

京都大学	博士（薬科学）	氏名	譚 萌萌
論文題目	Structural optimization of polypod-like structured DNA based on structural analysis and interaction with cells (構造解析および細胞との相互作用解析に基づく多足型DNA構造体の構造最適化に関する研究)		
<p>近年、DNAナノテクノロジーを用いて開発されるDNAナノ構造体の生物医学応用が注目されている。非メチル化CpG配列（CpG motif）を含むDNA（CpG DNA）は、ヒトを含む哺乳類の樹状細胞やマクロファージなどに発現するToll-like receptor 9（TLR9）に認識され、自然免疫を活性化することから、がんや感染症、アレルギー疾患治療への応用が期待されている。申請者が所属する研究室ではこれまでに、天然型のオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）で作製可能な多足型DNA構造体（polypod-like structured DNA : polypodna）を開発し、これが直鎖状二本鎖DNAと比較してTLR9発現細胞と効率的に相互作用することを見出している。しかしながら、polypodnaの構造的特徴に影響を及ぼす因子や、効率的な細胞との相互作用および自然免疫活性化の機構については明らかではない。そこで申請者は、疾患治療に適したpolypodnaの開発を目的に、構造解析および細胞との相互作用解析に基づきpolypodna構造の最適化を試みた。</p> <p><b>第1章 原子間力顕微鏡観察による多足型DNA構造体を構成するODN配向性の解明</b></p> <p>原子間力顕微鏡（AFM）は、空間分解能が高く、水溶液中での観察が可能なことから、複雑なDNAナノ構造体の形状解析に有用である。その反面、AFM観察の際にはサンプルを雲母上に固定する必要があることから、撮像されたpolypodnaは平面状に変形された構造である。申請者は、DNA origami法でDNA frameを作製し、これに組み込んだpolypodnaの平面構造をAFMで観察することで、polypodnaを構成するODNの配向性の解明を試みた。60から88塩基長のODNを用いて、5本足構造のpentapodna（2種類）、6本足構造のhexapodna（3種類）、4本足構造のtetrapodna（2種類）を設計した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）を用いて形成を確認した各種polypodnaの融解温度はpod数の増加に伴い減少し、サイズはほぼ同じであることが示された。Pentapodnaの5本足のうち2本の5'末端を延長することで、DNA origamiフレームに固定した。これにより、各ODNが平面化の際に中央部分で大きく折れ曲がるbend-typeか、中央部分で交差するcross-typeかを判定可能である。AFM観察の結果、pentapodnaは90%以上の割合でbend-typeで平面化することが示された。Pentapodna中央部分における6塩基長の配列を置き換えたpentapodna*もほぼ同様の結果となった。HexapodnaとtetrapodnaについてもAFM観察の結果、どちらもbend-typeの配向性を示した。以上より、polypodnaを構成するODNは、平面状になる際にbend-typeの配向になること、この傾向はpod数に依存しないことを見出した。</p> <p><b>第2章 小角X線散乱法による部分的共有配列を含む多足型DNA構造体の構造解析</b></p> <p>Polypodnaを構成するODNの種類や本数が増加することによって、塩基配列に依存したオフターゲット毒性を含む副作用の可能性が高まることが懸念される。塩基配列の種類を減らす方法として、全てのODNの中央部分に共通のパリンドローム配列の組み込みが挙げられる。しかしながら、共通のパリンドローム配列を含むpolypodnaは対称または非対称の立体構造を取りうることから、対称構造となる既存のpolypodnaとは異なる性質を示す可能性がある。そ</p>			

ここで第2章では、tetrapodnaを対象として選択し、対称または非対称なtetrapodnaに加えて、パ  
リンドローム配列を有するtetrapodnaを設計し、その形成効率および構造解析、細胞との相互  
作用を評価した。36塩基長のODNで形成するtetrapodnaの中央の12塩基をパリンドローム配列  
に置き換えたTet(id12)を設計した。また、Tet(id12)の比較対象として、対称構造のTet(sym)と  
非対称構造のTet(asym12)も設計した。Tet(id12)はTet(asym12)と同様の二段階の融解温度曲線  
を示したことから、Tet(id12)は融解過程において非対称構造を取ることが示唆された。そこで、  
ナノサイズのタンパク質や粒子の構造解析に有用な小角X線散乱 (SAXS) 法を用いて各  
tetrapodnaの微細構造を解析した。その結果、散乱曲線の散乱波数ベクトルが小角領域におい  
て、Tet(id12)は対称構造のTet(sym)の曲線に近い形状を示した。また、慣性半径に関しても  
Tet(id12)はTet(sym)に近いことが示された。その一方で、マウスマクロファージ様細胞株  
RAW264.7細胞による取り込みに関しては、各tetrapodna間に有意差は認められなかった。以上  
より、中央部分にパリンドローム配列を挿入することで塩基配列の種類を減らしたtetrapodna  
は対称構造を取り、RAW264.7細胞との相互作用に関しては既存の対称構造のtetrapodnaと同様  
であることが示された。

### 第3章 多足型DNA構造体中のCpG motifの位置が免疫活性化に及ぼす影響の解明

CpG DNAによる免疫活性化にはDNA配列におけるCpG motifの位置が重要である。そこで申  
請者は、より効率的な活性化を示すpolypodnaの設計を目的に、polypodna中のCpG motifの位置  
が免疫活性化に及ぼす影響について検討した。5'末端の4塩基目からCpG motifを含む36塩基長  
のODNを設計し、これを含む2-6種類のODNで基本となるpolypodna (CpG-std) を構築し、CpG  
motifの位置をODN配列の中央に移動させたCpG-coreも設計した。また、CpG motifを含むODN  
の塩基長を3'側または5'側に伸長し、CpG motifを一本鎖部分に配置したCpG-ext(out)、二本鎖  
部分に配置したCpG-ext(in)を加え、合計4シリーズのpolypodnaを設計した。各polypodnaのT<sub>m</sub>  
は、同一pod数のpolypodna間ではほぼ同じであり、pod数の増加に伴い減少した。RAW264.7細  
胞からのTNF- $\alpha$ 産生はCpG-ext(out)が最も高く、CpG-coreで最も低かった。蛍光共鳴エネルギー  
移動 (FRET) 法でCpG-ext(out)とCpG-ext(in)polypodnaの経時的細胞取り込みと活性化を比較  
した結果、CpG-ext(out)はより早い段階で細胞活性を示した。一方、一本鎖CpG DNAにおいて  
はCpG-ext(in)が最も高いTNF- $\alpha$ 産生が得られ、CpG-stdが最も低い値を示した。以上から、一本  
鎖CpG DNAの結果から、効率的に免疫活性化を誘導するCpG polypodnaを予測することは困難  
であることが明らかとなった。また、多足型DNA構造体による効率的な免疫活性化には、CpG  
motifを構造体の一本鎖部分に配置することが有用であることを見出した。

以上申請者は、polypodnaを構成するODNの配向性を解明し、塩基配列の種類を減らした  
tetrapodnaの構造解析に成功した。さらには、CpG motifの位置がpolypodnaの免疫活性化に及ぼ  
す影響を明らかにした。本研究で得られた成果は、DNAナノ構造体の構造-活性相関の解明に  
有益と考え、より安全かつ効率的な免疫活性を有するDNAナノ構造体の設計に有用な情報を  
提供するものである。

### (論文審査の結果の要旨)

近年、DNAナノテクノロジーを用いて開発されるDNAナノ構造体の生物医学応用が注目されている。非メチル化CpG配列 (CpG motif) を含むDNA (CpG DNA) は、ヒトを含む哺乳類の樹状細胞やマクロファージなどに発現するToll-like receptor 9 (TLR9) に認識され、自然免疫を活性化することから、がんや感染症、アレルギー疾患治療への応用が期待されている。申請者は、疾患治療に適したpolypodnaの開発を目的に、構造解析および細胞との相互作用解析に基づきpolypodna構造の最適化を試みた。

#### 第1章 原子間力顕微鏡観察による多足型DNA構造体を構成するODN配向性の解明

DNA origami 法で DNA frame を作製し、これに組み込んだ polypodna の平面構造を原子間力顕微鏡 (AFM) で観察することで、polypodna を構成する ODN の配向性の解明を試みた。60 から 88 塩基長の ODN を用いて、5 本足構造の pentapodna (2 種類)、6 本足構造の hexapodna (3 種類)、4 本足構造の tetrapodna (2 種類) を設計した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を用いて形成を確認した各種 polypodna の融解温度は pod 数の増加に伴い減少し、サイズはほぼ同じであることが示された。Pentapodna の 5 本足のうち 2 本の 5'末端を延長することで、DNA origami フレームに固定した。これにより、各 ODN が平面化の際に中央部分で大きく折れ曲がる bend-type か、中央部分で交差する cross-type かを判定可能である。AFM 観察の結果、pentapodna は 90%以上の割合で bend-type で平面化することが示された。Pentapodna 中央部分における 6 塩基長の配列を置き換えた pentapodna\*もほぼ同様の結果となった。Hexapodna と tetrapodna についても AFM 観察の結果、どちらも bend-type の配向性を示した。以上より、polypodna を構成する ODN は、平面状になる際に bend-type の配向になること、この傾向は pod 数に依存しないことを見出した。

#### 第2章 小角X線散乱法による部分的共有配列を含む多足型DNA構造体の構造解析

本章では、tetrapodnaを対象として選択し、対称または非対称なtetrapodnaに加えて、パリンドローム配列を有するtetrapodnaを設計し、その形成効率および構造解析、細胞との相互作用を評価した。36塩基長のODNで形成するtetrapodnaの中央の12塩基をパリンドローム配列に置き換えたTet(id12)を設計した。また、Tet(id12)の比較対象として、対称構造のTet(sym)と非対称構造のTet(asym12)も設計した。Tet(id12)はTet(asym12)と同様の二段階の融解温度曲線を示したことから、Tet(id12)は融解過程において非対称構造を取ることが示唆された。そこで、ナノサイズのタンパク質や粒子の構造解析に有用な小角X線散乱 (SAXS) 法を用いて各tetrapodnaの微細構造を解析した。その結果、散乱曲線の散乱波数ベクトルが小角領域において、Tet(id12)は対称構造のTet(sym)の曲線に近い形状を示した。また、慣性半径に関してもTet(id12)はTet(sym)に近いことが示された。その一方で、マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7細胞による取り込みに関しては、各tetrapodna間に有意差は認められなかった。以上より、中央部分にパリンドローム配列を挿入することで塩基配列の種類を減らしたtetrapodnaは対称構造を取り、RAW264.7細胞との相互作用に関しては既存の対称構造のtetrapodnaと同様であることが示された。

#### 第3章 多足型DNA構造体中のCpG motifの位置が免疫活性化に及ぼす影響の解明

より効率的な活性化を示すpolypodnaの設計を目的に、polypodna中のCpG motifの位置が免疫活性化に及ぼす影響について検討した。5'末端の4塩基目からCpG motifを含む36塩基長のODNを設計し、これを含む2-6種類のODNで基本となるpolypodna (CpG-std) を構築し、CpG motifの位置をODN配列の中央に移動させたCpG-coreも設計した。また、CpG motifを含むODNの塩基長を

3'側または5'側に伸長し、CpG motifを一本鎖部分に配置したCpG-ext(out)、二本鎖部分に配置したCpG-ext(in)を加え、合計4シリーズのpolypodnaを設計した。各polypodnaのT<sub>m</sub>は、同一pod数のpolypodna間ではほぼ同じであり、pod数の増加に伴い減少した。RAW264.7細胞からのTNF- $\alpha$ 産生はCpG-ext(out)が最も高く、CpG-coreで最も低かった。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 法でCpG-ext(out)とCpG-ext(in)polypodnaの経時的細胞取り込みと活性化を比較した結果、CpG-ext(out)はより早い段階で細胞活性を示した。一方、一本鎖CpG DNAにおいてはCpG-ext(in)が最も高いTNF- $\alpha$ 産生が得られ、CpG-stdが最も低い値を示した。以上から、一本鎖CpG DNAの結果から、効率的に免疫活性化を誘導するCpG polypodnaを予測することは困難であることが明らかとなった。また、多足型DNA構造体による効率的な免疫活性化には、CpG motifを構造体の一本鎖部分に配置することが有用であることを見出した。

以上、本研究で得られた成果は、DNAナノ構造体の構造-活性相関の解明に有益と考え、より安全かつ効率的な免疫活性を有するDNAナノ構造体の設計に有用な情報を提供するものである。よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年2月14日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。