

令和 4 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：2019～2021

課題番号：19K22261

研究課題名（和文）DNAオリガミ分子機械を活用した可動式人工抗体の構築と超高感度抗体標識法への応用

研究課題名（英文）Development of A Super-Sensitive Immunolabeling 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）：免疫染色やELISAでも用いられる実践的なターゲットを認識する「基質認識部位」、およびDNAオリガミ分子機械の構造変化を蛍光や酵素活性として検出するための「シグナル発信部位」を、研究代表者独自の動いて機能する「DNAオリガミ分子機械」に組み込むことで、世界に類例のない「アロステリック人工抗体」の実用化をめざした。特に、DNAオリガミ分子機械のこれまでにない動作機構を採用することで、選択的なシグナル発信のオンオフ制御に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今日までにがんの治療薬として「抗体医薬」の有用性が広く認知されてきたが、タンパク質である抗体分子の製造には大きなコストがかかるため、これらの普及は同時に、我が国の今後の医療費の高騰を引き起こす可能性があることが指摘されてきた。本研究が目的とする核酸ベースの人工抗体を実用化することができれば、抗体医薬の抗原認識部位だけを取り出して活用することで、非常に安価な後発医薬品を広範に提供できるプラットフォームを確立できる。

研究成果の概要（英文）：A "substrate recognition site" to recognize practical targets used in immunostaining and ELISA and a "signal transmission site" to detect structural changes as fluorescence and enzymatic activity were incorporated to Project Leader's original "DNA Origami molecular machine", to develop an "allosteric artificial antibody" that is unprecedented in the world. By employing novel operating mechanism of the DNA Origami molecular machine, selective on/off control of signal transmission was successfully accomplished.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNAオリガミ 人工抗体

1. 研究開始当初の背景

抗原-抗体反応は、自然界で最も高い多様性と結合能をあわせもった分子認識機構である。今日では様々なターゲット分子に対して無数の抗体が市販されているが、これらの使用目的のほとんどは、「ターゲット分子の標識」あるいは「ターゲット分子の検出」である。培養細胞や組織切片の顕微鏡観察では、目的タンパクなどを特異的に認識する抗体を用いて目的タンパクの分布に基づいて観察対象を「染めわけ」、「免疫染色」が広く行われている。あるいは、診断における微量タンパク質や、感染微生物抗原の検出に使われる ELISA 法も、検出対象のタンパク質を認識する抗体が中心的な役割を果たしている。どちらの場合も、ターゲット分子を認識して結合する一次抗体と、その一次抗体を認識して結合する、蛍光色素酵素で標識された二次抗体を組み合わせて使用することが多い。また最近では、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。一方で、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も危惧されている。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。

2. 研究の目的

そこで本研究では、抗体医薬製造コストの問題を解決するために、「抗体がもつ特長を全て備えつつ、さらにこれを凌駕した機能をもつ『人工抗体』を、タンパク質以外をつかって構築する」ことを目的とした。そのために、研究代表者が世界に先駆けて独自に開発した「ターゲット分子を挟むように結合することで X 字型の開いた構造から=字型の閉じた構造に変形する DNA オリガミ分子機械 (*Nature Commun.* **2011**, *2*, 449.)」を本体に使用することで、DNA でできた「人工抗体」を構築することを考えた。具体的には、免疫染色や ELISA でも用いられる実践的なターゲットを認識する「基質認識部位」、および DNA オリガミ分子機械の構造変化を蛍光や酵素活性として検出するための「シグナル発信部位」を、応募者独自の DNA オリガミ分子機械 (図1 DNA Chopsticks と DNA Pliers) に組み込むことで、世界に類例のない「アロステリック人工抗体」の実用化をめざした。

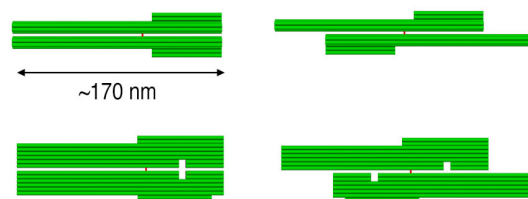


図1 DNA Chopsticks (上) と DNA Pliers (下) の、平行 (左) -反平行 (右) の2種類の「閉じた構造」模式図。基質と結合していない「開いた構造」では、二本のレバー部分が交叉して、AFM 測定時のマイカ基板上ではそれぞれ X 字に観察される。

3. 研究の方法

DNA オリガミ分子機械が基質を認識して構造変化をしたことを AFM 以外で容易に検出するための「シグナル発信部位」として、Split Hemin DNAzyme を検討した。先行例が多く報告されている G カルテット構造と Hemin の組み合わせによるペルオキシダーゼ活性 DNAzyme について、既報 (*Darius et al. Mol. BioSyst.*, **2010**, *6*, 792) にしたがって二分子に分割した split 体を設計し、DNA オリガミを構成する鎖と直結することで、それぞれの断片を DNA オリガミ分子機械に導入した。これにより、DNA オリガミ分子機械が閉じたときのみペルオキシダーゼ活性が再構築され、発色/蛍光基質の増大として検出できる系を構築した。基質結合に伴う DNA オリガミ分子機械全体の構造変化としては、既知のビオチン-streptavidin 相互作用を利用した効率的な構造変化を活用した。

また、「人工抗体」の心臓部とも言える「基質認識部位」としては、遺伝子組換えで合成した抗体断片である Fab を、DNA オリガミ分子機械を構成する DNA 鎖 (ステーブル鎖) の一部に、銅フリークリック反応で結合することを試みた。

4. 研究成果

まず「シグナル発信部位」としては、当初の計画通り DNA 四重鎖と Hemin を活用する Split Hemin DNAzyme を選択し、その構造の最適化を行った。構成する四本の鎖の組み合わせとして、それぞれ二本ずつに分割する系を検討した結果、ただ単に DNA 四重鎖を二分割しただけでは、四重鎖を再形成するための相互作用が強すぎて、ターゲット不在下でもシグナルを発してしまう（偽陽性反応）ことが明らかとなった。そこでこれを解決するために、ターゲット不在下でも DNA オリガミ分子機械の初期構造を開いた X 字型ではなく、もうひとつの閉じた構造であるアンチパラレル型に固定しておくことで、DNA オリガミ分子機械の構造変化に伴うシグナルのオンオフスイッチングが可能であることを確かめた。次いで、「基質認識部位」についても検討を行った。ステープル鎖の末端に DNA 自動合成機でジベンゾシクロオクチン(DBCO)基を導入し、アジド化した基質認識分子を銅フリークリック反応で結合することを試みた。遺伝子組換えにより得られた抗体断片 Fab を共同研究者より提供いただき、これらを修飾した DNA の DNA オリガミ分子機械への効果的な導入条件を検討した結果、銅イオンフリークリック反応は問題なく進行することがゲル電気泳動などで確かめられた。さらに、DNA オリガミ構造体への抗体断片の導入が行われたこと、およびその抗体断片への基質の結合（図 2）も、原子間力顕微鏡観察により確認することができた（図 3）。

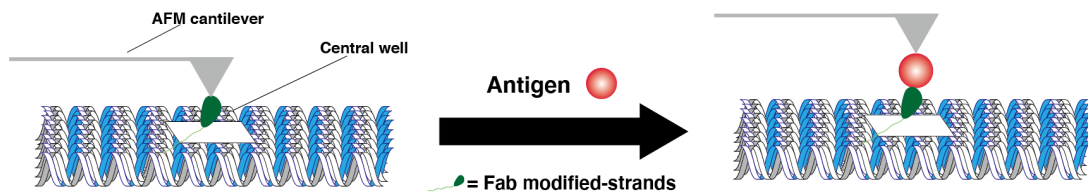


図 2 DNA オリガミ構造体への抗体断片の導入と、基質の結合の観察方法。研究代表者が以前開発した多数のナノメートルサイズのウェル（切り抜き）を有する DNA オリガミ構造体である DNA Nanostick (*ChemBioChem*, 2009, 10, 1811) を構成するステープル鎖に Fab を結合し、これへの基質分子の結合を AFM 観察による形状変化として観察した。

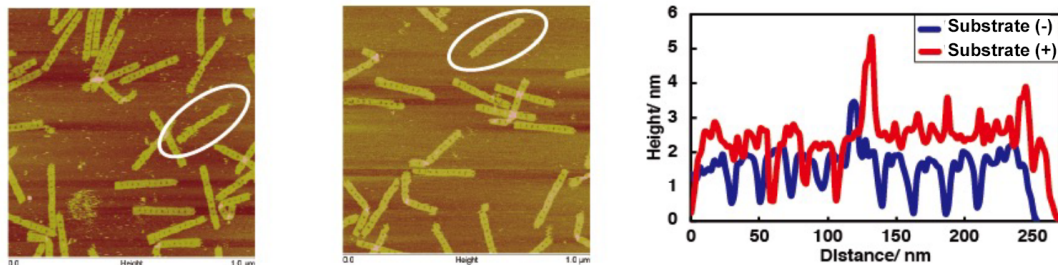


図 3 原子間力顕微鏡による DNA オリガミ構造体への抗体断片導入（左）、および基質の結合（中）の観察結果。抗体断片を導入した中央のウェルのみ、DNA 二重らせんの太さに相当する 2 nm よりも顕著に高くなった（右）。さらに抗体断片の基質であるタンパク質を系中に加えると、中央のウェルの高さは 5 nm を超え、抗体断片への基質タンパク質の結合が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ray Ankita, Liosi Korinne, Ramakrishna Shivaprakash N., Spencer Nicholas D., Kuzuya Akinori, Yamakoshi Yoko	4. 巻 11
2. 論文標題 Single-Molecule AFM Study of DNA Damage by 102 Generated from Photoexcited C60	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 7819 ~ 7826
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcclett.0c02257	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shizuma Tanaka, Shinsuke Yukami, Yuhei Hachiro, Yuichi Ohya, Akinori Kuzuya	4. 巻 11
2. 論文標題 Application of DNA Quadruplex Hydrogels Prepared from Polyethylene Glycol-Oligodeoxynucleotide Conjugates to Cell Culture Media	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 1607
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym11101607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Akinori Kuzuya
2. 発表標題 Real-Time AFM Observation of DNA-Capped CyD Rotaxane Attached to a DNA Origami Pegboard
3. 学会等名 BIONANO2020 Workshop（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akinori Kuzuya
2. 発表標題 Real-Time Single-Molecular AFM Observation of DNA Origami Nanomachines
3. 学会等名 The 14th International Symposium in Science and Technology at Chulalongkorn University（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinori Kuzuya
2. 発表標題 DNA Quadruplex Hydrogels Prepared by Liquid-Phase Large Scale DNA Synthesis
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of Nucleic Acid Chemistry (CISNAC 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019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

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸構造体	発明者 葛谷明紀、高橋望、 岡本祐太、河野幸 子、加藤千尋、齋藤	権利者 Cranebio株式会 社、関西大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-132829	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

関西大学 化学生命工学部 知能分子学研究室 https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/mol-mach/ 関西大学 学術情報システム http://gakujo.kansai-u.ac.jp/profile/ja/e43atXUd5P3aff3delc2401b6.html 関西大学 化学生命工学部 知能分子学研究室 https://wps.itc.kansai-u.ac.jp/mol-mach/ 関西大学 学術情報システム http://gakujo.kansai-u.ac.jp/profile/ja/e43atXUd5P3aff3delc2401b6.html
--

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
---------	---------