

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01774

研究課題名(和文) DNAオリガミ分子機械を活用した生体分子の超高感度検出法の開発

研究課題名(英文) Development of Super Sensitive Detection Systems for Biomolecules 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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、研究代表者が世界に先駆けて独自に発表した「動く」ことで機能する「DNAオリガミ分子機械」を本体部として使用した人工抗体を開発し、さらにこの分子機械の構造変化を超解像イメージング法でリアルタイム観察することにより、生体分子を一分子レベルで検出することができる超高感度検出法を開発すること当初目標とした。結果として、基質認識部位としてDNAオリガミ構造体に抗体断片を導入する手法をほぼ確立するとともに、超解像イメージング法にも適用できる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として、生物発光共鳴エネルギー移動システムをDNAオリガミ分子機械に実装した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体は巨大、かつ複雑なタンパク質であり、その製造には哺乳動物細胞の培養が必要となるなど、抗体医薬などに応用するためには非常にコストが高いことが従来から問題視されてきました。この問題を解決するために本研究では、比較的安価に生産できる抗体断片をDNAの足場上で組み上げることで人工抗体を構築するための道筋をたてました。また、この人工抗体を超高感度で検出するための光技術もあわせて開発に成功しました。

研究成果の概要(英文)：The initial goal of this project was to develop artificial antibodies that use "DNA Origami molecular machine," which functions through "mechanical motion," as the main body, and to develop an ultra-sensitive detection method to detect biomolecules at the single molecule level by real-time observation of the structural changes of this molecular machine using a super-resolution imaging technique. As a result, we have established a method to introduce antibody fragments into DNA Origami structures as substrate recognition sites, and have implemented a bioluminescence resonance energy transfer system into DNA Origami molecular machines as a signal transmitting site to visualize structural changes of DNA Origami molecular machines that can also be applied to super-resolution imaging technique.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNAオリガミ 人工抗体 分子機械 超解像イメージング法

## 1. 研究開始当初の背景

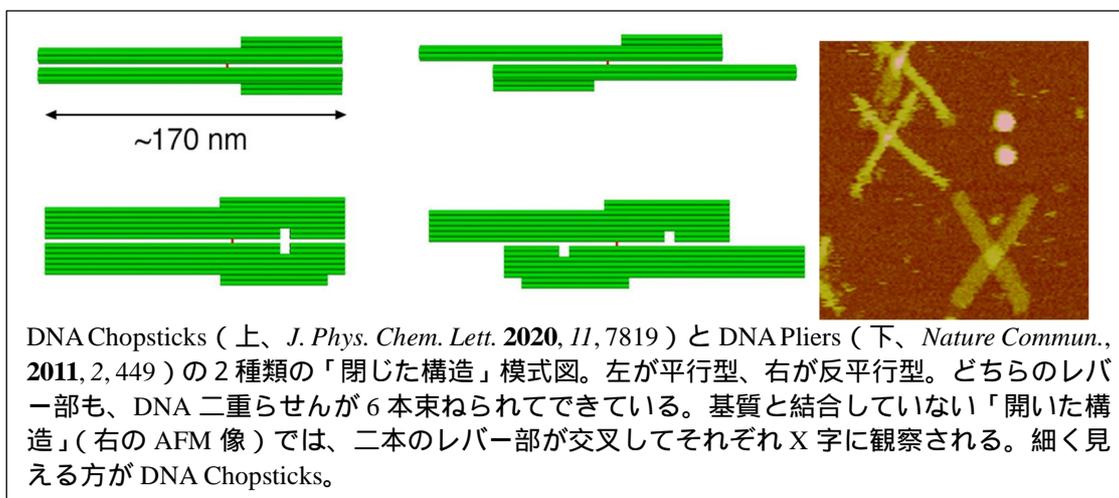
抗原-抗体反応は、自然界で最も高い多様性と結合能をあわせもった分子認識機構であると言える。今日では様々なターゲット分子に対して無数の抗体が市販されているが、これらの使用目的のほとんどは、「ターゲット分子の標識」あるいは「ターゲット分子の検出」である。培養細胞や組織切片の顕微鏡観察では、目的タンパクなどを特異的に認識する抗体を用いて目的タンパクの分布に基づいて観察対象を「染めわけ」、「免疫染色」が広く行われている。あるいは、診断における微量タンパク質や、感染微生物抗原の検出に使われる ELISA 法も、検出対象のタンパク質を認識する抗体が中心的な役割を果たしている。どちらの場合も、ターゲット分子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。その問題は、1瓶 100 mg の薬価が 73 万円もすることであり、1年間治療を続けると、実に約 3,795 万円の費用がたった 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。

そこでこれら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、一部はさらに高度化までした『人工抗体』を、タンパク質以外をつかって構築することができないか」という「問い」を着想した。

## 2. 研究の目的

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することを目的とした。そのために、DNA 二重らせんを束ねて望みのナノ構造体を構築する技術である DNA オリガミ法を用いて、研究代表者が世界に先駆けて独自に発表した「動く」ことで機能する「DNA オリガミ分子機械」を、人工抗体の本体部として使用することを考えた。これまでに設計済みの DNA オリガミ分子機械 (DNA Pliers と DNA Chopsticks) に「1. 基質を特異的に認識するリガンド」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」のそれぞれを導入することで、免疫染色や ELISA における一次抗体や二次抗体に相当する機能を、これらに付与することをめざした。さらに「3. 目的の生体分子 (抗原) と結合することによる「人工抗体」の構造変化を超解像イメージング法でリアルタイム観察する」ことにより、生体分子を一分子レベルで検出することができる超高感度検出法へと応用することも検討した。

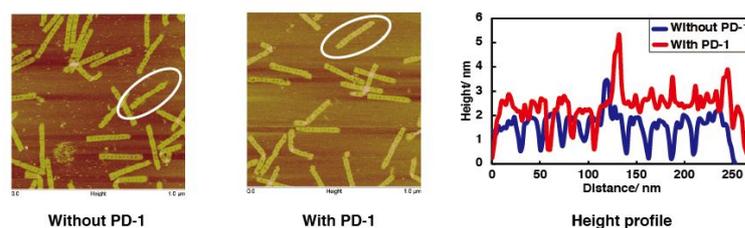


### 3. 研究の方法

まず、「1. 基質を特異的に認識するリガンド」の DNA オリガミへの導入法を確立するために、アジド基を有機化学的に導入した抗体断片 Fab を dibenzocyclooctyne (DBCO) 基を導入した Staple 鎖との間で銅フリークリック反応を行うことを検討した。DNA オリガミとしては、二次元のテープ状の構造の中に 10 nm 角の切り抜き (ウェル) を有する DNA Nanostick ( *ChemBioChem* 2009, 10, 1811 ) をモデル化合物として使用した。アジド修飾 Fab としては Pembrolizumab と Nivolumab の 2 種類を使用し、DNA Nanostick の 5 番目 (真ん中) のウェルに配置される異なる 2 本の Staple 鎖とそれぞれ結合させた。ターゲットである PD-1 との結合は、原子間力顕微鏡 (AFM) で確認した。また、「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」として、DNA を足場とする生物発光共鳴エネルギー移動 (BRET) / 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 複合システムを開発した。具体的には、深海エビ由来の発光タンパク質について、既報のスプリット体に注目し、銅フリークリック反応を活用してペプチド断片を Staple 鎖に結合させた。さらに相補鎖等を利用して近傍に蛍光色素を配置することで、DNA 末端で局所的に発光タンパク質を再構成し、ここで生成する生物発光エネルギーを効率良く蛍光色素にエネルギー移動させる系を構築した。最後に「3. 目的の生体分子 (抗原) と結合することによる「人工抗体」の構造変化を超解像イメージング法でリアルタイム観察する」系の構築については、DNA オリガミ構造体を蛍光顕微鏡で使用するスライドガラスに固定化する手法を種々検討した。

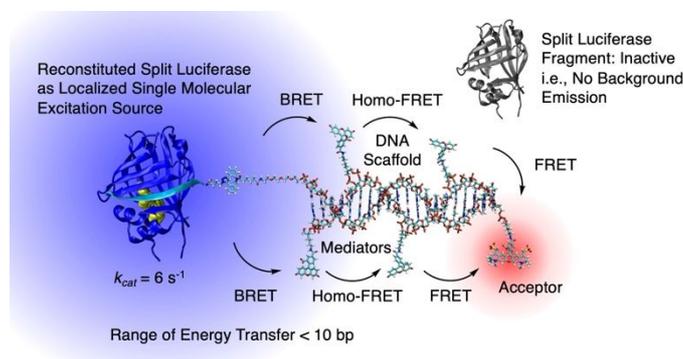
### 4. 研究成果

抗体断片修飾 DNA Nanostick としては、Pembrolizumab と Nivolumab をそれぞれ単独で導入した場合において、PD-1 の 5 番目のウェルへの結合を AFM で高さ変化として明瞭に観察することに成功した。一方で、Pembrolizumab と Nivolumab の両者を導入したヘテロ修飾 DNA Nanostick については、PD-1 の添加に伴う有意な高さの変化が観察できなかった。これは両抗体断片をあわせた高さが PD-1 とほぼ同じになっていることに起因するものと推定される。同様の手法により DNA Pliers へのヘテロ抗体断片修飾にも成功し、AFM で抗体断片の結合を可視化することに成功した。PD-1 の導入による閉じた構造体の割合の上昇も、わずかながら観察することができた。



DNA Nanostick bearing Nivolumab

シグナル発信部位として開発した BRET/FRET 複合システムを用いることで、本来青色発光する NanoLuc タンパク質で生じたエネルギーを、緑色蛍光を発する Fluorescein や赤色蛍光を発する Alexa 594 へと効率的にエネルギー移動させることに成功した。さらにこの系を応用して、発光タンパクからのエネルギーを 20 残基先に配置した蛍光色素まで、複数分子の蛍光色素で中継しながら伝送する系の開発にも成功した。



DNA オリガミ構造体のガラス基板への固定化については、ビオチン修飾 BSA とストレプトアビジンを経由してビオチン化した DNA オリガミを結合させる複雑であるが一般的な系を用いなくても、DNA オリガミ溶液に加えた金属イオンを介して、静電的に結合できることを AFM および全反射蛍光顕微鏡 (TIRFM) で確かめた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuzuya Akinori, Nomura Shin-Ichiro M., Toyota Taro, Nakakuki Takashi, Murata Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 From Molecular Robotics to Molecular Cybernetics: The First Step Toward Chemical Artificial Intelligence	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IEEE Transactions on Molecular, Biological and Multi-Scale Communications	6. 最初と最後の頁 354 ~ 363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/TMBMC.2023.3304243	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10件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 葛谷明紀
2. 発表標題 分子ロボットの部材としてのDNA
3. 学会等名 CBI学会 第2回分子ロボット倫理研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高野史章、南出悠貴、仁木智哉、葛谷明紀
2. 発表標題 DNA上でのBRET/FRETを活用した多色発光システム
3. 学会等名 第32回バイオ・高分子シンポジウム
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を足場に利用したマルチカラー生物発光素子の開発
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 南出悠貴、高野史章、谷本晃一、葛谷明紀
2. 発表標題 単分子励起光源を利用した分子内エネルギー移動
3. 学会等名 第16回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南出悠貴、谷本晃一、仁木智哉、田花汐理、高野史章、葛谷明紀
2. 発表標題 発光タンパク質を分子内励起光源とした効率的な分子内エネルギー伝送
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷本晃一、仁木智哉、南出悠貴、田花汐理、高野史章、葛谷明紀
2. 発表標題 DNAを足場とした生物発光共鳴エネルギー移動システムの精密解析
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Akinori Kuzuya
2. 発表標題 DNA quadruplex hydrogels for biomedical applications
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (PACIFICHEM2021) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuta Okamoto, Shota Abe, Yoshihiro Iida, Kota Sakamoto, Yuichi Ohya, Akinori Kuzuya
2. 発表標題 Single molecule analysis of excluded volume effect with DNA origami-PEG hybrid
3. 学会等名 The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (PACIFICHEM2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akinori Kuzuya
2. 発表標題 DNA Nanodevices for Single-Molecule Optical Detection of Various Biomolecules
3. 学会等名 The 25th SANKEN International Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akinori Kuzuya
2. 発表標題 Intelligent supramolecular DNA materials from nano to macro scale
3. 学会等名 RIKEN CEMS Topical Meeting Online (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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.	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 アミダイトモノマー	発明者 葛谷明紀, 栗本寛也	権利者 関西大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-079640	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 複合分子	発明者 葛谷明紀, 高野史章, 乾俊輝	権利者 関西大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-132865	出願年 2021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 <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://kugakujo.kansai-u.ac.jp/html/100000495_ja.html">https://kugakujo.kansai-u.ac.jp/html/100000495_ja.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チューリッヒ校		