

亜鉛イオンとプラスミド DNA の共送達による遺伝子発現上方制御

○朝山 章一郎¹, 松田 宏紹¹, 根岸 洋一², 川上 浩良¹(¹首都大院都市環境, ²東京薬大薬)

【緒言】我々は生体内必須亜鉛イオンキャリア/DNA 複合体による遺伝子発現上方制御を提案してきた。本研究では、我々が開発した遺伝子キャリアであるメチル化ポリビニルイミダゾール (PVIIm-Me) への亜鉛イオンの配位を試み、亜鉛イオンによる遺伝子発現上方制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、PVIIm-Me による亜鉛イオンとプラスミド DNA (pDNA) の共送達、および、亜鉛イオンによる転写因子 NF- κ B の活性化に基づく pDNA の核内移行の観点から、導入遺伝子の発現上方制御メカニズムを解析したので報告する[1]。

【実験】Zn/PVIIm-Me/pDNA 複合体の形成は、各成分の混合の順序を変えたアガロースゲル電気泳動実験等により、また、PVIIm-Me による亜鉛イオンの細胞内への送達は、亜鉛イオン特異的蛍光指示薬を用いた細胞内蛍光観察により、評価した。*in vitro* トランスフェクション実験は、ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) に対して、各種転写因子依存的なレポータープラスミドを用いて行った。

【結果・考察】ゲル電気泳動実験の結果、PVIIm-Me と pDNA を混合後、塩化亜鉛を添加した系が、他の混合順の系と比べて、フリーな pDNA のバンドが消失した。この時、塩化亜鉛添加に依存し、PVIIm-Me/pDNA 複合体と異なる粒径・ゼータ電位を示したことから、Zn/PVIIm-Me/pDNA 複合体の形成を証明した。得られた複合体を用いると、亜鉛イオンは効率的に細胞内へ取り込まれた。また、pDNA も効率的に取り込まれ、核内へ送達された。さらに、トランスフェクション実験では、NF- κ B の結合配列を有する pDNA を用いた時に、遺伝子発現が向上した。これらの結果より、亜鉛イオンにより活性化された NF- κ B が、共送達された pDNA と結合し、核内移行促進と転写活性化により、遺伝子発現を上方制御したと考えられる。

[1] S. Asayama, K. Matsuda, Y. Negishi, and H. Kawakami, *Metallomics*, in press.