

遺伝子送達における高圧技術の応用

○木村剛¹⁾・南 広祐¹⁾・小野 努²⁾・吉澤秀和²⁾・古菌勉³⁾・藤里俊哉⁴⁾・岸田晶夫¹⁾

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、2) 岡山大学、環境理工学部、3) 国立循環器病センター研究所 生体工学部、4) 大阪大学 工学部

1. 緒言

非ウイルス遺伝子デリバリーにおける主流は、正電荷物質と DNA の複合体を用いる手法である。DNA は、静電的相互作用により数千分の 1 に凝縮され、これにより核酸分解酵素耐性を獲得し、効率的な細胞内導入がなされる。しかしながら、正電荷に由来する細胞障害性が従来から問題とされ、また最近では、強度の DNA 凝縮による転写因子の認識抑制が指摘されている。そこで我々は、静電的相互作用を介さない DNA 凝縮法について高圧技術を用いて検討した。核酸への高圧印加の影響については、600MPa の静水圧印加によるオリゴ DNA・RNA の B 型から Z 型へのコンフォメーション変化や、圧力の上昇に伴う閉環状プラスミド DNA のスーパーコイル形成の促進などが報告されている。また、圧力上昇に伴うヘアピンリボザイムの活性の減少が報告されており、核酸の構造/機能への高圧の影響が検討されている。本研究では、高圧印加によるプラスミド DNA の立体構造変化について詳細に検討し、さらに、その機能の一つとして高圧印加プラスミド DNA の被転写/翻訳について検討した。

2. 実験

DNA としては、T7 プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミド DNA (pT7-luc) を用いた。高静水圧印加装置 (Dr. CHEF; (株) 神戸製鋼所) を用いて、種々の温度・圧力・時間にて高静水圧印加処理を行った。処理液を、DLS 測定、CD 測定、アガロースゲル電気泳動、AFM 観察にて構造解析を行った。また、高圧処理による DNA の機能解析として、ウサギ網状赤血球を用いた無細胞系転写・翻訳、核酸分解酵素を用いた分解性試験により検討した。

3. 結果と考察

図 1 には、10,000 気圧、5 分間の高圧印加前後のプラスミド DNA の DLS 測定結果を示す。約 100 nm、600 nm のサイズのスーパーコイル、開環状プラスミド DNA は、高圧印加により約 25 nm、100 nm のサイズで検出された。原子間力顕微鏡観察においては、未処理プラスミド DNA では、開環状のプラスミド DNA および繊維状のスーパーコイル DNA が観察され、高圧印加処理した場合は球形のプラスミド DNA が観察された。以上の結果から、高圧印加によりプラスミド DNA が凝縮されることが明らかとなった。次に、種々の圧力にて 5 分間の高圧印加を施した結果、プラスミド DNA のサイズは圧力の上昇に伴い減少した。また、10,000 気圧での異なる時間の施圧において、施圧時間の延長に伴う

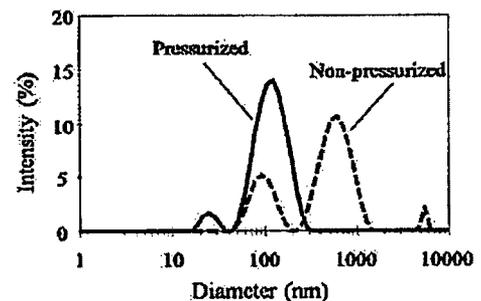


Fig. DLS measurement of plasmid DNA with/without pressurization at 10,000 atm for 5 min..

サイズの減少が示され、これら結果は、プラスミド DNA 凝縮の圧力制御を示していると考えられる。上述の高圧凝縮プラスミド DNA の機能解析の一つとして、無細胞系転写・翻訳を用いたプラスミド DNA の被転写・翻訳活性について検討した。種々の圧力にて施圧したプラスミド DNA の被転写・翻訳活性は、未処理のプラスミド DNA とほぼ同等、あるいは若干の上昇が示され、非ウイルス遺伝子デリバリーへの応用可能性が示された。本研究は、厚生労働省科学研究補助金の助成を受けて行われた。

Application of ultra-high pressure technology for gene delivery

Tsuyoshi KIMURA¹⁾, Kwangwoo NAM¹⁾, Tsuyomu ONO²⁾, Hidekazu YOSHIKAWA²⁾, Tsutomu FURUZONO³⁾, Toshiya FUJISATO⁴⁾ and Akio KISHIDA¹⁾

¹⁾Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan, ²⁾Department of Material and Energy Science, Okayama University, ³⁾Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, ⁴⁾Division Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology.
Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

DNA condensation using hydrostatic pressurization for gene delivery

T. Kimura¹⁾, K. Horiuchi²⁾, K. Kurita²⁾, T. Ono³⁾, H. Yoshizawa³⁾, T. Fujisato⁴⁾, A. Kishida¹⁾,

¹⁾Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, Japan, ²⁾Nihon University, Tokyo, Japan, ³⁾Okayama University, Okayama, Japan, ⁴⁾Osaka Institute of Technology, Osaka, Japan

Introduction

Plasmid DNA was utilized for gene transfection into mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. Mainly, plasmid DNA was condensed by various cationic compounds, which can interact with plasmid DNA electrostatically, in order to be stable for nuclease degradation and to be effectively delivered into cells. Although the transfection efficiency was enhanced using these methods *in vitro*, their cytotoxicity is one of essential problems. On the other hands, it was reported that when plasmid DNA was directly injected into muscle, liver, and heart *in vivo*, called as naked plasmid DNA method, the transgene was transiently expressed. Although this method is simple and safe, the level of transgene expression resulting from such local regional administration is relatively low and restricted to the injection site due to its low stability. Therefore, for safer, more stable and efficient gene delivery, it is necessary to condense plasmid DNA with a less cationic material or without one. In our previous study, it was reported that nanoparticles of poly(vinyl alcohol) (PVA) itself or its mixture with plasmid DNA were prepared via hydrogen bonds by ultra-high hydrostatic pressurization, in which the hydrogen bond is strengthened, and were delivered into mammalian cells with low cytotoxicity. In the present study, we hypothesized that the pressure induces the compaction of plasmid DNA itself because DNA is one of typical hydrogen bonding polymers as well as PVA, and then we investigated the effect of pressure on the tertiary structure of plasmid DNA having the super-coiled and relaxed forms. Kunugi et al previously reported that the elevated pressure to 160 MPa induced the super-coiling of relaxed plasmid DNA.

Materials and Methods

1kbp ladder DNA (Takara, Co. Ltd) was used as a linear DNA. Plasmid DNA encoding luciferase under T7 promoter (pT7-luc, Promega Co.) was also used. Aqueous solution of them (20 µg/ml) was prepared and hydrostatically pressurized at various atmospheres and 40 °C for different times using high pressure machine (Dr.chef, Kobe Steel Co. Ltd). After pressure removal, the obtained solution was analyzed by agarose gel electrophoresis, DLS (Nano-Zs, Malvern Instruments Ltd), CD (J-820, JASCO Co. Ltd) and melting temperature (T_m) at 260 nm (V-560, JASCO Co. Ltd) measurements.

Results and Discussion

For 1kbp ladder DNA, when the DNA solution was hydrostatically pressurized at 10,000 atm (980MPa) and 40 °C for 10 min, there was no change for the agarose gel electrophoresis of the ladder DNA with/without the pressurization, whereas the decrease in the size of the pressurized DNA was confirmed by DLS measurement compared to that of the non-pressurized DNA. Also, there were differences between the ladder

DNA with and without the pressurization for CD and T_m measurements. These results suggest that the condensation of DNA was induced by the pressurization.

Secondary, plasmid DNA was used in order to examine the effect of pressure on the conformational structure of DNA in detail. The aqueous solution of pT7-luc at the concentration of 20 µg/ml was hydrostatically pressurized at 10,000 atm and 40 °C for 20 min and analyzed by DLS measurement. Before the pressurization, the hydrodynamic diameter of pT7-Luc solution was detected at approximately 95 nm and 625 nm, which were assigned to the super-coiled and relaxed (open-circled) form of pT7-luc plasmid DNA, respectively. After the pressurization, the hydrodynamic diameters of the pT7-luc were measured at approximately 27 nm and 127 nm. It was previously reported that super-coiling of plasmid DNA was induced by elevated pressure to a relaxed plasmid DNA at 160 MPa. Thus, the pT7-luc having the diameter of 127 nm obtained by the pressurization at 10,000 atm was regarded as super-coiling of relaxed pT7-luc plasmid DNA. It is also considered that the super-coiled pT7-luc was effectively condensed by the high pressurization, resulting that the compacted super-coiled pT7-luc was detected at approximately 27 nm. To investigate whether the pressurizing strength and time affect the compaction of plasmid DNA, the pT7-luc solution was pressurized at different atmospheres and 40°C for various times. For DLS measurement after pressure removal, the hydrodynamic diameters of the super-coiled and relaxed plasmid DNA were decreased with increasing pressure. Also, at constant pressure at 10,000 atm, a long period of pressure treatment effectively induced the compaction of pT7-luc. These results suggest that the hydrostatic pressurization could regulate the tertiary structure of plasmid DNA. To investigate the function of the pressure-condensed plasmid DNA, the activity of luciferase expressed from the pT7-luc pressurized at various atmospheres for 5min in cell-free translation and translation system was evaluated. The luciferase activity of the pressurized pT7-luc at 5,000 atm was increased about 1.8 times compared to the non-pressurized one. Although more increasing of pressure decreased the luciferase activity, indicating that the pressurized plasmid DNA was applicable for gene delivery.

Conclusions

It was found that the high pressurization induced the super-coiling of relaxed plasmid DNA and the compaction of super-coiled plasmid DNA. The extent of the tertiary structural changes of them was depended on the pressurizing strength and time. The high hydrostatic pressurization is considered as a potential tool for preparing the compacted plasmid DNA.

圧縮 DNA の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 木村剛, 岸田晶夫, 岡山大学 環境理工学部 小野努, 吉澤秀和,
国立循環器病センター研究所 生体工学部 古菌勉, 大阪工業大学 工学部 藤里俊哉

Gene delivery using pressure-compacted plasmid DNA

Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Inst. of Biomater. Bioeng., Tokyo Med. & Dent. Univ., Tsutomu Ono, Hidekazu
Yoshizawa, Dept. of Environ. Sci. Tech., Okayama Univ., Tsutomu Furuzono, Dept. of Biomed. Eng., Nat.
Cardiovascular Cent. Res. Inst., Toshiya Fujisato, Dept. of Eng., Osaka Inst. Tech.

1. 緒言

高压技術は、タンパク質、多糖、核酸等の生体高分子の圧力下での構造変化に関する検討に用いられている。核酸への高压印加については、600MPa の静水圧印加による B 型オリゴ DNA・RNA の Z 型へのコンフォメーション変化や、圧力上昇に伴う環状プラスミド DNA のスーパーコイル形成促進などが報告されている[1]。著者らは、これらをヒントに新たな DNA 凝縮法として高压 DNA 圧縮法を考案した[Fig1]。本研究では、高压印加によるプラスミド DNA の立体構造変化について詳細に検討し、さらに、遺伝子送達への応用について検討した。

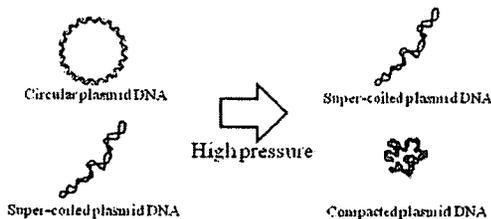


Fig.1. Compaction of plasmid DNA using high pressurization

2. 実験方法

2.1 圧縮プラスミド DNA の調製とサイズ・形態評価

プラスミド DNA は、ルシフェラーゼ遺伝子をコードする pT7-Luc, pGL3 を用いた。プラスミド DNA を 40°C、種々の圧力下 (2,000~10,000 気圧) にて 5 分間の高静水圧印加処理を施した。常圧に戻した後、圧縮プラスミド DNA の DLS 測定および AFM 観察により高压印加によるプラスミド DNA のサイズ・形態を評価した。

2.2 ハイドロダイナミクス法を用いた圧縮プラスミド DNA の in vivo 遺伝子導入

ハイドロダイナミクス法によりマウス (約 28g) に圧縮プラスミド DNA (5µg/1.6ml 生理食塩水) を投与し、12, 24, 48 時間後の肝臓でのルシフェラーゼ活性を測定した。

3. 実験結果および考察

3.1 圧縮プラスミド DNA のサイズ・形態

Fig2 には、種々の圧力にて 5 分間の高圧印加を施したプラ

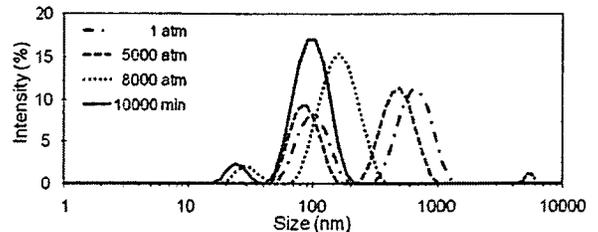


Fig.2. DLS measurement of the pressurized pT7-luc at various atmospheres and 40 °C for 5 min.

ズミド DNA の DLS 測定結果を示す。未処理のプラスミド DNA では、スーパーコイルと環状のプラスミド DNA が約 100 nm, 600 nm にて検出された。印加圧力の上昇に伴いそれぞれのサイズが減少し、10,000 気圧において約 25 nm と 100 nm にて検出された。これまで、環状プラスミド DNA への高压印加によるスーパーコイル形成が報告されていることから[1]、高压印加後の約 100 nm プラスミド DNA はスーパーコイル型と考えられ、約 25nm のプラスミド DNA はスーパーコイルの凝縮体と考えられる。AFM 観察では、高压印加処理した場合に球形のプラスミド DNA が観察された。以上の結果から、高压印加によりプラスミド DNA が凝縮されることが明らかとなった。

3.1 圧縮プラスミド DNA の in vivo 遺伝子導入

未処理プラスミド DNA では、投与 12 時間後に最大の遺伝子発現を示し、その後は経時的に著しい低下を示した。一方、圧縮プラスミド DNA では、投与 12 時間後は未処理プラスミド DNA より遺伝子発現は低かったが、投与 24 時間後は未処理プラスミド DNA と同程度の発現を示し、さらに、投与 48 時間後においても高い遺伝子発現を示していた。これは、高压処理により凝縮されたプラスミド DNA が巻き戻ったためと考えられ、DNA の構造制御による遺伝子発現制御の可能性を示唆し、新しい知見と考えられる。

参考文献

1. a) J. Q. Wu, R. B. Macgregor, Jr, Biochemistry, 32, (1993), 12531. b) G. Q. Tang, N. Tanaka, S. Kunugi, Biochim. Biophys. Acta, 1443, (1998), 364.