

自己評価報告書

平成23年 4月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20680027

研究課題名（和文） DNA 高次構造・凝縮の圧力操作と細胞内転写制御

研究課題名（英文） Pressure controlling of DNA structure and its transcription

研究代表者

木村 剛（KIMURA TUYOSHI）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：10393216

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：静水圧、遺伝子、高次構造、凝縮、転写、遺伝子送達

1. 研究計画の概要

研究代表者らは、静水圧印加によりDNAが圧力依存的に凝縮され、除圧後の大気圧下でもその凝縮構造が維持されることを発見した。この事実は、DNAの高次構造・凝縮を圧力制御により操作しうることを示唆し、多価カチオン添加に誘起されるDNAの1次相転移による高次構造変化・凝縮とは異なる新しいタイプのDNA高次構造体の創製のコンセプトを与える。本研究では、圧力凝縮DNAという実験的にも理論的にもほとんど未開拓・未経験のDNA高次構造体が、機能性DNA創製において新しい局面を拓く「シーズ」となりうるという認識の下で、圧力に誘起されるDNA高次構造変化・凝縮に関するプロセス工学的、構造・機能科学のおよび機能開発的研究を包括的かつ系統的に行う。研究の実施においては、以下の3つの項目、DNA高次構造・凝縮の圧力制御法の確立、圧力凝縮DNAの高次構造と機能発現相関の解明、圧力凝縮DNAのin vitro・in vivo 遺伝子デリバリーへの応用を目標としている。各項目で得られた結果を有機的に相互リンクできる計画を立て、本研究を効率的に実施する。

2. 研究の進捗状況

本研究では、DNA高次構造・凝縮の圧力制御法の確立、圧力凝縮DNAの高次構造と機能発現相関の解明、圧力凝縮DNAのin vitro・in vivo 遺伝子デリバリーへの応用を目標に研究を実施している。

加圧により閉環状のスーパーコイルプラスミドDNAが凝縮状態に変化すること、到達圧力・印加時間によるDNA凝縮制御が可能であることを明らかにし、ノウハウの蓄

積ができた。

高圧凝縮DNAの生化学的機能への影響について、遺伝子送達において重要な分解酵素耐性および被転写活性を中心に検討を行った。高凝縮度のDNAにて高い分解耐性を示すこと、また、転写特性については、高凝縮度のDNAにて初期の転写活性の増加が認められ、高次構造と機能との相関での非常に興味深い結果が得られた。

高圧凝縮DNAの細胞内への直接注入時の転写・発現挙動を検討し、転写・発現の遅延が示され、高圧凝縮DNAの構造的要素の転写への関与が示された。また、高圧凝縮DNAの遺伝子デリバリーについては、一般的な遺伝子キャリアーであるカチオン性脂質を用いた場合に、in vitro 遺伝子導入効率の向上が認められた。また、アンチセンスDNA、siRNAなどの短鎖核酸を用いたin vitro 遺伝子抑制においても、高圧技術の適応による抑制効率の向上が示された。

3. 現在までの達成度

当初の計画以上に進展している。

（理由）では、長鎖DNAの高次構造変化・凝縮法の確立が概ね達成でき、更に、RNAや短鎖核酸への応用に進展している。では、DNA高次構造と生化学的機能の相関における非常に興味深い結果が得られた。では、遺伝子キャリアー自身の遺伝子送達能が高静水圧印加により向上する新たな知見が得られた。

4. 今後の研究の推進方策

上述の高圧誘起DNA高次構造体の構造・機能科学的研究および遺伝子デリバリーへの応用に注力し、機能性核酸の創製にお

ける高圧技術の有用性を示すとともに、生命科学の原理についての探求に努める。

5. 代表的な研究成果

〔雑誌論文〕(計 16 件)

Tsuyoshi Kimura, Yoichi Nibe, Seiichi Funamoto, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Kwangwoo Nam, Akio Kishida, Preparation of a nano-scaled poly (vinyl alcohol)/hydroxyapatite/DNA complex using high hydrostatic pressure technology and in vitro and in vivo gene delivery, Journal of Drug Delivery, in press. 査読有
Shingo Mutsuo, Kazuya Yamamoto, Tsutomu Furuzono, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Ono, Akio Kishida, Release behavior from hydrogen-bonded polymer gels prepared by pressurization, Journal of Applied Polymer science, 119(5), 2725-2729, 2011. 査読有
Jun Negishi, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, High-hydrostatic pressure technique is an effective method for the preparation of PVA-heparin hybrid gel, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 41(5), 617-622, 2010. 査読有
木村剛、今野北斗、佐野麻美、南広祐、岸田晶夫、高静水圧印加によるプラスミド DNA 凝縮と遺伝子送達への応用、東京医科歯科大学生体材料工学研究所年報, 43, 11-13, 2010, 査読無
Tsuyoshi Kimura, Hokuto Konno, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Expression behavior of high-pressure-compacted plasmid DNA in mammalian cell, Nucleic Acids Symposium Series, No53, 313-314, 2009. 査読無
Shingo Mutsuo, Kazuya Yamamoto, Tsutomu Furuzono, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Ono, Akio Kishida, Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers, Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics, 2008, 46, 743-750 査読有

〔学会発表〕(計 25 件)

Tsuyoshi Kimura, Hokuto Konno, Asami Sano, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Transcription analysis of high-pressure-compacted plasmid DNA injected into mammalian cell,

ISNAC2010, 2010/11/10-12, 横浜
Asami Sano, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Akio Kishida, Improvement of oligonucleotides delivery using oligonucleotide /cationic liposome complex treated with high hydrostatic pressurization, CRS2010, 2010/7/10-14, Portland
Tsuyoshi Kimura, Hokuto Konno, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, High pressure-induced plasmid DNA condensation for regulating the transgene expression in mammalian cells, ESB2009, 2009/9/7-11, Lausanne
木村剛、今野北斗、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧凝縮 pDNA の特性と細胞内発現解析、第 38 回医用高分子シンポジウム、2009/7/27-28、東京大学
Tsuyoshi Kimura, Hokuto Konno, Seiichi Funamoto, Kwangwoo Nam, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Effect of condensed DNA by high hydrostatic pressurization on in vivo gene transfection, TERMIS-NA2008, 2008/12/7-10, San Diego
Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Gene transfection and regulation using plasmid DNA condensed by high pressurization, ASGT2008, 2008/5/28-6/1, Boston

〔図書〕(計 4 件)

木村剛、核酸・遺伝子デリバリー研究の現状・課題・将来展望、バイオマテリアル-生体材料-, 28(3)、175-176、2010
木村剛、岸田晶夫、核酸の構造と機能解析における高圧技術 - 高静水圧下で核酸はどう変化し、何がかわるか? -, 化学, 64(7), 64-65, 2009
木村剛、岩井彩夏、森反俊之、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡田正弘、古藺勉、藤里俊哉、岸田晶夫、第 46 回日本人工臓器学会大会論文賞(広領域)受賞レポート, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds with ultra high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery, 人工臓器, 38(1), 26-28, 2009
寺田堂彦、木村剛、岸田晶夫、藤里俊哉、バイオスカフォールド、バイオマテリアル, 26(4), pp309-319, 2008

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.labonet.net/kishida/index.php>