75　分子機能を集積したDNAデバイスによる細胞機能の制御	遠藤　政幸

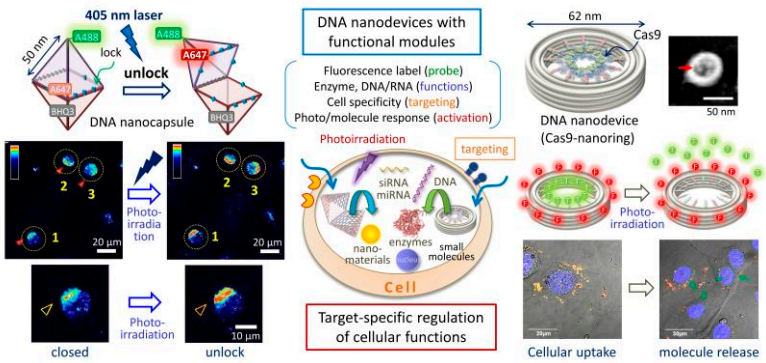
【目的】細胞選択的な分子デリバリーシステムと遺伝子発現など細胞機能の制御は、癌治療・診断などの医療応用につながる重要な技術であり、薬物のデリバリーや細胞に対する機能制御の基礎研究がなされてきている。本研究では、DNA から設計・作製したナノスケールの構造体「DNA オリガミ」を用いて、目的に応じた機能を集積した DNA ナノデバイスを開発し、細胞機能の制御から細胞標的型の分子デリバリーと生体への応用まで視野に入れた新たな汎用性のある技術を創出する。DNA によって開閉可能なカプセル状あるいはリング状の 3 次元ナノ構造体を設計・作製し、細胞機能の制御に関連する生体分子や細胞選択的な標的結合分子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



75. 分子機能を集積したDNAデバイスによる細胞機能の制御

遠藤　政幸

京都大学 大学院理学研究科 化学専攻 生体分子空間化学特別講座

Key words : DNA オリガミ，DNA ナノデバイス，デリバリーシステム，細胞内操作，細胞機能制御

緒　言

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、容易に機能の拡張が可能な DNA から設計・作製したナノスケールの構造体「DNA オリガミ」[1〜3] 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に集積し、細胞侵入後に外部からの操作や内在性の分子に応答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。

本研究では、ナノスケールのDNA構造体であるDNAオリガミを用い、開閉可能なカプセル状あるいはリング状の3次元DNA構造体のデザインと作製、及び目的とする機能を集積したDNA分子デバイスの構築を行った。この技術を使うことで、光に応答する機能、細胞を制御する機能、蛍光ラベルや細胞特異的なリガンドなどの機能を 1 つのナノ構造体に集積でき、これを自己集合のみで作製できる。これらの作製した DNA オリガミ構造体を細胞への分子デリバリーに使用し、さらに細胞内での操作を検討した。従来の薬物導入法では、生体高分子を細胞に導入する場合、細胞膜を透過するためにカチオン性の複合化試薬などが必要となるが、細胞導入に使用するDNAナノ構造体のサイズが天然のウイルスと同様の数十 nm のスケールであり、直接細胞に取り込まれると考えられる［3，4］。一方で、外部操作が可能な応答システムを組み込み、細胞への導入と細胞中で構造変化の誘導を光照射によって時空間制御した。また、DNA ナノ構造体は自己集合によって様々にカスタマイズが可能であるため、細胞機能の制御に関わる酵素や RNA、光刺激に応答する部位、細胞ターゲット用のリガンド、蛍光ラベルなど機能をモジュールとして集積し、機能集積したDNA分子デバイスの作製を行った。

方　法

1.　DNAナノカプセルの作製と細胞への導入

1）DNA ナノカプセルの作製： 40 nm 程度の内部空間を持ち 1 辺 50 nm の八面体の DNA オリガミ構造体（ナノカプセル）を DNA オリガミ法で設計した［5，6］。2 つの四角錐構造からなり、開口できるように設計した。M13mp18 と相補鎖 DNA をアニーリングし、その形成は AFM 及びアガロースゲル電気泳動によって同定した。

2）光応答性 DNA ナノカプセルの反応：ナノカプセルの開口部分に光切断できる DNA 鎖を導入し、閉じた状態のナノカプセルを作製した。またその開口部分に蛍光色素（Cy3）と消光分子（BHQ2）を導入し、ナノカプセルへのUV光照射（350 nm）により開口を制御した。時間依存的に光照射を行い、蛍光の回復によって溶液中での開口を見た。

3）培養細胞への導入と光照射による操作： 正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を 37℃、3 日間、5% CO_2、EpiLife 培地で培養し、作製した光応答性DNAナノカプセルを培地に加え、37℃、1時間後、MTT と LDH アッセイを行い、細胞毒性を見た。また、光応答性 DNA ナノカプセル（FAM ラベル）を培地に加え、37℃、1 時間後、細胞への導入を共焦点顕微鏡により観察した。光照射は顕微鏡下で行い、ナノカプセルの開口を蛍光消光の回復

（蛍光色素 Cy5/消光分子 BHQ2）によって観察した。

4）細胞光照射による操作：作製したナノカプセルを細胞内検出用に Alexa488 と開口を検出する蛍光回復用に Alexa647/BHQ3 でラベルし、細胞導入後、個々の細胞へのレーザー照射（405 nm）を 40 s 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。

2. DNA ナノデバイスの機能化と細胞への導入

1）DNA ナノリングの作製： DNA オリガミ法によりリング状の 3 次元構造体を設計した。環状一本鎖 DNA p8064 と相補鎖 DNA をアニーリングし、その形成は AFM 及びアガロースゲル電気泳動によって同定した。

2）DNA ナノリングへの機能性分子の導入：ナノリングの内側より 1 本鎖 DNA を延ばし、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 を導入した。ビーズ精製後、Cas9 を導入したナノリングに、基質 DNA 鎖（850 bp）を加え光照射を行い、電気泳動によって基質 DNA 鎖の特異的な切断を見た。

3）培養細胞への導入と光照射による操作：ナノリングの外側及び内側より 1 本鎖 DNA を延ばし、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、MCF-7 細胞（ヒト乳がん細胞）へ導入した。光照射による細胞内での分子の放出を共焦点顕微鏡により観察した。

結果および考察

1. DNA ナノカプセルの作製と細胞への導入

複合体形成や相互作用の操作、生体分子反応を制御する系の構築、高速原子間力顕微鏡（AFM）を用いた 1 分子の挙動や反応の可視化についての検討を行った。まず初めに、動的な DNA 構造変換の技術と 3 次元構造の構築技術を基盤として、3 次元構造の変化により機能を発現する系の構築を行った。光照射に応答して開裂する DNA 鎖を使用し、内部にナノ空間を持つ DNA 構造体の開閉を光照射によって誘導した。構築した光応答性 DNA ナノ構造体の 3 次元構造の形態の変化を光照射によって制御し、その動的な形態の変化を高速 AFM によって解析した。

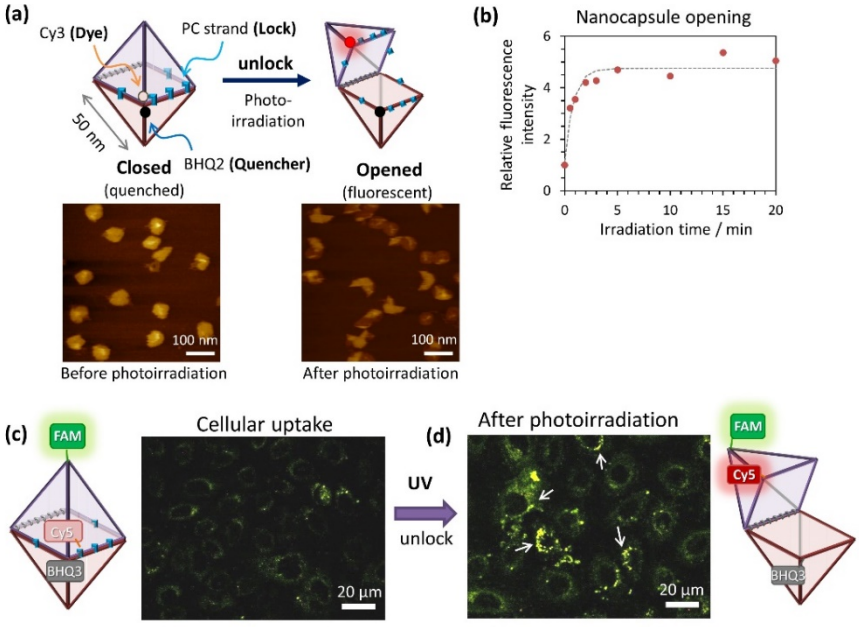


図 1. DNA ナノカプセルの光機能化と細胞内への導入

a） 光機能化した DNA ナノカプセルと光照射による開口。光ケージ分子で閉じたナノカプセルを光照射によって開口し、蛍光分子と消光分子を導入し開口を蛍光検出した。AFM 画像はそれぞれのナノカプセルの形状。

b） 光照射時間に応じた蛍光の増加。

c、d） ナノカプセルの細胞への取り込み（左）と光照射後（右）の共焦点蛍光顕微鏡画像。

2. 光応答性 DNA ナノカプセルの設計・作製と光照射による反応性

DNA オリガミ構造体の設計と構築技術を利用し、40 nm 程度の内部空間を持つ八面体 DNA オリガミナノ構造体（ナノカプセル）を設計した。1 辺 50 nm の八面体構造のナノカプセルは、2 つの四角錐構造からなり、開口できるように設計した。DNA オリガミ法により、自己集合によって作製した。その構造は AFM 及びアガロースゲル電気泳動によって同定した。次に、構築し、構造体の開閉を光照射により制御した。2 つの四角錐構造からなる開口部に光照射により開裂する DNA 鎖を導入し、八面体構造に閉じたナノカプセルを光照射によって開口できるように設計した（図 1a）。光照射（350 nm）することで、ナノカプセルが開口できることを AFM による形状の観察、及びアガロースゲル電気泳動によって同定した。溶液中での光応答性ナノカプセルの開口を蛍光消光の回復によって検出し、照射時間に依存したナノカプセルの開口（構造変換）が確認された（図 1b）。

3. 光応答性ナノカプセルの細胞内導入と光照射による開口操作

培養細胞への導入と光照射による細胞内での開口操作を検討した。培養細胞には、正常ヒト表皮角化細胞（NHEK）を用い培養後、作製した光応答性ナノカプセルを培地に加え、MTT と LDH アッセイを行い、細胞毒性を見た。この結果、実験に使用するナノカプセルの濃度（8 nM）で細胞毒性に変化なかった。次に、光応答性ナノカプセル（FAM ラベル）の細胞への導入（37℃、1 時間）を共焦点顕微鏡により観察した（図 1c 左）。この結果、細胞質中に取り込まれることが分かった。また、同条件後、観察用の容器上で光照射（350 nm）を顕微鏡下で行い、ナノカプセルの開口を蛍光消光の回復（蛍光色素 Cy5/消光分子 BHQ2 ペア）によって検討した。この結果、開口による蛍光強度の増加が細胞質内で見られ、一部オルガネラにも集積することが分かった。

4. 光応答性ナノカプセルの 1 細胞への選択的光照射と開口操作

ナノカプセルに細胞内検出用の Alexa488 ラベルと開口を検出する蛍光消光の回復用に蛍光色素 Alexa647/消光分子 BHQ3 ペアでラベルした。細胞導入後、個々の細胞へのレーザー照射（405 nm）を 40 s 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（図 2）。この結果、光照射後にナノカプセルの開口に由来する 647 nm の蛍光強度の増加が見られた（図 2b）。個々の細胞に照射していくと同様に照射直後に開口による赤色の蛍光強度の増強が見られた（図 2c）。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。

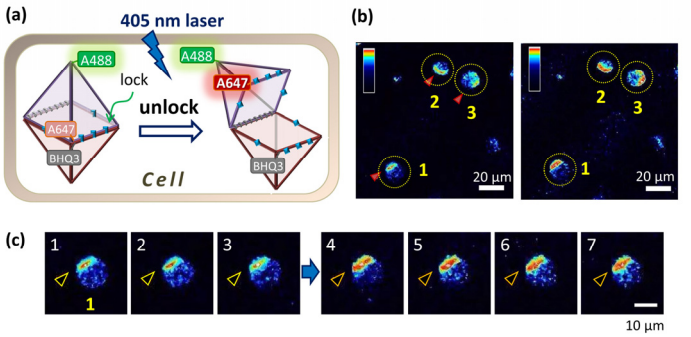


図 2. 導入されたナノカプセルの 1 細胞ごとの光照射による開口の観察

a) 光応答性ナノカプセルが導入された細胞に選択的に光照射を行う。

b) ナノカプセルを導入した細胞（左）と個々の細胞への光照射後（右）の共焦点蛍光顕微鏡画像。

c) 1 細胞光照射による選択的なナノカプセルの開口。5 秒ごとに画像を取得。画像 3 後に 40 s のレーザー光照射。

このナノカプセルには、生体分子で修飾した金ナノ粒子を導入し、放出することもでき、比較的大きな分子や材料のキャリアーとして利用することができる［6］。ナノカプセル内部には遺伝子発現の制御用に Cas9 を導入し、光照射によってナノカプセルを開くことで活性を発現できることに成功している。これらの結果から、DNA 構造体に比較的大きなナノ材料を導入でき、開閉によってその包摂や放出を制御できる。このように外部刺激に応答できる DNA ナノ構造体キャリアーを培養した細胞内に導入し、光照射による構造体の開口を制御し、細胞応答の誘導を行える新たな分子システムを構築へと展開していく。

5. 光応答性 DNA ナノリングの機能化と細胞への導入

DNA ナノリングの機能化と光照射による機能発現

DNA オリガミ法によりリング状の 3 次元構造体を設計した。その内側に目的の機能性分子、酵素、DNA、RNA を集積したナノデバイスを作製した（図 3）。環状一本鎖 DNA と相補鎖 DNA を自己集合させ、その構造は AFM 及びアガロースゲル電気泳動によって同定した。ナノリングへの機能性分子の導入は、ナノリングの内側より 1 本鎖 DNA を延ばし、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 を導入した（図 3a～c）。精製後、Cas9 を導入したナノデバイスに光照射を行い、基質 DNA 鎖（850 bp）の配列選択的な切断が電気泳動によって見られた（図 3d、lane 3）。このことから、ナノデバイスからの光照射による Cas9 の放出によって活性化の制御に成功した。

6. 培養細胞への導入と光照射による操作

作製したナノデバイスを細胞内に導入し、その機能制御を検討した。ナノリングの外側及び内側より 1 本鎖 DNA を延ばし、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、ナノデバイスを作製し、MCF-7 細胞（ヒト乳がん細胞）への導入を検討した。共焦点顕微鏡の観察により、ナノデバイスの細胞質内への導入が確認された（図 3e）。さらに、ナノデバイスを細胞内に導入後、リング内側に導入した蛍光ラベルした DNA 鎖を UV 光照射によって切断することで、その細胞内での放出を分子の共焦点顕微鏡により観察した。これにより、光照射による細胞内でターゲット分子の放出に成功した。また、Cas9 を導入したナノデバイスも同様に細胞内に取り込まれた（図 3e）。現在、細胞内での機能発現と細胞への選択的な導入を検討している。

これらの結果から、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、機能制御に必要な酵素、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。

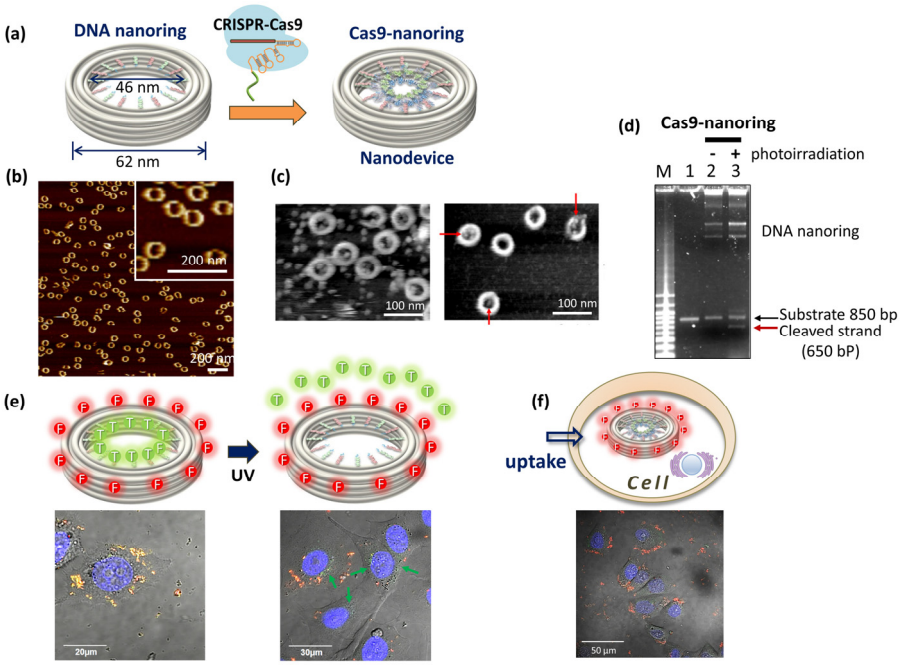


図 3. DNA ナノリングを用いたナノデバイスの作製と細胞への導入

a) DNA ナノリングを作製し内部に Cas9 を集積する。

b) 作製した DNA ナノリング。

c) Cas9 導入後（上）と精製後（下）のナノデバイス。

d) 光照射による機能発現の電気泳動。

e) ナノカプセルを導入した細胞（左）と個々の細胞への光照射後（右）の共焦点蛍光顕微鏡画像。

f) Cas9 を導入したナノデバイスの細胞への導入後の共焦点蛍光顕微鏡画像。

本研究では、外部刺激に応答する分子デリバリーシステムを開発するため、3 次元の DNA オリガミ構造体をキャリアーとして用い、光応答性、DNA やタンパク・酵素などの機能性分子、蛍光ラベル、細胞特異的なリガンドをモジュールとして構造体に導入し、ナノデバイスの構築を行った。構造変換や光照射に応答した酵素活性の発現などの制御を行える新たな分子システムを構築した。これら 3 次元 DNA オリガミ構造体を用いて、ナノカプセルを使った細胞内部への導入と光照射による細胞内で構造変換、及び Cas9 の活性制御を行う DNA ナノデバイスの構築と細胞内導入と光照射による分子放出に成功した。また、細胞選択的な導入技術の開発として、特定の癌細胞を選択的に標的とする DNA アプタマーをリング状の DNA ナノデバイスの外側に導入し、細胞標的型の分子デリバリーを行う系の構築も現在行っている。今後も、本研究の DNA デバイス化技術によって、多様な分子の集積化、分子デリバリーと細胞機能の制御を可能とするインテリジェントな「機能集積型分子デバイス」の創成を展開していく。

共同研究者・謝辞

本研究は、京都大学大学院理学研究科生体分子空間化学特別講座で行われたものであり、関係した諸スタッフと学生に感謝する。

文　献

1) Rothemund PW. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. Nature. 2006 Mar 16;440(7082):297-302. doi: 10.1038/nature04586. PMID: 16541064
2) Rajendran A, Endo M, Sugiyama H. Single-molecule analysis using DNA origami. Angew Chem Int Ed Engl. 2012 Jan 23;51(4):874-90. doi: 10.1002/anie.201102113. Epub 2011 Nov 25. PMID: 22121063
3) Endo M, Yang, Y. Sugiyama, H. DNA origami technology for biomaterials applications. Biomater. Sci. 2013 Dec 7;1(4):347-360. doi:10.1039/C2BM00154C
4) Chen YJ, Groves B, Muscat RA, Seelig G. DNA nanotechnology from the test tube to the cell. Nat Nanotechnol. 2015 Sep;10(9):748-60. doi: 10.1038/nnano.2015.195. PMID: 26329111
5) Takenaka T, Endo M, Suzuki Y, Yang Y, Emura T, Hidaka K, Kato T, Miyata T, Namba K, Sugiyama H. Photoresponsive DNA nanocapsule having an open/close system for capture and release of nanomaterials. Chemistry. 2014 Nov 10;20(46):14951-4. doi: 10.1002/chem.201404757. PMID: 25223393
6) Tohgasaki T, Shitomi Y, Feng Y, Honna S, Emura T, Hidaka K, Sugiyama H, Endo M. A Photocaged DNA Nanocapsule for Controlled Unlocking and Opening inside the Cell. Bioconjug Chem. 2019 Jul 17;30(7):1860-1863. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00040. PMID: 30811178