

論文の内容の要旨

論文題目 **DNA Origami** による

エクソソーム捕捉システムの開発

氏名 飯沼 良介

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。エクソソームは細胞から分泌される小胞体内、大きさが30nm-100nm程度のものでされている。細胞由来のたんぱく質や核酸(mRNA や miRNA)を内包しており特に、がん、神経疾患、感染症、糖尿病等の疾患メカニズムにもエクソソームの関与が示唆されていることから、バイオマーカーとして実用化を図るべく盛んに研究がおこなわれている(Fig. 1)。

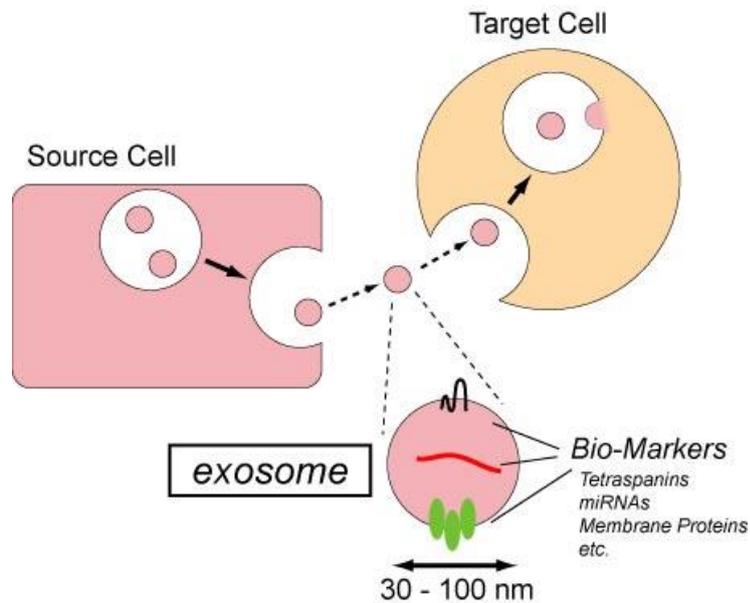


Figure 1. 様々なバイオマーカーを運び、注目されるエクソソーム

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。超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が本手法は煩雑かつ長時間の作業を必要とし代替手法が望まれてきた。エクソソームの新たな単離手法の一つとして磁気ビーズによる捕捉システムが開発されている。本手法ではビーズによるエクソソーム捕捉後、ビーズの集磁、洗浄の工程を確立されたシステムの中で実施するため従来のような煩雑、かつ長時間の作業を必要とせず超遠心法に替わる単離手法としての広がり期待されている。その他にもフィルター法、沈殿法が挙げられるが、ここに挙げたいずれの手法も長所・短所があり、精密分離できるシステムにはなっていない。

本研究では、精密分離を実現するために、ナノオーダーで任意に構造制御が可能な DNA Origami 技術に着目した。この手法では長鎖 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)。2006 年 Rothmund 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(Rothmund 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)。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)、たんぱく質(Streptavidin, ビオチン、抗体、酵素) (Williams et al., 2007)、アプタマー等 (Chhabra et al., 2007) 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)、色素導入による人工光合成システム(Hemmig et al., 2016)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。そこで、本研究においては 3D DNA Origami 技術を利用したエクソソームの捕捉手法を考案した。

まず、DNA Origami 構造体の設計と folding を行った。アガロースゲル電気泳動分析と透過型電子顕微鏡写真(TEM)による解析を行い、実際に設計した DNA Origami 構造体が高い精密性を持って構築されていることが示された。

本 DNA Origami 構造体を用いてエクソソーム捕捉に関する検討を行った。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した。

TEM 像から DNA Origami 構造体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い、HT-29 から調製したエクソソームサンプル、及び磁性粒子により捕捉されたエク

ソソームサンプルの粒子径分布との比較を行った。その他アガロースゲル電気泳動により DNA Origami 構造体によるエクソソーム捕捉の速度論的解析を実施した。さらには異なる構造特性を持つ DNA Origami 構造体を作製しエクソソームの捕捉挙動に及ぼす影響についての解析を行った

次に、エクソソームよりもさらに大きな物質の捕捉を目的として DNA Origami 構造体のスケールアップに関する検討を行った。DNA Origami は使用する鋳型 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 構造体を構築する手法の一つとして DNA Origami 同士をさらに結合させ目的の構造体を構築する系が考えられる。特に 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。過去に DNA Origami 同士をコネクター Strands により接合させより大きいサイズの DNA Origami 構造体を構築した結果が報告されているがいずれの手法も目的構造体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。そこで DNA Origami motif をお互いに接合させ種々 Polyhedra 構造 (Tetrahedron, Triangular Prism, Cube, Pentagonal Prism, Hexagonal Prism) を構築する方法を検討した。

検討の結果、DNA origami motif 間を繋ぐコネクターの接合力が重要である事が判明し、motif 同士の誤接合を防ぎつつ、目的の Polyhedra をより高い収率で構築する適度な接合強度を持つ手法(新規コネクターデザイン)を設計した。過去に DNA Origami 構造体を結合させるために検討、報告された従前のコネクターは DNA Origami 構造末端に 28 塩基でハイブリダイゼーションし 2 塩基分の sticky ends を保持する (Dietz et al, 2009)。本研究においては従来よりも動的なハイブリダイゼーション挙動を示し、それにより DNA Origami 同士の誤接合を抑制し得るコネクターデザインとして 9 塩基分で DNA Origami 末端にハイブリダイゼーションするコネクターデザインを採用した。

設計したコネクターの性能を検討するためまずは、作成における難易度が高く作成が比較的困難とされてきた Cube 構造体をターゲットに定め、実際に新規コネクターデザインを適用して Cube 構造の作成を試みた。またコントロール条件として過去に報告された従前のコネクターデザインを用いての検討を行った。その結果、新規コネクターデザインを使用することでより高い収率で Cube 構造体を得ることに成功した。またこの新規コネクターデザインを使用して、Triangular prism, Cube, Pentagonal prism, Hexagonal prism の作成に成功した。本章で開発された新規コネクターは複雑な設計思想を必要とせず非常に一般性の高い手法と考えられ、DNA Origami 構造体同士の接合において大きな技術の進展を与えたと言える。

以上

参考文献

・ P. W. Rothmund, *Nature* **440**, 297-302 (2006)

- S. M. Douglas, H. Dietz, T. Liedl, B. Högberg, F. Graf, W. M. Shih, *Nature* **459**, 414–418 (2009)
- W. Liu et al., *Angew. Chem. Int. Ed* **49**, 2700-2704 (2010)
- B. A. R. Williams et al., *Angew. Chem. Int. Ed* **46**, 3051-3054 (2007)
- R. Chhabra et al., *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10304 (2007)
- G. P. Acuna et al., *Science* **338**, 506-510 (2012)
- F. A. Aldaye and H. F. Sleiman, *Angew. Chem. Int. Ed* **45**, 2204-2209 (2006)
- O. I. Wilner et al., *Nature Nanotech* **4**, 249-252 (2009)
- E. A. Hemmig, *Nano Lett* **16**, 2369-2374 (2016)
- H. Dietz, S. M. Douglas, W. M. Shih, *Science* **325**, 725-729 (2009)