

研究課題別評価

1. 研究課題名 核酸・多糖複合体における分子認識メカニズムの研究と遺伝子工学への応用

2. 研究者氏名 櫻井 和朗

3. 研究の狙い：

我々が始めて発見した核酸と天然多糖 1-3 グルカン複合体に関して、その基礎的性質と構造を明らかにして、複合体形成の機構を探ると共に、機能的オリゴ核酸のデリバリーシステムへの応用を目指した。

4. 研究結果：
複合体の構造

1-3 グルカンの 1 種であるカードランとホモ核酸 poly(C)との複合体について、分子動力学と MOPAC を組み合わせて、最安定な状態を計算したところ、図 1 に示すように、糖鎖 2 本と核酸鎖 1 本からなる 3 重らせん構造をとっていることが示された。このような複合体の棒状形態は、SEM や AFM から確認された。また、WAXS から塩基が分子軸に垂直な方向にスタッキングしていることが判明した。

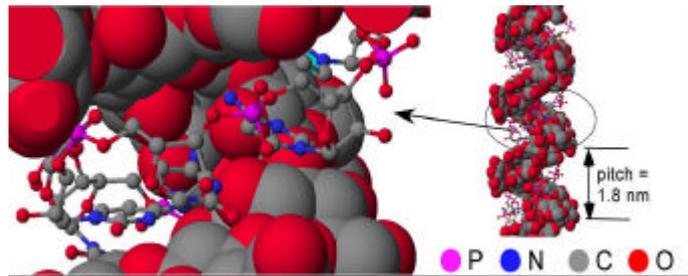


図 1 MOPAC で得られた poly(C)/SPG 複合体の構造。糖は CPK、核酸は棒モデルで示してある。

複合体の基礎物性

poly(C) や poly(dA) との複合体に関して検討したところ、DNA の 2 重らせんと類似した協同的な解離現象、核酸選択性などの興味深い現象が観測された。とくに、poly(U) との複合体では、カチオン種選択的に複合体が形成され、且つ、クリプタンドでカチオンの濃度を変化させると、それに伴い複合体の形成のオン・オフができた。

機能的オリゴ核酸のデリバリーシステムへの応用

1-3 グルカンの 1 種であるシゾフィランの側鎖を選択的に化学修飾して機能性の官能基を導入する方法を確立した。このようにして得られたオリゴペプチド修飾シゾフィランを用いてアンチセンス DNA や免疫刺激性 CpG モチーフの細胞導入を試みた。複合体は血漿タンパク質とオリゴ核酸との非特異的結合や DNase による核酸の分解を防ぎながら、核酸を細胞膜近傍に輸送し、修飾したオリゴペプチドでエンドサイトーシスを誘発して、核酸の細胞内取り込みを増幅できることが判明した。この結果、選択的に mRNA の発現の抑制が行われたり、サイトカインが効果的に誘発されることが分かった。

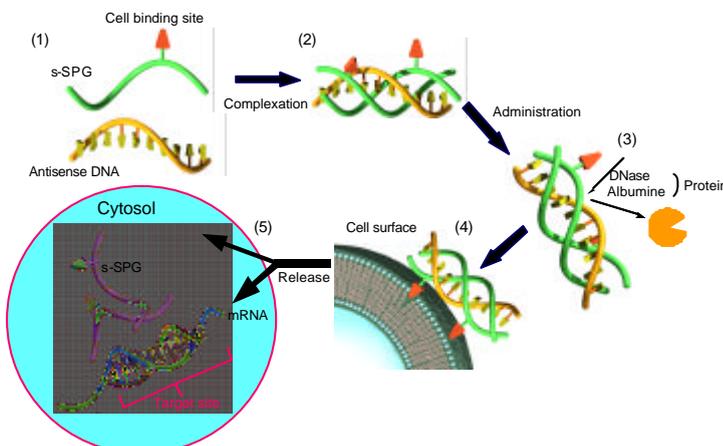


図 2 化学修飾したシゾフィランを用いた機能オリゴ DNA のデリバリーシステムの概念図。図はアンチセンス鎖の輸送であるが、ターゲット細胞を抗原提示細胞として、核酸を CpG モチーフにすると、サイトカインは誘発される。

5. 自己評価 :

さきがけの3年間で、複合体の基礎物性の解明から応用展開までを行うことができた。本研究を通じて、アンチセンス等の機能性核酸のデリバリーの分野で新しい方法論を提案できたと信じる。これは、基本的な構造と物性の関係を明らかにした上で始めて可能となったと考える。1-3 グルカンは漢方薬の成分として免疫系を活性化することが古くから知られているが、その分子論的メカニズムは明らかになっていない。今後はその神秘的な性質の解明にも挑戦していきたい。

6. 研究総括の見解 :

多糖と核酸の複合体を用いて核酸を細胞に取り込むシステムを実現した。核酸デリバリーの新しい方法として応用展開を期待したい。また、計算機を用いて、複合体の相互作用と構造を解明しており、このグルカンの機能解明と応用開発についてさらなる研究を期待する。

7. 主な論文等 :

1. M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, K. Sakurai, S. Shinkai, *Polym. J.*, 35, 714-720 (2003) "Polysaccharide-polynucleotide complexes Part 17. Solvent effects on conformational-transition of polydeoxyadenylic acid in the complex with schizophyllan"
2. A. H. Bae, S. W. Lee, M. Ikeda, M. Sano, S. Shinkai, K. Sakurai, *Carbohydr. Res.*, in press. "Rod-like architecture and helicity of the poly(C)/schizophyllan complex as observed by AFM and SEM"
3. M. Mizu, K. Koumoto, T. Kimura, K. Sakurai, S. Shinkai, *Biomaterials*, in press. "Protection of polynucleotides against nuclease-mediated hydrolysis by complexation with schizophyllan"
4. K. Sakurai, R. Iguchi, M. Mizu, K. Koumoto, S. Shinkai, *Bioorg. Chem.*, 31, 216-226 (2003). "Polysaccharide-Polynucleotide Complexes Part 7. Hydrogen-ion and Salt Concentration Dependence of Complexation between Schizophyllan and Single-Stranded Homo RNAs"
5. K. Sakurai, R. Iguchi, K. Koumoto, T. Kimura, M. Mizu, Y. Hisaeda, S. Shinkai, *Biopolymers*, 65, 1-9 (2002). "Polysaccharide-polynucleotide Complexes Part 8. Cation Induced Complex Formation between Polyuridylic Acid and Schizophyllan"
6. K. Sakurai, M. Mizu, S. Shinkai, *Biomacromolecules*, 2, 641-650 (2001). "Complementary polynucleotide mimetic behavior of a Natural polysaccharide: Schizophyllan in the Macromolecular Complex with a Single stranded RNA: Poly(C)"
7. M. Mizu, T. Kimura, K. Koumoto, K. Sakurai, S. Shinkai, *Chem. Commun.*, 2001, 429-430. "Thermally induced conformational-transition of polydeoxyadenosine in the complex with schizophyllan and the base-length dependence of its stability"
8. K. Koumoto, T. Kimura, M. Mizu, K. Sakurai, S. Shinkai, *Chem. Commun.*, 2001, 1962-1963. "Chemical modification of schizophyllan by introduction of a cationic charge into the side chain which enhances the thermal stability of schizophyllan / poly(C) complexes"
9. K. Sakurai, S. Shinkai, *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 4520-4521 (2000). "Molecular recognition of Adenine, Cytosine, and Uracil in a Single-Stranded RNA by a Natural polysaccharide: Schizophyllan"

解説

1. 櫻井和朗, 新海征治 多糖・核酸からなる3重らせんの発見とその応用, *高分子*, 51 (8), 603-606 (2002)

特許

1. 「多糖を利用する遺伝子キャリアーとその製造方法」(PCT 国際出願)