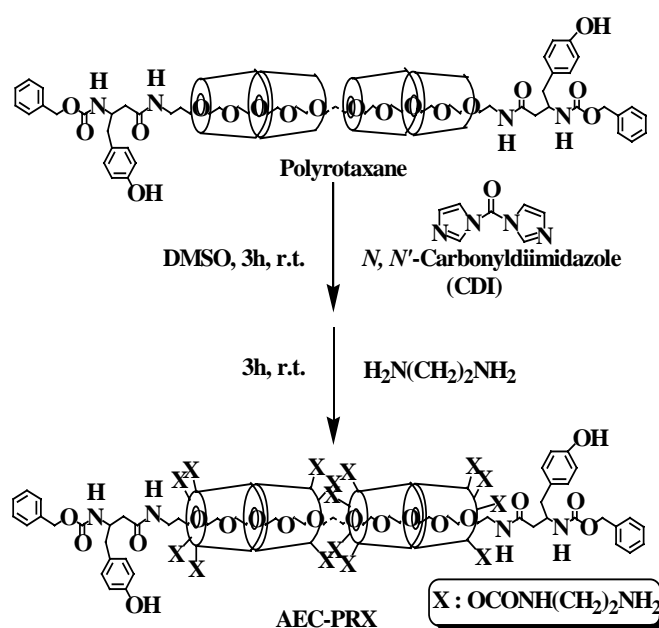


Title	DNAポリイオンコンプレックス形成におけるポリロタキサン構造因子の影響
Author(s)	渡辺, 延由
Citation	
Issue Date	2003-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	none
URL	http://hdl.handle.net/10119/3016
Rights	
Description	Supervisor: 由井 伸彦, 材料科学研究科, 修士

【緒言】 ポリリンやポリイミンなどのカチオン性高分子は、DNA とポリオンコンプレックス形成して細胞内へ DNA を取り組むことが可能である。これまでに、これら高分子の化学修飾によってポリオンコンプレックスの荷電状態や溶解性を変化させ、細胞内取り込み能を向上させる方法が盛んに行われてきた。細胞内に取り込まれたコンプレックスはエンドソーム内にて解離できるが、遊離 DNA がエンドソーム内に存在したままなので、ポリオンコンプレックス形成以外にエンドソーム膜を崩壊するカチオン性高分子の設計が必要となる。そこで、生分解性ポリロタキサンの超分子構造に着目した。このポリロタキサンは、多数の α -シクロデキストリン(α -CD)空洞部を貫通したポリエチレングリコール(PEG)の両末端に生分解性基を導入してあり、酵素分解により多数の α -CDは空洞部が露出される。この CD 空洞部は、細胞膜を構成しているリン脂質を包接するためエンドソームを崩壊して遊離 DNA のエンドソーム内酵素分解を回避できるものと期待される。本研究では、ポリロタキサン中の多数の α -CD 水酸基にアミノ基を化学修飾したアミノ化ポリロタキサンの合成法を確立し、ポリロタキサン構造因子である PEG 分子量、アミノ基導入量及び α -CD 貫通数が DNA とのコンプレックス形成に及ぼす影響について検討した。

【実験】 α -CD 飽和水溶液に両末端基をアミノ化した PEG(PEG-BA)水溶液を滴下して包接錯体(擬ポリロタキサン)を室温にて調製した。ここで、PEG-BA の分子量は 4,000 と 35,000 を用いた。その後、擬ポリロタキサン中の α -CD の脱離を防ぐため、Z-L-チロシンで両末端を縮合反応によりキャップした。さらにエチレンジアミンを用いて、多数のアミノ基(アミノエチルカルバモイル基)を有するアミノエチルカルバモイルポリロタキサン(AEC-PRX)を合成した (Scheme 1)。このとき、CDI の仕込み量を種々変化させて、1 分子中のアミノ基数が異なるポリロタキサンを複数合成した。AEC-PRX と DNA とのポリオンコンプレックス形成の確認は、プラスミド DNA (pGL3) のリン酸基のチャージに対し、AEC-PRX のアミノ基のチャージ(N/P 比)を種々変化させて、アガロース電気泳動で観察した。また、DNA との結合性を評価するために EtBr Fluorescence Assay を行った。



Scheme 1 Synthesis of AEC-PRX.

【結果と考察】 反応後の回収物の¹H-NMRから α -CD、PEG及びアミノエチルカルバモイル基に由来するピークを確認した。さらに、GPC測定、ニンヒドリン反応によるアミノ基の定量からAEC-PRXであることを確認した。電気泳動の結果から、ポリロタキサン中のPEGの分子量4,000の時、N/P比が2以上で複合体を形成したが、35,000では0.5以上であった。このことからPEGの分子量は、ポリオンコンプレックス形成の強さに及ぼす一つの因子であると考えられた。PEG分子量の影響は、EtBr Fluorescence Assayの結果からも裏づけられており、分子量が大きいほうが密なポリオンコンプレックスを形成したことを示していた。さらにポリロタキサン1分子中のアミノ基数の増加に伴い、EtBrの蛍光強度の低下が著しくなる傾向にあったので、アミノ基密度の増加が安定なコンプレックス形成に必要であると示唆された。しかしながら、同程度のアミノ基導入数であるにもかかわらず、 α -CD貫通数を少なくすると、コンプレックス形成が強くなったことから(結果省略)、ポリロタキサン中の α -CDの運動性もコンプレックス形成に重要な因子であることが示唆された。以上の結果から、ポリロタキサン構造因子であるPEGの分子量、アミノ基導入量を増加させ、さらにポリロタキサン中の α -CDの運動性を持たせた設計が安定なポリオンコンプレックス形成に有効であると結論した。

Keywords ポリオンコンプレックス、ポリロタキサン、アミノ基