

両親媒性ペプチド系キャリアーの遺伝子導入効率に関する考察

京工織大繊維¹・国立循環器病センター研究所²

○小林 由美子^{1,2}, 橋本 朋子^{1,2}, 小堀 哲生¹, 村上 章¹, 山岡 哲二²

【緒言】 近年、高発現を示すウイルス法に対する安全面での懸念が大きくなり、より安全性の高い非ウイルス法への期待が高まってきている。しかし、発現効率が低い非ウイルス法においては、高発現効率を達成する必要がある。人工キャリアーにはポリマーや脂質、合成ポリペプチド、あるいは、それらを化学修飾したものが考案されている。一般的に、DNAと静電的相互作用する塩基性部位と機能を担う部位から構成され、特に、ペプチド性キャリアーは、そのアミノ酸配列を変えることにより諸物性を制御できる利点がある。当研究室では、DNAとコンプレックスを形成するためのカチオン性基の他に疎水基をもつキャリアーが高発現を示すことを報告してきた。本研究では、Arg₄、Arg₈およびArg₁₂に、疎水基としてステアリン酸(4s, 8s, 12s)、あるいはオリゴ-L-乳酸(4o, 8o, 12o)を導入した両親媒性化合物を評価した。

【実験】 Fmoc 固相合成法により塩基性ペプチドである Arg₄、Arg₈および Arg₁₂ を合成し、続いて、ステアリン酸あるいはオリゴ-L-乳酸 (OLLA) を導入して、両親媒性化合物を得た。その組成は元素分析によって確認した。各サンプルの D-MEM 溶液を C/A=1, 2, 4, 8, 16, 32 となるように段階希釈し、100ng/5μl の p-CMV-ZLuc 溶液 35μl と混合し、37°C、30min インキュベートした (最終 DNA 濃度: 100ng/10μl)。このポリプレックス溶液 10μl を 40μl の D-MEM とともに 96 穴プレートに播種した 1×10⁴ の COS1 細胞に添加した。続いて 20%クロロキン溶液を 50μl 加え、37°C で 5h インキュベートし、さらに 40h インキュベートした。細胞溶解液を 50μl 加え、プレートシールをして 37°C、30min インキュベートし、20μl を用いて ARVO 社 96 穴プレートリーダーにて発光測定した。

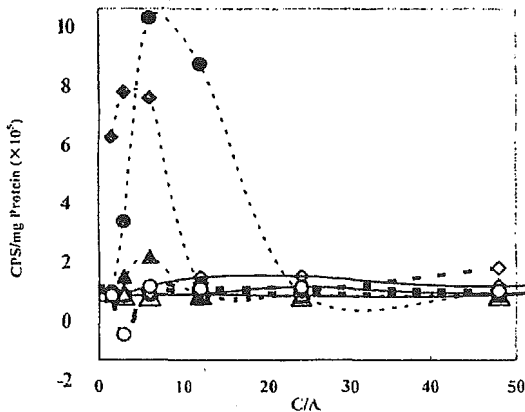


Fig. 1. Transfection efficiency of (▲)4s, (◆)8s, (●)12s, (△)4o, (◇)8o, (○)12o, (■)Arg₄, (◐)Arg₈, (◑)Arg₁₂, and (■)naked DNA in COS-1 cells. Reporter gene expression is given as CPS per milligram protein.

C/A is the ratio of cation(of carrieres) to anion(of DNA).

【結果と考察】 図1にポリプレックスの電荷比がルシフェラーゼ発現に与える影響を示した。ステアリン酸の導入により顕著に発現が向上し、またペプチド鎖長が長いほど高い発現が認められた。これらのステアリル化オリゴペプチドは、水中にてミセルを形成していることが確認され、分子間自己組織化によりカチオン基が集積したことが発現効率の向上につながったと考えられる。一方、オリゴ-L-乳酸導入サンプルでは、その加水分解性のために発現効率の向上が得られなかった。さらに、高分子量ポリアルギニンを用いた結果とも併せて、自己組織化と発現効率の関係について考察する。

P b-25

シチジンの2'位にピレンを持つ蛍光核酸プローブによる
RNAの検出京工繊大繊維¹ 国立循環器病センター研究所²村上 章¹, 〇繁澤 麻紗子¹, 坂本 隆¹, 小堀 哲生¹, 山岡 哲二²

【緒言】 近年、ゲノム解析によって明らかになった遺伝子情報の機能を解析する手法が重要性を増してきており、とりわけ、細胞内に存在する種々のRNAを検出する手法が求められている。我々はこれまでに、RNAと二重鎖形成することで蛍光スペクトルに変化を生じる蛍光標識核酸プローブの開発を行ってきた¹⁾。また、2'-ピレン修飾ウリジン (Upy)を2分子有する2'-O-メチルRNAオリゴマー (OMUpy2)は、RNAと二重鎖形成することにより480nm付近にブロードな蛍光発光を示すことを報告した²⁾。このピレン修飾核酸プローブに塩基配列の多様性を持たせ、その適用範囲を広げることを目的として、新たに2'-ピレン修飾シチジン (Cpy)を2分子有する2'-O-メチルRNAオリゴマー (OMCpy2)を合成した。本発表ではこのプローブの蛍光特性および、UpyとCpyを組み合わせた配列を持つプローブの蛍光特性について報告する。

【実験・結果】 2'-O-(1-pyrenylmethyl)cytidine (Cpy)のホスホロアミダイト誘導体を合成し³⁾、OMCpy2プローブ 16量体 (5'-CGCpyCpyUGCUUCACCACC-3')を固相ホスホロアミダイト法により得た。次に、OMCpy2に相補的なオリゴRNA (cORN)及び相補的なオリゴDNA (cODN)を添加した時の蛍光スペクトルを測定した。480nmでの相対蛍光強度は、OMCpy2が一本鎖の場合では2.2、cORNを添加した場合は55.9、cODNを添加した場合は5.1となり、OMCpy2はcORNと二重鎖を形成することで、480nmでの蛍光強度を大幅に増大させることが明らかになった。次いで、CpyとUpyが連続した配列を持つ2'-O-メチルRNAオリゴマー(OMCpyUpy)を合成し、cORN及びcODNを添加した時の蛍光スペクトルを測定した。その結果、OMCpyUpyはOMUpy2やOMCpy2と同様に、cORNと二重鎖を形成することで480nmでの蛍光強度を大幅に増大させることが明らかになり、RNA検出が可能であることが示唆された。

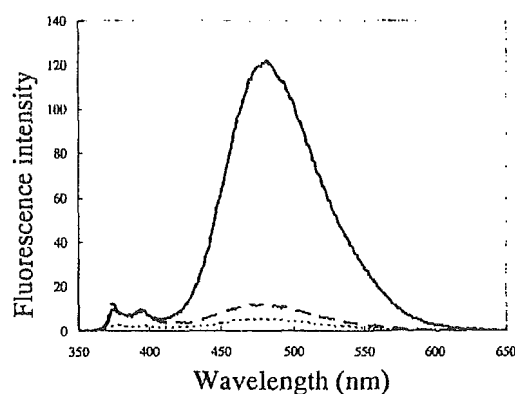


Fig.1 Fluorescence spectra of OMCpy2 (.....), equimolar mixture of OMCpy2 and cORN (—), and equimolar mixture of OMCpy2 and cODN (---).

[OMCpy2]=[cORN]=[cODN]=0.75 μ M
Buffer: 10mM phosphate buffer (pH7.0), 0.1M NaCl
Temperature: 11°C

- 1) Yamana, K., Iwase, R., Furutani, S., Tsuchida, H., Zako, H., Yamaoka, T., and Murakami, A. (1999) *Nucleic Acids Res.*, 27, 2387-2392.
- 2) Mahara, A., Iwase, R., Sakamoto, T., Yamana, K., Yamaoka, T., and Murakami, A. (2002) *Angew. Chem., Int. Ed.*, 19, 3648-3650.
- 3) Amitani, Y., Iwase, R., Mahara, A., Yamana, K., Yamaoka, T., and Murakami, A., *日本化学会第81回春季年会講演予稿集 II*, 2002, 931.

P b-31

**ピレンを含む長寿命蛍光剤を用いた
生体高分子間相互作用検出法の開発**

京工織大繊維¹・国立循環器病センター²

坂本 隆¹, ○藤原 伸行¹, 小堀 哲生¹, 山岡 哲二², 村上 章¹

【緒言】近年のプロテオーム解析により、多くの疾患に関わるタンパク質・ペプチドが同定されてきている。疾患の機構の解明にはプロテオーム解析により同定されたタンパク質・ペプチドの相互作用を詳細に解析することが求められる。本研究では、リアルタイムに生体分子間相互作用を検出できる蛍光偏光解消法に着目し、この手法における問題点の解決を目的とした。蛍光偏光解消法では、用いる蛍光ラベル剤の蛍光寿命により検出可能な分子量が制限される。従来の短寿命蛍光剤では低分子量 (<100kDa) の分子間相互作用しか検出できず、高分子量 (>100kDa) の生体高分子への応用には長寿命蛍光剤が必要となることが報告されている¹⁾。本研究では、長寿命蛍光剤として Pyrene に着目した。Pyrene 誘導体は比較的長い発光寿命 (τ :130nsec) を有するものの、共存する分子と非特異的に疎水性相互作用するため、蛍光ラベル剤としては不向きであると考えられる。そこで、Pyrene- β -cyclodextrin conjugate (Py- β -CD) に着目した²⁾。Py- β -CD 中の Pyrene は同一分子内の β -CD に包接されるため、共存する分子との非特異的な疎水性相互作用をしにくいと考えられる。このことから、Py- β -CD が新規長寿命蛍光ラベル剤として有用であると考えた。今回は、Py- β -CD の合成、Py- β -CD の蛍光特性の評価およびモデルタンパクへのラベルを試みた結果について報告する。

【実験】Py- β -CD は、1-Pyrenebutyric anhydride を β -CD に反応させて合成し、逆相カラムクロマトグラフィーによる精製後、NMR および質量分析により同定した。また、Py- β -CD の蛍光スペクトル・定常光異方性・蛍光寿命測定の結果から、PBS 中での蛍光特性を評価した。Py- β -CD に HSA を加えたときの定常光異方性の変化から、Py- β -CD の非特異的な疎水性相互作用の有無について調べた。無水コハク酸を Py- β -CD に反応させてコハク酸リンカーを結合した後、粗生成物を NHS エステル活性化し、ヒト血清アルブミン (HSA) にラベルした。ゲルろ過による精製後、Pyrene と HSA の定量を、それぞれ、UV スペクトル法と BCA 法により行い、HSA に対する Pyrene の導入効率を評価した。

【結果と考察】Py- β -CD の収率は 40% であった。蛍光寿命測定の結果、Py- β -CD の蛍光寿命は 130nsec であった。このことから、Py- β -CD は PBS 中でも長寿命を保ち、本研究において有用な長寿命蛍光ラベル剤であることが示唆された。また、定常光異方性測定の結果 (Table.1)、1-Pyrenebutyric acid に HSA を加えた場合には定常光異方性 (r) は大きく増加したが、Py- β -CD に HSA を加えた場合には r 値は変化しなかった。これは、HSA の添加により、1-Pyrenebutyric acid の運動性は減少したが、Py- β -CD の運動性には変化が無かった、つまり、1-Pyrenebutyric acid は HSA と非特異的に結合し、Py- β -CD は HSA と結合しなかった事を示している。この結果から Py- β -CD 中の Pyrene が β -CD に包接されることにより HSA との非特異的な結合が抑えられたものと考えられる。Py- β -CD 誘導体を HSA にラベルした結果、HSA 1 つに対して Pyrene を 6.8 個ラベルできたことが明らかとなり、Py- β -CD の蛍光ラベル剤としての有用性が示された。

発表では、Py- β -CD でラベルした HSA を用いた抗原抗体反応の検出についても報告する。

Table 1. Anisotropy of pyrene derivatives in the presence and absence of human serum albumin (HSA)

Sample	r
1-Pyrenebutyric acid	-0.001
1-Pyrenebutyric acid+HSA	0.012
Py- β -CD	-0.001
Py- β -CD+HSA	-0.001

[Pyrene derivative]=[HSA]=0.75 μ M
in 20mM PBS (pH7.3)

- 1) E. Terpetschnig, H. Szmecinski, and J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.*, 227, 140 (1995)
- 2) A. Ueno, I. Suzuki, and T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 6391 (1989)

14) ポリプレックス被転写効率を亢進する 遺伝子キャリアーの分子設計

(京工織大繊維、国立循環器病セ研) ○橋本朋子、小林由美子、近藤千晶
(京工織大繊維) 小堀哲生、村上 章
(京都府立医科大) 松田 修
(国立循環器病セ研) 山岡哲二

E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

TEL: 06-6833-5004(ext2637), FAX: 06-6835-5476

1. 諸言

カチオンポリマーを用いた遺伝子導入システムにおいて、ポリプレックスの細胞内挙動、あるいは、キャリアー分子の化学的や物理的要因と導入効率との相関性について多くの知見が報告されている。しかしながら、遺伝子導入の最終ステップである核内での被転写翻訳効率についての報告は、他のステップに比べて未だに少ない。

我々は、この被転写翻訳効率の向上が、総括的な効率である遺伝子発現の向上に直結すると考えて検討を進め、これまでに、ポリプレックスの絡み合いを緩和することで発現効率が向上することを報告してきた。例えば、核への移行性が高いにも拘らず発現効率が低いレセプター介在型の遺伝子キャリアーに、疎水性基を付与すると発現効率が向上する。この結果は、キャリアーが分子内ミセルを形成することによって、核内での被転写翻訳効率が向上するためであることが示唆された。本研究では、カチオン性オリゴペプチド末端に疎水性基を付与した両親媒性のキャリアーを設計し、その分子内ミセル形成の効果について検討した。さらに、カチオン性オリゴペプチド部位を様々なタンパク質の活性化に寄与する細胞内酵素である furin によって分解されてフラグメント化する配列とすることで生理活性的要素により被転写翻訳効率が向上する新規遺伝子導入システムの構築を図った。これらの要因が、細胞内でのポリプレックスの不安定化と被転写翻訳効率の向上との相関性に及ぼす影響について検討した。

2. 実験

Fmoc 固相合成法にて furin の切断部位を有するオリゴペプチド(Fur ペプチド)として Fur-1: $\text{H}_2\text{N}-(\text{RKKR})_4\text{C}-\text{CONH}_2$ 、Fur-3: $\text{H}_2\text{N}-(\text{RKRKKR})_4\text{C}-\text{CONH}_2$ を、また、それぞれと同じアミノ酸組成でかつ認識配列を持たない Fur-2 と Fur-4 を、および Fur-5(Leu0): $\text{H}_2\text{N}-\text{KRR}(\text{RKRKRR})_2\text{C}-\text{CONH}_2$ 、オリゴアルギニン (以下 Arg_n) を合成した。続いて N 末端側に疎水性基としてステアリン酸あるいはオリゴロイシン (以下 Leu_n) をコンジュゲートした。常法にて脱保護後、合成確認は $^1\text{H-NMR}$ 測定、元素分析、HPLC、および Maldi-Tof-Mass により行った。得られた両親媒性のキャリアーの水溶液中での臨界ミセル濃度 (CMC) をピレンプローブ法にて測定し、その構造を AFM にて観察した。無細胞系での転写翻訳効率はウサギ網状血球を利用して求め、また、pCMV-Luc を COS-1 細胞へクロロキニン処理法にて導入し、48 時間後にルシフェラーゼ発光を測定して一過性の発現効率とした。

13) 新規アンチセンス核酸のデザインと遺伝子制御効果

○村上 章¹・樋口麻衣子¹・中澤智子¹・小堀哲生¹・山吉麻子²
加藤聖子³・和氣徳夫³・山岡哲二⁴京都工繊大繊維¹・九州大学先端物質化学研究所²・九州大学生体防御医学研究所³
国立循環器病センター研究所⁴Tel: 075-724-7814 Fax:075-724-7814 E-mail: akiram@kit.ac.jp

【緒言】 近年、RNA の機能の多様性が明らかになってきている。rRNA、mRNA、tRNA 等のような遺伝子発現の主役を担っている RNA に加え、snRNA、hnRNA、miRNA 等に代表される新たに見い出された RNA 群が遺伝子発現に大きく関与していることが報告されている。これらは siRNA (small interference RNA) と名付けられた small RNA が、配列特異的に RNA の分解を引き起こす RNAi (RNA 干渉) という分子機構とも密接に関係しており、それら RNA の機能解析は今後の生命科学の中心課題になると思われる。機能解析と並行して、それら RNA の制御も重要な課題となる。従来制御の対象となってきた RNA は主に mRNA であり、制御分子はアンチセンス核酸であり、リボザイムであった。現在は少しその影が薄れた感のあるこれらの手法であるが、RNA 選択的制御の手法は対象 RNA の切断によるのみではなく、一過的な制御やスプライシングのコントロールなど非破壊的な制御法も重要であることから、アンチセンス法はその重要性が今後も維持されるものと考えられる。一方、疾患関連遺伝子の発見や分子病態解明が進み、正常遺伝子の 1 塩基の変異(点突然変異)が重篤な疾患の原因となることがわかってきた。これら変異遺伝子の発現を特異的に制御できれば、副作用のない疾患の治療につながる。従来のアンチセンス核酸や siRNA では 1 塩基の変異を検出する能力が不十分であり、変異遺伝子だけでなく正常遺伝子をも制御してしまうことを防ぎ得ない。

本発表では高い配列選択性を持つアンチセンス核酸の開発を目的として行った種々のアンチセンス核酸デザイン法について報告する。

【実験】 (1) 新規アンチセンス核酸 (Fig.1) の合成: タイプ A 及びタイプ B については論文に従って合成した^{1) 2)}。タイプ C: 3',5'位をシリルエーテル基、N⁶位をベンゾイル基で保護したアデノシンの糖環 2'-位にメチレンリンカー及びアミドメチレンリンカーを介して 4,5',8-trimethylpsoralen を導入した後、2'位水酸基を、(a) NaH、(b) N,N'-カルボニルジイミダゾールでそれぞれ活性化し、4'-aminoethyl-4,5',8-trimethylpsoralen を導入した。これら 2 タイプの修飾アデノシンを固相合成法によりオリゴヌクレオチドに導入し、2'-Ps-oligo を得た (2'-Ps-met および 2'-Ps-amd)。(2) アンチセンス核酸の配列決定: 3通りの手法により配列決定を試みた。(a) RNA 高次構造予測プログラム (RNA-Structure Ver.3) ならびに独自に開発したループ領域検索プログラムから、結合可能部位を選択した。(b) 逆転写酵素法: 対象 RNA 溶液に RNA-Structure に基づいて選択したオリゴヌクレオチドを添加し、それらの逆転写酵素反応阻害効率の高い部位を予測した。(c) 蛍光法: 対象 RNA との結合により蛍光特性を変化させる蛍光核酸プローブを用い、RNA-Structure Ver.3 に基づいて選択したオリゴヌクレオチドの結合可能性を評価した。(3) 相補的な oligo-RNA との二重鎖安定性並びに構造は、UV 融解曲線、CD、蛍光分光法により解析した。さらに、2'-Ps-met および 2'-Ps-amd と match-RNA もしくは配列中に 1 塩基 mismatch を含む oligo-RNA (mismatch-RNA) との UVA (365nm) 照射による光架橋効率と配列選択性を、RPLC と変性 PAGE により評価した。(4) デザインしたアンチセンス核酸の遺伝子制御能は、無細胞タンパク質合成系並びに子宮頸がん細胞系を用いて評価した。

4) HAp 複合化吸収性ハイドロゲルによる軟組織再生

(京工織大繊維、国立循環器病セ研) ○中村友亮、北川達哉

(京工織大繊維) 小堀哲生、村上 章

(国立循環器病セ研) 山岡哲二

E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

TEL: 06-6833-5004(ext2637), FAX: 06-6835-5476

1、緒言

人工皮膚用材料として広く臨床応用されているコラーゲンやその複合体は、優れた組織親和性を有する反面、生体由来であるために抗原性等の問題が指摘されている。我々は、コラーゲンのような生体由来材料に代わり、安全性に優れた合成高分子材料による軟組織再生を検討してきた。現在までに、優れた骨再生スキャホールドであるポリ乳酸と、親水性ポリエーテルとのマルチブロック共重合化後、ハイドロキシアパタイト(HAp)と複合化することで、柔軟性を有する HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの作製に成功し、ラット皮下埋入実験より、優れた軟組織適合性を確認した。

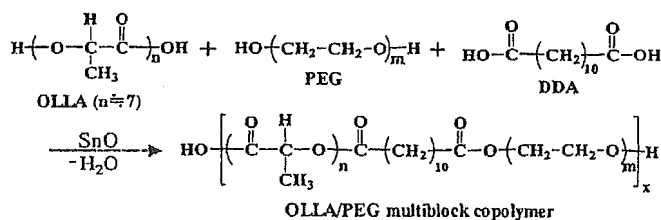
従来の組織再生では、*in vitro* でターゲット組織の細胞を播種し、培養後に埋入し、*in vivo* 組織再生を誘導する手法が一般的であるが、細胞の入手法、*in vitro* での培養条件等に未だ課題がある。本研究では、*in vitro* のステップを省き、*in vivo* のみでの組織再生を目的とし、*in vivo* 軟組織再生の最重要課題であると考えられる、スキャホールド内への組織浸潤性の向上を検討してきた。本発表では、作製した HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの特性評価、特に、ポリエーテル組成と HAp 析出量が組織浸潤性、生体適合性に与える詳細な効果について報告する。

2、実験

・マルチブロック共重合体の合成と物性評価

Oligo L-lactic acid(OLLA)、polyethylene glycol(PEG)、および 1,10-decanedicarboxylic acid(DDA)に、溶媒として diphenyl ether、触媒として tin(II)oxide を加えて、180℃、30mmHg 下で直接脱水重縮合法により、様々

な組成比の OLLA/PEG マルチブロック共重合体を合成した。凍結乾燥法により、スポンジ形状のハイドロゲルとし、物性評価として、含水率測定、*in vitro* 加水分解実験、および引張試験を行った。



Scheme 1. Multiblock copolymerization of OLLA, PEG, and DDA.

・HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの作製と物性評価

交互浸漬法¹⁾により、様々な複合化量の HAp 複合化吸収性ハイドロゲルを作製し、SEM 測定、X 線測定によりハイドロゲル内の白色結晶が HAp であることを確認した。引張試験により、HAp 複合化することによるハイドロゲルの含水性・柔軟性への影響を評価した。

208

Specific adhesion of CD34+ cells on PLLA porous scaffolds

Tetsuji Yamagata, Tomokazu Higami, Sho Uchida, Akira Murakami,
Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka
National Cardiovascular Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-0861, JAPAN

Hematopoietic stem cells (HSCs) have been attracting great attention in the field of regenerative medicine. In general, they have been isolated from the bone marrow cells (BMCs) by use of the magnetic cell sorting system (MACS) or the fluorescence activated cell sorter (FACS) before being transplanted. In the present study, bioresorbable porous scaffolds having HSCs specific surface modified with anti CD34 antibodies were developed. Poly (L-lactic acid-co-ε-caprolactone) scaffolds were briefly hydrolyzed in order to introduce carboxylic groups on their surface, and anti-human CD34 mouse IgG was immobilized by the carbodiimide method. The amount of immobilized antibody was about 30ng/scaffold. When a mixed suspension of KG-1a (CD34+) cells and HL60 (CD34-) cells was continuously applied into the modified porous scaffold, a selective adhesion of the KG-1a cells was observed under the FACS system.

The destabilization of polyplexes facilitates intranuclear transcription efficiency

Tomoko Hashimoto^{1,2}, Akio Kobori², Akira Murakami² and Tetsuji Yamaoka¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8585, Japan and ²Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

ABSTRACT

We have been focusing on the last step of transfection, that is, the intranuclear recognition of polyplexes by transcription factors. In this work, we studied about the relationship between the intracellular destabilization of polyplexes and the transcription efficiency. Polypeptides containing specific sequences which are digested by intracellular proprotein convertase(PC), furin(Fur-polypeptide) were synthesized as novel carriers. When Fur-polypeptide/plasmid DNA polyplexes were incubated with furin in the cell-free transcription/translation system, the sequence specific expression was observed as time. Additionally, Fur-polypeptides/plasmid DNA polyplexes led to site-specific effective transgene expression even in COS-1 cells. These results indicate that shortened carriers lose their abilities to form polyplexes in response to furin activity in the cells, and it seems to enhance the destabilization of polyplexes, the recognition of transgene in polyplexes by transcription factors, and the expression efficiency.

INTRODUCTION

In non-viral carrier mediated gene therapy, various intracellular mechanisms of polymeric carrier/gene polyplexes have been gradually clarified. The conventional evaluation of these polyplexes mediated gene delivery systems shows the total efficiency including all steps, such as cellular uptakes, endosomal escapes, nuclear transfers, and intranuclear expressions of transgene.

We have been focusing on the last step following the intracellular barriers described above, transcription of transgene. Since the transcription efficiency seems to be affected by condensation of the polyplex, optimum molecular design of polymeric gene carriers for high transcription efficiency should be clarified. Generally, linear polycations such as poly(L-lysine) (PLL) are known as DNA condensers. In order to relax the condensation between polymeric carrier and transgene, we have designed

various polymeric gene carriers that are cationic polymers conjugated with hydrophilic or hydrophobic segments. Some PLL derivatives showed that quaternary ammonium groups and non-ionic hydrophilic groups led to high transfection efficiency¹. On the other hand, cationic copolymers with hydrophobic segment formed micelle-like structure in aqueous solution and improved the expression efficiency because of an easy disassembly of polyplexes and recognition of the DNA in polyplexes.

These results indicated that both of the reciprocal factors, hydrophilic and hydrophobic, commonly destabilize electrostatic polyplexes and facilitate transgene expressions. Following these factors, a biological factor was proposed in the present study. Polypeptide containing sequences recognized and cleaved by intracellular proprotein convertase(PC), furin(Fur-polypeptide) was selected as a novel destabilization carrier. This intracellular enzymatic digestion-induced destabilization of polyplexes led to site-specific transgene expression². In the present study, we evaluated whether these enhanced expression efficiencies were brought by high transcription efficiencies or not.

RESULTS AND DISCUSSION

Since furin digests the carboxyl side of Arg-Xaa-Xaa-Arg³, H₂N-(Arg-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg)₄-Cys-CONH₂ and H₂N-(Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys)₄-Cys-CONH₂ were synthesized as a digestible and control carrier, and they were abbreviated as Fur-3 and Fur-4, respectively. These polypeptides are highly cationic enough to form polyplexes with plasmid DNA. Digestion assay with furin were conducted by a modified method of previously reported one² using Fur-polypeptide/pT7-Luc polyplexes(C/A=5) at a fixed concentration of human recombinant furin convertase(Affinity BioReagents, Inc., USA). The destabilization of polyplexes was observed on the ethidium bromide stained agarose gel(0.8%) electrophoresis. We selected *in vitro* transcription/translation assay as the cell-free evaluation system of the transcription efficiency. The polyplex was evaluated using T_NT Coupled Reticulocyte

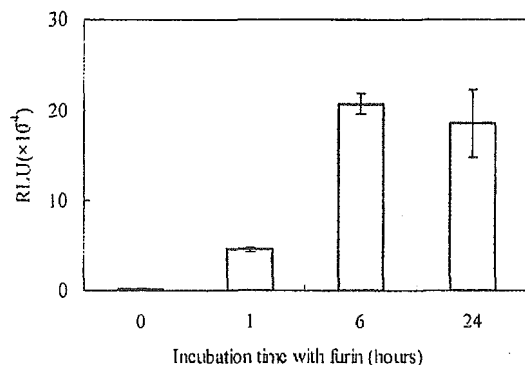


Figure 1. Transcription efficiency determined by luciferase activity *in vitro* transcription/translation system. Fur-3/pT7-Luc polyplexes (C/A=5) were digested with 5 units of furin for a given period of time and used.

Lysate Systems (Promega, USA). Polyplexes composed of Fur-polypeptide were destabilized chronologically. In case of Fur-3, the DNA release from destabilized polyplexes was observed clearly, and transcription efficiency of digested polyplexes in the cell-free system were increased time-dependently (Figure 1.). Especially polyplexes reacted with furin for 6 hours resulted in a about 100-fold enhancement compared with non-reacted polyplexes. It was reported that low molecular weight carriers easily release DNA under intracellular environment⁴. These results indicate that furin digestion resulted in the loss of the polyplex forming ability of the carriers, the destabilization of polyplexes, and higher transcription efficiency. These enhancements indicate that the enzymatic-destabilization actually occurs in the intracellular compartments when Fur-polypeptide is used as a gene carrier.

To assess the intracellular transcription efficiencies, the osmotic shock procedure and the microinjection were selected as transfection protocols. PLL and its derivatives having quaternary ammonium groups and non-ionic hydrophilic groups were used as carriers. To quantify the transcription efficiency of transgene in single cell, Cy3-labeled pCMV-Luc and pEGFP-N1 were transfected at optimum ratio into COS-1 cells by the osmotic shock method. The fluorescence intensity of Cy3 (585nm) and EGFP (520nm) were measured on the FACS system with a 488nm excitation laser 40h after the onset of transfection to assess the cellular uptake and transient expression. The transcription efficiency is defined as following equation (1).

Transcription efficiency in single cell =

$$\frac{\text{Fluorescence intensity of expressed EGFP}}{\text{Fluorescence intensity of uptaked Cy3}} \quad (1)$$

Although PLL and all derivatives showed similar degree of nuclear transfer of plasmid DNA (data not shown), only PLL derivative having quaternary ammonium groups and hydroxy groups showed high transcription. These results indicate that polyplexes formed with these chemical structures also play an important role to destabilize the polyplexes during the intracellular trafficking.

In conclusion, the polyplex destabilization was induced by the enzymatic fragmentation and the chemically modified characterization, and they facilitate their transcription efficiencies.

REFERENCES

1. Kimura, T., Yamaoka, T., Iwase, R., and Murakami, A. (2002) *Macromol. Biosci.* 2, 437-446
2. Hashimoto, T., Murakami, A. and Yamaoka, T., (2004) *Nucleic Acids Res Suppl.*, 48, 235-236.
3. Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., and Nakayama, K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 12127-12130
4. Schaffer, D. V., Fidelman, N. A., Dan, N., and Lauffenburger, D. A. (2000) *Biotechnol. Bioeng.* 67, 598-606

Luminescence anisotropy-based detection of nucleic acids and proteins using long-lifetime Ru(II) complex as a luminescent label

Takashi Sakamoto¹, Atsushi Mahara², Kobori Akio¹, Tetsuji Yamaoka² and Akira Murakami¹

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan and ²Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

ABSTRACT

Luminescence anisotropy-based methods are powerful tool for the detection of biomolecules in homogeneous physiological media without Bound/Free separation. However, analyses based on the method are always disturbed by the autofluorescence from biological specimen. This disturbance limits the sensitivity of the method. To improve the detection limit of the method, a long-lifetime luminophore was adopted as the label. Because of the lifetime of the autofluorescence is below 10ns, it is expected that the use of the long-lifetime luminophore enables us to avoid the disturbance by adopting time-resolved luminescence anisotropy measurement. To verify this concept, oligodeoxyribonucleotides and *Staphylococcus aureus* protein A were labeled with Ru(II) complex ($\tau \sim 500$ ns) and used for the detection of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and immunoglobulin G (IgG), respectively. Results indicated that the methods were useful for the detection of rRNA and IgG without disturbance of the autofluorescence.

INTRODUCTION

Recent advancements of the methods for the detection of biomolecules largely contribute to understand the functions of DNAs, RNAs and proteins. Especially, solid-phase methods such as DNA chip¹ and oligonucleotide microarray² enabled us to understand gene functions. These methods will play an important part of genome-based diagnostics. However, as the chip-based technology requires a lot of time-consuming procedures, the technology is not applicable for the real-time analysis of the biomolecules. For the real-time detection of biomolecule, further developments of the solution-phase methods are still required for the detection of biomolecules.

In this study, as a method to detect biomolecules in homogeneous physiological media, we adopted the luminescence anisotropy-based method. During the past 50 years, this method has contributed significantly to biological studies. This method can analyse not only the rotational motion of the luminescent-labeled biomolecule but also the change in rotational motion caused by interactions between biomolecules in homogeneous

physiological media without Bound/Free separation. However, the analysis based on this method was frequently disturbed by the autofluorescence from biological specimen.

To apply this method for highly sensitive and real-time detection of biomolecules, we adopted the time-resolved luminescence anisotropy (TR-LA) analysis using long-lifetime Ru(II) complex as a luminescent label. The disturbance caused by the autofluorescence could be avoided by the TR-LA analysis using the appropriate time window. In this report, interactions between oligonucleotide (ODN) and *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA (16S rRNA), and between *Staphylococcus aureus* protein A (SpA) and immunoglobulin G (IgG) were examined by this method.

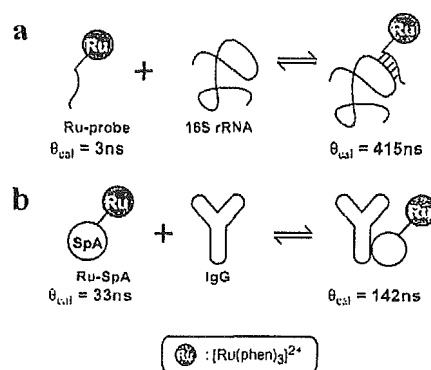


Fig. 1. Schematic illustrations of the change in rotational correlation time (θ) of Ru-probe (a) and Ru-SpA (b). θ_{cal} was calculated according to the following equation³;

$$\theta_{\text{cal}} = (\bar{v} + h)\eta M_w / RT$$

\bar{v} : specific volume, h : hydration volume, η : viscosity, M_w : molecular weight, R : ideal gas constant, T : absolute temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Ru(II) complex labeling of ODN and SpA

Ru(II) complex was successfully conjugated to the 5' end of ODN (5'-GCCGTACTCC-3'; 10mer) according to the following procedure. The sequence of the ODN was complementary to the single stranded region of 16S rRNA. The 5' end of the ODN on the CPG support was activated

by 1,1-carbonyldiimidazole and the CPG was suspended in 0.1M $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{phen}-(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2)](\text{PF}_6)_2$ in dry DMSO (60°C, 30h). After the cleavage and deprotection, the Ru(II) complex-labeled ODN (Ru-probe) was purified by reversed-phase HPLC. It was found that approximately 80% of the ODN was labeled with Ru(II) complex. SpA was labeled according to reported procedure⁴. Briefly, SpA was treated with *N*-hydroxysuccinimide activated $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{phen}-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})](\text{PF}_6)_2$ in 50mM Na-carbonate buffer (pH9.8) containing 50%(v/v) DMF (20°, 18h). Unreacted Ru(II) complex and DMF were then removed by gel-filtration (Sephadex-G25). Dye to protein ratio of the Ru(II) complex-labeled SpA (Ru-SpA) was 0.97. The Ru-SpA was used without further purification.

Detection of 16S rRNA and IgG by TR-LA analysis

Basic principles of the luminescence anisotropy-based detection of 16S rRNA and IgG were shown in Fig.1. In our previous study, we demonstrated that the target site of Ru-probe was accessible site for ODN binding⁵. The TR-LA analysis of Ru-probe was performed in the absence and presence of 16S rRNA (Fig.2). Results indicated that the addition of 16S rRNA to the Ru-probe caused significant change in luminescence anisotropy 0.1 μ sec after the pulse excitation (Fig.2. dashed line). The results suggested that the autofluorescence ($\tau < 10$ sec) from biological specimen could be avoided by the use of appropriate time window for the analysis. Rotational correlation time (θ) of Ru-probe bound to 16S rRNA was observed to be 1.2 μ sec, which was 3-fold greater than the calculated value (θ_{cal}) as depicted in Fig.1a, suggesting that the assumption in the calculation of θ_{cal} ($\nabla \cdot h = 1.9$)³ should be reconsidered.

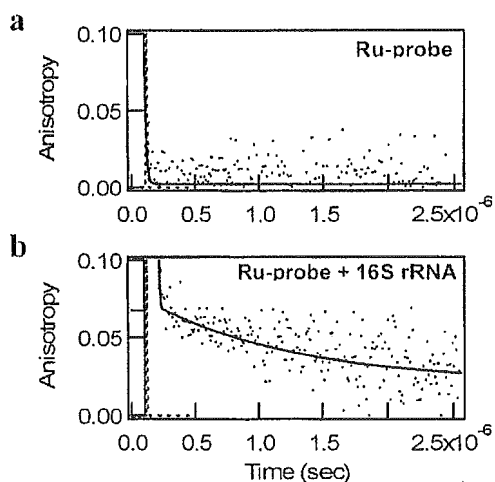


Fig.2. Luminescence anisotropy decay curves of Ru-probe in the absence (a) or presence (b) of 16S rRNA.

Dashed line represents the intensity decay of the excitation pulse. $[\text{Ru-probe}] = [\text{16S rRNA}] = 0.75 \mu\text{M}$ in 10mM Tris-HCl (pH7.5) containing 100mM NaCl and 1mM MgCl_2 . Measurements were carried out at 11°C

Table 1 Detection of IgG by TR-LA and SS-LA analyses using Ru-SpA in DMEM containing 10% FBS

	Luminescence anisotropy	
	TR-LA (average anisotropy) ^a	SS-LA
Ru-SpA	0.025	0.097
Ru-SpA + 0.5 μ M IgG	0.066	0.084
Ru-SpA + 5.0 μ M IgG	0.116	0.093

^aAverage anisotropy was calculated using the anisotropy decay curve 50-100nsec after the pulse excitation. $[\text{Ru-SpA}] = 0.3 \mu\text{M}$ in 20mM PBS. Measurements were carried out at 20°C.

To evaluate the availability of the TR-LA-based detection of IgG using Ru-SpA, TR-LA analysis was compared with the steady-state luminescence anisotropy (SS-LA) analysis (Table 1). In the case of SS-LA analysis, the addition of IgG to Ru-SpA did not show the significant change in luminescence anisotropy, suggesting that the autofluorescence from FBS greatly disturbed SS-LA analysis. On the other hand, the significant change in luminescence anisotropy was detected in the case of TR-LA analysis. These results suggested that the autofluorescence from FBS was effectively avoided by the TR-LA analysis.

CONCLUSION

In this report, we tried to evaluate the availability of the TR-LA-based method for the detection of various biomolecules in the homogeneous physiological media. Results suggest that the autofluorescence due to concomitant materials in the serum containing media was effectively avoided. This methodology might contribute to the development of highly sensitive and real-time detection system for biomolecules in homogeneous physiological media.

REFERENCES

- Schena, M., Shalon, D., Davis R.W., Brown, P.O. (1995) *Science*, 270, 467-470.
- Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A. (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, 4913-4918.
- Lakowicz, J.R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Sakamoto, T., Mahara, A., Yamagata, K., Iwase, R., Yamaoka, T., Murakami, A. (2004) *Anal. Biochem.*, 329, 142-144.
- Sakamoto, T., Mahara, A., Iwase, R., Yamaoka, T., Murakami, A. (2005) *Anal. Biochem.*, 340, 369-372.

Synthesis and properties of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralen-conjugated adenosine

Maiko Higuchi¹, Asako Yamayoshi², Akio Kobori¹, Tetsuji Yamaoka³ and Akira Murakami¹

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan, ²Institute of Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan and ³Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

ABSTRACT

In order to selectively regulate mRNA having a point mutation, the photo-reactive antisense oligonucleotides were developed. Two types of photo-reactive oligonucleotides containing adenosine whose 2'-OH was modified with 4,5',8-trimethylpsoralen (psoralen) were synthesized (2'-Ps-oligo). One contains psoralen *via* a methylene linkage (2'-Ps-met), and the other *via* an amidomethylene linkage (2'-Ps-amd). 2'-Ps-oligos were then subjected to the photo-cross-linking reaction. 2'-Ps-met cross-linked to the complementary RNA and scarcely did to the RNA having a single mismatch base. Contrarily, 2'-Ps-amd did not cross-link to both RNA strands. These results suggest the structure of the linkage might affect the efficiency of the photo-cross-linking.

INTRODUCTION

Through the identification of human genome sequence and the development of molecular biology, it has found that various serious diseases were caused by the consequence of a single point mutation in the coding region. For example, *ras* oncogene having a single point mutation in the coding region is responsible for the transformation [1,2]. The mutation affects the cellular proliferation and induces tumorigenic properties. It is desired to inhibit selectively the expression of disease-causing mutation without affecting normal genes. Traditional drugs have certain limitations for such diseases because of the lack of the sequence specificity. The antisense strategy which inhibits gene expression in a sequence specific manner might be suitable for the purpose.

We designed new photo-reactive antisense oligonucleotides to suppress the expression of mRNA having a single point mutation and 4,5',8-trimethylpsoralen (psoralen) was adopted as the photo-reactive molecule.

In our previous study, it was found that 5'-O-psoralen-conjugated oligonucleotide (5'-Ps-oligo) [3] which was complementary to HPV18 mRNA inhibited the cellular proliferation of cervical carcinoma cells (C411) upon UVA-irradiation [4]. However, there is some possibility that the

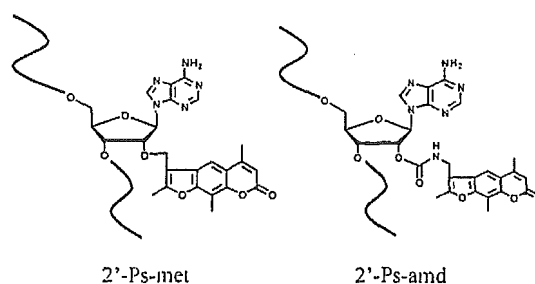
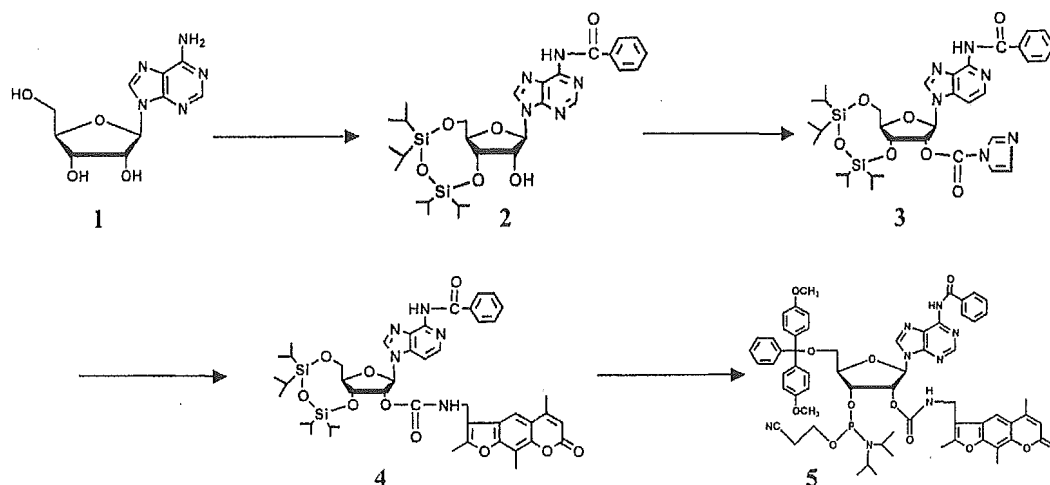


Fig.1. Structures of 2'-Ps-oligos (2'-Ps-met and 2'-Ps-amd)

psoralen of 5'-Ps-oligo could photo-cross-link to the undesired sites of mRNA because of the flexibility of the linkage. In this study, photo-reactive oligonucleotides whose 2'-OH was modified with psoralen were designed to overcome the problem.

RESULTS AND DISCUSSION

We designed the photo-reactive antisense molecule so as to cross-link to pyrimidine base at the site of the point mutation in the target RNA, and so as not to randomly cross-link to the pyrimidine bases. The antisense molecules possess a psoralen derivative at 2'-position *via* either a methylene linkage (2'-Ps-met) or an amidomethylene linkage (2'-Ps-amd). The conformational calculation of the hybrid between 5'-Ps-oligo or 2'-Ps-oligo and its complementary RNA was carried out using AMBER* force field in MacroModel ver.8.0. It was demonstrated that both psoralens of 2'-Ps-met and 2'-Ps-amd intercalated only between the designated base pairs. Contrarily, the psoralen of 5'-Ps-oligo intercalated between the designated base pairs and also between the neighboring base pairs. This might cause the undesired cross-linking. The calculated distances between the double bond of the pyrimidine base 5-6 and the double bond of psoralen 3-4 were 5.7 Å in the 2'-Ps-met and 4.0 Å in the 2'-Ps-amd.



Scheme 1. Synthetic scheme of 2'-Ps-amsd-adenosine derivative

Two types of 2'-*O*-psoralen-conjugated adenosine phosphoramidites were synthesized. The introduction of psoralen derivatives to the 2' position was achieved in two ways. (I) 4'-Chloromethyl-4,5',8-trimethylpsoralen was selectively introduced to 2'-position of adenosine whose 2'-OH and 3'-OH were activated by sodium hydride. (II) 4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen (AMT) was introduced to 2'-position of *N*⁶-benzoyl-3',5'-*O*-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)adenosine **2** adopting the carbonyl diimidazole (CDI) activation protocol (Scheme 1) [5]. The reaction of **2** with CDI in THF gave 2'-*O*-(imidazol-1-ylcarbonyl)-3',5'-*O*-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)adenosine **3** in nearly quantitative yield. Subsequently, **3** was treated with AMT in THF to give **4** and **4** was isolated by column chromatography (87%). These 2'-*O*-psoralen-conjugated adenosine derivatives (Aps) were introduced to oligonucleotide by the solid phase synthesis protocol. The sequence of the Ps-oligo was d(CCTCGACAApsACCGCAT), which was complementary to codon 12 of K-ras mRNA surrounding region.

2'-Ps-oligos were then subjected to the photo-cross-linking reaction with their target RNAs. The reactions were analyzed by RPLC and denaturing PAGE. 5'-Ps-oligo cross-linked to both its complementary RNA and RNA having a single mismatch base. It means that 5'-Ps-oligo could cross-link to the undesired site of RNA. On the other hand, 2'-Ps-met cross-linked to its complementary RNA upon UVA-irradiated, but scarcely cross-linked to the RNA having a single mismatch base. These results suggest that 2'-Ps-met could selectively cross-link to the site of a single base mutation of RNA.

CONCLUSION

We reported the synthesis of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-*O*-psoralen-conjugated adenosine. Photo-cross-linking reaction studies indicated 2'-Ps-met has higher selectivity than 5'-Ps-oligo, and 2'-Ps-met becomes a powerful antisense molecule to inhibit the expression of mRNA.

REFERENCES

1. Barbacid, M. (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827.
2. Bos, L. (1989) *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689.
3. Murakami, A., Yamayoshi, A., Nishida, J., Iwase, R., Yamaoka, T. and Wake, N. (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 25-34.
4. Lee, B., Murakami, A., Blake, K., Lin, S., Miller, P. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3197-3203.
5. Korshun, V., Stetsenko, D., Gait, M. (2002) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1092-1104.

Synthesis of antisense oligonucleotides containing a photocleavable protecting group on a guanine base and their photoinduced duplex formation

Reiko Iwase², Udai Fukui¹, Akio Kobori¹, Tetsuji Yamaoka³ and Akira Murakami¹

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8585, Japan, ²Department of Biosciences, Teikyo University of Science and Technology, 2525 Yatsusawa, Uenohara, Yamanashi, 609-0193, Japan and ³Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan

ABSTRACT

An oligonucleotide containing a photocleavable protecting group at a guanine base was synthesized to induce the duplex formation by photo-irradiation. α -Methyl-2-nitropiperonyl (MeNP) group was used for the photocleavable protecting group at O⁶ position of deoxyguanosine. The oligonucleotide containing MeNP group (MeNP-ODN: 5'-dTCTG^{MeNP}TCTGT-3') was synthesized by phosphoramidite method. The MeNP group was found to be removable by UV irradiation at wavelength of 365 nm for 5 min in 98% yield. UV-melting temperature (T_m value) analysis indicated that the duplex of MeNP-ODN with the complementary RNA was significantly unstable compared with the unmodified DNA/RNA duplex (Δ T_m = -25 °C). After UV irradiation at 365 nm, the T_m value of the mixture increased to the same as that of the unmodified duplex. These results suggest that the RNA binding ability of the MeNP-ODN can be induced by photocleavage of the MeNP group.

INTRODUCTION

Phototriggered duplex formation of oligonucleotides with the target DNA and RNA is expected as a new means for the temporal and spatial control of gene expression by photo-irradiation. Recently, systems for the phototriggered duplex formation of oligonucleotides have been reported by the use of photoinduced conformational change of azobenzene group¹⁾ or photocleavage of 1-*o*-nitrophenyl-1,3-propanediol linker²⁾ on the modified oligonucleotides. The control of base-pair formation of oligonucleotides using photocleavable protecting groups on the thymine bases has been reported to induce the duplex formation by photo-irradiation.^{3,4)} We have developed the utility of 6-nitroveratryloxycarbonyl (NVOC) group⁵⁾ as a photocleavable protecting group of the N³ position of thymidine on antisense oligonucleotides.³⁾ This protecting group has proved to have a property that it could be removed by photo-irradiation at wavelength of 365 nm to

induce the T-A base pairing of the oligonucleotide with the complementary RNA. Unfortunately, the photocleavage of the NVOC group required 5 h. Furthermore, two NVOC groups were needed in 18-mer-antisense DNA for the sufficient destabilizing effect of the duplex formation with complementary RNA. It is therefore required to introduce faster photocleavable protecting group at more effective position on antisense DNA as compared with the NVOC-modified oligonucleotides. We have chosen α -methyl-2-nitropiperonyl (MeNP) group as a rapidly photocleavable protecting group to protect the O⁶ position of deoxyguanosine for the induction of G-C base pairing by photo-irradiation (Figure 1). Recently another group has reported that rapidly photocleavable 2-(2-nitrophenyl)propyl group was attached to the O⁴-position of thymidine on oligonucleotides for the photoinduced duplex formation with complementary DNA.⁴⁾ In this report, we present the synthesis of MeNP-modified oligonucleotides (MeNP-ODN) (1) and the ability of photo-induced duplex formation of MeNP-ODN with the complementary RNA.

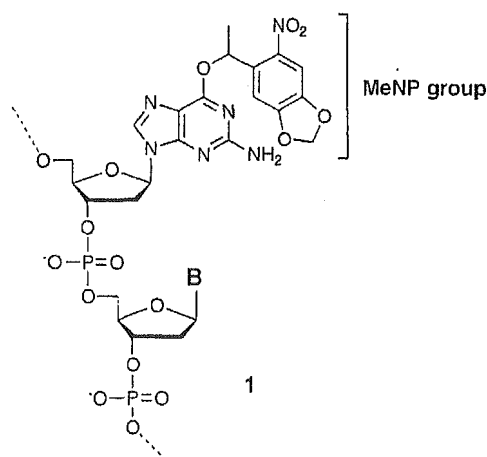


Figure 1. Structure of MeNP-modified oligonucleotide

RESULTS AND DISCUSSION

First, we prepared a deoxyguanosine phosphoramidite 5 bearing MeNP group at the O⁶ position (Figure 2). 3',5'-bis-O-(t-butylidimethylsilyl)-N²-phenoxyacetyl-2'-deoxyguanosine was first converted into 3',5'-bis-O-(t-butylidimethylsilyl)-N²-phenoxyacetyl-O⁶-mesitylene-sulfonyl-2'-deoxyguanosine in 80% yield. The intermediate was converted into the 6-quinuclidinium salt, which was allowed to react with 1-(4,5-methylenedioxy-2-nitrophenyl)ethanol in the presence of DBU to give the O⁶-MeNP-modified derivative (2) in 86% yield. The treatment of 2 with TBAF gave the 3',5'-diol derivative (3) in 83% yield. The 5'-dimethoxytritylation of 3 gave the 5'-O-tritylated product 4 in 41% yield. Compound 4 was converted into 5 by 3'-phosphitylation in 81% yield.

Next, MeNP-ODN was prepared by phosphoramidite method using 5 and other nucleoside phosphoramidites bearing easily-removable protecting groups under mild basic condition at exocyclic amino functions of guanine and cytosine bases (G^{iPrPac}, C^{Ac}, T: iPrPac = *p*-(isopropyl)phenoxyacetyl, Ac = acetyl). CPG support with hydroquinone-O,O'-diacetic acid linker was also used. Cleavage from CPG and deprotection of the MeNP-ODN with 0.05M of potassium carbonate in methanol⁶ for 2h gave MeNP-ODN (5'-dTTCGT^{MeNP}-TCTGT-3'; G^{MeNP} = deoxyguanosine having a MeNP group at O⁶ position).

The MeNP group of MeNP-ODN was found to be removable by UV irradiation at wavelength of 365 nm (transilluminator, 2.5 mW/cm², 37 °C) in 5 min to produce the unmodified oligonucleotide in 98 % (Scheme 1).

To examine the destabilizing effect of the MeNP group for the duplex formation, we measured UV melting temperature (T_m value) of the mixture of MeNP-ODN and

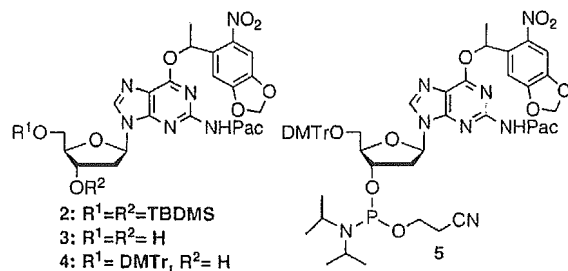
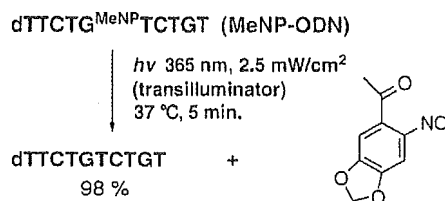


Figure 2. Structures of MeNP-modified deoxyguanosine derivatives

Scheme 1.



complementary RNA. The T_m value of this duplex (T_m = 16 °C) was significantly reduced compared with that of unmodified ODN-RNA duplex (T_m = 41 °C)(Table 1). In mixtures with complementary RNA, the MeNP-ODN also exhibited the T_m value 5 °C lower than the mismatch ODN (5'-dTTCATCTGT-3') containing an adenine mismatch base (T_m = 21 °C) (Table 1). These results suggest that the MeNP group on the oligonucleotide remarkably inhibits the duplex formation. After UV irradiation to the mixture of the MeNP-ODN with the complementary RNA, the T_m value was the same as that of unmodified duplex (Table 1). This result indicates that the RNA binding ability of MeNP-ODN was induced by UV irradiation. Thus, the photo-induced RNA binding ability of oligonucleotide was achieved by the introduction of photocleavable protecting group at the O⁶ position of guanine base.

Table 1. Values of T_m for MeNP-ODN with the complementary RNA

	T _m (°C)	Δ T _m (°C)
unmodified ODN	41	-
mismatch ODN	21	-20
MeNP-ODN	16	-25
MeNP-ODN (UV irradiation)	41	0

Measurement: 10mM phosphate buffer (pH7.0), 1M NaCl. Concentration of total oligonucleotides: 4μM. Condition of UV irradiation: transilluminator (λ_v 365nm, 2.5mW/cm², room temperature, 5 min.). Sequence of mismatch ODN: 5'-dTTCATCTGT-3'.

CONCLUSION

In conclusion, MeNP group can be attached to the O⁶ position of deoxyguanosine and incorporated into oligonucleotide in a site-specific manner by the use of MeNP-modified deoxyguanosine phosphoramidite unit 5. The MeNP group on oligonucleotide has high photocleavage efficiency at UV wavelength of 365 nm and allows the production of unmodified oligonucleotide. The MeNP-modified oligonucleotide has the ability of photo-induced duplex formation with the target RNA.

REFERENCES

- Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X., Komiya, M. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2393-2395.
- Ordoukhanian, P., Taylor, J-S. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9570-9571.
- Iwase, R., Kitani, A., Yamaoka, T., Murakami, A. (2003) *Nucleic Acids Res. Supp.*, **3**, 61-62.
- Kröck, L., Heckel, A. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 471-473.
- Alvarez, K., Vasseur, J.-J., Beltran, T., Imbach, J.-L. (1999) *J. Org. Chem.*, **64**, 6319-6328.
- Kuijpers, W.H.A., Kuyl-Yeheskiely, E., van Boom, J.H., Boeckel, C.A.A. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3493-3500.

2X13

ポリカチオンミセルによる遺伝子導入効率向上の機構解析

(¹国循セ研、²京工織大繊維) ○山岡哲二¹、北川達哉²、橋本朋子²、
小林由美子²、村上 章²、馬原 淳¹

【緒言】非ウィルスベクターにより細胞内に送達された DNA 分子が転写されて、遺伝子が発現するまでの詳細なメカニズムはいまだ明らかでない。細胞表面レセプター介在システムやプロトスポンジ効果、あるいは、核移行性シグナル (NLS) を利用した試みが報告されているにもかかわらず、未だ十分な発現効率の向上が達成できないのは、最終段階である複合体の転写・翻訳効率の低さが原因と考えられる。複合体からの DNA 分子の遊離や複合体中の DNA の直接転写は、導入遺伝子の発現効率を左右する最も重要な段階の一つであることは疑い余地もないが、その検討はほとんど進んでいない。本研究では、ポリプレックスの解離などの特性を制御すべく、様々な分子構造を有するカチオンポリマー系非ウィルスベクター、特に分子集合化によるミセル状ポリカチオンを合成し、その被転写翻訳効率と遺伝子発現効率について検討した。

【実験】キャリアーの合成 分子内ミセル形成型遺伝子キャリアーとして、側鎖に数%のステアリル基を有する直鎖状のポリカチオン (poly(Gal-co-DMAPAA-co-S)) を選び、親水性モノマーの 6-O-vinyladipoyl-D-galactose (Gal)、カチオン性モノマーの N-[3-(dimethylamino)propyl] acrylamide (DMAPAA)、および、疎水性モノマーの stearylacrylate (S) を様々な比で共重合し、定法により精製した。また、分子間ミセル形成型モノマーとしては、様々な配列を有するオリゴアミノ酸とステアリン酸との縮合による両親媒性化合物を合成した。ミセル形成の確認 ミセル形成確認のため、ピレンを用いて以下の方法で臨界ミセル濃度 (cmc) を測定した。各ベクター水溶液の希釈系列 1.5 ~ 0.0005mg/ml に所定量のピレンプローブを加え、3時間 65°C でインキュベートし、室温で放冷した後、励起スペクトルを測定した (蛍光波長 393nm、サンプリング間隔 0.2nm)。また、各ベクター水溶液 1.5mg/ml を、マイカ上に 2 μ l 滴下し、窒素雰囲気下で乾燥させた後、AFM タッピングモードにて撮像した。In vitro 遺伝子導入 pCMV-Luc プラスミド DNA を COS-1 細胞にクロロキン処理法により導入し、定法により発現量を定量した。ヘパリン添加によるポリイオン交換反応 種々の C/A 比のキャリアー/pT7-Luc ポリプレックス溶液に、カチオン基数に対して所定倍量の硫酸基数となるようにポリビニル硫酸カリウムを添加し、プラスミド DNA の解離の様子をアガロースゲル電気泳動法および in vitro 転写翻訳系にて分析した。細胞内でのポリプレックスの解離 RITC ラベル化ベクターと FITC ラベル DNA を用いて両者の FRET の有無を利用することで、複合体の細胞内挙動の追跡を検討した。

Novel mechanism of enhanced gene transfer with micelle type gene carriers

Tetsuji YAMAOKA¹, Tatsuya KITAGAWA², Tomoko HASHIMOTO², Yumiko KOBAYASHI², Akira MURAKAMI², Atsushi MAHARA (¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Department of polymer science and engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo, Kyoto 606-8585, Japan) Tel: 06-6833-5012 ext 2637, Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.nccv.go.jp

We have been focusing on the last step of gene delivery using nonviral carriers, that is, the intranuclear recognition of the polyplexes by transcription factors. In the present study, cationic micelles of linear polycations having hydrophobic groups at the side chain and oligo cationic peptide bearing hydrophobic group at the N terminus were evaluated. The former forms intramolecular micelles and the latter forms intermolecular micelles. Both of the micelle-type carriers form stable but uncompacted polyplexes with plasmid DNA, and the polyplexes are easily disassemble by addition of another polyanion such as heparin and potassium poly(vinyl sulfate). In addition, the disassembly of the polyplexes was observed even in the nucleus based on fluorescent resonance energy transfer (FRET) using FITC-labelled plasmid DNA and Cy3-labelled polycations. Polyplexes composed of micelle-type carrier and plasmid DNA disassembles much easier than the case of linear type carriers possibly because of the suppressed entanglement between them, resulting in the high transcription and high expression efficiency.

疎水化キャリアー分子のナノ自己組織化現象の解明

図1に、poly(Gal-co-DMAPAA-co-S)の、ピレンプローブを用いたCMC測定の結果、および、AFM観察による分子内ミセル形成の様子を示した。疎水基含有率に拘わらず全てのキャリアーが、ミセル形成能を有する両親媒性分子であることが確認され、CMC以上の濃度では、分子内疎水場を形成するナノ自己組織化キャリアーであり、外殻にカチオン基が集積した構造であることが明らかとなった。さらに、図2には、キャリアー分子に導入した疎水基の割合がナノミセル化構造に与える影響について観察した結果を示した。特に、ステアリル基が3%以上では、DNAの複合体形成後にも、その構造を保持しており、「ブドウ」状の複合体を形成していることがわかる。さらに、図2最下段に示したアガロースゲルの写真は、形成したポリプレックスが解離し易いかをアニオン分子間交換反応により検討した結果である。Potassium polyvinyl sulfate solution (PVSK)をDNAに対し1~4等量加えたところ、疎水基導入率の上昇とともにミセル構造が明らかとなり、さらに、DNA分子の放出(ポリプレックスの解離)が容易になることが明らかとなった。

pCMV-Luc遺伝子導入の結果、ナノ構造化により、その遺伝子導入効率は飛躍的に向上した。また、直鎖状のキャリアーの多くで認められる、C/A比上昇に伴う発現効率の急激な低下が顕著に抑制され、広い範囲に於いて高い発現効率を示した。

さらに、ミセル型キャリアーとDNAとのポリプレックスが、実際に、細胞内でも解離しやすい事を示すために、新たな追跡システムを構築した。すなわち、FITCで蛍光ラベルしたプラスミドDNA分子とRITCで蛍光ラベルしたキャリアー分子のポリプレックス間で起こるFRET(Fluorescence resonance energy transfer)現象を利用した。上記と同様にして細胞内にポリプレックスを導入し、FITC分子を励起して蛍光スペクトルを測定した結果を図3に示した。疎水基を導入していない第一世代キャリアー分子の場合(図3左)、細胞の蛍光写真は黄色く観察され、そのスペクトルからも、RITC由来の蛍光がメジャーであることが判る。すなわち、細胞内でもポリプレックスは解離できず、このために、プラスミドDNAを核にないに送達できるにもかかわらず、遺伝子の発現を誘導できなかったことが明らかである。それに対して、ナノ自己組織化キャリアーの場合には、細胞は緑色蛍光を発生し、そのスペクトルはFRET現象の消失を示しており、細胞内でポリプレックスが解離し、十分に離れた位置に存在していることが示された(図3右)。

分子内・分子間ミセルの何れの場合にも、ポリプレックスの易動性の向上と共にその被転写効率が向上すること、さらに、この効率向上が直接的に遺伝子発現効率の向上につながる事が明らかとなり、この事は非ウィルスキャリアー新たな分子設計指針となる。

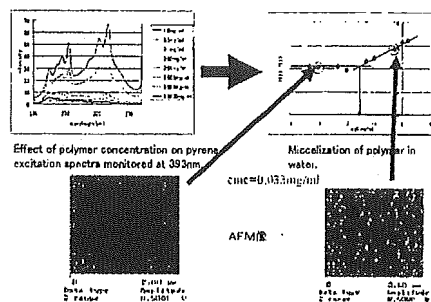


Figure 1 CMC measurement and AFM images of poly(Gal-co-DMAPAA-co-S) micelle.

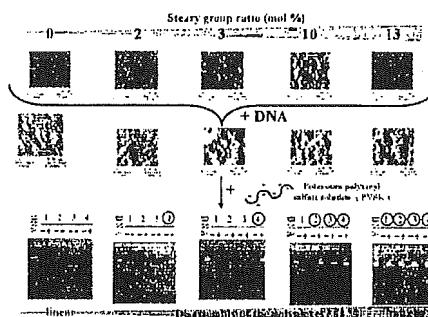


Figure 2 Polyplexes composed of poly(Gal-co-DMAPAA-co-S) micelle-type carrier and pCMV-Luc. Agarose gels represent the interexchange reaction of polyplexes with PVSK

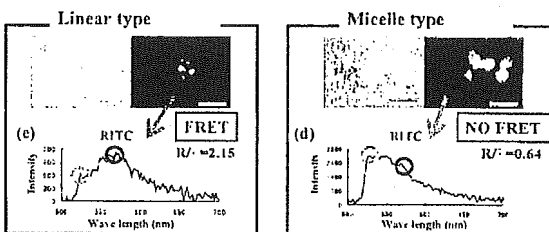


Figure 3 Polyplex disassembly in the nuclei assessed by FRET.

3X08

幹細胞特異的表面的構築と組織再生

○馬原 淳¹、樋上 智一²、村上 章²、山岡 哲二¹

(1 国立循環器病センター研究所 生体工学部、2 京工織大・織)

【緒言】様々な細胞に分化が可能な自己幹細胞を用いて組織を再構築する再生医療分野では、目的の幹細胞を効率よく回収し、スキャホールドへ細胞を播種する必要がある。現在、目的の幹細胞のみを単離するためには、表面レセプターの有無に基づいた FACS 法や磁気ビーズ法が検討されている^{1, 2}が、操作が難しく回収できる細胞数に限界があることから臨床への展開は難しい。

そこで本研究では、血管再生用スキャホールドとして用いられている多孔質構造の poly(L-lactide-co-caprolactone) (p(LA/CA)) をスキャホールドとして採用し、目的の幹細胞のみが連続的に接着することで組織を再生できるシステムの構築を目指した。造血幹細胞の表面マーカーである CD34 に対する特異抗体を固定化した p(LA/CL) 表面の構築を行い、骨髓細胞液を通液することで CD34 陽性細胞のみを連続的に単離・播種する事が可能であるばかりでなく、迅速な組織再生材料の構築にも有効である。

【実験】パーティクルリーチング法および凍結乾燥法により p(LA/CA) 多孔質体を作成し、走査型電子顕微鏡 (SEM) および水銀圧入法により多孔質構造の評価および表面積の算出を行った。Anti-human CD34 mouse IgG 抗体 (CD34 抗体) の固定化を行うために、まず p(LA/CA) 多孔質体を 1N の NaOH で 30 分間加水分解することで、その表面にカルボキシル基を導入した。次に、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) によりカルボキシル基を活性化後、CD34 抗体と反応した。固定化された抗体量は、ペルオキシダーゼ標識 anti-mouse IgG 抗体 (HRP-IgG 抗体) を用いて定量した。その後、CD34 陽性モデル細胞である KG-1a 細胞 2×10^6 個/50ml を流速 0.05ml/min で抗体固定化 p(LA/CA) 多孔

Design of Stem cell-specific Surface for the Regenerative Medicine

Atsushi MAHARA¹, Tomokazu HIGAMI², Akira MURAKAMI², Tetsuji YAMAOKA¹ (¹Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan)
Tel: 06-6833-5012 ext 2637, Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Key Word: stem cell / CD34 / regenerative medicine / separation

Abstract: Hematopoietic stem cells are the ideal cell source of the regenerative medicine for restoring the function of damaged vascular tissues, but the target stem cells are in general only 1-2% of the total cell population in the bone marrow. When the regenerative medicine is apply to the clinical stage, it is important to condense the stem cells on scaffold without complicated procedure. To separate and condense the stem cell directly on the scaffold, antigen-antibody interaction is adopted. Pours poly(L-lactide-co-caprolactone) scaffolds were prepared, and anti-human CD34 mouse IgG was immobilized on the surface by methods of alkali hydrolysis and carbodiimide activation. The antibody density was about $7.6 \mu\text{g}/\text{m}^2$. The amount of KG-1a cells (CD34⁺) adhering on the antibody-modified scaffold evaluated by WST-1 assay was about four times larger than that of the non-modified scaffolds. When cell suspension containing KG-1a cells and HL-60 cells (CD34⁻) was pass through the scaffold, and the eluent was analyzed by flow cytometric analysis, the fluorescence signal for the KG-1a cells was largely reduced due to the CD34 specific cell adhesion on the scaffold. These results suggest that the antibody-modified p(LA/CA) scaffold via extremely safe manner is useful and expected for isolating CD34-positive cells from the bone marrow.

質体へ播種し、スキャホールド表面に接着している細胞数を WST-I assay により定量した。また、KG-1a 細胞と CD34 陰性モデル細胞の HL60 との混合懸濁液からの KG-1a 細胞単離実験も行った。

【結果と考察】作成した p(LA/CA) 多孔質体の SEM 像を図 1 に示した。数十 μm の均一な連通孔が確認され、また、水銀圧入法により、その比表面積は $0.88\text{m}^2/\text{g}$ であった。これらの結果より、多孔質でかつ連通孔を有するスポンジ状の p(LA/CA) 多孔質体は細胞接着のスキャホールドとして有効であると判断した。

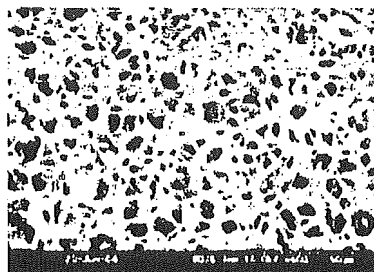


Figure 1. SEM image of p(LA/CA) scaffold.

スキャホールド に対する CD34 抗体の固定化とその定量

HRP-IgG 抗体を用いて、作成したスキャホールド表面に結合している CD34 抗体量を定量した結果、スキャホールドに対して結合している抗体量は、 $30\text{ng}/\text{scaffold}$ であった。さらに水銀圧入法により求めた表面積から、固定化抗体密度は $7.6\mu\text{g}/\text{m}^2$ であることが算出された。

CD34 抗体を固定化したスキャホールドによる KG-1a 細胞の選択的分離

CD34 抗体を固定化したスキャホールドに対して KG-1a 細胞を播種した結果、original あるいは control のスキャホールドと比べて約 4 倍多い KG-1a 細胞の接着が確認された。この結果より、抗体固定化スキャホールド表面に結合した細胞は CD34 抗体を介して特異的に細胞が接着しているものと考えている。次に、このスキャホールドを用いて、KG-1a と、CD34 陰性細胞である HL60 が等量存在する細胞混合液からの CD34 陽性細胞の選択的単離が可能であるか検討した。作成した細胞混合液とスキャホールド通液後の溶出液をフローサイトメーターで解析した結果、KG-1a 細胞に由来する蛍光シグナルが大きく減少し、HL60 に由来するシグナルの割合が増加した。すなわち、抗 CD34 抗体を固定化したスキャホールドは、細胞混合液から CD34 陽性細胞のみを選択的に接着できるため、骨髓液中に 2% 程度しか存在しない造血幹細胞を効率よく濃縮できるものと期待される。

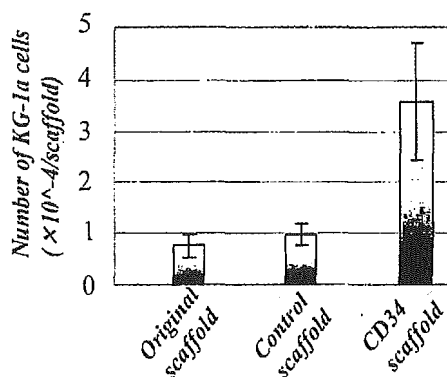


Figure 2. Number of KG-1a cells adhered on the original scaffold, control scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, and capped with 2-aminoethanol), and CD34 scaffold bearing $7.6\mu\text{g}/\text{m}^2$ CD34 antibody. 2×10^6 KG-1a cells were seeded and adherent cells were counted by WST-I assay.

Reference

1. Visser et al. Isolation of murine pluripotent hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine* 591: 576-1590, 1984.
2. Miltenyi et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238, 1990.

C-707

In vitro 血管組織再構築を目指した
スキャホールド内細胞への遺伝子導入○北川達哉¹、小堀哲生¹、村上 章¹、山岡哲二²
(¹京工織大繊維、²国立循環器病セ研)

1. [緒言] 組織の再生を促進するため、スキャホールドから細胞増殖因子を放出する検討がなされているが、タンパク因子の安定性や徐放期間などの問題があり十分な効果は得られていない。そこで、安定性の高いプラスミド DNA の徐放化による再生促進を目指し、スキャホールド内で増殖する細胞へ効果的に遺伝子導入可能なキャリアーの開発、ならびに、スキャホールドへの保持方法を検討した。これら一連の細胞播種、遺伝子導入、および三次元培養には、我々がこれまでに報告してきた灌流型バイオリアクターを利用した。

2. [実験] 凍結乾燥法により、ポリ-L-乳酸 (PLLA; Mw=130,000) 性中空多孔質スキャホールドを作製した。スキャホールドとの疎水性相互作用が可能な遺伝子導入キャリアーとして、疎水性基 (stearylacrylate (SA)) を付与した N-[3-(dimethylamino) propyl] acrylamide (DMAPAA) と、2-methacryloyloxy ethylphosphoryl choline (MPC) の共重合体 (DMAPAA/MPC/SA=46/53/1) を作製した。スキャホールドへの複合体保持方法として、方法(1): あらかじめ形成した DNA/キャリアー複合体溶液をスキャホールドに含浸後、凍結乾燥し保持する方法、または、方法(2): スキャホールド上で複合体を形成させ、保持する方法 (キャリアー溶液、DNA 溶液を別々にスキャホールドへ含浸、乾燥させ、キャリアー/DNA/キャリアーの三層構造を作製) を検討した。これら二種の方法で作製した複合体保持スキャホールドを用い、DNA の放出挙動、放出された複合体の表面電荷 (ζ -potential)、および遺伝子導入能を評価した。

Fluorescence ラベルした DNA (F-pCMV-Luc) を用い、方法(1)で作製したスキャホールドを PBS 溶液中に浸け、一定時間ごとに溶液の蛍光強度 ($\lambda_{em}=595nm$) を測定し、DNA の徐放性を評価した。遺伝子導入能の評価では、方法(1)、(2)のスキャホールドを灌流型バイオリアクターに接続し、ヒト平滑筋細胞 (AOSMC) 懸濁液の 12 時間送液 (1.1ml/cm²·min) によるスキャホールドへの細胞播種後、10%FBS を含む DMEM 培地に交換し、灌流培養 60 時間後のスキャホールド内細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。比較のため、スキャホールドに複合体を保持しない方法(3)として、上記の培地交換後に複合体溶液を送液した時の遺伝子導入能を評価した。ポジティブコントロールに linear-PEI (Mw=25,000) を用いた。

3. [結果・考察] p(DMAPAA-co-MPC) や PEI では、2 日間で完全に DNA がスキャホールドから放出したが、疎水性基を付与した p(DMAPAA-co-MPC-co-SA) を用いると 7 日以上、DNA の徐放が可能であった。キャリアーへの疎水基の付与がスキャホールドとの疎水性相互作用を向上させ、DNA の徐放化に有用であることが示された。しかしながら、方法(1)のスキャホールドから放出された複合体はマイナスの表面電荷を有しており、全く遺伝子導入能がなかった。それに比べ、方法(2)のスキャホールドから放出された複合体はプラスの表面電荷を有し、最適条件 (キャリアー (C/A=3)/DNA/キャリアー (C/A=3)) での遺伝子導入効率は、方法(3)に比べ 7 倍高く、ポジティブコントロールの PEI (C/A=10) と同程度まで上昇した (図 1)。また PEI は、方法(2)で保持させても、すぐにスキャホールドから放出し、培地交換時に系中から除かれるため、方法(3)に比べ、導入効率が低くなったと考えられる。以上の結果より、疎水性基を付与したキャリアー/DNA 複合体を、方法(2)でスキャホールドに保持すると、遺伝子導入能を有した複合体が徐放され、接着細胞の周囲での DNA 濃度が常に高く保たれるため、効果的な遺伝子導入が可能であったと考えられる。

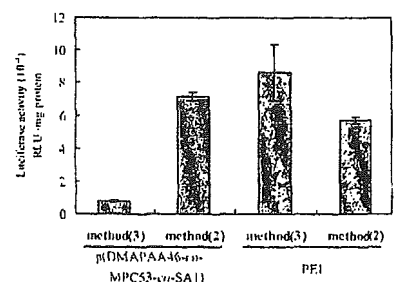


Figure 1. Transient expression of luciferase introduced to SMC cells using p(DMAPAA-co-MPC-co-SA) and PEI. method(2); carriers and pDNA were separately coated on the scaffold, method(3); complex solutions were added to the cell-seeded scaffold.

Gene transfer to smooth muscle cells on 3-D porous scaffolds

Tatsuya KITAGAWA¹, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹, and Tetsuji YAMAOKA²¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology²Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute