

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18882

研究課題名（和文）DNAオリガミ分子機械からなる人工抗体を活用した超高感度抗体標識法の開発

研究課題名（英文）Development of Super-Sensitive Immunostaining Method Utilizing DNA Origami Molecular Machines

研究代表者

葛谷 明紀（Kuzuya, Akinori）

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：00456154

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：研究代表者が独自に開発したDNAオリガミ分子機械である「1. DNA Pliersへの抗体断片の導入」について、アロステリック機構を活用して導入した二分子の抗体断片がターゲット分子を協同的に結合していることを示唆する結果を得た。また「2. 基質の結合を可視化するためのシグナル発信部位の構築」については、別途開発していた「DNA足場を活用した生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）の制御」系を活用して、「DNA Pliersの構造変化に伴い発光タンパク質の発光色が変化するシステム」の開発に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究における「基質の結合を可視化するためのシグナル発信部位の構築」により、ターゲット分子の結合に伴ってDNA Pliersが構造変化すると、発光タンパク質の発光色が変化するシステムが開発された。これまでDNA Pliersの構造変化はAFMでイメージングする以外、FRETを利用したわずかな蛍光スペクトルの変化からしか観察することができなかったが、この系により、高価な研究用機材を有していない一般家庭などでも、DNA Pliersの開閉を明瞭に区別することができるようになった。DNA Pliersを化学検査キットとして実用化するための最大の障壁が克服され、DNAオリガミ技術の社会実装に近づいた。

研究成果の概要（英文）：1. Introduction of antibody fragments into DNA Pliers, a DNA Origami molecular machine originally developed by the Principal Investigator. Results suggesting that the two antibody fragments introduced to DNA Pliers cooperatively bind to the target molecule were obtained utilizing an allosteric mechanism of the DNA Origami molecular machine. 2. Construction of a signal transmission site for visualization of substrate binding. We succeeded in developing a system in which the emission color of a luminescent protein changes in accordance with the conformational change of DNA Pliers by utilizing the "control of bioluminescence resonance energy transfer (BRET) using DNA scaffolds" system, which had been separately developed.

研究分野：DNAナノテクノロジー

キーワード：DNAオリガミ

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 二重らせんを丸太のように見立ててこれをいかだのように束ねて望みのナノ構造体を構築する「DNA ナノテクノロジー」の分野において、その第2世代の技術と言われる「DNA オリガミ法」が開発されたのは2006年のことであるが、研究代表者らは早くからその技術に着目し、二次元構造体としてDNA オリガミ構造体を足場としたタンパクのナノアレイ構築法 (*J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 9937 等) や、箱型三次元構造体構築法 (*Chem. Commun.* **2009**, 4182) などを世界に伍して開発してきた。その中で、世界で初めての四次元、すなわち時間とともに動くDNA オリガミ構造体として報告したのが、本研究で使用するDNA オリガミ分子機械DNA Pliers である (*Nature Commun.*, **2011**, *2*, 449)。当初の開発時からこのDNA オリガミ分子機械を用いてIgG抗体の単分子検出に成功していたが、その方法は「ターゲットの抗体と特異的に結合する抗原(例えばフルオレセイン)をDNA Pliersに結合することにより、特定の抗体(例えば抗フルオレセイン抗体)存在化でのみ構造変化させる」というものだった。しかしながら、抗体は本来「検出対象となる抗原と結合することにより、その抗原を検出する」ために使用するものであって、抗体そのものを検出対象とするのは、免疫染色やELISAにおける二次抗体等の限られた場合でしかない。この場合であっても、「自身の抗原と既に結合している一次抗体」を検出するのが目的なのであるから、その一次抗体の認識には、実用的には抗原以外をもってする必要がある。以上のような経緯で、DNA PliersをはじめとするDNA オリガミ分子機械を、免疫染色やELISAにおける一次抗体や、二次抗体を置き換える人工抗体として利用することを着想した。

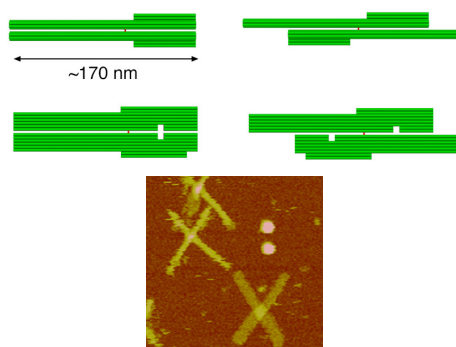


図1 二種のDNA オリガミ分子機械DNA Chopsticks (上)とDNA Pliers (中)。それぞれ平行(左)・反平行(右)の2種類の「閉じた構造」をとる。一方、基質と結合していない「開いた構造」では、二本のレバー部分が交叉して、AFM測定時のマイカ基板上ではそれぞれX字に観察される(下)。

### 2. 研究の目的

抗体は、免疫染色やELISAのように「ターゲット分子の標識」あるいは「ターゲット分子の検出」に用いられる他、最近では、病変細胞を特異的に認識して結合し、異常増殖の抑制や、生来の免疫系の活性化による治療効果を発揮する抗体医薬品も実用化されるようになってきた。このように、その高い有用性が明らかとなっている抗体にも、より広範な普及を阻むいくつかの根本的な課題が存在する。例えば、最近医療費の高騰の実例として話題となったがん免疫療法剤「オプジーボ」(ニボルマブ)は、抗体医薬の成功例の1つである。その問題は、1瓶100mgの薬価が70万円を超えることであり、1年間治療を続けると、実に4,000万円弱の費用がたった1人のがん患者にかかる計算となる。そのため、これらの抗体医薬品が、日本の保健医療崩壊のきっかけとなることが危惧されている。薬価高騰の原因は様々であるが、抗体医薬が避けられない問題の1つは、その製造コストである。非常に大きな分子量をもつタンパク質であるため化学合成できない抗体分子は、マウス由来の抗体を産生するB細胞と無限増殖能を持つミエローマ細胞を融合したハイブリドーマ細胞を、継代培養していくことで主に製造される。再生医療の分野でも同様の問題があるように、培養細胞の製造コストは今日でも、他の工業生産分野と比較して、桁外れに高い。そこで本研究では、このように今日の医療分野で広く利用されている「抗体分子」(特にIgG抗体)を模倣し、さらに高度な機能性を付与した「人工抗体」を、タンパク質以外を使用して構築し、上述の社会的な問題点の解決に寄与することを目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでに開発されている二種DNA オリガミ分子機械は、どちらも二本の剛直なレバー部が一方の支点で固定された構造をしている(図1)。いずれのレバー部もDNA 二重らせんが六本束ねられてできており、DNA Pliersは平面、DNA Chopsticksはチューブ型の断面をもつ。これらは、レバーの先端に特異的なリガンドを導入することにより、基質一分子を挟んで「閉じた構造」へと構造変化し、原子間力顕微鏡(AFM)による単分子イメージングや、FRETのリアルタイム観察により、単分子レベルの基質検出に用いることができる。さらにこれらのDNA オリガミ分子機械は、基質の結合に伴う分子機械全体の構造変化をアロステリック酵素と同様に利用して、二番目の基質-リガンド結合を制御できることも、これまでの研究により示されている(*Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 8276)。

そこで、本研究ではまず、機能性分子の導入が比較的容易なDNA Pliersに対して「1. 基質と特異的に結合する抗体断片の導入」および「2. 基質の結合にともなうDNA オリガミ分子機械の

構造変化を可視化するためのシグナル発信部位の構築」をそれぞれ検討し、その結果を踏まえながらより構造変化の観察が明瞭な DNA Chopsticks への機能化を構想した。

#### 4. 研究成果

まず「1. DNA Pliers への抗体断片の導入」については、これまでに実績のある銅フリークリック反応を用いて、DNA Pliers を構成するステープル鎖（短鎖 DNA）を修飾することを試みた。DNA 自動合成機でジベンゾシクロオクテン（DBCO）基を末端に導入したステープル鎖を合成した後、研究協力者より提供していただいたアジド基を有する二種の抗体断片 Fab と反応させた。これらはいずれも同じターゲットタンパク質の異なるエピトープを認識する。反応産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）で確認したところ、元の DBCO 修飾 DNA 鎖よりも移動度がかなり小さいバンドが観察され、目的どおり Fab 修飾 DNA が合成されていることが確認されたが、一方の Fab については目的物周辺に複数のバンドが観察され、Fab の二量化が不十分な成分が含まれていることも示唆された。

これらの Fab 修飾ステープル鎖を用いて形成した DNA Pliers に対してターゲットタンパク質を加え、AFM による観察を行ったが、ターゲットタンパク質の添加に伴う開いた形状から閉じた形状への顕著な構造変化は、残念ながらおこらなかった。これは、上記のように完全な Fab 修飾 DNA の割合が低いことが原因であると推測している。この問題を改善するために、DNA Pliers のもう一つの運用形態である、「アロステリック機構」を活用することを検討した。すなわち、DNA Pliers を短鎖の DNA であらかじめ閉じた形状に固定することで、レバー部に導入した Fab 同士を近接させておく。ここにターゲット分子を加えて Fab と結合させた後に、短鎖 DNA を引き剥がすことで、閉じていた DNA Pliers を開放する。本来ならば、全ての分子が開いた形状に変化するはずだが、目論見通り二分子の Fab で協同的にターゲットを結合していたものがあれば、閉じた形状を維持するはずである。実際の検討結果でも、ターゲット添加後に開放した系では閉じた形状の DNA Pliers が顕著に観察された（図 3）。今後は、抗体精製用のアフィニティカラムなどを用いて、完全な Fab 修飾 DNA のみを精製することが望ましいと考えられる。

「2. 基質の結合を可視化するためのシグナル発信部位の構築」については、別途開発していた「DNA 足場を活用した生物発光共鳴エネルギー移動（BRET）の制御」系を活用して、「DNA Pliers の構造変化に伴い発光タンパク質の発光色が変化するシステム」を開発した（図 4）。Fab 修飾ステープルと同様に、銅フリークリック反応で発光タンパク質を DNA 鎖に修飾することで、DNA Pliers のレバー部に発光タンパク質を結合する。もう一方のレバー部には蛍光色素を修飾しておき、ターゲット分子の結合に伴って DNA Pliers が閉じると、両者が近傍に配置されるために BRET が誘導され、新たに蛍光色素の蛍光が観察されるというしくみである。モデル系としてターゲット分子をストレプトアビジン（SA）、これに対するリガンドとしてビオチンをレバー部に結合した DNA Pliers に上記の修飾を施した結果、目的通りに発光色の変化を誘導させることに成功した。この発光色の変化は、マルチモードプレートリーダーによる発光スペクトルとしての変化のみならず、iPhone のカメラによる溶液の撮影でも、明瞭にその変化が捉えられるものであった（図 5）。これまで DNA Pliers の構造変化は AFM でイメージングする以外、FRET を利用した極わずかな蛍光スペクトルの変化からしか直接観察することができなかったが、この系を利用することにより、高価な研究用機材を有していない一般家庭などでも、DNA Pliers の開閉を明瞭に区別することができるようになる。DNA Pliers を化学検査キットとして実用化するための大きな障壁が克服できたと言える。

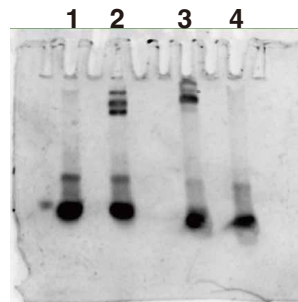


図 2 Fab 修飾 DNA の PAGE 分析結果。レーン 2 と 3 に流した反応産物では、移動度の小さな新たなバンドが観察できる。

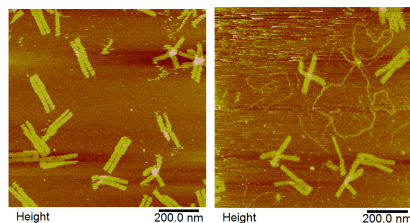


図 3 アロステリック機構を利用した DNA Pliers のターゲット添加前（左）と添加後（右）の AFM 観察結果。

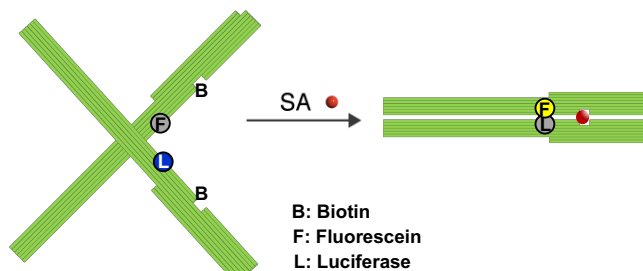


図 4 DNA Pliers の構造変化に伴い発光タンパク質の発光色が変化するシステム。

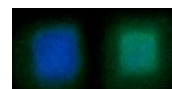


図 5 ターゲット添加前（左）と添加後（右）の DNA Pliers 溶液の発光色。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 南出悠貴、西山健太郎、仁木智哉、秋葉宏樹、永田諭志、鎌田春彦、大野浩章、葛谷明紀
2. 発表標題 DNA OrigamiのAFM観察を活用した単分子抗原検査法の開発
3. 学会等名 第5回分子ロボティクス年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuki Minamide, Kentaro Nishiyama, Tomoya Niki, Hiroki Akiba, Satoshi Nagata, Haruhiko Kamada, Hiroaki Ohno, Akinori Kuzuya
2. 発表標題 Visualization of Antigen Binding on DNA Origami Using Atomic Force Microscopy
3. 学会等名 CBI学会2021年大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南出悠貴、真野祐樹、田中喜基、葛谷明紀
2. 発表標題 遺伝子発現細胞内検出を志向した核酸検出DNAオリガミプローブの開発
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会(神戸)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田花汐理、南出悠貴、高野史章、仁木智哉、葛谷明紀
2. 発表標題 DNA Origami液中微細構造サブnm解析のためのBRETシステムの開発
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高野史章、南出悠貴、仁木智哉、田花汐理、葛谷明紀
2. 発表標題 DNAを足場に活用した多色生物発光「システム」の開発
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会15.0(招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Akinori Kuzuya	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 296
3. 書名 Molecular Robotics, An Introduction, Satoshi Murata, Ed.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

関西大学 化学生命工学部 知能分子学研究室 <a href="https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/mol-mach/">https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/mol-mach/</a> 関西大学 学術情報システム <a href="https://gakujo.kansai-u.ac.jp/profile/ja/e43atXUd5P3aff3de1c2401b6.html">https://gakujo.kansai-u.ac.jp/profile/ja/e43atXUd5P3aff3de1c2401b6.html</a>
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

スイス	スイス連邦工科大学			
-----	-----------	--	--	--