

Study on Synthesis of Dendrimer-Like Polymeric DNA and Its Application for Chemiluminescence Detection of Telomere DNA and Delivery of siRNA

(デンドリマー様ポリマーDNAの合成とテロメアDNA化学発光検出およびsiRNAの細胞内輸送への応用に関する研究)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻
Ahmed Fikry Mohamed EL-Mahdy Ahmed

[目的]

デンドリマーは、中心から放射状に分枝した構造を持つ高分子である。一本鎖およびその相補鎖DNAからなるデンドリマー様DNAは、構成成分がDNAであるため、化学修飾が容易であり、蛍光基を結合させたプローブ開発や医薬品分子を結合させた薬物輸送などへの応用が考えられる。

本研究では、多数のグアニン塩基を含む新規デンドリマー様DNA (YY-DNAs)を合成し、固相膜上および溶液中の標的DNAの高感度検出のための化学発光プローブへ応用した。さらに、siRNAの細胞内輸送分子としてのYY-DNAsの有効性について検討した。

[結果および考察]

デンドリマー様DNAの合成と固相膜上テロメアDNAの高感度化学発光検出用プローブとしての応用

当研究室では、室温でグアニンと特異的に短時間で反応し、発光を生じる化学発光試薬 3,4,5-trimethoxyphenylglyoxal (TMPG)を開発している。そこで、多数のグアニンを含むYY-DNAsは、TMPG反応と組み合わせることで高感度化学発光検出用プローブとして応用できるものと考え、テロメアDNAを標的とした化学発光検出法を開発した (Fig. 1)。

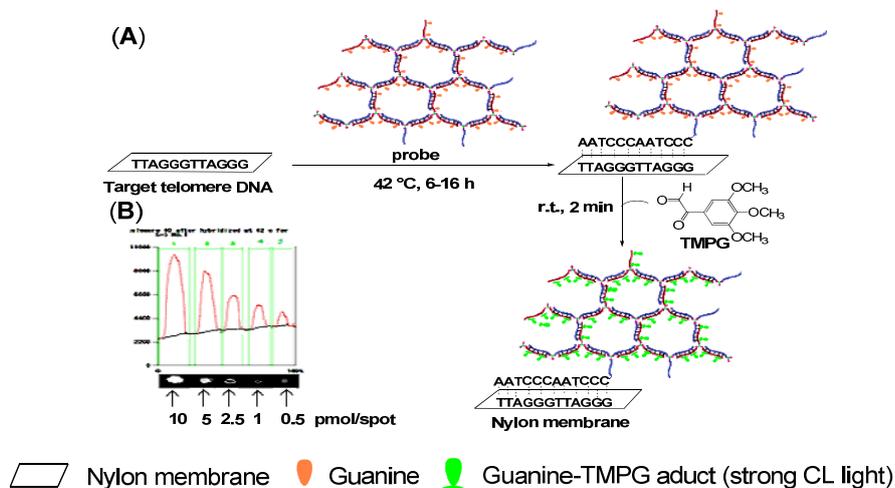


Fig. 1 (A) Schematic protocol for the chemiluminescence (CL) detection and (B) CL-imaging detection of telomere DNA by the direct hybridization with the synthesized probe of YY-DNAs followed by TMPG reaction.

まず、テロメア配列(TTAGGG)₃ およびその相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを導入した Y 字型三量体の DNA を、それぞれ合成した。これら 2 種類の三量体 DNA を混合し、ハイブリダイズさせることで YY-DNAs である重合体を形成させることができた。YY-DNAs の生成は、電気泳動によるバンドの位置によって確認した。

次に、ナイロン膜にテロメア DNA をスポットし、YY-DNAs とハイブリダイズさせたのち、TMPG を用いた化学発光検出を行った。その結果、スポットしたテロメア DNA 量に比例した化学発光が観察された (Fig. 1)。このときのテロメア DNA の検出限界は約 50 fmol (0.9 ng)であり、biotin-avidin-horseradish peroxidase を用いた従来の化学発光検出法と比較して、5 倍程高感度であった。

Streptavidin-coated sephadex beads とデンドリマー様 DNA プローブを用いたテロメア DNA の高感度化学発光検出

著者らは、sephadex beads を酸化し、生成したアルデヒド基と streptavidin (SA)のアミノ基を反応させたのち還元することによって、SA-coated sephadex beads の効率的な調製法を開発した。この方法による sephadex beads 1mg あたりの SA の結合量は、市販の SA-coated polystyrene beads や sepharose beads と比較して、それぞれ約 24 倍および 5 倍増大した。そこで、この SA-coated sephadex beads と YY-DNAs を用いて、テロメア DNA を標的とした化学発光検出を行った。

最初に、biotin 標識 cDNA を SA-coated sephadex beads に結合させ、標的であるテロメア DNA とハイブリダイズさせた。次に、結合したテロメア DNA と YY-DNAs をハイブリダイズさせ、TMPG を用いた化学発光検出を行った (Fig. 2A)。その結果、テロメア DNA 5-200 nM の範囲において、化学発光強度と DNA 濃度の間に良好な直線性が得られた(Fig. 2B)。本測定法の検出限界は約 0.75 nM (1.3 ng/100 μL)であった。本測定法は、操作時間が短く(2-3 h)、測定範囲も広く、簡便かつ高感度であり、他の DNA 検出法に匹敵するものである。また、SA-coated sephadex beads は、DNA だけでなく、抗体を用いたタンパク質の免疫測定にも応用可能であると考ええる。

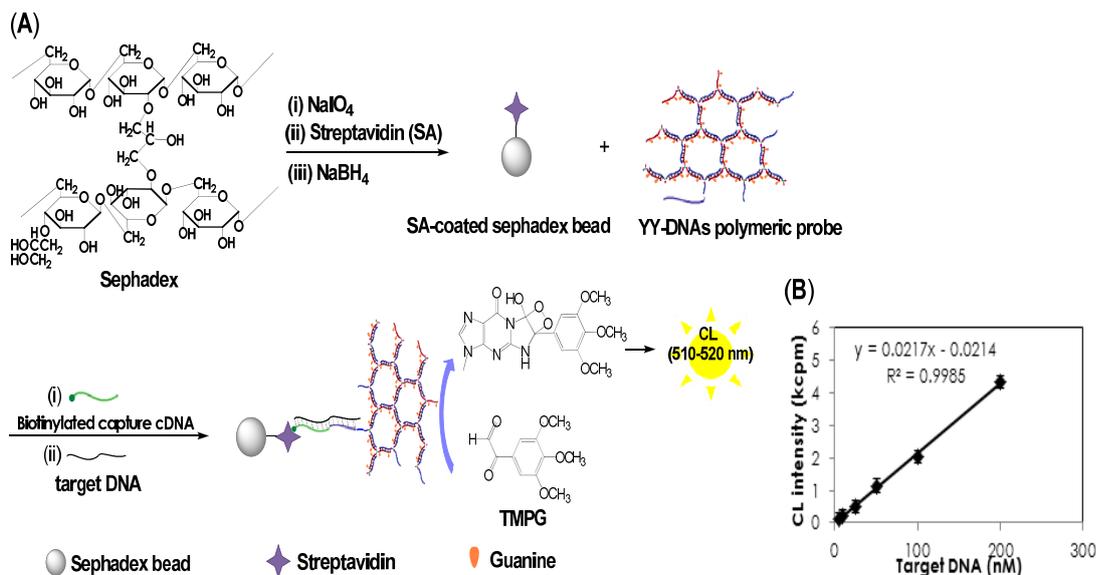
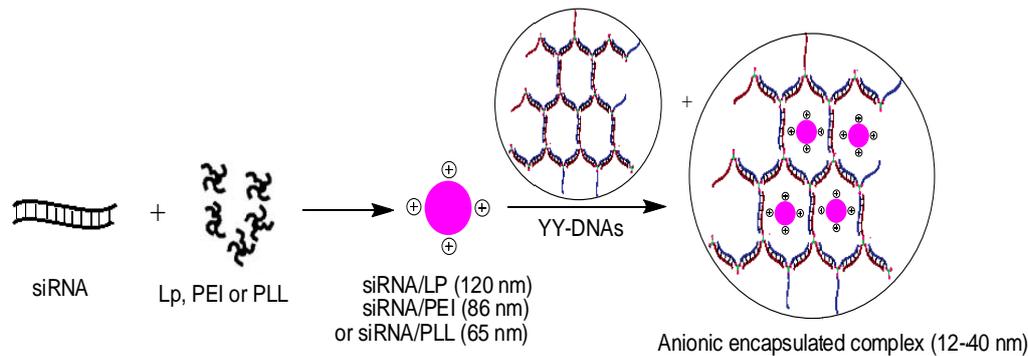


Fig. 2 (A) Schematic principles for preparation of SA-coated sephadex bead and its application for CL detection of telomere DNA. (B) Calibration curve of CL intensity versus the target DNA.

siRNA の細胞内輸送におけるデンドリマー様 DNA の有効性

基礎研究レベルにおける siRNA などの核酸の細胞内輸送には、トランスフェクション試薬として Lipofectamine (LP)、polyethylenimine (PEI)、poly-L-lysine (PLL) などのカチオン性化合物が使用されているが、カチオン性化合物は細胞毒性があるため、臨床に適用できない。一方、YY-DNAs は負に荷電しているため、カチオン性化合物の細胞毒性を軽減できると考えた。そこで、siRNA/カチオン性化合物(LP、PEI、PLL)/YY-DNAs の複合体を作製し(Scheme 1)、これら複合体の HeLa 細胞への細胞毒性および siRNA の細胞内輸送への影響を調べた。



Scheme 1 Electrostatic encapsulation of siRNA/LP, siRNA/PEI or siRNA/PLL nanoparticles with YY-DNAs.

その結果、siRNA/カチオン性化合物と比較して、siRNA/カチオン性化合物/YY-DNAs 複合体の細胞毒性は著しく減少した (Fig. 3A)。一方、siRNA の細胞内輸送について、YY-DNAs は影響しなかった (Fig. 3B)。これらの結果は、YY-DNAs はカチオン性トランスフェクション試薬の核酸導入効率を維持したまま、これらの細胞毒性を低減できることを示している。

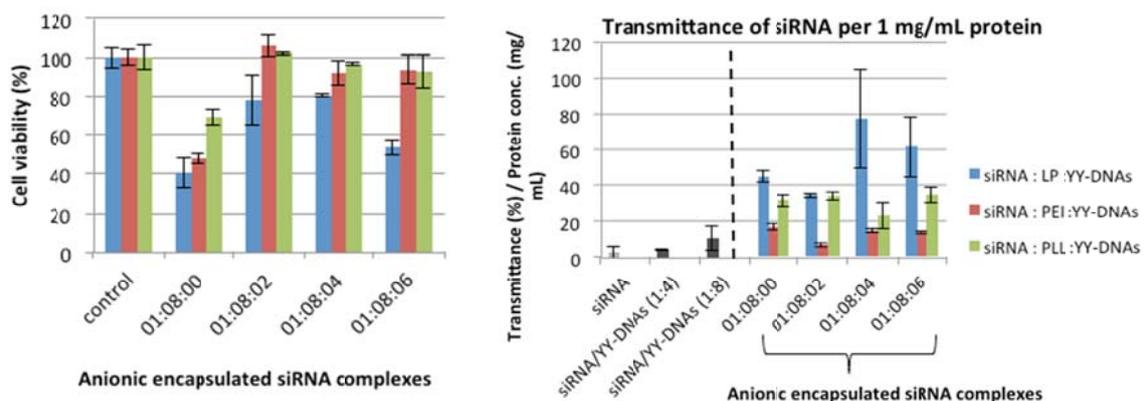


Fig. 3 (A) *In vitro* cytotoxicity of the anionic encapsulated siRNA complexes on HeLa cells for 24 h incubation. (B) Uptake efficiency of the anionic encapsulated siRNA complexes in HeLa cells for 4h incubation.

[基礎となった学術論文]

[1] A. F. M. EL-Mahdy, T. Shibata, T. Kabashima, M. Kai, Dendrimer-like polymeric DNAs as chemiluminescence probes for amplified detection of telomere DNA on a solid-phase membrane. *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 859-861.