

超高压誘起 PVA ハイドロゲルの調製と物性に関する研究

日大院理工 ○三浦義之・栗田公夫、東医歯大生材研 木村剛、
 岡山大環境理工 六雄伸吾・吉澤秀和、国立循環器センター 藤里俊哉、
 物材機構 小林尚俊、東医歯大生材研 岸田晶夫

<緒言>

超高压条件下では、疎水性相互作用が弱まり、水素結合が強調されることが報告されている。我々はこの点に着目し、水酸基を有する水素結合性分子への圧力印加による水素結合を介する構造体の創出について検討している。これまで、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリエチレングリコール(PEG)、アガロース、デキストランを用いて、それらの種々の条件下での静水圧処理を施した結果、PVA にてハイドロゲルが得られた。本研究では、PVA ハイドロゲルの作製および物性について詳細に報告する。

<実験>

PVA(重合度:1700, 鹸化度:99.8%)の水溶液およびジメチルスルホキシド(DMSO)/水(DMSO:水=80:20)混合液を様々な濃度で調製した。種々の温度(25~40°C)・圧力(1,000~10,000 気圧)・時間(0~30 分)にて高压処理装置(Dr.CHEF;(株)神戸製鋼所)を用いて、高压処理を行った。また、PVA ハイドロゲルの一般的な作成方法である凍結融解法を用いて PVA ハイドロゲルを作製した。得られた PVA ハイドロゲルのマクロ・ミクロ観察、透過度、膨潤度、力学強度測定にて物性解析を行った。

<結果・考察>

従来から PVA 溶液 (DMSO 混合系) を凍結・融解することにより PVA ゲルが得られる。-20°Cにて2時間インキュベートし、室温にて30分間放置し、これを1サイクルとして10サイクルを繰り返して凍結融解 PVA ゲルを得た。得られた凍結融解ゲルは、透明性が高く、機械的強度にも優れていた。一方、PVA 水溶液への超高压印加処理にて得られた PVA ゲルは白色ゲルであり、DMSO 混合液では透明ゲ

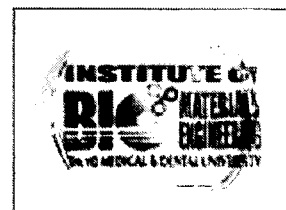
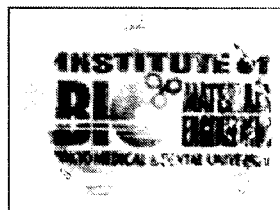


Fig1. Photos of PVA hydrogels using ultra-high pressurization or repeated freeze/thaw method. (Left)UHP method. PVA solution was treated under the UHP condition(10,000atm, 10degrees) for ten min. (Right)Repeated freeze/thaw method.

ルであった。溶媒により水素結合結晶領域のサイズ、密度が異なっていたためと考えられる。圧縮試験の結果、表面強度は凍結融解法で調製したゲルの方が強く、ゲル内部の強度は高压で調製したゲルの方が強いことが示された。さらに高压処理によるゲルは、PVA 濃度、処理温度および処理圧力に依存的にゲルの物性が異なった。凍結融解法ではコントロールが困難である様々な特性を高压処理により制御の可能性が示唆された。発表では、種々の条件による PVA ゲル形成についてさらに検討し、また、力学強度、透過性等の物性についても詳細に検討したので報告する。本研究は、厚生労働省科学研究費ならびに文部科学省研究費の補助を受けて行なわれた。

Preparation and characteristics of PVA hydrogels induced by ultra-high pressurization

Yoshiyuki MIURA¹, Kimio KURITA¹, Tsuyoshi KIMURA², Shingo MUTSUO³, Hidekazu YOSHIZAWA³, Toshiya FUJISAO⁴, Hisatoshi KOBATASHI⁵, Akio KISHIDA²(¹Nihon Univ., 1-8-14 Kanda -surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan,²Tokyo Medical and Dental Univ.,³Okayama Univ.,⁴National Cardiovascular Center Reserch Institute,⁵National Institute of Materials Science)

² TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra high pressure / hydrogel /

Abstract: In this study, the preparation and characteristics of PVA hydrogel induced by ultra-high pressurization was investigated. PVA hydrogel which has transparent was obtained by high hydrostatic pressurization at more than 8,000atm for 10min. The formation of the PVA hydrogels was depended on the pressuring temperature and the higher strength of pressurization induced the gelation of PVA. Also, PVA with higher concentration tended to form the hydrogel. It was clear that the obtained hydrogels was mediated by hydrogen bonding interaction.

高圧凝縮DNAの調製と機能解析

東医歯大生材研 ○木村剛 日大理工 堀内可奈・三浦義之・栗田公夫
 岡山大環境理工 吉澤秀和 国循セ研 藤里俊哉 東医歯大生材研 岸田晶夫

<緒言>

無機・有機化学, 医療, 食品分野などでの高圧技術の利用が進んでおり, タンパク質, 多糖への圧力効果を中心とする高圧バイオサイエンスが基礎研究として進められている. タンパク質, 多糖, 核酸などの生体高分子の構造に関する研究は, 生体反応のメカニズムを解明し, 生体機能を制御する上で重要である. DNA, RNA などの核酸は, 遺伝子情報を担う塩基配列(一次構造)とそれらの遺伝情報の保持・発現のための二次構造が重要である. 核酸の高次構造は, 温度, 圧力, pH, 塩濃度などの環境条件に影響されることが知られている. これまで, 核酸への圧力の影響として, DNA のコンホメーション変化や, 圧力依存的に RNA(リボザイム)の活性が低下することがわかっている. しかし, DNA への高圧処理における活性については検討されていない. そこで本研究では, 遺伝子導入における遺伝子発現を調節することを目的に, 圧力印加による DNA 二次構造変化およびその機能について検討した.

<実験>

試料には 1kb ラダーDNA とプラスミド DNA(pT7-Luc)を用いた. 超高圧印加装置を用いて, 温度 40°C, 圧力 3,000, 5,000, 8,000, 10,000 気圧, 印加時間 1, 5, 20 分間と異なる条件にて高圧処理を行った. 常圧に戻したときの DNA 溶液を T_m 測定, CD 測定, DLS 測定, 蛍光強度測定にて解析した. 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・翻訳により検討した.

<結果・考察>

CD 測定, T_m 測定の結果から, 超高圧印加によるラダーDNA の構造変化は示されなかった. 一方, プラスミド DNA では, CD 測定の結果から構造変化が示唆された. これは, 環状であるためラダーDNA よりコンホメーションの変化性が大きいことによると考えられる. DLS 測定により慣性半径を調べたところ, 超高圧印加による DNA サイズの減少が示された. さらに, プラスミド DNA サイズへの圧力の影響と超高圧処理時間の影響を調べた結果, 圧力の増加と圧力印加時間の延長に伴い, DNA サイズが減少することが示された. 次に, 超高圧による影響でプラスミド DNA の構造変化が示唆されたことから, DNA インターカレーターであるエチジウムブロマイド(EtBr)を用いてプラスミド DNA への圧力の影響を調べた. 圧力増加に伴う蛍光強度の減少が示された. これは, DNA にインターカレートしていた EtBr が外れたことによる蛍光強度の減少と考えられ, 高圧印加による DNA の構造変化を示す. また, インターカレートしたプラスミド DNA においてもサイズの減少が示された. 以上より, プラスミド DNA は高圧印加により凝縮すると考えられる. 部分的あるいは全体的に凝縮され, オープンサークルからスーパーコイルへの転移, さらにはよりきつく巻かれたスーパーコイルになると考えられる. これを判断するために, 原子間力顕微鏡(AFM)による視覚的な観察を検討している. 凝縮した DNA の機能について調べるため無細胞系転写・翻訳を行った結果, 圧力による転写・翻訳活性の向上が示された. 一方, 処理時間による活性への影響は示されなかった. 活性の促進は, 高圧処理により転写因子に認識されやすい構造に変化したことによると考えられる. 本研究は, 厚生労働科学研究費の補助を受けて行われた.

Preparation and characteristics of DNA molecules condensed by high pressurization

Tsuyoshi KIMURA¹, Kana HORIUCHI², Yoshiyuki MIURA², Kimio KURITA², Hidekazu YOSHIZAWA³, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA¹ (¹Tokyo Medical and Dental Univ., 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, ²Nihon Univ., ³Okayama Univ., ⁴National Cardiovascular Center Reserch Institute)

¹TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: high pressurization / DNA/transcription and translation/

Abstract: We studied structure and functions of nucleic acids treated with high pressurization. DNA (1kb ladder molecular weight maker) was pressurized at 3000, 5000, 8000, 10,000 atms and 40 degree for 1, 5, 20 min. CD and T_m analyses revealed that there was no change for the structure of ladder DNA. On the other hand, when plasmid DNA (pT7-luc) was pressurized under conditions described above, the size of plasmid DNA was decreased with increasing the strength and period of pressurization. The inhibition test of intercalating of EtBr was carried out. The intensity of EtBr was decreased with increasing the strength of pressurization, indicating that the change of stacking of plasmid DNA.

Assembling of hydrogen-bonding-polymers using high pressure technology

Tsuyoshi Kimura¹, Kwangwoo Nam¹, Tsutomu Ono², Hidekazu Yoshizawa²,
Toshiya Fujisato³, and Akio Kishida¹.

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University
Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan

Tel:+81-3-5280-8029 Fax:+81-3-5280-8028

E-mail:kimurat_fm@tmd.ac.jp

² Department of Material and Energy Science, Okayama University,

³ Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology

Introduction

Pressure technology is applied for many fields, such as inorganic, organic and food processing. Also, in life science, high pressure effects on the denaturation of proteins¹ and other bio-compounds² and thermo-sensitive synthetic polymers^{3,4}, which are used as a model of bio-molecules, have been investigated because pressure is one of intensive variables in thermodynamic as well as the concentration and temperature. It was known from high pressure-induced protein denaturing studies that hydrogen bond was strengthened under high pressure condition rather than hydrophobic and electrostatic interactions^{5,6}. From these facts, we hypothesized that assembly of hydrogen-bonding-polymers should be formed via hydrogen bond using high pressure technology. In this study, poly(vinyl alcohol) (PVA), poly(ethylene glycol) (PEG) and dextran (Dex) were used as models of hydrogen-bonding polymers and were pressurized at various conditions, pressure strength, pressuring time, temperature, in order to investigate whether polymeric assemblies are formed by high pressurization. In other word, the aim of this study is the development of assembly method of hydrogen-bonding-polymers using ultra-high pressure technology.

Results and Discussions

PVA (Mw:74800, Kuraray), PEG(Mw: 6000 and 8000, Wako), and dextran (Mw: 32000-45000, 60000-90000, 500000, Wako) were used as hydrogen-bonding-polymers. The aqueous solutions of them were prepared at different concentrations and were hydrostatically pressurized at various conditions of pressure strength and pressuring time. Although PVA solution of 0.01w/v% was still translucent through the pressurization at 10,000 atm for 10min, the formation of nano-particles having the average diameter of 200 nm was confirmed by SEM observation. The morphology of PVA assembly depended on the PVA concentration and micro-particles, gels were formed with increasing concentration through pressurization described above. These results suggest that the pressure induced PVA assembly via the intra, inter- hydrogen bonds between PVA molecules. In order to investigate the pressure effect on the assembling of PVA, the aqueous PVA solution of 5 w/v% was pressurized at various levels of pressure. The size of particles was increased with increasing of pressure when the pressurized PVA solutions were measured by DLS measurement. Also, it was found that the assembling of PVA was promoted by prolongation of the pressurizing time. From these results, it was suggested that the assembly of PVA was controlled by high pressurization.

When aqueous solutions of PEGs or Dexs at 10 w/v% concentration were hydrostatically pressurized at 10,000 atm for 10 min, they were still clear solution, of which there was no change for DLS measurement. When PEG (Mw: 6000) solution were mixed with Dex (Mw: 32000-45000 and 60000-90000) solution at volume ratio of 1 to 1 (final concentration of 5 w/v%, respectively), the solutions with light scattering were obtained, suggesting the formation of micro emulsions of them. After pressurization at 10,000 for 10 min, aqueous two-phase separation having light scattering in lower phase was obtained for both cases (Fig 1), whereas no aqueous phase separation was formed in the mixed solutions of them being previously pressurized respectively. These results suggest that the assembling of PEG and Dex, but not assembling of PEG or Dex molecule itself, was induced by the pressurization. It is considered that the assembly of PEG and Dex, whose apparent molecular weight was increased as compared to PEG and Dex molecules, was accumulated in the lower phase and gave rise to this phase separation. Also, this phenomenon was observed for the case of PEG (Mw: 8000) used. DLS measurement of them before/after pressurization was carried out. The particle size was increased by pressurization, and then decreased by heat treatment at 50 degrees, indicating the formation of novel hydrogen bonding assembly. On the other hand, for PEG-Dex 500,000 system, an aqueous two-phase system was formed with light scattering in the lower phase before the pressure treatment and then maintained during pressure processing.

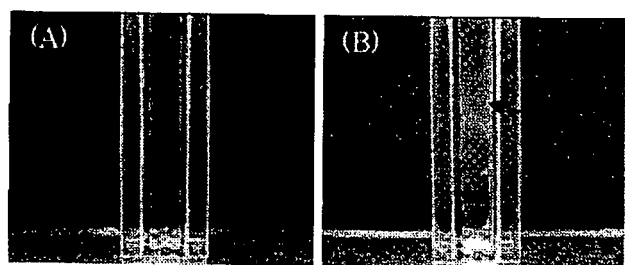


Fig1. Photographs of the mixtures of PEG(6,000) and DEX(60,000~90,000).
(A) without or (B)with ultra high pressure treatment.

References

1. Mozhaev, VV, Heremans, K, Frank, J, Masson, P, Balny, C, High pressure effects on protein structure and function, *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, 24, 81-91, 1996.
2. Banly, C, Masson, P, Heremans, K, High pressure effects on biological macromolecules: form structural changes to alteration of cellular processes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1595, 3-10, 2002.
3. Schild, HG, Poly(N-isopropylacrylamide)-experiment, theory and application, *Prog. Polym. Sci.*, 17, 163-249, 1992.
4. Akashi, M, Nakano, S, Kishida, A, Synthesis of poly(N-vinylisobutyramide) from poly(N-vinylacetamide) and its thermosensitive property, *J Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. Ed.*, 34, 301-303, 1996
5. Sawamura, S, Kitamura, K, Taniguchi, Y, Effect of pressure on the solubilities of benzene and alkylbenzene in water, *J Phys. Chem.*, 93, 4931-4935, 1989.
6. Doi, E, Shimizu, A, Kitabatake, N, Gel-sol transition of ovalbumin by high pressure, in: R, Hayashi (Ed.), *High Pressure Bioscience and Food Science*, Sanei Press, 171-177, 1993.

2-P-2

pH 応答性ナノ無機粒子を含有する水素結合性ポリマー／DNA 複合体の細胞内送達

木村 剛¹、吉澤 秀和²、古菌 勉³、藤里 俊哉³、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

我々は、細胞障害性の軽減を目指し、ナノ無機粒子を含有する水素結合性ポリマー／DNA 複合体の細胞への遺伝子送達について検討している。複合体は、エンドサイトーシスにおける pH 低下により無機粒子が溶解し、浸透圧変化によりエンドソームが崩壊することで細胞内に取り込まれると考えられる。これまで、ナノ HAp 粒子／水素結合性ポリマー／DNA 複合体の細胞内送達が認められた。本研究では、更なる細胞内送達効率の向上を目指し、種々の pH 応答性を有するナノ無機粒子を用いた複合体の細胞内導入について検討した。湿式法にて pH 応答性を有するナノ無機粒子を調製し、種々のポリマーと DNA とのハイブリット化を超高压処理により行い、ナノ無機粒子／水素結合性ポリマー／DNA 複合体を得た。蛍光ラベル化 DNA を用いた細胞内導入量測定においては、pH 応答性の高いナノ無機粒子の場合に高効率な細胞内導入が示され、pH 応答性のコントロールによる細胞内導入制御の可能性が示された。

3D11 超高压誘起ナノ高分子集合体の DDS への応用

(東医歯大・生材研) ○木村剛、(日大・理工) 三浦義之、栗田公夫、(岡山大・環境理工) 六雄伸悟、吉澤秀和 (国循セ研・再生医療) 藤里俊哉、(東医歯大・生材研) 岸田晶夫

【緒言】

近年、ファンデルワールス力、クーロン力、水素結合など比較的弱い分子間相互作用によって形成される分子集合体に関する研究が活発に行われている。その多くは、精密な分子設計に基づき合成された分子が熱、塩濃度、pH などの条件が最適化された環境において集合化される。我々は、6000 気圧以上の高圧条件下において物質の相互作用のうち水素結合が強調されることに着目し、新たな分子集合体化法として、水素結合性高分子への超高压印加処理による分子集合体の形成について検討している。本研究では、汎用的な水素結合性高分子を用いて、さまざまな高圧印加条件での高分子集合体形成に関して検討し、DDS への応用について検討した。

【実験】

水素結合性高分子としては、種々の分子量の PVA、ポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン (Dex) を用いた。各水溶液を所定の濃度に調製し、単独あるいは混合した後、高圧印加装置 (Dr.chef : (株) 神戸製鋼所) を用いて種々の圧力印加条件下にて超高压印加処理を施した。SEM 観察、DLS 測定にて高分子集合体の物性解析を行った。また、DDS への応用として、プラスミド DNA の細胞内送達について検討した。DNA と各高分子の混合溶液に超高压印加処理を施し、アガロースゲル電気泳動、DLS 測定、AFM 観察により複合体形成を確認し、複合体の培養細胞への導入について検討した。

【結果・考察】

5w/v% の PEG、Dex 水溶液に超高压印加処理を施した場合、単独溶液では分子集合体形成は確認されなかったが、PEG と Dex の混合溶液への超高压印加処理により、約 200nm の PEG/Dex 複合体が形成されることが明らかとなった。一方、PVA 溶液への超高压印加処理では、単独溶液にて PVA 集合体を得られた。得られる複合体は、PVA 濃度、圧力、印加時間により大きく異なり、低濃度、低圧力、短期間の圧力印加にてナノサイズの集合体を得られる傾向があった。上記の複合体は、尿素存在下では得られなかったことから、水素結合を介した集合体であることが示唆された。プラスミド DNA と PVA の混合溶液への超高压印加処理により、ナノサイズの PVA/DNA 複合体が得られることがアガロースゲル電気泳動、DLS 測定により明らかとなった。また、蛍光ラベル化 DNA を用いて複合体の培養細胞への導入について検討した結果、細胞内での蛍光が観察され、超高压誘起高分子集合体の DDS 担体としての応用が期待された。

【謝辞】

本研究は、厚生労働科学研究費の助成を受けて行われた。

Application of nano-polymeric assemblies induced by ultra high pressurization for DDS, Tsuyoshi KIMURA¹, Yoshiyuki MIURA², Kimio KURITA², Shingo MUTSUO³, Hidekazu Yoshizawa³, Toshiya Fujisato⁴, Akio Kishida¹. ¹ Institute of Biomaterials Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, 101-0062 Tokyo, Tel 03-5280-8029, Fax 03-5280-8028, e-mail kimurat.fm@tmd.ac.jp, ² Nihon University, ³ Okayama University, ⁴ National Cardiovascular Center Research Institute

(52) Cellular Delivery of DNA-Polymer Complex Encapsulating Inorganic Nanoparticles Prepared by Ultra High Pressurization

Kimra T., Okada M., Furuzono T., Yoshizawa H., Fujisato T., Kishida A.

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062 Japan

Dept Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita city, Oksaka, Japan

Department of Material and Energy Science, Okayama University, Okayama City, Okayama, Japan

Department of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, Asahi-ku, Osaka, Japan

We have developed gene delivery system using DNA complex with non-ionic, water soluble polymers via hydrogen bond through ultra high pressurization (UHP) because the inter-, intra-molecular weak hydrogen bonding interaction was strengthened under high pressure condition. Previously, polyvinyl alcohol (PVA) was used as a model hydrogen bonding polymer, and the PVA/DNA complexes were formed by UHP treatment. Although the PVA/DNA complexes were up-taken by cells, a little enhancement of gene expression was observed using them. Therefore, in this study, to promote the endosomal escape of transferred DNA, we performed the development of PVA/DNA complexes encapsulating inorganic particle, which are dissolved under low pH condition in endosome vesicles and then the rupture of endosome is induced by osmotic shock, using UHP technology. Plasmid DNAs encoding luciferase gene or enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene under CMV promoter were used. Nano-scaled inorganic particles having the average diameter of 50–200 nm were synthesized by modified micro-emulsion method. Nano-inorganic particles were dispersed ultrasonically in PVA solution and then mixed with DNA solution. Their mixtures were treated under 10,000 atmospheric pressures at 40°C for 10 min. By SEM observation, the irregular surface of PVA/DNA complexes including inorganic particles was observed, indicating the encapsulation of inorganic particles in PVA/DNA particle. The PVA/DNA complexes encapsulating inorganic particles showed a higher transfection activity. These results indicate the utility of the PVA/DNA complexes encapsulating inorganic particles prepared by UHP method for DNA delivery.

高圧技術を用いたプラスミドDNAの凝縮操作

東医歯大生材研 ○木村剛
 日大理工 三浦義之、栗田公夫
 岡大環境理工 小野努、吉澤秀和
 大工大工 藤里俊哉
 東医歯大生材研 岸田晶夫

【緒言】 非ウイルス遺伝子デリバリーにおいては、正電荷物質との静電的相互作用により DNA を凝縮させる手法が主流の一つである。凝縮による DNA の核酸分解酵素耐性の向上、細胞表面との効率良い相互作用により目的の細胞へと送達される。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。高圧技術は、熱力学パラメータとしての点から圧力下でのタンパク質の構造変化に関する検討がなされている [1]。クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などの種々の相互作用が複雑に介して構造形成するタンパク質は、加圧によりそれらの相互作用が変化し、構造変化すると考えられている。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 [2] 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 [3] 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 [4]、あるいは、高圧処理したプラスミド DNA の大腸菌への形質転換効率の向上 [5] などと核酸の構造/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、真核細胞への遺伝子導入への応用を目的に、高圧印加プラスミド DNA の被転写/翻訳について検討した。

【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。

Pressure-induced condensation of plasmid DNA

Tsuyoshi KIMURA¹, Yoshiyuki MIURA², Kimio KURITA², Tsutomu ONO³, Hidekazu YOSHIZAWA³, 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 Nihon University, ³ Osaka Institute of Technology)

Tel: 03-5280-8029, Fax: 03-5280-8028, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: condensation / plasmid DNA / high pressure / transfection

Abstract: We investigated the effect of pressure on topology of plasmid DNA in order to develop a novel method condensing plasmid DNA. Plasmid DNA was hydrostatically pressurized at various atmospheres for different time. After pressure removal, the obtained plasmid DNA was analyzed by DLS, CD measurements and AFM observation. The sizes of the super-coiled and relaxed forms of the plasmid DNA were decreased with increasing the strength and period of pressurization, and then detected at approximately 25 and 100 nm, respectively, by DLS measurement. This result indicates the condensation of super-coiled plasmid DNA and the super-coiling of the relaxed plasmid DNA. For AFM observation of the pressurized plasmid DNA, the spherical structure of the super-coiled plasmid DNA was observed. Also, the condensed plasmid DNA was significantly transcribed and translated in cell-free transcription/translation system.

【結果と考察】 図1には、10,000気圧、10分間の高圧印加を施したプラスミドDNAのDLS測定結果を示す。プラスミドDNAでは、約100nm、600nmのサイズのピークが検出された。それぞれ、スーパーコイルと開環状プラスミドDNAであると考えられる。一方、高圧印加処理したプラスミドDNAでは、約25nmと100nmのサイズのピークが検出された。開環状プラスミドDNAへの高圧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[3]、後者の約100nm付近のサイズピークはスーパーコイル状のプラスミドDNAと考えられ、前者はスーパーコイルの凝縮体と考えられる。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

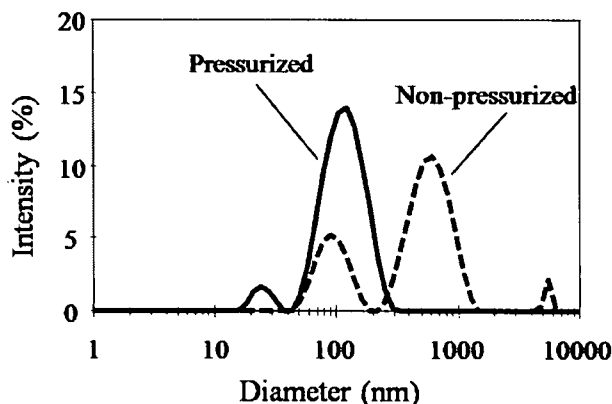


Fig1. DLS measurement of plasmid DNA with/without pressurization at 10,000 atm for 5 min.

のスーパーコイルDNAが観察され、高圧印加処理した場合に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、大気圧に戻した場合でも維持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、スーパーコイルと開環状プラスミドDNAのいずれの場合も、それら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サイズの減少が示され、これら結果は、スーパーコイルプラスミドDNA凝縮の圧力制御を示していると考えられる。これまで、圧力上昇に伴うオリゴDNAの二重鎖安定性(T_m)の上昇[6]、およびプラスミドDNA形成性の上昇が報告されている[3]。これらは、圧力印加によるDNA二重鎖のねじれの増加に起因すると考えられており、今回のスーパーコイルプラスミドDNAの場合、更なる二重鎖のねじれの増加により凝縮したと考えられる。一方の開環状プラスミドDNAの場合は、高圧印加によりスーパーコイル形成はなされるものの、ニックが入っているため更なる凝縮は困難であると考えている。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。

【謝辞】 本研究は、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

【参照論文】

1. Mozhaev, V.V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., Balny, C., (1996) *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, 24, 81-91.
2. Krzyzaniak, V.A., Salanski, P., Jurczak, J., Barciszewski, J., (1991) *FEBS Letter*, 279, 1-4.
3. Tang, G.Q., Tanaka, N., Kunugi, S. (1998) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1443, 364-368.
4. Herve, G., Tobe, S., Hems, T., Vergne, J., Maurel, M.C., (2006) *Biochimica et Biophysica Acta*, 1764, 573-577.
5. Sharma, A., Gautam, S., Fotedar, R.K., Thomas, P., Kesavan, P.C., Chidambaram, R., (1997) *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 43, 199-208.
6. Macgregor, R.B., (1996) *Biopolymers*, 38, 321-327

高静水圧誘起 PVA ゲルの特性解析

日大院理工 ○三浦義之・栗田公夫 東医歯大生材研 木村剛、
岡山大環境理工 小野努・吉澤秀和 大工大工 藤里俊哉、
東医歯大生材研 岸田晶夫

<緒言>

DMSO/水混合系中での PVA ゲルの作製においては、その過程がゲルの物性に強く影響する。室温下での静置においては、スピノーダル型相分離により誘起される不透明ゲルであり、 -20°C 以下では、PVA の結晶化が優先され透明なゲルが得られると報告されている。また、凍結 - 融解サイクルの制御により透明かつ機械的強度の優れたゲルが得られると報告されている。しかし、これらの作製法は長時間の静置、あるいは複数回の凍結 - 融解サイクルが必要であり、作製に時間を要する。一方、我々は、水素結合性が強調される高静水圧処理を PVA 水溶液に施すことでゲルが短時間で得られることをこれまでに報告している。本研究では、種々の混合比の DMSO/水溶媒系での PVA ゲルの作製および物性について詳細に検討した。

<実験>

PVA(重合度:1700, 酸化する度:99.8%)を、種々の混合比の DMSO/水混合液にて様々な濃度で溶解した。高圧処理装置(Dr.CHEF;(株)神戸製鋼所)を用いて、異なる温度・圧力・時間にて高圧処理を行った。得られた PVA ゲルのマクロ・ミクロ観察、透過度、膨潤度、力学強度測定にて物性解析を行なった。

<結果・考察>

PVA 水溶液、DMSO/水(80/20)混合液への圧力印加(10,000 気圧、 10°C 、10 分間)により、それぞれ不透明、透明な PVA ゲルが得られた(Fig1)。一方、同温度、同処理時間の放置ではゲルが得られず、圧力処理によるゲル化促進が改めて示された。高圧 PVA ゲル作製における、DMSO/水混合溶媒の混合比、温度、圧力、時間等の圧力条件の影響について詳細に検討を行なった。

まず、DMSO/水の混合比を 20/80、60/40、80/20 とし、 10°C にて 10,000 気圧、10 分間の高圧処理を施した。60/40、80/20 ではゲル形成が認められたが、20/80 ではゲル形成されなかった。次に温度の影響について 25°C 、 40°C で高圧処理したところ、 25°C では 60/40 で成形性の良いゲルが、80/20 では脆弱なゲルが形成されたが、20/80 ではゲルが形成されなかった。 40°C では、60/40 のみでゲル形成が認められた。さらに処理圧力の検討を行なったところ、60/40、80/20 ではより高圧の条件下にてゲル形成が認められたが、20/80 では 10,000 気圧の高圧下においてもゲル形成されなかった。以上の結果から、種々の DMSO/水の混合比において、高圧処理温度、圧力に依存的にゲルが形成されることが示された。発表では、種々の条件により得られた PVA ゲルの力学強度、透過性等の物性についても報告する。

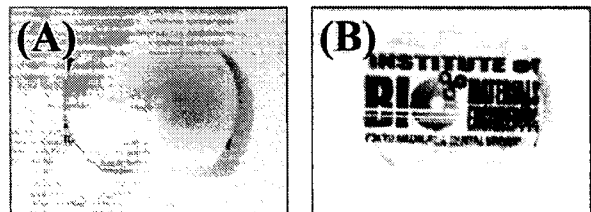


Fig1. Photos of 10%PVA gels using Ultra high pressurization(10,000atm 10degrees 10min). (A):DMSO/W(0/100), (B):(80/20).

Characteristics analysis of PVA hydrogels induced by ultra-high pressurization

Yoshiyuki MIURA¹, Kimio KURITA¹, Tsuyoshi KIMURA², Tsutomu Ono³, Hidekazu YOSHIZAWA³, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA²(¹Nihon Univ., 1-8-14 Kanda-Surugadai Chiyodaku, Tokyo 101-0062, Japan, ²Tokyo Medical and Dental Univ., ³Okayama Univ., ⁴Osaka Institute of Technology)

² TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra high pressure treatment /hydrogel

Abstract: We investigated the effect of pressurizing condition, such as pressurizing strength, time and temperature, on the hydrostatic pressure-induced PVA gels in the mixture of DMSO and water at various ratios of them. When aqueous PVA solution was pressurized at 10,000atm and 10°C for 10 min, the opaque PVA gel was obtained, whereas the transparent PVA gel was formed in mixtures of DMSO and water (80/20) by the pressurization under the condition described above. The gelation was strongly dependent on the mixing ratio of DMSO and water, pressurizing strength and temperature, and then the gel having good formability was obtained under pressure condition of higher pressure and lower temperature.

細胞への遺伝子送達における高圧技術応用 Application of high pressure for gene delivering into cells

○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. 大阪工業大学工学部

○Tsuyoshi Kimura¹, Kwangwoo Nam¹, Tsutomu Ono², Hidekazu Yoshizawa², Tsutomu Furuzono³, Toshiya Fujisato⁴ and Akio Kishida¹

1. Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental Univ. 2. Department of Environmental Science, Okayama Univ, 3. Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 4. Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology

(5~10mm あける)

1. 緒言

細胞への外来遺伝子導入による細胞の機能制御法がある。遺伝子導入法としては、正電荷物質との静電的相互作用により DNA を約数千分の 1 程度に凝縮した複合体を形成させ、目的の細胞に導入する方法が主流である。得られた複合体は、核酸分解酵素に対する耐性を有し、培養細胞への比較的高い導入効率を示す。しかしながら、正電荷に由来する細胞傷害性と強い DNA 凝縮による細胞内での転写・翻訳阻害が問題となる。そこで本研究では、細胞毒性の低減および被転写・翻訳活性の向上を目的に、水素結合を介する複合体の調製について高圧技術を応用し、細胞への遺伝子導入を検討した。また、DNA への高圧印加による凝縮についても検討した。

2. 実験

水素結合を介する複合体の調製には、水素結合性高分子であるポリビニルアルコール (PVA)、デキストラン (Dex)、ポリエチレングリコール (PEG) を用いた。DNA としては、蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだプラスミド DNA (pEGFP)、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだプラスミド DNA (pT7-Luc) を用いた。水素結合性高分子と DNA との混合液を 10000 気圧の高圧印加を施した。走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察、アガロースゲル電気泳動により複合体の形成を確認した。蛍光ラベル化 DNA を用い、複合体の細胞内導入および発現を評価した。DNA への高圧印加による凝縮は、動的光散乱法 (DLS) により検討した。

3. 結果と考察

水素結合性高分子を異なる濃度で調製した。DNA 溶液と混合し、超高压処理 (10000 気圧、10 分間) を施した。PVA を用いた場合、濃度の上昇に伴い透明溶液、白濁溶液、ゲル化と溶液のマクロ変化が観察された。透明溶液では約 200nm のナノ粒子が、白濁溶液では約 1 μm の微粒子が SEM により観察された。また Dex および PEG の場合は、若干の粘性の上昇が認められたものの透明溶液のままであった。DNA との複合体の形成について、アガロースゲル電気泳動により確認した。いずれの水素結合性高分子においても、超高压処理した場合のみスメアーなバンドが見られ、複合体が形成されていることが明らかとなった (Fig2)。水素結合阻害剤である尿素の存在下では複合体が形成されず、水素結合を介した複合体であることが示された。熱融解測定では、DNA および PVA と DNA の混合液の超高压未処理の場合、融解温度の変化は認められなかった (約 57°C) が、DNA の超高压処理した場合は融解温度が上昇した (約 62°C)。また、DNA/PVA 複合体では、40~50°C 付近のブロードな変化と約 54°C のシャープな変化が観察され、54°C 付近で DNA 二重らせんの解離が起こっている

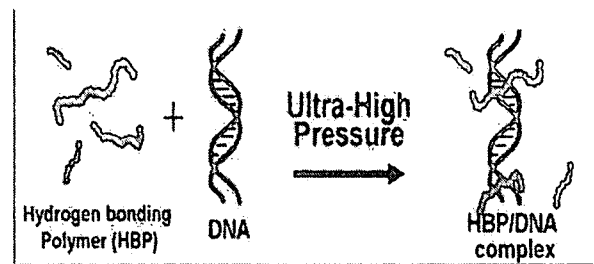


Fig1. Hydrogen bonding polymer/DNA complex via hydrogen bond by ultra-high pressure.

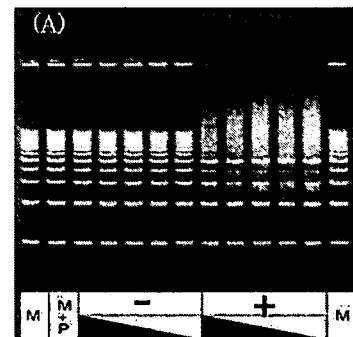


Fig1. Agarose gel electrophoresis of DNA mixtures with PVA treated with ultra-high pressure.

と考えられ、40~50°Cにかけての融解温度は複合体の解離であると考えている。核酸分解酵素耐性試験では、複合体の十分な分解耐性が示され、また、無細胞系転写・翻訳試験では、核酸分解酵素存在下で長期間インキュベートした後でも十分な転写・翻訳活性が示された。これらより、長期間の遺伝子導入の可能性が示唆された。さらに、蛍光ラベル化 DNA を用いた細胞への導入試験では、細胞内にて十分な蛍光が認められたことから、PVA/DNA 複合体の細胞内導入が示された。発表では、高圧凝縮 DNA についても詳細に報告する。

4. 謝辞

本研究は、厚生労働省科学研究費、文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

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に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

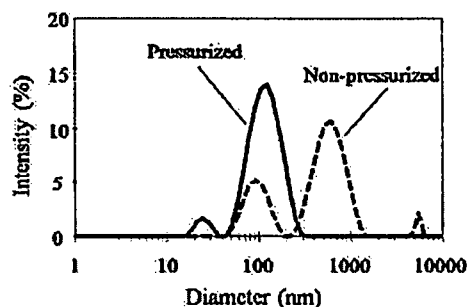


Fig. DLS measurement of plasmid DNA with/without pressurization at 10,000 atm for 5 min.

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.chief, 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。

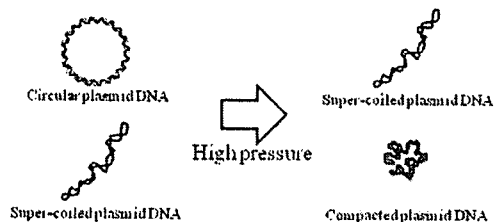


Fig.1. Compaction of plasmid DNA using high pressurization

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

ハイドロダイナミッ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 分間の高压印加を施したプラ

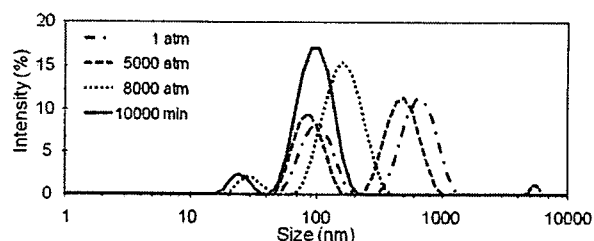


Fig.2. DLS measurement of the pressurized pT7-luc at various atmospheres and 40 °C for 5 min.

スミド 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 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.