

## 研究課題別 事後評価結果

1. 研究課題名: 1次元分子認識システムを応用した多糖系遺伝子マニピュレーターの創製

2. 研究代表者: 新海 征治 (九州大学 大学院工学研究院 教授)

### 3. 研究内容及び成果

本研究は、これまでに得られた“ $\beta$ -1,3-グルカン的一种シゾフィラン(SPG)がDNAやRNA等の核酸と3重螺旋を形成する”という発見に基づき、糖と核酸の相互作用に関する基礎研究を続けるとともに、遺伝子を人工的にマニピュレート(精製、分離、運搬、配列認識、転写・翻訳のon-off)する、全く新しい技術体系の確立を目指した研究である。

具体的には、高分子化学、物理化学、有機化学のポテンシャルを駆使した糖と核酸の組み合わせによる新規材料の開発と、分子生物学及び細胞工学に基づいた、遺伝子デリバリー、アンチセンスデリバリー、CpGモチーフのデリバリーへの応用や、mRNAの分離と微量検出システムの開発を行った。また、 $\beta$ -1,3-グルカンが形成する1次元空孔を活用する新しい材料合成への道を切開いた。

以下、得られた成果の概要を示す。

#### 1) 遺伝子デリバリー

天然多糖シゾフィラン(SPG)を用い、コードさせたい遺伝子の両末端にpoly(dA)を付加し、これをSPGと複合化させたものを用いてがん細胞へトランスフェクションを行ったところ、核内で遺伝子発現が起こることを見出した。さらに、細胞膜透過性に優れた市販の非ウイルス系ベクターと複合化により、今までにない高い遺伝子発現率を達成した。この多糖系の非ウイルスベクターの最大の特徴は、従来のカチオン性の合成高分子と比較して細胞毒性が低く圧倒的に安全性が高いことにある。

#### 2) アンチセンスデリバリー

SPGの細胞認識部位を修飾し、アンチセンスDNAとSPGの複合体(AS-ODN/SPG複合体)を形成して細胞内取り込み作用を促進させることで、血液中に存在する酵素等によるアンチセンスDNAの分解等、アンチセンス法を用いたデリバリーシステムの問題点に対処した。その結果、安全で効率の高い、新規なアンチセンスデリバリーシステムを確立した。また、関節炎での*in vivo*試験の結果、アンチセンスDNAをSPGで複合化することで、DNAが安定に存在し、関節炎の炎症を抑制する効果が認められた。

#### 3) CpGモチーフのデリバリー

コレステロールを修飾したSPGを用いる等により、生体内で分解されやすいCpGDNAを保護することで、細胞性免疫を活性化するCpGモチーフの安全で効率の高いデリバリーシステムを確立した。現在CpG研究の中心である大阪大学微生物学研究所のチームと共同で、花粉症治療やアレルギーに対するアジュバント(Adjuvant)化学療法等の*in*

*vivo* 試験を行っている。

#### 4) mRNA の分離

SPGを修飾したアフィニティーカラムを用い、酵母抽出物から mRNA を高精度で抽出することに成功した。既存の oligo dT 法と比較して収率、純度は遜色ない。この方法の実用化に際し、新しくフィルター分離法を考案した。本手法の特徴は、低コスト、簡便な操作性、多サンプル一括処理等にあり、ポストゲノム関連研究等、応用範囲が広い。

また、本手法の開発中にオクタデシル基修飾シリカを充填した固相抽出カラムを使用することにより、さらに高選択的な分離抽出が出来た。本件は、現在福岡県生物食品研と共同で mRNA の自動分離キットを試作しており、近々製品化する予定である。

#### 5) 機能性材料の開発

$\beta$ -1,3-グルカンの特性である螺旋構造を形成する過程での分子の振る舞いや水溶性等を、新規コンジュゲート材料創成へ応用した。その結果、カーボンナノチューブ(CNT)の優れた可溶化剤となることが分かり、CNT の応用に道を拓いた。これは、 $\beta$ -1,3-グルカンの持つ 1 次元空孔が疎水場であり、この 1 次元空間をナノフラスコとして操作出来ることを示す。そこでこの特徴を生かし、この中で重合させることで導電性の材料のポリアニリン、ポリチオフェンやポリシラン等の 1 次元コンポジットの作成に成功した。また、色素や金ナノ粒子の組織化も可能となり、今後のメモリーやデバイスの開発に重要な指針を与える成果を上げた。さらに、 $\beta$ -1,3-グルカンのうち最も安価なカードランを化学修飾し、水溶性化する方法も編み出し、ホスト分子の多様化も可能となった。

以上のように本研究チームは、1 次元分子認識を掘り下げ、多点相互作用をコントロールする手法により、化学とバイオ、化学と精密材料を結びつけることに成功した。また、本研究期間内で多数の特許を出願し、そのいくつかは、関連企業の協力を得て、工業的な応用へと展開している。新しい遺伝子デリバリー、mRNA の分離システム、高機能ナノ材料等の開花に近い。

## 4. 事後評価結果

### 4-1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

研究代表者は  $\beta$ -1,3-グルカン構造をもつシゾフィラン(SPFG)が poly 核酸と 2:1 complex を形成することを世界で初めて発見し、この現象が示す大きな可能性を、以下の多くの具体的証拠をもとに証明した。

基礎研究としては、(1) SPG と poly 核酸の complex が helix 型をとること。(2) (1)は  $\beta$ -1,3-グルカン構造が重要で、安価なカードランも側鎖構造を修飾することで利用出来ること。(3) (2)のような修飾法として click chemistry を応用したこと。また、(4) 計算化学の手法を用いてこれらの構造形成や多点相互作用等の分子的メカニズムを解き明かしたこと。

応用研究としては、(1) 上記の特性がバイオ材料、特に遺伝子デリバリー、アンチセンスデリバリー、CPG モチーフによる免疫疾患への対処等に有用であることを実証したこと。(2) 細胞膜透過

性の改良等による DNA の核内輸送が実現され、これらの結果は細胞毒性の低い人工非ウイルスベクターとして大きな期待が寄せられること。(3)新しい mRNA の分離カラムを開発し、安価で使い勝手の良い遺伝子診断に道を拓きつつあること。(4)応用研究のもう一つの柱としてナノテク材料の開発があり、 $\beta$ -1,3-グルカンが構成する疎水性の空洞を利用して、これをナノフラスコと考え、CNT や導電性 1 次元ポリマー、金粒子の 1 次元化等多彩な材料を導き出したこと。

これらの研究成果は多数の原著論文、レビュー、特許出願等で公表しており、各ジャンルにおいて大きな注目を集めている。

#### 4-2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

従来は、複雑であるためにサイエンスとして明確な理解が難しかった糖類について、DNA との複合体形成機能を見出し、その相互作用の機構を解明し、その特性を応用して無毒性への期待があるドラッグデリバリー法誕生へと導いたこと、さらにはナノテクデバイス構築への利用という新しい可能性を示唆したこと等、サイエンスの方法論はもちろん、チームワークの取り方等プロジェクト研究の優れたモデルとなり、後進にも良い影響をもたらした。また、研究期間中にアンチセンス薬剤等を開発するベンチャーも立ち上がる等、技術レベルは高く、社会への還元も進んでいる。

学術的進歩とともに多くの知的財産を生み出しており、研究費がこれほどうまく使用された例は珍しい。

#### 4-3. その他特記事項(受賞歴等)

優れた研究業績をもとに、日本及び外国から数多く顕彰された。主なものを記す。

新海征治	Vielberth Lectureship(ドイツ)	平成 14 年 5 月
	日本化学会賞	平成 16 年 3 月
	紫綬褒章	平成 16 年 11 月
	第 63 回西日本文化賞	平成 16 年 11 月
	東レ科学技術賞	平成 19 年 3 月
長崎健	第 17 回生体機能関連化学会講演賞	平成 14 年 9 月
木村太郎	第 18 回生体機能関連化学会講演賞	平成 15 年 10 月