

博士論文

DNA Origami による エクソソーム捕捉システムの開発

飯沼 良介

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

メディカル情報生命専攻

目次

1. 序章

- 1-1. DNA ナノテクノロジーについて
- 1-2. エクソソームについて
- 1-3. エクソソームの単離方法

2. DNA Tripod の構築

- 2-1. DNA Tripod によるエクソソーム捕捉コンセプト
- 2-2. DNA Tripod 構造のデザイン
- 2-3. 実験手法
- 2-4. 結果と考察
 - 2-4-1. DNA Tripod の角度制御性
 - 2-4-2. DNA Tripod 同士の凝集抑制

3. DNA Tripod / 抗体複合体の構築

- 3-1. DNA Tripod への抗体導入デザイン
- 3-2. 実験手法
- 3-3. 結果と考察
 - 3-3-1. DNA Tripod の精製と抗 CD-9 抗体の導入
 - 3-3-2. 捕捉抗体種の選定

4. DNA Tripod によるエクソソーム捕捉

- 4-1. 実験手法
- 4-2. 結果と考察
 - 4-2-1. エクソソームサンプルの特性
 - 4-2-2. エクソソームサンプルの粒子径
 - 4-2-3. 抗 CD-9 抗体/DNA Tripod によるエクソソーム捕捉
 - 4-2-4. アイソタイプコントロール抗体を使用しての検討
 - 4-2-5. DNA Tripod により捕捉されるエクソソーム粒子径
 - 4-2-6. 不活化エクソソームを使用しての検討
 - 4-2-7. DNA Tripod のエクソソーム捕捉における Kinetics
 - 4-2-8. エクソソーム捕捉における DNA Tripod の角度の影響
 - 4-2-9. エクソソーム捕捉挙動に影響を与えるファクターとその制御

4-2-10. 磁性ビーズ法でのエクソソーム捕捉挙動

5. DNA Tripod 同士の自己組織化による Polyhedra 構造の構築

5-1. DNA Origami 構造体のサイズスケールアップ

5-2. DNA Tripod の Polyhedra への自己組織化デザイン

5-3. 実験手法

5-4. 結果と考察

5-4-1. Polyhedra 構築における DNA Tripod のコネクターに関する検討

5-4-2. Polyhedra 構築における DNA Tripod Vertex 部の検討

6. 考察

6-1. DNA Tripod と既存の方法の比較

6-2. 洗浄ステップの導入とエクソソームのリリースについて

6-3. DNA Tripod の角度可変デザインとエクソソーム回収への応用

6-4. DNA タンパク質複合体システムの応用

7. Polyhedra 構造の Strands ダイアグラム及びシーケンス情報

8. 参考文献

謝辞

1. 序章

1-1. DNA ナノテクノロジーについて

1953年にワトソンとクリックにより DNA が二重らせん構造をとることが提唱され (Watson & Crick 1953)、1944年にアベリーにより発表された DNA が生命の遺伝情報を担っているという説が証明された (Avery et al., 1944)。その後 DNA の複製、転写、翻訳という遺伝に関わる一連のセントラルドグマの詳細な機序が明らかにされこの研究の過程において mRNA, tRNA, 遺伝暗号などに関する理解が進み遺伝が定義された。今世紀に入り遺伝子改変技術、シーケンシング技術が発展しゲノム医療に関する期待が一段と高まっている、テーラーメイド診断やさらには核酸医薬など DNA に関連する技術は今後の先端医療をけん引していくと予想される。

一方で DNA は遺伝伝達物質のみならず超分子構造体を作製するための材料としても注目を浴びている。DNA の遺伝情報をつかさどる4つの塩基、グアニン、アデニン、シトシン、チミンは一般的な B 型 DNA の二重らせん構造の中で一塩基間の距離が 0.34nm, 直径が約 2nm, 10.5 塩基対で1回転のらせん構造形成し非常に規則的な構造を保持している。この構造特性を利用して DNA をプログラムした通りの構造体を作り上げる DNA Structural Nanotechnology の理論が 1980 年代初頭に Seeman によって提唱された (Seeman 1982)。お互いに相補的な DNA strands を自己組織化させることによりプログラムした通りの DNA モチーフを作り上げるという理論は 1993 年に DNA Double Cross Over 構造 (DX 構造) として実験的に示された (Fu & Seeman 1993)。さらには 1998 年にこれらの DX 構造末端の sticky ends を利用したアルゴリズム自己組織化により 2 次元タイル構造が作製され、さらに原子間力顕微鏡により実際に可視化された (Winfrey et al., 1998)。その後本分野における研究が進められ、平面格子構造 (Mao 1999, Sha 2000)、ポリヘドラ (Zhang, 1994)、チューブ構造 (Rothemund et al., 2004; Yin et al., 2008) など nm オーダーで制御された種々精密パターンを保持する構造体が構築された。

このような DNA ナノ構造の研究はその後 DNA Origami と呼ばれる任意の構造体を構築する新しい技術へと発展する。ここでは長鎖 DNA に対して相補的なシーケンスを持つ短鎖 DNA をハイブリダイゼーションさせることで目的の構造体へと折りたたむ (folding)。DNA Origami の前身となる報告では PCR 反応により人工的に合成された 1,699 塩基の長鎖 DNA に対して 5 種類の 40 塩基からなる短鎖 DNA で folding することで Octahedron 構造が作製された (Shih 2004)。その後このコンセプトがベースとなり Paul Rothemund により DNA Origami 技術が開発された。2006 年 Rothemund は大腸菌から抽出した M13 ファージゲノム DNA (7,000 塩基) を Scaffold strand とし、ここに 200 種類の短鎖 DNA を加え folding することで大きさ 100nm 程度の任意の構造体を作り上げた (Rothemund 2006)。また本手法は 2009 年に 3D 構造にも展開され任意の 3D 構造体構築にも適用可能であることが示された (Douglas et al., 2009)。2015 年にはグラフ理論を使用した DNA Origami の

新しいソフトウェアが開発されさらに構造体設計の自由度が上がった(Benson et al., 2015)。2D,3D の構造体を構築する上では DNA Origami 以外の技術も開発されている。DNA Origami においては構築される構造物の大きさは Scaffold Strand の長さに依存する。それゆえアプリケーション幅の制限を受ける可能性もある。このような背景の基 Yin のグループは Single Strand Tile という手法を開発した(Wei et al, 2012; Ke et al, 2012)。ここでは Scaffold Strands を使用せず短鎖 DNA をハイブリダイゼーションにより組み上げ目的の構造体を構築することができ理論上は大きさの制限が取り払われた。このように DNA による構造体構築の手法はこの 30 年で劇的な進歩を遂げたと言っても過言ではない。

このような DNA 構造体構築の利点の一つはその構造上の任意の位置に機能性物質を導入できることにある。これまでの研究ではナノ粒子(金粒子、QD)(Liu et al., 2010; Kuzyk et al., 2012; Acuna et al., 2012)、たんぱく質 (Streptavidin, ビオチン、抗体、酵素)(Williams et al., 2007; Wilner et al., 2009; Fu et al., 2014)、アプタマー等(Chhabra et al., 2007; Rinker et al., 2008)の導入が報告されている。これらの機能性物質の導入によりプラズモン共鳴(Acuna et al., 2012)、電荷移動、光学カップリング(Aldaye and Sleiman, 2006)、抗体アレイ(Williams et al., 2007)、酵素によるカスケード反応(Wilner et al., 2009; Fu et al., 2012)、色素導入による人工光合成システム(Hemmig et al., 2016)、DDS システム(Douglas et al., 2012) などに関連する応用が提唱されており、いずれも機能性物質を nm オーダーで配置することにより初めて発現する特性に基づいている。また DNA 構造体における物質の配置は一般的なリソグラフィ技術では併用が難しい抗体やアプタマーなどの生物学的物質の配置ができることも大きな利点の一つであり、今後この特性を利用して更なるアプリケーション開発が期待される。

1-2. エクソソームについて

近年疾病の低侵襲、精密診断、さらには治療においてもその応用が見込まれる物質としてエクソソームが注目されている。エクソソームは脂質二重膜を有する直径が 30nm～100nm 程度の細胞外小胞体であり、細胞の多胞性エンドソームの中で産生される。このエンドソームの一部はリソソームによって分解されるが、それ以外の多泡性エンドソームが細胞膜表面に移行、細胞膜と融合をすることによりエキソサイトーシス機構に従い細胞外にエクソソームとして放出されると言われている。エクソソーム表面は細胞表面同様にリン脂質二重層により形成されるため表面脂質ラフトであるフィオチリン、コレステロール、LBPA、スフィンゴミエリンなどを含んでいる。また同様に、エクソソーム表面にはエンドソームに由来する小胞性タンパク質(Tsg101、Alix、ESCRTs など)や、膜輸送に関連する膜融合性タンパク質 (Annexin、Rab GTPase など) の他、エクソソームが分泌された細胞表面に発現しているテトラスパニン群のタンパク質(CD63, CD9, CD81 など)をマーカーとして表出させている(Llorente et al., 2013; Subra et al., 2007)。エクソソームはこれらの細胞内成分を細胞外へと排出する役割を担っていると考えられていたが 1996 年に Raposo らが B 細胞から分泌されたエクソソームによって T 細胞が刺激、活性化されると報告したことでエクソソームの細胞間情報伝達物質としての新たな機能が着目され始めた(Raposo et al., 1996)。

エクソソームは特に免疫細胞における細胞間コミュニケーションの分野でその重要性が認識されている。例えば樹状細胞は体内に侵入してきた細菌などの異物を取り込み、分解し抗原ペプチドまで断片化した後、それを MHC クラス II 分子により細胞膜表面に出させる。Montecalvo らは、In vitro もしくはアログラフト由来のエクソソームをマウスに注入ししての実験を行い、注入したエクソソームが樹状細胞間で受け渡しをされ間接的に抗原提示を促進し、その結果 T 細胞が活性化されている潜在的な可能性を示した。一方で、本報告においてはエクソソーム表面には T 細胞の活性化をするだけの共刺激分子の数が樹状細胞よりも少なく、エクソソームの分泌に富んだ白色球を移植しても CD4 陽性ヘルパー T 細胞を直接に活性化するだけのエクソソーム量を血中に循環させることは難しいことについても言及がされている (Montecalvo et al., 2008)。

またこのようなエクソソームを介した免疫系の発現に関する理解は次世代癌治療戦略にもつながることが期待され多くの研究が行われている。例えば Wolfers らは In vitro による実験において癌細胞由来のエクソソーム表面にはその癌細胞由来の抗原が提示されておりこれが樹状細胞に取り込まれることを示している。さらにはこのエクソソームを取り込んだ樹状細胞を担がんモデルマウスに注入することで、癌細胞の増殖が抑制されたことを報告している。本結果は癌細胞から分泌されたエクソソームが樹状細胞に取り込まれるとエクソソームに含有される癌細胞由来の蛋白質が樹状細胞によって分解され、その断片が MHC クラス I 分子により表面抗原として表出していることを示唆している。その結果

癌細胞に特異的な細胞障害性の T 細胞が活性化させているとの見解を示している(Wolfers et al., 2001)。こういったメカニズムを利用した効果的なワクチン開発も期待することができる。

一方で癌細胞もエクソソームを介して免疫細胞からの逃避機構を発現させているとの説もある。例えば Taylor らは卵巣癌患者の漿液由来のエクソソームを In Vitro においてナチュラルキラー細胞に作用させる実験を行った。その結果癌細胞を認識するための T 細胞表面の NKG2D レセプターの発現が低下しさらにはこれに伴い T 細胞へのアポトーシスが誘導されたことを報告している(Taylor et al., 2003)。他の例としては癌細胞由来のエクソソームがその表面に保持するプロスタグランジン E2 などにより CD11b と Gr-1 陽性の骨髄由来の免疫抑制細胞を腫瘍に蓄積させ、さらにはこの免疫抑制細胞から放出される IL-6 や VEGF などの腫瘍増殖因子で腫瘍が成長していくことがマウスによる実験で示されている (Xiang et al., 2010)。また癌細胞から放出されるエクソソームには Fas リガンドや TRAIL を乗せているものがあり、これらが免疫細胞に接触してアポトーシスを誘導することが In vitro におけるアッセイ系で示されている(Andreola et al., 2002)。

免疫系以外でもエクソソームは癌の悪性化に関連していると言われている。例えば神経膠腫では上皮成長因子受容体(EGFR)の一部が欠損しリガンドによるシグナリングがなくても常に活性化している EGFRvIII と呼ばれる変異型が存在する。Al-Nedawi らは In vitro におけるアッセイで EGFRvIII を発現しているグリオーマ細胞(星細胞腫のセルライン U373)から抽出したエクソソームをアクセプターとなる U373 細胞に振り掛けると、この分子が発現していない別のグリオーマ細胞にも受け渡されることを報告している。EGFRvIII はその後特定の遺伝子群(VEGF, Bcl-xL など)の発現を誘導しがん細胞の悪性度を上げることが示唆されている(Al-Nedawi et al., 2008)。その他エクソソームは癌領域において前転移ニッチ形成や繊維芽細胞の活性化につながることをマウスによる実験で示されている (B. Casta-Silva et al., 2015)。これら癌とエクソソームの関連性に関する理解は次世代の癌治療戦略を考える上でも重要と考えられる。

初期のエクソソーム研究は内包されるたんぱく質に焦点をあてた研究が盛んにおこなわれてきたが 2007 年に Valadi らにより肥満細胞のエクソソーム内に mRNA と miRNA が安定に存在していることが示されエクソソーム研究が新たな展開を迎える(Valadi et al., 2007)。RNA は血中においては RNase の影響により短時間で分解され一般にバイオマーカーとしての機能には乏しいと考えられてきた。しかしながら本報告により脂質二重膜でおおわれているエクソソーム内部においては mRNA や miRNA が安定に存在し、さらには mRNA が他の細胞内で翻訳されて機能する可能性が示された。ここではマウスのエクソソーム内包性 RNA がヒトのマストセルに取り込まれ、そこで蛋白質を発現していることが In Vitro の実験で示されエクソソームが種を超えて作用する可能性についても述べられている。この報告によりエクソソーム内包性 RNA の疾患バイオマーカーや情報伝達物質としての機能に関する研究に注目が集められた。

エクソソーム内包性 RNA に関しては近年特に miRNA が疾病へ及ぼす機能、診断マーカーとしての可能性に関する報告も増加している。In Vitro における実験系で miRNA の機能については 2009 年には Kosaka らにより分泌型 miRNA が細胞間を移動しレシピエント側の細胞で機能する可能性が示されている(Kosaka et al., 2010)。ここでは癌抑制遺伝子である miR-146a を強制発現させたヒト胎児腎臓細胞株 HEK-293 とアフリカミドリザル腎臓由来細胞株の COS-7 の培養上清から回収したエクソソームを前立腺がん細胞株に添加すると特定のキナーゼを抑制し細胞増殖が抑制されることが報告されている。その後、Pegtel らによる B リンパ芽球細胞由来エクソソーム EBM-miRNAs の単球由来樹状細胞への伝達(Pegtel et al., 2010)などの報告もされている。

以上に挙げたようにエクソソームは細胞間コミュニケーションにおいてタンパク質や遺伝情報の伝達において重要な機能を果たしており、これらの機能を解析することで次世代の疾患治療戦略にもつながる可能性が示唆されている。一方で細胞間コミュニケーションにおいて提唱されたエクソソームの機能についてはさらに慎重に議論をする必要があることも事実である。以上に挙げた報告例ではあらかじめ多量に調製したエクソソームサンプルを In vitro における培養細胞に添加、もしくはマウスへ注入してその後の機能発現を確かめるといった検証となっている。多くのクロストークがある人の体内において、これらの実験系と同じ様にレセプターとなる臓器に受け渡され、機能するのか更なる検証が待たれる。

エクソソーム内包性の miRNA の診断マーカーとしての応用も興味深い。本領域における研究では患者検体から抽出されたエクソソーム中の miRNA プロファイルから疾患特有のマーカーを探索しており、臨床応用に向けた検証が盛んに進められている。例えば 2008 年の卵巣がんの患者において 8 種類の miRNA が腫瘍組織と血清中のエクソソームで高いことが示され(Taylor et al., 2008)、さらには良性と悪性腫瘍の差別化ができる可能性が示されたことを始めとして、その後、膠芽腫(Skog et al., 2008)、非小細胞肺がん(Rabinowits et al., 2009)、膀胱がん(Brayton et al., 2012)においてもエクソソーム中の miRNA が疾病マーカーとして機能する可能性について報告がされている。

全体として黎明期にあると思われる本エクソソーム研究を実用化につなげる上においては、エクソソームの機能、バイオマーカーとしてのさらなる研究が必要である。ここで一つ重要な「鍵」となるのがエクソソームの単離手法である。現在、エクソソームの定義にはまだ曖昧な部分も多く、本分野における更なる研究発展のためにもエクソソームをより精密、かつ安定的な手法に基づき分離する手法が求められている。現在、母集団の小胞体群をエクソソーム分画へと絞り込むために小胞のサイズ、表面マーカー、密度、電荷などのファクターに基づき種々エクソソーム分画の単離手法が提案、開発されている。以下にその詳細について述べたい。

1-3. エクソソームの単離方法について

エクソソームは細胞外分泌小胞(EVs)の一種と分類することができる。EVsは細胞から分泌されるあらゆる小胞体を指し示す用語として提案されているが(Lotvall et al., 2014)、この中には細胞がアポトーシスを起こす際に生じる破片であるアポトーシス小胞(Caciola-Rose et al., 1994)や細胞膜の出芽に伴い生成する大きさが200~1000nm程度のマイクロベシクル(Beaudoin et al., 1991)も含まれる。エクソソームはこれらヘテロなEVs集団の中のサブクラスにあたる。エクソソームは実際には血液、尿、唾液などに存在するが、この系中にはエクソソームに特徴的な粒子径とされる30-100nmと同等の粒子径を持つ血小板由来のマイクロ粒子やウィルスやコレステロール由来の粒子などが含有されている(Colombo et al., 2014)。エクソソームを用いた精密診断や治療への実用化においてはこれらの極めてヘテロなEVs集団の中からよりの確に目的とするエクソソーム分画だけを単離する技術が必要になると考えられる。

エクソソームの単離方法としてはいくつかの手法が知られている。現在一般的に使用されている手法は①遠心分離法 ②フィルター法 ③沈殿法 ④アフィニティ精製法に分類することができる。遠心分離方法は最も古くから実施されており、現在でも最も一般的な手法と言える(Momen-Haravi et al., 2013; Jeppensen et al., 2014)。この方法は分画遠心法と密度勾配遠心法の2種類がある。分画遠心法では最初に300-500×gの低速遠心を行い、10,000-20,000×gでの高速遠心、100,000-200,000×gの超高速遠心とステップを踏むことで系中の細胞破片、マイクロベシクルなどの粗大粒子を除去し最終的にエクソソームに特徴的とされる100nm前後の小胞分画を単離する(Thery et al., 2006)。密度勾配法においてはスクロースなどで密度勾配を形成させた溶液上にサンプルを添加して超遠心を行うことで、密度に合った層に小胞体を振り分ける手法になる(Iwai et al., 2016)。分画遠心法と密度勾配遠心法を組み合わせることで高度な精製が可能であるが、超遠心機が必要かつ作業が複雑で処理量も少ないということに加え遠心力による小胞破壊の可能性が指摘されている。

フィルター法では固有の孔径を持つフィルターを用いてEVsの母集団を分類していく方法である。0.1-0.22μmのフィルターやさらに小孔径の限外ろ過フィルターを用いることが一般的である(Cheruvanky et al., 2007; Merchant et al., 2010)。超遠心法と比較して比較的大量にそして簡便に粒子径特異的にEVsの分画ができ、他のエクソソーム単離方法における前処理としても有用な手法である。一方でフィルターの孔径だけでの分画となるためエクソソームとされるEVs以外の粒子も当然系中には混入する。小胞体母集団のより正確な分画という点においては課題が残る。

沈殿法はポリエチレングリコールなどのポリマー存在下で特定のEVs分画を遠心、沈殿させる方法である(Chen et al., 2013)。超遠心法のような高い遠心力を必要とせずインタクトなEVsを大量に手軽に回収できる方法である。EVsの単離以前にもDNAや抗体の精

製で幅広く用いられており手軽に実施できるがその一方、本手法においては系中の蛋白質など夾雑物や沈殿に使用するポリマーも含有されるという課題が残る。

アフィニティ法においては上記に挙げたサイズや密度の違いを利用した EVs の分離ではなくエクソソームに発現する表面マーカーをターゲットとしてこれらに対する特異的な抗体を用いてエクソソームを回収する手法である(Kanwar et al., 2014)。本手法に関しては磁性粒子上に抗体を結合させた製品やクロマトグラフィー内部に担持させた抗体によりエクソソームを免疫学的に捕捉する製品が開発されている。本手法により得られる粒子はエクソソーム表面の抗原をターゲットとしているため純度の高いエクソソーム分画を単離可能である。一方でエクソソーム表面抗原に関してはエクソソーム以外の粒子にも発現していることが知られている。例えば CD-9 抗原は血小板にも発現していることが知られているため本手法においてもエクソソーム以外の夾雑物の混入は避けられない。

以上のように現在 EVs からのエクソソーム差分化にはオーソドックなものとして粒子径、密度、アフィニティの方法が提案されているが、今後実際にエクソソーム研究を応用に結び付けるためにはより精密なエクソソーム分画手法が必要になると考えられる。例えば体液から回収される EVs をさらなる特定サブクラスに分類できれば疾患情報における質の向上や特定の部位に指向性の強いエクソソーム DDS の応用にもつながる。しかしながら現在市販されている手法は粒子径、密度、アフィニティとそれぞれが独立のファクターに基づいているため小胞体母集団を特定サブクラスへの絞り込みをする上では限界がある。もちろんいくつかの手法を多段階に展開することでより特定の分画へ絞り込むこともできるがその場合収率や手間などの観点からの課題も残る。また従来粒子径分布に基づく分画手法(遠心法やフィルター法)ではサイズごとの精密な分離能力には乏しいのが現状である。

このような現状においてエクソソームのより精密、かつ容易な分離手法はエクソソーム研究における課題としても捉えられている。まだ実用化には至っていないがエクソソームの差分化手法に関しては研究レベルでは種々の方法が提案されている。サイズ分離性に着目した手法に関しては以下の報告がされている。例えばレーザー光により暗視野照明と粒子のブラウン運動からエクソソームの粒子径を求めることができるがこの散乱強度からエクソソームを差分化する試みが行われている(C. Gardiner et al., 2014)。また Toner のグループは高さ 20um, 幅 19mm 程度のマイクロ流路の底面に抗 CD63 抗体を結合させ、エクソソームを捕捉するシステムを開発している(Chen et al., 2010)。このようなマイクロ流路を使ったデバイスでは原理上は、エクソソームがプローブ壁から受ける力とストークス抵抗のつり合いを利用して捕捉するエクソソームの粒子径を制御することも可能である(Kato et al., 2003)。マイクロ流路によるエクソソームのサイズ分離手法としては他には音響電気泳動と呼ばれる超音波を利用した方法(Lee et al., 2015)も提唱されている。また流動場分離法というナノ粒子の流体中での流れ方の差を利用した手法もある(Peterson et al., 2014; Sitar et al., 2015)。その他リソグラフィーにより作成したナノピラーを導入したマイ

クロ流路によりある一定の大きさ以上のエクソソームをふるい分ける方法も報告もされている (Yoon et al., 2016)。

いずれの手法も診断や治療への実用化を見据えて簡易的な操作でエクソソームが分離できる手法である。一方でここに挙げたいずれの手法もエクソソームの分画精度が低く、数十 nm 分解能で分画、精密分離できるシステムにはなっていない。また、エクソソームの分画では、サイズのみならず、由来を反映すると考えられる表面マーカーを用いた特異性分画(純度)も重要であると考えられるが、エクソソーム表面の抗原特異性との組み合わせを利用したシステムは Toner のグループのシステム(Chen et al., 2010)によるもののみとなっている。そこで本研究においてはサイズと特異性(純度)の両方の指標で同時に分画し、母集団となる EVs から、特定の表面抗原を持つエクソソームをより厳密なサイズ範囲に限定して捕捉できるシステムの開発を目指した。このようなシステムが確立できれば、エクソソームの特性そのものに関する基礎的な理解がさらに進み、エクソソームを使った精密診断や治療に関するアプリケーションの実用化を推し進める一因にもなると期待される。

2章 DNA Origami Tripod の構築

2-1. DNA Tripod によるエクソソーム捕捉コンセプト

母集団となる EVs から特定のサイズと表面抗原を持つエクソソーム分画のみを捕捉するシステムを考案するにあたって自然界におけるシステムを参考にすることができる。例えば酵素の基質特異性を発現する鍵-鍵穴モデルが挙げられる。ここでは酵素の活性部位がターゲットとなる基質の形状と合致する立体構造を持ち、このことにより分子間力、アミノ酸残基との水素結合、疎水性相互作用などを最大限に働かせエントロピーを最小状態に導き特定の基質だけを認識、捕捉している。酵素の基質を捕捉するこの鍵穴となる立体構造は特定の amino 酸配列からなる高次構造により実現されるものであり、この精密性をそのままに再現することは容易でないが、特定の立体構造に加え捕捉対象物との相互作用も利用しターゲットを捕捉するという考えは EVs 母集団から特定のエクソソーム分画のみを捕捉する上において利用することができる。

今回目的に定めるシステムはエクソソームをより厳密なサイズコントロールとエクソソーム表面抗原との特異性を両立させ捕捉することが重要となる。この際、EVs 母集団をより精密に差別化することも視野に入れ、構造体の形状を nm~数十 nm 精度で設計可能なことが理想と言える。例えば Fig2-1 に示すように特定のサイズを持つエクソソームをロッド構造が形成する角度内部で捕捉できた場合、ロッド間の角度を変化させることで特定の大きさのエクソソームを捕捉できると考えられる。またエクソソーム表面の抗原を認識する抗体などのリガンドをその構造体上に導入できるればエクソソームを表面抗原特異的に捕捉することも可能と考えられる。DNA Origami はこのような精密構造制御性とその構造上へリガンド導入を実現できる技術の一つと考えられ、本研究においては DNA Origami と抗体の複合体を利用したエクソソームの捕捉システムを考案し検討を実施した。

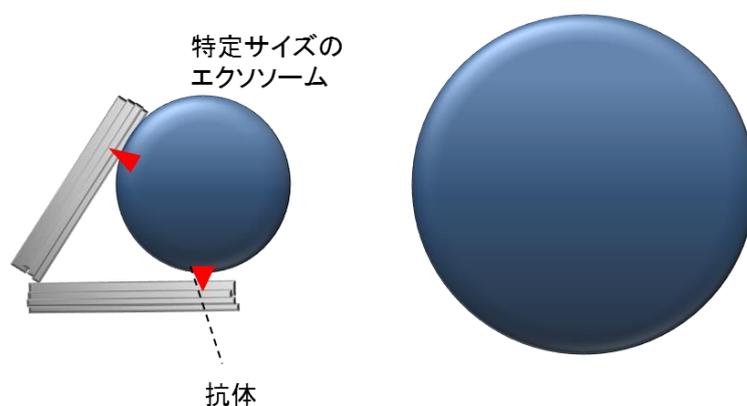


Figure 2-1. 精密構造体による特定サイズのエクソソームの捕捉コンセプト

2-2. DNA Tripod 構造のデザイン

本研究においては DNA Origami 技術により内角が精密に制御された Tripod 構造(以後 DNA Tripod)を作製しこの DNA Tripod の各辺の内面にエクソソームのテトラスパニン抗原を認識する抗体を導入する。小胞母集団は DNA Tripod の三辺の内面に設置された抗体で認識され捕捉されるサイズと表面抗原との特異性という二つのファクターを満たした小胞体のみが捕捉できることになる。例えば 60°の角度を持つ DNA Tripod 構造の場合は 40nm のエクソソームが捕捉できる設計になる(Fig 2-2-(1) A)。

DNA Origami の 3次元構造デザインにおける基本構造は DNA 二重鎖の束ね合わせである。この際 DNA 二重鎖を束ね合わせる配置にはハニカム配置とスクエア配置が存在する(Fig 2-2-(1) B, C)。ハニカム配置は DNA 二重鎖を長軸方向に六角形状に配置する。DNA Origami 形状が作製される際、Scaffold Strands が長軸方向の途中で折り返しされ、Staple Strands とハイブリダイゼーションしお互いに隣り合う DNA 二重鎖が形成されていく。ここで B 型 DNA は 21 塩基で 2 回転(720°)、つまり 7 塩基ごとに正確に 240°回転する性質を持つことを考慮する必要がある。ハニカム配置はこの B 型 DNA の特性に合致し塩基が 7 塩基(240°)、14 塩基(480°)、21 塩基(720°) 進んだ地点で正確に Scaffold Strands の折り返しと Staple strands による隣り合う DNA 二重鎖同士のつなぎ合わせが可能であるため、長軸方向へのねじれや歪みはほとんど生じない(Douglas et al., 2009; Dietz et al., 2009; Ke et al., 2012)。一方でスクエア配置は DNA 二重鎖を長軸方向に四角形に配置する方法である。そのため Scaffold Strand の折り返しと Staple strands による DNA 二重鎖同士のつなぎ合わせは 90°、180°、270°、360°のどこかで行う必要があるが、B 型 DNA の特性上正確にこれらの角度と一致する塩基数は存在しない。例えば 360°の回転に最も近い塩基数は 10 塩基、もしくは 11 塩基となるため、そのどちらかの塩基数で隣の DNA 二重鎖への折り返しが必要となってくる。このような理由からスクエア配置においては長軸方向にねじれや歪みが生じやすい特性がある(Ke et al., 2009; Woo & Rothemund 2011)。本研究における DNA Origami のデザインは DNA Tripod の各辺により生じるゆがみを抑えるためハニカム配置でのデザインを行った。

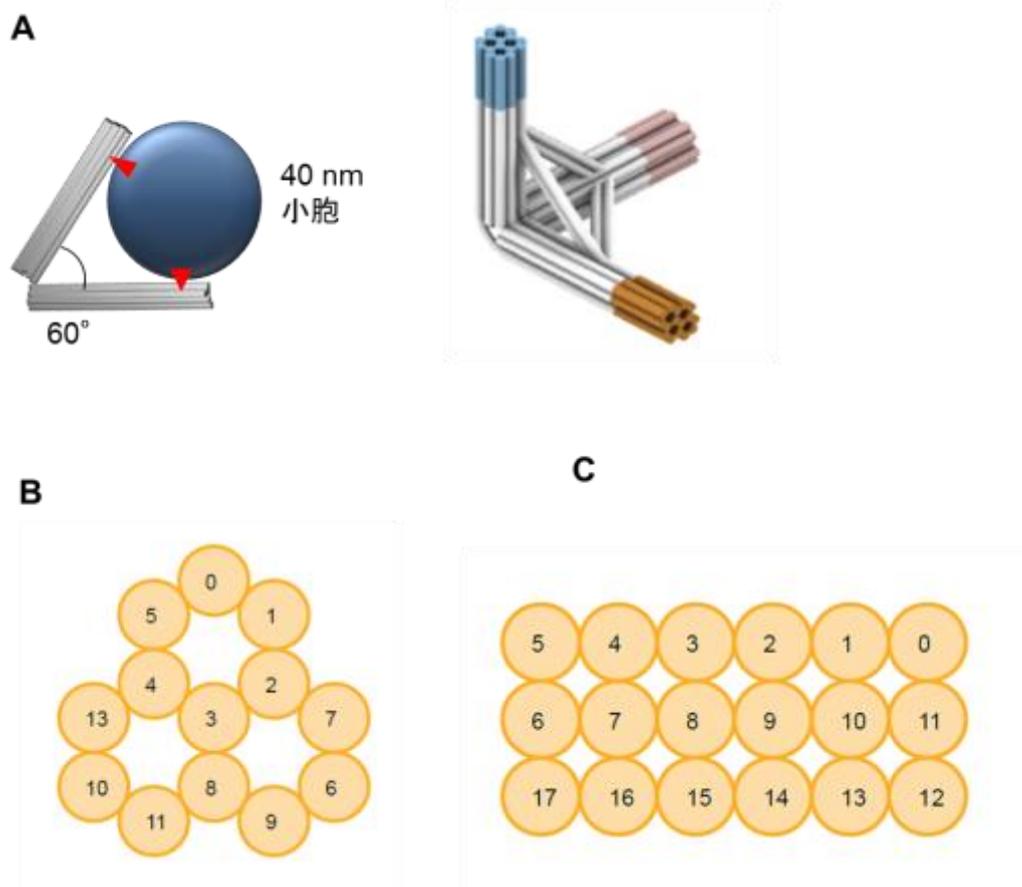


Figure 2-2-(1). DNA Tripod デザイン

- A. 60° DNA Tripod で捕捉されるエクソソーム(40nm)の概念図と DNA Tripod 模式図
- B. DNA Origami 構造におけるハニカム配置の一例。各円は DNA 二重鎖の断面を表す。
- C. DNA Origami 構造におけるスクエア配置の一例

検討に使用する DNA Tripod はオープンソフトウェアの Cadnano(MIT Licenced, ver2.2.0)を使用し設計した。DNA Tripod の一边はハニカム配置により DNA 二重鎖が 16 本結束した構造体をとる(Figure 2-2-(3) A)。また DNA Tripod の各辺の長さは 50nm となり、各辺における最内面の DNA 二重鎖は Tripod の頂点で Scaffold strand により結束されている(Figure 2-2-(3) Bにおける 12,13 番の DNA)。Scaffold strand に作用させる Staple strands は約 20~40 塩基程度の鎖長となっており、隣り合う 2 本~3 本の DNA 二重鎖にハイブリダイゼーションしお互いの DNA 二重鎖をつなぎとめている (Fig 2-2-(3) B)。

DNA Tripodの辺間の角度はつかえ棒(Strut)として作用する2本のDNA二重鎖を導入することにより形成した。ここで Strut は使用する Scaffold Strand と複数の Staple strands とのハイブリダイゼーションにより形成され(Fig 2-2-(3) C)、長さは約 28nm と DNA 二重鎖の持続長である 50nm よりも小さな値に設定している。持続長についてはフィラメントの熱力学的な変形に対する抵抗力を表すパラメーターであり、フィラメントの熱力学的な変形が感知できる最少のフィラメント長さとして理解される。フィラメント両末端の角度を $\theta(0)$ と $\theta(s)$ とし、フィラメントの長さを s とした時、持続長 L_p は以下の式で定義される。

$$\text{時間平均 } \text{Cos}[\theta(s)-\theta(0)]=\exp(-s/2L_p)$$

これは時間平均 $\text{Cos}[\theta(s)-\theta(0)]$ の値はフィラメントが長くなるに従い指数関数的に減少していくことを表している。直観的には、フィラメントが長くなるに伴い $\theta(s)$ と $\theta(0)$ には相関がなくなり両角度は $0\sim 2\pi$ の間の値を自由にとるため $\text{Cos}[\theta(s)-\theta(0)]$ は時間平均的には 0 に近づくということになる。一方、フィラメントが大きな持続長を持つ場合はフィラメントの長さが増加しても両角度の相関は保たれやすい傾向になる(Fig 2-2-(2))。

30nm の長さで導入されたこの DNA 二重鎖は熱力学的な運動による構造変化は概ね無視され剛直な支え棒(以降 Strut)としての役割を果たすと考えられる。今回の検討においては 28nm の Strut を Tripod の頂点から約 29nm の位置に導入することにより辺間の角度が約 60° に形成されるように設定した。Tripod の角度は Strut の長さを約 30nm 付近に維持しながら、Strut の各辺への導入位置を変更することで変更することができる。後述する $90^\circ\text{-}90^\circ\text{-}90^\circ$ DNA Tripod に関しては Strut の長さを 30nm に設定し DNA Tripod の頂点から 21nm の位置に導入した。

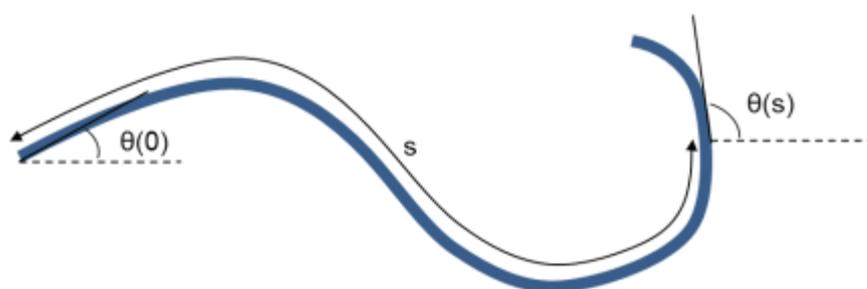


Figure 2-2-(2) フィラメントの熱力学的な構造変化と持続長

(Mechanics of Motor Proteins and Cytoskeleton (Howard 2001), Chapter 6, Page 110 から抜粋、改編)

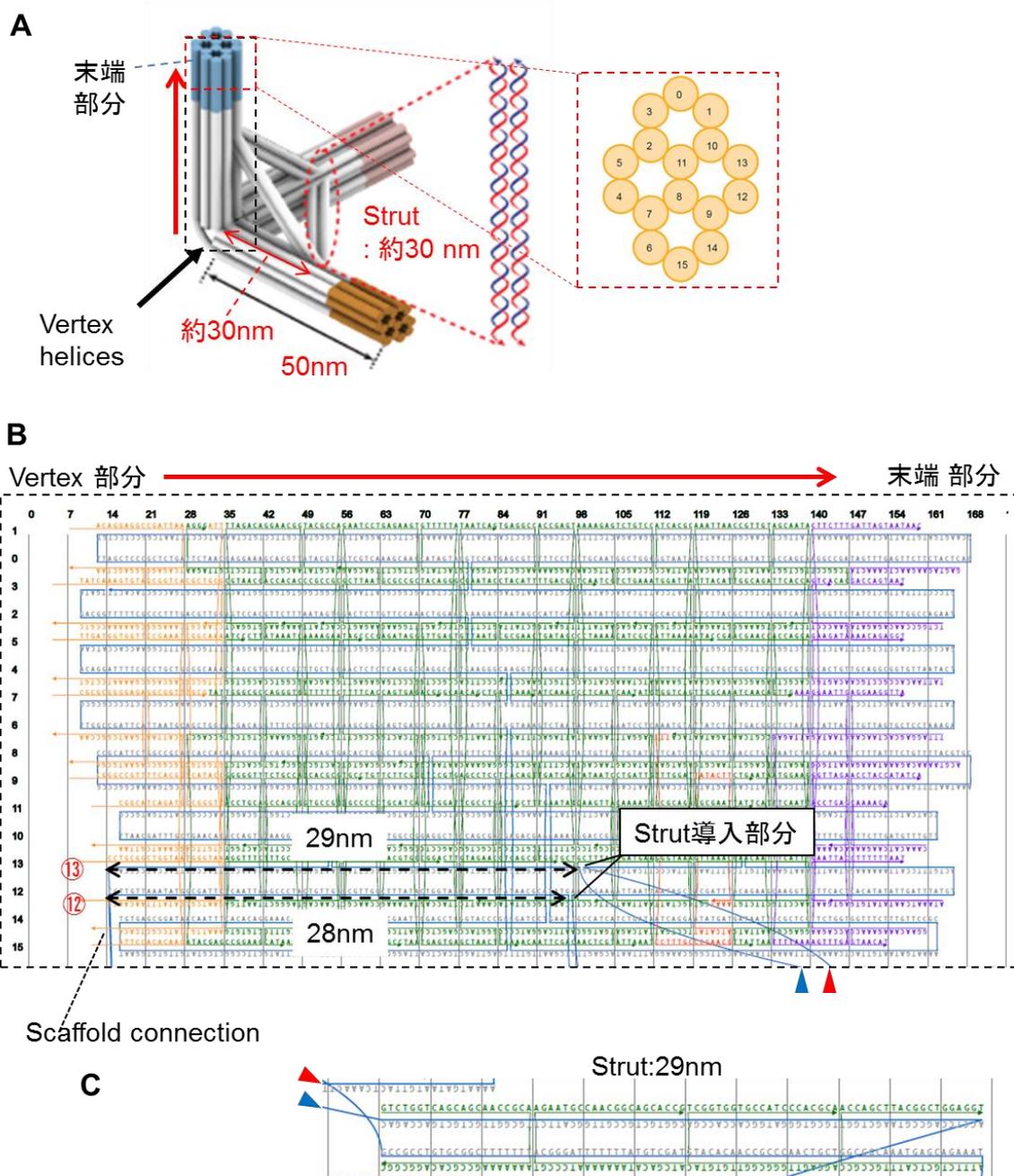


Figure 2-2-(3). DNA Tripod のデザイン詳細

A. DNA Tripod 各辺における DNA 二重鎖のハニカム配置図。

便宜的に 0-15 までの番号を設定する。

B. DNA Tripod 各辺の展開図。図 A において DNA 二重鎖に設定した番号に対応して

各 DNA 二重鎖に番号が振られている。

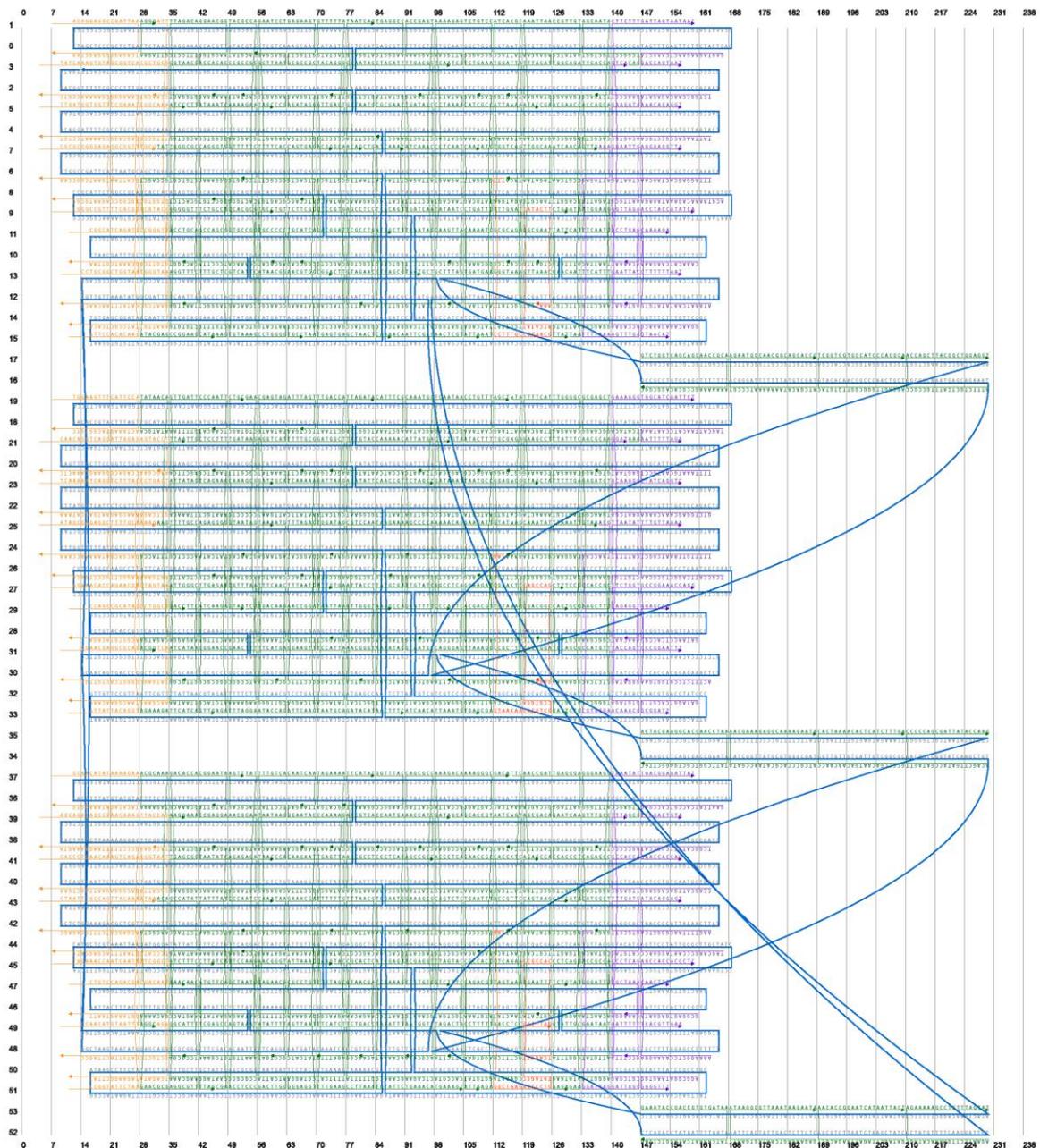
青線が Scaffold DNA strand を表し緑線、オレンジ線、紫線が Staple strands を表す。

2-3. 実験手法

DNA Tripod デザイン

DNA Tripod のデザインはオープンソフトウェア Cadnano (MIT licensed, ver2.2.0)を用いて行った。以下にデザイン詳細を示す Strand Diagram と使用した Staple strands に関するシーケンス情報を示す。

◆DNA Tripod(60° -60° -60°)の Strand Diagram



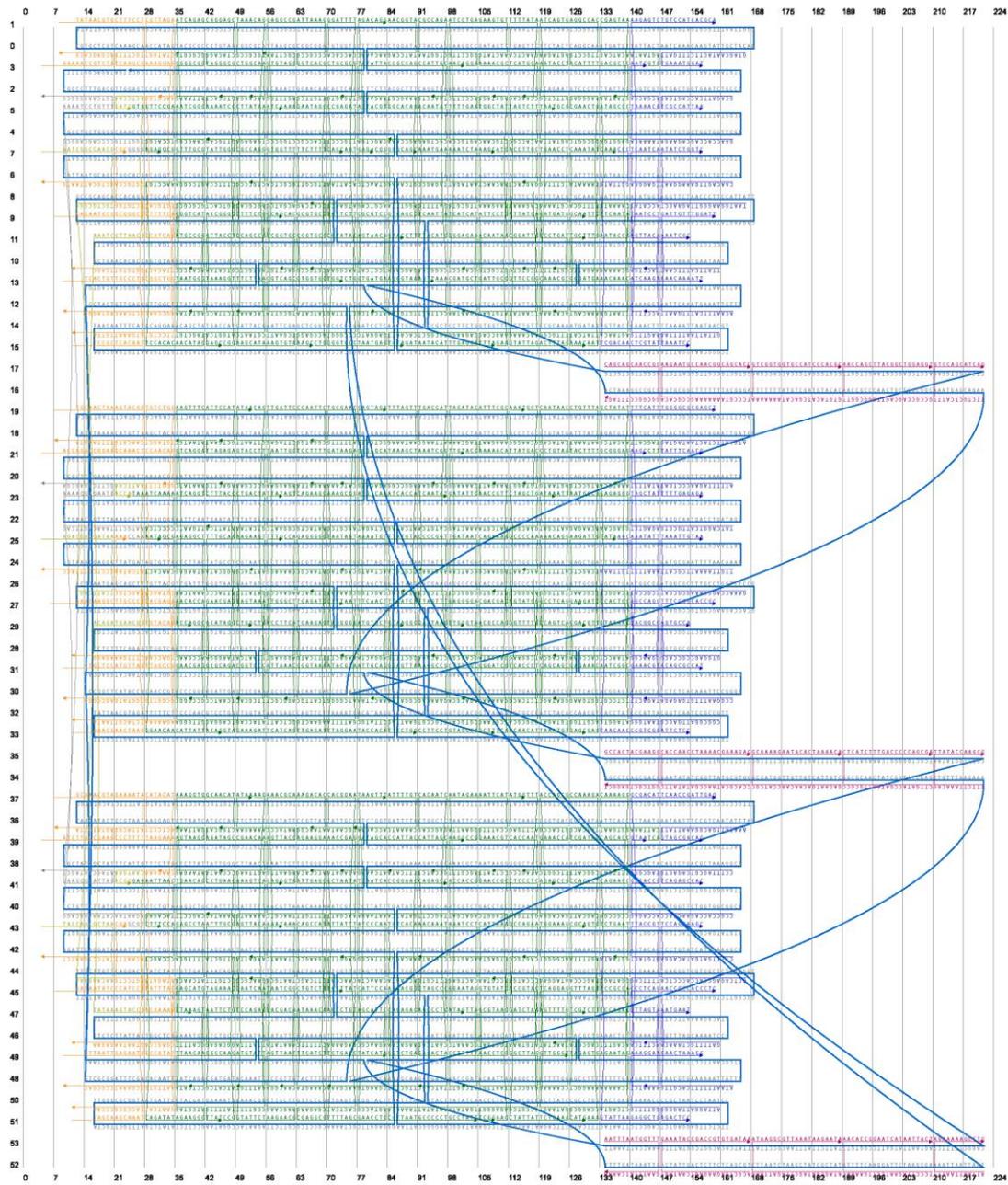
◆DNA Tripod(60° -60° -60°)に使用する Staple Strands のシーケンス情報-1

開始地点	終了地点	シーケンス	シーケンス数	メモ
1[84]	13[73]	TGAGGCCAACGCTCATGACGCTACTGGTTTACAGCCTCCGGA	46	DNA Tripod 主要部分
0[54]	2[45]	ACGTATTACGCCACCACAAACATCCCTAGCCAGCGAAAG	38	
3[102]	13[94]	TCGATTGCAACAGGAAACCGAGTGTTTTTTTGGT	45	
3[144]	11[129]	CAGCTGGGCTTGGTGGTAGCAATATAATTACATTTATGTATT	32	
2[44]	6[52]	AACATAAATCAAAAGAGCAGCAAGTTTTCTCCA	35	
2[51]	15[45]	ATTGTCCGGCACTGGCGCACGGGTATAGCTGTTCCTATA	42	
2[72]	1[83]	AGTGAACGATTCCGCTGTGGTGGTAACTCAG	31	
2[93]	12[101]	ATGTGAATACACCTTTTTGATCAATAAATCTTTC	35	
2[107]	6[115]	GACCATCGCCATTAAAAATGAAATGGTCAGTACA	35	
2[114]	15[108]	TGGCGCAGAAAGATGAATTTGGATTCTGATTATCAGAATTA	42	
2[135]	15[129]	ACCTTCAATTTAGATTTATGAAAGGAGCGGAATTTCTTAT	42	
5[39]	1[31]	CTTGTGGACTGGTAACTTTCTCGTTAGAAAGGG	35	
5[123]	10[115]	CGAGTAAAGATTTACATAGAACAATATACCACACGCGCGT	42	
4[83]	2[94]	CCCTTCAGTAAATGGTCTTTCGCAATACCTACATTTGACGCTTGA	46	
7[32]	12[38]	TATGCCAGCTATACGAGCCGGAAGCTGTGGGGGGTTTTAAT	42	
7[74]	12[80]	GCCAGTGTGGTGGTGAAGTAACTGGGTACCAAGCTCCCAAA	42	
7[81]	15[66]	CTGGAGAAACAATAAACGGTCCGTGGAGTCAAAATCGTTGCC	42	
7[91]	7[89]	ATGAAACATTAAGCTTTAGCATTTATGGAGCT	32	
7[109]	3[101]	ATCATCTAAAGCATCACCTAAAAAATTTTTCAA	35	
6[51]	9[59]	GTCTGTAAAGCTGGGGAATCATGTGCC	28	
8[44]	5[38]	TGTCAAGGTGGCGGTCCACGCTGGATCC	28	
8[65]	5[59]	AGCCAGTGAAGCCCTGAGAGAGTTTAAAG	28	
9[60]	10[66]	TGTCCAACGCATAAACGAAAGTGGCGGC	28	
9[130]	5[122]	ATATCAGGTTATCAACAGAGCCAGCAGCAAAATAC	35	
11[88]	4[84]	CTTGGTATTACCGCACTGATAGCTTGGTGAACCTTG	38	
11[130]	7[136]	CATTGAAAGCAAGAACCAACAGCAGCAAGCTGGTTG	35	
10[37]	2[52]	GGTTTAGACAGGAAACGGAAGTGCACCAACCCCGCCCACT	42	
10[58]	2[73]	CATGAATCCTGAGAAGTGTCTTGGCGCGCTACAGGGTTC	42	
10[65]	7[73]	CAGTGCATCATTGAAACAGATAGGGTGAAGTCCGCTGACGG	42	
10[100]	2[115]	TCCAAAAGAGTCTGTCCGCCAGCTCTGAAATGGATTATACG	42	
10[114]	7[108]	TCCGGTAAACCGCTAATTAATCTGATTTGATACAGAAT	42	
10[121]	2[116]	TTGAAATTAAGCTGGTAAATCTGGAGATTCAACCATCTG	42	
13[74]	8[66]	CTTTACCAAGTATAAGCTTTCGCTCC	28	
13[95]	7[90]	GCTTCATATGCGTTATACACAGTACATCGGATCAAAAT	38	
12[37]	8[45]	TGAAGTTCTTTGCTCGTCTTCTCAACAGTAGGGCTCTGCCACGC	49	
12[79]	11[87]	TTGTTAGAAGCTCAGCGCTCTCGATTG	28	
12[100]	2[108]	CCTGCTTAAAGTGAATGAAGCAAAACCAAAATCCACA	35	
12[121]	9[129]	CGTGTAAACGAACAATTTCAATTTAACTTGGTCTGTCTGA	42	
15[46]	10[58]	AAAGGAGCACTGTGGTGGCGCCGCTTACTGACCACT	42	
15[67]	10[59]	TAACTCACTGCCGCTTTTTTCCAGCAGTGTTCGCCCAAGCA	42	
15[88]	15[87]	ACAATTCGCAACCTGGTGTAGGCAATTCAGGATCCCCAAA	42	
15[109]	10[101]	AATGAGGATTTAGAAGTCTCAATTAACAGTCAAGTTAGCGG	42	
15[130]	10[122]	TAAACCGTCAATAGATAAATGGCAATAACTGGCGGAATCTGA	42	
17[147]	16[147]	GTCTGGTCAAGCAACCGCAAAAGGAGCCGACAGCGCGC	42	
16[188]	17[188]	ATCGCATAAAAAATCCGTTAGATTCGCAACGCGCACCGC	42	
16[209]	17[209]	AGCAGTTGGCGGTGTGTACTCGTGGTGGCATCCACGCA	42	
16[229]	17[229]	ATTTCTGCTCATTGCCCGCACCACTACGGCTGGAGGT	40	
19[53]	20[45]	GAACGACCAACTTGAATCAAGATAAT	28	
19[84]	28[73]	CATTTGAGCTAAATCGGTGAGCTTAAATTTGACCAAGAG	39	
19[116]	26[108]	ATAAGCAGCGCCGCTTTAGAACAACGGGATCGGAAGATTTAT	42	
18[44]	29[52]	CATCTCCTTTGATAGCGCGTTTTGTAA	28	
18[65]	20[73]	GAATTTTGGGATGGCTAGCC	21	
21[39]	31[31]	TTGGTTTAAATATGCATATAACACAGATGAACGG	35	
21[102]	28[94]	GTAGCCTCAGAGCATAAACAATGGAACG	28	
21[144]	29[129]	AAATCATACGCAAGGGCGAGCTGGCGAAGCTAGTCACT	42	
20[44]	24[52]	TGCTCAGAAGCAAGGCCCCCTCGTAATAGGCAA	35	
20[65]	24[73]	CTTTCAAAAAGATTAAAGCTCATATGGATAGGAAAT	31	
20[72]	19[83]	CGATAAATAAAGTTGGTGGCTACTTGAATA	35	
20[93]	30[101]	ATCGGTTTCCGGAAGTTGATCGGCTGAAAC	35	
20[107]	24[115]	CCGTAAATCCCGGAGAGGGCATGTGATTAAGAAA	35	
20[114]	33[108]	AGATGAAAACTTCCGCGCACTCTGCGCAGTTTGAAGTGA	42	
20[135]	33[129]	AGGAAGCTTTGAAGGCGCAGCCGCTGGCGCATCGTAAGATT	42	
23[123]	19[115]	CTATCAAAAGGAAGCCTTTAGCAAAAATTAAGAGCT	35	
22[97]	23[97]	CGGTTGATAATCCTGGGGAATAGATAATCAACCGTCTAGCT	42	
25[32]	30[38]	AAAGTTTACCAAGAAAGATTCAATTAATAATGGGCGTGTG	42	
25[60]	18[66]	ATCGAAATCATGCAAGCTAAAGCAGTATAGTTAGTGTGCT	42	
24[51]	30[60]	CACCTTAGAATACCACCGTTGGGTTCAACGCA	34	
24[72]	30[80]	TACTAATGCAAGTACATGCTCATTTACCTGGG	35	
24[90]	27[73]	GCCAGCGCAAAAGCTCAATGCTGCAAGCGTTATTG	39	
26[44]	21[38]	CTGAGAGGGAAATGCTTTAAACAATTTAGAGCTTCATTAA	42	
26[65]	23[59]	ACCTTTAGACAATTCATTTGAATGATT	28	
26[86]	24[91]	ATGTAAAGAAAGCCACTCTGTA	24	
26[107]	21[101]	ACGGAAGTTAATCATATGTACCGATAAATGAGACAGCCCT	42	
27[74]	25[59]	TGATATACCAGTCAGGAATTAACGAGGCATAGTAAGATAAA	42	
27[129]	23[122]	TCCGGATCGGTTAAATTTAATCGTAAACTAGTAG	36	
29[39]	18[45]	TTCAAGGAGGTTGATTTCCCAATTTCAA	28	
29[53]	33[45]	TCTACGTAACGTTTAAAGAAAATCTACGGTTG	35	
29[88]	20[94]	CCAACCATCAATATGATATGTACCAAAAACATTTATGATCAA	42	
29[102]	20[115]	GTCCATCGGTCAATAACTGTTTCAATAAATCTTTTGGGGAGGTG	49	
29[130]	25[136]	GCCTAAAGTTTTTTGAGAGATCTTGAACGGTAA	35	
28[72]	26[66]	GCTTCCATTTGACAGCGCTTTCTTTAATCCATT	35	
28[93]	26[87]	AGGGTAAATGAGTCCAGCATCAGCTATGCGAGGGG	35	
28[121]	20[136]	CTTTTTCAATTTGGGCGCAAGAAATTTTCAACGCAAGTGT	42	
30[37]	26[45]	CGGATCAATAGGGAACCGAATTTATCCGCGGCGGTTGAGATAAAG	49	
30[59]	20[66]	CTCATTATGAGGAAGTTTGAAGAAACCGGAAGA	36	
30[79]	29[87]	TCAACGGTAAATACGTAACCAAGC	28	
30[100]	20[108]	TTACGGGAGTTAAAGGAAAGACAACGACGTAAGG	35	
30[121]	27[128]	CGCTGCGGATCCAGGCCATGTCTCTCACGGAAAACCTT	41	
33[46]	29[38]	AGATATCATAACCTCTGTTTTGCCCTATTGACC	35	
33[91]	33[90]	ATCAACATTAATGGGACGACGACATTAAGAATAACTTTTC	42	
33[109]	29[101]	CGATTGCGCTCTGGCTTAAAAACGCGCTGCCA	35	
33[130]	28[122]	CTTAGGAACGCCATCAACAATATGGGCGCCGACGGCCACC	42	
35[147]	34[147]	ACTACGAGGCCCAACCTAATTTGGTCCCTGAGGCTTGC	42	
34[188]	35[188]	ATGCCCAAGCATAACCGATAAAGGAAAGGCAAAAGATA	42	
34[209]	35[209]	GCGCGCAATGACAAACCACTCAAACTCATCTTTGA	42	
34[229]	35[229]	ACAGCTTGAATCCGATAGTTCGCCAGCGATTATACCAAG	40	
37[53]	38[45]	TATAAAGGAATATGATTTCAAGCA	28	
37[84]	36[76]	GGTTTACCAAGGCCGGAATCTG	22	
37[116]	44[108]	TTCTAACTATAGCTCCGCTTTCGAGGTGAACGCCCAACT	42	
36[44]	44[52]	TTACCGAGAAACGCAATGAAATGCTAATGTCTT	35	
36[65]	38[73]	GACGGAATACCAAAAGCAAT	21	
36[75]	48[70]	GCATGATGAAAAGAAAGCTTCATCTAGATTG	34	
39[39]	49[31]	AAAGCAAAAGTAAAGAAACGCAAAAGCAAAAGGC	35	
39[102]	48[91]	GCAACCATTACCATTAGCAGCGCCGCAATCAATGGTTACGCGAA	45	
39[144]	47[129]	GGGTTGAGCCTATTGGGGGAAAGCAACTAAAGGATGTCTG	42	
38[44]	42[52]	ATTAATATGAGAGGAATTAACCACTCAAT	35	
38[65]	42[73]	GCACAAATTTGATTTAAATAGCAATTTTTGTGCT	35	
38[72]	37[83]	AAATTTTACGCTAACGAAAGCAATTCATAT	31	
38[83]	38[94]	GGAACCAACCTCACCAATGAAACCATCCAG	32	
38[93]	48[101]	AGCTTTTTGTAGCAATACGAGGTTTGTACTTTC	35	
38[107]	42[115]	ATGAAACCCGACCCCTTATTCAACCGTTCAGT	35	
38[114]	51[108]	AAATAGTAAACAGTACACTCAGAACGGAATAGTGTATATA	42	

◆DNA Tripod(60° -60° -60°)に使用する Staple Strands のシーケンス情報-2

38[135]	51[129]	TAGGGGATTCGTAAACAACCGCCAGGGTTGATATAAGAAGA	42	
41[60]	37[52]	CCAAGAAACATAAATCTCTTTATTCAGCGAGGTT	35	
41[123]	37[115]	CCACATCTTTAGCGACGCGCAAAATCAGACA	35	
40[97]	41[97]	TCATTAAGGCCAAAAAAGAAAGCGCTCCCTCAGAGCCGCC	42	
43[32]	48[38]	ACAACGCTAGAAACGCGAGCGCTTAAGCAAGCTTTCTCCG	42	
43[60]	36[66]	TAAAGATAAGCAAGCGCTTTTCTTTGTCACAATCAATTA	42	
43[130]	41[122]	ATAACGATTGGCCTGAAGAG	21	
42[51]	48[59]	TTAACTCCGACTTGATCATTAAACGGGTGCCT	35	
42[72]	48[80]	ATTTTTGAAGCCTTAAAGTTTTTACGCACTCACAA	35	
42[90]	45[73]	CCTAT AAGATTAGTTTTAACGCGCCCTCATAGATCAAG	39	
44[51]	51[45]	GAATTCGAAGCGCGCCCAATAGCTTAG	28	
44[107]	39[101]	ACATGAATTTAAACAATAAATCCACCTCAACCGGAAGATA	42	
45[46]	39[38]	TCACAAGAAATTTATTTAAACAGGGAAGTGAGCGCTACTAAGG	49	
45[74]	43[59]	TACTTTTATCGTAGGAGGGAGGTTGCACCCAGTACCCAAA	42	
47[39]	36[45]	AACAAGTACCGACACCAAGGAATATATG	28	
47[102]	38[115]	TTCTGCTGATAAAGACAAAAGGCGCAGTAGCGCCAGTCAAT	49	
47[130]	42[136]	TATCGTTTCCCAACCTCAGAGCCAGTCAAGTGGCTGAGT	42	
46[121]	38[136]	ATAACGATTGAGGAAATTAAGAGATCAAGTTTTGCCTTAT	42	
49[126]	43[129]	ATTTGCGAATAATTTGATCGGTTATCTCAGACTGAGTTCGTC	46	
48[37]	45[45]	CGAGCCTTTTTCGAGCCAGTAAATAAATGTGTGAACTTA	42	
48[58]	38[66]	GATATTTTTAGTAAATGAGAAAACGCTGTAAAG	35	
48[69]	41[59]	TATCATCATTAAACCAACAATGAAACGAGCCTTTACAGAGATTAAC	46	
48[79]	38[84]	CGCTGCTCACTAAATTTCAATCGCTCTAAAGCACCACC	38	
48[90]	42[91]	ACAAAGTTCGAGACCAAGATCGAATGGAAGCGTTCGGAA	42	
48[100]	38[108]	TTATAGACTACTTTTTATGTAAACAAGCTCAAA	42	
50[104]	51[104]	CACGCTACTCAGAGCAAGCTCTATTGTAACATGAAAGT	42	
51[46]	47[38]	CGATCCTGAATCTTACCCTCATATAATAAACA	35	
51[109]	47[101]	AGATGCCCTGCCTACAGTCTCAGCGCTGGTCT	35	
51[130]	46[122]	GAAAGTCCCGTATAAACAAGTAACTGCTCAATTTGGT	42	
53[147]	52[147]	GAAATACCGCGCTGTGATAAATCAAAATCATAGGCTGAG	42	
52[188]	53[188]	GGAAGAGTCAATAGTAAATTAAGCGGTAAATAAGAATA	42	
52[209]	53[209]	ATAGCTTAAATTAAGAGCTCAAGCGAATCATAAATAT	42	
52[229]	53[229]	AGAACTTTGAAACATAGCAAAAAGGCTGTTTAGTAT	40	
5[60]	0[55]	CCGAAGTGCCTTAATTGACGAGC	25	
23[60]	19[52]	GCACAAATATAGTCAATTAATGCTGTAGCCTGC	35	
0[166]	3[156]	GAGTAGAAAGCACTCAAACTAGCCAGTAAT	30	DNA Tripod コネクター周辺部分
2[163]	5[156]	TCTGGCCACAGAGATAAACAAGGTT	27	
4[163]	3[143]	TATTAACCCCGCTGCAACAGTGGAGATAGAACCTGTCA	42	
7[137]	12[143]	AAAAATAGAGTTTTAAAGTTTGAACAGAGGTTAGAAAGTG	42	
6[163]	10[143]	TTTAGGACCACTAACTAATAGGGAATTAATGCGACTGAGACAA	49	
8[166]	7[156]	ACGTAAAAAGAAATAAAGAAAGGAGGTA	30	
10[142]	1[159]	AATCTCTTGTATGATAAATAC	23	
10[160]	11[153]	CAAAATCAAGAAACAAAAGA	21	
12[142]	13[156]	AATGAATACCTTTTTAAT	20	
12[163]	9[159]	ATAAATCAATATATGACCTACCATATCA	30	
14[160]	15[153]	GGACAAAGAAACGTAACAT	21	
18[166]	21[156]	TAGCAATTAACATCAATAAATTTTTAGA	30	
20[163]	23[156]	TTTTAAATGCAATGCCTCTATCAGGTC	27	
22[163]	21[143]	GTCTGGAGCAACAAGGAATCAAAAGGGAGTAAATGGAT	42	
25[137]	30[143]	ACGTAAACCAAGTGGGAACAACGGTGTAGATCTGTTGGTGGGA	42	
24[163]	28[143]	TTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAAATATCTGTTGGCAGAGTAAAC	49	
26[166]	25[156]	TGCGCATTCAGGCTGCGCAATTTGTTAAAA	30	
28[142]	19[159]	AATGAAAGGTGGCATCAATCT	23	
28[160]	29[153]	GATAACCTCACCGGGAGCCG	21	
30[142]	31[156]	TAGTACCAATCCCGAATTT	20	
30[163]	27[159]	ACTTTCTCGTGGTGAAGCCGGAACCAAG	30	
32[160]	33[153]	GATAGGTCACTTGGCGGATT	21	
36[166]	39[156]	GAATATCACCGTCAACGCTCAGACTGTA	30	
38[163]	41[156]	TGCGCATTTTCTGATGAACCAAC	27	
40[163]	39[143]	CCAGCAATGACAGAGGTTGAGCGCCACCAAGCCCTTTA	42	
42[135]	48[143]	AACGATTAGGATAGCCGTGAGCCCTCAGCGCT	35	
42[163]	46[143]	AAGTTTTAACGGGTGAGTCCCTTTTTGATGCATGACTGCTAAAGAAA	42	
44[166]	43[156]	TAGCAAGCCCAATAGGAACCATACAGGAGT	30	
46[142]	37[159]	GGATAAATTTGACGGAAATTA	23	
46[160]	47[153]	CGGAGTGAATAACAATTT	21	
48[142]	49[156]	TTAAATTTTTCAAGTGA	20	
48[163]	45[159]	AAAAAGCTCCAAAAGGAAGCCACCCCTC	30	
50[160]	51[153]	AGCGGATAGTGCAGGCTTT	21	
6[114]	12[122]	TTTTCTTCCCGCAAGCATATATACTTAAAT	35	ビオニン化Strands
24[114]	30[122]	TAAAGTAAACCCCGTCCCGCTGCAACGCCAGGAGA	35	
42[114]	49[125]	TAGGCTGAGACTCCTCTATAGCCCGCCACTCAGCTTGCTTAG	45	
1[7]	2[31]	TTTTACAGGAGGCGATTAATCAGAGCGCGTCAAGCTGCGCCAA	46	Vertex部分のpolyT strands
1[32]	12[9]	ATGTTGTTCTGAGTAAATCCCAATTTTTAAACAAGTTTTT	43	
3[4]	0[7]	TTTTTTATCAAAGTGTAGGAGCTAAATTTTT	31	
2[30]	14[11]	CGTCCGGTGTGGTCACTCAACAAATGTTATCCGCTCACATTTTT	48	
5[4]	2[4]	TTTTTTTGTGGTGGTTCGAAAAACCGCTTTTT	34	
7[4]	8[7]	TTTTTCCGCGGGGAGAAATGCGGTTTTT	31	
9[7]	4[4]	TTTTTGGGCGGTTTTACCGGTGCGCGCGCGGTTCAAGCGCGAAATCCTGTTTTT	59	
11[11]	7[31]	TTTTTGGCATGATGCAAGGGCGCAATCGCAAAATTTGCCCTGCG	49	
13[9]	10[11]	TTTTTCTCGCGCTGGTAAACAAATCGTAAATTTTT	36	
15[11]	6[4]	TTTTTATCCACACACGCTTAATGAATCGGCAATTTTT	41	
19[7]	20[32]	TTTTTGGAGTTTCACTCAACTAAAGATAGAGGACTCTAAG	45	
21[4]	18[7]	TTTTTCAACAGTCAAGTACGGTCTTTTT	31	
20[31]	32[11]	GGAAGCTGGCTAGTGAATGATGATAAACGAACTAACGGAACAATTTTT	49	
23[4]	20[4]	TTTTTTCAAATAACGGGGAAGCAAACTCTTTTT	34	
25[4]	26[7]	TTTTTACCGAGAGCGCCCTGAGGTTTT	31	
27[7]	22[4]	TTTTTGAAGAACCAAGCAAGAAAGGTTTTTTCGAAAAGGAAATGACCATAAATTTTT	59	
29[11]	25[31]	TTTTTCCAGGCGCATAGCCAGACTCTTACCCTGACTGTTCAGAAAAG	49	
31[9]	28[11]	TTTTTGGAAAGCGCGAGCGGTTACAGATTTTT	36	
31[32]	30[9]	TCATATGAGCGGGTCACTGTTGCTTTTT	29	
33[11]	24[4]	TTTTTATTTACAGGTGACGAGCATAAAAACCAATTTTT	41	
37[7]	38[31]	TTTTTCAACATATAAAGAAATACATACAAACAAGTTACCAAGTACC	46	
39[4]	36[7]	TTTTTACAGATACCGATAAAGGTTTTT	31	
38[30]	50[11]	GAGGACAATTCGCATCATCGCTTCAGATAGAAAGGCTTATTTTT	48	
41[4]	38[4]	TTTTTCAACCTGAACAATTAAGAAAAGTATTTTT	34	
43[4]	44[7]	TTTTTCTAATTCGACAGGAGCATGTTTT	31	
45[7]	40[4]	TTTTTTGAAACCAATCAATCACTAATTTTACAAAAGCGGGAATTAAGTGAATTTTT	59	
47[11]	43[31]	TTTTTCTGCGAGAGCGCCCTTTAGTCAAGGGTAAATCGCATTAATAA	49	
49[9]	46[11]	TTTTTCAACATGTAATTTGGTAAAGTAAATTTTT	36	
49[32]	48[9]	AGACCTCCTCAATGATTTACCTTTTT	29	
51[11]	42[4]	TTTTTCCGATATCTAAACAGCGCTTTTCCAGAGCTTTTT	41	

◆ DNA Tripod (90° - 90° - 90°) の Strand Diagram



◆DNA Tripod(90° -90° -90°)に使用する Staple Strands のシーケンス情報-1

開始番号	終了番号	シーケンス	シーケンス数	備考
1[54]	1[73]	RAGCTTATCCAGACAAACACACAGGATTTAAACCGAATGGT	46	90° Tripod主要部分
0[54]	2[45]	CGCCGTAAACAGAGTCTGTCATAGTACCTGTCC	38	
3[144]	13[94]	GGAGCCTTCTGGTAAACCCAGACCGCCCAAGT	35	
2[44]	11[129]	GTCAATAAACATCACCGATAGCGAAAGAAAGATTCTGCT	42	
2[51]	8[52]	ACTAAATCCCTTATATGAGAGCCCGAGCTGC	35	
2[51]	15[45]	AGACAGCCAGCCAGGTTCTGCGTAAATCATGCGAGCG	42	
2[72]	1[83]	GTGCCTACAGTAACTCCTCATAGACAG	31	
2[93]	12[104]	CTGTTACATGATTTCTCAATTCATCATGTTGAA	35	
2[107]	8[115]	AGATGCTTATAGTCTACACCGACCTTGGAGC	35	
2[114]	15[108]	CAGCGATTCCAGAAATATTAACAAGAAGAACCTTTA	42	
2[135]	15[129]	TAAAATACCAAAATATCAATTAAGTAAATATCATAAAC	42	
5[25]	7[31]	GTGGTCCGATCCAGCAGAG	21	
5[60]	0[55]	AAAGTTTTGGGTGAGCCGCTAAT	25	
5[123]	10[115]	CGGATCTGGAATACCTAGTAGAAGAACTCATTATATCGT	42	
4[41]	0[35]	CAACCGAAATCGGATTAAGCGGGCCCGCCGCTA	35	
4[83]	2[94]	CAGCTGAAGTACGTAGAGAGTATTAACCCCGACCTTCTGCTGAC	46	
7[32]	12[38]	CGCAACTGTTCCACACAACTACTAGCTGTGCGTCATAGTA	42	
7[74]	12[80]	AGTACATTAAGGGTGCCTAATGAGGAGGATCCGCGTCCATCG	42	
7[81]	15[66]	CGGAGCTCAGATGAATCTGTTCTCCGGGTACCGGCAAGC	42	
7[91]	7[60]	AAATGATAGAGCCGTGAAGCTACTCGAA	42	
7[109]	3[101]	ATCCTGCAACAGTGCCTTTTGAACCTTCAACA	35	
6[51]	9[59]	CCGAAGCATAAAGTATCGAATCCAG	28	
6[114]	12[122]	ACTGATTAAGCTTACTTTGCGGGATGATGACAT	35	
8[65]	5[59]	CAGTCTTTTCACCCGCTGCCCTCA	28	
9[60]	10[66]	CAGTCTTACGTCAGCGTGGTCCCGTG	28	
9[130]	5[122]	TTTCAATGCAAAATATGGCGTCAATTTAAT	35	
11[88]	4[84]	CTTAAGGCTGGCAGACAAATCCTGAGAGCCAAA	38	
11[130]	7[136]	TTGAGGCGCACTGATAGCCCGTGGTGA	35	
10[37]	2[52]	CCCATCAGCGGGAAGCTACAGTGGGCGTGGCAAAACA	42	
10[58]	2[73]	TGTGAGGCGGATTAAGCCCGCGGTGCGCTGCGGTTGA	42	
10[65]	7[73]	CCGCGTGGCTTGTCCGAATGCCCGAGATTTCCTCCACC	42	
10[100]	2[115]	CTCTATCTGAGAGGCTAGCTATCAAAAGCTGATGGACAA	42	
10[114]	7[108]	CTCGTTCGCTCAATATGAGGATTCTGAAGAAAAG	42	
10[121]	2[136]	TTTTACGTGAGGCACTTGCCTGACATTTGAGCGTAA	42	
13[74]	11[87]	CTGGTGAAGGGTAAAGCAGCAGTAC	38	
13[95]	7[90]	AAAGCTTCTGCTGATGAGCAGATTTAGGCGAGC	38	
12[37]	12[49]	TAATAATGGTAAAGTTCCTAATACAAAT	31	
12[48]	4[42]	TCTTACCACCGGGTGTCACTTATGGGTTGAG	35	
12[79]	8[66]	TGCGCTTTAGTATCATAGCTGCCGAT	35	
12[100]	2[108]	TAAAGTCTGATGGCGTGGTGAATAAAGAT	28	
12[121]	9[129]	AAACAACCGGGATGAACAACCTAATGGAAACAGTGA	42	
15[46]	10[38]	CGGCTTTCAGTGGGAGTTTGGGGCGCCATGCCGACAT	42	
15[67]	10[59]	CTGTTCCGCTCCGCTCAGTGGTTTACGATCCGCGTACT	42	
15[88]	15[87]	GATAATACATTTGAGGACGAAAGGCGCTCACAGTTGTA	42	
15[109]	10[101]	GAACAACCTAATAGTAAATCTTTCGCGAGGGAAGCAG	42	
15[130]	10[122]	AATTAATAATCTTATAGTGAACCTGTAAGAGCTGATCGTT	42	
19[53]	20[45]	CAGTAAATCAAAAGGCAATAGAGAC	28	
19[84]	28[73]	TTTTAGTAAATAAAGCTCATCTTTTGTGGAAACAAGA	39	
19[116]	26[108]	GGTTCGGAACCTCACCTTCTCAGGAAAAGGCGAGCATCG	42	
18[44]	29[52]	AATTTAGAGATCTTCCGCGACTGG	21	
18[65]	20[73]	TGGTCTTTTAAAGATC	28	
21[102]	28[94]	ACCTAGCAAAATTAAGCTGACCTCTAC	28	
21[144]	29[129]	CTTTAGCATTAACTCCGCTATATAAACCCTCAGCGAACGAC	42	
20[44]	24[52]	TTCTTACCCTGACTGATCATAAAGAAAGTAAAT	35	
20[65]	24[73]	TTACAGAAACAAAGCGGCGCTCTAATAGTCAGA	35	
20[72]	19[83]	AAATAGGGGATGCTAGGACTAGAGTAGA	31	
20[93]	30[101]	GAAATTAAGCTTCCGCTTGTAGTTTGGGGGAAAGC	35	
20[107]	24[115]	ATTAAACGTTCTAGCTGAACGCTGCCCAAACCC	35	
20[144]	33[108]	GGTGGTTTGGGGGAGATGGGGGGGATGTAAGCCCTT	42	
20[135]	33[129]	GCAGTAAACCTCAGGCTGCATCTAGTGCAGTGGGAGC	42	
23[25]	25[31]	TAAATCAAAACCCCTCAAATA	21	
23[60]	19[52]	AGTAAAGGATTAATGCCCTAAGCTTAAATATAA	35	
23[123]	19[115]	ATTAGTAAAGCTGATCAAAACAGGCAAGGCAAT	35	
22[41]	18[35]	TTGAATCATCAGGTAATATCGTCAGAAATATGCG	35	
22[97]	23[97]	CATGTCATCATAGACTGGATATGTCAAATCACCATCAAT	35	
25[32]	30[38]	GGCAACACTGGAGCACTTATGTTGGAAACACCAACCGC	42	
25[60]	18[66]	CCAAAGACCGACCTTCAAGAGATTTGATCCCAATTCGGCA	42	
24[51]	30[60]	ACGAAAAGTTTATCAGGCTCATTTGGGCTAGG	34	
24[72]	30[80]	TACTAGGATACCAACTTACTGCTCACTAACT	35	
24[90]	27[73]	TCCGCAACTAATGAAGTGTGAGTGGCGGATGTTTT	35	
24[114]	30[122]	AATCAACATTAATGTTGTAGTGCCTCAGGAT	35	
26[65]	23[59]	ACAGAGGGGAAATCTGCGAATCTTAT	28	
26[86]	24[91]	CGCTTATGATCCCGGTAAATAT	24	
26[107]	21[104]	GTCCGAAAANAATGTAACACTAGATATCCAAAGGTTGT	42	
27[74]	25[59]	AATGATTTAAGACTGTGAGATATAACGCAAAAGGTTTG	42	
27[129]	23[122]	GATCGCCCAACAAGATTGACAAGAAATCGATATAA	36	
29[39]	18[45]	GGCACCGAAGATTTCATTCATGCTG	28	
29[53]	33[45]	CTGATATCTAGTAANAATACAGCTCAGGACAGAC	35	
29[88]	20[94]	GGCAGCCGAGACATGGGAGCATAAAGCTAAATCGGGGA	42	
29[102]	20[115]	GTAGCAACGATAGATCATTTCGCAAGAAATAAACCATTATGCTGA	49	
29[130]	25[136]	GTTTACCTGAACTCCGAGAGGGGGAGCAATA	35	
28[72]	29[87]	CTTATAGCTAATTCGAGGAGTGGCTTGGGAA	35	
28[93]	26[87]	AGAAAGCGGCAACAGCGGATTAATCAATTA	35	
28[121]	20[136]	GCACAATAACCTGTTAAATAAATACTTTGCGGGAGAAAT	42	
30[37]	30[49]	GGCAACCGAGCCGACAGCGTCCCTTCCGAC	31	
30[48]	22[42]	TCAATCCGACAGATTAACCTTTGCAAAATTTCA	35	
30[59]	20[66]	CGCTATTAACCGGTAATTTTATGTCAGAGAGA	36	
30[79]	26[66]	TAAATCGGGTCACTGCTGAGTCTTG	28	
30[100]	20[108]	GCACCTTTGCGGGATCGAGGGTAAACCGCAAGAG	35	
30[121]	27[128]	AGCCAGCGAGGAAACAATGGCTCTGCTGGTGAAGGAA	41	
33[46]	29[38]	GTAAAGCATAGTAAAGAGAGGCTAAATCAAAACA	35	
33[91]	33[90]	CCTTCTGAGCCAGCTGCATCTGCGGTGAATTTCTTCTGG	42	
33[109]	29[101]	TCAGGAACCCCAATGATAATCGGCGCTTTGG	35	
33[130]	28[122]	GGTCCGCTCATTTTAAAGCGGTTTGGGCGATCAGACA	42	
37[53]	38[45]	AAGTATTTAGCGAGAAATCTGCCCA	28	
37[84]	36[76]	ATTTTGTCAAATCACCAAGAC	42	
37[116]	44[108]	TTTTTGTAAAGCTTAGGAGCTTTAATGTTGTGTATCAGCCG	42	
36[44]	44[52]	CATAGTACCCGAAACAAGTTAAGTCCAGAGAAC	35	
36[65]	38[73]	CCGAGAAAGAAACCGAGAGAG	21	
36[75]	49[83]	GCATAACAGGAAAGAAATCTGACCTATCATA	34	
39[102]	48[91]	CCGGAAATAGCGAGCCAGAAATCGAATCCGAGACTATCAGC	45	
39[144]	47[129]	TCACATTAAGGTAATCAAAAGGACAGTTTCAAGCTATCGT	42	
38[44]	42[52]	ATACCTGAACAAGTCAAAAATGAGTTACAAGA	35	
38[65]	42[73]	ACAATTAGGCTAATAAAGGATTTATTTTGGG	35	
38[72]	37[83]	ATAACCTGTAGCTTCAAGAGCTAAGTT	31	
38[83]	38[94]	ATCAAGGATAGCAGCTTACCATTAGGCCA	32	
38[93]	48[101]	TCTAGCCCTCTTTCGTCGATAGCCCGAATAGATCG	35	
38[107]	42[115]	ATTGAACCGCTCCCTGAGTGGGCGAAGACATG	35	
38[144]	51[108]	CCGATCTAACCCATGTACCGCTCGGAGAGGGTTCGG	42	
38[135]	51[129]	CATTCCAGCGGATAGCACCGCACTCAGTACAGGCGCATG	42	
41[25]	43[31]	GAGAAATTAACACAGAGCTTT	21	
41[60]	37[52]	GTAGAAATGAGTTACCAATACCCAAAAGAAATAA	35	
41[123]	37[115]	CCGCTCGGTGAAACAGCTGACCGCTTGGATGG	35	
40[41]	36[35]	CAGCCTTGAACATAAGAGAGTAAAGGCTAAG	35	
40[97]	41[97]	TGGCCTTGAATCAAAATCAATCAATCACCAGAACCGAGCC	42	
43[32]	48[38]	CAACCCAGCTCAGATATAGAGGATCTGAGGAGCATGCTTG	42	
43[60]	36[66]	AAATATGAGGAGCAAAATATAAAGCGAAAGACACATAA	42	
43[130]	41[122]	GTCCAGCATCAGCAGAGAG	21	
42[51]	48[59]	TTAGTATTTAAGAAAGAGCAAGTAAATCCGCAAC	35	
42[72]	48[70]	TTTTTTTAGGAACTGAGTACCGATTTCCGAGGTTGAACGAAA	45	
42[90]	45[73]	TAAGGAGCTTCCGAGTCCCAACAATCAACAGTCTCT	39	
42[114]	49[125]	GCCTATTTATCTGAAAGTAAAGTTCAGGAGCAAAAGTTGGT	45	
44[51]	51[45]	GGCGAATCAACCGTTTTATTTCTTAT	28	

◆DNA Tripod(90° -90° -90°)に使用する Staple Strands のシーケンス情報-2

44[107]	39[101]	TAACATTAAGAGGCTCAGACGATACCACCGAGGCTTTAAGG	42
45[74]	43[59]	TATCACTCATCGAGAACCGAGCGTGAAGCCTTAATCAAT	42
47[39]	36[45]	AGTCATTTAAAGGTGCGAAGATTGG	28
47[102]	38[115]	TTAGCAATCAATGAAATTCATCCTTTGGAAAGCTCACCATATAG	49
47[130]	42[136]	CTTCGGCATTCCACCCTCAGAACCCCGCCCTCTGAATGGTA	42
46[121]	38[136]	TATACCGCCGCAAAAGATATCACCTCGATAGCAGCACCTTTT	42
49[84]	38[94]	GGTCTGAAGACACACAGACTTTCATA	28
49[126]	43[129]	TAGAGTGAATAGCCAAAAAAGGCTGTTAGTAAAGCCACGCA	46
48[37]	48[49]	ATATTAAACAAGCCCAACATGATTTGATTTGT	31
48[48]	40[42]	ATCATCGTAGAAACCTGTTTATTTGCCAAATAG	35
48[58]	38[66]	GGAGTTTATTTTCATCTCTTTTGTAAAGACACC	35
48[69]	41[59]	CAAGTACTGTCTTGTTCAGCCAGCATTTTTGTAAAGTCCGAGG	46
48[90]	42[91]	TTGCTTTAGAAGCGACAGTATCTCACAAACAAATCCGATATA	42
48[100]	38[108]	GTTCCTTTTAACTCTCTGCTGATGCGTAAACCTT	35
50[194]	51[194]	TGATATAAGTATATTAAACCCCTTAATGCCCCCTGCCTATT	42
51[46]	47[38]	CCGGTTCCTTTTGCAGAGCCTAATCAACAGTAA	35
51[109]	47[101]	AACTTGAAGTAAAGTGCAAATCCTCACTGAGTAG	35
51[130]	46[122]	AAAAGTTTAAAGGGGTGGAAAGTATGGAAGTITTTGTAAC	42
1[166]	3[156]	GTAGCAATACTCTTGTGATTTGAATGGAT	30
2[163]	5[156]	GCAGATTCAACAGTCACTGCCATTAA	27
4[163]	3[143]	GAACCCACGCAAGAGTAAACATATAAACCAACGACCAATC	42
7[137]	12[143]	CCGGTATCTCGAACACTGATAGTITTTGTAACTCACT	42
6[163]	10[143]	CAACAGTTGAAAGGAATTAGGAATCAATCAACATATAGTTACATACC	49
8[166]	7[156]	TAATGGAAGGTGAGAACCTATATCTGGTC	30
10[142]	1[159]	TGAAGAGTCTGTCCATCAGCA	23
10[160]	11[153]	TTATTCATTTCAATAATCCG	21
12[142]	13[156]	TTTATCAAGAAACAATTT	20
12[163]	9[159]	ACAATTCATTTGAATGATTTGTTGGATT	30
14[160]	15[153]	GTATTAAATTTAATAAATCC	21
18[166]	21[156]	ATCAATCTACTAATAGTAGTATTTTCAACG	28
20[163]	23[156]	ATTTTAGAACCTCATTTTAGAGA	27
22[163]	21[143]	TATCAGTCAATGCCTGAGGCTTAGCTATATATTTAAGC	42
25[137]	30[143]	AGCTGTTAAATAACACCCCTCGGTAAATGGAGCCAGCTAGA	42
24[163]	28[143]	TGTTAAATTCGCATTAATTTTAAATATTTCCCGATGAGCCCGGAA	38
26[166]	25[156]	GAAACCGCAAGCCGCTAATAATGTAA	30
28[142]	19[159]	CGGTTTCATTTGGGCGGAGCT	23
28[160]	29[153]	GTGGAGCCGACAGGTGCCA	21
30[142]	31[156]	CTTGAAGCTAGAGCCCAT	28
30[163]	27[159]	CCGGAATTTGTGAGGATTTCCGGCACCCG	30
32[160]	33[153]	CGCCGATTTGCCGATTTCTCC	21
36[166]	39[156]	AAATATTGACCGAATATTTGTAGCGACAG	30
38[163]	41[156]	TTGTAGCTCAAGCTGTGAGAGCAG	27
40[163]	39[143]	CCGCCACCAACACCCAGAGCCACCTAGCCCGGTAA	42
42[135]	48[143]	ATAGTATTAAAGGCTGGGTTTGCCTCAGAAAA	35
42[163]	46[143]	TTTGTATACAGAGGCTGATATACCGTTTTCAGGTAGTAACTT	49
44[166]	43[156]	CCTCAGAGCCACCCCTCATCAGTAAAG	30
46[142]	37[159]	TCAGCGACTTCAACCGATTGAG	23
46[160]	47[153]	GATTTTCTAAACAATGAAT	21
48[142]	49[156]	TCTAAGGAACTAAAGG	28
48[163]	45[159]	ATAATTTTTCACTTGAACGCCACCCCTC	30
50[160]	51[153]	ATTAGGATTAGCGGACTCC	21
7[24]	38[4]	GGGGTGGTTTGCCCCAGCAGCGGAGGCGCATTAGATAGCAATAGCTTTTTT	52 Vertex bundle 1
25[24]	2[4]	CGAAATGCTTTAAACAGCTCAGAAATCCTGTTTGGTCAAGGGCGTTTTT	52
43[24]	20[4]	CGGTAGAAATAAATATAAAACAGGAAACGAGAATGCCCTCAAAGCGATTTTT	52
7[4]	41[24]	TTTTTAATCGGCCAAGCTGCTGGCCTATAAAGTACCGCAATGAAACGG	49 Vertex bundle 2
25[4]	5[24]	TTTTTAGACGAGTAAATCATTCAGTAAATCGTTAACGACTCCAAGATG	49
43[4]	23[24]	TTTTTACCAGCCTAAACCAAGAAACAGATGAACGGAATTCGAACCA	49
17[134]	16[134]	CAGCAGCAACCGCCGCGCTTAGT	26 Connector 挿入
16[167]	17[167]	TCCCGTAAAAAAGCCGCAAAAGATGCCAACGGCAGCACCC	42
16[188]	17[188]	GTGTACATCGACATAAAAAAGTGGTGGTGCATCCCCAGC	42
16[209]	17[209]	GCCCGCGAGATTGGCGGCTAACAGGCTTACGGCTGGAGGT	42
16[221]	17[221]	TTCTGCTATTGTCCAGCATCAG	24
35[134]	34[134]	GCCACTACGAAGGGTCCGCTGAAGCT	26
34[167]	35[167]	CCACGATAAACGATATATTCCACCAACTAAAAAGGAAAGG	42
34[188]	35[188]	GACAAATGACAGACACTCCCGCAAAAGTACTCATAAACA	42
34[209]	35[209]	CTTGATACCGATAGTTGGCCCTCATTTGACCCCAAGCA	42
34[221]	35[221]	TTTTCTAAACGTTATACCAAGCG	24
53[134]	52[134]	AAATTAATGGTTGAATTTAACAARA	26
52[167]	53[167]	AGCCTGAGAGAGTCAATAGTGAATACCGACCTGTGATAA	42
52[188]	53[188]	ATAGCGATAGCTTAGATTAAATAAGCGTAAATAAAGAATA	42
52[209]	53[209]	TCCCTTAGAATCCTTGAATAACACCCGGAATCATAACTACT	42
52[221]	53[221]	ATTAATTAATTTGAAGAAGCGCTG	24
1[9]	2[31]	TTTTTAAAGCTGTTTCCTTGGCTTTGTCAAGCGAAGGAGAACG	45 Vertex PolyT Strands
0[34]	12[9]	CTATGGTCTGTAGATTACACTCGGCTGGAGCCCAAGCTCAACAGTGGGTTTTT	54
3[4]	0[8]	TTTTTAAAAAGCTGTACAGGACGTTTTT	30
2[30]	4[111]	TGGGCATCAGTGTGAGCGTTTCTCTCTGTGMAATGTTATTTTT	48
9[7]	7[23]	TTTTTCAAGATGGCGCGGCTCTGTGGCG	31
13[9]	10[11]	TTTTTCACTGTTCCTTGGGTGTGTCAGCTTTTT	36
15[11]	6[4]	TTTTTCCGCTCACAACTGTCAGCTGCATTAATGTTTT	41
19[7]	20[32]	TTTTTGCACATAAAGTACCGCAACTGCCAACTCCAACGCGC	45
18[34]	30[9]	TGTAGCTTGTCTGTTGACCAATAGCCCGCGGTTGCGGTATGAGCCGGTTTTT	54
21[4]	18[7]	TTTTTACCAGCCGGAATTTAAATATTTTT	31
20[31]	32[11]	TTTTTGTACAGGCTAACAGCGAGAGAAATCTACGTTAATATTTTT	49
27[6]	25[23]	TTTTTGAATAGGCTTGCCCTAAAGTGCAAA	33
31[9]	28[11]	TTTTTCTGCTCCATGTAACCTTTGAAGAGGTTTTT	36
33[11]	24[4]	TTTTTAAACGACTAACATCAACCTCGTTACCTTTTT	41
37[7]	38[31]	TTTTTGCAAAGCTAGAAATTAATACGCCCTTTTAAAGAAACAAG	46
35[34]	48[9]	ACTCCCTCATACATCGAGCGCATTAATTTGTGCGAAATCCGCGACTTTTT	54
38[4]	36[7]	TTTTTATCTTACCAGAGATGTTATTTTT	31
38[30]	50[11]	AAAAAAGATAGATAAATTTACGAATCATTACCGCCCAATTTTT	48
45[7]	43[23]	TTTTTAAATATATCCCATCCTAGTCTGCGA	31
49[9]	46[11]	TTTTTCTAATTTGAGATCGTAAAGAGATTTTT	36
51[11]	42[4]	TTTTTACAGCAAAATCAATTTTATCTGATCTTTTT	41

DNA Tripod の作製

試薬

- DNA Tripod 用 Staple Strands : Cadnano ソフトウェアにより DNA Origami Tripod を設計し得られる各 Staple Strands シークエンスは代理店として MBL 株式会社を通して IDT 社より購入した。25nmole スケールでの合成、精製は脱塩のみとし、納入時には V ボトムのプレート(450uL)の各 well に 10 nmole の Oligo 紛体で納入されるよう手配した。納入後は各 well に milliQ 水を加え 100uM/well に調製し、-20℃の冷凍庫で保管した。
- P8,064: Tilibit nanosystem 社製 100nM Single Stranded Scaffold DNA, Type P8,064 本製品納入後は 30uL ずつ PCR チューブに小分けし-20℃の冷凍庫で保管した。実験に使用する際に必要な分だけを解凍して使用した。
- 1M Tris-HCl (pH=8.0) : ニッポンジーン社製 Tris-HCl (pH 8.0), 型番 314-90065
- TE Buffer : ニッポンジーン社製, 型番 314-90021
10 mmol/l Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol/l EDTA (pH 8.0)
- EDTA 溶液 : 0.5M EDTA (pH 8.0) ニッポンジーン社製 型番 311-90075
- 1M MgCl₂ 溶液 : SIGMA 製 Magnesium Chloride Solution, 型番 M1028-100ML
- DNA Origami stock solution
組成: 100 mM EDTA, 500 mM Tris-HCl (pH=8.0), 上記 EDTA 溶液と Tris-HCl 溶液を MilliQ water で希釈して調製した。
- 10x DNA Tripod folding 用 buffer : DNA Origami stock solution 40 uL, 1 M MgCl₂ 48 uL, MilliQ water 312 uL を混合して 10x DNA Tripod folding 用 buffer(組成 : 50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 120 mM MgCl₂)を調製した。
- Biotin 化 Strand : Sigma Genosys 社から紛体として納入。上記 TE buffer で 2uM まで希釈して DNA Tripod の folding に使用した。

方法

100uM / well に調製した Staple strands をそれぞれ 5uL ずつピペットし混合する。この液と P8,064 scaffold、ビオチン化 Strands 液、10x DNA Tripod folding 用 buffer、MilliQ water を以下の比率で混合した (最終組成 : P8,064 scaffold の濃度は 20nM, Staple strands は P8,064 scaffold に対して 5 倍当量、MgCl₂ の濃度は 12 mM MgCl₂)。

60°-60°-60°DNA Tripod作製レシピ			
	conc. (nM)	standard	actual load(uL)
P 8,064 scaffold	100	10.00	20.0
Staple strands	680	7.35	14.7
Biotin staple strands1	2000	2.50	5.0
Biotin staple strands2	2000	2.50	5.0
Biotin staple strands3	2000	2.50	5.0
10x Origami folding buffer		5.00	10.0
H2O		20.15	40.3
total		50.00	100

上記の混合液を PCR チューブ 1 本あたり 50uL 添加し、サーマルサイクラーにより 24 時間タイムコースでのアニーリングにより DNA Tripod の folding を実施した。アニーリングサイクルは 80°C→65°Cまでは-1°C / 5 分間、65°C→20°Cまで-1°C / 30 分間でのサイクルとした。

DNA Tripod のアガロースゲル電気泳動解析

試薬

- ・ Agarose : タカラバイオ社製 L03 「TAKARA」
- ・ SYBR® Safe DNA Gel Stain : Invitrogen 社製
- ・ 1kb DNA Ladder : New England Bio Labs 社製 型番 3232S
- ・ DNA Loading dye (4x) : 1wt% ブロモフェノールブルー溶液 200 uL と 40wt% グリセロール溶液 200 uL を混合して作成した。
- ・ アガロースゲル電気泳動槽 : Thermo Scientific 社製 OWL EASY CAST™ B2
- ・ ゲル解析装置 : BIO-RAD 社製 ChemiDoc™ MP imaging system

方法

DNA 構造体の電気泳動においてはアガロースゲルを使用する。1.2g のアガロースを 1x TBE 120g に溶解させ電子レンジ(500w)で 2 分 30 秒加熱した。その後 1M MgCl₂ 溶液を 1.2mL、SYBR® Safe 5uL を加え電気泳動槽に流し込み、室温で冷却することによりアガロースのゲルを作製した。その後で 1x TBE Buffer 693 mL と 1M MgCl₂ 溶液を 7mL を混合しアガロースゲル泳動用の buffer を調製した(10 mM MgCl₂ conc.)。

先に作成したアガロースゲルを本泳動用 buffer に浸し、folding 後の DNA Tripod 液の電気泳動を実施した。この際、DNA Origami の反応液は DNA Loading dye (4x) と 3 : 1 の比率で混合して電気泳動用の混合液を作成した (DNA Tripod 液 6uL に対して Loading dye を 2uL 加える量比率を標準的な条件として採用している)。また泳動槽は氷水を入れた容器の中に設置、90V で 2.5 時間泳動を実施した。電気泳動終了後 ゲル解析装置により Cy2 フィ

ルターを用いて DNA 構造体のイメージングを実施した。なお泳動中も氷が解けきらないように補充を行い、常に氷水がある状態で電気泳動を実施した。得られた DNA Tripod に相当するゲル上のバンドは切り出しマッシャーによりつぶした後専用のフィルターに入れ 4,000g で 3 分間遠心させることで DNA Tripod の精製を行った。本精製により得られた液を透過型電子顕微鏡での観察に用いた。

透過型電子顕微鏡観察

測定に使用する Cu グリッドはあらかじめ親水化処理を行った。ここに上記の工程により精製した DNA Tripod サンプルを 5 μ L 滴下し 3 分間静置させ DNA 構造体、もしくはエクソソームをグリッドに吸着させた。その後余分な液をろ紙で吸い取り、すぐに 2%の酢酸ウラニウムを滴下させ、40 秒間静置させた。その後余分な酢酸ウラニウムをろ紙で吸い取り透過型電子顕微鏡での測定に使用した。

2-4. 結果と考察

2-4-1. DNA Tripod 構造の構築

実際に本コンセプトに基づき 60°- 60°-60°と 90° - 90°-90°の角度を保持する DNA Tripod をデザインした。P8,064 scaffold strand と staple strands を混合し P8,064 scaffold Strand の濃度を 10nM とし、12 mM MgCl₂ の存在下で 24 時間アニーリングプロセスを行うことにより構造体の folding を行った。アガロースゲル電気泳動による分析を行ったところ両反応生成物共に均一なバンドが出現した(Fig 2-4-1 A)。DNA Origami 構造は出現したバンド部分を切り出し、砕いた後にスピフィルターでろ過することにより構造体を単離することができる(Douglas et al., 2009)。

本手法によりゲルバンドから精製されたこの構造体を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところ設計通りの DNA Origami 構造体が観察される(Fig 2-4-1 B, C)。TEM 上の実測値から一辺の長さは約 50nm の辺長となり一辺の短辺方向の長さは約 13nm(Fig 2-1-2 D, E)とこれも同様に設計と概ね一致する結果となった。その他、辺間の角度を形成するための Strut も観察される。

DNA 構造体は TEM での測定の際、親水化処理した Cu グリッドの上に滴下することで吸着、固定化させる。ここでは系中に含有される Mg²⁺イオンが親水化処理によりマイナスに荷電した Cu グリッド表面とマイナスの荷電を持つ DNA Tripod 構造を静電相互作用により引き寄せる形をとっている。DNA Tripod は頂点を下にして Cu グリッドに突き刺さるように吸着するか、DNA Tripod が横に倒れて 2 辺の角度を保持したまま吸着されるかの 2 つのモードが観察される。ここでは横に倒れたモードの DNA Tripod の 2 返間の角度が実際の DNA Tripod の角度を反映していると考えられる。両 Tripod 構造それぞれ

れ 100 個ずつに関して角度分布を測定したところ、 60° - 60° - 60° DNA Tripod に関しては $53^\circ \pm 3^\circ$ 、 90° - 90° - 90° DNA Tripod に関しては $87^\circ \pm 4^\circ$ の角度分布となっていることが確認された。設計値より若干低い値の角度となっており、Strut の熱力学的な変形も多少生じていると推察されるが本コンセプトにより高い精度で DNA Tripod の角度制御をできることが明らかになった。

バンドの泳動スピードに関しては 60° の DNA Tripod が 90° の DNA Tripod よりも若干早く泳動される様子が観察される。DNA Tripod の分子量は両構造体で同じであるが、角度が大きい Tripod ほど泳動における抵抗を受けやすいため遅く泳動されると推察される。

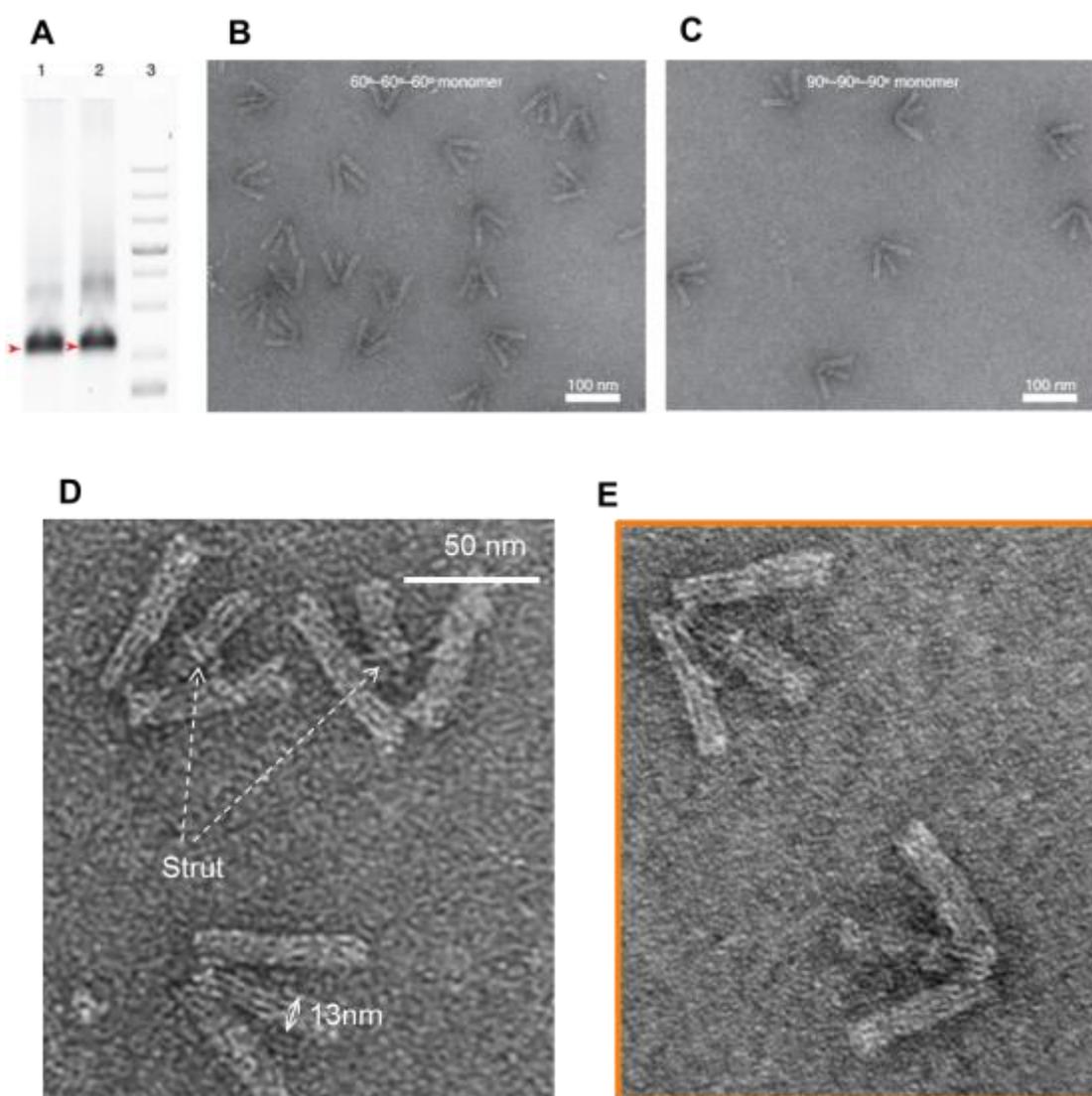


Figure 2-4-1. DNATripod (60° - 60° -60°、90° - 90° -90°) の分析結果

- A. 両 DNA Tripod のアガロースゲル電気泳動分析結果。レーン 1 は 60° DNA Tripod、レーン 2 は 90° DNA Tripod、レーン 3 は 1kb Ladder。
- B. DNA Tripod(60°) の TEM 画像 / D はその拡大図
- C. DNA Tripod(90°) の TEM 画像 / E はその拡大図

2-4-2. DNA Tripod 同士の凝集抑制

本 DNA Tripod の Vertex 部分、末端部分は DNA 二重鎖の平滑末端となっている。DNA 平滑末端では DNA の塩基部分がむき出しになっている状態をとるため、塩基同士の π - π スタッキングにより強い会合を示すことが知られている(Kilchherr et al., 2016)。ここでは DNA Tripod 同士の DNA 平滑末端での会合を防止するため Vertex 部分の DNA 平滑末端部分には 5 塩基の Poly T Strands を導入し保護した(Figure 2-4-2(1). A)。DNA Tripod の Vertex とは反対の末端では Scaffold の一部(10~15 塩基)を Staple strands とハイブリダイゼーションさせずに Single strand DNA のまま残した(Figure 2-4-2(1) B)。

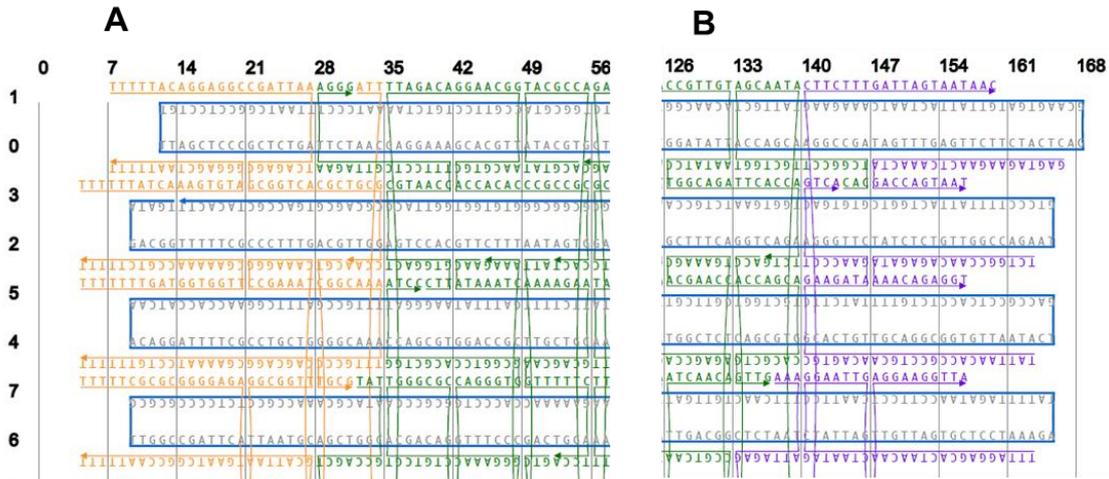


Figure 2-4-2(1). DNA Tripod の Vertex(図 A)と各辺の末端部分 (図 B)における Staple strands の配置図。オレンジ色のシークエンスが PolyT=5 保護用の Staple strands

実際、Vertex 部分に Poly T Strand を導入しない系においては DNA Tripod 同士が強い会合を示しアガロースゲル電気泳動における解析においてはメインのバンドが DNA Tripod 同士のダイマー由来のバンド(Figure 2-4-2(2) A, B の赤枠)となる。またその他にも

2 本のバンドがさらに遅い泳動位置に生じるが(同図 青枠)これは TEM での分析の結果 DNA Tripod のトリマー、テトラマーであることが観察された(Figure 2-4-2-(2) C)。本系においては DNA Tripod のモノマーは生成しない結果となった。

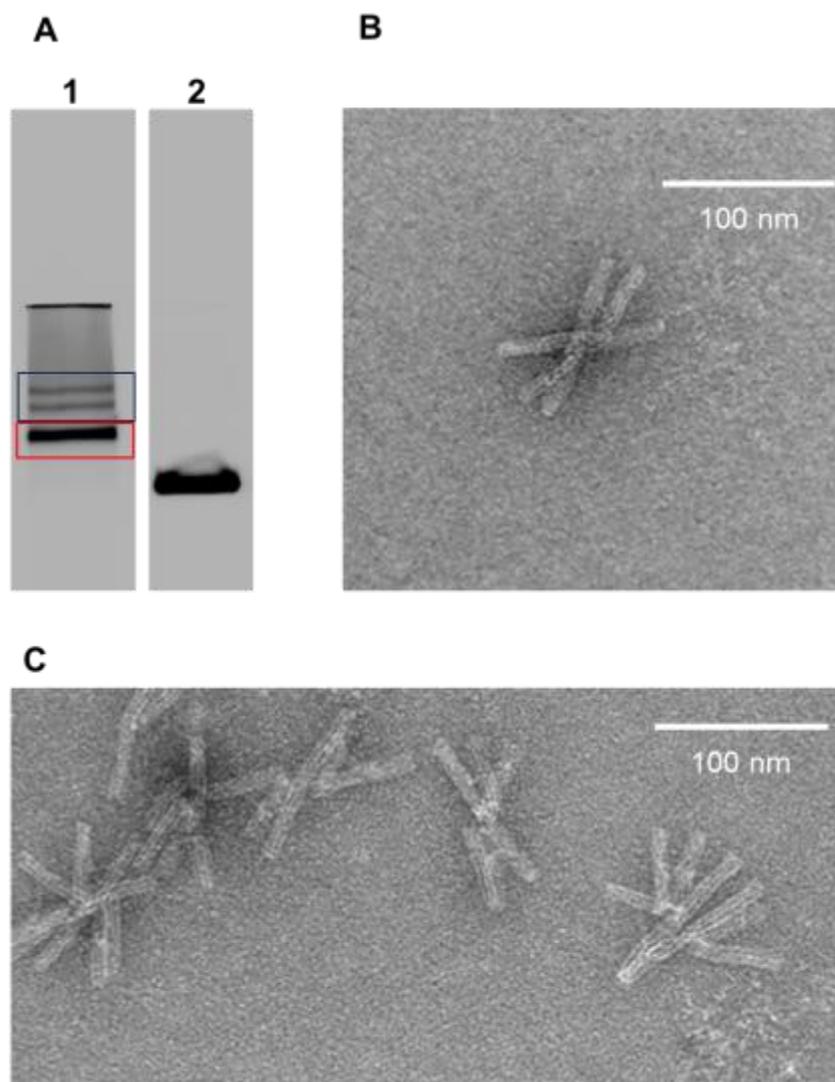


Figure 2-4-2-(2). PolyT=5 保護なしの DNA Tripod の凝集挙動

- A. DNA Tripod (PolyT=5 保護なし)のアガロースゲル電気泳動結果. 1 レーンが DNA Tripod (PolyT=5 保護なし)の反応混合物。2 レーンは P8,064 scaffold strand
- B. A のゲルにおける赤線枠内の構造物の TEM 画像
- C. A のゲルにおける青線枠内の構造物の TEM 画像

3. DNA Tripod / 抗体複合体の構築

3-1. DNA Tripod への抗体導入デザイン

エクソソームの表面抗原を捕捉するための抗体は DNA Tripod の各辺の内面に導入される。抗体は Tripod の各辺の内部に末端から 12nm の位置にビオチン/Streptavidin の反応を利用して導入され、Tripod 構造一つあたり 3つの抗体が導入される設計となっている (Fig 3-1 A, B)。DNA Tripod の folding の際末端がビオチン化された短鎖 DNA を staple strands として使用することで DNA Tripod の folding 時に各辺にビオチン分子が導入される。その後 Alex647 で標識された Streptavidin を導入し、最後にビオチン化した抗体を結合させる。

エクソソーム表面には多種のタンパク質が存在するが抗体とのアフィニティーを利用するエクソソーム捕捉手法においては多くの細胞由来のエクソソームに発現している膜貫通タンパク質であるテトラスパニン群の CD-9, CD-81, CD-63 抗原を表面マーカーとし、抗 CD-9, 抗 CD-81, 抗 CD-63 抗体を使用する方法が知られている。一方で癌細胞由来のエクソソームには EpCAM (上皮細胞接着因子) が発現していることも知られており (Keller et al., 2007)、癌細胞由来のエクソソームを捕捉する場合には抗 EpCAM 抗体を使用することもできる。今回の検討において使用するエクソソームは癌細胞 (結腸腺癌セルライン HT-29) の上清から採取するものであるため以後 DNA Origami 上へ導入検討する抗体としては抗 CD-9 抗体、抗 CD-63 抗体、抗 EpCAM 抗体を使用する。

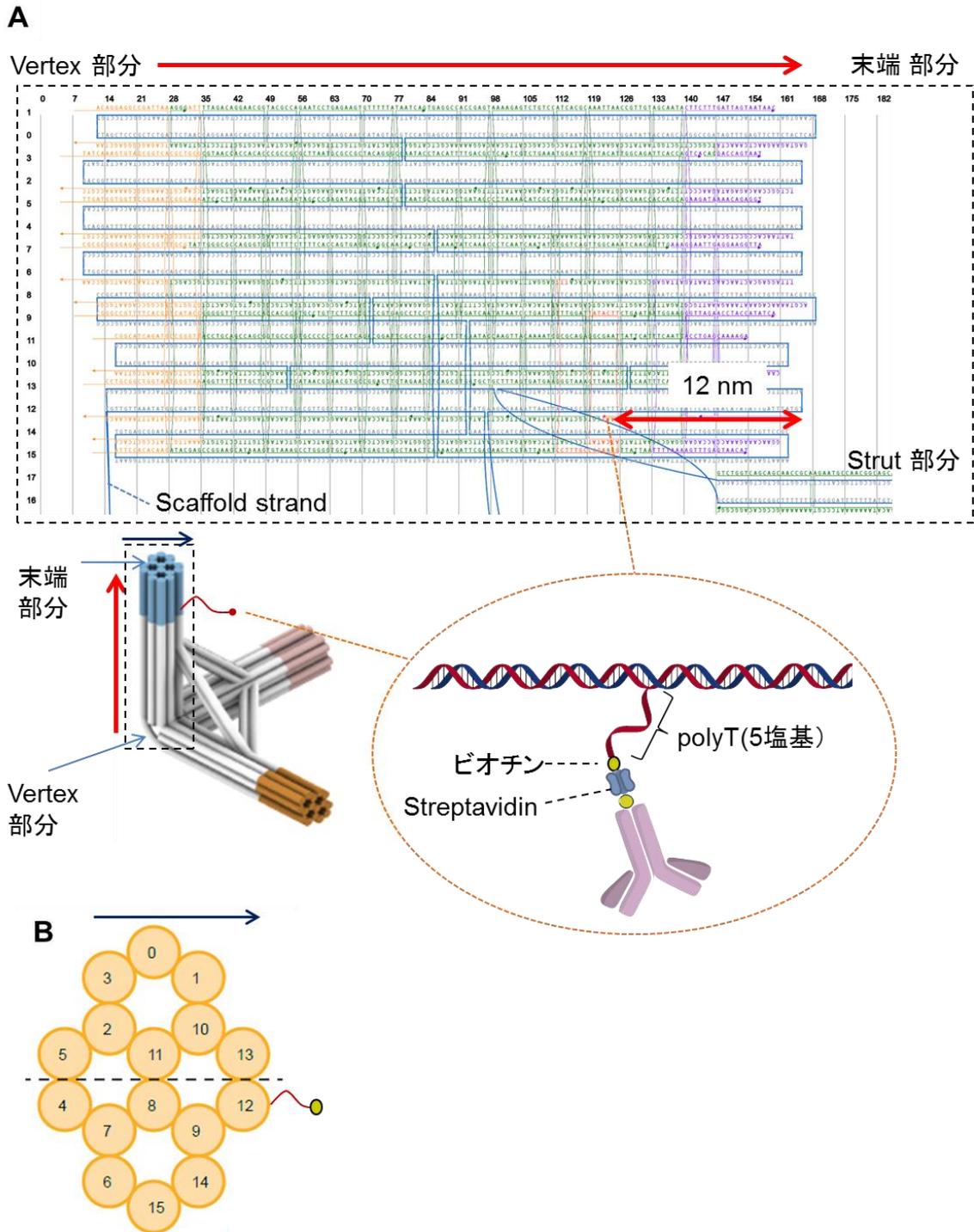


Figure 3-1. DNA Tripod への抗体導入位置

- A. DNA Tripod の各辺展開図におけるビオチン/Streptavidin 結合の導入位置
- B. DNA Tripod の各辺断面図におけるビオチン化 Strand の導入位置。

3-2. 実験手法

以下に特別の記載のない項目については2-3章の手法、試薬を用いて実験を行った

DNA Tripod の精製

試薬

- ・マイクロスピングルろ過カラム：GE Healthcare 社製 illustra™ S-300 HR
- ・ゲル精製用 buffer：上記 DNA Origami stock solution 40uL に対して 1M MgCl₂ 溶液 36 uL, MilliQ water 324uL を混合した。本混合液をさらに MilliQ water で 10 倍に希釈して ゲル精製用 buffer (組成：5mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 9 mM MgCl₂) を調製した。

方法

DNA Tripod folding 後の反応混合液に含まれる過剰の Staple strands の精製にはマイクロスピングルろ過カラムを使用した。最初にゲルろ過カラムに充填されている buffer を 800g×1 分間の遠心により除去し、その後で精製用 buffer 300uL を加えてさらに 800g×1 分間遠心を実施した。その後再度この工程を繰り返しゲルろ過カラムの buffer 置換を行った。その後すぐに DNA Tripod を folding した反応混合物を 1 本のカラムあたり 40uL 投入し、800g で 2 分間の遠心を行った。得られたろ過精製物全量を再度新しいマイクロスピルカラムに投入して精製を行った。

DNA 濃度の測定

Nano Drop 3000 により紫外蛍光領域(260 nm)の DNA の吸収波長を測定し濃度を求めた。

DNA Tripod のアガロースゲル電気泳動解析

試薬/方法

2-3章の方法に従って実施した。ただし DNA Tripod のイメージングの際には SYBR Safe で染色した構造体 Cy2 フィルターで観察を行い、Streptavidin を標識する Alex647 によりイメージングする際には Cy5 フィルターを使用した。

DNA Tripod への抗体導入(抗 CD-63, 抗 CD-9 抗体, 抗 EpCAM 抗体)

試薬

- ・ビオチン化 抗 CD-9 抗体、ビオチン化抗 CD-63 抗体、ビオチン化抗 EpCAM 抗体： MBL 株式会社製、1mg / ml 濃度。DNA Tripod との反応時は本抗体液を PBS(-)で 2 500nM に希釈して使用する
- ・PBS(-) buffer：ニッポンジーン社製 10x PBS buffer 型番 304-90185 を MilliQ water で 10 倍に希釈して使用。
- ・Alexa Fluor™ 647 標識 Streptavidin: Thermo Fischer 社製、製品番号 S21374 33 uM 濃度の元サンプルを TE buffer(pH=7.4)で 10 倍希釈して実験に使用した

方法

2-3 章の方法により精製した DNA Tripod に対して Alex647 標識 Streptavidin(3300nM)を DNA Tripod のビオチン化サイトに対して 3 等量添加し室温で 30 分間インキュベートした。この時 2 回のゲルろ過カラムを通した後の平均的な DNA Tripod 濃度は 6-7 nM であり、本液 150 uL に対して約 2-3 uL の Streptavidin 液を添加する。その後、本反応液をゲル精製 buffer で置換した新しいマイクロスピカラム 1 本に対して 50uL 投入し、過剰な Streptavidin の除去を行った。さらにその後で 500nM に希釈した抗体を DNA Tripod のビオチン化サイトに対して 1 等量添加し室温で 1 時間インキュベートし次のエクソソーム捕捉実験に使用した。

3-3. 結果と考察

3-3-1. DNA Tripod の精製と抗 CD-9 抗体の導入

DNA Tripod への抗体導入においては folding、抗体導入の各ステップで精製プロセスが重要になる。DNA Tripod のフォールディング後、Streptavidin を DNA Origami 上のビオチン化サイトに効率的に導入するため最初に系中からビオチン化 strands を含む過剰な Staple Strands を除去する必要がある。本検討においては DNA の排除限界が 118bp の遠心型ゲルろ過カラムを使用しての精製を試みた。本精製においては理論上 DNA Tripod はカラムを通りぬけ、DNA Tripod のフォールディングで使用される過剰の Staple strands(30~40 塩基数)のみがカラムに捕捉されるはずである。

一方で本ゲルろ過カラムで精製できる DNA 量には制限があり、かつ DNA Origami 自体も本カラムにある程度捕捉される可能性がある。そのためより効率的な精製を試みるために、DNA Tripod のフォールディングにおいては DNA Tripod の濃度、staple strands 量の最適化を行った。具体的には 3D DNA Origami の folding における Scaffold DNA の標準的な濃度とされる 10nM 濃度から 20nM 濃度に変更しさらに staple strands の使用量を Scaffold に対して 10 等量を 5 等量まで減らし folding を行った。この反応物をゲルろ過カラムに 2 回通し精製を行うことで系中から完全に Staple strands が除去できることが分かった(Fig 3-3-1 A の 2 レーン)。なお当初予測していた通りゲルろ過カラムによる 1 回の精製では十分に Staple strands が除去しきれないことがわかった(Fig 3-3-1 A の 1 レーン)。さらに生成物の紫外吸収スペクトル(260 nm)から 2 回のゲルろ過精製プロセスを経て最終的に得られる DNA Tripod の最終モル量は最初にカラムに投入した DNA Tripod に対して約 30%となっており、DNA Tripod がゲルろ過カラムに吸着していることが示唆された。一方、本プロセスの後でもアガロースゲル分析においては DNA Tripod 由来のバンドが明確に確認されており、構造体が精製後も安定的に維持されていることが示唆された。

得られた精製 DNA Tripod の各辺に存在する 3 つのビオチン化サイトに対して 3 等量の Alex 647 Streptavidin を加え室温で 30 分間インキュベーションした。反応混合物は再度ゲルろ過カラムに通過させ過剰量の Streptavidin を除去した。前プロセスと同様に紫外光による DNA 濃度測定を行ったところ得られた DNA Tripod 構造体の濃度は約 2nM 程度であり初期の DNA Tripod 量に対して 10%程度の収率であった。得られた精製物に対してさらにエクソソーム認識用抗体(抗 CD-9, 抗 CD-63, 抗 EpCAM 抗体)を Streptavidin 結合サイトに対して 1 等量加え室温で 1 時間反応させた。

今回使用した 3 種類の抗体においては目的とする DNA Tripod / 抗体結合体が抗 CD-9 抗体使用時にのみ得られた。一方で抗 CD-63 抗体、抗 EpCAM 抗体使用時には後述するように DNA Tripod の 2 量体が形成されてしまったため、以後の検討は抗 CD-9 抗体使用時の結果について述べる。

アガロースゲル電気泳動解析と TEM 観察から DNA Tripod に対する Streptavidin と抗 CD-9 抗体の導入が示唆される結果が得られた。DNA Tripod に足して Streptavidin, 抗体を導入した各ステップに関して反応物をアガロースゲル電気泳動による分析を行ったところ、DNA Tripod に由来するバンドの泳動性が顕著に遅くなる傾向が観察される (Fig 3-3-1-(1) B)。このことから各段階において DNA Tripod に対して Streptavidin、抗体が導入されたと考えられる。また DNA Tripod に対して抗体を導入し TEM 観察を行ったところ DNA Tripod の辺上に設計からの予想と一致する位置に抗体と思われる物質を観察した (Fig 3-3-1-(1) C)。TEM 像上では抗体の形状は明確に観察することが難しく、DNA Tripod の各辺に導入されている抗体数を議論することはできないが概ね一つの DNA Tripod 上の辺に 2~3 つの抗体が導入されている様に観察される。一方で TEM 像には DNA Tripod の構造上以外の場所においても抗体と思われる物質が観察されることから実際には DNA Tripod に結合していないフリーな抗体も系中に存在すると考えられ、正確な抗体結合数の定量には抗体の蛍光標識などを行い、蛍光曲線からの見積もりを行う必要がある。ここまでの精製工程で 3 回のゲルろ過カラム精製を経ており DNA Tripod の収量が少ないことからこれ以上の精製は行わず、抗体との結合反応後、直接次のステップへと進んだ。

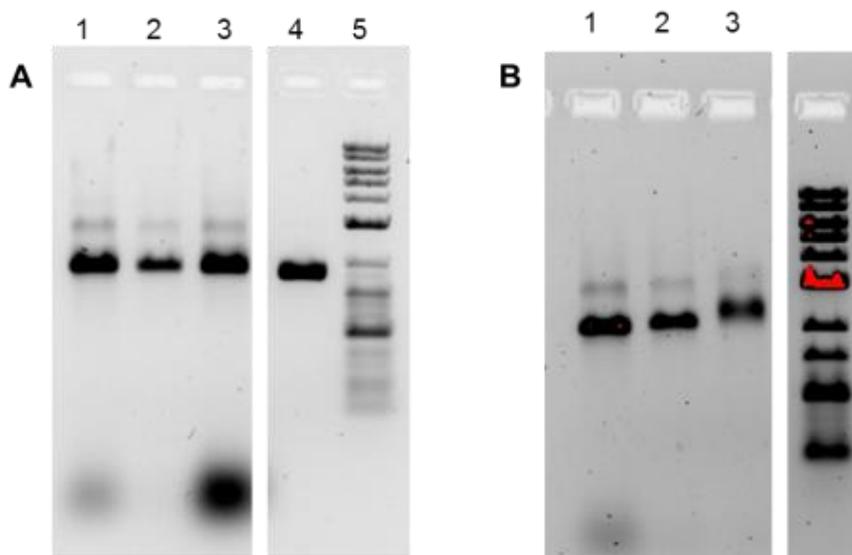


Figure 3-3-1-(1). DNA Tripod の精製と DNA Tripod への抗体導入

- A. DNA Tripod のゲルろ過カラム精製時におけるアガロースゲル電気泳動分析結果。1 レーンは DNA Tripod をゲルろ過により 1 回精製。2 レーンはゲルろ過カラムで 2 回精製。3 レーンは未精製の DNA Tripod。4 レーンは P8,064 scaffold strand。5 レーンは 1kb DNA ladder。DNA 結合型の Syber Safe による染色。
- B. DNA Tripod への Streptavidin, 抗体導入時のアガロースゲル電気泳動分析結果。1 レーンはゲルろ過カラムで精製した DNA Tripod。2 レーンは Streptavidin との反応後ゲルろ過精製した構造体。3 レーンは Streptavidin との反応後さらに抗体との反応を行ったサンプル。DNA 結合型の Syber Safe による染色。

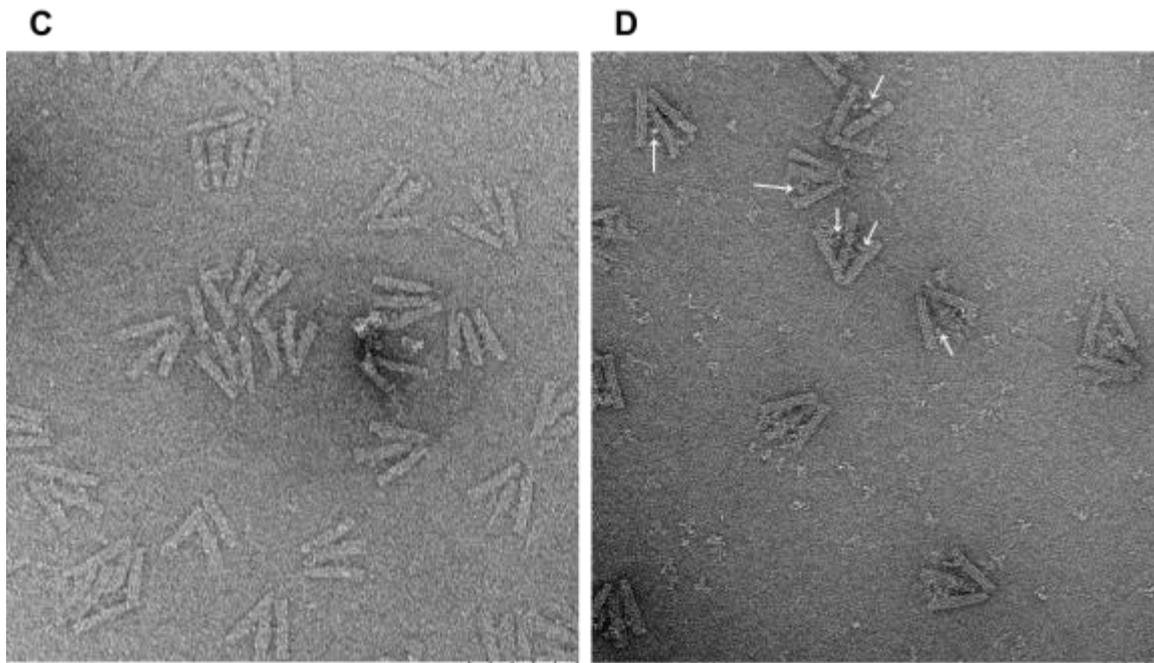


Figure 3-3-1(1). DNA Tripod の精製と DNA Tripod への抗体導入

C. DNA Tripod (Streptavidin との反応後)の TEM 画像

D. DNA Tripod (Streptavidin/抗体との反応後)の TEM 画像。矢印は抗 CD-9 抗体と思われる物質を表す。

本系では、抗体表面の Lysin 残基をランダムに標識したため、空間配置(抗体の向きや固定点)はバラバラであり、エクソソームへの親和性が Tripod1 分子毎に違う可能性がある。より厳密な位置特異性を持った抗体導入の手法としてはビオチン・リガーゼ発現システムなどが有効と考えられる(Fairhead and Howarth, 2015)。本システムの具体的な製品としては Avidity 社の Avi-Tag システムなどが挙げられるが、ここでは抗体を発現する遺伝子ベクターの特定の位置に Inverse PCR などによりあらかじめ特異的な 15 残基のペプチド (Avi-Tag)を導入することができる。その後 Avi-Tag が融合した抗体に対してビオチン・リガーゼを作用させることでこのペプチド上のリジン上にビオチンを導入する事が可能となる。このシステムを利用し抗体の Fc 部位の根元に選択的にビオチンを導入すれば、それ以後ステップに関して、抗体によるエクソソームの捕捉挙動などより厳密な検討、議論が行えるようになると思われる。

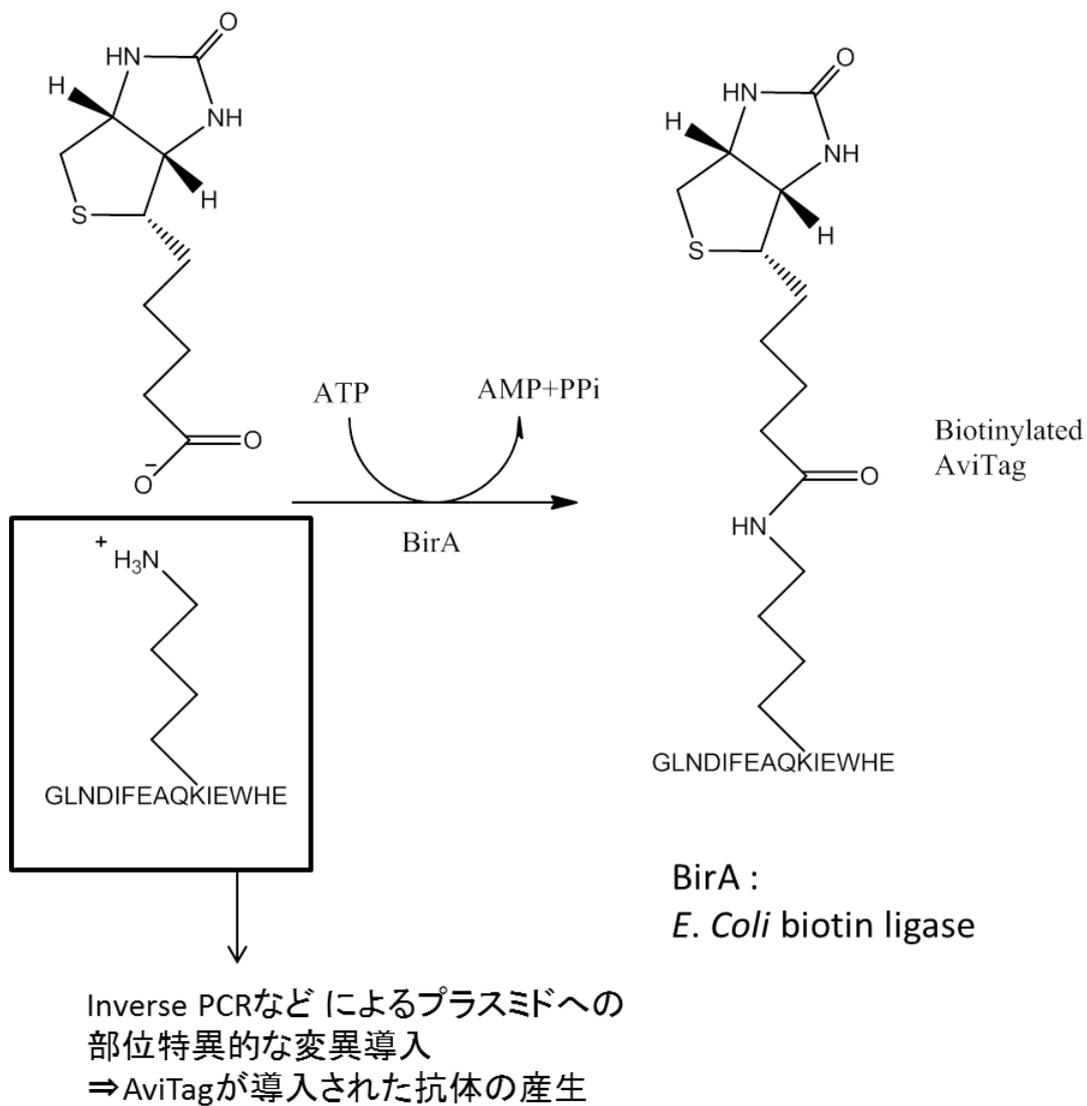


Figure 3-3-1-(2). ビオチン・リガーゼによるビオチンの位置特異的導入手法
 Methods Mol Biol 1266, 171-184 (2015)より抜粋、改編

3-3-2. 捕捉抗体種の選定

抗 CD-63 抗体、抗 EpCAM 抗体を導入した DNA Tripod のアガロースゲル電気泳動解析を行ったところ両抗体ともに抗体導入反応後に抗 CD-9 抗体導入時と同様の位置にバンドがわずかに観察されるが、主要なバンドはさらに遅い泳動位置に観察される(Fig 3-3-2 A)。

抗 EpCAM 抗体を導入した DNA Tripod に関して TEM 観察を行ったところ DNA Tripod 同士が結合した二量体が観察された。本二量体の詳細を観察してみると抗体導入部分を起点として DNA Tripod が会合しているように見られ(Fig 3-3-2 B)、抗 CD-63 抗体、抗 EpCAM 抗体自身の凝集性によるところが大きいと推察される。抗体自身が DNA Tripod に添加される前から凝集体を形成しているのか、添加後に凝集体を形成するのかは明確にはされていないが、前者の要因である場合は抗体液をあらかじめ超音波処理することや溶液の pH の調製により解決できる可能性が考えられる。また抗 CD-63 抗体に関しては異なるメーカーの抗体を使用すると凝集が生じないことがわかっている。同じ抗 CD-63 抗体でも Fc 鎖のアイソタイプや Fab 部分のアミノ酸配列の違いによってこのような挙動の違いは生じると考えられる。

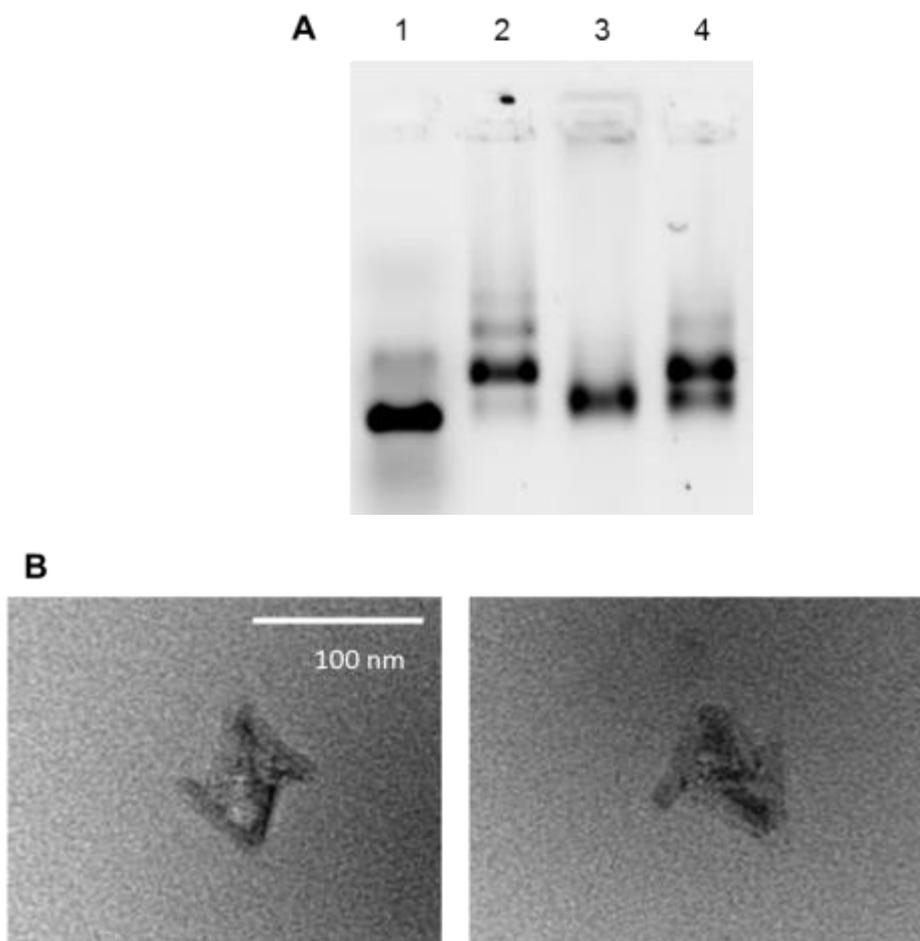


Figure 3-3-2. 抗 CD-63 抗体、抗 CD-9 抗体、抗 EpCAM 抗体の特性

- A. 各種抗体(抗 CD-63 抗体、抗 CD-9 抗体、抗 EpCAM 抗体)導入時の DNA Tripod のアガロースゲル電気泳動分析結果。1 レーンは Streptavidin 導入反応後の DNA Tripod、2 レーンはさらに抗 CD-63 抗体との結合反応、3 レーンは抗 CD-9 抗体との結合反応、4 レーンは抗 EpCAM 抗体との結合反応を行ったサンプル。Streptavidin を標識している Alex647 でのイメージング。
- B. 抗 EpCAM 抗体結合後の DNA Tripod における 2 量体の TEM 像。倍率 200,000 倍

4. DNA Tripod によるエクソソーム捕捉

これまでの検討によりエクソソームを捕捉するための DNA Origami 構造体の構築とその構造体上への抗 CD-9 抗体導入手法が確立されたため、この DNA Tripod/ 抗 CD-9 抗体を使用してエクソソームの捕捉挙動に関する詳細な検討を実施した。エクソソームサンプルは血液などの検体から採取することも可能であるが得られるエクソソームの性質と捕捉挙動に対するばらつきを最小限に抑えるため本研究においては培養細胞の上清から採取したエクソソームサンプルを使用する。以下に実験手法を述べる。

4-1. 実験手法

エクソソームサンプルの調製 (フィルター法)

試薬

- DMEM/F-12 + GlutaMAX : Thermo Fischer Scientific 社製 型番 10565
- FBS : GE ヘルスケア社製 Characterized Fetal Bovine Serum, 型番 SH30071
- 抗生剤 : 和光純薬工業社製 ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液 (×100) 型番 161-23181
- 血清入り培地の調製 : DMEM/F12 + GlutaMAX に対して 5% v/v % の FBS 添加。抗生剤としてペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液を 1x 濃度で添加して血清入り細胞培養用の培地を調製した。
- 無血清培地の調製 : 上記血清入り培地の調製において FBS を添加しない組成を無血清培地として使用した。

装置

- フラスコ : Nunc 社製 型番 159910
- 限外ろ過フィルター : ミリポア社製 アミコンウルトラ -15 (NMWL:100K) 型番 UFC910024
- インキュベータ : ヤマト科学社製 IP400 (5% CO₂, 37°C)
- 遠心分離機 : ベックマンコールター社製 Allegra X-15R
- 充填容器(凍結保存チューブ) SARSTEDT 社製 型番 72.730.100S

方法

エクソソームサンプルの調製手順 : 凍結保存の結腸癌株化細胞 HT-29 を融解させ 5% FBS 入りの上記培地での起眠を行った。培養初日においては 10cm ディッシュ一枚を使用して起眠を行い、一日ごとに継代を行い3日目に 10cm ディッシュ 15 枚分まで細胞を増殖させた。その状態のまま 4 日間培養を行い、10cm ディッシュ 30 枚分に継代を行った。この時点か

らさらに 3 日間培養を行い、細胞がコンフルエントになった状態で培養上清を廃棄し、PBS で細胞の洗浄を行った。血清中に含まれる BSA 由来の小胞を除去するためにここに無血清培地を添加してさらに 3 日間 HT-29 の培養を実施した。その後 30 枚分のディッシュから培養上清を回収し、0.2 μm シリンジろ過フィルターによるろ過を実施することで死細胞や大粒子径の小胞を系中から除去した。その後この上清を限外ろ過フィルターに通過させ 100 倍に濃縮を行った。このサンプルをエクソソームサンプル(100x)として実験に使用した。

磁性粒子によるエクソソームの捕捉実験と CLEIA 法による定量実験

試薬

- ・抗体結合粒子：JSR 社製 ExoCap™ CD9 Kit for Serum Plasm (0.1%, 1mg/ml)
- ・Washing/Dilution Buffer：JSR 社 ExoCap に付属の buffer 使用
- ・ALP 抗体希釈液：50mM MES (pH6.8), 100mM NaCl, 0.1% Proclin95, 0.03mM 塩化亜鉛, 1mM 塩化マグネシウム, 1%BSA, 0.003%Aikaline Phosphatase Mutein, recombinant (130410)
- ・発色基質：富士レビオ社製 クラスⅢシリーズ ルミパルス基質液 50mL Serial 型番 01186
- ・洗浄液：TBS / 0.01% TritonX-100
- ・ALP 抗体希釈液 50mM MES (pH6.8), 100mM NaCl, 0.1% Proclin95, 0.03mM

装置

- ・ルミノメーター プロメガ社製 GloMax
- ・インキュベータ TAITEC 社製 アルミブロック恒温槽 CTU-Mini
- ・96 ウェルプレート コーニング社 型番 23711007

方法

抗 CD-9 抗体が結合したエクソソーム捕捉用の磁性粒子キット(JSR ライフサイエンス社製 ExoCap™ CD9 Kit for Serum Plasm, 0.5wt%)を付属の dilution buffer で 0.1wt%まで希釈した。本磁性粒子液 100ul に対して 1x エクソソームサンプル(上記) 100uL を混合し室温でインキュベーションを開始した。この際、20, 60, 120, 180, 240, 300 分のインキュベーション時間に対してそれぞれ N=3 でサンプルを調製した。規定のインキュベーション時間後に本磁性粒子を集磁し、専用の洗浄 buffer を用いて 8 回洗浄を行った。この後で ALP(アルカリフォスファターゼ)標識の抗 CD81 抗体を添加し室温で 20 分間インキュベーションを行った。ここで再度集磁を行い洗浄後、発色基質を添加し 5 分後に発光強度を測定した。

DNA Tripod でのエクソソーム捕捉、解析

抗体まで導入反応を行ったである DNA Tripod 分散液(濃度が 2~3nM) 12uL に対して 100x のエクソソームサンプル 3uL を添加して室温で 24 時間インキュベーションを行いエクソソームサンプルの捕捉を行った。本反応の終了後、反応混合物は直接アガロースゲル電気泳動解析、及び透過型電子顕微鏡による観察を 3-2 章に基づく方法で行った。なおアガロースゲルにおける実験においてはエクソソームを捕捉した DNA Tripod 液 15uL に対して Loading dye を 5uL 加える比率を標準的な条件として採用している。

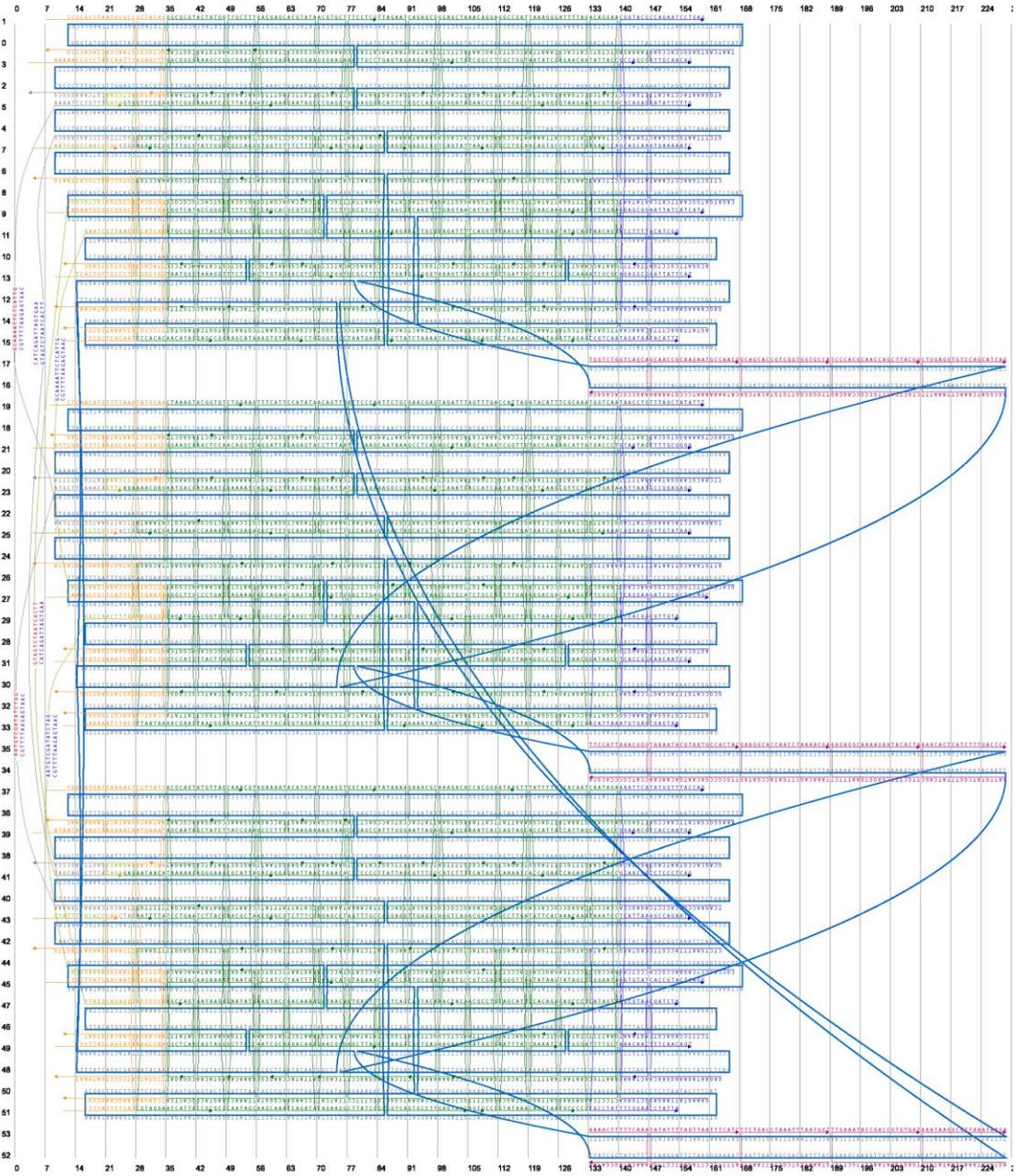
不活化エクソソームの調製/DNA Tripod との反応

100x のエクソソームサンプル 3 uL に対して 250nM の抗 CD-9 抗体溶液を 2uL 添加して室温で 24 時間インキュベーションしたものを不活化エクソソームサンプルとして用いた。抗体まで導入反応を行った濃度が 2~3nM である DNA Tripod 含有液 12uL に対して本不活化エクソソームサンプル 5uL を添加して室温で 24 時間インキュベーションを行い同様にアガロースゲル電気泳動による解析を実施した。

DNA Tripod(100°-100°-100°)

Strand Diagram とシーケンス情報を次ページに示す

◆DNA Tripod (100° - 100° - 100°) の Strand Diagram



◆DNA Tripod(100° -100° -100°)に使用する Staple Strands のシーケンス情報-2

50[104]	51[104]	GCTCAGTACCGAATCGCTGGGGTCACTGCCTTGAATAAC	42	
51[46]	47[38]	GCCACTTGGGGAGGTTTCTTCAAAACAACAAGCC	35	
51[109]	47[101]	CCCAGTGTACTGGTAATAGTGAAGGCTTAGAAC	35	
51[130]	46[122]	CCCCATGGCTTTTATGATATCCAGGCCACCCAGAGTCT	42	
0[166]	3[156]	TAATCAGTGAAGCCAGGATGCAACAG	30	connector 付近
2[163]	5[156]	ATGGAATACCTACATTAATATTTTG	27	
4[163]	3[143]	GTCTTTAATGCGCAACTGATAGCCACAGACTTGACGCCCA	42	
7[137]	12[143]	CCACCTCACTCGTCAATAGATAACAACAAGGAGCGGAA	42	
6[163]	10[143]	CTTGCCTGAACCTGAATATCAACCAGCAATATAATACCTTTTTTC	49	
8[166]	7[156]	CAGATGATGCAATTCATCAATGAAAATC	30	
10[142]	1[159]	TTTCGTAAGCCAGAATCCTGAG	23	
10[160]	11[153]	ACGGATTCGCTGAACATCGG	21	
12[142]	13[156]	CAAGAAGCGAATTTTCAT	20	
12[163]	9[159]	GAGCAAAAGAGATGATAATATCATATA	30	
14[160]	15[153]	AGTATTAGCTTTATACATTT	21	
18[166]	21[156]	GCGACTGAAAAGGTGGCTTTTTGCGGA	30	
20[163]	23[156]	TTCAACGCAAGATAAAGCCGAGAGG	27	
22[163]	21[143]	TGAGAGATCAAAAAGCTATCAGAAATTAATTTTTGTA	42	
25[137]	30[143]	AAAAAATTCGACATTAATGTGAGCAACCGTCAGGAACCCG	42	
24[163]	28[143]	ATTGTAAAGTAAATTTTTGTACAGGAAGAACAGGGTCAGGAAG	49	
26[166]	25[156]	GCAACGCTCTGGTCCGGAATGTATAAG	30	
28[142]	19[159]	GTGTAACCTGTTACCTAATTT	23	
28[160]	29[153]	AGTGCAAGCTTTCCGTTGTA	21	
30[142]	31[156]	GAATCAGCGAAAACAATCGG	20	
30[163]	27[160]	GCGCCATGTTTTACCAGTGATCGCACTCCAGC	31	
32[160]	33[153]	ATTTCTCGTGGGAACGAGTAA	21	
36[166]	39[156]	AAAGGGCGACATTCACCGATCACCAATGA	30	
38[163]	41[156]	GCAACAGCTAATCAGTCTCCCTCAG	27	
40[163]	39[143]	TCAGAAGCCGACCTCAGAGCCAGAACCCGAGCAGAGAA	42	
42[135]	48[143]	ATATGCTATTTGGAAGCTGAGAGGTATACTA	35	
42[163]	46[143]	CTCTGAATTACCGTTCCAATAGTCAATTAACCTCAGAGCTAAAGTA	49	
44[166]	43[156]	GCCACCTCAGAACCGCAAGCAGAATG	30	
46[142]	37[159]	AATAAATTCATATGGTTACAG	23	
46[160]	47[153]	TCTTCGAGAGTTCGATCTA	21	
48[142]	49[156]	AAGAAACAATTTCAAGAGT	20	
48[163]	45[159]	GAGAATAAGAAAGCAACACCTGACTCAGG	30	
50[160]	51[153]	GAAAGTATAAGAGCTATTA	21	
7[24]	38[4]	GGGGTGGTTGCCCCAGAGCGGTAGCAGCTTTAGAGTTAAGCCATTTTT	52	Vertex bundle1
25[24]	2[3]	ACCATTCACTGAATCCCCCTCAAAAAATCCTGTTTCTGTCAAAAGGGGTTTTT	53	
43[24]	20[4]	CTACTTAACGTCAAAAATGAAAAATGCTTTAAACATATCGCGTTTTAATTTTT	52	
7[4]	41[24]	TTTTTAATCGCCAGCGTCTGGCCTTAGCAAGAGCAAGATTCAGA	49	Vertex bundle2
25[4]	5[24]	TTTTTTTATAACCTCGTCAACGTAAAAATGTTAACGACTCAAGATG	49	
43[4]	23[24]	TTTTTCTATTTGACCAAGCAAGCGCGCAACTTTGACTTCAAAGTTC	49	
17[133]	16[133]	TGGTCTGGTCAAGAAAGCGCCACAGCGG	28	Strut部分
16[167]	17[167]	CATAAAAAATCCCGTAAAAAGCAACCGCAAGATGCCAAG	42	
16[188]	17[188]	TTGGGCGGTTGTGTACATCGAGCAGCACCGTGGGTGGCA	42	
16[209]	17[209]	CTGCTCAATTTGCCCGCCAGGTCCCACGCAACASCTTACGG	42	
16[229]	17[229]	AGCGGATCAAACTAAATTTCTGSAGGTGTCCAGCATCAG	40	
35[133]	34[133]	TTCCATTAACGGGCGCATCGCCACGCA	28	
34[167]	35[167]	TTGCCGCGCAATGACCACAATAAAATACGTAAATGCCACTAC	42	
34[188]	35[188]	TAAACAGCTTGATACCGATAGGAAAGCCACCAACTAAAAAGCA	42	
34[209]	35[209]	TTGCTTTCGAGGTAAATTTCTAAGAGCAAAAAGATACACTA	42	
34[229]	35[229]	AATGTATCGTTTTATCAGAAACACTCATCTTTGACCCC	40	
53[133]	52[133]	AAAACTTTTCAAAAACATAGCGATAG	28	
52[167]	53[167]	ATTTCCCTTAGAATCCTTGATATATTTAGTAAATTTTCATC	42	
52[188]	53[188]	GTAAATCGTGCCTAATTAATTTCTGACCTAAATTTAATGGT	42	
52[209]	53[209]	TGAGTGAATAACCTTCTTCTTGAATAACCGCCGCTGTGAT	42	
52[229]	53[229]	AGTACATAAATCAATATATAAATAAGGCGTTAAATAAGA	40	
1[7]	2[31]	TTTTTCCGCTTAATGGCGGTAAACCATGAATTTAGAGCTTAAAG	46	Vertex polyT strands
0[34]	12[9]	GCTGGCGCTACAGTACACTGGCTGGTATCATATGGGTTATACAAATTTTT	54	
3[3]	0[7]	TTTTTAAACCGTCTACCAACCCGTTTTT	32	
2[30]	14[11]	TGGGCTCAGTGTGACGTTTCTTCTTCTGTTGAAATTTGTTATTTTT	48	
9[7]	7[23]	TTTTTTCAGAATGGCGGGGCTCTGTGGCC	31	
13[9]	10[11]	TTTTTTCAGTGTGCCCTGGGTGTGTGAGCTTTTTT	36	
15[11]	6[4]	TTTTTTCGCTCACAATCGTCCAGCTGCATTAATTTTTT	41	
19[8]	20[32]	TTTTTCTCAAGATTTTTAAAGAATATAAGGCAACCAAGCCGA	44	
18[34]	30[9]	AATTCCTATGCAAAATCATACCACTGGCGGTTGGGATGAGCCGGTTTTT	54	
21[4]	18[8]	TTTTTTTCGAGCTTCAATGCTGTAGTTTTT	30	
20[31]	32[11]	AAGAAAGGAATTCATTTGTAATACAGTCAGGACGTTGGGAATTTTT	49	
27[7]	25[23]	TTTTTCAAAGCTGCTCATCAACCAATTT	31	
31[9]	28[11]	TTTTTTGTGTGCAAAATCCGGGAAACCGAATTTTTT	36	
33[11]	24[4]	TTTTTGAATAATCTACCATATGAAAGCAACCACTAATTTTT	41	
37[7]	38[31]	TTTTTGGCATATTAAGACTGAATACCAAGAAACAAATAACC	46	
36[34]	48[9]	AATAACGCCCTTATAACCAAGCAATTTGATCATCGCTGATAAATTTTTT	54	
39[4]	36[7]	TTTTTATAATAAGAGCAAAAAGAACTTTTT	31	
38[30]	50[11]	CACATTTCTGTTGTCAGGATAAAGTTCGAGAAACCAAGCCGTTTTTT	48	
45[7]	43[23]	TTTTTCTGTTTTCAACAATACTAATGCCAG	31	
49[9]	46[11]	TTTTTTCTACCAAGTATACCAACATGTAATTTTTT	36	
51[11]	42[4]	TTTTTTTTTTTTTTCATCTTAAATCAAGTAAAGTGTTTTTT	41	

4-2. 結果と考察

4-2-1. エクソソームサンプルの特性

4-1 章に記述した手法により HT-29 細胞の培養上清からフィルター法により調製したエクソソームサンプル液については CLEIA 法(Chemiluminescent Enzyme Immunoassay, 化学発光・酵素免疫測定法)により毎回サンプルを調製するごとに抗 CD-9 抗体に対する反応性を測定した。培養上清の 100 倍濃縮により得られた上記エクソソームサンプル(100x サンプル)を 1x に希釈して市販のエクソソームキャプチャービーズ(JSR ライフサイエンス社製の ExoCap™ CD9 Kit for Serum Plasm, 0.5wt%)を用いてエクソソームを捕捉した。抗 CD-9 抗体が結合した磁性ビーズと本エクソソームサンプルを混合、反応後、ALP(アルカリフォスファターゼ)蛍光標識した抗 CD-81 抗体を添加し発光強度の定量を行った。ここでの反応時間は 20 分、1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間としてそれぞれの時間での発光強度測定を行ったところ、反応時間 3 時間でほぼ発光強度が飽和する結果となった(Fig 4-2-1 A)。このことから反応時間 3 時間で抗 CD-9 抗体結合ビーズとエクソソームの反応が平衡状態に達したことが示唆される。そこで反応時間 3 時間の条件において希釈した 10x, 1x, 0.1x, 0.01x, 0.001x エクソソームサンプルに関して同様に抗 CD-9 抗体結合磁性粒子との反応を実施したところ、本濃度範囲において明確な希釈直線性を示す結果となった(Fig 4-2-1 B)。そこで初回に調製したエクソソームの 1x 希釈サンプルの発光強度を基準値の 100 の値に設定し、以後数回に分けて調整したエクソソームサンプルに関する同様の測定を行ったところその値は 95~105 の間に収まり各サンプルに関して大きな反応性差異は見られなかった。このことから各回に調製されるエクソソーム表面に表出する CD-9 抗原量はエクソソームサンプルの調製ごとに大きくばらつくことはなく、安定した表出量であることが明らかになった。そのため以後の実験においては調製されたエクソソームサンプルについて特別な規格化は行わずそのまま実験に使用した。

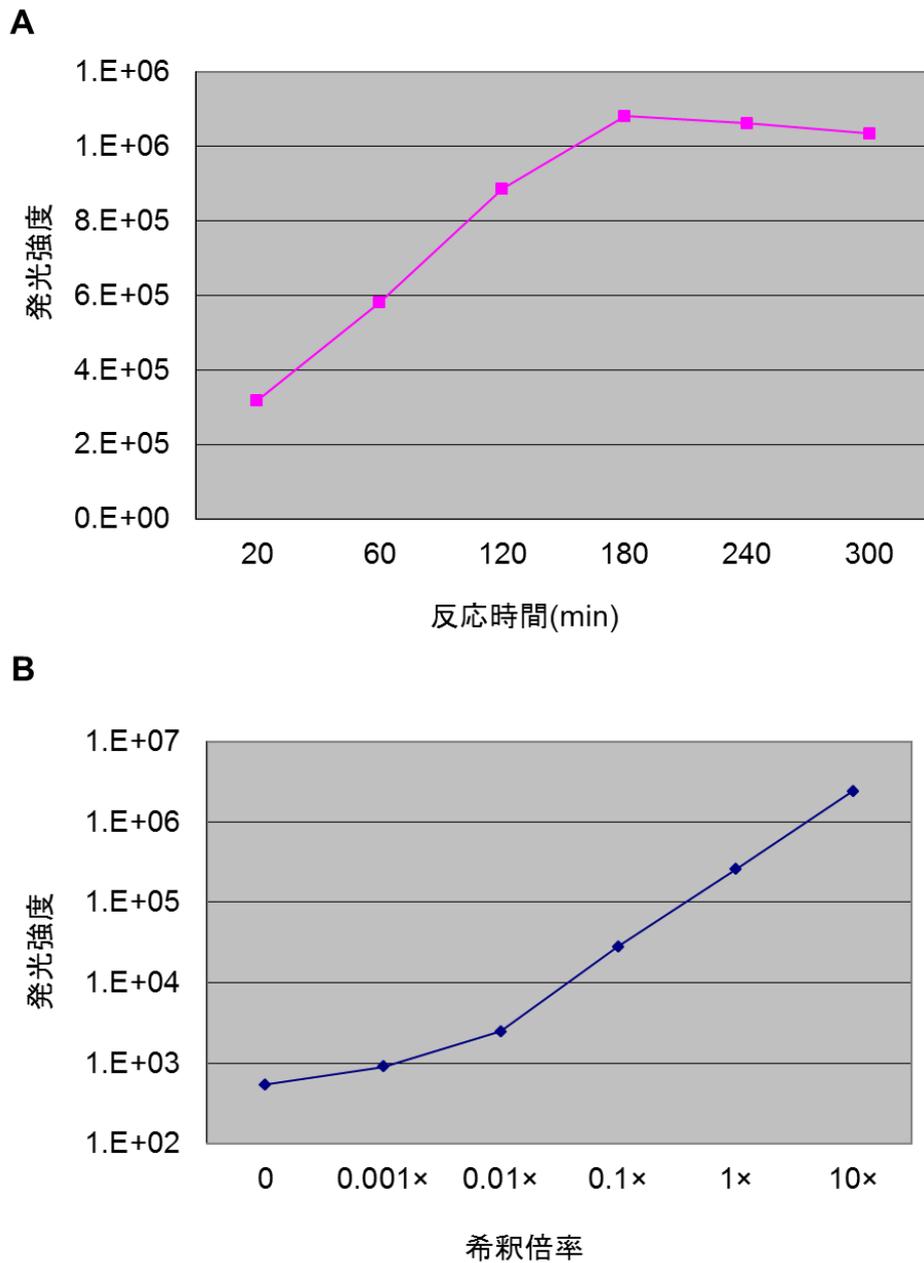


Figure 4-2-1. エクソソームサンプルと抗 CD-9 抗体結合粒子との反応挙動

- A. 抗 CD-9 抗体結合ビーズと HT-29 培養上清から調製した 1x エクソソームサンプルの ELISA 反応曲線
- B. 10x, 1x, 0.1x, 0.01x, 0.001x のエクソソームサンプルと抗 CD-9 抗体結合磁性粒子との反応曲線

4-2-2. エクソソームサンプルの粒子径

得られたエクソソームサンプルの透過型電子顕微鏡 (TEM)による観察を行った(Fig 4-2-2-(1))。調製した 100x のエクソソームサンプルを直接 Cu グリッドの上に添加し TEM 観察を行ったところ、エクソソームと見られる無数の円形物質が観察された。最少の粒子径では 10nm 程度、最大の粒子径では 180nm 程度であり 20nm~50nm 程度の粒子が多く観察される結果となっている。本エクソソームサンプルについての粒子径分布を確認するためにレーザー光を使用した光散乱型粒子径測定装置 NanoSight を用いてエクソソームサンプルの粒子径分布の測定を実施した。しかしながら本測定においては最少の粒子径が 50nm 程度、最大の粒子径は 300nm 程度の値を示し TEM 像との一致が見られない結果となっている(Fig 4-2-2-(2))。この原因としては溶液中におけるエクソソーム同士の凝集が考えられる。分散剤の添加、濃度の最適化などエクソソーム粒子径測定における詳細な条件検討により正確な粒子径分布が得られる可能性もあるが、TEM 測定からのエクソソーム粒子径のランダムサンプリングによる分布算出の方が実際のエクソソームの粒径分布を把握する上でより確実な手法と考えられ、本研究では TEM データを採用した。

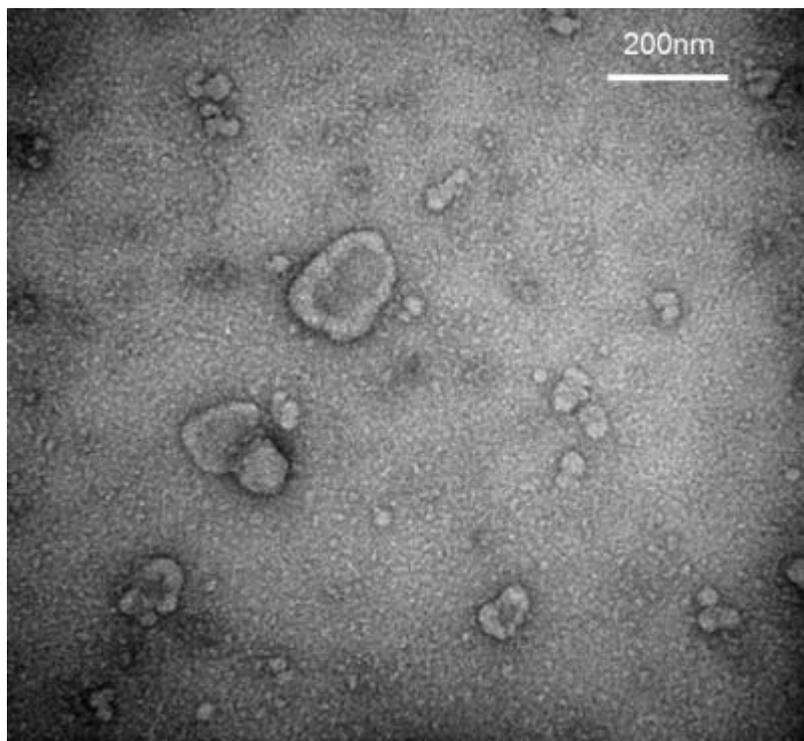


Fig. 4-2-2-(1)

HT-29 培養上清より調製したエクソソームサンプルの TEM 像 (倍率:100K)

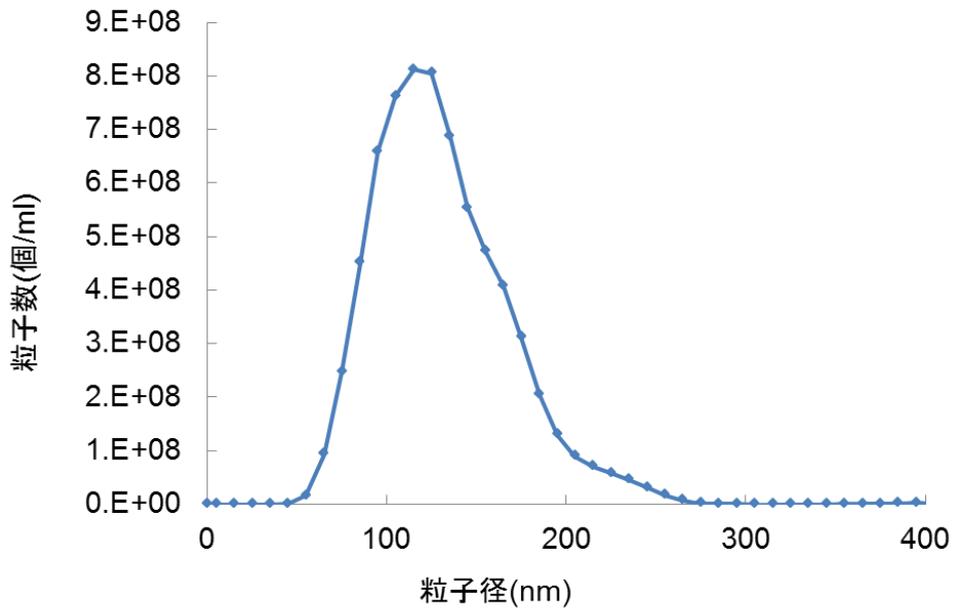


Fig. 4-2-2-(2)

レーザー光による光散乱型粒子径測定装置 NanoSight によるエクソソームサンプル(1x)の粒子径分布測定結果

4-2-3. 抗 CD-9 抗体/DNA Tripod によるエクソソーム捕捉

抗 CD-9 抗体を導入した DNA Tripod を使用してのエクソソーム捕捉検討を実施した。前記の方法に従い、抗 CD-9 抗体を DNA Tripod のビオチン化サイトに対して等量に加え、結合反応を行った後で調製した 100x のエクソソームサンプルを DNA Tripod に対して過剰量に加え 24 時間室温でのインキュベーションを行った。その後直接反応混合物をアガロースゲル電気泳動にて分析を行い、Streptavidin を標識している Alex647 の蛍光によるバンドイメージングを行った。この結果、ゲル上にはブロードなスミアが観察され DNA Tripod とエクソソームの何らかの相互作用が生じたことが示唆された(Fig 4-2-3-(1))。

この反応混合物を直接 TEM による分析を行ったところ系中のエクソソームが DNA Tripod の各辺の内面で挟むようにして捕捉されている様子が多数観察された(Fig 4-2-3-(2),(3))このことからスミア部分がエクソソーム/DNA Tripod の結合体によるものと推察された。ここでスミア部分がブロードに観察される理由としてはまず捕捉されるエクソソーム自体の大きさや性質が均一でないこと、さらには一つのエクソソームに対して複数の DNA Tripod が結合していることもあり、それゆえバンドに由来する DNA Tripod の泳動性にばらつきが生じるためと考察される。ここで DNA Tripod/抗 CD-9 抗体結合体に対してエクソソームを添加した際に出現するスミア部分の強度の定量を行った。Fig 4-2-3-(1)において赤枠強度 / (赤枠強度+青枠強度)として計算を行ったところ、スミア部分は全体の 80%に相当することが分かった。スミアが全て DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体複合体とエクソソームが結合したものと仮定すると系中に存在する DNA Tripod の内 80%がエクソソームと結合体を形成したと考えられる。

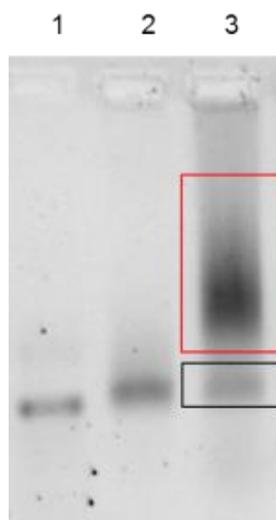


Fig 4-2-3-(1). DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体複合体によるエクソソーム捕捉におけるアガロースゲル電気泳動結果。1 レーンは DNA Tripod / Streptavidin、2 レーンは DNA Tripod / Streptavidin/抗 CD-9 抗体、3 レーンは 2 レーンのサンプルに対してエクソソームサンプルを加え 24 時間インキュベーションした条件。

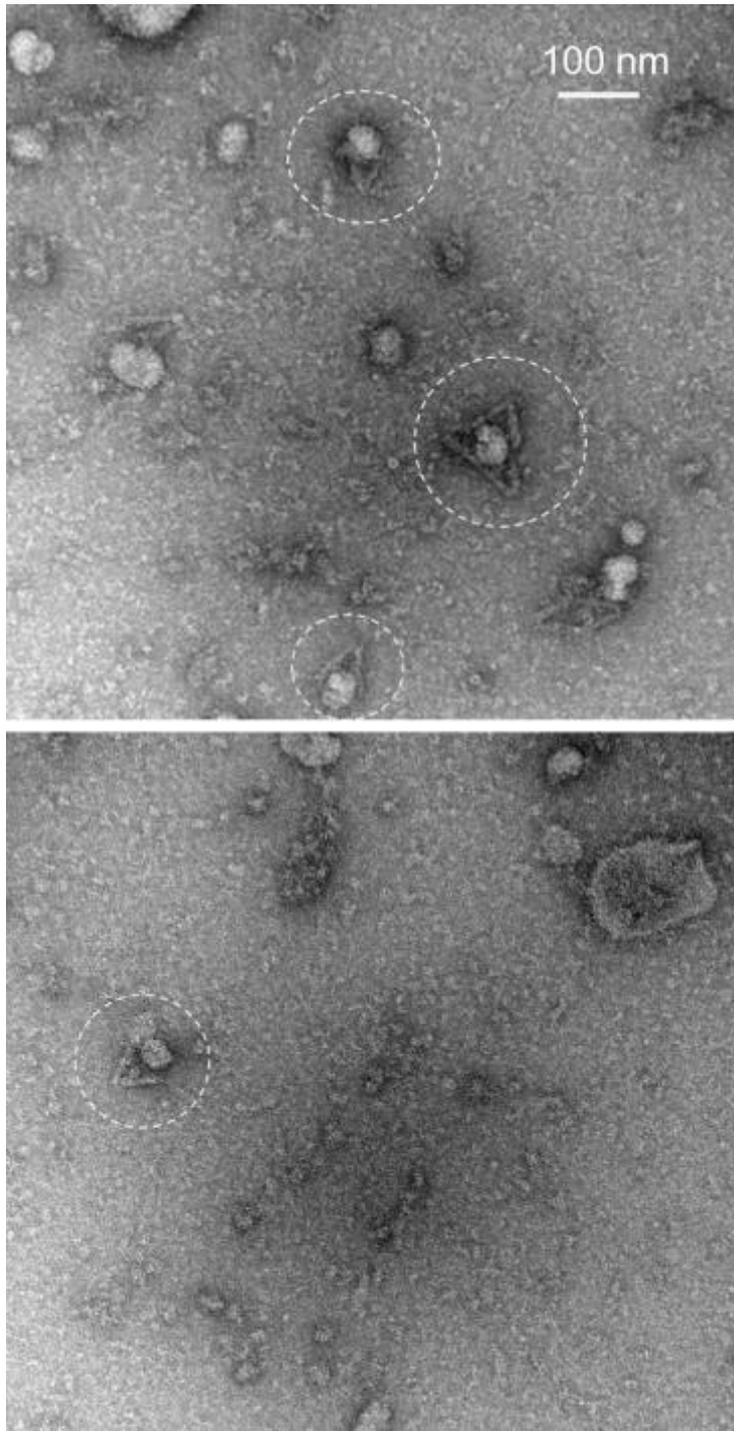


Fig 4-2-3-(2). DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体 複合体によるエクソソーム捕捉における TEM 画像結果。(倍率 : 120K)

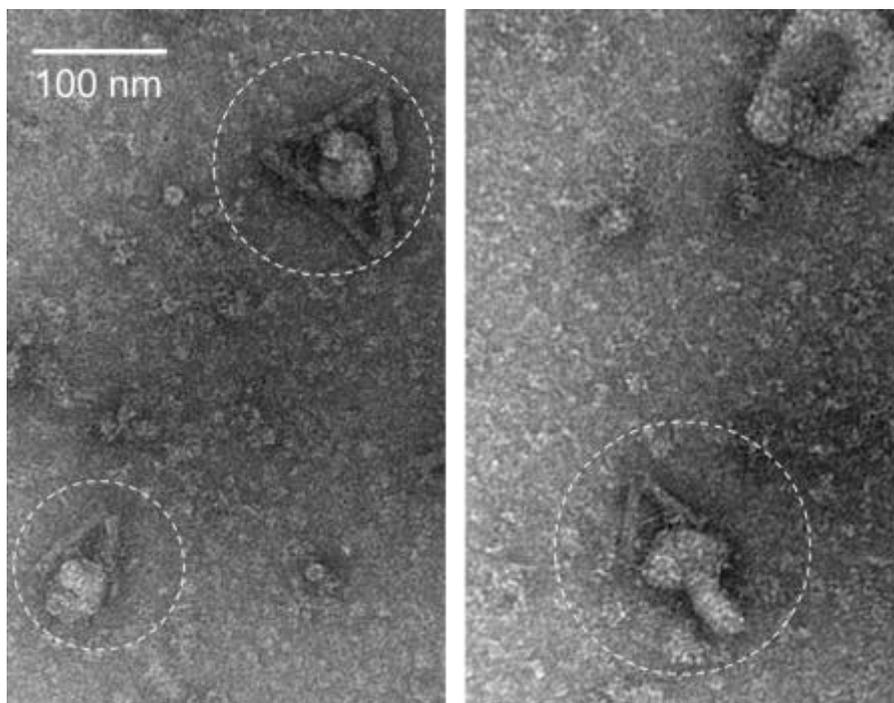


Fig 4-2-3-(3). DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体 複合体によるエクソソーム捕捉における TEM 画像結果。(倍率：200K)

4-2-4. アイソタイプコントロール抗体を使用しての検討

次に DNA Tripod によるエクソソームシステムの多角的な検証を実施した。抗 CD-9 抗体はマウスに対して CD-9 抗原を免疫することにより採取されたものであるが、抗 CD-9 抗体に対するアイソタイプはメーカー情報から Mouse IgG 2a タイプの抗体であることがわかっており、抗 CD-9 抗体と同様に DNA Tripod 上に導入しエクソソームサンプルの捕捉検討を行った。ここで抗 Mouse IgG2a 抗体は抗 CD-9 抗体導入における条件と同様、DNA Tripod 上のビオチン化サイトに対して等量加え結合反応を行った。抗 CD-9 抗体検討時と同じ条件のエクソソーム量を添加し、24 時間インキュベーションをした後で反応物のアガロースゲル電気泳動による解析を行った(Fig 4-2-4-(1))。この結果、本条件においてもわずかにスミアが観察され、抗 Mouse IgG 2a 抗体とエクソソームとの非特異吸着、もしくは DNA Tripod 自体とエクソソームの非特異吸着が示唆された。またここで抗 CD-9 抗体/DNA Tripod と同様に抗 Mouse IgG2a 抗体/DNA Tripod についてもスミアに関しての定量を行ったところ全 DNA Tripod に対する 25%に相当することが分かった。

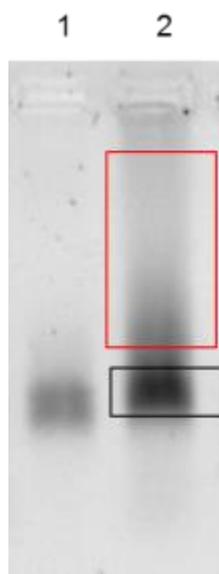


Figure 4-2-4-(1). DNA Tripod / アイソタイプコントロール抗体複合体によるエクソソーム捕捉におけるアガロースゲル電気泳動結果。

1 レーンは DNA Tripod / 抗 Mouse IgG2a 抗体、2 レーンはさらにエクソソームサンプルを加えた 24 時間インキュベーションした条件。赤枠が DNA Tripod /Streptavidin/抗 Mouse IgG2a 抗体と エクソソームの複合体に由来するスミア、青枠が DNA Tripod /Streptavidin /抗 Mouse IgG2a 抗体に由来するバンド。Streptavidin に導入された Alex647 によるイメージング。

ここで非特異吸着に関して DNA Origami と抗体でどちらの要因が大きいかを調べるため、DNA Tripod/Streptavidin 複合体によるエクソソーム捕捉の検討を行った。コントロール条件としては DNA Tripod / Streptavidin / 抗 CD-9 抗体を使用し、DNA Tripod / Streptavidin 複合体へのエクソソームサンプル添加、24 時間インキュベーションを実施した。なおこの時 DNA Tripod / Streptavidin / 抗 CD-9 抗体の作製においては抗 CD-9 抗体を DNA Tripod / Streptavidin の反応サイトに対して 2 等量加えている。本反応に関するアガロースゲル解析の結果を Figure 4-2-4-(2)に示す。

DNA Tripod / Streptavidin / 抗 CD-9 抗体へのエクソソーム添加においては 4-2-3 章同様に明確なスミアが観察され DNA Tripod によるエクソソーム捕捉が示唆された (Fig. 4-2-4-(2) 2 レーンと 4 レーン)。ここでスミアが 4-2-3 章に比べ少なくなっているのは、本実験においては過剰量の抗 CD-9 抗体が系中に存在するためと考えられる(この現象については 4-2-6 章で詳細について記述する)。一方で DNA Tripod / Streptavidin へのエクソソーム添加においてスミアはほとんど出現しないことから DNA Tripod/Streptavidin 複合体自体にはエクソソームを捕捉する性質はほとんどない事が明らかになった。(Fig. 2-3-4-(2) 1 レーンと 3 レーン)。このことから DNA Tripod / 抗 Mouse IgG 2a 抗体結合体に対してエクソソームを加えた際に生じるスミアは抗 Mouse IgG2a 抗体とエクソソームとの非特異吸着に起因するものと推察される。

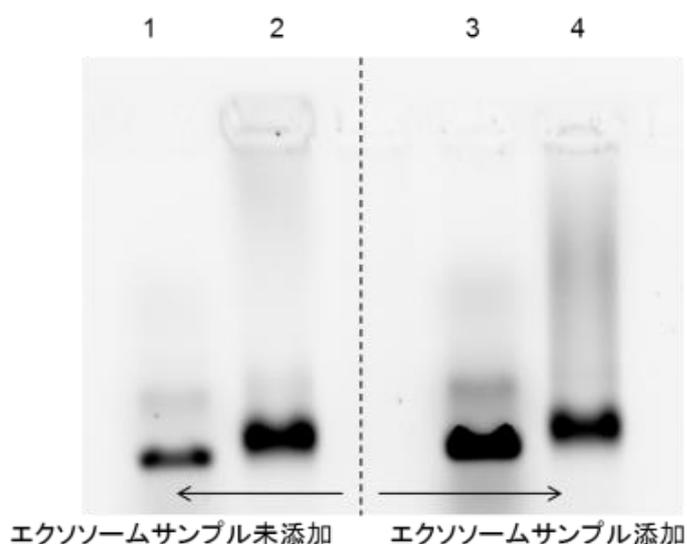


Figure 4-2-4-(2). DNA Tripod /Streptavidin と DNA Tripod/ Streptavidin / CD-9 それぞれに関するエクソソームサンプルとの相互作用

- 1 レーン:DNA Tripod / Streptavidin、2 レーン: DNA Tripod / Streptavidin / 抗 CD-9 抗体
 - 3 レーン: DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体 +エクソソームサンプル
 - 4 レーン: DNA Tripod / Streptavidin / 抗 CD-9 抗体+エクソソームサンプル
- Streptavidin を標識した Alex-647 によるイメージング

4-2-5. DNA Tripod により捕捉されるエクソソーム粒子径

ここで DNA Tripod により捕捉されたエクソソームの粒子径分布の測定を行った。最初に、HT-29 培養上清から 4-1 章に基づくフィルター法により調製したエクソソームサンプルについて粒子径分布の測定を行った。TEM で観察される小胞体をランダムに 150 個選び、その粒子径を測定しヒストグラムに表したところ 20~170nm に至るまでかなりブロードな分布を示すことが分かった(Fig 4-2-5 A)。ここで DNA Tripod により捕捉されたエクソソームの粒子径についても同様に測定を行った。本条件においては DNA Tripod により捕捉された 60 個のサンプルを測定してヒストグラムにまとめた。結果として 40-50nm における分布を最大値としながらおおよそ 30-60nm での分布に粒子径が納まる結果となっている(Fig 4-2-5 B)。本システムでは設計上 40 nm 以下のエクソソームのみを捕捉できるシステムとなっており、理想系からの解離はあるものの 60nm 以上のエクソソームは本系では排除されていることから、粒子径特異的なエクソソーム捕捉システムが現実になり立つことが示唆された。

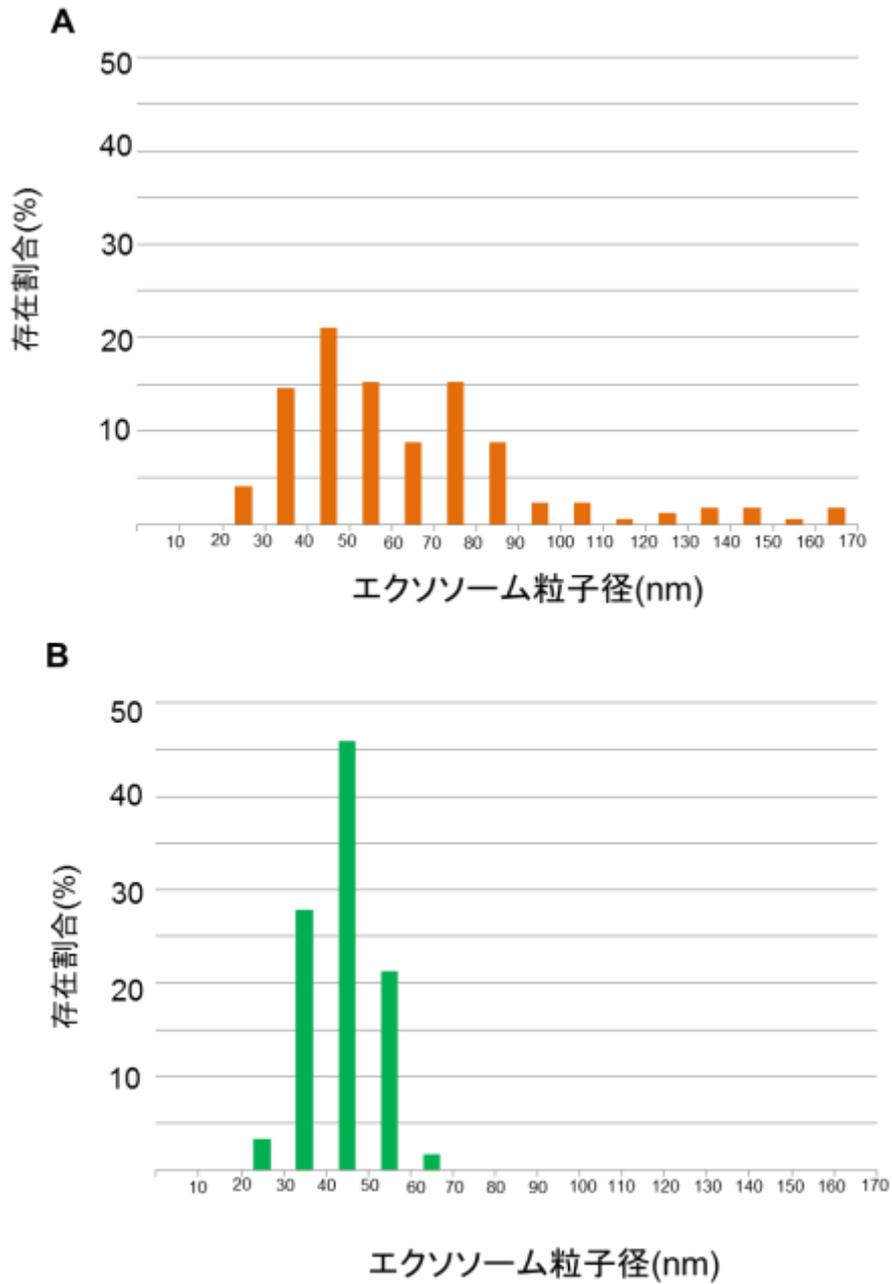


Figure 4-2-5. TEM 画像から測定した各エクソソームサンプルの粒子径

A. HT-29 培養上澄より調製したエクソソームサンプルの粒子径分。150 個のランダムサンプルから測定。

B. DNA Tripod / Streptavidin/抗 CD-9 抗体により捕捉したエクソソームサンプルの粒子径分布。60 個のサンプル数からの測定。

4-2-6. 不活化エクソソームを使用しての検討

DNA Tripod による本エクソソーム捕捉システムにおける更なる検証の一環として不活化エクソソームサンプルを用いての検討を実施した。4-1 章に基づく手法によりエクソソームサンプルに対して過剰量の抗 CD-9 抗体を添加し 24 時間室温でインキュベーションを行いエクソソーム表面の CD-9 抗原の反応活性を失活させる (以後不活化エクソソームとする)。この不活化エクソソームを同様に DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体結合体に添加し室温、24 時間インキュベーション後にアガロースゲルによる分析を行った (Fig 4-2-6)。本反応においては通常のエクソソーム添加時に出現するスミアがわずかに観察されその割合はバンドの強度分析から約 20%と測定された (Fig 4-2-6 レーン 2 の赤枠)。これまでの検討においてエクソソーム添加時に生じるスミアは約 80%程度の割合 (4-2-3 章参照) となる。この結果より DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体とエクソソームサンプル混合時に出現するスミアはエクソソーム表面の CD-9 抗原と抗 CD-9 抗体との結合により生じた DNA Tripod / エクソソームの複合体である示唆される。

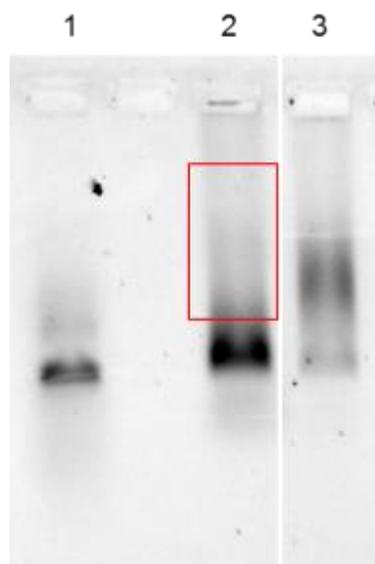


Figure 4-2-6. DNA Tripod による不活化エクソソームの捕捉検討

1 レーンは DNA Tripod / Streptavidin / 抗 CD-9 抗体、2 レーンはさらに不活化エクソソームを添加し 24 時間インキュベーション、3 レーンは 1 レーンサンプルに通常のエクソソームサンプルを添加した条件。Streptavidin に導入された Alex647 (Cy5 フィルター) によるイメージング。

4-2-7. DNA Tripod のエクソソーム捕捉における Kinetics

本 DNA Tripod によるエクソソーム捕捉における kinetics の検討を行った。DNA Tripod/抗 CD-9 抗体複合体に対してエクソソームサンプルを添加し 1 時間、7 時間、19 時間での室温インキュベーションを実施し、反応混合物のアガロースゲル解析を実施した。コントロールとしては抗 CD-9 抗体のアイソタイプコントロールである Mouse IgG2a サンプルを用いて同様の条件下でエクソソームサンプルの添加、インキュベーションを実施した。DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体複合体とエクソソームとの反応により出現するスミア部分の蛍光強度から反応率を算出すると 1、7、19 時間の順に 52%、68%、75%と時間を追うごとにスミア部分、つまり DNA Tripod / エクソソーム複合体に由来すると思われるスミアの割合が上昇する結果となった(Fig 4-2-7-(1) レーン 2-5)。またコントロールとなる抗 Mouse IgG2a 抗体においても 1、7、19 時間の順に 10%、11%、20%と少しずつスミア部分の強度が増えていく結果となった(Fig 4-2-7-(1) レーン 6-9)。本スミアの時間ごとの強度変化をグラフにまとめると DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体複合体に関してはエクソソームサンプルとの混合開始から 6 時間ほどで反応が飽和に近づいている (Fig 4-2-7-(2))。また DNA Tripod / 抗 Mouse IgG 2a 抗体とエクソソームの混合物についても徐々にスミアが増加しているが反応時間を延ばしてもこの後極端にスミアが強くなる傾向にはない。6 時間以上のいずれの反応時間においても DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体と DNA Tripod / 抗 Mouse IgG2a 抗体の両系でエクソソームサンプルとの反応性に明確な差異が認められる結果となった。

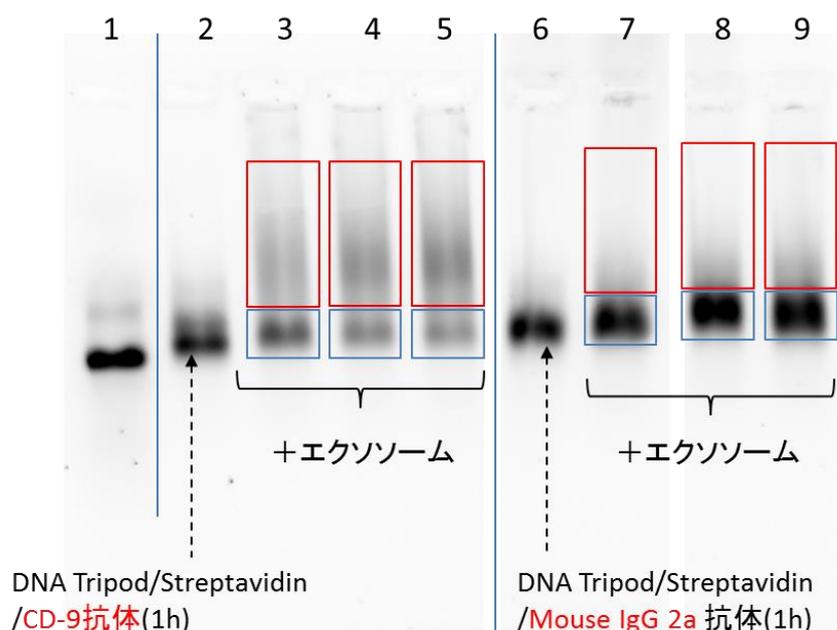


Figure 4-2-7-(1). DNA Tripod /抗 CD-9 抗体、及び DNA Tripod /抗 Mouse IgG2 抗体によるエクソソームの捕捉における時間ごとのアガロースゲル電気泳動解析。

1 レーンは DNA Tripod / Streptavidin、2 レーンは DNA Tripod / Streptavidin / 抗 CD-9 抗体、3 レーンは DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体とエクソソームサンプル反応後 1 時間
4 レーンは 7 時間、5 レーンは 19 時間
6 レーンは DNA tripod / 抗 Mouse IgG2a 抗体とエクソソームサンプル反応後 1 時間
7 レーンは 7 時間、8 レーンは 19 時間の条件

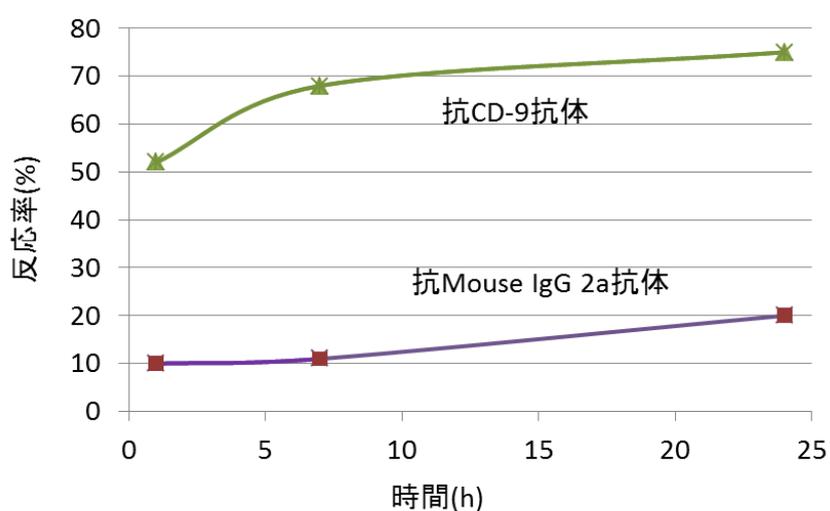


Fig 4-2-7-(2) DNA Tripod (60° -60° -60°)/ 抗 CD-9 抗体と DNA Tripod (60° -60° -60°)/ 抗 Mouse IgG2a 抗体の両系におけるエクソソームサンプルとの反応曲線
アガロースゲルにおけるスミアの蛍光強度から算出

4-2-8. エクソソーム捕捉における DNA Tripod の角度の影響

DNA Tripod の角度変化がエクソソームの捕捉効率に及ぼす影響についての検討を実施した。DNA Tripod の角度を変更するために Strut の導入位置を変更し、返間の角度が 100°をなす新たな DNA Tripod を設計した (以後 DNA Tripod-100°)。ここでは Vertex から Strut 導入部までの長さを 63 塩基 \approx 21nm に、Strut の長さを 98 塩基 \approx 33nm に設定した(詳細は 4-1 章に記述)。60°の DNA Tripod と同様のアニーリング条件で folding 後、バンドの切り出しを行い TEM による構造確認を行ったところ辺間の角度が 60°の DNA Tripod より明らかに広角である Tripod 構造が観察された。DNA Tripod-100°は TEM による観察の際そのほとんどが頂点を下に向け、その 3 辺が等間隔に開き平面三俣構造のように Cu グリッドに吸着している様子が観察される。これは 100°という広角のため、頂点を下に向けて吸着された場合 3 辺がグリッド上に引き寄せられる力により、変間の Strut が破壊されこのような平面構造として観察されるものと推察される(Fig 4-2-8-(1))。

得られた DNA Tripod-100°に関しては DNA Tripod-60°と同様の条件で精製、Streptavidin 導入(30 分反応)を行い抗 CD-9 抗体と抗 Mouse IgG2a 抗体の導入反応を行った。その後エクソソームサンプルを添加して 1 時間、24 時間でのインキュベーションを実施した。その後、アガロースゲルでの分析を行ったところ 60°DNA tripod と同様にエクソソーム/DNA Tripod の複合体に起因すると思われるスミアが出現した(Fig 4-2-8-(2) レーン 3)。

得られたスミア部分から DNA Tripod とエクソソームサンプルの反応率を計算したところ DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体とエクソソームの反応率は 1 時間ですでに 93%の反応率に 24 時間では 96%の値を示した。また DNA Tripod / 抗 MouseIgG 2a 抗体複合体とエクソソームとの反応においては 1 時間で 45%、24 時間で 54%の値となった(Fig 4-2-8-(3))。このことより広角を保持する DNA Tripod / 抗体複合体に関してはエクソソームとの反応性も高いがそれに伴い非特異吸着的なエクソソームの結合も増えてしまうことが示唆された。

また DNA Tripod-100°/ 抗 CD-9 抗体複合体にエクソソームを混合した時に生じるスミアの面積は 60°DNA Tripod の検討時に比べより広い面積に広がっている。ここでエクソソームと DNA Tripod-100°/ 抗 CD-9 抗体の反応混合液の TEM 観察を行ったところ、開かれた DNA Tripod の内面に 60°の DNA Tripod では捕捉されなかった 80nm 程度のエクソソームも多く観察され(Fig 4-2-8-(4))、DNA Tripod により捕捉されるエクソソームの大きさが DNA Tripod の内角に依存するという仮説を裏付ける結果が示された。一方で本 DNA Tripod-100°には粒子径 20~50nm 程度の比較的小粒子径の複数のエクソソームが一つの DNA Tripod に結合している様子も観察されている。この際エクソソームは DNA Tripod の一辺だけで結合している様子も観察され、検討に使用した抗 CD-9 抗体一つでもエクソソームを DNA Tripod に結合するだけのアフィニティをもっていることが示唆された。

観察された TEM 像から DNA Tripod-100°/抗 CD-9 抗体複合体で捕捉されたエクソソームサンプルの粒子径分布の算出を行った。DNA Tripod-100°/抗 CD-9 抗体複合体で捕捉されたエクソソーム 50 個の粒子径を測定しヒストグラムにまとめた(Fig 4-2-8-(5))。60°の DNA Tripod / 抗 CD-9 抗体複合体を使用したときに捕捉されたエクソソームの粒子径に比べその分布は広くなり、10~20nm 程度の比較的小さいサイズのエクソソームも捕捉されている。このことは DNA Tripod の角度が 100°の広角となることにより小さいサイズのエクソソームもより抗 CD-9 抗体とアクセスしやすくなったものと推察される。

現在の系では DNA Tripod に形成された角度から期待されるよりも小さいエクソソームを捕捉してしまっている。DNA Tripod の角度に依存した粒子径のエクソソームのみを捕捉するには各辺に導入した抗体が 1 点だけではエクソソームを捕捉できず 3 点で接合してエクソソームと接合したとき初めて捕捉できるように抗体のアフィニティをコントロールする必要があると考えられる。このような抗体アフィニティを実現させるためには抗体製造の仮定で意図的に CD-9 抗原とのアフィニティが弱い抗体を選び出すことや、反応系における塩濃度や使用する buffer の pH を変更することも一つの手法として検討する手法が考えられる。またエクソソーム表面抗原を認識するような DNA アプタマーを抗体の代替に用いることもできると考えられる。他の方法としては抗体 1 点のみで結合しているエクソソームを DNA Tripod から物理的に洗い流すことを目的として DNA Tripod でエクソソームを捕捉した後で洗浄工程を加えるということも考えられる。本システムでは洗浄工程を組み込んだ設計にはなっていないが実用的には DNA Tripod を磁性粒子などに結合させ洗浄が可能なシステムとする必要がある(考察 6-2 章)。

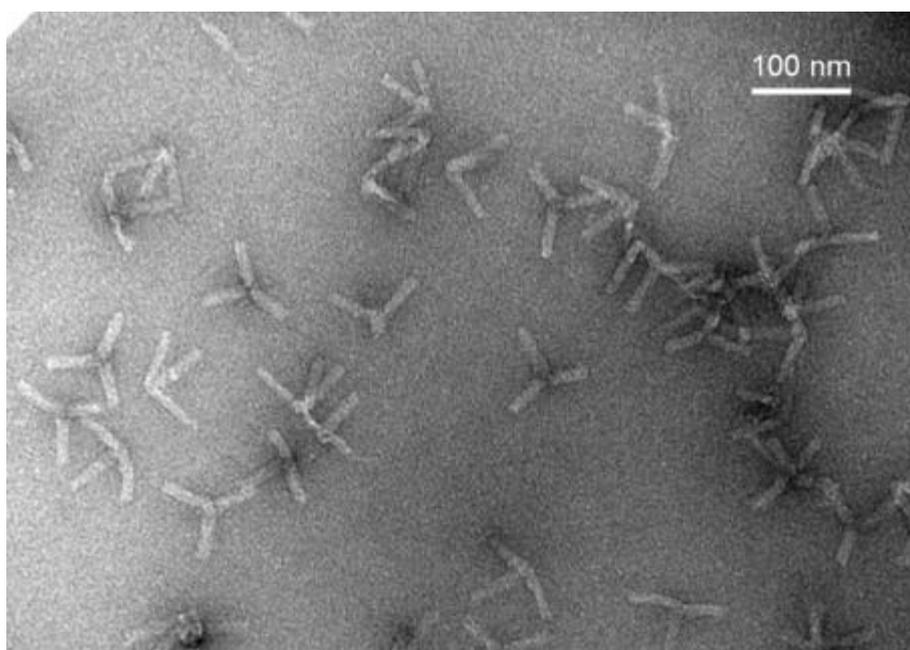


Figure 4-2-8-(1). DNA Tripod (100°)の TEM 観察結果 (倍率 150K)

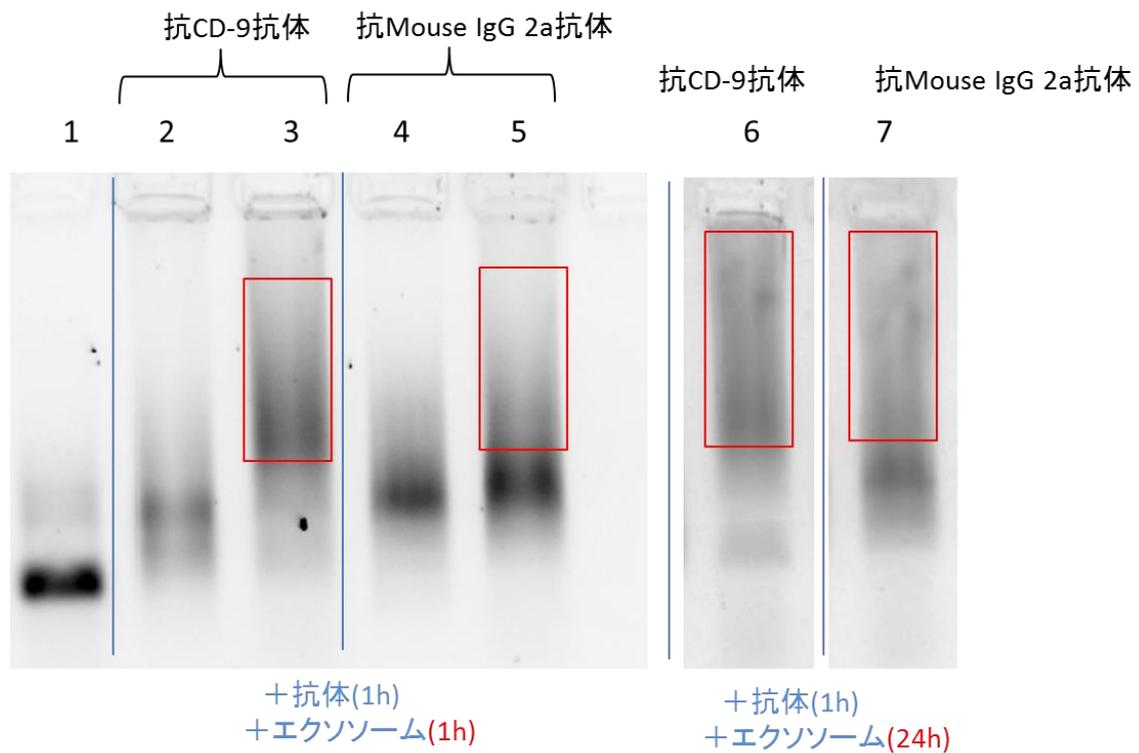


Figure 4-2-8-(2). DNA Tripod (100°)/Streptavidin/抗 CD-9 抗体によるエクソソームの捕捉挙動、アガロースゲル電気泳動解析。

1 レーンは DNA Tripod-100° /Streptavidin

2 レーンは DNA Tripod-100° /Streptavidin に抗 CD-9 抗体を加え 1 時間インキュベーションした条件

3 レーンは DNA Tripod-100° /Streptavidin /抗 CD-9 抗体にエクソソームサンプルを添加し 1 時間インキュベーションした条件

4 レーンは DNA Tripod-100° /Streptavidin に抗 Mouse IgG2a 抗体を加え 1時間インキュベーションをした条件

5 レーンは DNA Tripod-100° /Streptavidin /抗 Mouse IgG2a 抗体にエクソソームサンプルを添加し 1 時間インキュベーションした条件

6 レーンは DNA Tripod-100° /Streptavidin /抗 CD-9 抗体にエクソソームサンプルを添加し 24 時間インキュベーションした条件

7 レーンは DNA Tripod-100° /Streptavidin /抗 CD-9 抗体にエクソソームサンプルを添加し 24 時間インキュベーションした条件

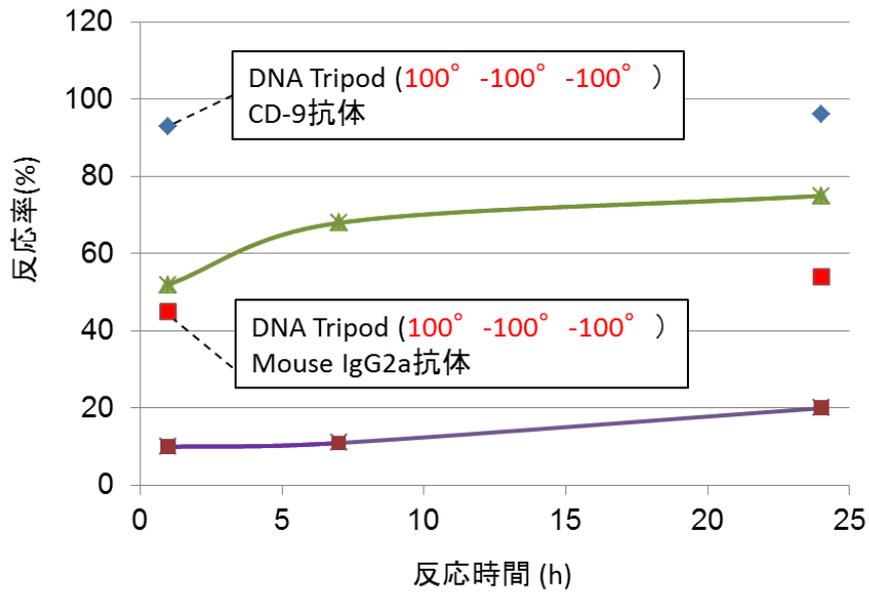


Fig 4-2-8-(3)

DNA Tripod (100° -100° -100°) / 抗 CD-9 抗体と DNA Tripod (100° -100° -100°)

/ 抗 Mouse IgG2a 抗体の両系におけるエクソソームサンプルとの反応曲線

緑色の曲線は DNA Tripod (60° -60° -60°) / 抗 CD-9 抗体複合体とエクソソームの反応曲線を、紫色の曲線は DNA Tripod (60° -60° -60°) / 抗 Mouse IgG 2a 抗体複合体とエクソソームの反応曲線を表す。

青点は DNA Tripod (100° -100° -100°) / 抗 CD-9 抗体複合体とエクソソームの反応曲線

赤点は DNA Tripod (100° -100° -100°) / 抗 Mouse IgG 2a 抗体複合体とエクソソームの反応曲線を表す。

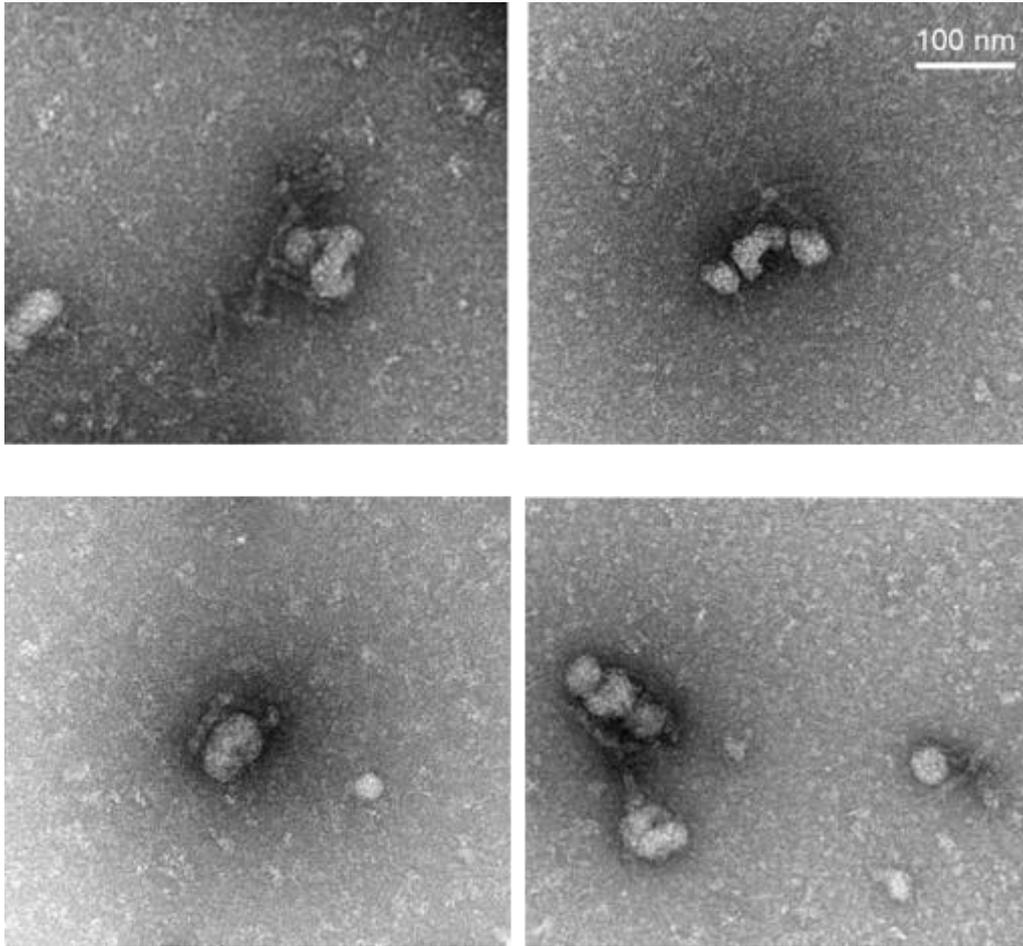


Figure 4-2-8-(4). DNA Tripod (100° -100° -100°) / 抗 CD-9 抗体複合体で捕捉されたエクソソーム複合体の TEM 画像 (倍率: 200K)

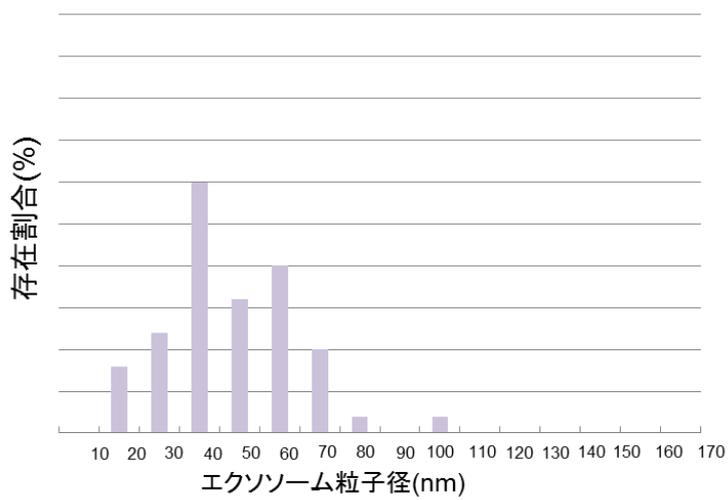


Figure 4-2-8-(5) DNA Tripod-100° / 抗 CD-9 抗体で捕捉したエクソソームの粒子径分布

4-2-9. エクソソーム捕捉挙動に影響を与えるファクターとその制御

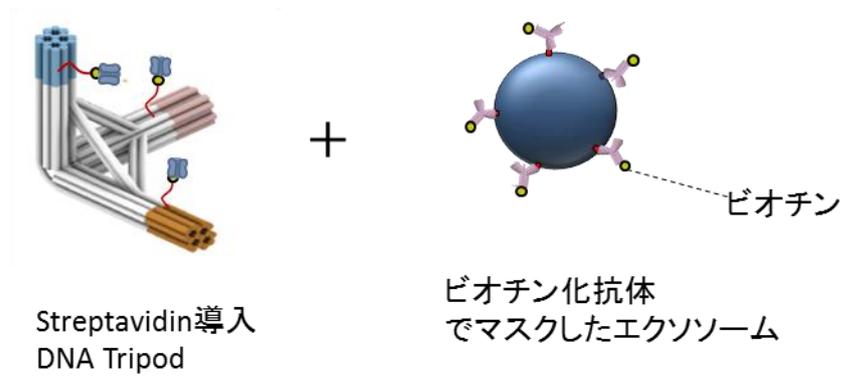
本 DNA Tripod によるエクソソームの捕捉システムにはおいてはエクソソームの捕捉挙動に影響を及ぼすと考えられる種々のファクターが存在する。例えばエクソソームと DNA Tripod 上に導入した抗体の結合性の強さや、エクソソーム捕捉時における立体障害などが挙げられる。

DNA Tripod とエクソソームの結合性の強さを変更する一つの手段としては、4-2-8 章で述べたように抗体と抗原のアフィニティの調節を意図して buffer の塩濃度や pH の変更、さらには抗体の替りにアプタマーを用いる手法などが考えられる。また、抗原によっては、立体障害の影響で結合しにくい可能性があるが、その場合は、あらかじめエクソソーム表面の抗原にビオチン標識した抗体を先に結合させ、その後に DNA Tripod と結合させるという手法も考えられる。この場合 DNA Tripod に関しては Streptavidin までの導入に止めておき、この二つを混合することにより DNA Tripod/Streptavidin 複合体によるエクソソーム/抗体の捕捉システムが成立することになる(Fig 4-2-9 A)。その他、エクソソームもしくは DNA Tripod の濃度を上げる、もしくはマイクロ流路を用いて実効濃度をあげる事で、Tripod とエクソソームの衝突頻度を上げることによってもエクソソームの捕捉挙動が変化すると推察される。

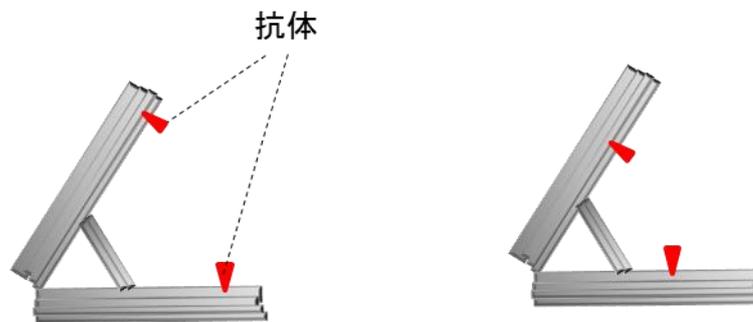
また、エクソソーム捕捉時の立体障害の形成と制御には、DNA Tripod 上における抗体位置のシフト、もしくは DNA Origami による障害物の形成が考えられる。前者は DNA Tripod の一辺に導入している現在の導入位置よりもさらに奥の位置に抗体を導入することで、エクソソームが抗体にアクセスする際の立体障害性は上がると考えられる。後者は抗体が導入される位置の周辺に DNA Origami により直接壁などを構築する、もしくは抗体が導入される位置をくぼみ形状に設計することでも抗体に対する立体障害性が上がると推察される(Fig 4-2-9 B, C)。

また 4-2-8 章においては 100°の DNA Tripod を使用したため、エクソソームのアクセス性が極端に上がり意図するように、DNA Tripod の角度変化に依存する捕捉エクソソームの粒子径分布変化は見られなかった。ここでは角度の微調整、つまり 60° - 60° - 60°の DNA Tripod の角度を 75°-75°-75°もしくは 30°-30° - 30°のように変化させた時のエクソソーム捕捉挙動も検討の余地が残る。今後の検討においては以上に挙げたファクターとエクソソーム捕捉挙動の関係を明らかにすることで、エクソソームの捕捉効率向上や非特異吸着の抑制などが実現するかの検討を進め、より実用的なシステムの開発につなげていくことが肝要である。

A



B



C

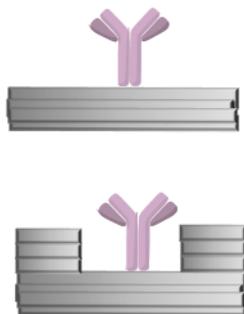


Figure 4-2-9. エクソソーム捕捉挙動に関係すると考えられるファクターのコントロール

A. ビオチン化抗体でマスクしたエクソソームと DNA Tripod / Streptavidin の反応系

B. DNA Tripod への抗体導入位置を変更した系

C. DNA Origami 上への抗体導入. (上) 現在のシステムにおける模式図 (下) DNA Origami による立体障害の導入

4-2-10. 磁性ビーズ法により捕捉されたエクソソームの粒子径分布

抗体認識によるエクソソームの分離手法としては磁性粒子法が一般的に知られている。市販されている磁性粒子により捕捉される粒子径分布がいかなる挙動を示すかは本研究の位置づけを明確にする上でも重要である。そこで実際に市販されている磁性粒子エクソソーム捕捉キットを用い、今回の一連の検討で使用しているフィルター法により調製したエクソソームサンプルでさらに捕捉しその粒子径分布測定を行った。市販製品としては JSR ライフサイエンス株式会社の ExoCap™ CD9 Kit for Serum Plasma を用いた。本キットにおいては磁性粒子上に抗 CD-9 抗体が導入されており、規定のプロトコルに従いエクソソームを本粒子で捕捉後は付属のエクソソーム elution buffer により捕捉したエクソソームを粒子から分離、回収することが可能となっている。本キットを用いてエクソソームの捕捉を行う際は ALP 標識の抗 CD81 抗体を用いて ELISA を実施し、時間ごとのエクソソーム捕捉量を確認した。4-2-1 章で述べたように、抗 CD-9 抗体結合の ExoCap™ 粒子とエクソソームとの反応において、3 時間ほどで捕捉率は飽和する(Fig 4-2-1 A)。この時点で磁性粒子からのエクソソーム分離、回収を行い TEM による観察を行った(Fig 4-2-10 A)。

TEM 画像の結果からは磁性粒子に捕捉、分離されたエクソソームはその粒子径、形状ともに捕捉前のエクソソームサンプルと顕著な違いは見出すことができない。本手法ではエクソソームサンプルの元の粒子径分布が概ね維持されることが判明した。また磁性粒子法により得られたエクソソームでは TEM による観察においてバックグラウンドが低く観察しやすいがこれは、磁性ビーズ法ではエクソソームを捕捉後、磁性粒子を集磁後洗浄することで系中の余分なたんぱく質などを減らすことができるためと考えられる。磁性粒子により得られたエクソソームの粒子径分布は約 20nm~120nm と最大粒子径は捕捉前のエクソソームサンプルに比較し小さくなっているものの、20~80nm の主要な集団における分布は最初のエクソソームサンプルと比較して大きな変化はなく、幅広い粒子径が観察される(Fig 4-2-10 B)。このように現在一般に採用されているフィルター法と磁性ビーズ法の両方の手法を適用しても得られるエクソソームのサイズ分布は以上に示した範囲が限界である事がわかる。一方で、DNA Tripod(60°-60°-60°)/抗 CD-9 抗体複合体によるエクソソーム捕捉システムでは、50nm を中心とした狭い粒径分布でエクソソームが捕捉されている(Figure 4-2-5 (B))。このことから今回考案した DNA Tripod システムにより、抗体によるアフィニティを利用したによる一般的なエクソソーム捕捉システムにはないエクソソームの粒子径選択能を実現できることが明らかになった。

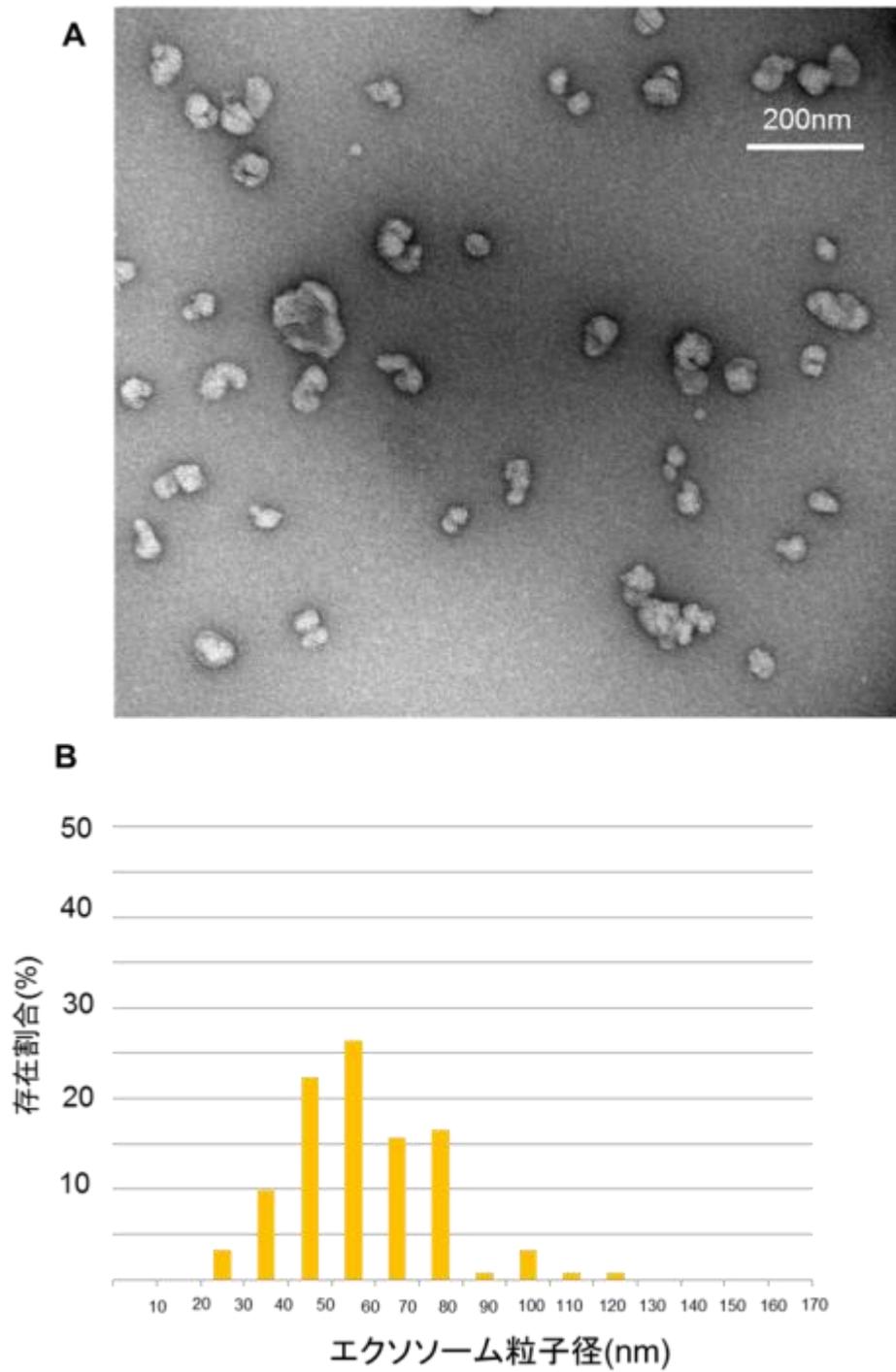


Figure 4-2-10. 磁性粒子により捕捉されたエクソソームの粒子径
 (A) 磁性粒子により捕捉したエクソソームサンプル(フィルター法)の TEM 画像、
 (B) (B)TEM 画像から測定した粒子径分布。

5. DNA Tripod 同士の自己組織化による Polyhedra 構造構築

5-1. DNA Origami 構造体のサイズスケールアップ

本研究においては DNA Tripod の構築と続いての抗体導入により、サイズ選択的なエクソソームの捕捉が可能なが示された。本システムに関しては実用的な観点からさらに最適化の検討が必要であるが一方で、本技術はエクソソームの捕捉に限定されず他の物質の捕捉、例えば細胞表面の特殊なドメインや細胞内小器官などの捕捉にも展開できる可能性がある。例えば細胞内小器官のミトコンドリアは直径が 500nm でありエクソソームよりもはるかに大きいサイズを持つ。その他の例としては近年その詳細な構造が明らかになった核酸蛋白複合体のボルトなども挙げられる(田中ら、生化学 第 83 巻, 第 5 号 2011 年)。ボルト自身の大きさは縦 40nm, 横 27nm の流線型のシェル構造をとっている。いずれの場合においても、今回開発した DNA Tripod による捕捉システムではこれらの大きさや特殊構造を持つ物質を選択的に捕捉することは困難と考えられる。理想的にはさらに大きな DNA Origami 構造体を構築し、ターゲットとなる物質の大きさや形状に確実に合致させ、捕捉選択性を発現させることが好ましい。

この時にボトルネックとなるのが対象物を捕捉する際に使用する DNA Origami の大きさである。DNA Origami は先に述べたように使用する鋳型 DNA によってその大きさが規定されてしまう。より大きな DNA Origami 構造体を構築するためには、現在使用している大腸菌由来のファージではなくさらに大きい鋳型 DNA を使用する、もしくは DNA Origami 同士をさらに結合させ目的の構造体を構築するという手法が考えられる。前者の方法に関しては PCR で人工的に合成した DNA scaffold を用いる方法も提案されているが DNA scaffold の大きさに比例して使用する Staple strands の数も増え大きなコスト増につながることで、folding における効率も落ちることが予想され実用的な観点からは課題が多く残る。一方で 1 種類の DNA Origami motif を組み合わせることで目的の構造体を構築できるのであればコスト、簡便性の観点からは望ましい。この場合、DNA Origami 同士を結合させる際の収率が課題になると考えられるがこれまで DNA Origami 同士をより高収率で接合させる手法についての報告はほとんどされていない。そこでより大きな DNA Origami 構造体を構築するための手法に着目して検討を行った。以下にその詳細について述べたい。

5-2. DNA Tripod の Polyhedra への自己組織化デザイン

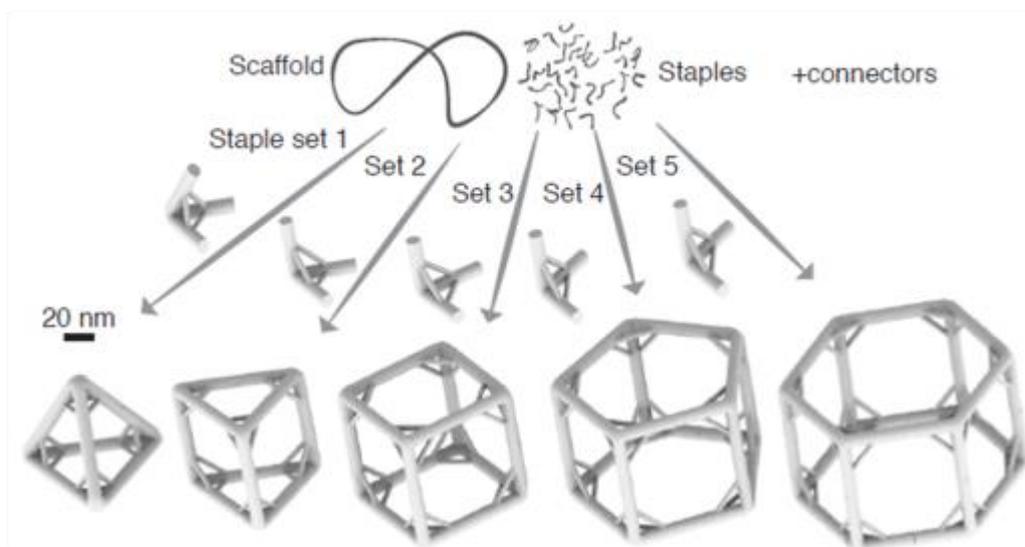
DNA Origami Tripod から構築する構造体については種々の Polyhedra 構造をターゲットに定めた。Polyhedra 構造は自然界においてはウィルスキャプシドにも見られる構造であり、ナノ反応場や DDS などの観点から興味深い。過去に DNA Nanotechnology により種々の Polyhedra 構造が作製されている。例えば Tuberfield のグループは 4 本の DNA 鎖を自己組織化させることで一辺が 5nm 程度の Tetrahedron 構造を作製した (Goodman et al., 2005)。また William Shih は 1,699 塩基の長鎖 DNA を folding することで 15nm ほどの Octahedron 構造を作製した (Shih et al, 2004)。また Douglas はそれぞれシーケンスが異なる 3 種の DNA Origami 分岐構造を作製し、さらに各 Origami を接合させるコネクターストランドを加えることで Icosahedron を作製した (Douglas et al., 2009)。しかしながらこのどの方法も Polyhedra 構造を作製する際の収率の低さ、煩雑性、サイズの制限などの観点から一般性には乏しい方法であった。一方で Mao のグループにより報告された Tetrahedron, Dodecahedron, Buckyball 構造の作製手法はより一般性の高い Polyhedra 構造を作製する上での指針を示したと言える (He et al., 2008)。ここでは 3 種類の DNA strands を自己組織させることで Three-arm junction を生成し、さらにはこの Three-arm junction がお互いに各辺の末端で接合し Polyhedra 構造へと one pot 反応で組み上げられる。Three-arm junction の系中濃度に依存して最終的な構造体の種類が決定され低濃度では Tetrahedron, 高濃度では Bucky ball が生成する。

そこでこの方法にヒントを得て DNA Tripod 構造を一つのモチーフとして組み上げ種々の Polyhedra を構築する検討を行った。ここで目的とする Polyhedra 構造を作製するためのファクターとしては DNA Tripod の角度に着目した。つまり Fig 5-2-(1) A に示すように DNA Tripod がお互いに各辺の末端で接合する場合、DNA Tripod の角度に誘導される形で最終的な Polyhedra 構造が決定されると考えた。つまり $60^\circ-60^\circ-60^\circ$ の角度を持つ DNA Tripod からは Tetrahedron が生成し、 $90^\circ-90^\circ-90^\circ$ の DNA Tripod からは Cube が $120^\circ-90^\circ-90^\circ$ の DNA Tripod からは Pentagonal Prism が生成する設計になる (Fig 5-2-(1) A)。

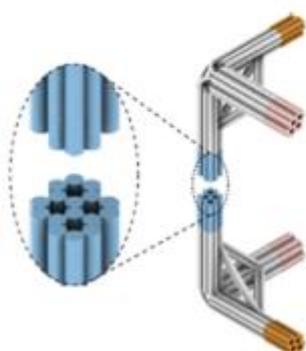
DNA Tripod の各辺はそれぞれ異なるシーケンスを保持しており、加えるコネクターストランドのシーケンスによりどの末端同士も接合させることが可能である。ここで DNA Tripod の各辺末端を X(青色)、Y(オレンジ)、Z(ピンク)で表した場合 Tetrahedron とそれ以外の Polyhedra 構造とでは接合パターンが異なる。Tetrahedron は DNA Tripod を X-X, Y-Y, Z-Z のパターンで接合させることで (Fig 5-2-(1) D) 理論上組み立てられるがそれ以外の構造は X-X, Y-Z の接合パターンが必要になる (Fig 5-2-(1) C)。また DNA Tripod の各辺の末端は 16 本の DNA 二重鎖が凹凸をなしている (Fig 5-2-(2) A)。Fig 5-2-(2) C 図におけるピンク色の DNA 二重鎖の末端を基準面として緑色は奥に引っ込み、青色は手間に突出する立体構造をとる。この凹凸構造は DNA Tripod 同士が Polyhedra を形成するように向かいあった

時に、お互いの凹凸がかみ合う立体構造となっている(Fig5-2-(2) B)。

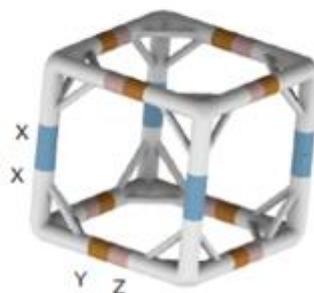
A



B



C



D

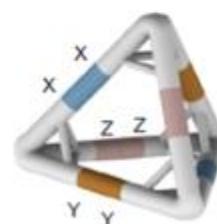


Figure 5-2-(1). DNA Tripod からの Polyhedra 構造の構築

- A. DNA Tripod からの各種 Polyhedra 構造構築におけるスキーム
- B. 各辺における接合模式図
- C. Cube 構築のための各辺接合パターン
- D. Tetrahedron 構築のための各辺接合パターン

5-3. 実験手法

各種 Tetrahedron 構造体の作製

試薬

- ・ DNA Tripod 用 Staple Strands : Cadnano ソフトウェアにより DNA Origami Tripod を設計し得られる各 Staple Strands シークエンスは IDT 社より直接購入した。25nmole スケールでの合成、精製は脱塩のみとし、納入時には V ボトムプレート(450uL)の各 well に 100uM の濃度で配置されるように手配した。
- ・ それ以外の DNA Origami の folding、構造解析に必要な各種材料、装置は全て 2-3 章に記載のものを使用した。

方法

100uM / well に調製した Staple strands をそれぞれ 5uL ずつピペットし混合する。この液と P8,064 scaffold、10x DNA Tripod folding 用 buffer、MilliQ water を混合し PCR チューブ 1 本あたり 100uL の混合液を加えた。この際の最終組成は P8,064 scaffold の濃度が 10nM、Staple strands は P8,064 scaffold に対して 10 倍当量、コネクターストランドは 5 倍当量、MgCl₂ の濃度は 12 mM MgCl₂ となるように混合した。その後、サーマルサイクラーにより 48 時間タイムコースでのアニーリングにより各種 Tetrahedron の folding を実施した。アニーリングサイクルは 80°C→65°Cまでは-1°C / 5 分間、65°C→20°Cまで-1°C / 1 時間でのサイクルとした。

各種 Tetrahedron 構造体の TEM 観察

得られた Tetrahedron, Triangular Prism, Cube に相当するアガロースゲル上のバンドは切り出しマッシャーによりつぶした後専用のフィルターに入れ 4,000g で 3 分間遠心させることで構造体の精製を行い、透過型電子顕微鏡での観察を実施した。Pentagonal Prism, Hexagonal Prism に関してはアニーリング後の反応液をそのまま電子顕微鏡観察に用いた。

各種 Polyhedra の Strand ダイアグラム

Tetrahedron 構造、Triangular Prism 構造、Cube 構造 (Short connector デザイン)、Pentagonal Prism 構造、Hexagonal Prism 構造の Strand Diagram、シークエンス情報は 6 章に記載する。

5-4. 結果と考察

5-4-1. Polyhedra 構築における DNA Tripod のコネクタに関する検討

DNA Tripod 同士の接合に使用するコネクタデザインは Dietz らの過去報告(Dietz et al., 2009)を参考にした。Dietz らの構造は 18 本の DNA 二重鎖をスクエア配置に(3×6)で束ねた DNA Origami ロッド構造である。ロッド方末端において 18 本の内 9 本の DNA 二重鎖末端にコネクタ-strands を配置し、残りの 9 本については対となる DNA Tripod ロッドからのコネクタがハイブリダイゼーションできるように Scaffold(P8,064)の配列のまま(空の軌道とする)として残している。コネクタの構造体末端からはみ出し(Sticky ends)には 2 塩基分が充てられおり、この 2 塩基分の Sticky ends で空の軌道にハイブリダイゼーションする (Fig 5-4-1-(1) A)。

本 DNA Tripod 構造においてコネクタは Dietz らの論文を参考にして DNA Tripod の末端部分に 28 塩基程度でハイブリダイゼーションさせ、2 塩基分が Sticky ends として末端から突出しているデザインとした(Fig 5-4-1-(1) B, C)。最初に DNA Tripod 辺末端への最大導入数である 8 本のコネクタ-Strands を使用して DNA Tripod 同士の接合による Tetrahedron の構築を試みた。

コネクタ-Strands の存在下 $60^\circ - 60^\circ - 60^\circ$ DNA Tripod を 12 mM $MgCl_2$ 存在下で 24 時間アニーリングプロセスにより folding した。その後、反応混合物をアガロースゲル電気泳動で分析したところ電気泳動の well からほとんど泳動しない凝集体の他に、DNA Tripod 単独のバンドよりも遅い泳動位置に一本のバンドが観察された(結果は示していない)。本バンドをゲルから切り出し TEM による観察を行ったところ明確な Tetrahedron 構造が確認された。これは DNA Tripod 同士の結合により生成する Polyhedra 構造は DNA Tripod の角度により決定されるという仮説を支持する結果の一つと言える。一方で今回目的に定めた構造体の中で X-X, Y-Y, Z-Z の接合パターンを持つものは Tetrahedron のみであり、DNA Tripod の設定角度において $60^\circ - 60^\circ - 60^\circ$ から多少のずれが生じても必然的に Tetrahedron が生成すると考えられる。本仮説を裏付けるためには Tripod の角度だけを変更した場合に、全て同じ接合パターンを持つ Triangular Prism, Cube, Pentagonal Prism, Hexagonal Prism が作り分けられることを確認する必要がある。

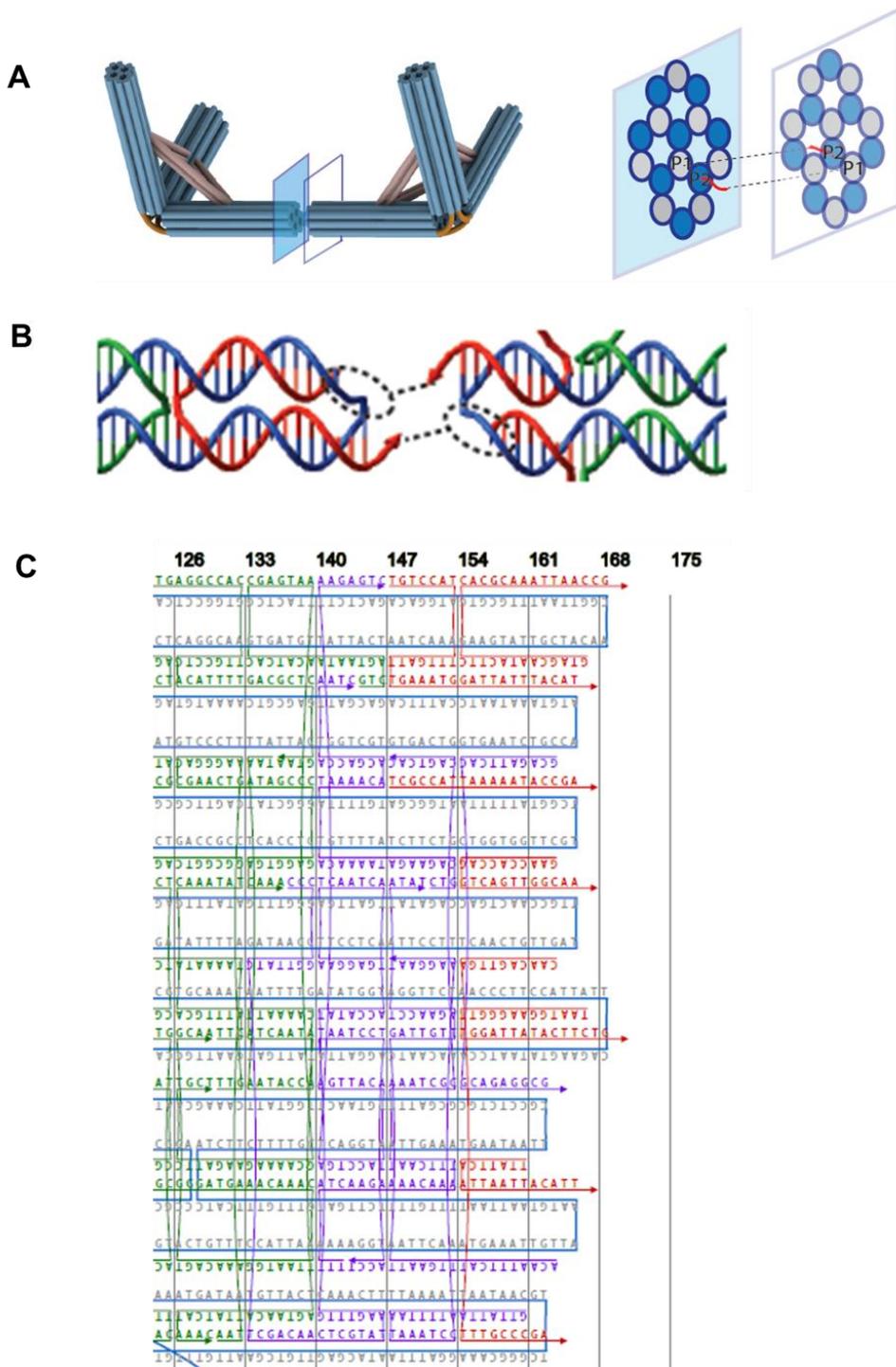


Figure 5-4-1-(1). DNA Tripod 同士のコネクタによる接合

- A. DNA Tripod の界面におけるコネクタ接続における模式図。右図グレーの円が Connector strand からの Sticky ends 突出部分。青円が Sticky ends がハイブリダイゼーションする空の軌道を表す。
- B. コネクタStrands デザインの詳細
- C. コネクタ配置における各辺末端の展開図

上記検討した DNA Tripod 同士の接合により Tetrahedron 構造体は作製できたものの、その収率は低い(～20%程度)。そのため DNA Tripod 同士の接合において生じる不具合に関する考察を行うため Folding により主生成物として出現する Well 付近のバンドについても同様に TEM 観察を行った。得られた TEM 像からは DNA Tripod 同士の結合体が観察されたがこの場合 DNA Tripod 同士は Polyhedra 構造を作ることはなく鎖状に連なっているように観察された(Figure 5-4-1-(2))。

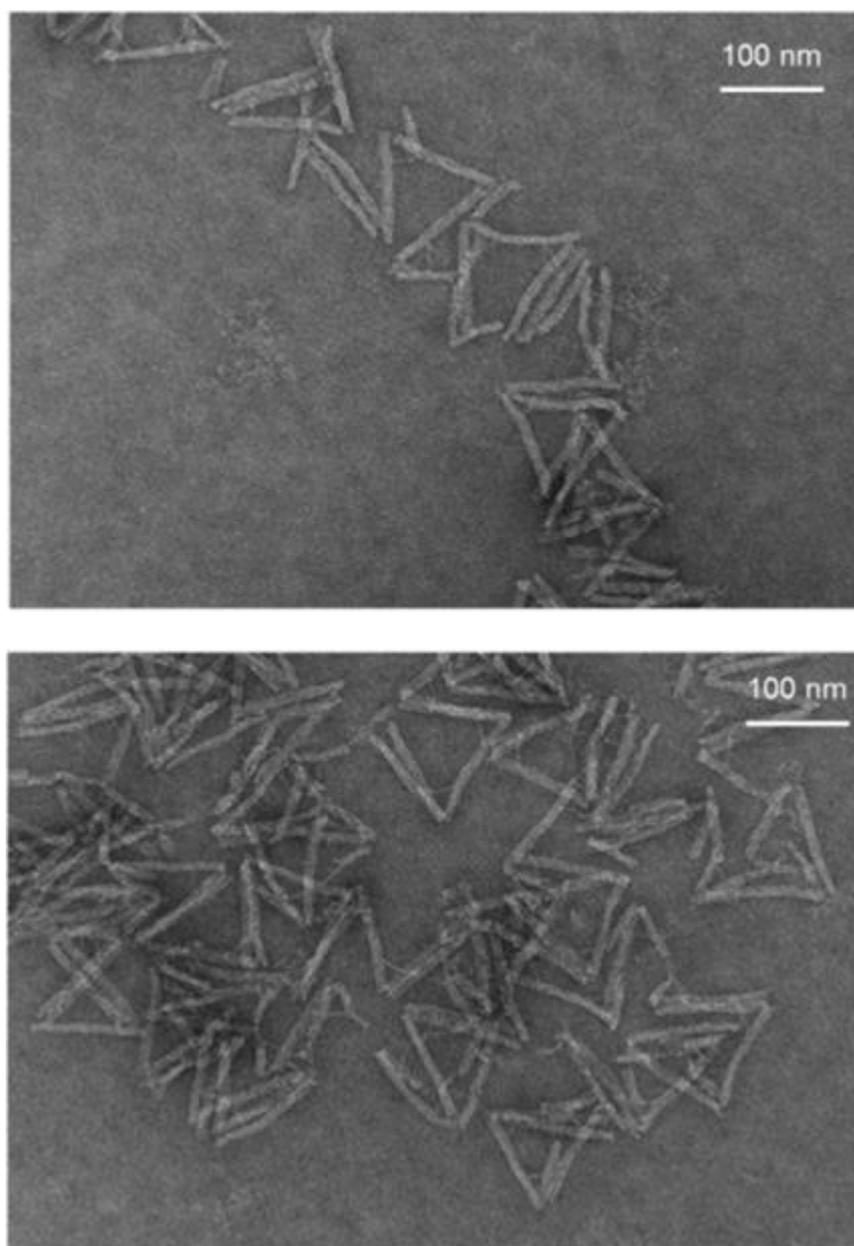


Figure 5-4-1-(2). Tetrahedron 作製において生じる凝集体 TEM 画像

この詳細を観察してみると DNA Tripod の互いの接合面は設計された通りに正しく向き合った状態ではなくお互いによじれ、間違った接合向きで連結している様に見られる。このようなことが生じる理由を考えると、本系においてはアニーリングプロセスにおいて DNA Tripod が形成される途中で、まだ各辺末端に十分剛直な立体構造が出来上がる前に DNA Tripod 同士が接着してしまっていると推察することができる。このようなエラー構造は DNA Tripod の各辺末端の接着力が強すぎるために生じるはずであり、反対に DNA Tripod 同士の接着力を弱めればエラー構造の抑制につながると考えられる。つまり DNA Tripod が一辺同士で接したとしても DNA Tripod が連結し安定化するほどの自由エネルギーの減少は生じないが、3 辺で連結した場合に初めて安定化するような結合力を導入すれば鎖状の誤接合構造が抑制され、DNA tripod が設計された通り、3 辺で接合した polyhedra 構造が選択的に生成すると期待される。

以上のような仮説の基、コネクタ末端の接着力強さが polyhedra 構造生成の収率に及ぼす影響について検討を実施した。作製する Polyhedra としてはより難易度が高く、これまでに報告例がほとんどない Cube 構造の構築を目指した。

DNA Tripod 各辺に弱い接着力を導入するためには各辺末端におけるコネクタの本数を減らすか、Sticky ends の数を減らせば良い。ここでは実験の進めやすさの観点からコネクタ本数を減らしての検討を行った。DNA Tripod 片辺末端に導入できる最大数である 8 本(DNA Tripod の各辺の接合面におけるコネクタ数は 16 本)のコネクタ存在下から 1 本ずつその数を減らし 7~1 本のコネクタ存在下で 90°-90°-90°の DNA Tripod の folding を実施した。

各本数のコネクタ存在下で folding を行った DNA Tripod(90°)反応液のアガロースゲル電気泳動を実施した(Figure 5-4-1-(3) A)。8 本、7 本のコネクタの存在下で folding した場合ゲル上に明確なバンドは観察されず well 付近の凝集体のみが観察された。コネクタの本数を 6 本、5 本としたときにはわずかにバンドが観察されるようになり、さらにコネクタ数を 4 本、3 本、2 本としたときにより明確なバンドが観察された。ここで出現したバンドを切り出し TEM による解析を行ったところ Cube 構造が確認された(Figure 5-4-1-(3) B)。コネクタ数を 1 本にまで減らした場合は Cube 構造由来のバンドは出現せず DNA Tripod のバンドのみが観察された。このことから DNA Tripod 同士を組み合わせ Polyhedra 構造の安定化をさせるためには DNA Tripod の一辺あたり最低でも 2 本のコネクタが必要であることが分かった。この場合辺接合の界面には 4 本のコネクタが存在し、各コネクタ-Sticky ends の塩基数が 2 であることから、DNA Tripod の接合面に関して 8 塩基分のハイブリダイゼーションによる自由化エネルギーの減少が Cube 構造の安定化には必要であると推察される。一般に DNA 二重鎖を安定化させる上では 8 塩基分のハイブリダイゼーションでは十分な安定化効果が得られないが、今回のように一界面あたり 8 塩基分のみという少ない塩基数での構造の安定化につながった理由としては 3 辺間の多点により接合により、より大きな安定化効果が得られたものによると思われる。

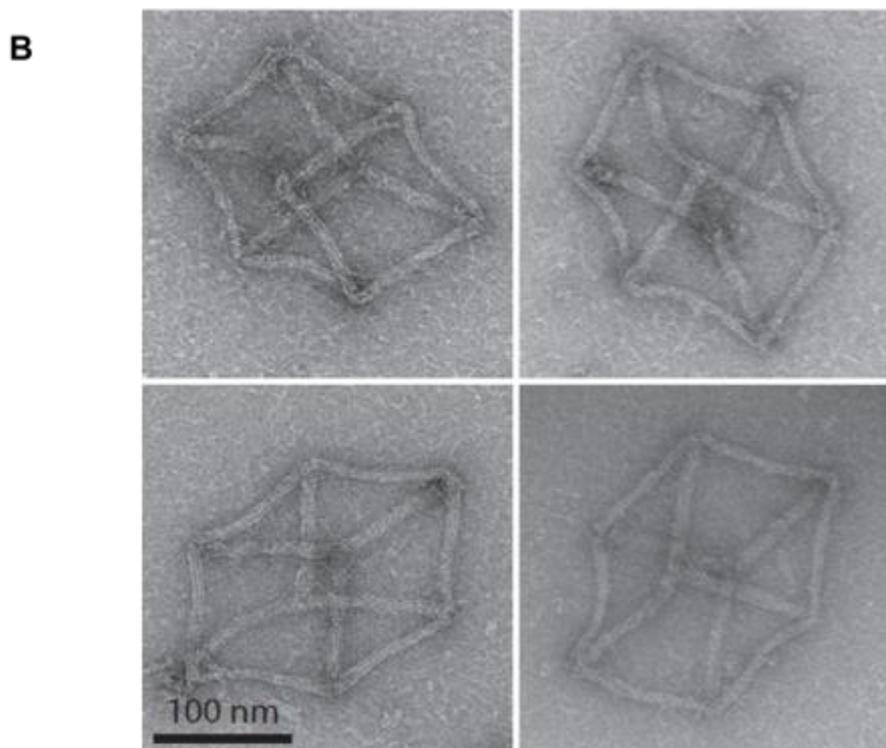
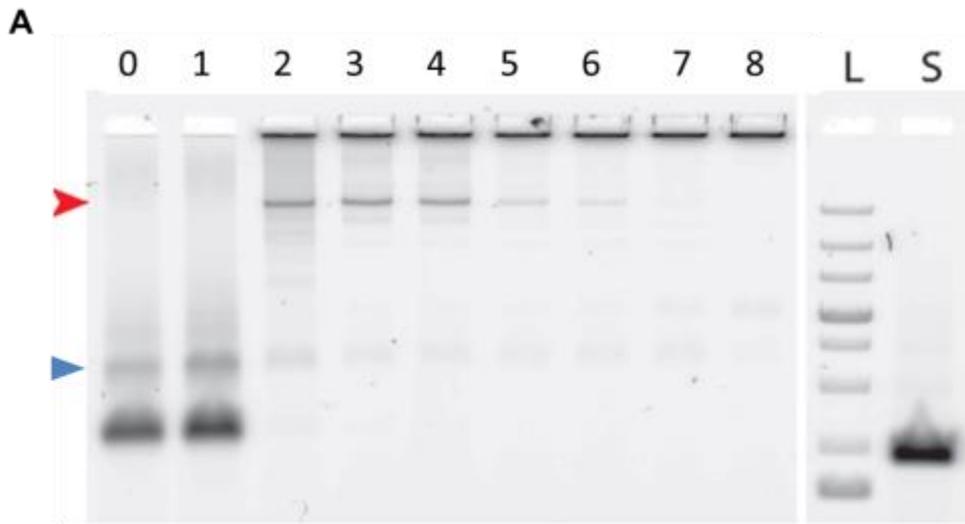


Figure 5-4-1-(3). 通常のコネクターデザインを使用した Cube 構造の構築
 A. 各コネクター本数を用いた Cube 構築におけるアガロースゲル電気泳動結果
 赤矢印が Cube 構造のバンドを示す。青矢印は DNA Tripod のダイマー
 B. 単離された Cube 構造の TEM 観察結果

次に Cube 構造のさらなる生成収率の向上を検討した。DNA Tripod の各辺に弱い結合力を導入しても一定の割合で誤接合、誤構造は生じるはずと考えられる。このような誤構造は DNA Tripod 同士が間違っただけで接合しても自由エネルギーの減少が生じ、準安定的な状態に陥るいわゆる Kinetic trap によるものと推定される。そこで Cube 生成収率を向上させるにはこの Kinetic trap の状態にある誤接合を再度 DNA Tripod へと解離させるような仕組みを作れば良いと考えることができる。このような考えのもと新たなコネクタージェザインを検討した。

ここで新たに用いるコネクターは従前のコネクター同様に sticky ends の数として 2 塩基分を充て、DNA Tripod の末端部分へのハイブリダイゼーションとしては Dietz らの報告 (Dietz et al, 2009) で使用している 28 程度の塩基数よりも小さい 9 塩基分とした (Figure 5-4-1-(4) A, B)。DNA のハイブリダイゼーションは可逆的であり DNA 二重鎖の状態、つまり binding 状態での時間を τ_b とし、お互いの DNA がかい離している状態を τ_d とすると平衡状態においては結合定数 K_{on} と K_{off} はそれぞれ以下の式で表すことができる。

$$\cdot 1/\tau_d = K_{on} \times c \quad (c \text{ は溶液中における DNA 鎖の濃度を表す})$$

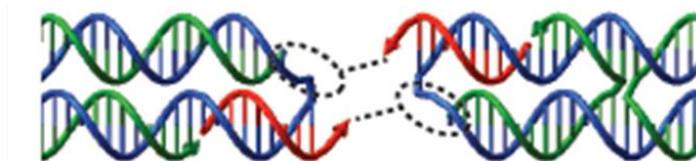
$$\cdot K_{off} = 1/\tau_b$$

これは結合定数が DNA 鎖の溶液濃度に依存しており、解離定数は溶液濃度とは独立していることを表している。一方で解離定数はハイブリダイゼーションする DNA 鎖の長さに依存し例えば塩基数=9 の時、 $K_{off} = 1.6 \text{ s}^{-1}$ 、塩基数=10 の時には $K_{off} = 0.2 \text{ s}^{-1}$ となり塩基数の増加に伴い指数関数的に K_{off} は減少していくことが知られている (Jungmann et al., 2010)。このことから 9 塩基分で Tripod 末端にハイブリダイゼーションするコネクターは非常に動的でありコンスタントにハイブリダイゼーションと解離を繰り返す状態を示すはずである。そのため誤接合した場合は本コネクタージェザインでは十分に構造は安定化されず再度 DNA Tripod 同士が解離し、結果的に正しい位置での接合へと導かれていくものと予想される。

実際にこのコンセプトに基づきコネクターをデザインし、実験を行った。先の検討同様 DNA Tripod 辺末端への導入数を最大の 8 本から 1 本までコネクター導入数を変え、得られる Cube 構造の生成収率に対する影響を確かめた。結果として辺末端へのコネクター数が 8~2 本に渡る幅広い範囲で Cube 構造由来のバンドが確認され (Figure 5-4-1-(5))、その中でもコネクター本数が 6 本、7 本の場合は得られる Cube 由来のバンドの強度も高く、他の副生成物によるバンドも観察されない結果となっている。一方で先に述べたコネクタージェザインにおいては今回検討した新規コネクターによるシステムでは最も Cube 由来のバンドが強い条件であるコネクター数 2 本、3 本、4 本においてはダイマーと思われるバンドも生成してしまっている。このことより今回新たに検討したコネクタージェザイン (ハイブリダイゼーション=9 塩基) の方が最終的な目的構造体を得ることに関しては従来のコネクタージェザイン (ハイブリダイゼーション=28 塩基) よりも収率の高いシステムを与える傾向にあることがわかった。実際にコントロールとして泳動させる P8,064 (Fig 5-4-1-(5) レーン s) のゲル投入量を基準として各バンドの強度比較から得られる Cube の収率を両コネクター

デザインで比較した。この結果、今回の新たなデザインのコネクタ使用時においてはどのコネクタの本数使用においても一様に従来コネクタデザインよりも高い収率を示すことが分かった(Figure 5-4-1(6))。

A



B

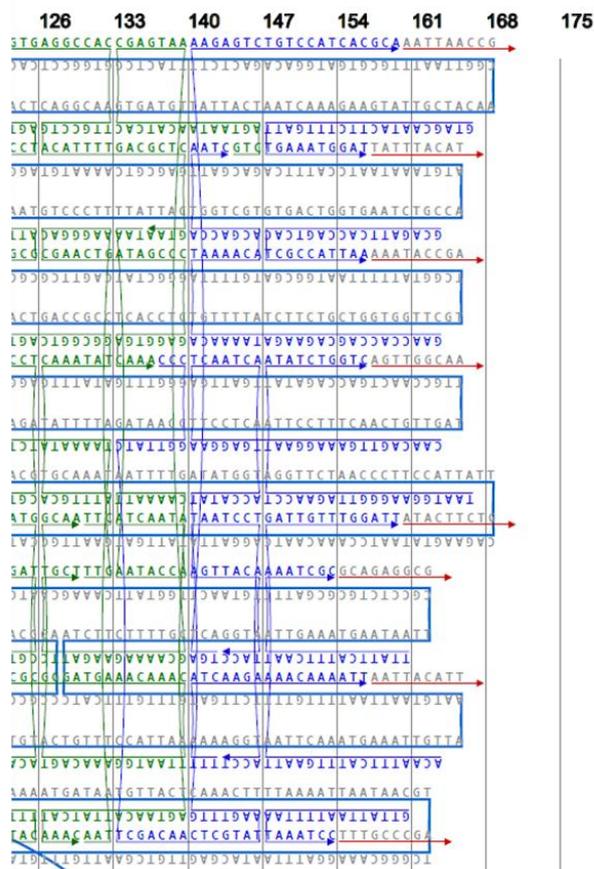


Figure 5-4-1(4). 新規コネクタデザイン

A. コネクタデザインの詳細

B. 新規コネクタデザインを用いた各辺末端の展開図

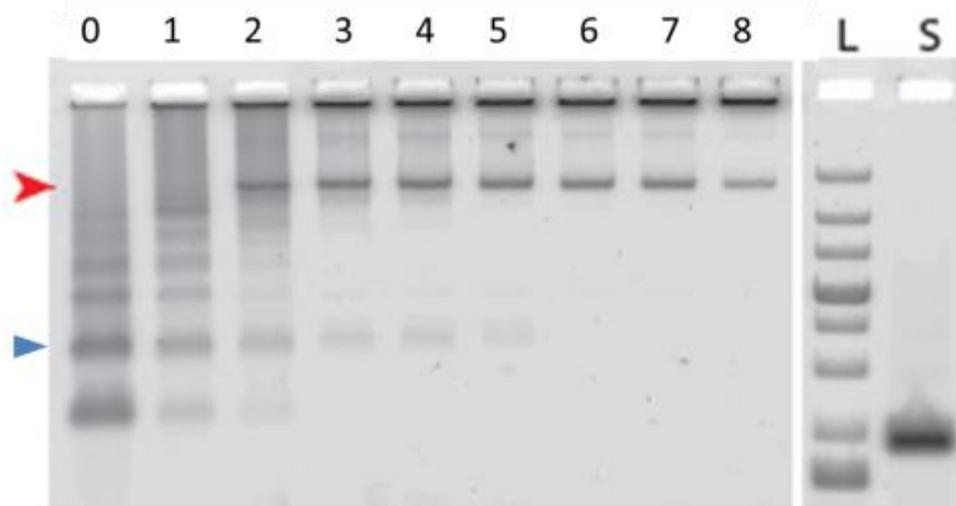


Figure 5-4-1-(5).新規デザインコネクタによる Cube 構築におけるアガロースゲル電気泳動結果.

赤矢印が Cube 構造のバンドを表す

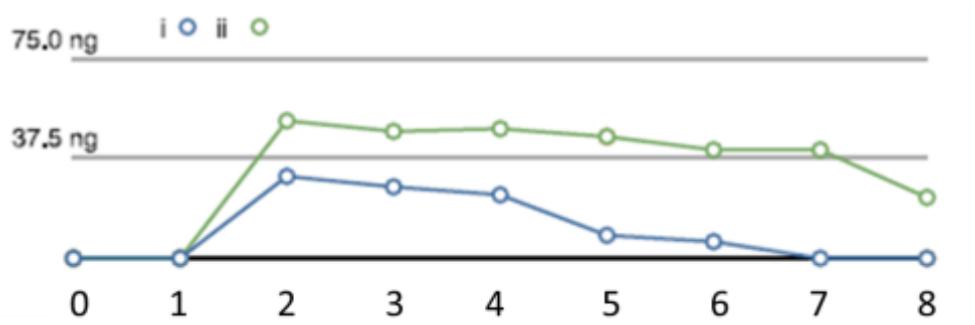


Figure 5-4-1-(6). 通常コネクタと新規コネクタにおける使用本数と Cube 生成収率の分析結果

i が通常コネクタ、ii が新規コネクタにおける結果を表す。横軸の数字は 1 辺におけるコネクタの本数を表す

5-4-2. Polyhedra 構築における DNA Tripod Vertex 部分の検討

Cube の構築においてはより DNA Tripod に形成される角度の精度を高めるために DNA Tripod の各辺を開く力を与える仕組みについて検討を行った。DNA Tripod 間の角度は二本の DNA 二重鎖 Strut により形成されるが、DNA 二重鎖の熱力学的なたわみ、変形も多少は生じているはずで形成される角度を時間平均でとらえた場合は設計されるよりも小さい値を示している可能性が高い。そこで設計された通りの角度形成により近づけるために Vertex 部分を二重鎖 DNA で結んだ(Fig 5-4-2-(1) オレンジ色、青色、以降 Vertex bundle と表す)。この際導入する DNA 二重鎖の長さとしては二点導入点間の距離よりも短く設定する。このことにより導入点間には張力が働き、さらにこの張力によって DNA Tripod の辺同士を開く力が働くと考えた。例えば Fig 5-4-2-(1), DNA Tripod(90°-90°-90°)における Vertex 部分の DNA 鎖末端の 1 番と 2 番間の距離は約 6~7 nm 程度と計算されるが、ここに 15 bp ≒ 5.1 nm の二重鎖 DNA を導入している。Cube 構築においては Fig 5-4-2-(2)に示す設計での 2 層に渡る Vertex bundle を導入した。

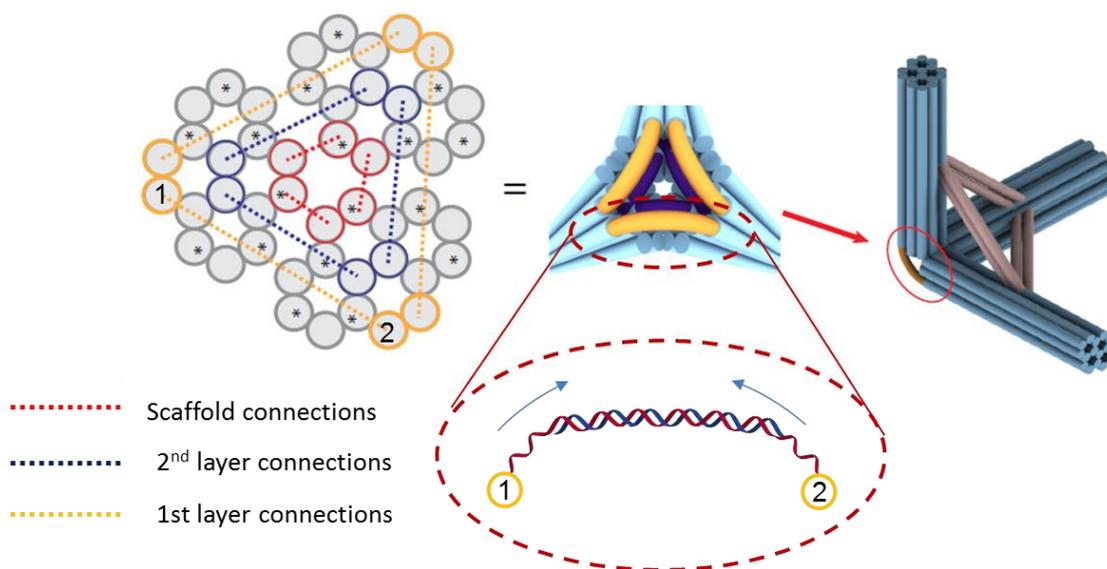


Figure 5-4-2-(1). DNA Tripod Vertex bundle のデザイン

図中のオレンジ色、青色の点線が Vertex bundle によるつなぎ合わせを表す。赤色は Scaffold Strand によるつなぎ合わせをあらわす。

	1 st layer	Vertex bundle DNA 二重鎖長さ	2 nd layer	Vertex bundle DNA 二重鎖長さ
Tetrahedron	0	n/a	0	n/a
Triangular Prism	3	15bp, 15bp, 18bp	0	n/a
Cube	3	15bp, 15bp, 15bp	3	15bp, 15bp, 15bp
Pentagonal Prism	3	15bp, 15bp, 12bp	0	n/a
Hexagonal Prism	3	24bp, 24bp, 12bp	3	19bp, 19bp, 19bp

Figure 5-4-2-(2). 各 Polyhedra 構造における Vertex bundle の長さ

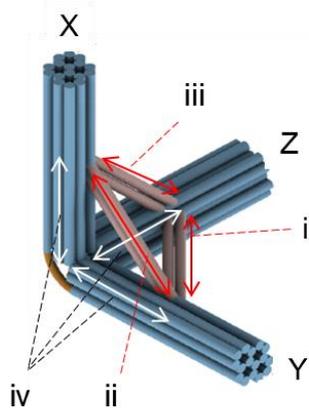
以上記述したコネクタデザイン(DNA Tripod 末端でのハイブリダーゼーション9塩基、Sticky ends 2塩基)、Vertex bundle の導入により Cube 以外に Triangular prism, Pentagonal Prism, Hexagonal Prism を生成させるための DNA Tripod のデザインを行った(各 Polyhedra における Vertex bundle: Figure 5-4-2-(2)、Strut の長さ: Figure 5-4-2-(3))。各種 DNA Tripod に関してコネクタ存在下で実際に Folding を行い反応生成物のアガロースゲル解析を実施した(Fig 5-4-2-(4))。ゲル解析においては Tetrahedron、Triangular Prism, Cube それぞれの反応物にかけて徐々に遅くなる泳動位置に明確なバンドが観察された。これらのバンドを切り出し TEM による観察を実施したところそれぞれにおいて期待される通りの目的構造体が観察された。

また Vertex bundle を導入せずに Cube の作製を検討したところ Triangular Prism が形成することが TEM から観察された。これはアガロースゲル電気泳動においては Fig 5-4-2-(4) レーン 7 に当たる。この結果は DNA Tripod の角度が溶液中においては 90°よりも小さくなっていることを示唆しており、2-4-1 章の DNA Tripod 角度の TEM による分析結果にも一致する。本システムで検討した、DNA Tripod における精度角度形成と続いての目的構造体形成においては DNA 二重鎖の Strut の形成に加えてこのような辺を開くための補助的な力を加えることの重要性が明らかとなった。以後検討する Tetrahedron 以外の Polyhedra 構造構築においても同様のコンセプトで Vertex bundle を導入している(Figure 5-4-2-(2))。

Pentagonal Prism, Hexagonal Prism は理論上(108°-90°-90°)と (120°-90° - 90°)の DNA Tripod から形成される。最初の検討で Hexagonal Prism を形成させるために DNA Tripod(120° - 90° - 90°)をデザインし、既述の新規コネクタデザイン、Vertex bundle と共に folding を実施した。得られた反応性生成物をアガロースゲルにて分析したところ Cube の位置よりも遅い泳動位置に明確なバンドが観察されるものの切り出して単離するほどの収量ではなかったため反応混合物をそのまま TEM にて観察した。この結果観察された構造

体は Hexagonal Prism ではなく Pentagonal Prism であった。Hexagonal Prism において 108°の角度形成するために導入した Strut の長さは 37nm と 60°の角度形成に用いた 28nm の Strut と比べ長く熱力学的な屈曲がより顕著に表れた可能性がある。そこで DNA Tripod における角度を理論上 120°から 140°の角度が形成されるように Strut をデザインして同様にコネクター、Vertex bundle の存在下で folding を行った(Fig 5-4-2-(3))。本系におけるアガロースゲル分析においては Pentagonal Prism よりもさらに遅い位置にバンドが形成されたため、同様に反応混合物を TEM にて分析を行ったところ Hexagonal Prism が観察された。

以上の検討により Tetrahedron から Hexagonal Prism に至る一連の Polyhedra の構築が達成された。アガロースゲル電気泳動におけるバンドの強度から収率は Tetrahedron, Triangular Prism, Cube, Pentagonal Prism, Hexagonal Prism の順に 40%、24%、20%、4.2、0.1%と算出された。Pentagonal Prism, Hexagonal Prism に関しては収率が非常に低くまだ本系でにおける DNA Tripod 同士の結合様式には改良の余地があり、より確実な角度形成やアニーリングプロトコルの改良などを実施することで収率の向上につながる可能性があると考えられる。



	i	ii	iii	iv
Tetrahedron	28	28	28	29
Triangular Prism	18	26	26	18
Cube	30	30	30	21
Pentagonal Prism	32	26	26	18
Hexagonal Prism	37	28	28	20

Figure 5-4-2-(3). 各 Polyhedra 構造を設計する上での DNA Tripod の Strut 長さ
Vertex からの Strut 導入部分までの長さ
i)は Y-Z 間の Strut 、ii)は X-Y 間の Strut 長さ、iii)は X-Z 間の Strut 長さ
iv)は Vertex から各 Strut 導入部分までの長さを表す。単位は全て(nm)

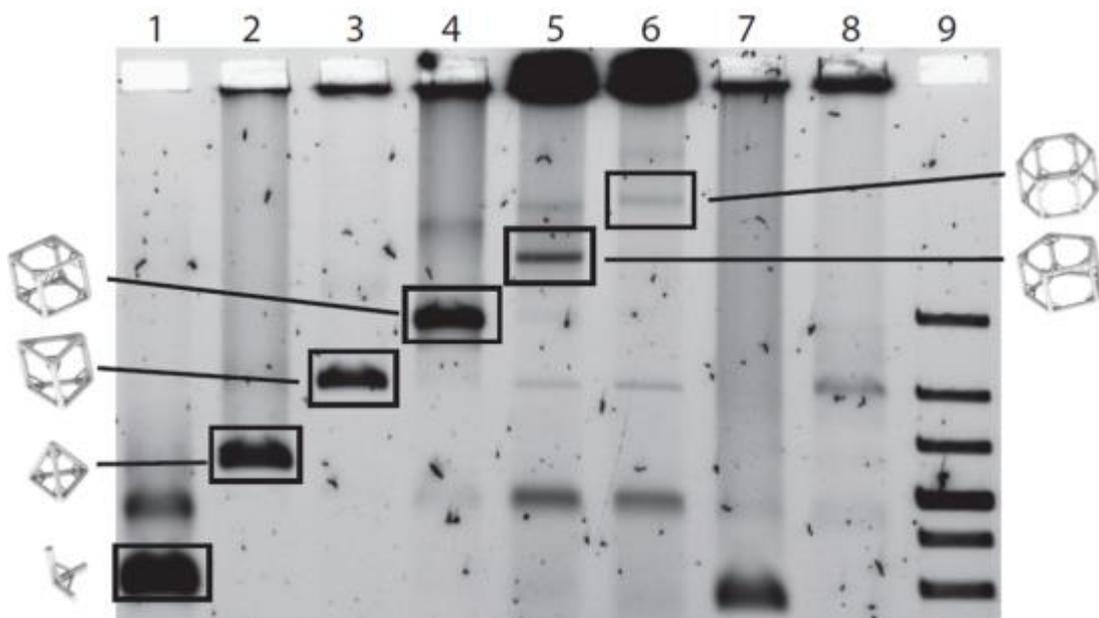


Figure 5-4-2-(4). 各 Polyhedra 構造のアガロースゲル電気泳動解析結果

レーン 1: DNA Tripod(90° -90° -90°), レーン 2:Tetrahedron, レーン 3: Triangular Prism、
 レーン 4: Cube、 レーン 5:Pentagonal Prism、 レーン 6:Hexagonal Prism
 レーン 7: Strut を形成しない DNA Tripod(90° -90° -90°)
 レーン 8:Vertex bundle を導入しない Cube

6. 考察

本研究では、DNA ナノ構造の精密分子配置技術を用いて、抗体の空間配置を制御し、エクソソームの精密な分画を試みた。その結果、1 辺が 50nm 程度の DNA tripod を用い、各辺を抗体で機能化することで、20-170nm なブロードに分布するエクソソームサンプルの中から、50nm 程度の大きさのエクソソームだけを識別することに成功した。すなわち、サイズと表面マーカー(タンパク質等)というエクソソーム分画の2つの重要パラメーターを1ステップで選り分けることができた。本章では、まず、DNA tripod を用いた本システムを、既存の方法(遠心、フィルター、アフィニティ)と比較することで、本システムの利点と欠点を議論する(6-1 節)。次に、本システムを実用化する上で、実現できていない2つの機能(洗浄とエクソソーム解離)について、考察する(6-2、6-3 節)。最後に、本システムの発展について述べる(6-4 節)。

6-1. DNA Tripod と既存の方法の比較

本システムの利点と欠点を既存の方法(遠心、フィルター、アフィニティ)と比較する。本システムの特徴は、抗体というエクソソーム表面マーカーを識別する機能分子を、nm 精度で空間配置することで、サイズとアフィニティの分画を1ステップに実現したところにある。また、サイズに関しても、市販の精製キットを用いた場合は、精製エクソソームが20-120nm に分布していたのに対して(Figure 4-2-10)、本システムでは、ほとんどの捕捉粒子が50nm を中心に ± 10 nm の範囲に収まっていた(Figure 4-3-5)。これらの性質は、エクソソームの精密分画に寄与すると考えられる。

従来の方法では、まず、サイズによる分画(遠心やフィルター)を行った後に、必要に応じて、分子マーカーによる分画(アフィニティ)を行っていた。サイズによる分画は、大量のサンプルを捌くのに適しているが、粒子径が小さいため、洗浄操作を組み込むことが難しく、タンパク質を初めとした、様々な物質のコンタミを防ぐことが難しかった。また、遠心やフィルターといった、閾値をデジタル的に設定することが難しい手法を用いるため、性質上、サイズ分布に広がりが生じてしまっていた。抗体を利用した、アフィニティ精製は、抗体を磁気ビーズやカラムに固定化することで、洗浄操作を組み込むことが可能であり、純度を上げることが可能であるが、サイズに関する分画能がないため、前処理で用いたサイズ分布をそのまま引き継ぐことが、今回実験で確かめられた。

一方で、DNA Tripod を用いた方法は、DNA Tripod の大きさと規定されるカットオフサイズがあり、理想的には、一定サイズ以下の粒子のみを捕捉できるはずである。実際、本研究において、辺間の角度が 60°と 100°の2種類の DNA Tripod を作製し(DNA Tripod-60°と-100°)、それぞれに関してエクソソームと混ぜた所一定サイズ以下の粒子のみが捕捉されていることが確認された。これらの結果は、DNA Tripod の硬い枠組みが粒径を

見分けるのに十分な硬さを持っていることを示唆するとともに、エクソソーム側もある程度の剛性があることを示唆する。

作製した2種類のDNA Tripodのうち、DNA Tripod-60は、非常にシャープな粒径分布となった一方、DNA Tripod-100は、期待したサイズ(80nm)の他に、50nm程度の小さい粒子も捕捉されていた。これは、1粒子に存在する分子マーカール量の影響かもしれない。球の表面積は、半径の2乗に比例するので、例えば、直径25nmの粒子では、直径50nmの粒子の1/4の分子マーカールしか1つの粒子に存在していない計算になる(分子マーカールの表面密度は変わらないと仮定)。そのため、抗体への結合速度定数(k_{on})と解離定数(k_{off})との兼ね合いで、小さな粒子(例えば、25nm)は、DNA Tripodに捕捉されない一方、ある一定サイズ以上の粒子では、分子マーカール量がみかけの K_d 値以上となっているため、捕捉されてしまうのかもしれない。より定量的に評価するためには、DNA Tripodに結合する抗体の数を現在の3個から、可変させて評価をする必要がある。

DNA Tripodは、一定サイズのエクソソームのみを捕捉できた一方で、捕捉速度は、現状では1時間程度と速くはない(捕捉率を1成分の指数関数で近似した場合)。捕捉速度は、分子マーカールの表面濃度、抗体と分子マーカールの結合速度定数や、DNA Tripodとエクソソームの衝突頻度などによると考えられる。何らかの手法によって溶液中に流れを作り出すことで、衝突頻度を向上させ、捕捉速度を向上させることは可能かもしれない。例えば、反応チューブの機械振動による衝突頻度の向上や、マイクロ流体デバイスにDNA Tripodを固定化し、狭い流路内エクソソーム溶液を高速で流すことで、衝突頻度を向上させるといった手法が考えられる。

本研究では、DNA Tripodの特定部位に抗体を結合させることで、特定サイズのエクソソームのみを捕捉することに成功した。今後、抗体の配置や数、抗体の種類、溶液条件を検討することで、より精密に目的のエクソソームのみを捕捉することが、可能になると期待される。

6-2. 洗浄ステップの導入とエクソソームのリリースについて

DNA Tripodによる本エクソソーム捕捉システムを実用化させる上ではDNA Tripodを固相に担持させる必要がある。このことによりDNA Tripodでエクソソームを捕捉した後の洗浄と非特異吸着によるエクソソーム捕捉の防止が可能となり、より正確な診断システムなどのアプリケーションにもつながると期待できる。ここではDNA Tripodを磁性粒子上に固定するのが最も実現性の高い手法と考えられる。

磁性粒子へのDNA Tripod導入においては過去にも報告がされており(Shaw et al., 2015)、これを参考にして考えると以下のようなシステムとなる。Streptavidin結合磁性粒子に末端がビオチン化したDNA鎖を結合させる。DNA TripodのVertex部分にはDNA鎖2を導入する。DNA鎖1とDNA鎖2をハイブリダイゼーションさせることで磁性粒子上にDNA Tripodを導入することが可能と考えられる(Fig 6-2(1))。

この際DNA鎖2の末端に塩基数5~7程度のToehold strandsを導入しておくことでDNA鎖1とDNA鎖2のリリースが可能になる。これはStrands Displacement technologyと呼ばれるYurkeらにより導入された技術(Yurke et al., 2000)である。ここではあらかじめハイブリダイゼーションしているDNA鎖の末端にToeholdsと呼ばれる5~7塩基程度の部位を導入しておくことによりDNA鎖3を系中に添加することでDNA鎖1をリリースできるシステムとなる。ここではDNA鎖3のToehold X*が最初にDNA鎖2のX部分にハイブリダイゼーションする。ここではDNA鎖2, DNA鎖3の長さ>DNA鎖1のため、その後DNA鎖2はよりエネルギー的な安定なDNA鎖3とのハイブリダイゼーションへと移行していく。結果DNA鎖1はDNA鎖2からリリースされることになる。

このようなDNA Tripodのリリースに関してはDNA Tripodの基本特性をさらに検討する上では有用なシステムと考えられる。現在の系においてはDNA TripodへのStreptavidin導入までのプロセスにおいてゲルろ過カラムでの精製を実施しているためDNA Tripodの収量が低く、抗体導入後はそれ以上の精製は実施できていない(3-3-1章 既述)。そのためフリーの抗体を系中から完全に取り除くことが出来ていない状況にある。DNA Tripod / Streptavidinへの抗体導入反応後、本システムを使用し洗浄工程を入れることで系中からフリーな抗体、さらには不純物などを除去することが可能となり、より正確なエクソソーム捕捉挙動を検証できると期待される。

診断システムなどの実用的な応用を考えた場合DNA Tripodからのエクソソームリリースについても具体策を考える必要がある。一つの手法としては上記の磁性ビーズ状に結合したDNA Tripod / 抗体複合体でエクソソームを捕捉した後、タンパク変性剤などを加えることで抗体と抗原の結合が切れエクソソームを回収できる可能性がある。またDNaseを加えることでDNA Origami自体を分解させエクソソームを回収することも考えられる(Fig 6-2(2) A)。しかしながらこれらの系ではエクソソーム表面のタンパク質の変性や系中への多量のDNAの混入が起こると考えられる。よりエクソソームをインタクトに回収する方法

としては光開裂性のビオチンリンカーなどを使うことも有用かもしれない。このような光開裂性のリンカーの一例として Hausch と Jaschke (Hausch and Jaschke, 2000) は DNA オリゴの末端に光開裂性のリンカーを介してビオチンを導入するシステムを開発している (Fig 6-2-(2) C)。本リンカーは 360 nm 付近の紫外線の照射を行うことで効率的に開裂することが知られている。例えば、本リンカーに片末端がチオール基の DNA Oligo を導入し、チオール基と抗体との更なる縮合反応により光開裂性ビオチンリンカーに目的の抗体を導入する事が可能と考えられる。このようなシステムを利用することで DNA Tripod で捕捉されたエクソソームをより効率的かつ intact な状態で回収される事が期待できる。

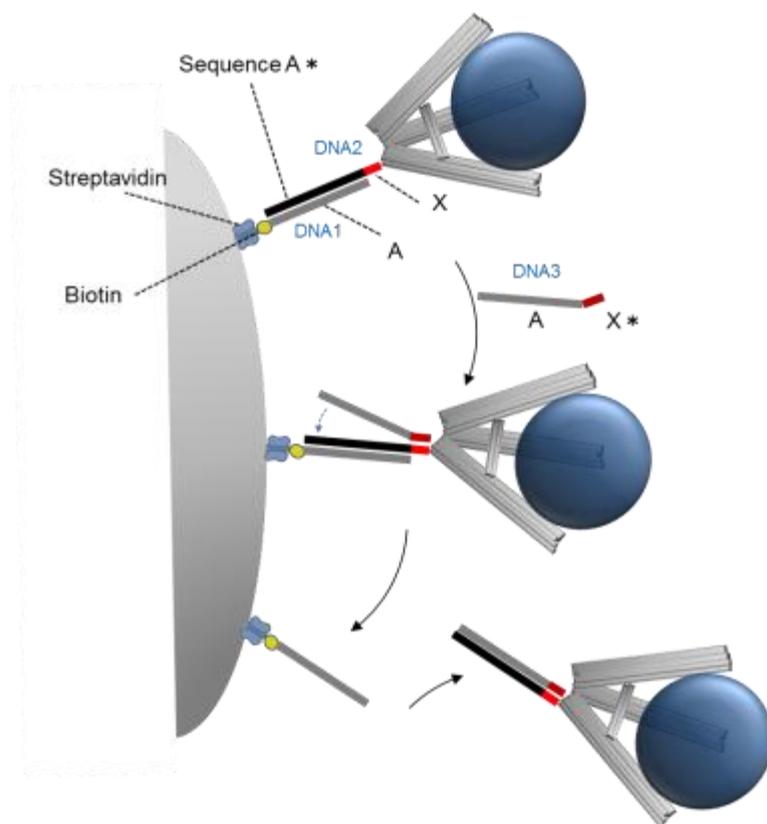


Figure 6-2-(1). 磁性粒子上への DNA Tripod 導入とそのリリースに関する模式図
X*が Toeholds を表す。

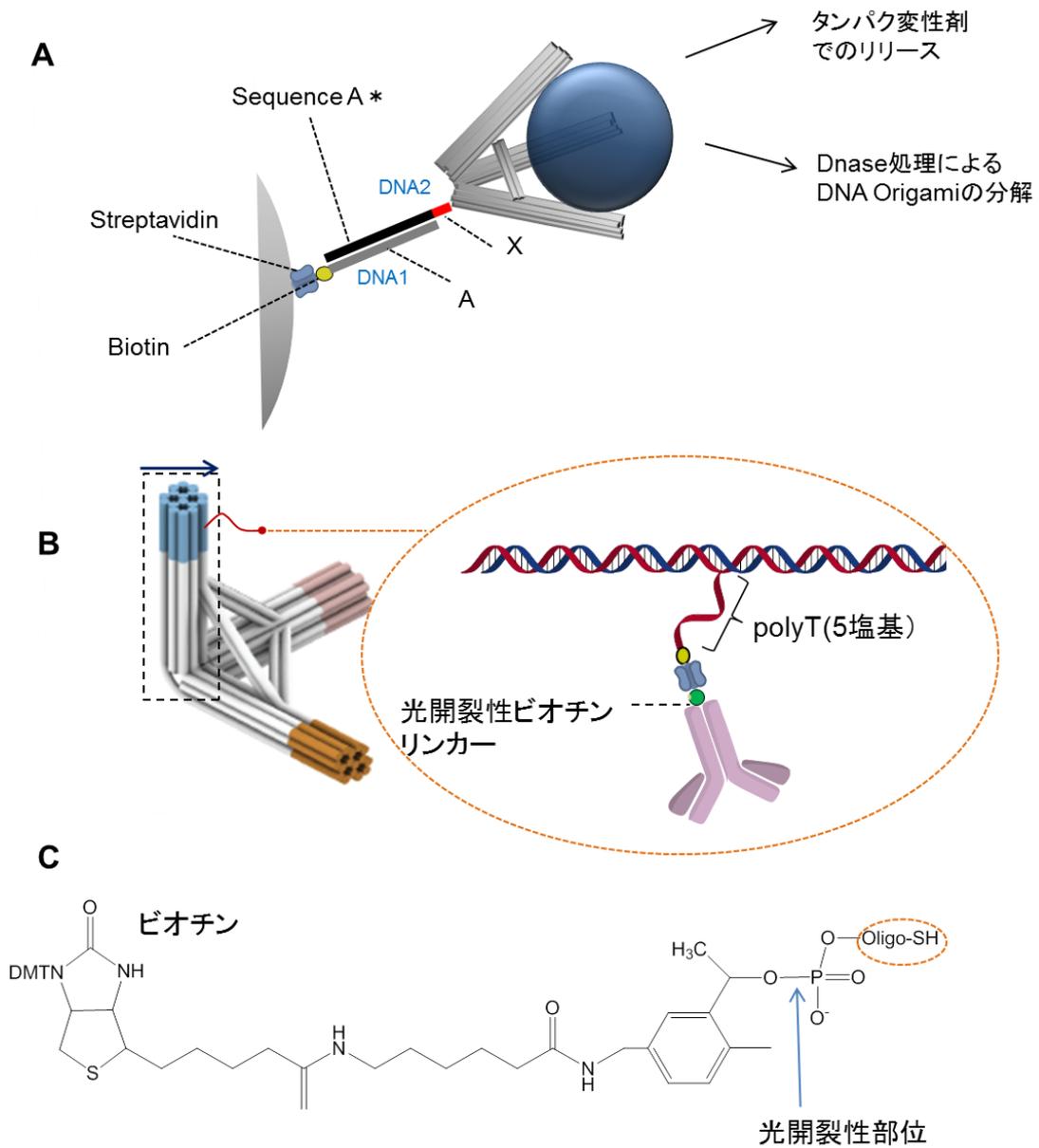


Figure 6-2-(2). DNA Tripod からのエクソソームリリースに関する戦略

A. ビーズ上に固定した DNA Tripod へのタンパク変性剤、DNase の添加

B. 抗体上に導入した光開裂性ビオチンリンカーの利用

C. 光開裂性リンカーの一例 (Nucleic Acids Research 28, e35 (2000)から抜粋、改編)

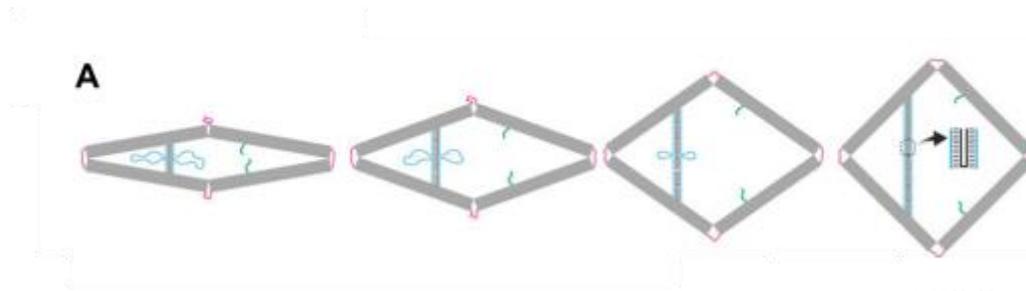
6-3. DNA Tripod の角度可変デザインとエクソソーム回収への応用

現在の検討においては角度が異なる各種 DNA Tripod を設計する上においてそれぞれの DNA Tripod に関してシーケンスを全て変えて設計を行っている。つまりこの場合目的の捕捉物質に合わせて DNA Tripod の角度を調整したい場合でも DNA Tripod を新たにデザインし直す必要がある。その結果新たなシーケンスを持った Staple strands を適用する必要があり実用化に向けては、コストの観点で課題が生じる。

理想的には一つの DNA Tripod の folding に使用される Staple strands の主要シーケンスは変更せずに Strut 部分に適用される Staple strands のシーケンスのみを変更し、DNA Tripod の角度を可変できることが望ましい。このようなシステムを実現させるためには 2016 年に Ke らが報告したシステム (Ke et al., 2016) が応用できると考えられる。

Ke らの論文では 10 本の DNA 二重鎖をハニカム配置したロッド構造から成るひし形構造が作られている。本ロッド構造はそれぞれ Scaffold strand で結ばれており、柔軟なヒンジとして働いている。このひし形構造の角度制御は本 DNA Tripod 構造と同じく 2 本の DNA 二重鎖を導入している (Fig 6-3 A)。ここでは 2 本のロッド間に形成される最大の角度を 90° としており、これよりも小さい角度を形成させる場合には Scaffold の一部を余らせループとすることで実現させている。理論上はループの長さを調節することで角度の精密可変が可能である。このようなシステムを導入することで目的構造体に合致した角度を保持した DNA Tripod を作製することができると期待できる。

本角度可変システムはエクソソームのリリースにも適用できる可能性がある。例えば最大で 90° の角度が形成できる Strut を保持した DNA Tripod で最初に 60° の角度を形成させ、エクソソームを捕捉する。この際 Strut 部分の余分な Scaffold 部分はループとして残す。エクソソーム捕捉後に Strut のループ部分にハイブリダイゼーションする Staple strands を加えることで 90° の角度をなすための Strut が形成される (Fig 6-3 B)。この時エクソソーム表面抗原と DNA Tripod 抗体の結合を引きはがすように力がかかるためエクソソームが DNA Tripod からリリースができる可能性があると考えている。



Y. Ke et al., Nature Commun 7, 10935 (2016) Figure 1より抜粋

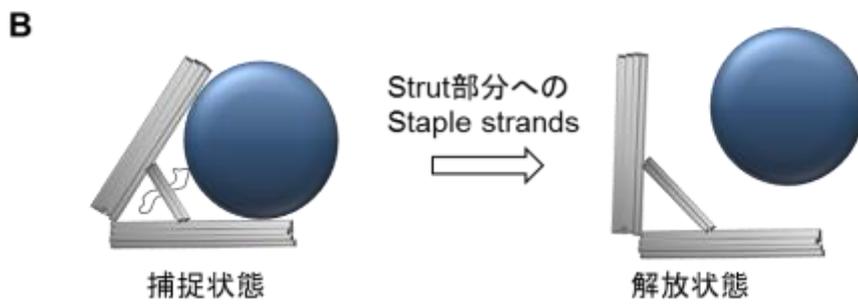


Figure 6-3. DNA Origami 構造における角度可変デザイン

A. Ke らの報告における DNA Origami アクチュエーターシステム

B. DNA Tripod への角度可変システムの導入とエクソソームのリリース

6-4. DNA タンパク質複合体システムの応用

本研究では、DNA ナノ構造に、特定の空間配置でタンパク質を固定化した、DNA タンパク質複合体デバイスを作製し、一定サイズのエクソソームのみを捕捉することに成功した。本システムの"空間配置を制御することで、特定の物質を捕捉する"というコンセプトは、工学だけでなく、理学的にも応用が可能であると考えられる。

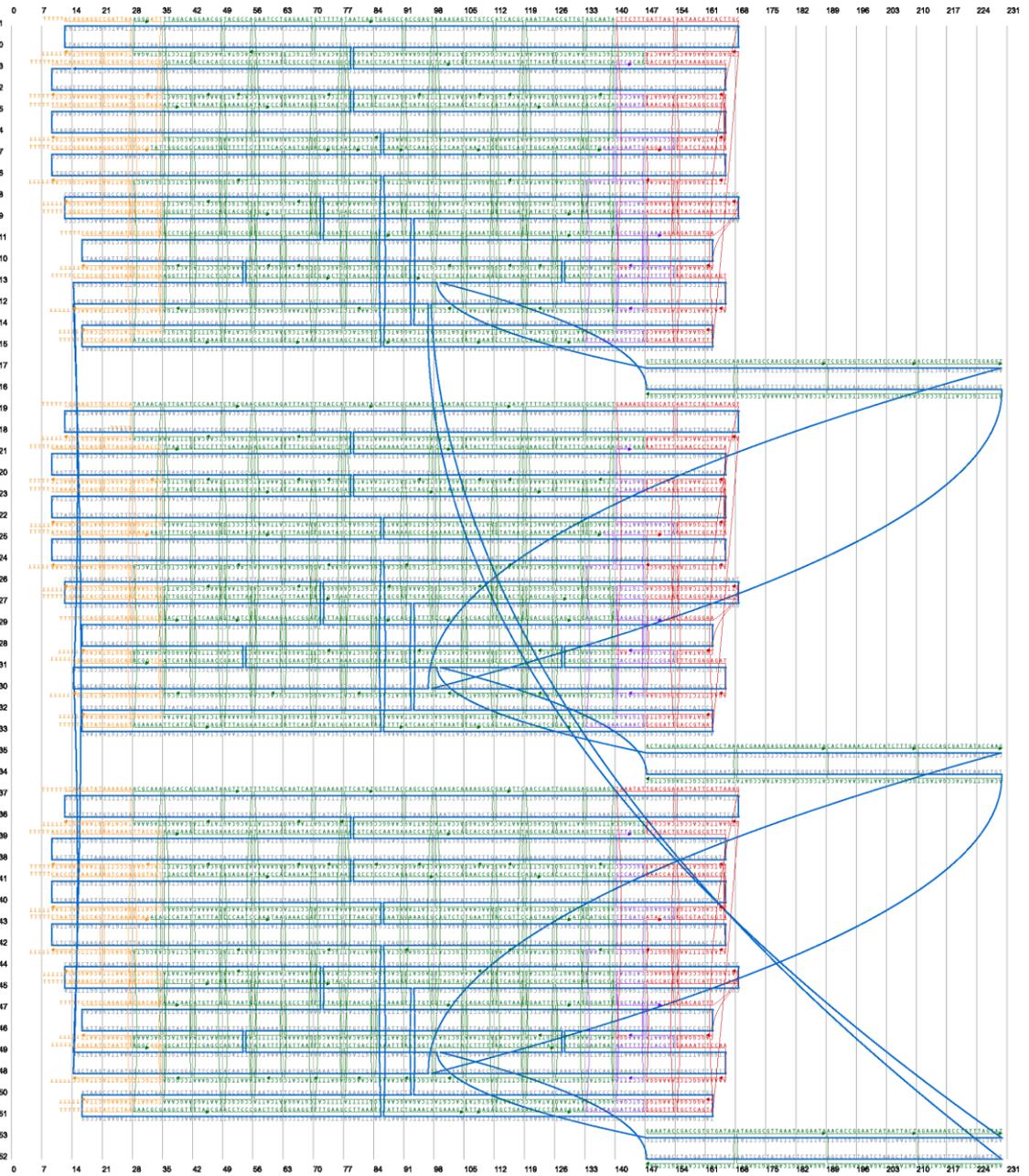
DNA ナノ構造の空間配置技術を用いて、特定の物質のみを捕捉するというアイデアは、過去にも報告されている。Hao Yan(アリゾナ州立大)らのグループは、DNA ナノ構造の特定の場所に 2 種類のアプタマーを組み込むことで、最適な空間配置においては、効率的に標的タンパク質(thrombin)を捕捉できることを報告している(Rinker et al., 2008)。本研究では、この発想を 3 次元の DNA ナノ構造と抗体の複合体に発展させることで、50-100nm のサイズの物質を捕捉することに成功した。5nm 程度の大きさのタンパク質の場合は、DNA ナノ構造の近接する部分から、アプタマー配列を提示するだけで、標的タンパク質を捕捉することが可能であったが、より大きな構造物であるエクソソームを対象に特定サイズの標的のみを捕捉するためには、DNA ナノ構造を設計した通りに保つ仕組みが重要であったと考えられる。本研究では、辺間の角度を維持するために、二重鎖 DNA の持続長 L_p (50nm) よりも短いつっかえ棒(Strut; 28nm)を導入した。また、DNA ナノ構造同士を連結した大きな構造体形成のために、Vertex 部分を計算上の距離よりも少し短い二重鎖 DNA で結んだ(Vertex bundle)。DNA の性質を上手く使うことで、設計した通りの DNA ナノ構造を得ることに成功した。

本システムの工学的なメリットとしては、単分子で機能が完結しているため、他のデバイスとの組み合わせが容易な点が挙げられる。例えば、マイクロ流体デバイスに固定化することで、個体から採取した体液から直接エクソソームを捕捉する、あるいは、流路内に固定した細胞から放出されたエクソソームを捕捉するといったことが実現可能になると期待される。また、DNA ナノ構造には、他の機能も付与することが可能であるので、エクソソームの捕捉だけでなく、複合的な機能を実現できる可能性もある。例えば、エクソソームの捕捉に伴って、構造変化を起こし、何らかのシグナルを産生する、といったデバイスが可能となるかもしれない。

本システムの応用は工学にとどまらない。細胞内では、様々な超複合体や、マイクロドメイン、細胞内小器官が機能している。DNA ナノ構造の特定部位を抗体で機能化することで、特定の生体分子を捕捉し、解析するためのツールとして、あるいは、特定の生体構造を再構成する足場として、本システムを用いることが可能かもしれない。その際は、より大きな構造体を形成可能な Polyhedra 構造の活用が鍵となる可能性があり、形成収率や、機械的強度の向上といった点が肝要になると考えられる。

7. Polyhedra 構造の Strands ダイアグラム及びピシーケンス情報

◆Tetrahedron



◆Tetrahedron に使用する Staple Strands のシーケンス情報-1

開始点	終了点	シーケンス	シーケンス数	備考
1[84]	13[73]	TGAGGCCAACGCTCATGGACACTATGGTTTTACAGCCTCCGGA	46	Tetrahedron main parts
0[54]	2[45]	AGGATACCGCCACAAACCTCCCTTAGCCAGCGAAAG	38	
3[102]	13[94]	TCGATTCGAACAGAAAACCGAGTGTTTTTGGT	42	
3[144]	11[129]	CACCTGGCCTTGCTGAGTACAAATATAATTACATTTATGTATT	38	
2[44]	6[52]	AACATAAATCAAAAGAGCAGCAAGTTTTCTCCA	35	
2[51]	15[45]	ATTGTGCCGCACTCGGGCACGGGTCATAGCTGTTCCATA	42	
2[72]	1[83]	AGTGCCGATTCGCCTGTCCGTGGTAATCAG	31	
2[93]	12[101]	ATGTGAATACACCTTTTGTCAATATAATCTTTTC	35	
2[107]	6[115]	GACCATCCCTTAAAAATGAAAATGGTAGTACA	35	
2[114]	15[108]	TGGCGCAGAAGATGAATTTGGATTCCTGATATCAGAATTA	42	
2[135]	15[129]	ACCTTCAATTTAGATTTATGGAAAGGAGCGAATATCTTAT	42	
5[39]	1[31]	CTTGTGGACTGTAACTTTCTCGTTAGAAAGGG	35	
5[60]	0[55]	CCGAAAGCTCGCTTAATTGACGAGC	25	
5[123]	10[115]	CGAGTAAGAATTTACATAGAAATATACCACACGCCCTG	42	
4[83]	2[94]	CCCTTCAGTAAATGGCTTTTGCGAATACCTACATTTGACGCTTGA	46	
7[32]	12[38]	TATCCAGCTATACGAGCCGGAAGCTGTGGGGGGTTAAT	42	
7[41]	12[80]	GCAAGCTTGCCTGAGTGAGTAACTGGTACACAGCTCCCAAA	42	
7[81]	15[66]	CTGGAGAAACAATAACGGTCCGTGGAGCTCGAATTCGTGCC	42	
7[91]	7[80]	ATCAACATTAGACTTTACCATTAAATGACAG	32	
7[109]	3[101]	ATCATCTAAAGCATCACCTTAAAAAATTTTTCAA	35	
6[51]	9[59]	GTCTGTAAGGCTGGGGAATCATGTGCC	28	
6[114]	12[122]	TTTTCTTTGCCGCAAGCATATTAATACCTTAAAT	35	
8[44]	5[59]	TGTCAAGCTGTGAGTCCACCTGGATCC	42	
8[65]	5[59]	AGCCAGTGGGCTTGAGAGAGTTAGC	28	
9[60]	10[66]	TGTCCAACGCATAAACGAACTGCCGCG	28	
9[130]	5[122]	ATATCAGGTATCAACAAGAGCCAGCAGCAAAATAC	35	
11[88]	4[84]	CTTGCTATTACGGCAACTGATAGCTTCTGCAACTTG	38	
11[130]	7[136]	CATTGAAAGCAGCAACCCAGCAGCAGCTGGTTG	35	
10[37]	2[52]	GGTTAGCAGAAAGCGAACTGTGCAACACCCCGCCCACT	42	
10[58]	2[52]	TATGAATCTGAAAGTGTCTTGGCCAGCTACAGGGTTAAT	42	
10[65]	7[73]	CAGTGCATCATTTGAAACAGATAGGGTGGTCCGCTCAGCG	42	
10[100]	2[115]	TCCAAAAGAGCTGTCCGCACTCTGAAATGGATATACG	42	
10[114]	7[108]	TCCGGTAAAGCTTAAATTAATCTGATTTATCAGCAAT	42	
10[121]	2[136]	TTGAAATTAACCTTGTAAATCCTGGCAGATTACCATCTG	42	
13[74]	8[66]	CTTTTACCAGTATAAAGCTTTCGCATCC	28	
13[95]	7[90]	GCTTCATATGCCTTATACAGCTACATGGATCAAT	38	
12[37]	8[45]	TGAAGTCTTCTGCTCGTCAATTTCAACAGTAGGGCTTCTGCCAGCC	49	
12[79]	11[87]	TTGCTAGAACGTCAGCGCTCTCGAATTG	28	
12[100]	2[108]	CCTGCTTGTAGTGAAGGCAACCAAAATCCACA	35	
12[121]	9[129]	CGTGTAAACGAACTTTCAATTAACCTTCTTCTGTCTGA	42	
15[46]	10[38]	AAGGGGAAACCTGTGGGCGCCACTCTACCTGCACACT	42	
15[67]	10[59]	TAACTCAGTGGCGCTTTTTCAGCGAGTGTGCCCCAGCA	42	
15[88]	15[87]	ACAATTCGCAACTCGTTGATGGCAATTCAGGATCCCCAAA	42	
15[109]	10[101]	AATGAGATTTAGAGTCTCAATTAACAGTCAAGTTAGCGG	42	
15[130]	10[122]	TAAACCTCAATAGATAATTTGCAATAAAGCTCGCGAATCTGA	42	
17[147]	16[147]	GTCTGGTCAGCAGCAACCCGCAAAAAGCGCAGCAGCGCG	42	
16[188]	17[188]	ATGCATCAAAAATCCCTAGATGCAACCGCAGCAGCCG	42	
16[209]	17[209]	AGCAGTTGGGCGTGTGTACTCGTGGTGCATCCACGCA	42	
16[229]	17[229]	ATTTCTGCTCATTTGCCGCCAGCTTACGGCTGGAGGT	40	
19[53]	20[45]	GAATCAGCAACTTTGAAATCAGGATTAAT	28	
19[84]	28[73]	CATTTGAGCTAAATGGTGGTAAATTTGACCAAGAG	39	
19[116]	26[108]	ATAAGCAGCCGCTTTAGAAACAGCGGATCGAAGATTATT	42	
18[44]	29[52]	CATCTCTTTGATAGCGGCTTTGTAA	28	
18[65]	20[73]	GAATTTGCGGATGGCTAGCC	21	
21[39]	31[31]	TTGGTTTTAAATATGCATATAACACAGATGAACGG	35	
21[102]	28[94]	GTAGCCTCAGAGCTAACAAATGGAACG	28	
21[144]	29[129]	AGATATACAGAGCGAGCTGGGAAAGCTAGTCAGT	42	
20[44]	24[52]	TCGTCAGAAAGCAAGCCGCTCTGTAATAGGCA	35	
20[65]	24[73]	CTTTCAAAAAGATTAAGCGTCAATAGATAGCAAT	35	
20[72]	19[83]	CGATAAATTAAGTGGTGGCTACTTAGATA	31	
20[93]	30[101]	ATCGGTTTTGCAAAAGTGTATCGGCTCAAAAC	35	
20[107]	24[115]	CCGTAAATGCCGGAAGGGCATGTGATATAAGAAAA	35	
20[114]	33[108]	AGATGTAATAATCTCGCCGCACTCTGCCAGTTTGGTGG	42	
20[135]	33[129]	AGGAACTTTGAGGGGCAACCGCTGGCGCATGGTAAGATT	42	
23[60]	19[52]	GCACAAATATAGCTCATTATAATGCTGTAGCCTGC	35	
23[123]	19[115]	CTATCAAAAAGGAGCTTTAGCAAAATTAAGAGCT	35	
22[97]	23[97]	CGGTTGATAATCCTCGGAAATAGATTTCAACCGTCTAGCT	42	
25[32]	30[38]	AAGTTACCAAGAAAGATTATCATTAATAAATGGGCGTTG	42	
25[60]	18[66]	ATGCAAAATCATGACAAAGTAAAGCAGATAGATTTAGTGTCT	42	
24[51]	30[60]	CACITTAGGAATACCAACCGTTGGGTTTCAACGCA	34	
24[72]	30[80]	TACTAATAGATATCATGGCTCATTAATACCTGGG	35	
24[90]	27[73]	CCAGCGCAAAAAGGCTCCAATGCTGCAAGGCTTATTG	39	
24[114]	30[122]	TAAAGTAAACCCGCTGCCCTGCACAGCCAGGAGA	35	
26[44]	21[38]	CTGAGAGGGAAATGCTTTAAACAATATAGAGCTCATTAA	42	
26[65]	23[59]	ACCTTTAGACAATATTATTGAATGATT	24	
26[86]	24[91]	ATGTAAGAAAAGCCCATCTGTAA	28	
26[107]	21[101]	ACGGAGATTTAATCATATGTACCCGATAAATGAGCAGCCCT	42	
27[74]	25[59]	TGATATACAGTACGAAATTCAGAGAGATTAAGATAAA	36	
27[129]	23[122]	TCCGATCGGTTAAATTTAATCGTAAACTAGTAG	42	
29[39]	18[45]	TTCAAGGAGGATGATTCCCAATTTCAA	28	
29[53]	33[45]	TCTACGTAACGTTTAAAAGAAAAATCTACGGTTG	35	
29[88]	20[94]	CCAACCATCAATATGGATATGACCAAAAACATTTGATCAA	42	
29[102]	20[115]	GTCCGATCGGTCATAAACCCTGTTTCAATAAAAATCTTTTGGGGAGGTG	42	
29[130]	25[136]	GCCTAAAGATTTTTGAGAGATCTTGAACGGGTTAA	35	
28[72]	26[66]	GCTTCCATATTGGAGCCCTTTCTTTAATCCATT	35	
28[93]	26[87]	AGGGTAATGAGTCCGATCAGCTATGCGAGGGG	35	
28[121]	20[136]	CTCTTTTATTGGGGCCAAAAGATTTTCAACGCAAGTGT	42	
30[37]	26[45]	CGGATATAAGGAAACCGAATTTATCCGCCGGGCGGTTGAGATAAG	49	
30[59]	20[66]	CTCATCATGAGGAAGTTTTGAGGAAACCGGAAAGA	36	
30[79]	29[87]	TCAAAAGGGTAAAATACGTAGCAAAAACG	28	
30[100]	20[108]	TTACAGGGAGTTAAAGGAAAGCAACAGCAGTAAAG	35	
30[121]	27[128]	CGCTGGGGATCCAGCCCATGTTCTTCAACGAAAAAATCT	41	
33[46]	29[38]	AGATATCAATAACCTCGTTTTTGGCTTATTCCGAC	35	
33[91]	33[90]	ATCAACATTAATGGGACGAGCAGCATTAAGAATCACTTTC	42	
33[109]	29[101]	CGATTCGCTCTGGCTTAAAACAGCAGCTGCCCA	35	
33[130]	28[122]	CTCTAGGAAACGCAATAAATGCGGGCCGAGGCGCCAC	42	
35[147]	34[147]	ACTACGAAAGGCAACCAATTAATTTCCGCTCGCTGAGGCTTGC	42	
34[188]	35[188]	ATGCCCGCATACCGATAAACGAAAGGCAAAAAGAAATA	42	
34[209]	35[209]	GGCCGCAATGACAAACCACTAAAACATCATCTTTGA	42	
34[229]	35[229]	ACAGCTTATACGATAGTTCCCGGAGCTTACCAG	40	
37[53]	38[45]	TATAATAAGAAATATAATGTTCAAGCA	22	
37[84]	36[76]	GGTTTTACCAAGCCGAAACTG	28	
37[116]	44[108]	TTCTAACTATAACCTCCGCTTTGAGGTAAGCCCAACT	42	
36[44]	44[52]	TTACCGGAAAGCCCAATGAAATGCTAATGTCT	35	
36[65]	38[73]	GAGGGATACCCAAAGCAAT	21	
36[75]	48[70]	GCATGATAGAAAAGAACTCTCATAGATTTG	34	
39[39]	49[31]	AAAACAAAGTAAAGAAAGCAAGCAAAAAGG	35	
39[102]	48[91]	GCAACCATACCATTAGCAGCCGCAATCAATGGTTACGCGAA	45	
39[144]	47[129]	GCCTTAGCCATTTGGGGGAAAGCAACTAAAGGATGCTG	42	
38[44]	42[52]	ATATAATACAGAGAAATAAACCAATCAAT	35	
38[65]	42[73]	GCACAAGAAATGAGTTAAATAGCTTTTTTGTGCT	35	
38[72]	37[83]	AATTTTTAGGCTAAAGAAAGCAATTCATAT	31	
38[83]	38[94]	GGAAACCAAGCTCACCAATGAAACCTCCAG	32	
38[93]	48[101]	AGCTTTTGTCTAGCATAGAGGTTTGTACTTTC	35	
38[107]	42[115]	ATCGAACCCGACCTCTATCACACCGTCCAGT	35	
38[114]	51[108]	AATTAGTAAACAGTACACTCAGAACGAAATAGTGTATATTA	42	
38[135]	51[129]	TAGGGGATTTGTAACAACCCGCAAGGGTGTATATAAGAA	42	
41[60]	37[52]	CCAAGAAACATAAATCACTCTTATACGCAAGTT	35	

◆Tetrahedron に使用する Staple Strands のシーケンス情報-2

41[123]	37[115]	CCACATCTTTAGCGCAGCCAGCAAAATCAGGACA	35	
40[97]	41[97]	TCATTAAAGCCAAAAAATGAAAGCGCTCCCTCAGAGCCGCC	42	
43[32]	48[38]	ACAACCGCTAGAACGCCGAGCGCTTAAAGCAAGCTTCTCCGC	42	
43[60]	36[66]	TAAAGATAAGCAGAACGCTTTCTTTGTCACAATCAATTA	42	
43[130]	41[122]	ATAACGATTGGCCTTGAAGAG	21	
42[51]	48[59]	TTAACCTCCGACTTGCATCATTAAACGGGTGCCT	35	
42[72]	48[80]	ATTTTGAAGCCTTAAAGTTTTACGCACTCACAA	35	
42[90]	45[73]	CCTATAGATTAGTTTTAAAGCGAGCCTCATAGATCAAG	39	
42[114]	49[125]	TAAAGCTGAGCTCCTCTATAGCCCGCCACTCAGCTTGGCTTAG	45	
44[51]	51[45]	GAATCCAAAGCCGCGCCAATAGCTTAG	28	
44[107]	39[101]	ACATGAATTTAAACAAATAAATCCACCTCAACCGGAAGATA	42	
45[46]	39[38]	TCAACAGAAATATTTAAAAACAGGGAAGTGAGCGCCTATCTAAGG	49	
45[74]	43[59]	TACTTTTCATCGTAGGAGGGAGTTTGCACCCAGCTACCAA	42	
47[39]	36[45]	AACAAGTACCGACACACCGAATATATG	28	
47[102]	38[115]	TTCTCCTGATTAAGCAAAAAGCGCCAGTACGCCAGCTAATCAGTTCAT	49	
47[130]	42[136]	TATCGTTTTGCCACCTCAGAGCCAGCTCAGCATGGCTGAGT	42	
46[121]	38[136]	ATAACCCGATTGAGGAAATAGAGAAATCAAGTTGCCTAT	42	
49[126]	43[129]	GTATTGCGAATAATTTGTATCGTATTACCTCAGACTGAGTTCGTC	46	
48[37]	45[45]	CGAGGCATTTTTCGAGCCAGTAAATAAATGTGTGCGAACTTA	42	
48[58]	38[66]	GATATTTTTAGTTAATGAGAAAACGCTGTAA	35	
48[69]	41[59]	TATCATCTTAAACCAAAATGAAACGAGCCTTACAGAGAGTAAAC	46	
48[79]	38[84]	CGGTGAGCTAAATTTCAATCGCTCTAAAGCACCAAC	38	
48[90]	42[91]	ACAAGATCGAGACCAGATCGAATGSAAGCGTTCGGAA	42	
48[100]	38[108]	TTATAGACTACCTTTTTATGTAACAGACAGCTCAA	35	
50[104]	51[104]	CACCGTACTCAGAAGCAAGCCTCTATTCTGAAACATGAAAGT	42	
51[46]	47[38]	CGATCCTGAATCTTACCGCCATATAAATAAACAAC	35	
51[109]	47[101]	AGATGCCCCCTGCCTATCAGTCTCAGCCTGGTCT	35	
51[130]	46[122]	GAAAGTCCCGCTTAAACAGTAAAGTCTCACTGAATTTGGTT	42	
52[147]	52[147]	GAATACGACCTGTGATAATATAAATCATAGGTGTGAG	42	
52[188]	53[188]	GAGAAAGTCAATAGTGAATTTAAAGCGTTAAATAAGAATA	42	
52[209]	53[209]	GATAGCTAGATTAAAGCCTAACACCGGAATCATAACTACT	42	
52[229]	53[229]	AGAATCCTTGAACAATAGCAGAAAAAGCCTGTTAGTAT	40	
7[137]	12[143]	AAAATTAGAGTTTTAAAGTTTGAACGAGAAGTTAGAAGTG	42	Connector付連
7[151]	3[143]	AGGCGCTGCAACAGTGCAGGATAGAACCTGTCA	35	
6[146]	10[143]	CTAATAGGGAATTTGAATTTGCGACTGAGACAA	32	
11[142]	11[142]	AATGAATACCTTTTTTGAAGAACAA	28	
25[137]	30[143]	ACGTAAACCAAGTGGAAACAAAGCGTGTAGATTCTGGTGGGA	42	
25[151]	21[143]	TTAAACAAGAGAATCGAAACAAAGGGAATAGATGGAT	35	
24[146]	28[143]	CATTTTTTAAATCTGTGTGCGAGAGTAAAC	32	
30[142]	29[150]	TAGTACCAAGTCCGGAATCAGCGGGAG	28	
43[151]	39[143]	AGGCAAGAGGTTGAGCGCCACCAAGCCCTTTA	35	
42[135]	48[143]	AACGATTAGGATTAGCGCTCGAGCCCTCAGGCCCT	35	
42[146]	46[143]	GTGCCTTTTATGATGCTACTGCTAAAGAAA	32	
48[142]	47[150]	TTAAATTTTTTACGCTTGAAGTAAACAAC	28	
0[166]	14[161]	GAGTAGAAGACTAATAACACTACTTGGCC	30	Connector strands
2[163]	8[167]	TCTGGCCAACAGATGATGAC	21	
4[163]	2[164]	TATTAACACCTTATCTAAAATAAT	24	
6[163]	0[167]	TTTTAGAGCATATCATTTCT	21	
8[166]	10[161]	ACGTAAGACAGAAATATAAATAATTTTAA	30	
11[151]	4[164]	AGAAAGATAAAACAGAGGTGAGCGGTGAG	31	
10[142]	6[164]	AATCTCTTTGATTAGTCAAACTAGACAGCAATAAAAAGGGACTC	45	
10[160]	12[164]	CAACATAATGGAAACAGTAC	21	
12[163]	7[150]	ATAAATCAATATATGTGACCTACCATAAAGAAAGGA	35	
14[160]	6[147]	GGAAACAAAGAACCGTAACTCTAAACA	28	
18[166]	32[161]	TAGCATTAACATCAATTTCTACTAATAGTGG	30	
20[163]	26[167]	TTTTAATGGCACGGGAAT	21	
22[163]	20[164]	GTCTGGACAAAATTCGATTATA	24	
24[163]	18[167]	TTTTTGTAAAGCCGTAATAG	30	
26[166]	28[161]	TGCCATTGAGCCAGGCAAGAGCGCCG	30	
29[151]	22[164]	CGAATGCCTCTATCAGTCAATGCCTGAGA	31	
28[142]	24[164]	AATGAAAAGGTGGCATCCAATAAAAATTTTAGAACCCCTCAAAA	45	
28[160]	30[164]	GATAAAGCTTTGTGAGAGTAG	21	
30[163]	25[150]	ACTTTCTGCTGTTGAGAGCCGATGCGCAATTTG	35	
32[160]	24[147]	GATAGTCAAGTGTGCGGATTTACGCT	28	
36[166]	50[161]	GAATATCACCGTAAATTTTCAATAAGCC	30	
38[163]	44[167]	TGCGCATTTTCAACAGTTGA	21	
40[163]	38[164]	CCAGCATTAAGTGTACTGTTACA	24	
42[163]	36[167]	AAGTTTTAACTGCTCAGTAGT	21	
44[166]	46[161]	TAGCAAGCCCAATACCTCTATTTGAGCA	30	
47[151]	40[164]	TTTTCGTCAATGAACCAAGCAGAGCGCCG	31	
46[142]	42[164]	GGATAAATTTGACGACACCGACTCAGACTGTAGCGGTTTTAT	45	
46[160]	48[164]	GCGGAGTAAAAATCTCCAAA	21	
48[163]	43[150]	AAAAGCTCCAAAAGGAAGCCACAGGAACCATAC	35	
50[160]	42[147]	AGCGGATTAAGTGGCGGTTTTGGGTC	28	
5[9]	2[9]	TTTTTTTGTGGTGGTTGAAAACCGTCTTTTT	24	Vertex 部分 PolyT cover
9[12]	4[9]	TTTTTTGGGCGGTTTTTACGCTGCGGCGGCTCAGCAGCGAAAATCCTGTTTTTT	49	
23[9]	20[9]	TTTTTTGAAAATCAGGGAAACCACTTTTT	24	
27[12]	22[9]	TTTTTTGAAAACAGCAAGCAAGGCTTTTTGCAAAACGAGAATGACCATAAATTTTT	49	
41[9]	38[9]	TTTTTTACCCCTGAACAAATAAGAAAAGTATTTTT	24	
45[12]	40[9]	TTTTTTAGAAAACCAATCAATACTAATTTTACAAGAAGCGGGAATTAACCGAATTTTT	49	
11[2]	2[31]	TTTTTTACAGGAGCGGATTAATCAGAGCGCGGTACGCTGCGCCAA	41	
1[32]	12[14]	ATTTGTTTCAATGGTGAAGATCGCCATTTTAAACAGTTTTT	38	
3[9]	0[12]	TTTTTTATCAAAGTGTAGGAGCTAATTTTT	21	
2[30]	14[16]	CGTCCGGTTTTGTGGTCTCATACCAATTTGTTATCGCTCAGATTTTT	43	
7[9]	8[12]	TTTTTTGCGCGGGGAGAGAATCGGTTTT	21	
11[16]	7[31]	TTTTTTGCGCATCAGATGCAAAAGCGCGAAATCGGCAATTTGCCCTGCG	44	
13[14]	10[16]	TTTTTTCTCGGCTGGTAAAGCAATCGTAAATTTTT	26	
15[16]	6[9]	TTTTTTTCCACCAACGCAATTAATGAATCGGCAATTTTT	31	
19[12]	20[32]	TTTTTTGGAAAGTTTCAATCCAATCAAAGATTAGAGAGTACCTAAG	40	
21[9]	18[12]	TTTTTTCAAAGGTCAGGTACGCTGTCTTTTT	21	
20[31]	32[16]	CGAAGTGGCTAGTGAATGTAGTAAAGGAACTAACGGAAACCACTTTTT	44	
25[9]	26[12]	TTTTTTAGCAGAGGCGCCCTGAGCTTTTT	21	
29[16]	25[31]	TTTTTTCCAGCGCATAGCCAGACCTTTACCTGACTGTTGAGAAAAG	44	
31[14]	28[16]	TTTTTTGAAACGAGGCGAGAGGTTACAGATTTTT	26	
31[32]	30[14]	TCAATGAGCCGGTCACTGTTGTTTT	24	
33[16]	24[9]	TTTTTTATTTACAGGTGACGAGTAAAAACCAATTTTT	31	
37[12]	38[31]	TTTTTTGCAACATATAAGAAATATAAAGCAAAAGTTACCAAGTACC	41	
39[9]	36[12]	TTTTTTAGCAGATAGCCGATAAAGGTTTTTT	21	
38[30]	50[16]	GAACGCAATTTCCATCATCGCTTCAGATAGAAAGGCTTATTTTT	43	
43[9]	44[12]	TTTTTTCTAATTTGCCAGAGCATGTTTT	21	
47[16]	43[31]	TTTTTTCTGCGAGCAGGCTTTAGTCAAGGGTAAATCGCATTAAATA	44	
49[14]	46[16]	TTTTTTCAAACATGTAATTTGGTAAAGTATTTTTTT	26	
49[32]	48[14]	AGACCTGCTCAATGTTACTTAGCCTTTTT	24	
51[16]	42[9]	TTTTTTCCGGTATTGTAACGAGCGTCTTTCCAGAGCTTTTT	31	

◆ Triangular Prism



◆Triangular prism に使用する Staple Strands のシーケンス情報-1

開始点	終了点	シーケンス	シーケンス数	備考
1[53]	2[45]	CGCCAACCGAAAGAAAGTTACCTGTCC	28	Triangular Prism main parts
1[84]	10[73]	AGT GAGGAAACCGCT CAT GC GCGT ACT AGT GTTTTTGGT	39	
6[44]	11[52]	GGTCCACCCACCCGCCAACAAGAGCAG	28	
3[102]	12[91]	AATCCATTGCAACAGGACCCGCGGACTTGCCTCCCTAGAA	45	
3[144]	11[129]	CACTATCGGCTTGTCTGTAGCAAAATTAATACATTGCATTA	42	
2[44]	6[52]	ACTAAAATCCCTTATAATGAGAGACGCCAGGCTGC	35	
2[65]	7[73]	TCCGAATAGCCGAGATTGCCCTCAC	28	
2[72]	1[83]	GTGCCAACGGATTGCCGTCAGCGTATAATC	31	
2[93]	12[101]	GAATTTGAATGTACCTTTCTCATCAATATAAATTT	35	
2[107]	6[115]	CGAACTCGGCATTAAAATGAATCTGGTCAATA	35	
2[114]	15[108]	CGTTCCGCGATCAGTGTGTGGATTCTGATTAATCAGTAT	42	
2[135]	15[129]	TGAATTTCAACGTAGATTAATGAAAGGAGCGAATTAAGTT	42	
5[60]	1[52]	AAAAGTTTGGGCGCTTATTTGACGAGCAGCTGGT	35	
5[123]	10[115]	ACCAGCTAAGTATTTACCCAGAAACATATTACCATCACCATC	42	
4[41]	0[35]	CAAGCGAATCGGCATTAAAGCGCGTAAGCTTTCC	35	
4[97]	5[97]	ACCTTGTCTGAACCAACGCTGAAGTTAATGCGGAACTGATA	42	
4[135]	14[133]	CGCCAGTTGAGAGTTAGAATTTTAAAAGTTTCCAC	35	
7[32]	12[38]	GCGAAGCTGTCCACCAACATACTAGCTGTGGTCAATGAG	42	
7[60]	10[59]	TTTACGATCCGCGTCTCAG	21	
7[74]	12[80]	AGTACATTAAGGCTGCCTAATGAGGAGGATCCGCTCCAAAC	42	
7[109]	3[101]	ATAAAATCTAAAGCATCGCCCTAAAACATATGCTC	35	
6[51]	9[59]	CCGAAACATAAAGTGTATCGAATTTCCAG	28	
6[90]	14[70]	ACTTTAGCTAACTCGAGACGGGGGAAACAACATCTTGTCTCCGGGT	49	
6[114]	12[122]	GATATCTTCCGCGAATCATATTTATACGTA	35	
8[65]	5[59]	CAGTCTTTTCCGCGCTGGCCATCC	28	
9[60]	2[66]	CACCCTCAACCCGTCGGTGTGGTCTGGCGTGCCTTGT	42	
9[130]	5[122]	GAATTCAGGAAATCAATGAGCGACGACGCAAAAT	35	
11[39]	0[45]	CGACATCCCTTTAGACAGGAACATAA	28	
11[53]	15[45]	CCAGCGCAGGTTCTGCCTAATCATGGTCAGGC	42	
11[88]	2[94]	TGCTGGCTATAGTTCGGGGAAATACCTACATTTTGACTTTT	35	
11[130]	14[136]	TTCTCTGAAAGACGCAACACTCTCAAGTTGACCAACAATTCG	28	
10[58]	2[73]	CAGCAGAACTCGGAATGGTGTGATCGCGCTACAGTTGA	42	
10[72]	11[87]	GCTCTGATTGCCGTTCCGCAAACTGAACTGAT	35	
10[100]	2[115]	TGCGTAAAAGGCTGTCCGCGCGGCTGAAATGGATAATA	42	
10[114]	7[108]	CTCTCGCTGGTCCGCTAATTAATCTGATATAACATCA	42	
10[121]	2[136]	GCAGCAAAATTAACCGTTGTAATATATTGGCAGATTCACTTC	42	
12[37]	12[49]	AATGCTCGTCACTGCGAACCGCAGCAGTGG	31	
12[48]	4[42]	GCTTAATACCGGGTGTCACTATTTGGGGTTGCGAG	28	
12[79]	8[66]	ATAGCGATAGCTTACAAGCTGGCCGA	35	
12[90]	6[91]	TCCTTGAATGAGCTTACATCGCTCAAAATCAAGTATTAG	42	
12[100]	2[108]	TCCGTTTTCGCTCGATACGCGTACAAAAGGCA	35	
12[121]	9[129]	ATCCAGCCTCCGTAACAATTTTATATAACCTTCTTCTTCT	42	
14[69]	7[59]	ACCAGCAAGCCTGTTCGCTTGCCTCAGTGG	32	
15[46]	11[38]	CGGCTTTCCAGTCGGGAGTTTGGCGCGCCATGC	35	
15[98]	15[97]	ACAACCTCGATTTGGCAATCTCAAGTTGACCAACAATTCG	42	
15[109]	10[101]	TAAATGAGGATTTAGAAACCTCAAGTAAACCAAGTAAAG	42	
15[130]	10[122]	ATTAGCCGTCATAGATAGTTGGCTTTAACGGAGGCGACAGA	42	
17[130]	16[130]	GTGCCATCCCAACGCAACAGGGTAAAGTAAACG	34	
16[167]	17[167]	CACAGGCGGCTTTAGTGTGACGCTTACGGCTGGAAGTGT	42	
16[188]	17[188]	AAAATCCCGTAAAAAAGCCGACGATCAGCGGGCTCATTGC	42	
16[205]	17[205]	GTGTACATCGCATAAAAGGCGCTTTCCGACTCA	34	
19[53]	20[45]	GAGCAACCTAAAGAGGATTAATCGA	28	
19[84]	28[73]	TCGCAAAAATCGSTGATTAATTTGCTCCATTAGTACG	39	
18[44]	29[52]	TTTTTTGATAAGAGTTTATAATCTT	28	
21[102]	30[91]	TACCAGACATAAAGCTTGGTCAAGTTTCCAAACGATTTGCTC	45	
21[144]	29[129]	ATTACAGGCAAGCGAAAGCTGAAAGAAACGTAACGCTTGCCA	42	
20[44]	24[52]	GCTAAGCAAGCGGATTTCTCAAATAGTAAACACT	35	
20[65]	25[73]	AAAAAAGATTAAAGGAAATTAATATAGC	28	
20[72]	19[83]	AGCAAGTTGGTAAAGCGTAAATATGATTT	31	
20[93]	30[101]	CCATTTCCAAAGGGGAAACGGCTCAGGAATTA	35	
20[107]	24[115]	AGAGCCGGAGGGTGGTCAATCAAGCAAAAT	35	
20[114]	33[108]	AGSAAACGACCGCTATTTCCGCGCCAGTTGGGGGACGAG	42	
20[135]	33[129]	AAAATTCAGAGCGGATCCGCTTCTCGCATCGTAAACGCTCTCC	42	
23[60]	19[52]	CAATATCGGCGATTTTATGCTGTAGCTCAAGAAC	35	
23[123]	28[115]	TTTTAAGGGTGGCTTTATCAAAATTAAGCAATATATTTTTAAA	42	
22[41]	18[35]	ACAAGTCTAGTCAAGGCTTGTCTGCTAAATAT	35	
22[97]	23[97]	TGATAATCAGAAAGGATCGTCAAGTCAACCGTTCTAGCTGATA	42	
22[135]	32[143]	AATACGTTAACAAATAGGGGAACAACGGCGGAGAT	35	
25[32]	30[38]	TTTCCAGACGAGATTCATCAGTTGTAACCGGCTTGAGAGC	42	
25[60]	28[59]	TTATCAACGTAAGAACCACGA	21	
25[74]	30[80]	GTCTACGAGGGCAGATACATAACGGCTATACCTTATGGCCA	42	
24[51]	27[59]	ATCGGAATACCAATCTCGGGGAAAGAACT	28	
24[90]	32[70]	GCTTTAAAGCAATCAATACACTGCAAGGCGAATTTGAATACCAAGTCA	42	
24[114]	30[122]	TCCCAACCGGTCGATTTGCATCTCGAGCTTTCCGA	35	
26[65]	23[59]	AAAGACTGATTCATTGAATCCCGCAT	28	
26[107]	21[101]	CAGATTGTATATATGACCCCGGTAATTAATCAGTCAAGTAA	42	
27[60]	20[66]	TTACGCGGGAAGAATAACAGATTTGCCACTGGATTTCTTC	42	
27[129]	23[122]	GCACGGTGGGATTTGACGTAACGTAACACTAGCATCTAT	36	
29[39]	18[45]	TACGGACAGATTTCCCAATTTCTGCCATG	28	
29[53]	33[45]	GAGCAACAGTAAATTTCAAATATAGTAAAGAT	42	
29[88]	20[94]	GGTCAATATGATATCCGCGCAAAACATTAAGCCCTATCA	42	
29[130]	22[136]	AGCGATTCAATGAGAGATCTACAACGGT	28	
28[58]	20[73]	AGGTAGATTTAGTTTGAATAATAGCGGATGGCTTAGACGAA	42	
28[72]	29[87]	TAACTGACCCCTCAGCAGCGAAAGTTAAACGCCAG	35	
28[100]	20[115]	GAATAACCTGTTAGCTAAAGCGCTTTTTCGGGAGAAAGAGAA	42	
28[114]	26[108]	GACCAACGGCAGCGGATCAAAAGCATCGCAACGC	35	
28[121]	20[136]	GACCATTTGGGCGCGAAGTATGTTCAAGCCCAAGGATAGGT	42	
30[37]	30[49]	CGGACTTTGAAACGAAAGGCGCACCGGTT	31	
30[48]	22[42]	GCGGATGATGGTTCTGCTCAGGGTAAAGCTTTAA	35	
30[79]	26[66]	GCAAGTGGCGGTTATCATCATTTGACCC	28	
30[90]	24[91]	ATTTGCCGATTTTATGCTGCAAGCGCCCAAAAAGTAGCCA	42	
30[100]	20[108]	ATTCGGAACGAGGGTAGTTTTTCCAGTGTACCCGG	35	
30[121]	27[128]	GAATACAGAGGCGCATGTTTACCCAGGAAAGAGAGACCCG	41	
32[69]	25[59]	GSAGCTTAACTAATCATAGAGCAAAATG	32	
33[46]	29[38]	TTAATAACCTCGTTCAGCAGAGTTCAAGTTCA	35	
33[98]	33[97]	ATGTAGGCGACGACGATTAAGCTGGCTCCCATCAACATTA	42	
33[109]	28[101]	TAACTGCTGGCTTCCAGGAAGCTGGCGAGTCAAGTATGAG	42	
33[130]	28[122]	GTGAACGCCATCAAAAATTTAAGCCTCTTGGCCAGTGTAG	42	
35[132]	34[132]	TAAAACTCATCTAGGCGGCTTTTGGGG	30	
34[224]	35[224]	TAGTTGCGCGCAATAAATTTGTTGCGAAA	30	
37[53]	38[45]	CACCGACCTGTGATCAGCAGCAGAAAG	28	
37[84]	46[73]	AATAGAAGCACCATACCAAGGATACCCATTGTTGAAAT	39	
36[44]	47[52]	CTTAGTTACCGAAGGAAATAGAGATAA	28	
36[65]	38[73]	GAAGAAACGCAATAAAGAA	21	
39[102]	48[91]	AATCAAAATCACCGTAAATTCATGTTAATTTGAAATCGAGGTG	45	
39[144]	47[129]	ATCTATCACCGTCAACCGTCAACCGGTGAGAATAGAAACGTTA	42	
38[44]	42[52]	AAAGAGGGTAAATGAGCCAGCTTCAAGCAATTTTT	35	
38[65]	43[73]	AGTCAAGAGGATAACTAGCTCTCCA	28	
38[72]	37[83]	TTGTGACAGACGCTCCTGACCTCACAATC	31	
38[93]	48[101]	AAAGCGTAACCAACTAAGCTATCACCGTACTTGC	35	
38[107]	42[115]	TCTAGAGCGCCAGCTAGAGGATCGAGTCAAGTCAAG	42	
38[114]	51[108]	TTTTGCTTCACTGAGGTTTGGTATGATTAAGTATAGTCTG	35	
38[135]	51[129]	GTCAATGAATATAGGAAAACCGCGGATAGTGGCGTGGGAGG	42	
41[60]	37[52]	ATACCCAATAAACCGACTGGCATGATTAAGAGAA	35	
41[123]	46[115]	ACCCTTATTCAGCACCCATTTTGGSAATACCAAAAGAACT	42	
40[41]	36[35]	AGAATAAAAAGTCAAAATGAAGCAAAATTAACGC	35	
40[97]	41[97]	ACAAAACAATTAATTTTTGTTCAAGCACCCACCGAAACCGC	42	
40[135]	50[143]	GGATCCAGTAAACGGGTTAGCTCCTCAAGAGCCAG	35	

◆Triangular prism に使用する Staple Strands のシーケンス情報-2

43[32]	48[38]	GCCTACCTGTATCCGGATTCTTACCGCGCAATCAAAGCC	42
43[60]	46[59]	TTTCCTGTTTACATGTTGAAA	21
43[74]	48[80]	AAATTTAAATCCCGACTTCGGGAGCGAGAAGCTATTAAATAAA	42
42[51]	45[59]	GCACGAGCGTTCCTAGCTATTTCTCCT	28
42[90]	50[70]	CCTGCTTTGAAGCAAGAACTGTAGCATTCCACAAGAACGGAAAGCAAG	49
42[114]	48[122]	TGCCATGAAAGATTAAAGAGGGTACCGCCATAAT	35
44[65]	41[59]	TCGATCCCAAAAAATGAAAATAGGCTA	28
44[107]	39[101]	GTCTGSAAGTGGCTTGTATTTCTCCTCCTCTTTATACACCC	42
45[60]	38[66]	TATGCACCTAAATAAGAACTTATGGTTTCAGCTAAAGTT	42
45[129]	41[122]	TCAGCCCATGTTACCGTGGTGGAGGAGGTCCAGA	36
47[39]	36[45]	GACGTAAATAAATAAGAAACGCAACTC	28
47[53]	51[45]	ACAATCAACACTGCTTATCGTAAATCATAAGA	35
47[88]	38[94]	TTATCACCGGAACCAACTTAGCAAGCCGAAAGCTATCA	42
47[130]	40[136]	GTAAATAGCCCGCCCTCAGAGCGACA	28
46[58]	36[66]	TACCGGAAATAGTTTAAAA	21
46[72]	47[87]	TTAAGGTTGGGTATATAACTATATCATCTTATAG	35
46[100]	38[115]	TTAATGGTTTACCAGCGGAGCGAGAAACCATCGATAGAGCG	42
46[114]	44[108]	TTTAAATCGCAATCGGTTTATCAGCTCAGGAGTTTCC	35
46[121]	38[136]	GAACAAAAGGGGACACTACTGAGGTAAATCAGTAGGCTTCG	42
48[37]	48[49]	GGATTTTCGAGCAATAAGCGGTTGCTCCAT	31
48[48]	40[42]	GTTACTTTAAATCGGATAGTAAATAATAACAGAG	35
48[79]	44[66]	CAGCTTGTACCGGATCCATTCCAGAAC	28
48[90]	42[91]	AATTTCTACCAAGTCAACCCGAATCCTCATTAAAAATGCC	42
48[100]	38[108]	TTTGCTGATCAAATCCTCAAATAAGTTTGGCCA	35
48[121]	45[128]	TGTAGACAAAAGAAACCACTAACCAAAAGGAGCCTTCCC	41
50[69]	43[59]	CCGTTTTGAACTCAAGATTAGTTGCTAATTA	32
51[46]	47[38]	ACGCCAGCTACAATTTAGTACAAAGTCTGTCCA	35
51[98]	51[97]	CTATTATCCGGATAGGTGCACTCATGTCTATTTCGGAAC	42
51[109]	46[101]	AAACCGTATAAACAGTTCCAGAAACAGTAGTCTAATATT	42
51[130]	46[122]	CTGAGTGCCTTGGATCTGAATCAGTAAATCCAGACGCGA	42
53[130]	52[130]	AAACCCGGAATCATAACTTTTAACTCCGG	34
52[167]	53[167]	AAATCATAGTCTGAGAGCTACTAGAAAAGCCTGTTAG	42
52[188]	53[188]	GAGTCAATAGTGAATTTATCATATCATATGCTTATACAAAT	42
52[205]	53[205]	GATTAAGACGCTGAGAACTTACCAGTATAAAGC	34
34[209]	35[209]	TGACAAACACGAGGGAGTTAATGACCCCAAGCATCGCCTGA	48
5[25]	7[31]	GTGGTTCCGATCCACGAGAG	21
23[25]	25[31]	CTGACTTTAAGAAAACAAGT	21
41[25]	43[31]	CACCCCTGAACCATAAAAATTT	21
0[166]	3[156]	CTGAGTAGAAGACTCAAAACGACCACTA	30
2[163]	5[156]	ATTCTGCGCAACAGATATAAACAGAG	27
4[163]	3[143]	AGTATTAAACCCGCTGCAACAGTCAAGATAGAACCAGT	42
6[163]	8[143]	TCTTTAGGACACTAAACACTAATAAGGAATGAAA	35
8[142]	1[159]	TTGTTACCTGAACAAACTCTCTTTGATTAGTAATA	37
8[166]	7[156]	GCAAGTAAAAAGAAATAATGAGGAGGT	30
10[160]	11[153]	AAACAAATCAAGAAAGCAAAA	21
12[163]	9[159]	ACATAATCAATATGSAACCTACCATAT	30
14[142]	13[156]	CAGAGGTTATGAGTGAATTAACCTTTTTTA	34
14[160]	15[153]	GCGAACAAAAGAGGTAAC	21
18[166]	21[156]	ATTAACTCAAATAAATCATTTTAGAACC	27
20[163]	23[156]	AAATGCAATGCCTGAGTCAGTCATTG	30
22[163]	21[143]	GGAGCAACAAAGAAATCGATGAAAGGCTAATGTGTAAAA	42
24[163]	26[143]	TGTTAAATCAGCTCATTTTAACTATTTTGGG	35
26[142]	19[159]	AAAGGTTGGAAGTCCGGAGTCCGATCAATCTACTA	37
26[166]	25[156]	CATTCAGCTGCGCACTGTTTAAATTCG	30
28[160]	29[153]	ACCTCACCGAAACCGCCAC	21
30[163]	27[159]	TCTCGTGGTGAAGGGAAGAACAGGCAAA	34
32[142]	31[156]	GGGGGTCCGCTAGCTAGTCCCGAATTTGTA	30
32[160]	33[153]	GGTCAAGTGGTGTATTGACC	21
36[166]	39[156]	ATTATTCATTAAGGTGAATAGTTTGGCT	21
38[163]	41[156]	CTGTAGCGGTTTCTCATCTCAGACCG	27
40[163]	39[143]	ACCACGAGCGCCGCACTCACTCACCCCGGCTTACA	42
42[163]	44[143]	GGAGTGTACTGTAATAGTTTAAAGCTCAAAGC	35
44[142]	37[159]	CCATTTCTGTGAGGGAATGAGGGAAGGAGGTA	37
44[166]	43[156]	CCCTCATTTTCAAGGATAGCTACATGGCTT	30
46[160]	47[153]	ACTTTCAACAGTTTATGGGAT	21
48[163]	45[159]	TTGAAATCTCAAAGAAAGAACCGCCACCT	30
50[142]	49[156]	GGGACCTCAAAGGCTAGSAAATGCGAATAATA	34
50[160]	51[153]	GGTTTCTCAGTAAAGGAT	21
7[9]	41[24]	TTTTT AATCGCCCAACGTGCTGCGCT TTC ACT AAT CTG ATG AAAAGGTAAAGTTAGCTATTGAA	64
25[9]	5[24]	TTTTT CGAGAGGCTTTTTCAGGAGAA GCA AAA TTC TCA TTG AAATCGTAAACGCTCAAAGATG	68
43[9]	23[24]	TTTTT AGCGCTTCCATATCCATC TTC ACT AAT CTG ATG TACT GGCAGTAGGCTGACCCGGAATACC	68
		CATCAGATTAGTGA	
		CAATAGAAATTTGC	
		AGTACATAAGATTAGTGA	
		CAAAATATGA	11
9[160]	10[161]	CAAAATATGA	11
27[160]	46[161]	GCGCCATTCCA	11
45[160]	28[161]	CAGAGCCACTA	11
11[154]	8[167]	GAAGATGATT	11
29[154]	44[167]	GGGAACGGACA	11
47[154]	26[167]	TTTGCTAAAGC	11
7[157]	2[164]	TATCTAAAAAC	11
25[157]	38[164]	CATTAATTTGA	11
43[157]	20[164]	TTGATGATTT	11
1[160]	14[161]	ACATCACTTT	11
19[160]	50[161]	ATAGTAGTAGG	11
37[160]	32[161]	TATTGACGGTA	11
1[12]	2[9]	TTTTT AAACGAGCGCGATTAATCAGTACCGGTACGCTGAAGC	41
0[34]	12[14]	TCGTTAGAAAGGATTAACCTTTCTTTGCGCATATTTAAACAAGCCAA TTTT	49
3[9]	0[12]	TTTTT AAAACCGTCTACGCGGAGCT TTTTT	21
2[30]	14[16]	TGGCATCAGTGTGCAGCTTTTCTTCTGTGTAAATTTGTT TTTTT	43
9[12]	7[23]	TTTTT CAGAATGCGCGGGCCTCTGTGGCGC	26
13[14]	10[16]	TTTTT GTAATGGGTAAAGGGGTGTGTTCAG TTTTT	26
15[16]	6[9]	TTTTT TCCGCTCAAAATCGTGCACGCTGCTTAAAT TTTTT	31
19[12]	20[32]	TTTTT AGTTTCCATCATTAAGTACGAGGATACCTTTAAGAA	49
18[34]	30[14]	SCAACTAAACAGTTGTGAACGGCTGACCACTGCTGTGCGCTGCGGCT TTTTT	40
21[9]	18[12]	TTTTT AGGTCAAGTATGTTCTGTGA TTTTT	21
20[31]	32[16]	CCAGGCTGACCAATAGGTAAATGAACTAACGGAACCAATTA TTTTT	44
27[12]	25[23]	TTTTT ACACCAAGCAAGTACGCTGCCCGCA	26
31[14]	28[16]	TTTTT TAAGGGAACCGAATGTACAGACCA TTTTT	26
33[16]	24[9]	TTTTT TTACAGGTAGAAACGATAAAACCAAATAG TTTTT	31
37[12]	38[31]	TTTTT ACATACTAAAGGTTAGCAAAAGTAAAGGATAGCATAG	41
36[34]	48[14]	AGTATGCAACATGAGAAATAAGAGGCAACGAGGCGCAGACGGTCAATC TTTTT	49
39[9]	36[12]	TTTTT CTTTTAAAGAACGTAGAAA TTTTT	21
38[30]	50[16]	CAAAATTTGAAACAAATAGAAACCCCAATAGCAAGCAATTA TTTTT	43
45[12]	43[23]	TTTTT CTAATTTACGAGCATGAAAATAAGAG	26
49[14]	46[16]	TTTTT CATGTAATTTAGGCTAAAGTACCGA TTTTT	26
51[16]	42[9]	TTTTT GATATAGAGGCAATCTTACCAAGCTAACG TTTTT	31
5[9]	2[9]	TTTTT AAATCCTGTTTCTGTAAGAGG TTTTT	24
7[24]	4[9]	GGGGTGGTTTCCCGCAGCAGG TTTTT	23
23[9]	20[9]	TTTTT AAATCAGGCTTCAAAC TTTTT	23
25[24]	22[9]	AAAGGAATGACCAATAATCAA TTTTT	24
41[9]	38[9]	TTTTT GGGAAATTAACCTTACCGAAGC TTTTT	24
43[24]	40[9]	CCTAAAGGGAGCGCATTAGAC TTTTT	23

◆Cube に使用する Staple Strands のシーケンス情報-1

開始番号	終了番号	シーケンス	シーケンス数	備考
1[84]	13[73]	AACCGTATATCCAGAACAAACCACAGGATTTTAAACGAAATGGT	46	Cube with short connector
0[54]	2[45]	GCCCGTAACAGAGTCTCGTCAATAGTTACCTGTCC	38	main parts
3[102]	13[94]	GGAGCCCTTGGTGGTAAACGCGACGCGCAAGTT	35	
3[144]	11[129]	GTCAAGTAAACATCACCAGTAAAGCAAAAGGATTTCTGCT	42	
2[44]	6[52]	ACTAAATCCCTTATAATGAGAGCGCCAGCTGC	35	
2[51]	15[45]	AGACGACCAAGCGAGGTCTCTGGTAAATCATGGTCCAGAGC	42	
2[72]	1[83]	GTGCCTACACAGTAACTCTCATAGACAGG	31	
2[93]	12[101]	CTGTTACATCGATTTTCTCAATTATCATATTGAA	35	
2[107]	6[115]	AGATGGCTATTAGTCTTACACCGCACCTTGGGAGC	35	
2[114]	15[108]	AGCGGATCCAGAAATATTCAAAACAGAAACCACTTTA	42	
2[135]	15[129]	TAAAATACCAAAATATTCAATAGTAAAGATTATCATAAAC	42	
5[25]	7[31]	GTGGTCCGATCCAGCGACAG	21	
5[60]	0[55]	AAAAGTTGGGTGAGCCGCTTAAT	25	
5[123]	10[115]	GGGATCTGGAAATACCTAGTAAAGAACTCATTATATCGT	42	
4[41]	0[35]	CAAGCGAATCGGATTAAGCGCGCGCGCGCGCTA	35	
4[83]	2[94]	CGCTGAATAGTAAAGAGGATATTACCGCCAGCATTGCTGAC	46	
7[32]	12[38]	GCGCACTGTTCACACAACTACTAGCTGTGGTCAATAGTA	42	
7[74]	12[80]	AGTACATTAAGGGTGCCTAATGAGGAGGATCCGCTCCATCG	42	
7[81]	15[66]	CGGAGTCAAGTAACTTGTCTTCCGGGTACCGAGCAAGC	42	
7[91]	7[80]	AAATGATAGAGCGCTCAAAGTAACTTCGAGA	32	
7[109]	3[101]	ATCCCTGCACAGTGCCTTTTGAACCCCTTCAACA	35	
6[51]	9[59]	CCGAGCATAAAGTGTATCGAATCCAG	28	
6[114]	12[122]	ACTGTTAGACTTACTTTGCGGGATGATGACAT	35	
8[65]	5[59]	CAGTCTTTTCACCGCTGCCCATCA	28	
9[60]	10[66]	CACCTCGTTCAGTCAAGCTGGTCCGCTG	28	
9[130]	5[122]	TTGATTTGCACAATATCGCGTGAATTTATAAT	28	
11[88]	4[84]	CTTAAAGCGTGGCAGACAATATCGTGAAGCCAAA	38	
11[130]	7[136]	TTGAAGGACCGAAGTATAGCCGAGTGCACAA	35	
10[37]	2[52]	CCCATCAGAGCGGAGCTACAGGTAGGCGCTGCCAAAACA	42	
10[58]	2[73]	TGTGAGGCGAATTAAGCGCGCGGGTCAAGCTTGGCGTGTGA	42	
10[65]	7[73]	CGCGCTGTTCGCAATATCGCGTGAATTTGCGCTCAC	42	
10[100]	2[115]	CCTACTGAGAAAGTGTAACTCAAAACGCTCATGACCAA	42	
10[114]	7[108]	CTCGTTCCGCTCAATATATGAGATTCTGAAAGAAAAGC	42	
10[121]	2[136]	TTTATCAGTGAAGCGCTTGCCTGACATTTGACGCTCGTAA	42	
13[74]	11[87]	CTGGTGAAGAGGTAAGAGCACTAGTAC	28	
13[95]	7[90]	AAACCTTGTCTGTAAAGTGAAGAGTATGCGCAGC	38	
12[37]	12[49]	TAAATAGGTTAAGGTTCTTAAATCAAAAT	31	
12[48]	4[42]	TCTTACCACCGGGTGTCACTTATGGGTTGCAG	35	
12[79]	8[66]	TCCGTTTGTATCATAGGCTGCCGAT	28	
12[100]	2[108]	TAAACGATGCTGATTCGCGTGGTGAACAATAAAGT	35	
12[121]	9[129]	TAACAACCGCGGATGAACAACTTAAATGAAGACGTCGAA	42	
15[46]	10[38]	CGGCTTTCAGTCCGAGTTCGCGCGCCATGCCGACAT	42	
15[67]	10[59]	CTGTTGCGTTGCGCTCAGTGGTTACGATCCGCGTGCAGCT	42	
15[88]	15[87]	GATAATACATTTGAGGACAGAAAGGCGCTCACGTTTGTGA	42	
15[109]	10[101]	GAACAACAATAATAGATAATCTATTTCGTAGGAGAAAGCAG	42	
15[130]	10[122]	AATTAAATATCTTTAGTGAAGCTGGTAAAGGCTGATCGTT	42	
17[134]	16[134]	CAGCAGCAACCGCGGCTTAAAT	26	
16[167]	17[167]	TCCGTTAAAAAAGCCGCAACAAGATGCCAACGCGACACC	42	
16[188]	17[188]	GTGTACATCGACATAAAAAAGTCCGTTGGTCCATCCACGC	42	
16[209]	17[209]	GCCCGCAGAGTGGCGGTTAACAGCTACGCGCTGGAGGT	42	
16[221]	17[221]	TTCTGCTAATTTGTCAAGTATAG	24	
19[53]	20[45]	CAGTAAATCAATAGGAGCATAGGAC	38	
19[84]	28[73]	TTTAGTAAATAAAGCCTCATCATTTTGTGCGAACAAAGA	39	
19[116]	26[108]	GGTCCGAACTCACCTTCTCAGGAAAAGCGACGACATCG	42	
18[44]	29[52]	AATTAGAGAGTACCTTGGCCGAACTGG	28	
18[65]	20[73]	TGGTCTTTGATAAAGATC	31	
21[102]	28[94]	ACCTAGCAAAATTAAGCTGACCATCTAC	28	
21[144]	29[129]	CTTAGCATTAACATCCGCTATATATAACCTCACCGAACGAC	42	
20[44]	24[52]	TTCCCTTACCCTGACTAGTCAATAAAGAGTAAT	35	
20[65]	24[73]	TTACGAAAGCAAAAGCGAGCTCCTAATAGTCAGA	35	
20[72]	19[83]	AAATAGGAGGATGTCTAGGATAGGATAGA	31	
20[93]	30[101]	GAAGATTAACTTCCGCTTAAAGTTGAGGGAAGAC	35	
20[107]	24[115]	ATTAACCGTCTAGCTGGAAGGTTGCCAAAACCC	35	
20[114]	33[108]	GGTGGTTTTCAAGGGCGAGTATCGGGGCGCATGTAACGCTT	42	
20[135]	33[129]	GCAGTAAACTCAGGCTGCACTCCATAGTCACTTGGAGC	42	
23[25]	25[31]	TAAATCAAAACCTTCAATA	21	
23[60]	19[52]	AGTAGGAAATTAATTTGCTTAGGCTTAATATAA	35	
23[123]	19[115]	ATTAGTAAATGCTGTAAACATCAGGCAAGCAAAAT	35	
22[41]	18[35]	TTGAATCATCAGTAAATATGTCAGGAATAATGC	35	
22[97]	23[97]	CATGTCATCATAGACTGGATGTCAAAATCACCATCAATAT	42	
25[32]	30[38]	GCGCACTCGAGACATATTTGTTGGGAAGCACGCGCG	42	
25[60]	18[66]	CCAGAACCAGCTTCAAGGAGTGTATCCCAATTCGGA	42	
24[51]	30[60]	ACGGAAGATTATCAGGCTCATTTGGGCTAGG	34	
24[72]	30[80]	TACTTAGAATACCACTTACTGCTCACTAAT	35	
24[90]	27[73]	TGCGCAACTAATGAAAATGTGAGTGGCGAAAATGTTT	39	
24[114]	30[122]	AATTCACATTAATTTGTAGTGGCTCAGGGAT	35	
26[65]	23[59]	ACAGAGGGAATAGCGAATCTTAT	35	
26[86]	24[91]	CGCTTATGACCCGCTAAATAAT	24	
26[107]	21[101]	GTGCAAAAAAATCGTAAACTAGGATTTCCAAAAGTTGT	42	
27[74]	25[59]	AATGATTTTAAAGACTTGGATATACGCCAAAAGTTTG	42	
27[129]	23[122]	GATCCGCAACAGTTCGACAGGAACTGATATAA	36	
29[39]	18[45]	GCACCCGACAGGTTTCAATCCGCTG	35	
29[53]	33[45]	CTGGATTTCTAGTAAATACCACTCAGGACAGC	35	
29[88]	20[94]	GGCAGCCGAGACATGGGAGCATAAAGCTAAATCGGGTGA	42	
29[102]	20[115]	GTAGCAACGTTAGTACATTTGCAAAAGATAAAAATTATGACTGA	49	
29[130]	25[136]	GTTATGCTTAAATCCGCGAGGGGGGCAATATA	35	
28[72]	29[87]	TTATAGCTAATTTGCGAGGATTAAGCTTTGGAGA	35	
28[93]	26[87]	AGAAAGCCGGAACAGCGGATTAATTAATTA	35	
28[121]	20[136]	GCACAACTGTTTAAATAAATCTTTTGGGGAGAAAT	42	
30[37]	30[49]	GGCGAACGAGCGACAGCGTCCCTTCCGAC	31	
30[48]	22[42]	TCAATCCGACGAGTACCTTTCGAAATATTCA	35	
30[59]	20[66]	CGCTTAAAGCGGTAATTTGATGTCAGGAGAAGA	36	
30[79]	26[66]	TAAATCCGGGTCATTTGCTGAGTCTTGG	28	
30[100]	20[108]	GCACCTTTGCGGGATCGGAGGTAACCGCAGAAAG	35	
30[121]	27[128]	AGCCAGCAGCGAAGAACTTCCGCTTCCGTTGAAAGGAA	41	
33[46]	29[38]	GTAAAGGATAGTAAAGAGAGGCTAAATCAAAACA	35	
33[91]	33[90]	CCTTCCGTGAGCCAGCTGCATCTGCGCTGATTTACTTTCTGG	42	
33[109]	29[101]	TCAAGGAAAGCCATCAATGATTAATCGGGCTTTGG	35	
33[130]	28[122]	GAGTCACTCATTTTTAAACAGGTTGGGCGAGTCAAGCA	42	
35[134]	34[134]	GCCACTACGAAGGGTCCGTTGAGGCT	26	
34[167]	35[167]	CCACGCTAACCGATATTTCCCAACCTAAAAAGAAAG	42	
34[188]	35[188]	GACAAATGACCAACACTCCGCAAAAGATACACTAAAACA	42	
34[209]	35[209]	CTTGATACCGATAGTGGCGCTCATCTTGGCCCCAGCGA	42	
34[221]	35[221]	TTTCTTAAACAGTATACCAAGC	24	
37[53]	38[45]	AAAGTATTAGCGAGAAATCTGCCCA	28	
37[84]	36[76]	ATTTTGTCAAAATCACAGAC	22	
37[116]	44[108]	TTTATGAAAGCTTAGGAGCTTTAAATGTTGTATCACCG	42	
36[44]	44[52]	CATAGATAGCCGAAAGTAAAGTCCAGCCGAAC	35	
36[65]	38[73]	CGGAGAAAGAACCGAGAGG	21	
36[75]	49[83]	GCAATACCGGAAGAAAATCTGACCTATCATA	34	
39[102]	48[91]	CCGGAATAGAGCCAGCAACTCCAATCGCGAGCTATATCAGC	45	
39[144]	47[139]	CACATTAAGGTTGATCAAAAGGAGTTTCAAGCTATCGT	42	
38[44]	42[52]	ATACTTGAACAAAGTCAAAAATGATTAACAAGA	35	
38[65]	42[73]	ACAATTAGCGCTAATAAAGCTATTATTTGAGG	35	
38[72]	37[83]	ATAACCTGTAGCATCAGAACGCTAAGTTT	31	
38[83]	38[94]	ATCAAGGATAGCCACTTACCATTAGCCCA	32	
38[93]	48[101]	CTACCCCTCTTTGCTGAGCCGAGTATGATGG	35	
38[107]	42[115]	TTTGAACCCCTCCCTCGGTTGAGCCGAGAACAGT	35	
38[114]	51[108]	CCGATCTAACCCATGTACCGTACGCGCTCGAGGGTTCGG	42	
38[135]	51[129]	CATTCCAGACGATAGCCGCTCATGATCCAGCGCATG	42	
41[25]	43[31]	GAGAAATTAACACAGAGCTTT	21	
41[60]	37[52]	GTAAAGATTGATTAACATAGCCAAAGGAAATAA	35	
41[123]	37[115]	CCGTTCCGTCGAAACAGTCCCGACTGAGATGG	35	
40[41]	36[35]	CAGCCTTTGAACACATAGAGAGTAAAGGATTAAG	35	
40[97]	41[97]	TGGCCTTGATATAAATAAGTCAATCCCGAACCGAGCC	42	
43[32]	48[38]	CCACCCAGCTCAGATATAGAGGATCGTAGGAGCTGCTGT	42	
43[60]	36[66]	AAATAATGCAAGGACCAAAATATAAAGCCAAAGCACATAA	42	
43[130]	41[122]	GTCCAGCATTAGGAGGAGG	21	

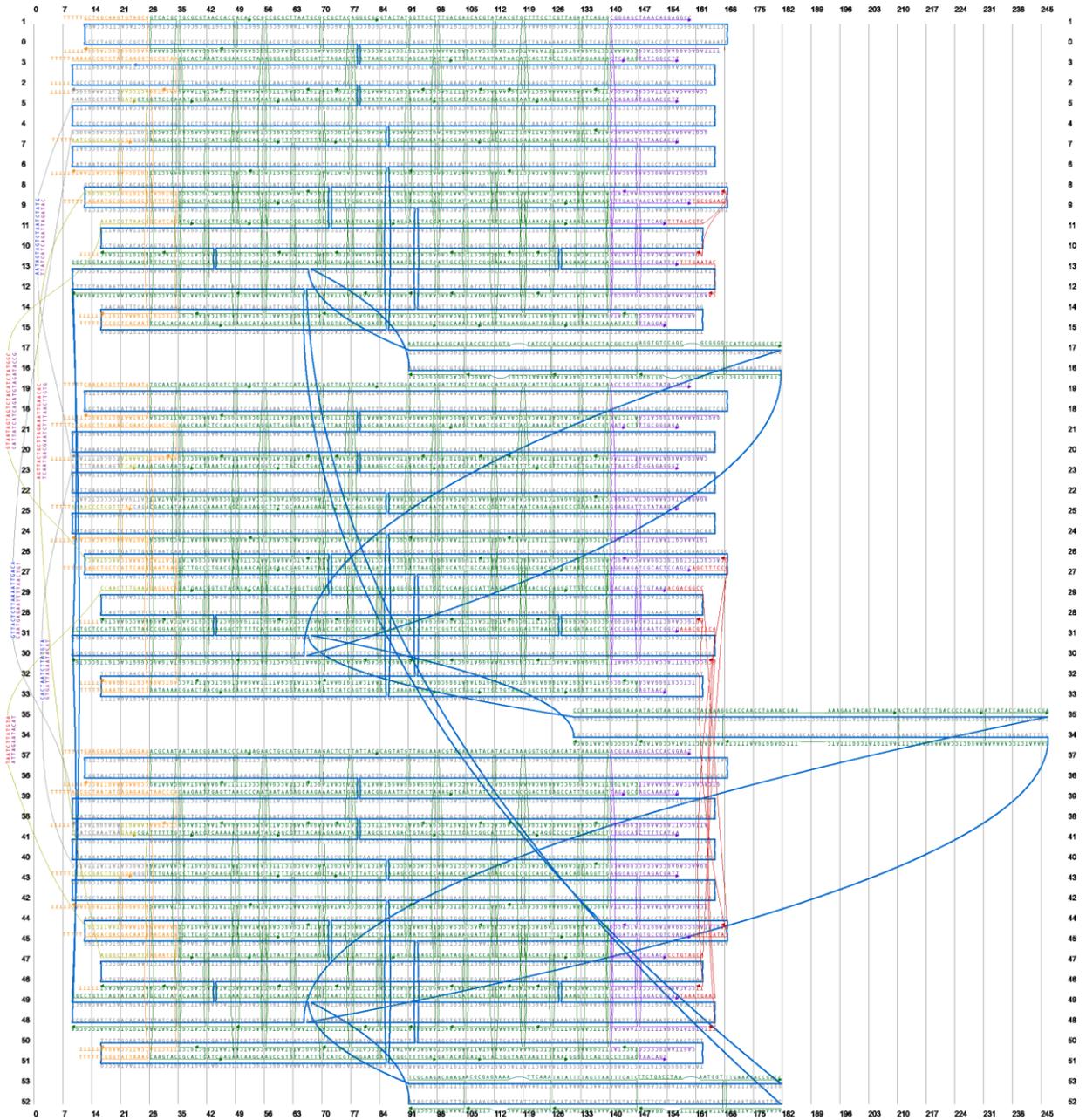
◆Cubeに使用する Staple Strands のシーケンス情報-2

42[51]	48[59]	TTAGTATTCTAAGAACGAAGCAAGTAAATCGGCAAC	35	
42[72]	48[70]	TTTTTTTACGGAACCTCAGTACCGCATTCCACGAGGTGAACGAAA	45	
42[90]	45[73]	AACAGGACTTCGGATCCCAACAACTACAACGATTCCT	39	
42[114]	49[125]	GGCCCTATTCTGAAAGATAAGTTCAGAGCCAAAAGGTGGGT	45	
44[51]	51[45]	GCCCAATCAACCGTTTTATTCTTTAT	28	
44[107]	39[101]	TACATTAAAGCAGGTGCGGATACCCAGCGGTTAAAGG	42	
45[74]	43[59]	TATCACTCATCGAGAACCAGCGGTGAAGCCTTAAATCAAA	42	
47[39]	36[45]	AGTGCATTTAAAGTGGCAACATCTGG	28	
47[102]	38[115]	TTAGCAAAATCAATAGAAAATTCATCCATTTGGAAAGCTCACCAATATAG	49	
47[130]	42[136]	CTTGGCAATTCACCTCAGAAACCCCGCCTCTGAATGGTA	42	
46[121]	38[136]	TATACAGGECGCAAAAGTATGALCTCGATAGCAGCACTTTT	42	
49[49]	38[84]	GGTCTGAAAGCAACACAGACTTTCATA	28	
49[126]	43[129]	TAGAGTGAAGATAGCCAAAAAAGGCTTTAGTAAAGCCACGCA	46	
48[37]	48[49]	ATATTAACAACGCCAACATGTATTGATTTGT	31	
48[48]	40[42]	ATCATCGTAGAAACCTGTATTTCGCAAAATAG	35	
48[58]	38[66]	GGAGTAAATTTTCATCTCTTTTCATAAAACACC	35	
48[69]	41[59]	CAAGTACTGTCTTGTTCAGCCAGCATTTTTGTAAACGTCGAGG	46	
48[90]	42[91]	TTGCTTTAGACCGGACCGATCTCACAACAAATCCGTATA	42	
48[100]	38[108]	GTTCTTTTAAACCTCCTGCTGATGCGTAAACCTT	35	
50[104]	51[104]	TGATTAAGTATATTAAACCACTTAATGCCCTCCCTATT	42	
51[46]	47[38]	CCGGTTCATTTTCGAGAGCCTAATCAACAGTAA	35	
51[109]	47[101]	AACTTGAGTAAAGTGCAAATCCTCACTGAGATAG	35	
51[130]	46[122]	AAAAGTTTAAACGGGTGGAAAGATAGAAAAGTTTGTAAAC	42	
53[134]	52[134]	AATTTAAATGGTTGAATTTATCAAAA	26	
52[147]	53[147]	ACCGTGAGAAGGTCAATAGTGAATACCCAGCCGTGTGATAA	42	
52[188]	53[188]	ATAGCGATAGCTTAGATTAAAGTAAAGCGCTTAAATAGAATA	42	
52[209]	53[209]	TCCCTTAGAATCCTTGAACAACACCCGAAATCATAATTA	42	
52[221]	53[221]	ATTAAATTTAGAAAAGCCTG	24	
9[166]	3[156]	GTAGCAATCTCTTGTATTGAATGGAT	30	Connector 特産
1[163]	5[156]	CGAGTTCACGACCTCGCCCTAA	23	
4[163]	3[143]	GAACCACGACGAAGATAAAACATAAAACACGACCAAAATC	42	
7[137]	12[143]	CCCGTTATCTCGACAACTCGTAAAGTTTGAATCCTACCT	42	
6[163]	10[143]	CAACAGTTGAAAGGATTTGAGGATCAATCAACCATATAGTTACATACC	49	
8[166]	7[156]	TATGAGGAGGTAGAACCTATATCTGGTC	30	
10[142]	11[159]	TGAAAGGCTGTGCATTCGCA	23	
10[160]	11[153]	TTATCATTTCAATAATCGC	21	
12[142]	13[156]	TTTTATCAAGAAAAAATTT	20	
12[163]	9[159]	ACATTTTCATTTGAATTTGTTGTTGGATT	30	
14[160]	15[153]	GTTTAAATTTTAAATACC	21	
18[166]	21[156]	ATCAATCTCACTAATAGTAGTATTCAACG	30	
20[163]	23[156]	ATTTTAGAACCTCATTTTGAGAGA	27	
22[163]	21[143]	TATCAGGTTCATTCGCTGAGAGCTTAGCTATATATTTAAGC	42	
25[137]	30[143]	AGCTGTTAAATAACAACCCGTGGTAAAGGGCAAGCTAGA	42	
24[163]	28[147]	TTGTAATTCGCATTTAAATTTAAATTTTTCGCATGACGGCCGGA	49	
26[166]	25[156]	GAACCACGCAAGCGCCATTTAAATTTGATA	30	
28[142]	19[159]	CGGTTTCATTTGGGCGCGAGCT	23	
28[160]	29[153]	GTGGAGCCGCCAGAGTGCCA	21	
30[142]	31[156]	CCTTGAACGTCAGAGCCAT	20	
30[163]	27[159]	CCGGAATTTGTGAGAGTTTCGGCCACCCG	30	
32[160]	33[153]	CGCGGATTCGACGATTTCTCC	21	
36[166]	39[156]	AAATATTGACGAAATTTAGTTCAGCAGAG	30	
38[163]	41[156]	CCCTTAGCGTCAAGCTGTAGAGCCAC	27	
40[163]	39[143]	CCGACCGAGAACCAACCCAGAGCCACCTAGCGGGTAA	42	
42[135]	48[143]	ATAGTATTAGAGGCTGGGTTTTCCTCAGAAA	35	
42[163]	46[143]	CTTTGATGATACAGAGTGTACTTTACCGTTTTACGGTTAGTAACTT	49	
44[166]	43[156]	CCTCAGAGCCACCACCTCATCCAGTAAAG	30	
46[142]	37[159]	TCAAGGACTTCAACCGATTGAG	23	
46[160]	47[153]	GATTTGCTAAACAAATGAAT	21	
48[142]	49[156]	TCTAAGGAACTAAAGG	20	
48[163]	45[159]	ATAATTTTTCAGCTTGAACGCCACCCCTC	30	
50[160]	51[153]	ATTAGGATTCGGGAGCTCC	21	
7[24]	38[9]	GGGGTGGTTCCCCGAGCGGCTCCTACTAATCTGATGAAAGCCATAGATAGCAATA	47	Vertex bundle
3[24]	5[9]	CCAAAAGCTTAAACACTCAGCAAAAATTCATGAAATCGTTTTGTCGAAAGGSE	43	
43[24]	30[9]	CGGTGAATACATAAAAACAGGAAATGTCGATATCAGAAAACGAGAATGGCTTCAAG	47	
7[9]	41[24]	TTTTTAATCGGCCAACGTCGCGGCTCCTACTAATCTGATATATAAGTACCCGAAAGAA	44	
25[9]	5[24]	TTTTTAGAGCAGGATAATCATTCAAGTCAAAAATTCATCAATGTTAAAGGCTTCA	44	
43[9]	23[24]	TTTTTTACCAACGCTAAAACAAGAAATGTCGATATCAGACAGTGAACGGAATTCGA	44	
		CACTCAGTATAGTGA		Vertex bundle 相補鎖
		CAATGAGAATTTTGC		
		CTAGATATCGACATT		
13[157]	12[164]	AAATACATTTTA	11	short connectors
31[157]	48[164]	GTTTACCAGTA	11	
49[157]	30[164]	AATTCGCAATC	11	
9[160]	10[161]	ATACCTCTGAA	11	
27[160]	46[161]	TTCTGGTGGG	11	
45[160]	28[161]	AGAACGCCAG	11	
11[154]	8[167]	GCAGAGCCGAA	11	
29[154]	44[167]	AGCTTTCAGAC	11	
47[154]	26[167]	TTTTCTGATCG	11	
7[157]	2[164]	AGTTGGCAATG	11	
25[157]	38[164]	ACGTTAATATG	11	
43[157]	20[164]	GTCAACATAA	11	
5[157]	4[164]	AAATACCGAAC	11	
23[157]	40[164]	TCTACAAAGAG	11	
41[157]	22[164]	CACCTCAGGC	11	
3[157]	6[164]	TATTTACATAT	11	
21[157]	42[164]	CAAGGATAGG	11	
39[157]	24[164]	AATCAAGTTT	11	
15[154]	0[167]	TTTTCCCGATT	11	
33[154]	36[167]	GTGGAAACAGT	11	
51[154]	18[167]	TCAAGAGAAGC	11	
1[160]	14[161]	AATTAACCGAC	11	
19[160]	50[161]	GAAAAGTGGG	11	
37[160]	32[161]	GGAGGGAAGAA	11	
9[12]	7[23]	TTTTTCAGATTGCGCGGGCTCTGTGGCCG	25	Vertex polyT cover
15[16]	6[9]	TTTTTCCGCTCACAACTCGTCCAGCTGCAATTAATGTTTTT	31	
38[30]	50[16]	AAAACAAAAGATAGATAAATTTACGAATCATTACCGCCGCAATTTTT	43	
36[34]	48[14]	ACTCCTTCATACATCGACCCACCCATATAATTTGTGCGAAATCCGCGACTTTTT	49	
49[14]	46[16]	TTTTTTCTAATTCGAAATCGTAAAGAAATTTTT	26	
45[12]	63[23]	TTTTTAATAATATCCATCCTAGCTCGCA	26	
51[16]	42[9]	TTTTTTAGCAAGCAATACAATTTATCCTGAATCTTTTT	31	
37[12]	38[31]	TTTTTGCAAACGTAGAAAATTAATACGCCCTTTTTAAGAAACAAG	41	
39[9]	36[12]	TTTTTATCTTCCGAAAGATATGTTATTTTT	21	
30[31]	52[16]	TTTTTGTACAGCTACAGACGAGAGAAAATCTACGTTAATATTTTT	46	
18[34]	30[14]	TGTAGCTTGTCTGGTGAACCAATTTAGCCGCGTTCGCGTATGAGCCGGGTTTT	49	
31[14]	28[16]	TTTTTCTGCTCCATGTTACCTTTGAAAGAGGTTTTT	26	
27[12]	25[23]	TTTTTGAATAGGCTTGCCCTAAGCTCGAAA	26	
33[16]	24[9]	TTTTTAAACGAACTAACATCATACCCCTGTTACCTTTTT	31	
19[12]	20[32]	TTTTTGCAACTAAGTACCGCAACATGGCAACTCAACGCGGG	36	
1[12]	2[31]	TTTTTTAATGCTGCTTTCTCTGCTTTGTGACGGAAGGAGGAGC	41	
21[9]	18[12]	TTTTTACCAGCCGAAATTTAAATATTTTT	21	
2[30]	14[16]	TGGGCATGAGTGCACGTTTTCATTCCTGTTGAAATGTTATTTTT	43	
9[34]	12[14]	CTATGGTGGTATGATTAACCTCGCTGGTGGAGCCCAAGCTCAACAGTAGGGTTTT	49	
13[14]	10[16]	TTTTTGTAGTTCGCTGGGTTGTTCAAGCTTTTT	26	
3[9]	0[12]	TTTTTAAAACCGCTCAACGAGCAGTTTTT	21	

◆Pentagonal Prism に使用する Staple Strands のシーケンス情報-1

開始点	終了点	シーケンス	シーケンス数	備考
1[53]	2[45]	CCCAACCCGAAAGAAAGTACCTGTCC	28	Pentagonal prism main parts
1[84]	10[73]	AGT GAGGAAACGCT CAT GCGGCTACTAGT GT TTTTGGT	39	
0[44]	11[52]	CGTCCACACCCGCCAACAGAGCAG	28	
3[102]	12[91]	AATCCATTGCAACAGCCACCGAGGACTTGGCGTCCCTTAGAA	45	
3[144]	11[129]	CACTATGGCGCTTGTGTAGCAAAATTAATACATTCGATTA	42	
2[44]	6[52]	ACTAAAATCCCTTATAATGAGGACGCCAGGCTGC	35	
2[65]	7[73]	TCCGAATAGCCCGAGATTGGCCCTCACC	28	
2[72]	1[83]	GTGCCAACGGATTGGCGCTCAGCGTATAATC	31	
2[93]	12[101]	GAATTTGAATGTACCTTTCTCATCAATATAAATTT	35	
2[107]	6[115]	CAGAACATCGGCATTAATAATGAATCTGGTCAATA	35	
2[114]	15[108]	CGTTCGGCATCAGATGTGTTGSAATTCCTGATATCAGTAT	42	
2[135]	15[129]	TGAATTTCAAGTAGATTAATGAAAGGACGGAAATACGTT	42	
5[25]	7[31]	GTGGTTCGATCCACCGAGAG	21	
5[60]	1[52]	AAAAATTTGGGCGCTTATTGACGAGCACGGTGA	35	
5[123]	10[115]	ACCCGCGTAAGTATTTACCCGAAACAATATACCATCACCATC	35	
4[41]	0[35]	CAAGCGGAATCGGCATTAAGCGCGTAAGCTTTCC	35	
4[97]	5[97]	ACCTTCTGACAAACAGCTGAGTTTAAATGGCGAACTGATA	42	
4[135]	14[143]	CGCCGATGAGGATTAAGAAATTTAAAGTTTCCAC	35	
7[32]	12[38]	GGCAACCTGTCCACAACTACTAGCTGTGGTCAATGAG	42	
7[60]	10[59]	TTACGATCCGCGGTGCTCAG	21	
7[74]	12[80]	AGTACATTAAGGGTGCCTAATGAGGAGATCCGCGTCCAAAC	42	
7[109]	3[101]	ATAAAATCTAAAGCATCGCCCTAAACAATAGCTC	35	
6[51]	9[59]	CCGAAGCATAAAGTGTATGSAATCCAG	28	
6[90]	14[70]	ACTTTACTACTCGAGAGGGGGAACAATCTTGTCTTCCCGGGT	49	
6[114]	12[122]	CATATCCTTTGCCGAATCATATTAACGTAA	42	
8[65]	5[59]	CAGTTCTTTTACCAGCTGCCCATCA	28	
9[60]	2[66]	CACCGCTCAACCGCTGGTGTGGTCTGGCGTGCCTTGT	42	
9[130]	5[122]	GAATTTCAAGAAATCAATGAGGACGACGCAAAAT	35	
11[39]	0[45]	CGGACATCCCTTTAGACGGAACATAA	28	
11[53]	15[45]	CCAAAGCGAGGTTCTGCGTAAATCATGGTCAGAGC	35	
11[88]	2[94]	TGCTGGCTATTAGTGGGGGAAATACCTCATTTTGACTTTT	42	
11[130]	4[136]	TTCCTGAAATGACGAACTTCCACGGCA	28	
10[58]	2[73]	CAGCAAACTCGAAGATGTTGCATGCGCGCTACAGTTGA	42	
10[72]	11[87]	GCTCTGATTCGGCTTCGGCAACGTAAGAACTGAT	35	
10[100]	2[115]	TGCGTAAAAGTCTGTCCGCGCGCTGTAATGATAATA	42	
10[114]	7[108]	CTCTCGCTGGTGCCTATAATATCTGATAATATACATCA	42	
10[121]	2[136]	GCAGCAAAATAACCGTTGTAATATTGGCAGTTCACCTTC	42	
12[37]	12[49]	AATGCTCGTATTGCAAGCGGCAAGAGTGG	31	
12[48]	4[42]	GCTTAATACGGTGTCAAGTATTGGGTTGCGAG	28	
12[79]	8[66]	ATAGCGTAGCTTACAAGCTGCCGCT	28	
12[90]	6[91]	TGCTTGAAGGCTTACATCGCTCAAATCAAGTATTAG	42	
12[100]	2[108]	TCCGTTTTTGTCTCGATACGGTACAAAAGGCA	35	
12[121]	9[129]	ATCCAAGCTCGTAAACAATTTATATAACCTTCTTCTTCT	42	
14[69]	7[59]	ACCGAGCAAGCTGTTGCGTTGCGCTCAGTGG	32	
15[46]	11[38]	CGGCTTTCAGTGGGAGTTTCCGGCGCGCATGC	35	
15[98]	15[97]	ACAATCGATGATGCAAACTTCCACAGTTTGACAAACAATTCG	42	
15[109]	10[101]	TAAATGAGGATTAAGAAACCTCAAGTAAACAACCAAGTAAAG	42	
15[130]	10[122]	ATTAGCGCTCAATAGATGATGGCTTAAACGGGCGACAGA	42	
17[130]	16[130]	GTGCCATCCACGCAACAAGGGTAAAGTTAAACG	34	
16[167]	17[167]	CACAGGCGGCTTAAAGTGTGCAAGCTACGGCTGGAAGTGTG	42	
16[188]	17[188]	AAAAATCCGCTAAAAAAGCCGACAGCTCAGCGGGGCTTATGC	42	
16[205]	17[205]	GTGTACATCGATTAAGGGGCTTTCGCACTCA	34	
19[53]	20[45]	GAGCAACAACCTAAGAGGATTAATCGA	28	
19[84]	28[73]	TCCGCAAAAATCGGTTGTAATTAATGCTCCATTAAGTACG	39	
18[44]	29[52]	TTTTTTTGAAGAGGTTTAAATCTT	28	
21[102]	30[91]	TACCAGAGCATAAAGCTTGGTCAAGTTTCCAAACGATTCGCTC	45	
21[144]	29[129]	ATTACAGCAAGGCAAAAGCTGAAAGAACTACAGCTTGCCA	42	
20[44]	24[52]	GCTAAGCAAAAGCGATTCTCAAAATAGTAAACACT	35	
20[65]	25[73]	AAAAAAGATTAAGGAGATTAATATAGC	28	
20[72]	19[83]	AGACAAGTGGGTAAAGGGTAAAAATACATT	31	
20[93]	30[101]	CCATTTCCAAAGGGGAAAGCGCTCAGGAATTA	35	
20[107]	24[115]	AGAGCGGAGAGGAGTGTCAATCAAGCAAAATTA	42	
20[114]	33[108]	AGSAAACAGCCCTATTCTCAGCCAGTTTGGGGGACGAG	35	
20[135]	33[129]	AAAAATTCAGAGCGGATCCGCTTCTCGCATCGTAAACCGTCTCC	42	
23[25]	25[31]	CTGACTTAAAGAAACCAAGT	21	
23[60]	19[52]	CAATATCGGCAATTTTATGCTGTAGCTCAAGAC	42	
23[123]	28[115]	TTTTAAGGGTGCCTTATCAAAATTAAGCAATATATTTTAAA	42	
22[41]	18[35]	ACAGTCTAGTCAAGTCAAGCTTCTCCTAAATAT	35	
22[97]	23[97]	TGATAATCAGAAAGGATCGTCACTCAACCGTCTAGCTGATA	42	
22[135]	32[143]	AATACGTTAAACAATAGGGGAACAACGGCGGAGAT	35	
25[32]	30[38]	TTTCCAGACGAGTTCATCAGTTGTAAAAAGGGCTTGAGAGC	42	
25[60]	28[59]	TTTCAACGTAAAGAACCCGA	21	
25[74]	30[80]	GTACAGGGGAGATACATAACGCTTATACCTTATGGCCA	42	
24[51]	27[59]	ATCGGAATACCCATTCGGGAGAACT	28	
24[90]	32[70]	GCTTTAAAGGAATCAACTGCAAGGCGATTATTTGAATACCAAGTCA	49	
24[114]	30[122]	TCCCAACCGCTCGGATGCATCTGACGCTTTCGCA	35	
26[65]	23[59]	AAAGCATGATTATTGAATCCCGCAT	28	
26[107]	21[101]	CAGATTTGATATATGACCCCGTAAATTAATCAGTCAAGTAA	42	
27[60]	20[66]	TTACCGCGGAAAGAAATACAGATTTGCCACTGATATTTCTTC	42	
27[129]	23[122]	GACCGTGGGATTTGACGTAACCTAGCATCTAT	35	
29[99]	18[45]	TCAAGCAAGATTCGAATCTGCGCTG	35	
29[53]	33[45]	GACAACAAGTAAATTTCAAAATCTACGTTAAAGAT	35	
29[88]	20[94]	GGTCAATATGATTCGCGCCAAAACATATGACCCCTATCA	42	
29[130]	22[136]	AGCGATTCAATGAGAGATCTACAACGGT	28	
28[58]	20[73]	AGGTAGATTTAGTTTGAAGAATAGCGGATGGCTTAGACGAA	42	
28[72]	29[87]	TAAAGTCAACCTCAGCAGCGAAAGTTAAACGCCAG	35	
28[100]	20[115]	GAATTAACCTGTTTACGTAAGCGCTTTTGGGGAAGAGAA	42	
28[114]	26[108]	GACCAACGGCAGCGGATCAAAAGCATCCAAACGC	35	
28[121]	20[136]	GACCATTTGGGCGGAGAAATGTTCAACGCAAGGATAGGT	42	
30[37]	30[49]	CGGACTTTGAAACGAAAGGACGCGGTT	31	
30[48]	22[42]	GCGGTATGATGTTTCTGCTCAGGGTAAAGCTTAA	35	
30[79]	26[66]	GCAAGTTGGGCGTATCATCATTGACCC	28	
30[90]	24[91]	ATTTGGCCGATTTATGTTGCTGCAAGCCCAAAAGTAGCCA	42	
30[100]	20[108]	ATTCGGAAGAGGAGTGTGTTGAGGTTGACCGG	35	
30[121]	27[128]	GAATACAGAGCGCCATGTTTACCACGAAAGAGAGCCG	41	
32[69]	25[59]	GGAGCTTAACATAATCATAGTAAGACAAATGT	32	
33[46]	29[38]	TTAATACCCCTGTTAGCCAGAGTTCAGTGTCA	35	
33[98]	33[97]	ATGTGAGCGACGACAGTATGAACCTGGCTCCCATCAACATTA	42	
33[109]	28[101]	TAAAGCTTGGCTTCTCAGGAAGCTGGCGAGTCAGCATGAG	42	
33[130]	28[122]	GTAAAGCCCTCAAAAATATTAAGCTCTTGGCCAGTGTAG	42	
35[132]	34[132]	TAAAGACTCATCTAGGCGCTTTTGGCG	30	
34[224]	35[224]	TAGTTGGCGGCAATAAATTTGTCGAAA	30	
37[53]	38[45]	CACCGACCGTGTATCAGAGCACACAAG	28	
37[84]	46[73]	AATAGAAGCACCATACCAAGGAATACCCATTTGTAAAT	39	
36[44]	47[52]	CTTAGTTACCAAGGAATAAGAGATAA	28	
36[65]	38[73]	GAAAGAAACGCAATAAAGAA	21	
39[102]	48[91]	AATCAAAATCACAGTAAATTCATGTTAATTTGTAATCGAGGTG	45	
39[144]	47[129]	ATCTCACCGTCAACCGTCAACGGTGAAGATTAAGAAACGTTA	42	
38[44]	42[52]	AAAGAGGATTAAGGCAAGCTTCAGCCATTTT	35	
38[65]	43[73]	AAGTCAGAGATAACTCAAGCTCTCCA	28	
38[72]	37[83]	TTGTGACAGACCCCTCTGACCTCACAACT	31	
38[93]	48[101]	AAAGCGTAACCAACTCAAGTATCACCGTACTTCG	35	
38[107]	42[115]	TCTAGAGCCGCCACTAGCAGTTCGAGTCAAG	42	
38[114]	51[108]	TTTTGCTCTTCACTGAGGTTTGTGATATAAGTATAGTCTG	35	
38[135]	51[129]	GTCAATGATATAGSAAACCGCGATAGTGGCGTGGAGG	42	
41[25]	49[31]	CACCTGAACCAATAAATTT	21	
41[60]	37[52]	ATACCAATAAACCGAGCTGGCATGATTAAGAGA	35	
41[123]	46[115]	ACCCCTTATTCAGCACCCATTGGGAATACCAAGAAACT	42	

◆ Hexagonal Prism



◆Hexagonal Prism に使用する Staple Strands のシーケンス情報-1

開始点	終了点	シーケンス	シーケンス数	備考
1[53]	2[45]	CCGAGCGTGGTCTGAAGTACCTGTCC	28	Hexagonal Prism main parts
1[84]	10[73]	GTACTATCCATACCGAAGCGGGAAACCGCTACGCG	39	
0[44]	11[52]	AGGAATCGGAACCTAAAAAAGAGCAG	48	
3[102]	12[91]	TTTAGTAAAAAGTCTGGTGTGAGCATGATGCTGAAACATC	25	
3[144]	11[129]	AACCGAATCCTGAGATCAGAGCTTTACATCGGTTAAAT	42	
2[44]	6[52]	ACTAAATCCCTTATATGAGAGAGCGAGCTGC	35	
2[65]	7[73]	TCCGAATAGCCCGAGATTTGCCCTCAC	28	
2[72]	1[83]	GTCCGAATATGAGAGCGGAACGAGCGC	31	
2[93]	12[101]	AATACCTACCATCCTGATCGACAACCTCGTATATGA	35	
2[107]	6[115]	ACATCACACGACGATCTTTAACCCAGCTGTC	35	
2[114]	15[108]	AATTGCACGTGATGGCTTTGCCGAGTATFAGACTTCAA	42	
2[135]	15[129]	AACGAAATGATCATATTTAAAAGGATAATACATTTGAGGAA	42	
5[25]	14[39]	GTGGTCCGATCCACGAGGCGGAACCTGTTCCACCAACACTAG	48	
5[39]	10[31]	GGCATTAAAGAGCCTGAAGAAAGCGAAAGGTCACGCTTAC	42	
5[60]	1[52]	AAAAGTTGGAGGAGCGAACGTCGCCGAAACAC	35	
5[123]	10[115]	AAGAGCCTCATCACTTGTATATCAAGTGAAGCTGTCGC	42	
4[97]	5[97]	GCCCTAAACATACAGCTGAAGATTTTACATTTGCCAGAT	35	
4[135]	14[143]	TTTGTGAGGCTGAAAAATCTAAAAATCTGTCA	35	
7[60]	10[59]	TTTACGATCCGGTGCAGAC	21	
7[74]	12[80]	AGTACATTTAAGGGTGCCTAATGAGGAGATCCCGCTCCCAA	42	
7[109]	3[101]	CCATCGCGAATGATACCCAGTTTGGACCTC	35	
6[51]	9[59]	CCGAGCATAAAGTGTATCGAATTCGAG	28	
6[90]	14[70]	ATCAAAGCTAACGAGAGCGGATATACTTCTCTGTTCTTCCCGGT	49	
6[114]	12[122]	TGATGAAAGGAATGAGGATTTAGACGTTTAC	35	
8[65]	5[59]	CAGTCTTTTACCGCTCGCCCATCA	28	
9[60]	2[66]	CACGTAAAGCAACCGAAGTACGCTTGTACGGTCCCTGT	42	
9[130]	5[122]	ATTTCTGATAAAGAGTGAATGGCTATTAGATAA	35	
11[39]	0[45]	CGAATCCCTGCGCTAACCCAGCA	28	
11[53]	15[45]	CCAGCGCGGTTCTCGTAAATCATGTCAGAGC	35	
11[88]	2[94]	AGACGCTGAAATGGGGTATTAAACGTTGTAGCAATAGCTC	42	
11[130]	4[136]	AAAAGAAAGGACATCTGCCAATAT	28	
10[58]	2[73]	GTCCCGCTTAATGCGAGCCGGCCCGCATTTAGAGCTTGA	42	
10[72]	1[87]	CAGTGATGAGGGTAAAGTAAAGCTCATAGGT	35	
10[100]	2[115]	CAGTTGACGAGCAGTACGCCCGGATAGTAAATCAATCGGA	42	
10[114]	7[108]	TGAAACCGGAGCAAAAGAGATGAAATCCAATTCATCGAA	42	
10[121]	2[136]	TCCGTTCTCGTGAAGTGTCTGAGTGAAGAAATTCG	42	
12[48]	5[38]	TTAAATAACCGGGTGTCACTTTGGGGTGCAGCAAGCGGAATC	46	
12[79]	8[66]	ATTAATACATTTAGTGGCTGCCGAT	28	
12[96]	6[91]	AAGAAAGTGAAGCTGTTTGGCGCAATAAAAACCCCTCA	42	
12[100]	2[108]	AACATGCCGTTCCGGCCAGCTCAATTAATTC	35	
12[121]	9[129]	CTGGTCCGTTTGGAAACAATAAATTAATTCATTTCAAATTA	42	
14[38]	12[49]	CTGCGGTATAGAAATAGCTCGTATGTCGGTCAAGCAAGGCG	46	
14[69]	7[59]	ACGAGCAAGCTGTGCGTTGCGCTCAGTGG	32	
15[46]	11[38]	CGGCTTCCAAGTGGGAGTTTGCAGCGGCTATGC	42	
15[98]	15[97]	TGCAAAATACAAACAAATCTCCACAGTTTGTATCTGGTCAGT	42	
15[109]	10[101]	CAGCTCAATATCAATACCGCAATATAATATCAAGCG	42	
15[130]	10[122]	GGTCTAAAGCATCAAAAGATATAGAAAAACAGCGTC	42	
17[91]	16[91]	AATGCCAACGCAAGGCAAGCGGCTT	28	
17[105]	16[105]	CACCGTCGGTGCATCCAAAAATCCGCTAAAGCC	34	
17[126]	16[126]	ACGCAACGAGCTACGGCTGGCGGTTGTGATACATCGACATAA	42	
17[147]	16[147]	AGGTGTCCAGCGCGGGCATTTGCCCGGTTGGG	34	
16[181]	17[181]	CTTAATTTCTGCTTATTCGAGCGCT	28	
19[53]	20[45]	GTCTTTGAGGACTAAGGTTACTAAG	28	
19[84]	28[73]	TCTCGAATAGCAAAATTTCTTTGAAGTTGATGGGT	39	
18[44]	29[52]	TAGCTCAACAGGTGAGAAAGATAGAC	28	
21[102]	30[91]	AAGAGCAAGGCAAAAGCAAGTACGAAAGAAATATTCGAAAA	45	
21[144]	29[129]	CTTATTTACTAATAGTGTCAATAGCGCCACGGGACCGG	42	
20[44]	24[52]	AGAAATCAAAAATCAGCAATACCGGAGGACAT	35	
20[65]	25[73]	GATCCGTGACTATTAAATGTTGTGTT	28	
20[72]	19[83]	CAATGAGCGCAGCTGGCGAAGCATCCCAAT	31	
20[93]	30[101]	AGAGGATGTGCGATCGAATTAACCGTGCATCGCTC	35	
20[107]	24[115]	TAACTCAATATGATATAAACAAGGTTGATAAATC	35	
20[114]	33[108]	GCCAGTTGGGCTGCGCATTTGAGGGTCAAGTGGTGTAGGGCC	42	
20[135]	33[129]	CTCTCCAGTAAAGCGCCGCGCTCGATGACCCGTAATGCATC	42	
23[25]	32[39]	AAAAGAGAAAAATTTGACCGATCGAGGCAATAAAAAGCAATTTA	48	
23[39]	28[31]	CATAGCCCGAAGCAAAAGCTTAATTTGATGCAACTCATA	42	
23[60]	19[52]	TTATGCATCAGATAGATCATTTTGGCGATGAA	42	
23[123]	28[115]	CCGTAAATGCCAAAAATTAACATCCAATAAATAGATCGGG	42	
22[97]	23[97]	GTAATCGTAAATAATAGTAAAGTAAAGGCGCGGAGACGTC	35	
22[135]	32[143]	GCCAAAAACAATTTGCAATTAATGTGAGCGAAGC	42	
25[60]	28[59]	TGCAAGAGTAGCGCATAAACAG	21	
25[74]	30[80]	TGCCCAATATTTATCATAGTGTAGAAATCATTTGAGACAGA	42	
24[51]	27[59]	AACACATTTATACAGGCGATTTCAAG	28	
24[90]	32[70]	CGCCATTAGGAATACAGAGGGCTCTCGCTATTCAAAATGGGGTGAATT	49	
24[114]	30[122]	AGCCTGTAGCCAGCTTTGGATAGGAGCAAGCTTTT	35	
26[65]	23[59]	ATCAAAGAAAGACTGATAGCGCTGT	28	
26[107]	21[101]	TTTACCCCGAGAATCGATGAACGAAATCACTGTGTAGCAT	42	
27[60]	20[66]	ACGGCATCATGAGGAAATTTACAAAAGGCTGGCTGGCAGCGG	42	
27[149]	23[122]	GTATATTGCGAAGCGCTGAGAGCTGTGGAGCTCAA	36	
29[39]	18[45]	AACGGTCAATAAAGTACGGTGTGCT	32	
29[53]	33[45]	CAGATCTGAGAAACACTAAGAACTGCTCAACGG	42	
29[88]	20[94]	GGGTCAAAGGGTGCAGCAAGCAATAAAGCTCAGAGGTAA	35	
29[130]	22[136]	TTTATATTTTCTAGCTATAAACAAT	28	
28[58]	20[73]	AGGTCAATCCATATAACTAAGAGGGAGTACCTTTAATTGAAG	42	
28[72]	29[87]	AGCACCATCGCCAGCATAAACCGGAGCATCGAAA	35	
28[100]	20[115]	CAGGATTTAGTTGACCATCATACCTAAATCGTTGTACAAT	42	
28[114]	26[108]	ATCTGAGGGGTGGTGAAGGGATATGCCAGTACTG	35	
28[121]	20[136]	TTGACATTTGCAAAATGAGTAGCAATATTACCCCTGTAACC	42	
30[48]	23[38]	GGCGCGCTGACGCAAGCAAAAATAGTCCGGAATCGTATTGAC	46	
30[79]	26[66]	AACAGCGGATCAAAATCAGTAGTACTTC	28	
30[90]	24[91]	AGAGCGTGGTTTATCGGGCGGCTAGCATGTCAAATAGGAA	42	
30[100]	20[108]	TGACGTCGCTGAGGCTGTCAACCGCATTTATGAG	35	
30[121]	27[128]	TCCAGTTAAAGAGCGAATAACCTCTGTGAGGATAGACACA	41	
32[38]	30[49]	TACCGCTTGGCTGTGCGGAGGCGGAGACTTTTCAATCCGCC	46	
32[69]	25[59]	ACCTTATTAGAAAGCAACTAATCGAGATCTTT	32	
33[46]	29[38]	AACGCCAAAAAGAAATAAAAACCGGATGATG	35	
33[98]	33[97]	CGGCTCTAGGGCGCATCGTTCAACTTTATTAAAAAATTAAT	42	
33[109]	28[101]	TTTCTATTTTAAACCATATATGGGAGGGCTGCAAGTCAAG	42	
33[130]	28[122]	AACATAAATTTTGTAAATCAGAAATTCAGGTAAAGCGCGCT	42	
35[131]	34[131]	CCATTAACCGGGTAAATGCCCGCAATGACA	32	
35[147]	34[147]	ATACGTAAATGCCACTACGAAGAAACAGCTTGTACCGGATAGT	42	
35[168]	35[209]	GCACCAACTAAAAAGAAAGAAATACACTAAAAAC	35	
34[209]	34[168]	AATTGTATCGGTTTATCTTTGAGGTGAATTTCTT	35	
34[230]	35[230]	AAGGCTCCAAAAAGGAGCTTTACTCATCTTTGACCCCAAGCG	42	
34[246]	35[246]	GAAAACTCCAAAAAATATACCAAGCGGCA	32	
37[53]	38[45]	AGATATAACTATATAACAAAGGAT	28	
37[84]	46[73]	CAGTATGAAAGTAAATATATAGCAATAGACTCCTAAC	39	
36[44]	47[52]	GAATGAGTTAAGCCCAAGCGGAGCA	28	
36[65]	38[73]	TCTAGCAAGAAACAATGAAA	21	
39[102]	48[91]	TGACCGATTTAGGGAGGTTAGCAAGGCTGATGAAAAAAGGAA	45	
39[144]	47[129]	GCCCATATGTTTACCAAAAAAGGAGGTAACGATCAGAGTT	42	
38[44]	42[52]	TAAATCAAAAATGAAATAGAGCTTATGTTCTAGA	35	
38[65]	43[73]	AAGTTTACAGAGGATAACTACTAC	28	
38[72]	37[83]	AACAGCCCTCATTTCCCTTTTATTAACG	31	
38[93]	48[101]	GAGCAAGCTCAGAAACAACTCTCAAGAAAAACA	35	
38[107]	42[115]	AATATCGCATTTTCCGCTCAGAAAGCGGCTCTC	42	
38[114]	51[108]	GCAGTACCGTCCACCTGATTAGCACATGAAAGTATTAGAGT	35	
38[135]	51[129]	CCATCACGAGTACTCAGTACCGGTTCCGAACTATTATAAC	42	

8. 参考文献

- J. D. Watson, F. H. C. Crick *Nature* **171**, 731-738 (1953)
- O. T. Avery, C. M. Macleod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* **79(2)** 137-158 (1944)
- N. C. Seeman, *J. theor. Biol.* **99**, 237-247 (1982)
- T. J. Fu, N. C. Seeman, *Biochemistry* **32**, 3211-3220 (1993)
- E. Winfree et al., *Nature* **394**, 539-544 (1998)
- C. Mao, W. Sun, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 5437-5443 (1999)
- R. Sha, F. Liu, D. P. Millar, N. C. Seeman, *Chem Bio* **7**, 743-754 (2000)
- Y. Zhang, N. C. Seeman, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1661-1669 (1994)
- P. K. Rothemund, *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 16344-16352 (2004)
- P. Yin et al., *Science* **321**, 824-826 (2008)
- W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **427**, 618-621 (2004)
- P. W. Rothemund, *Nature* **440**, 297-302 (2006)
- S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **459**, 414-418 (2009)
- E. Benson et al., *Nature* **523**, 441-444 (2015)
- B. Wei, M. Dai, P. Yin *Nature* **485**, 623-626 (2012)
- Y. Ke, L. L. Ong, W. M. Shih, P. Yin *Science* **338**, 1177-1183 (2012)
- W. Liu et al., *Angew. Chem. Int. Ed* **49**, 2700-2704 (2010)
- A. Kuzyk et al., *Nature* **483**, 311-314 (2012)
- G. P. Acuna et al., *Science* **338**, 506-510 (2012)

- B. A. R. Williams et al., *Angew. Chem. Int. Ed* **46**, 3051-3054 (2007)
- O. I. Wilner et al., *Nature Nanotech* **4**, 249-252 (2009)
- J. Fu et al., *Nature Nanotech* **9**, 531-536 (2014)
- E. A. Hemmig, *Nano Lett* **16**, 2369-2374 (2016)
- R. Chhabra et al., *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10304 (2007)
- S. Rinker et al., *Nature Nanotech* **3**, 418-422 (2008)
- F. A. Aldaye and H. F. Sleiman, *Angew. Chem. Int. Ed* **45**, 2204-2209 (2006)
- S. M. Douglas, I. Bachelet, G. M. Church, *Science* **335**, 831-834 (2012)

- A. Llorente et al., *Biochim. BioPhys. Acta* **1831**, 1302-1309 (2013)
- C. Subra, K. Laulagnier, B. Perret, M. Record *Biochimie* **89**, 205-212 (2007)
- G. Raposo et al., *J. Exp. Med* **183**, 1161-1172 (1996)
- A. Montecalvo et al., *J Immunol* **180**, 3081-3090 (2008)
- J. Wolfers et al., *Nat Med* **7**, 297-303 (2001)
- X. Xiang et al., *Int. J. Cancer* **124**, 2621-2633 (2010)
- G. Andreola et al., *J Exp Med* **195**, 1303-1316, (2002)
- K. Al-Nedawi et al., *Nat Cell Biol* **10**, 619-624 (2008)
- B. Casta-Silva et al., *Nature Cell Biol* **17**, 816-826 (2015)
- H. Valadi et al., *Nat Cell Biol* **9**, 654-659 (2007)
- N. Kosaka et al., *J Biol Chem* **285**, 17442-17452 (2010)
- D. M. Pegtel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **107**, 6328-6333 (2010)
- D. D. Taylor, C. G. Taylor, K. S. Lyons, J. Stanson, T. L. Whiteside *Clin Cancer Res* **9**,
- J. Skog et al., *Nat Cell Bio* **10**, 1470-1476 (2008)
- G. Rabinowits et al., *Clin Lung Cancer* **10**, 42-46 (2009)
- R. J. Brayton et al., *Br. J. Cancer* **106**, 768-774 (2012)
- J. Lotvall et al., *J. Extracell. Vesicles* **3**, 26913- (2014)
- L. A. Caciola-Rosen, G. Anhalt, A. Rosen *J. Exp. Med* **179**, 1317-1330 (1994)
- A. R. Beaudoin, G. Grondin, *Biochim Biohys Acta* **1071**, 203-219 (1991)
- M. Colombo, G. Raspo, C. Thery, *Annu Rev Cell Dev Biol* **30**, 255-289 (2014)
- D. K. Jeppesen et al., *J. Extracell. Vesicles* **3**, 25011- (2014)
- C. Thery et al., *Curr. Protoc. Cell. Biol.*, Chapter **3**, Unit 322 (2006)
- K. Iwai et al., *J. Extracell. Vesicles* **5**, 30829- (2016)
- A. Cheruvanky et al., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol* **292**, F1657 (2007)
- L. Chen et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun* **431**, 566-571 (2013)
- M. L. Merchant et al., *Proteomics Clin Appl* **4**, 84-96 (2010)
- S. S. Kanwar et al., *Lab Chip* **14**, 1891 (2014)
- C. Garidiner et al., *J. Extracell. Vesicles* **3**, 25361 (2014)
- C. Chen et al., *Lab Chip* **10**, 505-511 (2010)
- K. Kato et al., *Biotechniques* **35**, 1014-1018 (2003)
- K. Lee et al., *ACS Nano* **9**, 2321 (2015)
- K. E. Peterson et al., *Anal. Bioanal. Chem* **406**, 7855 (2014)
- S. Sitar et al., *Anal. Chem* **87**, 9225 (2015)
- Y. Yoon et al., *Sci. Rep* **6**, 26531 (2016)

- S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **459**, 414–418 (2009)
- H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science* **325**, 725-729 (2009)
- Y. Ke, L. L. Ong, W. M. Shih, P. Yin *Science* **338**, 1177-1183 (2012)
- Y. Ke et al., *J. Am. Chem. Soc* **131**, 15903-15908 (2009)
- S. Woo and P. W. K. Rothmund, *Nature Chem* **3**, 620-627 (2011)
- J. Howard, *Mechanics of Motor Proteins and Cytoskeleton* **6**, 110- (2001)
- F. Kilchherr et al., *Science* **353**, 5508-1-9 (2016)
- Keller et al., *Gynecol Oncol* **107**, 563-571 (2007)
- M. Fairhead and M. Hawarth, *Methods Mol Biol* **1266**, 171-184 (2015)
- 田中秀明, 加藤公児, 住澤知之, 山下栄樹., 生化学 第 83 卷, 第 5 号 392-395 (2011)
- R. P. Goodman et al., *Science* **310**, 1661-1665 (2005)
- W. M. Shih, J. D. Quispe, G. F. Joyce, *Nature* **427**, 618-621 (2004)
- S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **459**, 414–418 (2009)
- Y. He et al., *Nature* **452**, 198-201 (2008)
- H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science* **325**, 725-729 (2009)
- R. Jungmann et al., *Nano Lett* **10**, 4756-4761 (2010)
- A. Shaw, E. Benson, B. Hogberg *ACS Nano* **9**, 4968-4975 (2015)
- B. Yurke et al., *Nature* **406**, 605-608 (2000)
- F. Hausch and A. Jaschke, *Nucleic Acids Research* **28**, e35 (2000)
- Y. Ke et al., *Nature Commun* **7**, 10935 (2016)
- S. Rinker et al., *Nature Nanotech* **3**, 418-422 (2008)

謝辞

本研究の実施ならびに本論文の作成にあたり多くのご指導、ご鞭撻を頂き、本研究の機会を与えて頂きました東京大学大学院 分子医科学分野 上田卓也教授に深く御礼申し上げます。また同様に、多くのご指導、ご鞭撻を頂きました東京大学大学院 生命分子遺伝学分野 伊藤耕一教授、東京大学 分子細胞生物学研究所 泊幸秀教授、東京大学大学院 医薬デザイン工学分野 山本一夫教授、東京大学大学院 RNA 生物学分野 富田耕造教授に厚く御礼申し上げます。

また本研究の実施、本論文の作成にあたり懇切丁寧なご指導、ご助言を頂くと共に多くのディスカッションを通して生命科学とナノテクノロジー領域における技術開発の可能性と、研究者としての姿勢を示してくださいました大阪大学 蛋白質研究所 多田隈尚史博士に厚く御礼申し上げます。

そして本研究を実施するにあたっての礎となる DNA ナノテクノロジーに関する研究の機会を与えてくださり、多くのご指導を頂きました Harvard 大学 Wyss Institutes の Peng Yin 教授、Georgia Tech College of Engineering / Emory School of Medicine の Yonggang Ke 教授、Max Planck Institute of Biochemistry の Ralf Jungmann 教授、Johannes Wöhrstein 氏、 Thomas Schlichthärle 氏に深く感謝申し上げます。

その他、本研究を進めるにあたって数々の有益なご助言を頂きました東京大学 増渕岳也氏、JSR 株式会社、JSR ライフサイエンス株式会社の皆様方に深く感謝申し上げます。