



Ryuju Science Corporation
39-4 kosora-cho Seto-city,
Aichi 4890842 Japan
WEB: <http://www.ryuju-science.com>
E-mail: info@ryuju-science.com

DEAE-Dextran-MMA GRAFT COPOLYMER の特徴

- 1) DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体とは DEAE-デキストラン (DEAE-Dextran) にメタクリル酸メチルエステル (MMA) をグラフト重合したもの。
- 2) DEAE-デキストラン (DEAE-Dextran) を幹ポリマ - に PMMA を枝ポリマ - とする共重合体である。
- 3) DEAE-デキストラン (DEAE-Dextran) 部を親水ドメイン、枝ポリマ - PMMA 部を疎水ドメインとする親水 - 疎水ミクロ相分離構造を形成する。
- 4) オートクレーブ (121、15 分) が可能である。

注：グラフト率 (graft rate) = 枝ポリマ - / 幹ポリマ -

重量増加率 (weight increase) = (生成共重合体 - 使用した幹ポリマ -) / 使用した幹ポリマ -

DEAE - デキストランMMA共重合体のキャラクタリゼ - ション

メタノ - ルに沈殿した共重合体は DEAE デキストランの良溶媒である水にもホモポリマ - PMMAの良溶媒であるアセトンにも不溶であり、混合物でなく共重合体である事が確認された。図 1 その赤外吸収スペクトルの測定結果(b)を示されている。グラフトされた PMMA に由来する吸収が 1730 cm^{-1} 付近にみられ、DEAE デキストランに由来するピラノ - ズ環の吸収が 1000 cm^{-1} から 1150 cm^{-1} 付近にみられる。これらの事から DEAE デキストランを幹ポリマ - とし MMA を枝ポリマ - としたグラフト共重合体を確認出来た。

DNAとDEAE デキストラン共重合体の錯体形成反応

細胞への形質変換は先ずDNAとDEAE デキストラン共重合体の錯体形成による細胞のエンドサイトシス（捕食）による。

図1にはその生成させた複合体の赤外吸収スペクトルの測定結果(a)が示されている。DEAE基に由来する 1500 cm^{-1} 付近の C_2H_5 基の吸収、 1220 cm^{-1} 付近にみられるDNAのリン酸エステル部分に起因するP-Oの逆対称伸縮振動による吸収、 3450 cm^{-1} 付近にみられる-NHの伸縮振動による吸収が観察される。-NHの伸縮振動による吸収はDEAE デキストラン共重合体に比較して高波数側にシフトしているのが観察されている。このことから静電的な結合が強く成り複合体が結晶状態に成って行く傾向が解った。これはDNAが凝集してコンパクトな構造をとるDNA凝縮であり、形質変換効率が高いと想像される。それはDNAが凝集した場合は細胞膜を透過しやすく、細胞内で分解されにくいからである。

形質変換試験

非ウイルスベクターとしてDEAE - デキストラン共重合体の可能性を細胞毒性や形質変換効率の観点から確認する事を主に ガラアクトシダ - ゼ遺伝子がプロモ - トされたプラスミドを導入する293細胞をもちいた形質変換試験を行った。形質変換効率はXgal染色法を用いた。図2には重量増加率100%、150%のDEAE - デキストラン共重合体のサンプル(DDMC2, DDMC1)とDEAE - デキストランとの遺伝子発現の比較を示す、これによると遺伝子導入効率はDEAE - デキストラン共重合体が5倍程度高い事を示す。

細胞毒性

非ウイルスベクターとして注目されてから長い歴史を持つDEAE - デキストランは細胞毒性などが指摘されてきた。今回、細胞毒性を改善するためにDEAE デキストランにMMAを重合した。重量増加率150%のDEAE - デキストラン共重合体(DDMC2, DDMC1)で共重合体とプラスミドの量を2倍にして ガラアクトシダ - ゼ遺伝子がプロモ - トされたプラスミドを導入する293細胞をもちいた形質変換試験を行った。結果は遺伝子発現の2倍と成った。通常は細胞毒性のためにDEAE - デキストランでは不可能である。このことからDEAE - デキストラン共重合体はDEAE - デキストランに比較してその細胞毒性は改善されている事が解った。

DEAE デキストラン共重合体の高分子ミセルとしての特性

細胞への形質変換率はDNAの構造に強く依存すると言われている。即ち、DNAがコンパクトに閉じた状態、DNA収縮の状態が細胞膜での透過や細胞内でのDNA自体の分解に有利に働くと言われている。一方、錯体形成反応条件で反応時間は結晶化を促進してDNAがコンパクトに閉じた状態をなす。これは錯体がDNAのリン酸エステルのマイナス電荷とDEAEデキストラン共重合体のプラス電荷が静電的に結合したポリオンコンプレックスと言われるものであるからである。

一方、細胞への形質変換は先ずDNAとDEAEデキストラン共重合体の錯体形成による細胞のエンドサイトシス(捕食)による。この錯体形成条件は重要である。

又細胞のエンドサイトシス(捕食)には細胞膜を透過する為にDEAEデキストラン共重合体の疎水ドメインであるPMMA部分が重要である。DNAとDEAEデキストラン共重合体の錯体形成反応はpHや電荷率に強く作用されるが、この反応はDNAのリン酸エステルのマイナス電荷とDEAEデキストラン共重合体のプラス電荷が静電的に結合したものであり、ポリオンコンプレックスと言われるものである。それ故、DNAは凝縮して細胞内で分解から保護され、さらに核にいたる核膜の透過を容易にすると考えられる。以上、DEAEデキストラン共重合体の高分子ミセルとしての模式図を図3示す。

Fig.3

2-diethylaminoethyl-dextran-methyl methacrylate Graft Copolymer for Non-Viral Gene Delivery

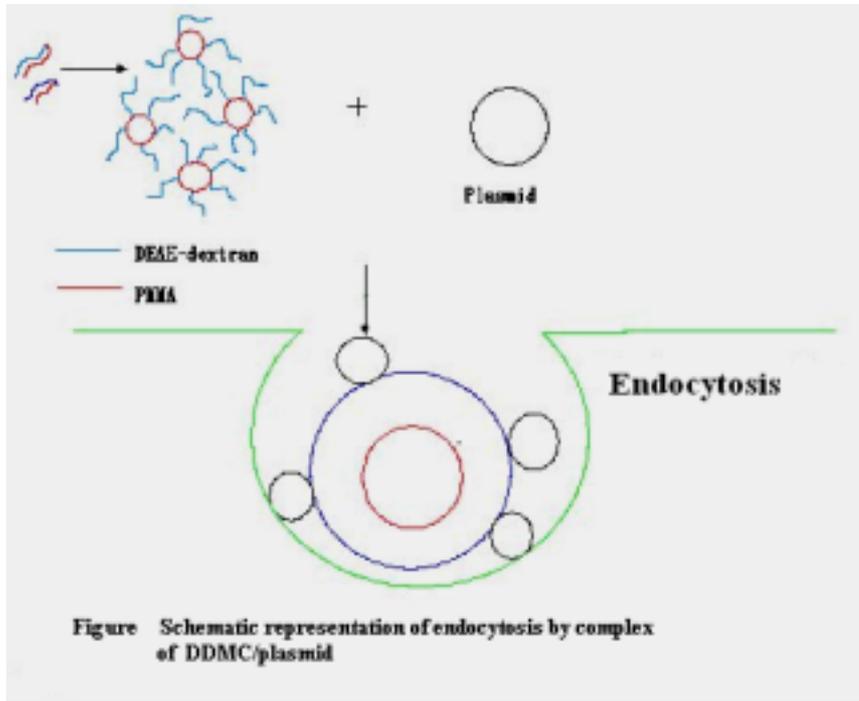


Fig.1

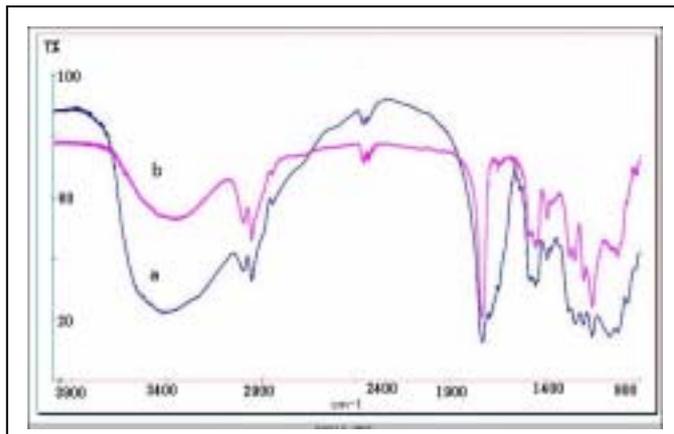


Fig.2 Transfection activity of DDMC with Lac-Z reporter plasmid was evaluated in vitro using 293 cells.

