

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5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 transcription

研究代表者

木村 剛 (KIMURA TSUYOSHI)

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

研究成果の概要（和文）：

遺伝子医療に用いるための新たな DNA 凝縮法として高静水圧印加法を開発した。高静水圧印加条件の調節により DNA 凝縮・高次構造の制御が可能であることを明らかとした。高静水圧凝縮 DNA は、DNA 分解酵素耐性と被転写活性の向上が有為に認められ、これらは DNA 高次構造の変化に誘起されることが示唆された。In vitro・in vivo 遺伝子導入においては、DNA の凝縮構造からの巻き戻りによる転写・発現の遅延が示され、生体分子構造の圧力操作による生体反応制御としての有用な知見と考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have developed a novel compaction method of DNA using high hydrostatic pressure technology for gene delivery. It was founded that the compaction and secondary structure of DNA was controlled by the regulation of the high hydrostatic pressuring condition. When the compacted DNA by high hydrostatic pressure was applied for in vitro and in vivo transfection, the gene transcription and expression were delayed, suggesting that the controlled compaction of DNA by high hydrostatic pressurization would be regulate the transgene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6600000	1980000	8580000
2009年度	4300000	1290000	5590000
2010年度	4300000	1290000	5590000
2011年度	4300000	1290000	5590000
年度			
総計	19500000	5850000	25350000

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、高次構造、凝縮、転写、遺伝子送達

## 1. 研究開始当初の背景

国内・国外における非ウイルス遺伝子デリバリーに関する研究は多い。現在臨床研究で用いられるウイルスに比して安全かつ高効率な遺伝子導入・発現を目的とした遺伝子キ

ャリアー開発が精力的に進められている。一般的な方法論は、カチオン性キャリアー（ポリマー・リポソーム）とDNAを静電的相互作用により複合化させることでDNAを凝縮させ、DNAの酵素分解を回避して目的の

細胞へと送達する手法である。これまで様々なキャリアが開発されているが、上述の目的は未だ達成されていない。このことから、遺伝子導入経路と低効率の律速段階について検討されており、1) 細胞質内導入、2) 核内移行、3) 転写の3つのステップが主に議論されている。1)および2)に関しては、おおよそのメカニズムが明らかとなっており、各ステップに対応する方策もいくつか提案・実現されている。一方、3)の転写に関する研究は1)、2)に比して圧倒的に少なく、メカニズムについても不明な点が多く、今後の議論の中心は転写ステップと考えられる。最近の知見として、非ウイルスキャリアの転写効率がウイルスに比して数千倍も劣ることが報告されており、また、正電荷物質とDNAとの複合化が非常に強固であるため転写が抑制されていると考えられている。すなわち、キャリアとDNAの複合化による強いDNA凝縮は、1)、2)においては有利であるが、転写ステップでは不利に働く。従って、DNAの凝縮制御が必要と言える。細胞内での複合体からのDNAの解離促進(脱凝縮)、転写を許容する複合体の物性検討などDNA凝縮制御から転写効率を高める試みがなされ始めている。また、DNAの高次構造・凝縮構造が転写効率に影響する報告も一部でなされている。一方、申請者のグループは、静電的相互作用に替わる複合化の駆動力として水素結合に着目し、高圧下にて水素結合が強調されることから、加圧による水素結合性キャリアー/DNA複合化と遺伝子デリバリーの応用を検討している。その検討中、加圧によりDNAが凝縮されることを発見した。詳細なメカニズムは明らかではないが、圧力依存的にDNAのヘリシティが増加することが報告されており、それに伴う高次構造変化に誘起される現象であると考えている。また、DNA凝縮が圧力依存的であること、分解酵素耐性を有するが被転写活性が向上する特異な機能を発現することが示されている。これらは、系内の状態(圧力)の変化に誘起される新たなDNA高次構造・凝縮制御法としての可能性を示唆し、上述の遺伝子導入過程、特に転写ステップにおいて新規性、特異性、優位性が獲得されると考えられる。以上から、本研究では、DNA凝縮の圧力制御および機能相関についての基礎的検討を行い、そこから得られる知見を基に遺伝子デリバリーシステムへの応用を検討する計画に至った。

## 2. 研究の目的

申請者のグループは、圧力技術の遺伝子デリバリーへの応用に関する検討中、加圧によりDNAが凝縮され、除圧後の大気圧でもそ

の凝縮構造が維持されることを発見した。この事実は、圧力制御によりDNAの高次構造・凝縮を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。また、圧力凝縮DNAは、DNA helicityの増加により折り畳みなどの高次構造変化が誘起され凝縮されたと考えられ、これを反映して新規で特異な機能を顕す。例えば、分解酵素耐性と被転写活性の相反する機能を示すが、これは選択的反応性を高次構造変化によりDNAに付与することを表しており、遺伝子デリバリー・DNAナノテクノロジーなどの分野で有用な機能性DNAの創製コンセプトを提供する。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った。

## 3. 研究の方法

本研究では、(1) DNA高次構造・凝縮の高静水圧制御法の確立研究、(2) 高静水圧凝縮DNAの高次構造と機能発現相関の解明研究、(3) 高静水圧凝縮DNAの *in vitro*・*in vivo* 遺伝子デリバリーへの応用研究について以下に実施した。

(1) DNA高次構造・凝縮の高静水圧制御法の確立研究：

高静水圧DNA凝縮の支配因子を同定と凝縮制御を目的とし、プラスミドDNAの高静水圧凝縮について溶媒の影響について注目し、pH、塩濃度等の各種溶媒を用いて加圧プロセスの凝縮度への影響の検討を行うため、種々の加圧条件にて高静水圧処理を施した。得られた高静水圧凝縮DNAの凝縮度を動的散乱測定、原子間力顕微鏡観察、蛍光相関等により検討した。加えて、高静水圧凝縮DNAの高次構造変化について、熱的・分光学的・生化学的解析を行った。さらに、短鎖核酸への圧力の影響についても検討した。

(2) 高静水圧凝縮DNAの高次構造と機能発現相関の解明研究：

高静水圧凝縮DNAの高次構造に強く影響すると考えられる核酸分解酵素を用いて、その分解挙動を解析することで構造と機能を検討した。また、核酸の高次構造緩和酵素を用いて速度論的解析を行った。さらに、遺伝子デリバリーにおける重要な機能である被転写活性について検討を行った。無細胞系転写システムを用いて、転写反応の速度論的

解析を行った。

### (3) 高静水圧凝縮DNAの *in vitro*・*in vivo* 遺伝子デリバリーへの応用研究：

高次構造・凝縮度の異なる高静水圧凝縮DNAをマイクロインジェクション法により培養細胞内に直接導入し、転写・発現挙動を評価し、高静水圧凝縮DNAの構造的要素と転写反応の関係を検討した。また、一般的な遺伝子キャリアーを用いた *in vitro* 遺伝子導入およびマウスを用いた *in vivo* 遺伝子導入を行い、遺伝子発現効率、遺伝子発現の経時的挙動を解析することで高静水圧凝縮DNAの有用性を検討した。さらに、遺伝子導入における各ステップを詳細に解析することで細胞内導入メカニズムを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) DNA高次構造・凝縮の高静水圧制御法の確立研究：

まず、DNAの形状による高圧凝縮構造の差異について、開環状、閉環状が共存するプラスミドDNAを用いて検討した(図1)。開環状プラスミドDNAは、高静水圧印加によりスーパーコイル状態に変化した。閉環状プラスミドDNAはスーパーコイル構造を有しており、スーパーコイルプラスミドDNAへの高静水圧印加によりスーパーコイル状から凝縮状態に変化した。これらの構造変化は、到達圧力および印加時間に依存した。高圧力、長時間の加圧にて高凝縮度のDNA凝縮が示され、凝縮度の制御が可能となった。また、加圧条件(温度、塩濃度、pH)のDNA凝縮への影響について検討し、加圧条件によりDNA凝縮度は異なり、およそその凝縮傾向が示された。

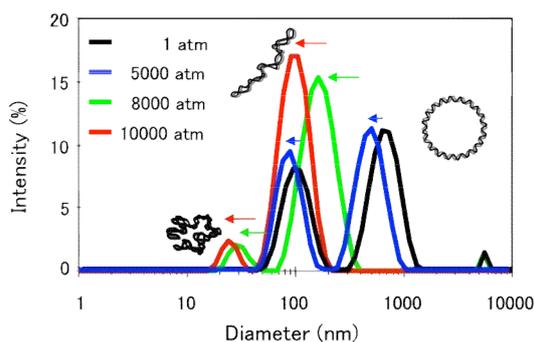


Figure1. DLS measurement of plasmid DNA pressurized at various levels of pressure.

### (2) 高静水圧凝縮DNAの高次構造と機能発現相関の解明研究：

プラスミドDNAへの高静水圧印加による凝縮構造について検討した。図2にプラス

ミドDNAの原子間力顕微鏡写真を示す。高静水圧印加によるDNA鎖のねじれ構造およびそれによる凝縮構造が確認された。メカニズムについては、加圧によりDNA二重らせんのねじれが増加されることが大きな要因であることが明らかとなった。DNAのねじれを緩和するトポイソメラーゼ反応を検討した結果、非凝縮のスーパーコイルDNAに比べ、高圧状縮DNAにてねじれの緩和が促進された。また、高圧凝縮DNAへの260nmのUV照射を行った結果、開環状プラスミドDNAへの早期の変化が示された。これらの結果から高静水圧凝縮DNAが動的特性を有していることが示唆された。分解特性については、DNA配列特異的な分解耐性は示されず、高い凝縮度DNAにて高い分解耐性を示すことが明らかとなった。一方で、一本鎖DNA特異的切断酵素では切断反応の促進が示された。被転写特性については1次的相関が認められず、更なる検討が必要であると考えられた。

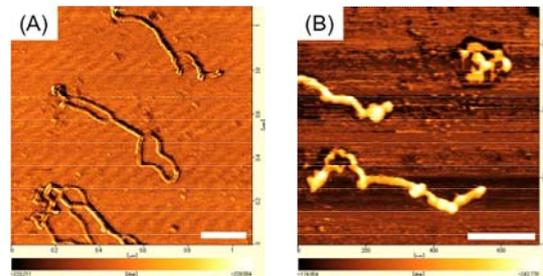


Figure 2. Atomic force microscopic images of plasmid DNA (A) without the pressurization and (B) with the pressurization at 10,000 atm for 5min. Scale bar: 200nm

### (3) 圧力凝縮DNAの *in vitro*・*in vivo* 遺伝子デリバリーへの応用研究

マイクロインジェクション法による高静水圧凝縮DNAの細胞内への直接注入では、遺伝子発現の遅延が認められる興味深い結果が得られた。PCR法による転写レベルでの挙動解析では、高静水圧凝縮DNAの転写遅延が示され、高静水圧凝縮DNAの巻き戻りによる転写遅延と考えられた。また、一般的な遺伝子導入試薬である lipofectamine を用いて高圧凝縮プラスミドDNAの遺伝子導入を行った結果、有為な遺伝子発現効率の上昇が認められ、高静水圧凝縮DNAの遺伝子送達における有用性が示された。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、高静水圧技術の適応にて抑制効率の向上が示された。これらの場合、遺伝子発現および抑制の遅延現象は示されず、導入試薬との複合体

への高静水圧印加の影響が示された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

- ① 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*, 2011. 査読有
- ② 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
- ③ 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
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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 39 件)

- ① Tsuyoshi Kimura, XiaoNan Wen, Kwangwoo Nam, Sarah C. Hielshorn, Akio Kishida, Preparation and characterization of PLL-PPP

conjugates as gene carrier binding to protein based physical hydrogels, TERMIS-NA 2011, 2011/12/12-14, Houston, USA.

- ② XiaoNan Wen, Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Sarah C. Hielshorn, Akio Kishida, Synthesis of PLL-PPP conjugates as gene carrier binding to protein based physical hydrogels, 38th Annual Meeting & Exposition of The Controlled Release Society, 2011/7/31-8/3, National Harbor, USA.
- ③ Tsuyoshi Kimura, Asami Sano, Kwangwoo Nam, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Akio Kishida, Antisense ODN delivery into mammalian cells using high-pressurized lipoplexes, 38th Annual Meeting & Exposition of The Controlled Release Society, 2011/7/31-8/3, National Harbor, USA.
- ④ Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Tsutomu Furuzono, Masahiro Okada, Akio Kishida, Gene transfection using PVA/HAp/DNA nanoparticles prepared by high hydrostatic pressurization, SFB2011, 2011/4/13-17, Orland, USA.
- ⑤ 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
- ⑥ Asami Sano, Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Improvement of oligonucleotides delivery using oligonucleotide /cationic liposome complex treated with high hydrostatic pressurization, CRS2010, 2010/7/10-14, Portland
- ⑦ 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
- ⑧ 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
- ⑨ 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
- ⑩ 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

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：遺伝子導入のための分子複合体の製造  
方法

発明者：岸田晶夫、木村剛、吉澤秀和

権利者：国立大学法人 東京医科歯科大学、

国立大学法人 岡山大学

番号：特許第 4765061 号

取得年月日：平成 23 年 6 月 24 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木村 剛 (KIMURA TSUYOSHI)

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