-Amp-Cm-Km)と含まないプレート上で培養した。また、ネガティブコントロールであるTG1インテグラーゼ発現プラスミド欠損株はLB-Amp-Kmプレートで、アクセプター*att*部位欠損株はLB-Amp-Cmプレート上で培養した。TG1インテグラーゼによる組換えであるかはM4およびK^{m^r}-5'プライマー、またはPCRFPおよびK^{m^r}-5'プライマーを用いたPCRによる組換え産物の増幅から確認し、増幅したDNA断片の*attL*または*attR*配列はジデオキシチェーンターミネーション法による配列解析により決定した。

~10 kbpのプラスミドを用いたプラスミドDNAとゲノムDNA間での組換えには、pMOD*attPlac*またはpMOD*attBlac*をドナープラスミドとして、ゲノムDNAに*att*部位を挿入したEC100細胞をアクセプターゲノムとして用いた。ドナープラスミド (0.1 µg) はEC100細胞をCaCl₂処理したコンピテントセルに導入し、0.2 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal)に加え、1 mM IPTGを含むLB-Amp-Cm-Kmプレートまたは含まないプレート上で培養した。TG1インテグラーゼによる組換えであるかはPCRによる組換え産物の増幅から確認し、増幅したDNA断片の*attL*または*attR*配列はジデオキシチェーンターミネーション法による配列解析により決定した。

Table S1 PCR primers used for DNA amplification.

Name	Nucleotide sequence
pLac-5'	5'-GCTTAC GATATC CTGGCAGACAGGTTTCCCG-3' (<i>EcoRV</i>)
pLac-3'	5'-AGAATGACCATATGTATATCTCCTTCCTGTTTCTGTGTGAAATTG-3'
TG1 Int-5'	5'-GAAGGAGATATACATATGGTCATTCTGGCAGGCG-3'
TG1 Int-3'	5'-GTACTT GGATCC TACGCCGCCGCTGTGAACC-3' (<i>Bam</i> HI)
attP-5'	5'-GATA GGATCC GTTCCAGCCCAACAGTGTAGTCTTTGCTTTACCCAGTTGGGCGGGATAG TCGAC GATC-3' (<i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I)
attP-3'	5'-GATC GTCGAC TATCCCGCCCAACTGGGTAAGAGCAAAGACTAACACTGTTGGGCTGGAAC GGATCC TATC-3' (<i>Sal</i> I- <i>Bam</i> HI)
attB-5'	5'-GATA GGATCC TCGATCAGCTCCGCGGGCAAGACTTCTCCTTACGGGGTGGAAGTCCG GTCGAC GATC-3' (<i>Bam</i> HI- <i>Sal</i> I)
attB-3'	5'-GATC GTCGAC CCGACCTTCCACCCGTAAGGAGAAGGTCTTGCCCGGGAGCTGATCGA GGATCC TATC-3' (<i>Sal</i> I- <i>Bam</i> HI)
Kmr-5'	5'-GCTTAC AAGCTT GATGAATTGTGTCTCAAATC-3' (<i>Hind</i> III)
Kmr-3'	5'-GTACTT CTGCAG GATGAGAGCTTGTTGTAGG-3' (<i>Pst</i> I)
PCRFP	5'-ATTCAGGCTGCGCAACTGT-3'
PCRPR	5'-GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAG-3'
M4	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'

Recognition sequences of restriction endonucleases used for the construction of plasmids in this study are shown in bold, and the names of restriction endonucleases are shown in parentheses following the nucleotide sequences of primers.

3.5 参考文献

- 1) Campbell A., Episomes, *Adv. Genet.*, **11**, 101-145 (1962).
- 2) Capmbell A., Chromosomal insertion site for phages and plasmids, *J. Bacteriol.*, **174**, 7495-7499 (1992).
- 3) Smith M. C. M., and Thorpe H. M., Diversity in the serine recombinases, *Mol. Microbiol.*, **44**, 299-307 (2002).
- 4) Groth A. C., and Calos M. P., Phage integrases: biology and applications, *J. Mol. Biol.*, **335**, 667-678 (2004).
- 5) Hirano N., Muroi T., Takahashi H., and Haruki M., Site-specific recombinases as tools for heterologous gene integration, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**, 227-239 (2011).
- 6) Gilbertson L., Cre-lox recombination: Cre-active tools for plant biotechnology, *Trends Biotechnol.*, **21**, 550-555 (2003).
- 7) Turan S., Galla M., Emst E., Qiao J., Voelkel C., Schiedlmeier B., Zehe C., and Bode J., Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges., *J. Mol. Biol.*, **407**, 193-221 (2011).
- 8) Landy A., Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination, *Annu. Rev. Biochem.*, **58**, 913-949 (1989).
- 9) Biswas T., Aihara H., Radman-Livaja M., Filman D., Landy A., and Ellenberger T., A structural basis for allosteric control of DNA recombination by λ integrase, *Nature*, **435**, 1059-1066 (2005).
- 10) Li W., Kamtekar S., Xiong Y., Sarkis G. J., Grindley N. D. F., and Steitz T. A., Structure of a synaptic $\gamma\delta$ resolvase tetramer covalently linked to two cleaved DNAs, *Science*, **309**, 1210-1215 (2005).
- 11) Smith M. C. M., Brown W. R. A., McEwan A. R., and Rowley P. A., Site-specific recombination by ϕ C31 integrase and other large serine recombinases, *Biochem. Soc. Trans.*, **38**, 388-394 (2010).
- 12) Brown W. R., Lee N. C., Xu Z., and Smith M. C., Serine recombinases as tolls for genome engineering, *Methods*, **53**, 372-379 (2011).
- 13) Matsuura M., Noguchi T., Yamaguchi D., Aida T., Asayama M., Takahashi H., and Shirai M., The *sre* gene (ORF469) encodes a site-specific recombinase responsible for integration of the R4 phage genome, *J. Bacteriol.*, **178**, 3374-3376 (1996).
- 14) Grosh P., Kim A. I., and Hatfull G. F., The orientation of mycobacteriophage Bxb1 integration is solely dependent on the central dinucleotide of *attP* and *attB*, *Mol. Cell*, **12**, 1101-1111 (2003).

- 15) Xu Z., Lee N. C. O., Dafhnis-Calas F., Malla S., Smith M. C. M., and Brown W. R. A., Site-specific recombination in *Schizosaccharomyces pombe* and systematic assembly of a 400 kb transgene array in mammalian cells using the integrase of *Streptomyces* phage ϕ BT1, *Nucleic Acids Res.*, **36**, e9 (2008).
- 16) Thorpe H. M., and Smith M. C. M., In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5505-5510 (1998).
- 17) Rashel M., Uchiyama J., Ujihara T., Takemura I., Hoshiba H., and Matsuzaki S., A novel site-specific recombination system derived from bacteriophage ϕ MR11, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 192-198 (2008).
- 18) Bibb L. A., Hancox M. I., and Hatfull G. F., Integration and excision by the large serine recombinase ϕ Rv1 integrase, *Mol. Microbiol.*, **55**, 1896-1910 (2005).
- 19) Olivares E. C., Hollis R. P., and Calos M. P., Phage R4 integrase mediates site-specific integration in human cells, *Gene*, **278**, 167-176 (2001).
- 20) Stoll S. M., Ginsburg D. S., and Calos M. P., Phage TP901-1 site-specific integrase functions in human cells, *J. Bacteriol.*, **184**, 3657-3663 (2002).
- 21) Gregory M. A., Till R., and Smith M. C. M., Integration site for *Streptomyces* phage ϕ BT1 and development of site-specific integrating vectors, *J. Bacteriol.*, **185**, 5320-5323 (2003).
- 22) Morita K., Yamamoto T., Fusada N., Komatsu M., Ikeda H., Hirano N., and Takahashi H., In vitro characterization of the site-specific recombination system based on actinophage TG1 integrase, *Mol. Genet. Genomics*, **282**, 607-616 (2009).
- 23) Morita K., Yamamoto T., Fusada N., Komatsu M., Ikeda H., Hirano N., Takahashi H., The site-specific recombination system of actinophage TG1, *FEMS Microbiol. Lett.*, **297**, 234-240 (2009).
- 24) Thyagarajan B., Olivares E. C., Hollis R. P., Ginsburg D. S., and Calos M. P., Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage ϕ C31 integrase, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3926-3934 (2001).
- 25) Yamaichi Y., and Niki H., *migS*, a *cis*-acting site that affects bipolar positioning of *oriC* on the *Escherichia coli* chromosome, *EMBO J.*, **23**, 221-233 (2004).
- 26) Fekete R. A., and Chattora D. K. A., *cis*-acting sequence involved in

- chromosome in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **55**, 175-183 (2005).
- 27) Skarstad K., Boye E., and Steen H. B., Timing of initiation of chromosome replication in individual *Escherichia coli* cells, *EMBO J.*, **5**, 1711-1717 (1986).
- 28) Boye E., Blinkova A., and Walker J. R., Defective initiation in an *Escherichia coli dnaA (Cs, Sx)* mutant, *Biochimie.*, **83**, 25-32 (2001).
- 29) Russell J. P., Chang D. W., Tretiakova A., and Padidam M., Phage Bxb1 integrase mediates highly efficient site-specific recombination in mammalian cells, *Biotechniques*, **40**, 460-464 (2006).
- 30) Thyagarajan B., Olivares E. C., Hollis R. P., Ginsburg D. S., and Calos M. P., Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage ϕ C31 integrase, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3926-3934 (2001).
- 31) Goryshin I. Y., Jendrisak J., Hoffman L. M., Meis R., and Reznikoff W. S., Insertional transposon mutagenesis by electroporation of released Tn5 transposition complexes, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 97-100 (2000).
- 32) Morita K., Morimura K., Fusada N, Komatsu M., Ikeda H., Hirano N., and Takahashi H., Site-specific genome integration in alphaproteobacteria mediated by TG1 integrase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **93**, 295-304 (2012).
- 33) Foor F., Roberts G. P., Morin N., Snyder L., Hwang M., Gibbons P. H., Paradiso M. J., Stotish R. L., Ruby C. L., Wolanski B., and Streicher S. L., Isolation and characterization of the *Streptomyces cattleya* temperate phage TG1, *Gene*, **39**, 11-16 (1985).
- 34) Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sasaki Y., Hattori M., and Omura S., Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial micro-organism *Streptomyces avermitilis*, *Nat. Biotechnol.*, **21**, 526-531 (2003).

第四章

総括

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、微生物ゲノムの改変について概説し、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、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 (**PI_m1**)、およびブロック共重合体 (**PI_m2**) をそれぞれ合成した。分子量と重合度から推定される **PI_m1**、**PI_m2** 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、**PI_m2** 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 **PI_m1** 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~150nm 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おいても蛍光が観測された。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 **Plm1** 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ンタイプ・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ンタイプ・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、セリンタイプ・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生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、およびセリンタイプ 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。

論文発表

(第二章)

1) Yoshihiko Kihara, Tsukasa Ichikawa, Shouichi Abe, Nobukatsu Nemoto, Tsutomu Ishihara, Nobutaka Hirano and Mitsuru Haruki, “Synthesis of alkyne-functionalized amphiphilic polysiloxane polymers and formation of nanoemulsions conjugated with bioactive molecules by click reactions”, *Polymer Journal*, Vol. 46, No. 3, Mar 2014, pp. 175-183.

(第三章)

1) Nobutaka Hirano, Tetsuro Muroi, Yoshihiko Kihara, Ryuichi Kobayashi, Hideo Takahashi and Mitsuru Haruki, “Site-specific recombination system based on actinophage TG1 integrase for gene integration into bacterial genomes”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 89, Mar 2011, pp. 1877-1884.

2) Tetsuro Muroi, Takaaki Kokuzawa, Yoshihiko Kihara, Ryuichi Kobayashi, Nobutaka Hirano, Hideo Takahashi and Mitsuru Haruki, “TG1 integrase-based system for site-specific gene integration into bacterial genomes”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 97, May 2013, pp. 4039-4048.

略号

J	coupling constant (in NMR spectrometry)
cm^{-1}	wavenumber(s)
δ	chemical shift in parts per million downfield from tetramethylsilane
$^{\circ}\text{C}$	degrees celsius
d	doublet (spectral)
dd	double doublet (spectral)
g	gram(s)
h	hour(s)
Hz	hertz
IR	ingrared
k	kilo
L	liter(s)
m	multiplet (spectral); meters(s); milli
M	mega
min	minute(s)
mol	mole(s)
nm	nano meter
p.p.m.	part(s) per million
Rf	retention factor in chromatography
s	singlet (spectral)
vol	volume
v/v	volume per unit volume (volume-to-volume ratio)
w/v	weight per unit volume (weight-to-volume ratio)

謝辞

本論文は、2011年から2014年の間に日本大学大学院工学研究科 春木満教授の指導のもとで行われた、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と薬物送達システムへの利用およびセリンタイプ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研究結果をまとめたものである。

本論文を結ぶにあたり、本研究の遂行において、ご指導、ご協力いただいた方々に感謝の意を表します。

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、終始懇切なるご指導、ご鞭撻を賜った日本大学大学院工学研究科教授 春木満 先生、日本大学大学院工学研究科准教授 平野展孝 先生に心から深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、貴重なサンプルを快く譲渡していただきました福島県立医科大学教授 和田郁夫 先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、御助言をいただきました日本大学大学院工学研究科教授 根本修克 先生、日本大学大学院工学研究科准教授 石原務 先生に深く感謝致します。

本論文の執筆にあたり、NMR測定をしていただいた日本大学工学部次世代工学技術研究センターの 常盤聡子 氏、菅島奈美 氏、吉田久美子 氏にお礼申し上げます。

本論文作成にあたり、さまざまな面でご指導、ご協力いただきました生命分子工学研究室卒業生の小林隆一さん、阿部翔一くんに心より感謝いたします。

最後に、本研究をまとめるまでの長きに渡り、さまざまな面で支えていただきました家族、友人たちに心より感謝いたします。