

公益財団法人 立松財団 御中

様式 2021A1,A2,B

2024年 8月 5日

所属:名古屋大学物質科学国際
研究センター

氏名: 天池 一真



2022 年度 助成 研究 終了 報告書

※ゴシック文字で記入下さい。

研究テーマ	低分子ナノカーボンを用いた核酸輸送
研究の結果	<p>まず核酸輸送評価におけるハイスループットスクリーニング系を確立した。分泌型ルシフェラーゼがコードされたプラスミドを輸送核酸発現させ、その上清に含まれる発現したルシフェラーゼ量を、ルシフェリンを加えることで発光定量する手法の開発をおこなった。この手法をもちいることで、マルチウェルを用いてプレートリーダーで一度に 100 サンプル近くを解析することが可能になった。</p> <p>また既に核酸輸送ナノカーボン分子として見出している KTU059 を用いて核酸との複合体形成能およびその物性評価をおこない、それらと核酸輸送効率との相関関係から輸送条件の最適化を検討した。化合物と核酸の複合体形成時に用いる溶媒の種類や塩強度、pH、複合体形成にかかる時間が複合体の動態に及ぼす影響をゲルシフトアッセイや動的光散乱 (DLS) を用いた粒子径およびゼータ電位測定を用いて調査した。その結果、化合物/DNA 複合体形成には溶液の pH が大きく影響することが明らかとなり、pH 5.8 の MES 緩衝液および pH 7.1 の HEPES 緩衝液を用いた条件において複合体が 1000 nm オーダーの凝集体を形成することが示唆された。続いて、ハイスループット系をもちいて、化合物/DNA 複合体形成時に用いる溶媒の検討をおこなったところ pH 7.1 の HEPES 緩衝液が最適であることや、複合体形成が 30 分間で終結することが示唆された。</p> <p>見出した条件を参考に、KTU059 誘導体に対する詳細な構造機能相関研究をおこなった。ゲルシフトアッセイを用いた複合体形成能の評価の結果、化合物/核酸の塩基対比 (R 値) や化合物の pKa 値、立体構造が複合体形成能に大きく影響することが明らかになった。また、ルシフェラーゼアッセイによる核酸輸送効率の評価および MTT アッセイによる細胞毒性の評価を行った結果、R 値と核酸輸送効率および細胞毒性に正の相関が確認され、多くの化合物は R 値が 5 以下の条件において低い細胞毒性を示した。また、第一級アミンよりも第二級アミンを有する化合物の方が高い核酸輸送効率を有することが明らかとなった。化合物/核酸複合体形成が確認されなかった化合物が核酸輸送活性を示さなかったことから、複合体形成が核酸輸送において非常に重要なステップであることが示唆された。また、エステル基上の置換基を調整することで脂溶性を増加させた化合物は化合物/核酸複合体形成が確認されなかったのに対し、脂溶性を低下させた化合物は高い複合体形成能を示したが核酸輸送活性が確認されなかった。これは脂溶性の低下による複体の細胞膜透過能または細胞内での複合体解離能の低下が原因であると考えられる。このようにアミノ基の種類や化合物の脂溶性が核酸輸送において非常に重要な要因であることが示唆された。</p>
研究発表 (実績)	<p>「カチオン性ペリレンを用いた核酸輸送」 天池一真、加藤江莉佳、深津美羽、Dominik Zetschok、宇佐見享嗣、山田 早人、伊丹健一郎 第 16 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋大学・東山キャンパス、2022 年 9 月 10-12 日</p> <p>「分子ナノカーボンを用いたケミカルバイオロジー」 第 448 回触媒科学研究所コロキウム、北海道大学、2023 年 5 月 9 日 (招待講演)</p> <p>“Nucleic acid delivery using cationic polycyclic aromatic hydrocarbons” Kazuma Amaike, Erika Kato, Miu Fukatsu, Dominik Zetschok, Luca Hagemeyer, Atsushi Usami, Hayato Yamada, Kenichiro Itami IKCOC-15, OP-55, Rihga Royal Hotel KYOTO, JAPAN, 2023/11/23 (Contributed Oral Presentation)</p>

提出期限：研究期間終了後、すみやかに助成金の「必要経費使途明細書」「領収書」と合わせて提出下さい。
年度をまたぐ場合は毎年3月末日までに、途中経過をご記入の上、報告願います。