

D209 DOTAP リポソームによる *in vitro* GFP 遺伝子発現抑制に対する酸化ストレスの影響

(大阪大院・基礎工) (正)馬越 大*・○(学)田部 智之・(学)Huong Thi Bui・(学)菅 恵嗣・(正)島内 寿徳・(正)久保井 亮一

従来の遺伝子組換え技術, ならびに, 近年の RNA 干渉技術の発展に伴い, 効率的・選択的な遺伝子送達システムの開発が期待されている. 従来の遺伝子送達システムでは, リポソーム等のベクターと核酸の複合体を形成させてエンドサイトーシスによって生体細胞へと導入する. 一方, 正電荷を有する DOTAP リポソームは遺伝子ベクターとして一般的であるが, 他の脂質と比較して核酸との結合が強く, 宿主細胞への遺伝子導入効率も高い. しかし, 核酸との強い相互作用により, 複合体中の核酸は発現出来ないケースもある事が報告されている. また, 様々な疾患と酸化ストレスとの関連性も報告されており, この「酸化ストレス」を基盤として, 遺伝子発現を制御出来れば新規な遺伝子送達システムへと応用出来ると考えられる.

本研究では, 遺伝子発現プロセスにおける生体膜ならびに酸化ストレスの役割を明らかにする事を目的とする(Fig.1). また, 酸化ストレスによる遺伝子発現の制御に着目し, 無細胞タンパク質合成系における DOTAP リポソームによる遺伝子産物(GFP: Green Fluorescent Protein)の発現抑制について検討した.

【実験】

1. リポソームの調製

1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane(DOTAP)からなる脂質薄膜を水で水和させ, 凍結/融解(5cycle)した後, extrusion 法によりリポソーム粒径を 100 nm に調整した.

2. 無細胞タンパク質合成系

無細胞タンパク質合成系として, 大腸菌由来の翻訳システムを利用した(RTS 100 *E.coli* HY Kit, Roche Diagnostics, USA). mRNA を発現ベクターとし, 30°C で 6 時間インキュベーションさせて GFP を発現した. GFP 発現量は, 対照系の蛍光強度($\lambda_{ex}=395nm, \lambda_{em}=509nm$)を基準として, 相対蛍光強度により解析した.

【結果および考察】

1. mRNA からの GFP 発現に及ぼす正電荷リポソーム添加効果³⁾

DNA から GFP タンパク質を発現させる無細胞のタンパク質合成系において, 正電荷を有する DOTAP リポソームを添加すると, DOTAP 濃度増加に伴い GFP 発現が抑制された. この現象は主に mRNA が DOTAP と強く結合し翻訳活性を失う事や mRNA の構造が変化する事に起因すると考えられる. mRNA の翻訳過程における DOTAP の効果について検討するため, DOTAP 共存下において mRNA から GFP を発現させた(Fig.2). DNA から発現させた場合と同様, DOTAP 濃度の増加に伴い GFP 発現は抑制され, 3 mM 以上の濃度では全く発現しないことが分かった.

2. 酸化ストレス条件下における GFP 発現に及ぼすリポソーム添加効果

DOTAP の GFP 遺伝子抑制効果に及ぼす酸化ストレスの影響について検討した. mRNA からの GFP 発現において, 過酸化水素濃度が 5 mM 以下では GFP 発現

はあまり抑制されなかった. GFP 発現系に中性リポソーム(POPC)を添加すると GFP 発現量が増加することが報告されているが, 酸化ストレス条件下(H_2O_2 4.4 mM)においても POPC 共存下では GFP 発現量が増加した. 一方, GFP 発現を完全に抑制する 3 mM DOTAP 共存系に酸化ストレスを負荷した場合, 対照系と比較して約 40% の GFP 発現がみられた(Fig.3). 従って, 酸化ストレス条件下では DOTAP の GFP 発現抑制効果が緩和され, 遺伝子発現することが示された.

3. DOTAP に与える過酸化水素の効果

酸化ストレス条件下の DOTAP の特性を解析した. 過酸化水素によって DOTAP リポソームを処理し, 回収した脂質を UV スペクトルで解析した. DOTAP はアシル鎖に 2 個の 2 重結合を有する. その 2 重結合由来のピークについて検討した. その結果, 過酸化水素処理後のサンプルについて新たなピークが出現した. 上記の知見は, DOTAP リポソーム膜内部の 2 重結合が過酸化水素で酸化されている事を示している. 酸化により膜の水素結合安定性が低下する事が知られており, 酸化による mRNA-DOTAP リポソーム間結合の変化が, GFP 遺伝子抑制緩和に影響するものと予想される.

【引用文献】

- 1) Kuboi et al Membrane, **33**(6), 300 (2008)
- 2) H.T.Bui, et al, Langmuir, **24**(19), 10537-10542 (2009)
- 3) H.T.Bui, H.Umakoshi, K.Suga, T.Tanabe et al., Membrane, **34**, 146-151 (2009)
- 4) H.T.Bui, H.Umakoshi, K.Suga, et al, Biochem. Eng. J., **32**, 154-160 (2009)
- 5) H.Umakoshi, K.Suga, et al, J. Biosci. Bioeng., **108**(5), 450-454 (2009)

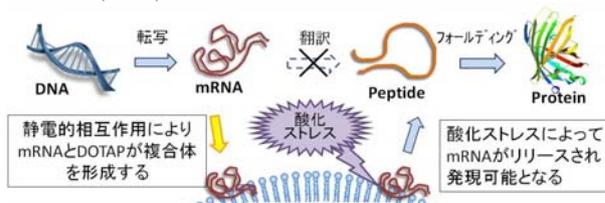


Fig.1 DOTAP による GFP 発現遺伝子抑制と酸化ストレス制御

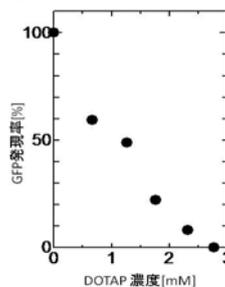


Fig.2 DOTAP 共存下における mRNA からの GFP 発現

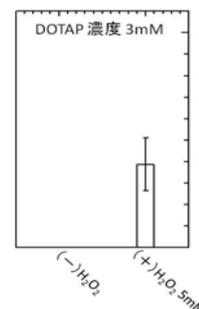


Fig.3 DOTAP 共存下における mRNA からの GFP 発現に与える過酸化水素の効果

E-mail: MSB@cheng.es.osaka-u.ac.jp

TEL/FAX: +81-(0) 6 -6850-6287