

山崎研究室 (生体高分子) 本郷キャンパス



HPはコチラ！



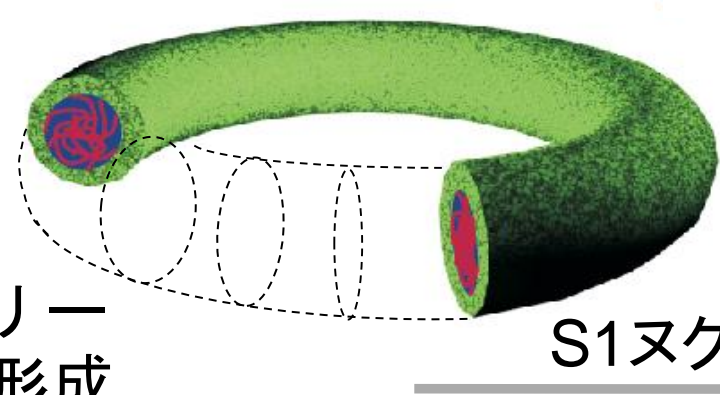
生体高分子の中でも高分子電解質として扱えるDNAやRNA、塩基性ペプチドを対象に、溶液物性や複合体形成を研究するとともに、応用としてPEG化リシン連鎖ペプチドを基盤とする人工遺伝子ベクターを開発しています。治療用遺伝子を疾患部位に届け細胞内で治療用蛋白質を発現させる役目を担うベクターには従来は無毒化したウイルスが使われていましたが、より安全な治療を目指して人工物である高分子や脂質を利用する試みが世界中で行われています。

PEG化リシン連鎖ペプチドによるプラスミドDNAの特異的折り畳み構造

PEG化ペプチド
+
プラスミドDNA

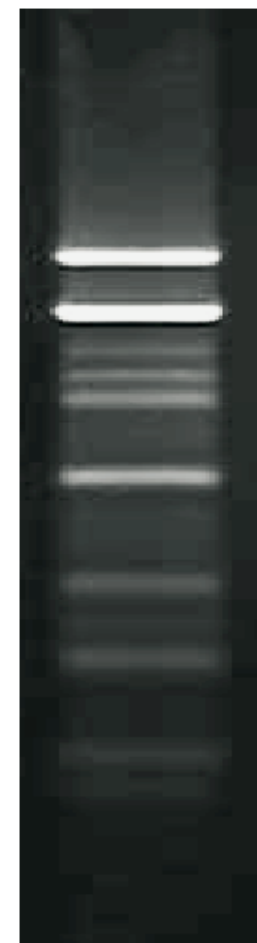
ナノアッセムブリに基づく会合体形成

トロイド状、ロッド状の単一pDNA内包高分子ミセル複合体



S1ヌクレアーゼ

1本鎖部分の特異的切断によりpDNAの全長のx/12という特徴的長さに断片化

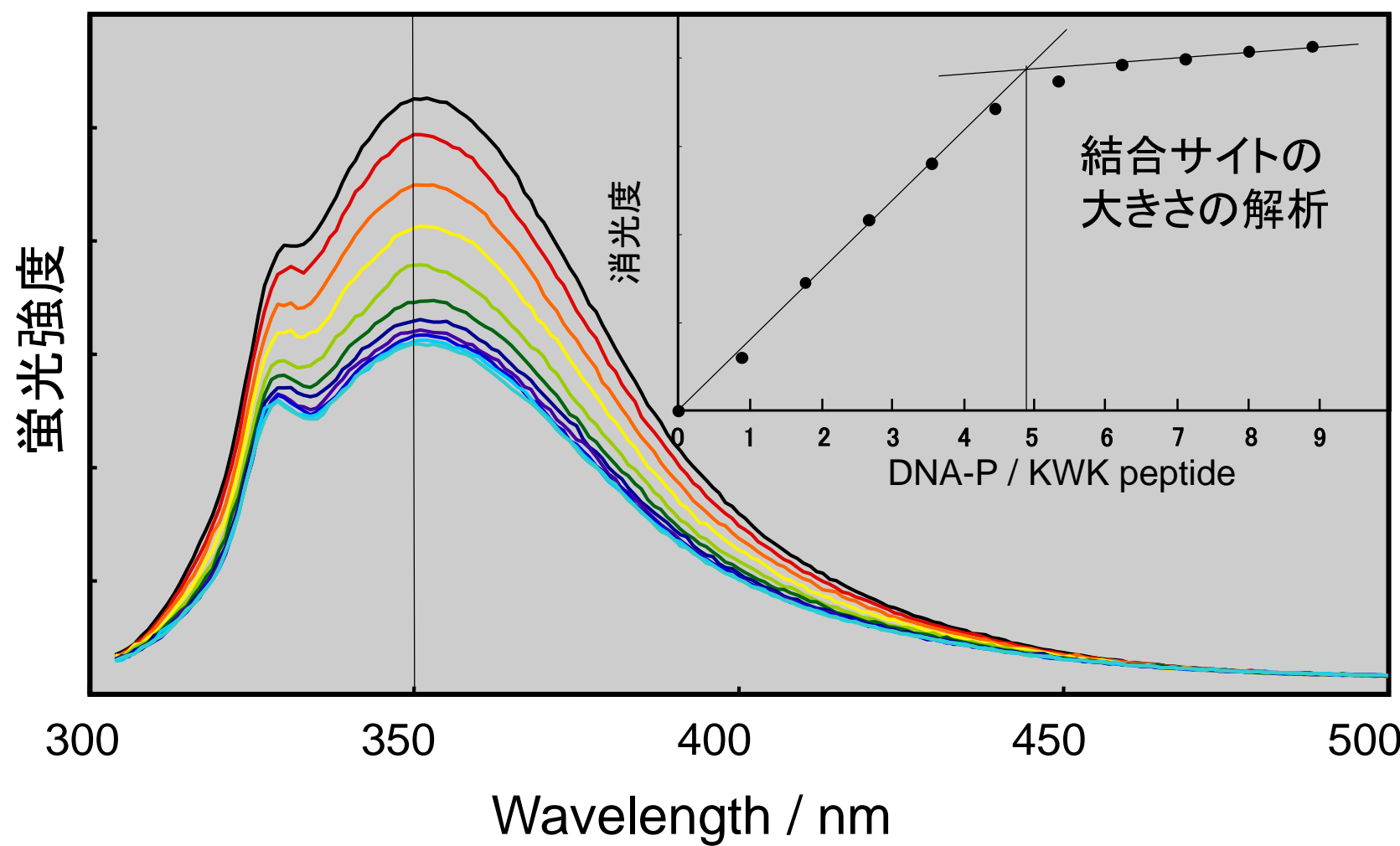


10/12
9/12
8/12
6/12
4/12
3/12
2/12

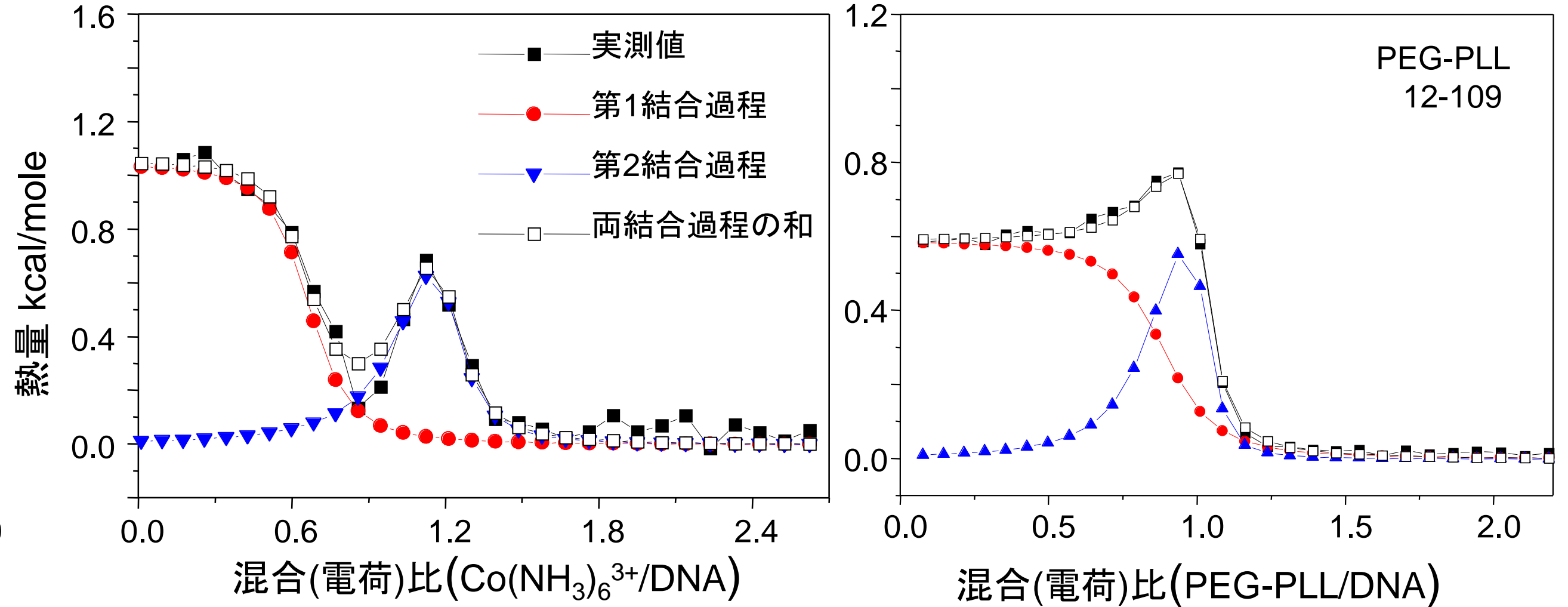
ロッド状に折り畳まれた複合体に1本鎖部分のみを切断する核酸分解酵素を作用させると、pDNAは長さが全長のx/12となる短い断片に切断されます。透過型電子顕微鏡で計測したロッド状構造の長さは、断片化されたフラグメントの長さに対応し、ロッド状構造の両末端でDNAの二重らせんが崩れていると仮定するとpDNAはPEG化ペプチドと複合体を形成する際に特異な折り畳み過程を経てロッド状構造を形成すると考えられます。

PEG化ペプチドなどのカチオン性物質のDNAへの結合挙動解析

DNA添加によるLys-Trp-Lysペプチドの蛍光消光



二段階の結合過程からなるカチオン性物質のDNAへの結合挙動



カチオン性物質とDNAとの結合挙動には未解明な部分が多く、蛍光性アミノ酸をプローブとした結合サイトの大きさの解析や、蛍光分光・熱分析を利用した結合定数の導出等を手がかりにPEG化ペプチドなどのカチオン性物質とDNAとの複合体形成のメカニズムを解析しています。

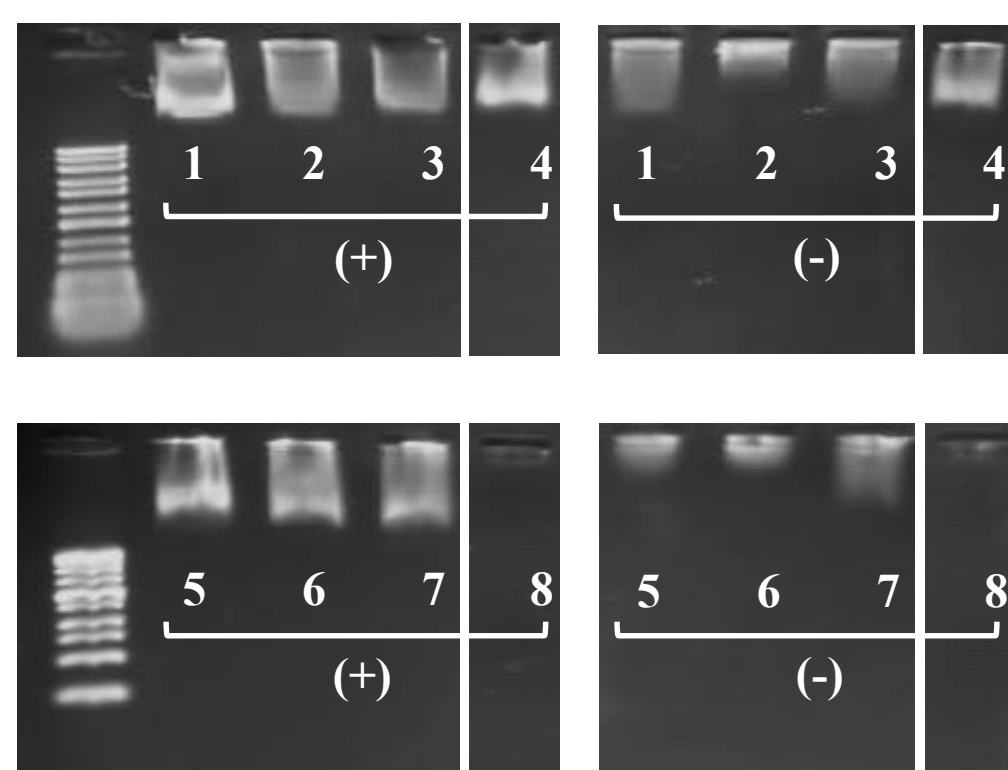
PEG化ペプチドとDNAとの複合体の構造安定性と遺伝子発現評価

PEG化リシン連鎖ペプチドの配列

sample #	PEG化ペプチド
1	PEG-K ₆ CK ₇ C
2	PEG-CK ₁₃ C
3	PEG-CK ₆ CK ₇
4	PEG-K ₁₅
5	PEG-K ₉ CK ₉ C
6	PEG-CK ₁₈ C
7	PEG-CK ₉ CK ₉
8	PEG-K ₂₀

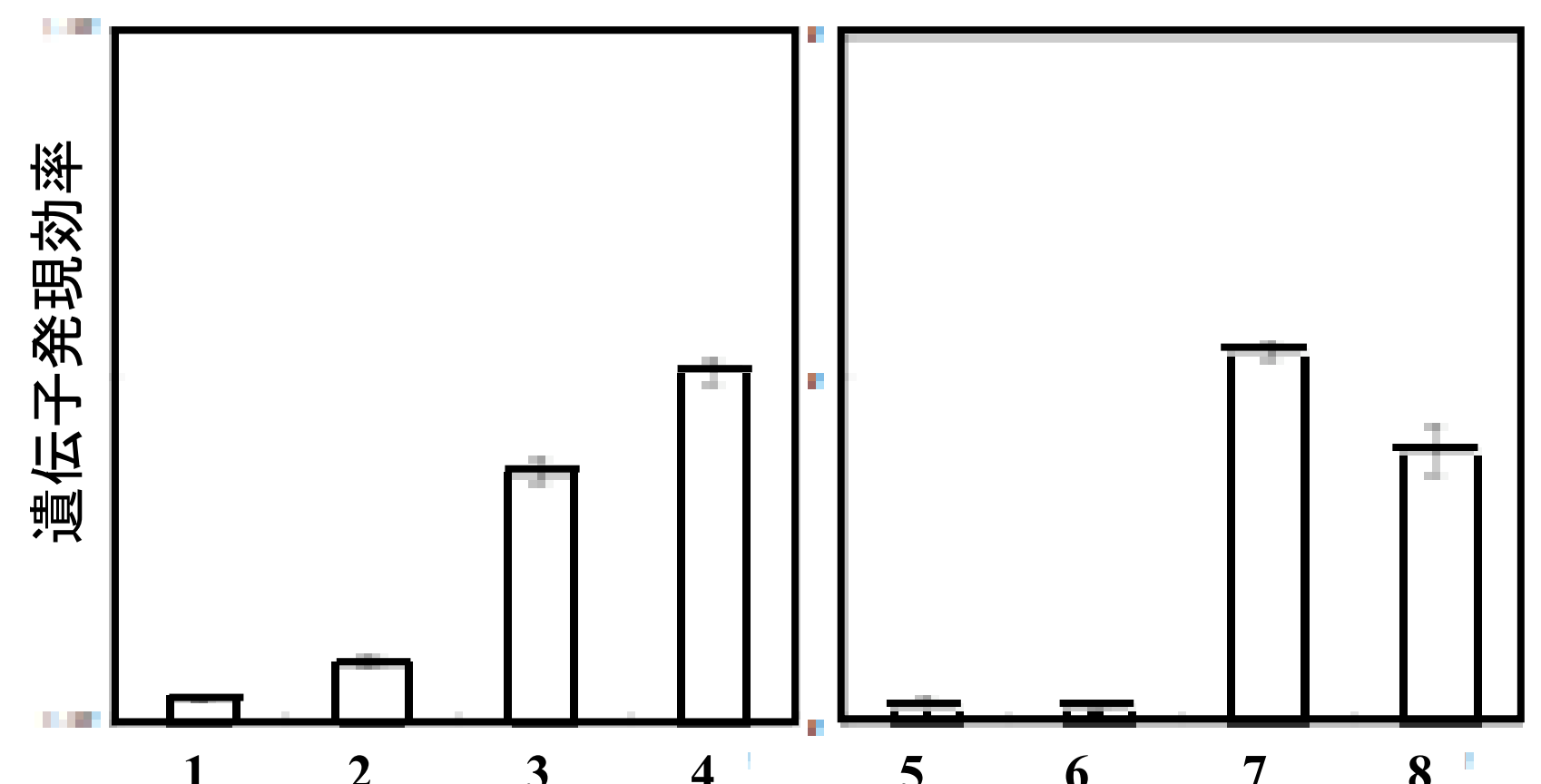
K: リシン、C: シスチン

ゲル電気泳動での安定性評価



(+) [DTT] = 10 mM (-) [DTT] = 0 mM, 共に[NaCl] = 150 mM,

無細胞蛋白質発現系での遺伝子発現評価



PEG化リシン連鎖ペプチドのペプチド内にシスチンを導入することにより、DNAとの複合体に構造安定性を付与することができます。また、遺伝子発現効率には顕著な配列依存性がみられ、遺伝子治療用の人工遺伝子ベクターの設計指針が得られます。