

研究報告書

北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科 博士後期課程 2年 櫻井研究室
西村 智貴

課題番号:2008A1727

利用ビームライン:BL45XU

課題名:カチオン性脂質と DNA が形成する超分子構造の形成過程の動的観察

研究概要

1. 本研究の背景

生命活動は遺伝子によりコントロールされ、その遺伝子の欠陥は細胞の構造・機能を損ない、その結果として病気が現れる。遺伝子疾患はすでに多数が知られ、高血圧などの生活習慣病や癌、そして神経難病なども遺伝子の影響を受けることが解明されつつある。このような疾患を治療する方法が遺伝子治療である。遺伝子治療とは、正常な遺伝子を細胞に運び、遺伝子の欠陥を修復・修正することで病気を治療する手法である。

これまで、遺伝子治療は不活性化したウイルスをベクター(運び屋)として用いていた。このウイルスベクターは遺伝子の導入・発現効率が高いという利点がある一方で、ウイルスのタンパクの免疫原性、病原性の再発などが問題視されていた。1999年には、ウイルスベクターによる治療を受けた患者が、免疫反応がもとに死亡するという事故が起きた。この事故を契機に人工物だけによる安全な非ウイルスベクターの開発が熱望されてきた。

非ウイルスベクターとしてカチオン性の脂質や高分子が主に研究されている。

最近まで、非ウイルスベクター/DNA の複合体中では、ベクターと DNA はランダムに凝集していると考えられていた。

しかし、1997年、1998年に UCLA の Safinya のグループが放射光 SAXS を用いて、「Science」紙上で、



真空チャンパー

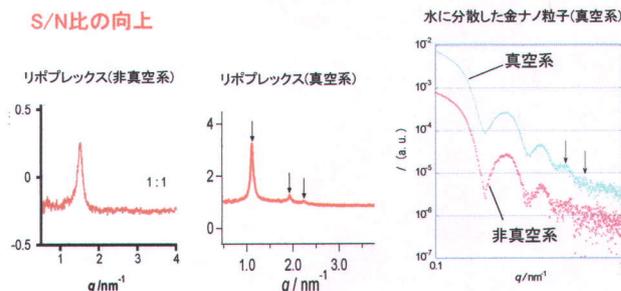


Fig.1 真空系と非真空系におけるミセルからの SAXS プロファイル

DNA は極めて規則正しい構造で折り畳まれている事を明らかにした。DNA と脂質の複合体をリポプレックスと呼ぶが、この研究を契機にして、リポプレックス内で DNA が取る構造と機能（遺伝子発現効率）の関係がきわめて強い関心を集めている。

我々のグループでは（１）遺伝子導入を行う時と同程度の濃度での SAXS 測定装置（超希薄溶液用真空チャンバー）の開発を行い、S/N 比の向上を試みた。その結果、これまで見られなかったリポプレックスからの２次、３次ピークまでもが観測できるようになるなど、S/N 比の著しい向上が見られた。さらには、カプトンフィルムからの散乱が除去可能となった（図 1）。

（２）遺伝子導入剤を開発している医療材料メーカーであるテルモ社と共同研究を行い、新規の高性能遺伝子導入剤を開発・合成し、特許を出願した(図 2)。その結果、我々の系及び Safinya らの系を上述した真空チャンバーを用いて SAXS を測定し、データを検討したところ、今までに知られていない構造を見出しつつある。新しい構造に基づいて遺伝子導入効率を合理的に説明できる可能性を見出している(図 2)。

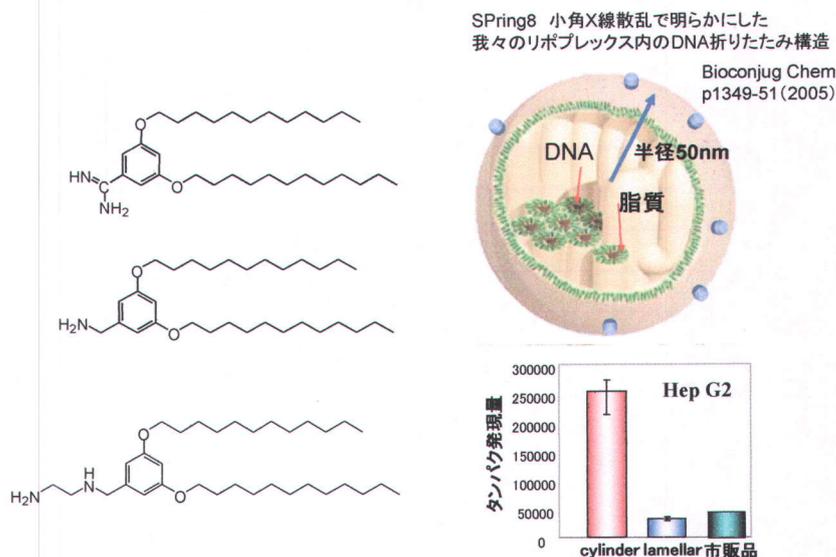


Fig. 2A 新規遺伝子導入剤

Fig. 2B SAXS で明らかにしたリポプレックス内の DNA の折り畳み構造と遺伝子導入効率

2. 本研究の目的

複合体形成のダイナミクス：実際の遺伝子導入では、投与直前に脂質と DNA を混合して使用する。最も効果があるのは 30 分静置してからであると言われている。また、混合時間が長いと効果が激減する（複合体からの核酸の解離）ため、この効果の時間依存性は、臨床使用においては使用上極めて重要な問題となる。

そのため脂質と DNA からなる複合体形成のメカニズムを調べる必要がある。そこで、新規に開発したベンジルアミン系・ジアミン系について、実際に遺伝子導入に使っている濃度にできるだけ近い濃度で SAXS 測定を行い、リポプレックス形成のダイナミクスの観察を行う。このような低濃度での SAXS 測定は世界最高輝度の放射光を発生できる SPring-8 でのみ可能である。

3. 本研究の戦略と進め方

(1)測定条件の最適化: ストップフロー装置の窓材であるサファイアはセルに挟み込むことで固定している。この固定によりサファイアに歪みが生じ、強い散乱を与えていると考えられた。そこで、本研究ではサファイアをセルに固定化し測定を行う。

核酸-脂質複合体サンプルは、基本的に希薄溶液であり、サンプルそのものの散乱が弱い。そこで、これまでのカメラ長 2300mm から 1000mm 程度に短くし、サンプルからの散乱を得る。

(2) 動的構造の測定: 45XU の II+CCD (電気刺激装置 SEN-7203) を用いて、フローインジェクションセルで混合した脂質と DNA から、リポプレックスが形成されていく過程を観測する。また、リポプレックス生成後の動的変化と遺伝子導入効率の関係を調べる。

4. 期待される効果

本研究の動的測定から、リポプレックスの成長と失活過程と構造の関係が明らかになり、遺伝子導入剤としての実用上重要な知見が得られる。これらの知見をもとにして、ウイルスベクターに匹敵する遺伝子導入率をもつ高い性能の化合物を開発が可能となると信じている。

実験方法

光学系は、BL45XU の各 BL 標準を利用した。試料周辺機器 (加熱セルおよびフローセル、それらの制御装置など) は申請者が準備し、試料からの SAXS および WAXS をそれぞれ 2.3m および 1.0m のカメラ長で透過法を用いて検出した。検出器としては、サブ秒スケールの動的測定にイメージングインテンシファイヤー(II)+CCD を用いた。

*DNA/カチオン性リポソーム複合体形成過程の動的測定

45XU に装備されている II+CCD (電気刺激装置 SEN-7203) を用いて、フロー

インジェクションセルで混合した各種脂質と DNA から、リポプレックスが形成されていく過程を観測した。脂質と DNA のカチオン/アニオン比(N/P 比)を 5 ～ 10 点、また、測定温度を 2 ～ 4 点ほど条件を振り、測定を行った。

<利用方法、結果及び考察>

我々が独自に開発したベンジルアミン、ベンジルジアミンと一般的なカチオン性脂質である DOTAP 溶液と pDNA 溶液を、種々の N/P 比になるように混合したリポプレックス溶液を調製した。小角 X 線散乱の測定条件は波長 0.9Å、カメラ長 2.3m、II+CCD (電気刺激装置 SEN-7203) を用いて、フローインジェクションセルで混合した脂質と DNA から、リポプレックスが形成されていく過程を観測した。2008A 期では、ハッチ内に人が入り溶液を混合後急いで出てから X 線を照射する方法で、おおよその複合体形成時間を得た。得られた知見を元にユニソク製のストップドフローセルを購入して初期過程の観測を試みたが、窓剤であるサファイアからの散乱が強く、データが得られなかった。この原因は、サファイアの窓にかかっている応力ひずみだと推定している。この結果を踏まえ、今後は窓材やカメラ長などの測定条件の最適化後、動的構造の測定を行う予定である。