

審査の結果の要旨

氏名 李 艶敏

DNA 凝縮として知られる体積転移は、ゲノム DNA のパッケージングの基本原理であることから生物学、化学、物理など各方面からのアプローチがなされている。特に、環状・超らせん構造を特徴とするプラスミド DNA (pDNA) の凝縮は、ゲノムのステム構造を理解するモデルとして、また近年では遺伝子治療のためのデリバリーシステムとして医療応用の観点から注目度を増している。本研究は、親水性連鎖-正電荷連鎖からなるブロック共重合体を用い、高分子ミセルとして一分子 pDNA 凝縮を取り出すという方法論を基盤に、塩濃度によって DNA とブロック共重合体との相互作用を調節することで、pDNA の凝縮構造を制御することを狙いとしている。さらに得られた構造体の遺伝子キャリアとしての有用性を検証している。以下、各章毎に本論文の審査結果の概要を述べる。

第1章では、これまでの DNA 凝縮研究の進展を概説し、凝縮構造として球状、ロッド状、トロイド状が観察されること、それらは常に共存した構造多形として観察されること、凝集体の併発が各構造の詳細な解析を阻んでいることを指摘している。これに対し、ポリエチレングリコール (PEG) と正電荷を有する連鎖とからなるブロック共重合体を用い、塩 (塩化ナトリウム) によってブロック共重合体と pDNA との相互作用を調節することによって、単分子かつ単一の凝縮構造体を選択的に形成させようとする本研究のねらいを述べている。さらに、この高分子ミセルの遺伝子キャリアとしての特性を説明するとともに、pDNA 凝縮構造制御の意義を述べ、本研究の目的を説明している。

第2章では、塩存在下でブロック共重合体と pDNA を混合させて得られる構造体の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察結果を示している。そのなかで、塩非存在下ではロッド状が単独で得られること、塩濃度が上昇するにつれロッド状からトロイド状へのシフトが観察され、600mM ではトロイド状が単独に調製されること、700mM 以上ではトロイド状の存在率が減少し、ひも状と呼ぶべき構造体が顕在化すること、そして 2000 mM では会合体自体が形成されないことを明らかにし、特定の塩濃度下で凝縮を誘起させることでロッド状構造とトロイド状構造を独立に得ることに成功したことを述べている。

第3章では、塩の効果と構造形成機構を考察している。pDNA の電気泳動移動度に対する塩濃度の効果、pDNA に対するブロック共重合体の結合数の定量、エチジウムブロマイドを用いた DNA 凝縮度の評価を通じ、塩濃度 600-700mM を境界に構造形成の駆動力が異なることを提案し、構造形成プロセスを論じている。具体的には、0~600 mM では、静電相互作用を基に会合し、対イオン放出によるエントロピー利得を主な

駆動力として構造形成されるのに対し、700mM以上の高塩濃度下ではその駆動力は限られると考察している。

第4章では、ロッド状構造とトロイド状構造を動力学と熱力学の観点から検証している。これらの構造形成にかかる時間を、円偏光二色性（CD）の変化および多分子間凝集形成を介して見積もり、ロッド状構造がトロイド状構造より速く形成されることを見出している。また、形成された構造間の転移の有無を塩濃度の変化から検証し、熱力学的安定性を議論している。具体的には、塩濃度0mMで得られたロッド状構造は塩濃度を上げていくことでトロイド状、ひも状への構造変化が見られるのに対し、600mMで得たトロイド状構造は塩濃度を低下させても構造変化しないこと、1500mMで得られるひも状構造は塩濃度を低下させても構造変化しないことを確認し、熱力学的安定性として、ひも状>トロイド状>ロッド状であることを提案している。

第5章では、第4章で見出した塩濃度を徐々に変更する手法によって、塩濃度0mMおよび600mMにおいてそれぞれ調製したロッド状構造およびトロイド状構造を、生体塩濃度である150mMにおいてそれぞれ独立して得られることを示し、構造と生理活性との直接比較を可能としたことを述べている。これを基に、ロッド状構造と比較し、トロイド状構造は転写効率が高いことを試験管内での実験から見出すとともに、マウスに対する遺伝子導入においても高い遺伝子発現が得られることを見出し、トロイド型遺伝子キャリアとしての有用性を提案している。

第6章では、トロイド状構造にジスルフィド架橋を導入し、安定化させることによって培養細胞への遺伝子発現効率が向上することを示し、トロイド状構造の遺伝子キャリアとしての拡張性を提唱している。

第7章は総括として、一連の結果を整理するとともに、pDNA凝縮構造制御の意義と、トロイド型遺伝子キャリアとしての医用応用と展望を述べている。また、トロイド状構造を銀化させることに成功したことも述べており、ナノシルバーリングとして光電子材料への応用の可能性も提案しつつ、本論文をまとめている。

以上、本論文では塩濃度によって、pDNAの凝縮構造がロッド状、トロイド状、ひも状と変化することを見出すとともに、pDNA単分子からなるロッド状およびトロイド状構造を単独に得ることに初めて成功している。さらに、トロイド状構造に高い転写活性を見出すとともに、その効果を動物実験によって実証し、新規な遺伝子キャリアとして提案している。本研究の成果は、pDNA凝縮構造制御の方法論を提示するとともに、凝縮メカニズムの理解を大きく前進させるのみならず、トロイド型遺伝子キャリアとして新たなコンセプトを提案するもので、バイオマテリアルの基礎、応用両面において高い水準にあることから、バイオエンジニアリング領域の進展に資するものと判断される。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。