

【目的】細胞選択的な分子デリバリーシステムと遺伝子発現など細胞機能の制御は、癌治療・診断などの医療応用につながる重要な技術であり、薬物のデリバリーや細胞に対する機能制御の基礎研究がなされてきている。本研究では、DNA から設計・作製したナノスケールの構造体「DNA オリガミ」を用いて、目的に応じた機能を集積した DNA ナノデバイスを開発し、細胞機能の制御から細胞標的型の分子デリバリーと生体への応用まで視野に入れた新たな汎用性のある技術を創出する。DNA によって開閉可能なカプセル状あるいはリング状の 3 次元ナノ構造体を設計・作製し、細胞機能の制御に関連する生体分子や細胞選択的な標的結合分子を機能モジュールとして構造体へ集積し、細胞侵入後に外部からの操作や内在性の分子に反応して自律的に起動する「分子機能を集積した DNA デバイス」を構築する。

【方法】DNA オリガミ構造体の設計と構築技術を利用し、光応答性を持つ八面体 DNA オリガミナノ構造体（ナノカプセル）及びリング状の 3 次元構造体（ナノリング）を設計した。40 nm 程度の内部空間を持つナノカプセルは、2 つの四角錐構造から作製し、光開裂する DNA 鎖を導入することで光照射により開口できるように設計した。また、ナノリングには Cas9、光開裂性 DNA 鎖、蛍光ラベルを自己集合によって集積した。これらのナノデバイスの機能を確認後、細胞に導入し、細胞内での構造体の光照射による開口操作や機能発現を行い共焦点顕微鏡による観察を行った。

【結果】1. 光応答性 DNA ナノカプセルの細胞への導入と細胞選択的な開口操作：光照射によるナノカプセル構造体の開口は蛍光検出及び AFM 観察により確認した。作製したナノカプセルは正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）へ導入し、光照射による細胞内での開口操作を行った（図左）。光応答性ナノカプセルを培地に加え、細胞内に取り込まれることを確認した。さらに、細胞導入後、個々の細胞へのレーザー照射（405 nm）を行い、細胞内での選択的な DNA ナノカプセルの開口を共焦点顕微鏡により観察した。この結果、光照射後にナノカプセルの開口に由来する蛍光強度（Alexa647）の増加が見られた（図左下）。このように、光応答性ナノカプセルの細胞導入と光照射によるカプセルの選択的な開口を細胞内で操作でき、1 細胞レベルでも操作することに成功した。2. 光応答性 DNA ナノリングの機能化と細胞への導入：機能性ナノデバイスは、自己集合させた DNA ナノリング内側に光開裂する相補鎖 DNA を導入し、それに相補的な RNA 鎖を持つ Cas9 を結合し作製した（図右上と AFM 画像）。精製後、Cas9 を導入したナノデバイスからは光照射による Cas9 の放出が観察され、それに伴う基質 DNA 鎖の配列選択的な切断が確認された。次に、蛍光ラベルしたナノデバイスの細胞への導入を行った。ナノリングの外側に蛍光ラベル（Alexa647）した相補鎖 DNA、内側に光切断可能な DNA 鎖と蛍光色素（Alexa488）を導入したナノデバイスを作製し MCF-7 細胞へ導入した。UV 光照射により細胞内でのナノデバイスからの分子の放出が確認された（図右下）。

これからの結果から、DNA の自己集合のみを用いて、分子機能を集積化した DNA ナノデバイスを作製し、その機能をモジュール的に入れ替える新たな分子技術を開発した。蛍光ラベルやリガンドなどの機能性分子、細胞機能の制御に必要な酵素、光切断に必要な DNA 鎖などをモジュールとして導入可能であり、光照射による分子の放出や活性化など作製した DNA ナノデバイスの機能を発現できる系の構築に成功した。

ナノカプセル（左）とナノリング（右）構造体を機能化したナノデバイスによる分子デリバリーシステムと細胞内での操作

