

Title	細胞内観察のためのローダミンラベル化ポリロタキサンの合成
Author(s)	季, 恵柱
Citation	
Issue Date	2009-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10119/8027">http://hdl.handle.net/10119/8027</a>
Rights	
Description	Supervisor: 由井 伸彦, マテリアルサイエンス研究科, 修士

## 細胞内観察のためのローダミンラベル化ポリロタキサンの合成

李惠柱

### [要点]

蛍光ラベル化は、様々な生きた細胞内イベントを解明するための有効な手段である。本研究では、生分解性人工遺伝子キャリアによるpDNAの送達プロセスにおけるキャリアの分解に関する位置的時間的情報を明らかにすることを目的とする。したがって、ここでは生分解性キャリアを蛍光ラベル化する。これまでに、pDNAをラベル化した系では、ポリプレックスが凝縮された状態のまま核内に送達され、局在化していることが報告されている。また、送達されたpDNAの発現能とキャリアからのリリース能の間には、重要な相関があることが提唱されている。

当研究室で利用してきた生分解性人工遺伝子キャリアは、環状分子の空洞部に線状高分子を貫通させ、環状分子の脱離を防止するため線状分子両末端に嵩高い置換基を導入した構造を有する。このキャリアは、SS結合の切断を引金として超分子構造の崩壊が誘起され、pDNAをリリースできるよう設計されている。この末端部位を蛍光分子に置き換えることにより、SS結合の切断に伴い、それまで局在化していた複合体中の色素が拡散することにより、切断の時間・位置を明らかにすることができるのではないかと考えた。得られたポリロタキサンの構造は、NMR、GPCによりキャラクタライズされた。

### [諸言]

成功的な遺伝子送達は効果的な遺伝子ベクターを開発することで決まる。これまでに、ウイルスによる遺伝子を送達する方法が報告されているが、その取り扱いやウイルス自身が持つ本質的な安全性の問題が指摘されている。一方、それに代わる方法として、人工的に合成された遺伝子キャリア(非ウイルス性キャリア)による送達が研究されて来た。非ウイルス性キャリアはウイルス性キャリアに比べて安全な効果を期待することができるし、少ない費用で多くの量を生産することができるし、パッキング可変遺伝子の大きさが制限されないという長所がある。しかし、非ウイ

ルス性キャリアはウイルス性キャリアに比べ遺伝子発現効率が高いという問題点がある。そして、非ウイルス性キャリアの核内移行後においても明らかにされていない様々な問題があり、安全かつ効率的な遺伝子送達を実現するためには、非ウイルス性キャリアの細胞内部の移行についてあるメカニズムを明らかにすることが必要となる。その中原島たちは非ウイルス性キャリアの核の中でDNAとキャリアのリリースが遺伝子発現効率に影響を及ぼすことを報告した。[1]。

当研究室では、ポリロタキサン<sup>1</sup>の構造的特徴を利用したキャリア設計を行ってきた(DMAE-SS-PRX)。これまでにSS結合を導入したポリロタキサンはそれが無いもの<sup>2</sup>に比べ、発現活性が100倍以上高く、細胞毒性が軽減されたことも確かめられた[2]。しかし、ポリロタキサン<sup>1</sup>のSS結合の切断が細胞内のいつ、どこで起きているのかについては明らかになっていない。

本研究では、ポリロタキサン<sup>1</sup>を可視化することにより、SS結合がいつ、どこで切るかを明らかにすることを目的とした。具体的には、ポリロタキサン<sup>1</sup>の末端部位に蛍光色素(ローダミン)を導入し、SS結合切断を明らかにしようとするものだ(図1)。

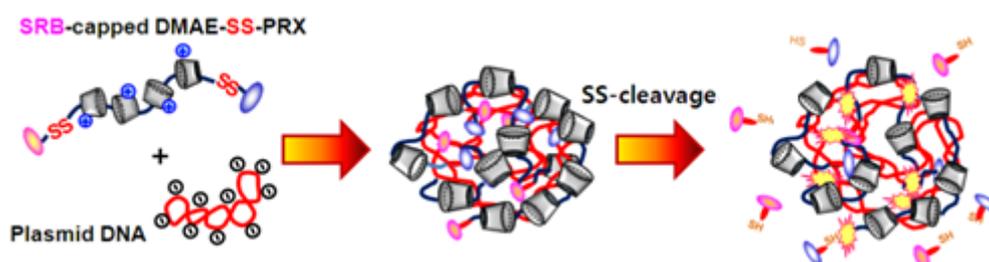
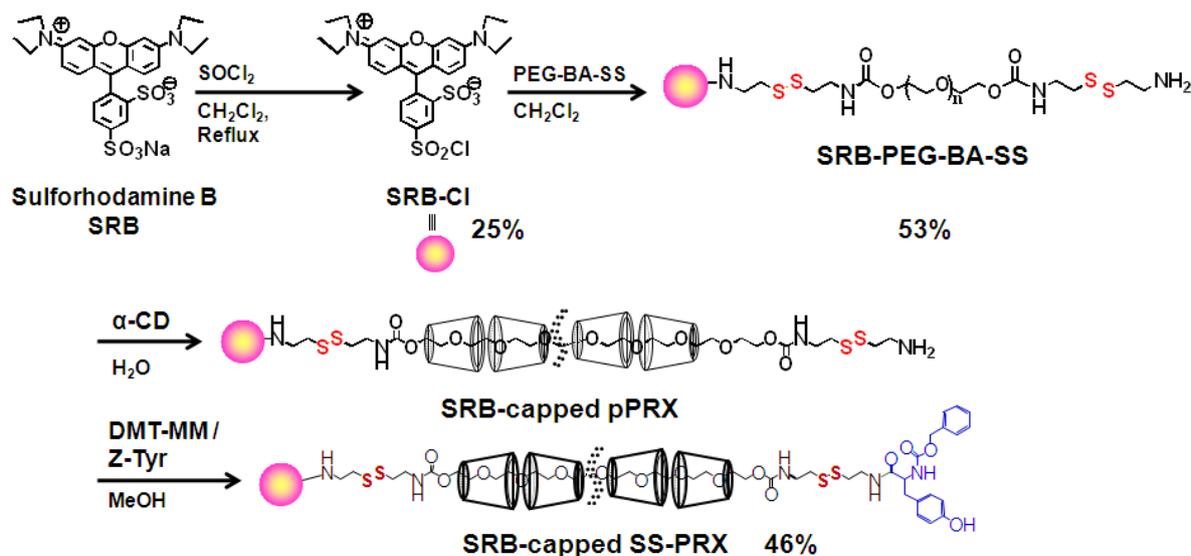


図1 ローダミンラベル化ポリロタキサンによるSS結合に切断のイメージ

## [実験結果]

この研究で目指しているロタキサンキャリアは片末端部位がローダミンという蛍光色素でラベル化されキャリアの可視化ができるように設計された。スキーム1にSRB-capped SS-PRXの合成を示す。市販のスルポロダミンB(SRB)と塩化チオニルを利用してジクロロ中でDMFを加して、スルホン酸塩化物を合成する。そして線状高分子にポリエチレングルリコル(PEG  $M_w$ ; 4,000)の両末端水酸基とCDI( $N,N'$ -カルボニルジイミダゾール)により、イミダゾールカルボキシレートと変換後、還元させたシスタミンと反応させることでSS結合導入両末端化ポリエチレングルコール (PEG-SS-B

A)にスルホン酸塩化物と反応させて PEG鎖の片末端にSRBを連結した。これを $\alpha$ -CD飽和水溶液中で攪拌することにより擬ポリロタキサンを調製した後、擬ポリロタキサンの片末端のアミノ基とZ-(L)-チロシンのカルボキシル基を縮合剤DMT-MMを用いてメタノール中で縮合させることでSRB-capped SS-PRXを得た。これらのポリロタキサンの合成および精製は、 $^1\text{H}$  NMRおよびGPCにより確認した。



スキーム 1 SRB-capped SS-PRXの合成

図 2 にSRB-ClとSRB-PEG-BA-SSの重クロロホルム中で測定した $^1\text{H}$  NMRを示す。 $^1\text{H}$  NMRより、すべてのピークが帰属され、またはMALDI-TOFマスペクトルにより目的物の分子量を示すピークが検出され、SRB-ClとSRB-PEG-BA-SSの合成を確認した。

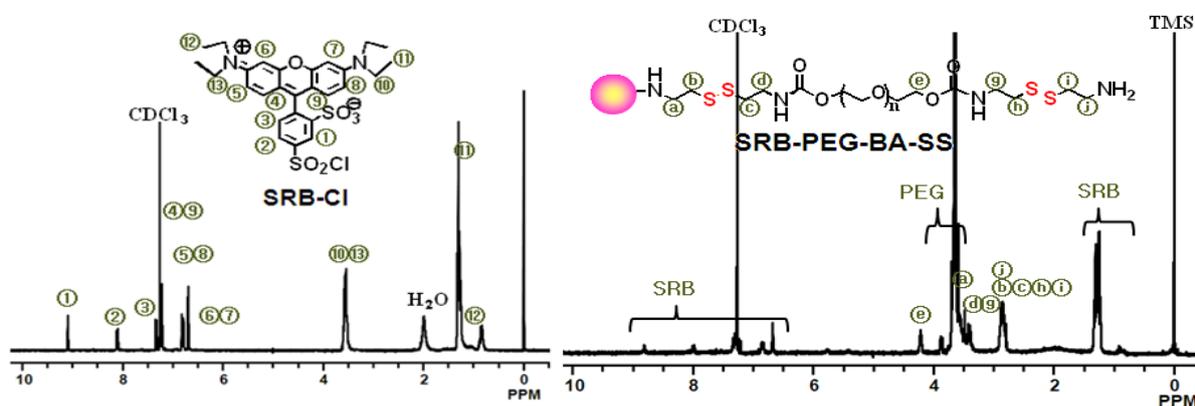


図 2 SRB-Clと(左)SRB-PEG-BA-SS(右)の $^1\text{H}$  NMR

SRB-capped SS-PRXの貫通数は $^1\text{H}$  NMRの $\alpha$ -CD 1位のプロトンとPEGの $\text{CH}_2$ のプロトンの積分値を比較することにより算出し、その結果貫通数は11であった（図3）。図3にSRB-capped SS-PRXのDMSOで溶出したGPCと1 wt% NaOD/ $\text{D}_2\text{O}$ 中で測定した $^1\text{H}$  NMRを示す。GPC測定の結果、50分付近に見られる $\alpha$ -CDや未反応のキャポ剤は見られず、高分子領域のみピークが見られ精製を確認した。

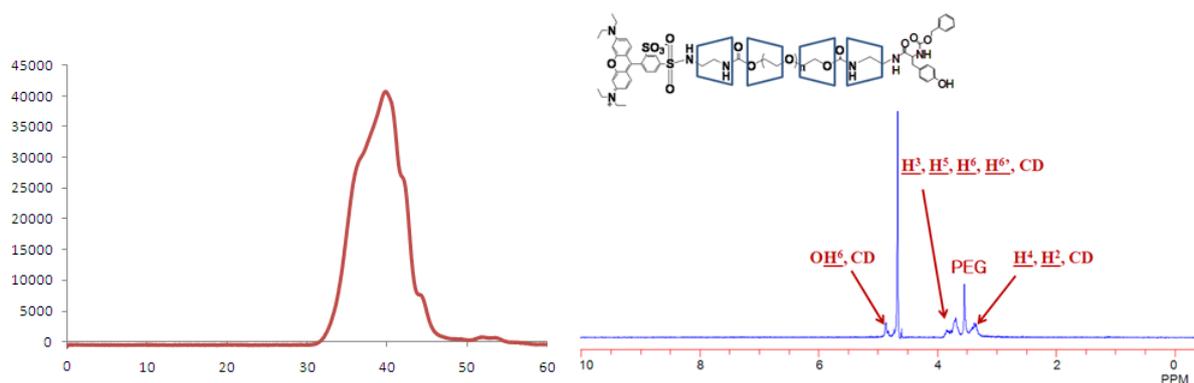


図3 SRB-capped SS-PRXのGPC(左)と $^1\text{H}$  NMR(右)

#### 参考文献

- [1] Hama, S.; Akita, H.; Ito, R.; Mizuguchi, H.; Hayakawa, T.; Harashima, H. *Mol. Ther.* **2006**, *13*, 786-794.
- [2] T. Ooya, H. S. Choi, A. Yamashita, N. Yui, Y. Sugaya, A. Kano, A. Maruyama, H. Akita, Rie Ito, K. Kogure, H. Harashima, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3852-3853.
- [3] 神田大三, 北陸先端大学院大学博士前期課程修士論文, 2007
- [4] 堀内淳平, 北陸先端大学院大学博士前期課程修士論文, 2008