

光感受性カチオン脂質によるトランスフェクション光制御

長崎 健、甚田知美、谷口晶宣、和田克利
大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻

Photo-regulation of transfection efficiency by using photo-responsive cationic lipids

Takeshi Nagasaki, Tomomi Jinta, Akinobu Taniguchi, Katsutoshi Wada

Department of Bioengineering, Graduate School of Engineering, Osaka City University

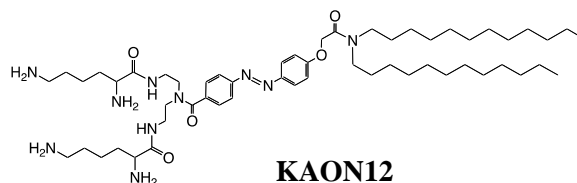
In the hope of facilitating the escape of exogenous genes from endocytic vesicles and improving transfection efficiency, we have investigated photoresponsive gene carriers and using UV irradiation during gene delivery to destabilize endocytic vesicle membranes and to facilitate membrane fusion. A photosensitive amphiphilic molecule can regulate the shape of an assembled vesicle as determined by microscopic observation. Photo-isomerization induces a change in membrane fluctuation behavior, fusion, or a morphological transition. The mechanism of this photo-switching in the vesicle morphology is interpreted in terms of a change in the effective cross-sectional area of the photosensitive molecule. Using a luciferase gene as a model, we show that UV irradiation of photosensitive lipid/DNA complex-treated COS-1 cells induces a substantial increase in the transfection efficiency. After DNA complex pass through the cell membrane by endocytosis, trans to cis photo-isomerization of the azobenzene structure would induce the destabilization of photosensitive lipid membrane and enhance endosomal escape of plasmid DNA complex.

(Corresponding author) T. Nagasaki: nagasaki@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

1. はじめに

非ウイルスベクターは一般にエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれる。従って、エンドソームなどの輸送小胞体からの脱出が必要不可欠となる。我々は、この障壁を克服するために刺激応答性遺伝子デリバリーシステムの構築を目指し研究を進めている[1]。

本研究では、遺伝子キャリアーとして機能するカチオン脂質に光感受性構造を導入し、光照射により分子集合形態の変化を誘起し、分子集合体の形態変化観察を行った。また、光感受性脂質の分子集合体形成能低下に基づく膜構造の不安定化、さらには輸送小胞との膜融合によるエンドソーム脱出促進を期待し、トランスフェクション活性の光制御を検討した。



2. 試料と実験方法

光応答性脂質が形成する分子集合形態の光制御を行うために、分子集合体自体は比較的不安定であるが大きな構造変化が期待される KAON12 のみからなる小さな一枚膜リポソーム (SUV) とルシフェラーゼをコードするプラスミド DNA (pGL3、プロメガ社) との複合体を調製し、アフリカ緑ザル腎細胞 (COS-1) 細胞への導入を行った。細胞培養培地上清に DNA 複合体を添加後 3 時間培養を行い細胞内へ取り込ませた後、培地を交換し、培養プレート底面より UV ランプを照射 (365 nm, 3.5 mWcm⁻², 10 min) することでトランスフェクションへの光照射効果を検討した。その後、48 時間培養後に細胞溶解液中のルシフェラーゼ活性をプロメガ社製キット (Steady-Glo[®] Luciferase Assay Kit) を用いて測定した。

3. 実験結果と考察

KAON12 のみからなる SUV は動的光散乱の結果より、トランス溶液では平均粒径 29 nm であるのに対し、シス溶液では 290 nm となり、平均粒径の増大が観察された[2]。この時の構造変化を透過型電子顕微鏡(日立 H-7000)にて観察した(図1)。UV 光照射前では 20-30 nm の均一な小胞構造のみが見られるのに対して、照射後は膜融合しより大きなベシクル形成や繊維状構造が見られる。屈曲率が大きく不安定な SUV においては、UV 光照射によるトランス体からシス体へのアゾベンゼンの光異性化に伴い、分子集合形態に大きな変化が誘起されることが明らかとなった。

SUV 溶液とプラスミド DNA 溶液を混合し、複合体を形成後、細胞培地に添加し遺伝子導入を行った。培地添加3時間後、複合体がエンドソームに最も集積しているタイミングでトランス体からシス体への構造変化を UV 光照射により誘起し、エンドソーム脱出促進を試みた。最終的な発現タンパク量で評価した場合、光感受性脂質である KAON12 を用い、光照射を行うと、光照射なしの場合と比較し2倍以上の発現効率の向上が見られた。一方、光非感受性のリポフェクチンでは UV 光照射を行っても有意な発現効率向上は観察されなかった。光感受性カチオン脂質による分子集合形態変化がエンドソーム膜との膜融合などによりエンドソーム膜の不安定化を誘起し、プラスミド DNA のエンドソームから細胞質への脱出を促進し、その結果タンパク発現量が増大したと思われる。

4. まとめ

アゾベンゼンを基体とする光感受性脂質はトランス-シスの構造変化によりその分子集合体の形態が大きく変化することが明らかとなった。エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた場合にはエンドソーム膜との融合により、薬物の細胞内輸送にも大きな影響を与える。今回、外部遺伝子の導入・発現効率を評価した結果、UV 光照射によりトランスフェクション効率を向上させることに成功した。*in vivo* での検討を考慮した場合現在用いている照射光の波長(紫外光)では浸透性が低く、また細胞障害性の危惧も残されている。今後、より長波長の光を利用した光応答性デリバリーシステムの開発が望まれる。

参考文献

- [1] T. Nagasaki, K. Wada, and S. Tamagaki, *Chem. Lett.*, **32**, 88 (2003).
- [2] T. Hamada, Y. T. Sato, K. Yoshikawa, and T. Nagasaki, *Langmuir*, **21**, 7626 (2005).

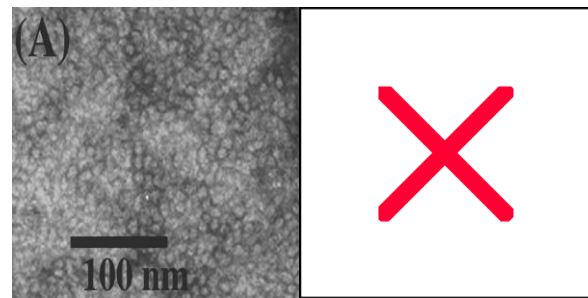


Figure 1. Transmission electron micrograph of KAON12 membrane before (A) and after (B) UV irradiation (365 nm, 3.5 mWcm⁻²) for 5min. The

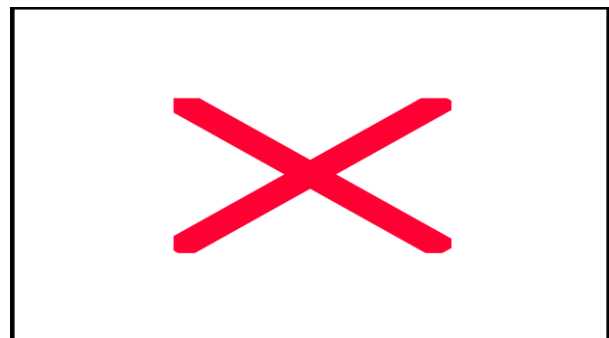


Figure 2. Transfection Efficiency of DNA Complexes with cationic lipids. DNA complex was formed using 1 mM lipid dispersion (7.7 μ L) and pGL3 (1 μ g). After that, transfection was carried out for three hours using COS-1 cells in a 24-well plate, and the activity of luciferase in cell lysate was measured 48 hours later to assess transfection efficiency. In order to investigate the effects of photo irradiation on transfection, after allowing cells to come in contact with complexes for three hours, UV (365 nm, 3.5 mWcm⁻²) was irradiated for zero or ten minutes, and the results were compared. The