

放射光を用いたポリポッド DNA の精密構造解析

○真田雄介^{1,2}・坂本俊介²・塩見朋紀³・大河平紀司⁴・Efstratios Mylonas⁵・
八木直人⁵・西川元也³・高倉喜信³・櫻井和朗²・高原淳¹
九大先導研¹・北九大工²・京大院薬³・有明高専⁴・JASRI/SPRING-8⁵

配列を制御したオリゴ DNA を適切な条件でアニーリングすると、Figure 1 に示すようなポリポッド型の DNA 会合体が形成する。ポリポッドのサイズは小さく、電子顕微鏡観察等の手段では詳細な構造を決定するのは困難である。本発表では腕の数が 3 - 6 のポリポッド DNA について小角 X 線散乱 (SAXS) を用いた構造解析の結果を報告する。SAXS 測定は全て SPRING-8 BL40B2 で行った。

Figure 2 にポリポッド DNA の SAXS 測定結果を示す。縦軸は散乱強度 $I(q)$ 、横軸は散乱ベクトルの絶対強度 q である。4 種の試料はいずれも $q = 0.6 - 0.8 \text{ nm}^{-1}$ に屈曲点を持ち、 $q = 5.0 \text{ nm}^{-1}$ にピークを持つ。 $q = 5.0 \text{ nm}^{-1}$ のピークは B 型 DNA らせん形成を示唆しており、実際に 18 塩基対の B 型 DNA のモデルから計算した理論線はこのピークを再現する (紫線)。すべての試料がピークを持つことから、腕の数にかかわらずポリポッド DNA の各腕は B 型 DNA らせんを形成していると考えられる。

低 q 領域では、上述したようにすべてのポリポッドで屈曲点が見られ、この屈曲点は腕の数の増加とともに低 q 側へ移動している。小角散乱においてこのような低 q 領域での情報は粒子全体の構造を反映する。ここで我々は、ポリポッドの全体の形状の近似として、マルチロッドモデルを導入した。このマルチロッドモデルは、複数のロッドを一点で連結したものである。仮定として、B 型 DNA 18 塩基対分の鎖長と等しい 6.1 nm とした。形状は各ポリポッドに対応した、正三角形、正四面体、三角両錐、正八面体の各頂点にロッドの先端が来る構造を選択した。このモデルのフーリエ変換から理論曲線を得た。3-pod、4-pod ではロッドの長さが 6.1 nm の時、実験点を再現するが (Figure 2、赤線)、5-pod、6-pod ではこの長さでは説明できず、さらに長いロッドを必要とする (それぞれ 7.0 、 7.2 nm 、Figure 2、赤線)。

マルチロッドモデルを用いた検討より、腕の多いポリポッドでは結合点からより外側まで腕が伸びていることから、ポリポッド中心部の 2 重らせんが一部ゆるみ、その結果広がった構造になっていると考えられる。腕の数の増加とともにポリポッドの中心部の鎖同士の立体障害、静電反発は大きくなると考えられ、これが中心部の鎖の緩みにつながると考えられる。

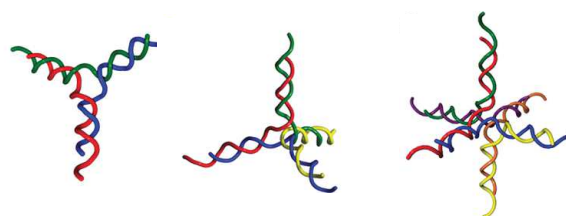


Figure 1. Schematic pictures of the polypod DNAs.

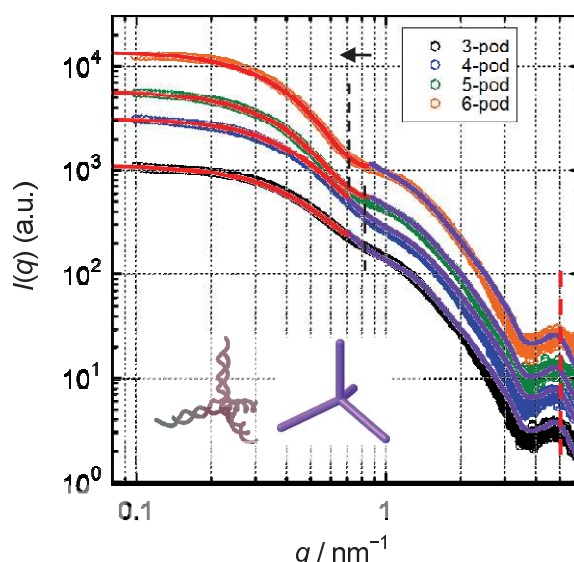


Figure 2. SAXS profiles of the polypods and the ones with theoretical curves of the multi-rods model.

放射光を用いた ポリポッドDNAの精密構造解析

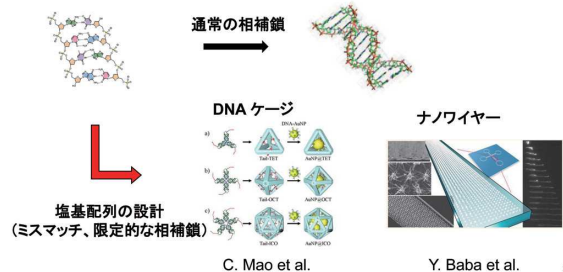
真田雄介^{1,2}・坂本俊介²・塩見朋紀³・大河平紀司⁴・Efstratios Mylonas⁵
八木直人⁵・西川元也³・高倉喜信³・櫻井和朗²・高原 淳¹

九大先導研¹・北九大工²・京大院薬³・有明高専⁴・JASRI/SPRING-8⁵

Introduction

DNA ナノテクノロジー

核酸の塩基対形成を利用し、人工的に合成したDNAが形成する構造体を様々な分野に応用
N. Seeman, 1980s



Introduction

・核酸医薬

アンチセンスDNA, small interfering RNA (siRNA), etc...

多くが一本鎖で機能を発現するが、体内では核酸分解酵素によって分解されてしまう

→ 核酸をどうやってターゲットへ届けるかが非常に重要

ウイルスベクター、脂質との複合化、等々

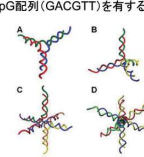
我々のアプローチ

DNA そのものを核酸医薬のキャリアとして使う
DNA ナノテクノロジー技術に応用

Introduction

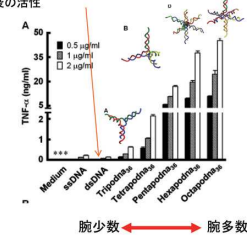
ポリポッド型DNA

細胞内で腫瘍壊死因子TNF-αの産生を促す(=免疫の活性化) CpG配列 (GACGTT) を有する



Mohri et al., ACS nano, 2012

二重鎖DNA



ポリポッド型DNAは一本鎖、二重鎖DNAと比べて有意にTNF-α産生量が高い
ポリポッド構造をとることで細胞取り込み、核酸医薬の機能発現が増大した

目的

生理活性の差は構造の違いに由来するのでは？

細胞への取り込まれやすさの違い

→ ポリポッドDNAの大きさそのもの

CpG配列の発現能の違い

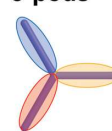
→ CpG配列周辺の環境が影響

小角X線散乱(SAXS)と計算化学の組み合わせで
詳細な構造を明らかにする

サンプル

- ・各ポリポッドの腕は18塩基対
- ・全て完全な相補鎖を組む配列
- ・ひとつのポリポッドにひとつCpG配列を持つ

3-pods



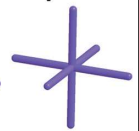
4-pods



5-pods



6-pods



GCTAGACGTTCCATACCT GACTAAGCTAGCTCTAGC

GTTTCTGCAACCTATGGA AGGTATGGAACGCTCTAGC

GCTAGAGCTAGCTTAGTC TCCATAGGTTGCAGAACC

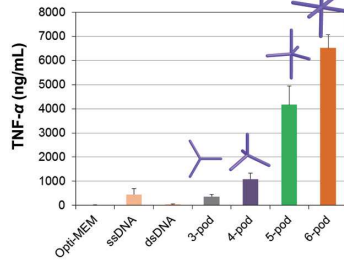
CpG配列

- ・細胞内で腫瘍壊死因子TNF-αの産生を促す(免疫の活性化)
- ・一本鎖で受容体に認識されることで免疫活性化

生理活性

TNF- α 産生量の比較

0.1 mL (0.1 μ M) for 5×10^5 cells
incubated for 8h at 37°C



- 細胞内に取り込まれる
- CpG配列が受容体に認識される

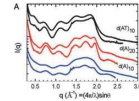
- 二重鎖、一本鎖DNAと比べると、ポリポッドDNAは高いTNF- α 産生量を示す
- 5、6-podは他と比べて有意に高いTNF- α 産生量を示す

7

SAXS

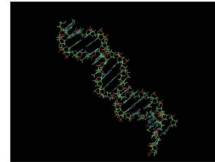
分子動力学(MD)シミュレーションではB型DNAの散乱を完全には再現できない

Zuo et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2006



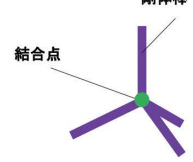
Approach

高 q 領域 (高角側)



リジッドボディモデル

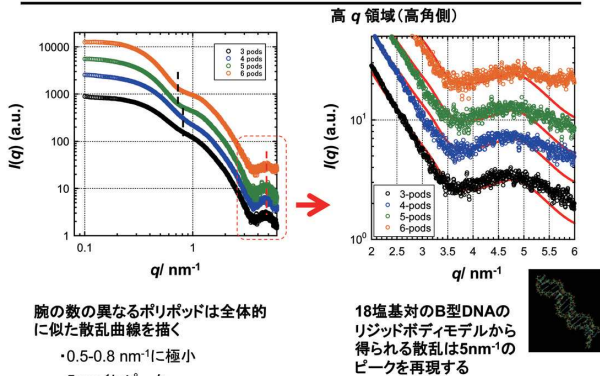
低 q 領域 (低角側)



マルチロッドモデル

8

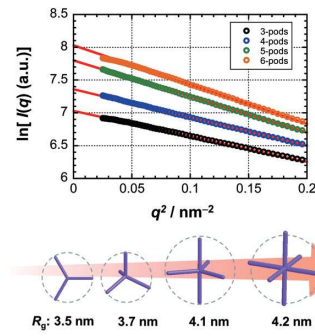
SAXS



9

慣性半径(R_g)の比較

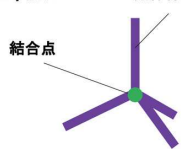
ギニエプロットより



10

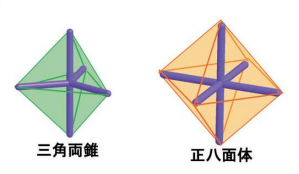
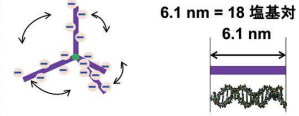
マルチロッドモデル

低 q 領域



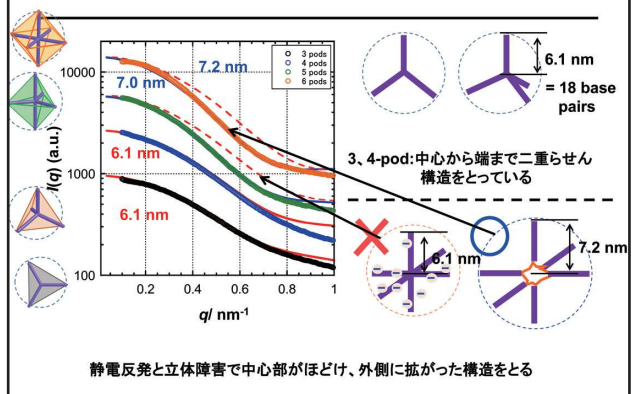
正三角形
正四面体 (テトラポッド)

静電反発と立体的な込み合いにより、それぞれの腕は正則多面体のような離れた構造をとると考えられる

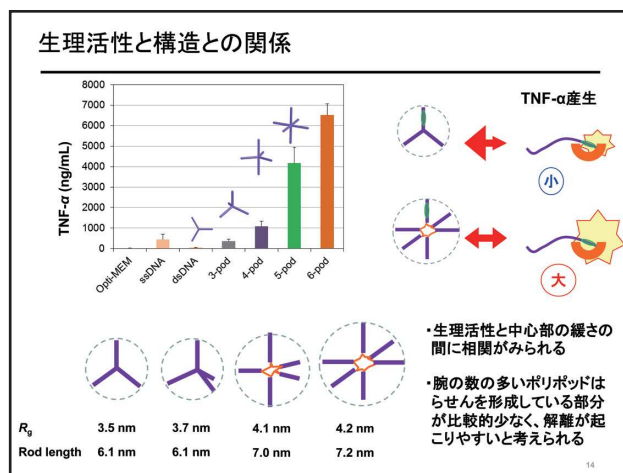
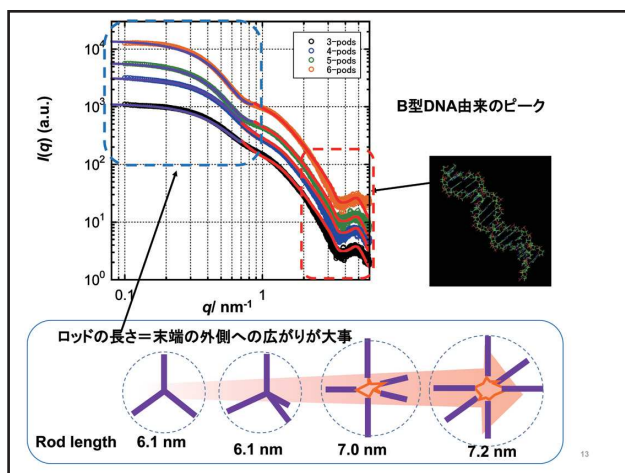


11

マルチロッドモデル



12



まとめ

- ・腕の数の増加と共に慣性半径、マルチロッドモデルのロッドの長さは増加した
- ・これはポリポッドの腕の数の増加と共に静電反発と立体障害により中心部の鎖がほどけたためである
- ・この構造の変化はSAXS測定結果に反映されており、2種類のモデルを組み合わせることで測定結果を十分に説明することができた
- ・生理活性の違いは腕の数の違いによるポリポッド構造の安定性(不安定性)によるCpG配列の露出のしやすさに依存する