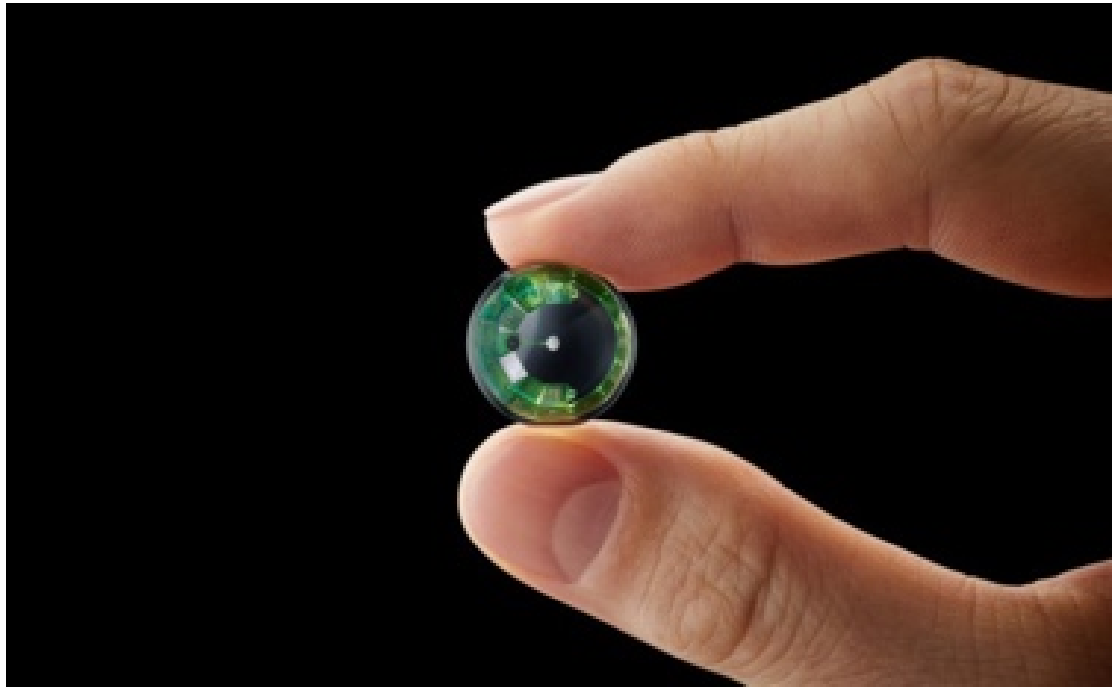
新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

DNAの分子情報で制御される多色生物発光素子

関西大学　化学生命工学部　化学生命工学科
教授　葛谷　明紀

2023年8月31日

想定される用途

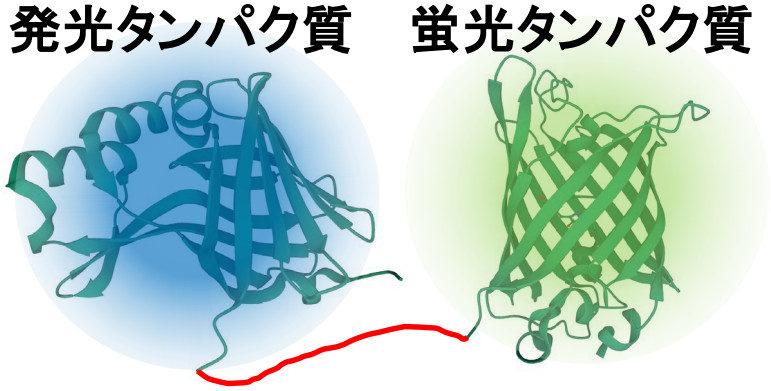


Mojo Vision社のMojo Lens

https://www.moguravr.com/mojo-vision-2/

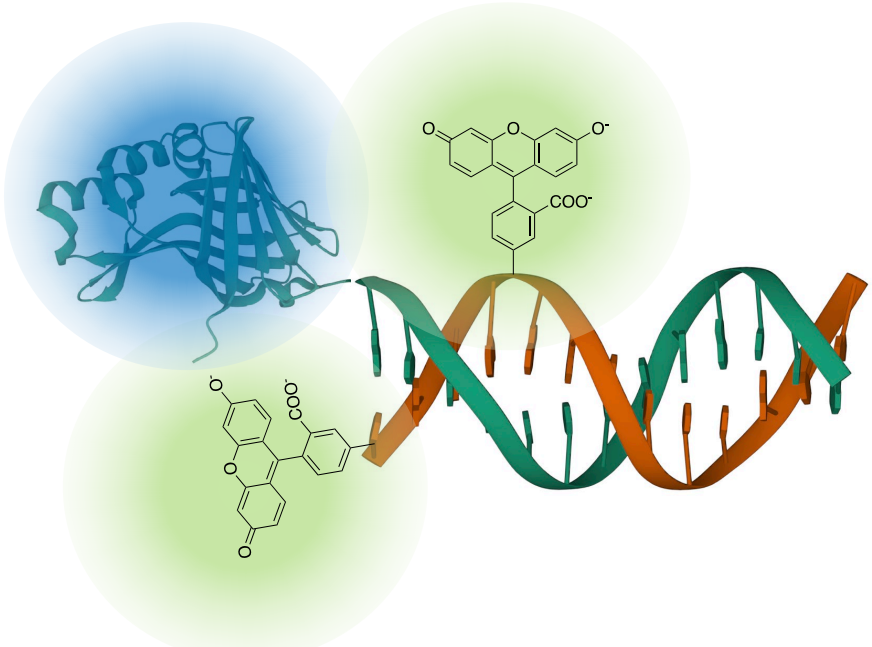
電気を使わない生物発光ディスプレイを埋め込んだ使い捨てソフトコンタクトレンズ

従来技術とその問題点



- 発光タンパク質と蛍光タンパク質を連結した融合タンパク質が必要。
- 両タンパク質の正しい折りたたみ、活性を維持できるリンカー配列の煩雑なトライアンドエラーを要する。
- 一度連結した組み合わせの切り替えなどは不可能。

新技術の特徴･従来技術との比較

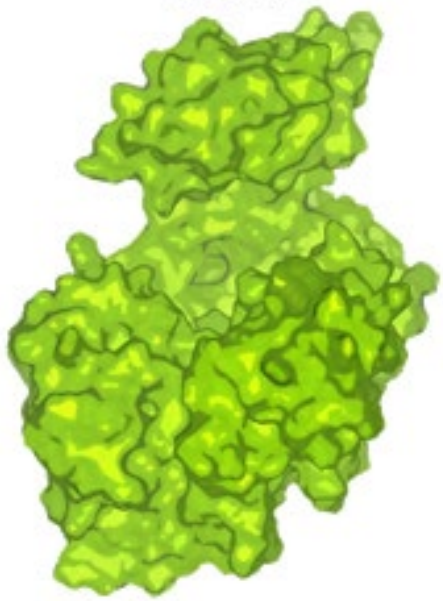


- DNA二重らせんをリンカーとして活用することで、配列選択的かつ可逆的な連結が可能となった。
- エネルギーを受け取るアクセプターを蛍光色素とすることで、その数や種類を自在に選択することが可能となる。

発光タンパク質

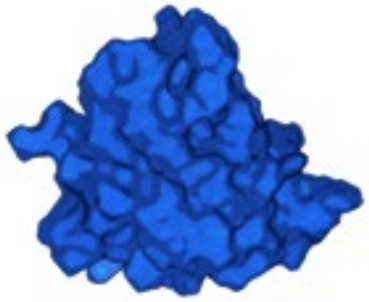
ホタルルシフェラーゼ

(61kDa)



NanoLuc ®
ルシフェラーゼ

(19kDa)



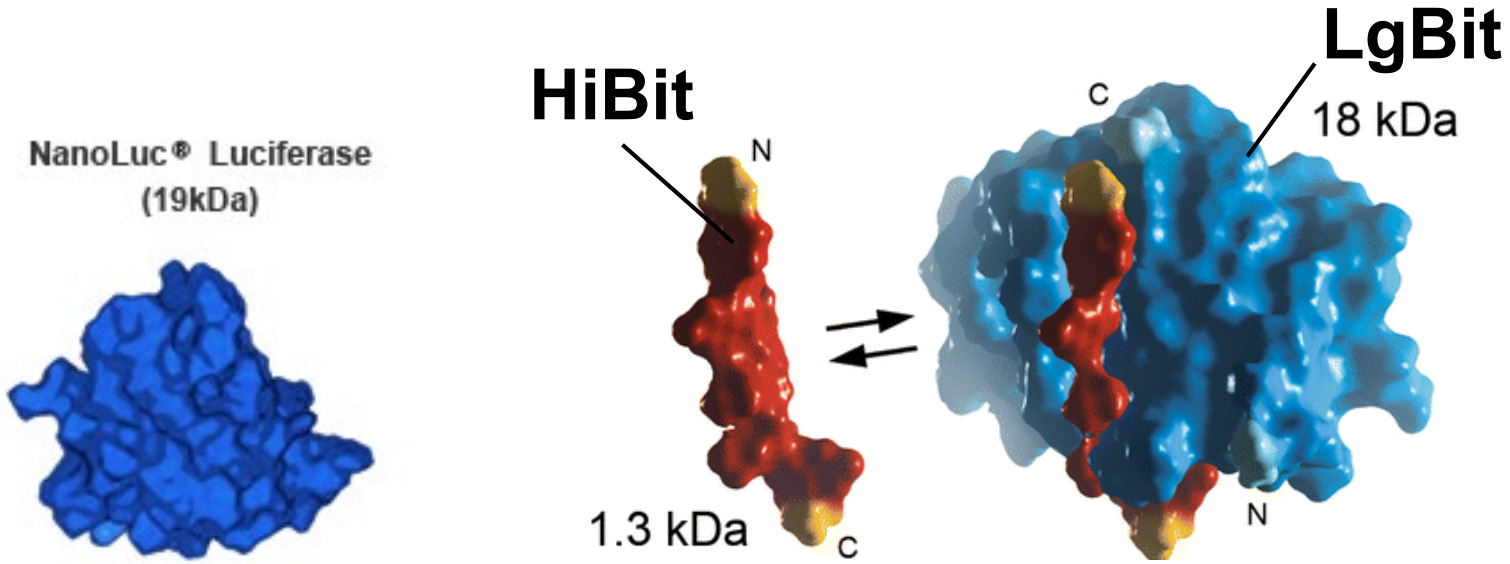
ホタル	由来	深海エビ
ATP、O_2、基質（ルシフェリン）	発光条件	O_2、基質（フリマジン）
556 nm	発光波長	460 nm
1	明るさ（比活性）	100以上

A. S. Dixon, *et al., Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.

https://www.youtube.com/watch?v=LbxJBHvH-MA

NanoLuc: トゲオキヒオドシエビ
Oplophorus gracilirostris

スプリットNanoLuc

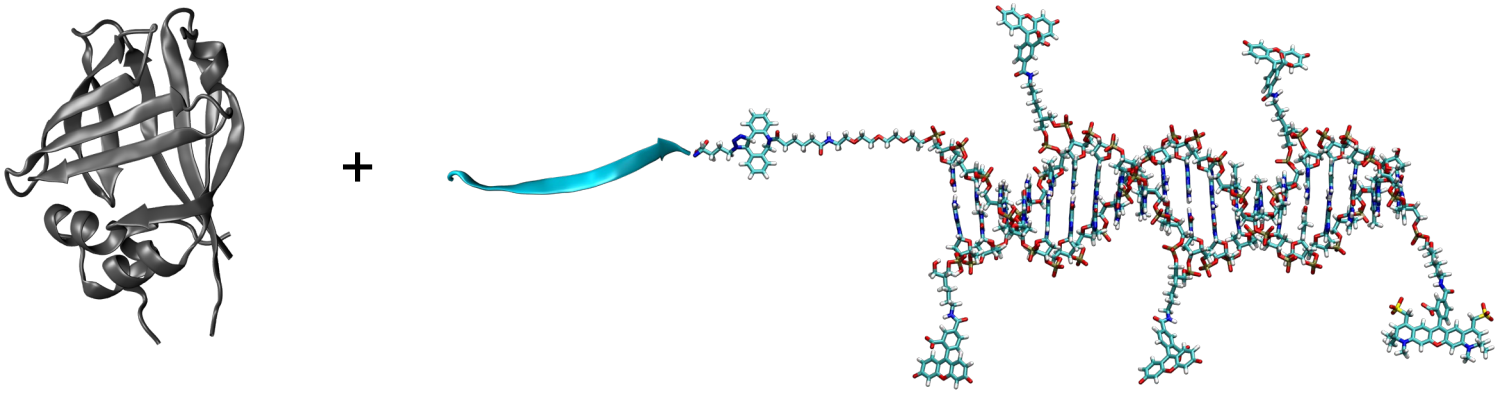


Peptide	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	K_D (M)*
86	-	V	S	G	W	R	L	F	K	K	I	S	-	0.7×10^{-9}
78	N	V	S	G	W	R	L	F	K	K	I	S	N	3.4×10^{-9}
79	N	V	T	G	Y	R	L	F	K	K	I	S	N	8.5×10^{-9}
99	-	V	T	G	Y	R	L	F	E	K	I	S	-	1.8×10^{-7}
128	-	V	T	G	Y	R	L	F	E	K	I	L	-	2.8×10^{-7}
NP	G	V	T	G	W	R	L	C	E	R	I	L	A	0.9×10^{-6}
104	-	V	E	G	Y	R	L	F	E	K	I	S	-	1.3×10^{-6}
101	-	V	T	G	Y	R	L	F	E	K	E	S	-	2.5×10^{-6}
114	-	V	T	G	Y	R	L	F	E	E	I	L	-	1.9×10^{-4}

A. S. Dixon, *et al., Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.

11アミノ酸のHiBitはLgBitフラグメントと高い親和性で再構成する

DNA足場BRETシステム



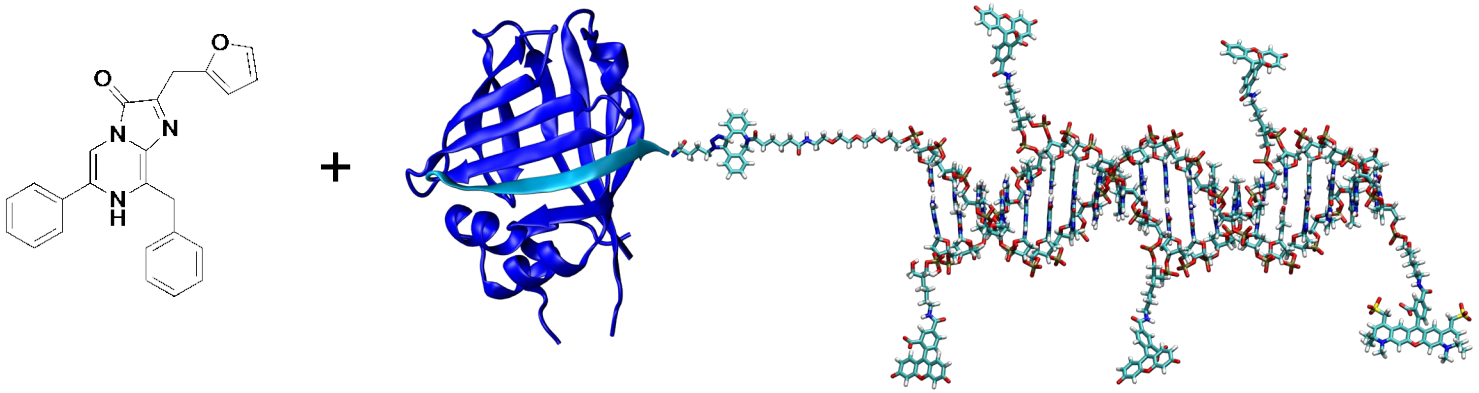
LgBit

HiBit-modified DNA/Dye-modified DNA

K_D = 0.7 nM*

*A. S. Dixon, et al., *Anal. Chem.* **2016**, *11*, 400-408.

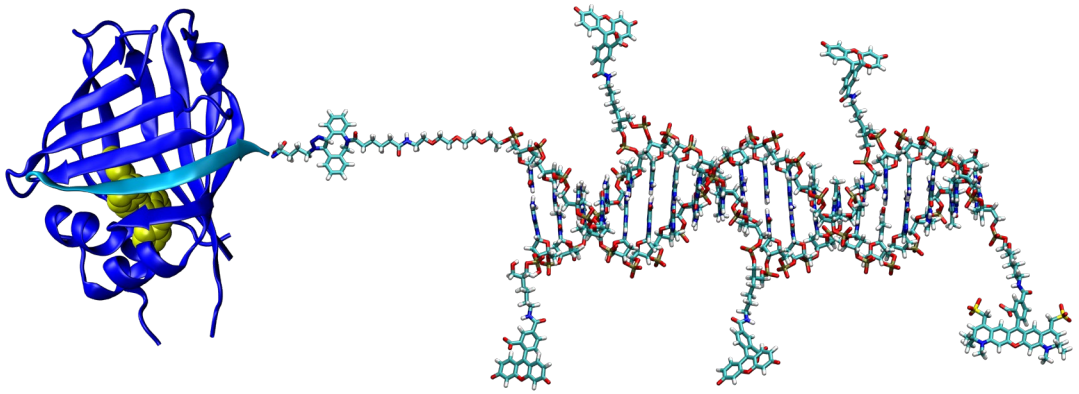
DNA足場BRETシステム



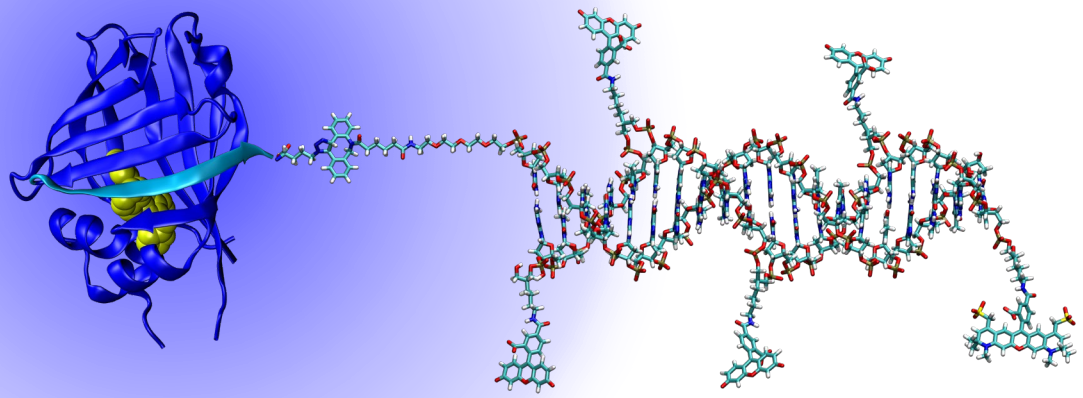
Furimazine

DNA足場BRETシステム

O_2 ＋

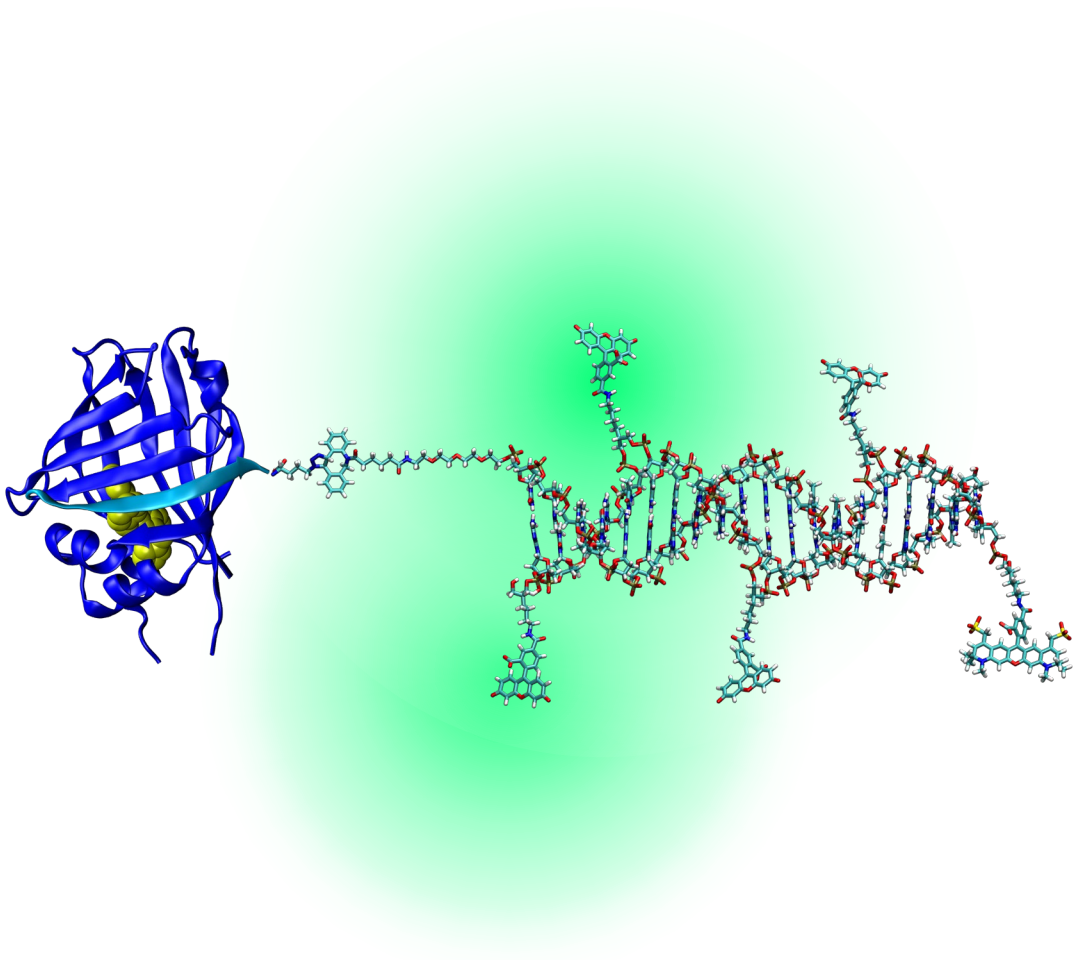


DNA足場BRETシステム

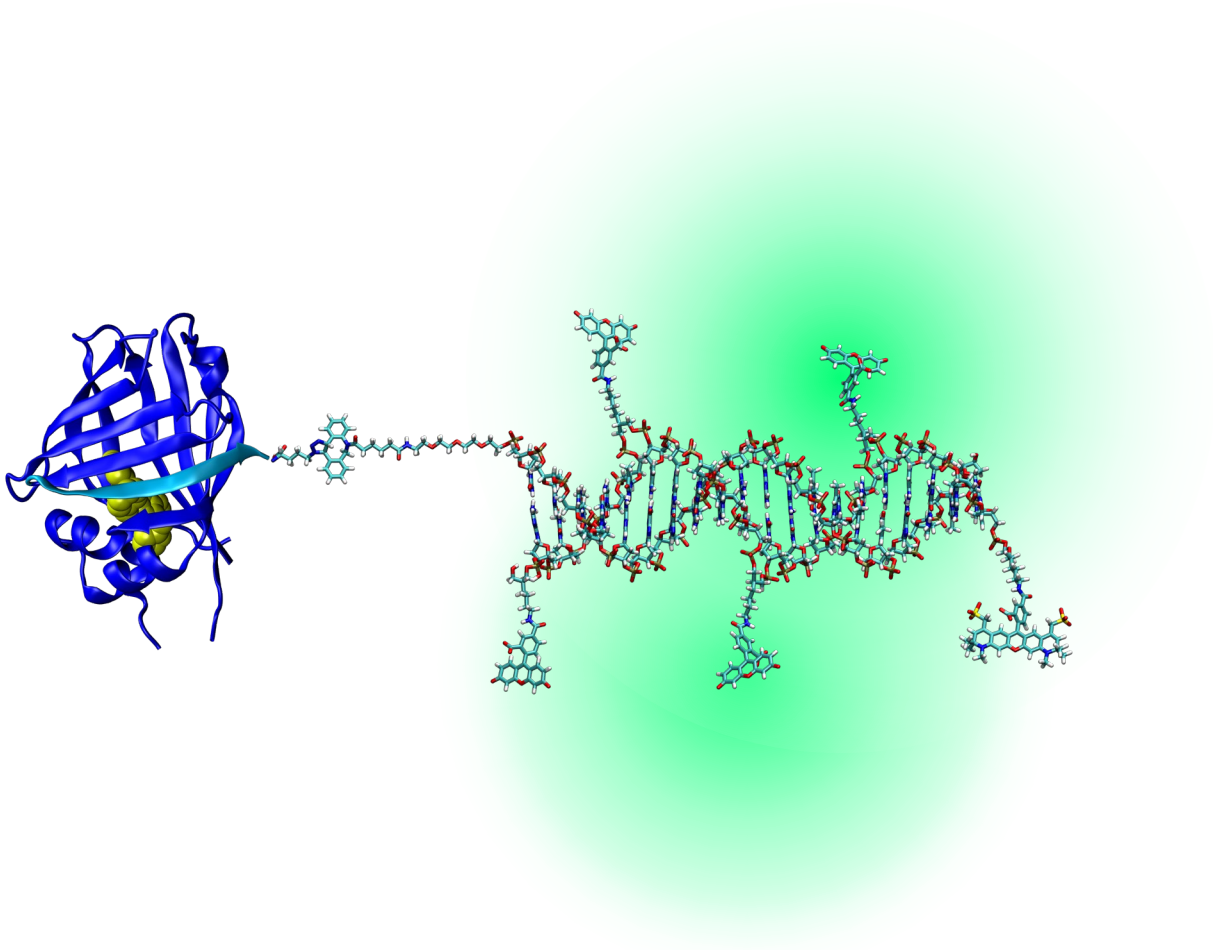


Range of Energy Transfer < 10 bp

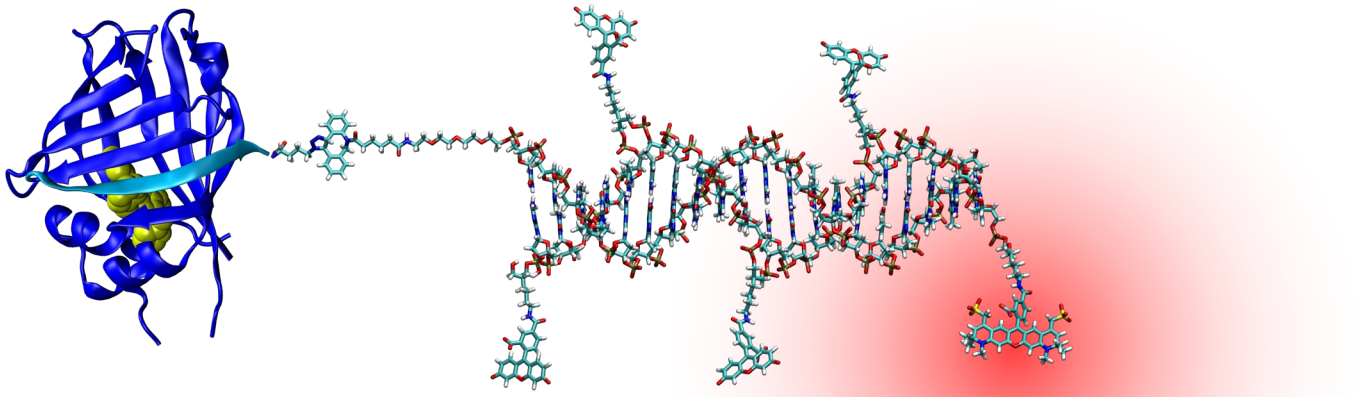
DNA足場BRETシステム



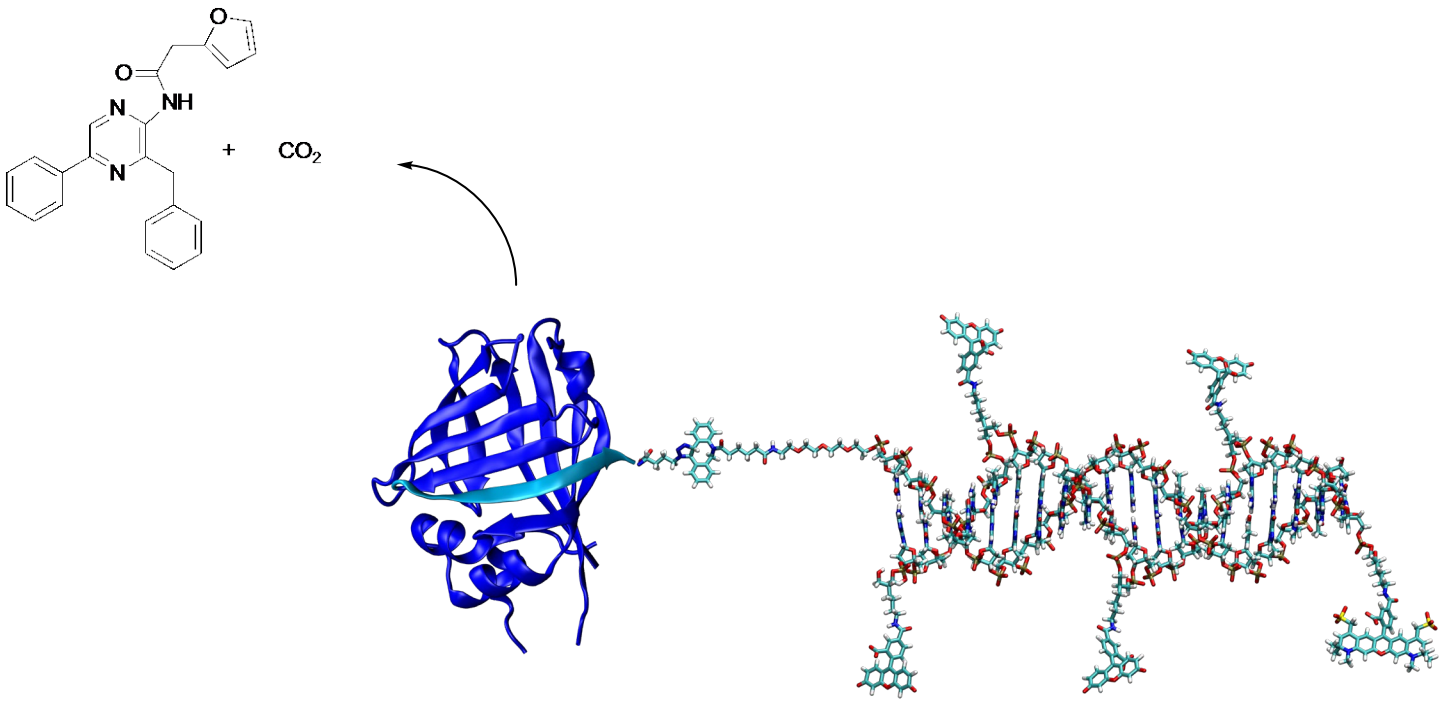
DNA足場BRETシステム



DNA足場BRETシステム



DNA足場BRETシステム



$k = 6.6\ s^{-1}$*

*Suzuki and Nagai et al., *Nature Commun.* **2016**, *7*, 13718.

VSGWRLFKKIS-5'-TAAGAGGCTGGGTTTTGCTC-3’

Complementary DNA

X-3’-ATTCTCCGACCCAAAACGAG-5’

X: FAM

VSGWRLFKKIS-5'-TAAGAGGCTGGGTTTTGCTC-3’

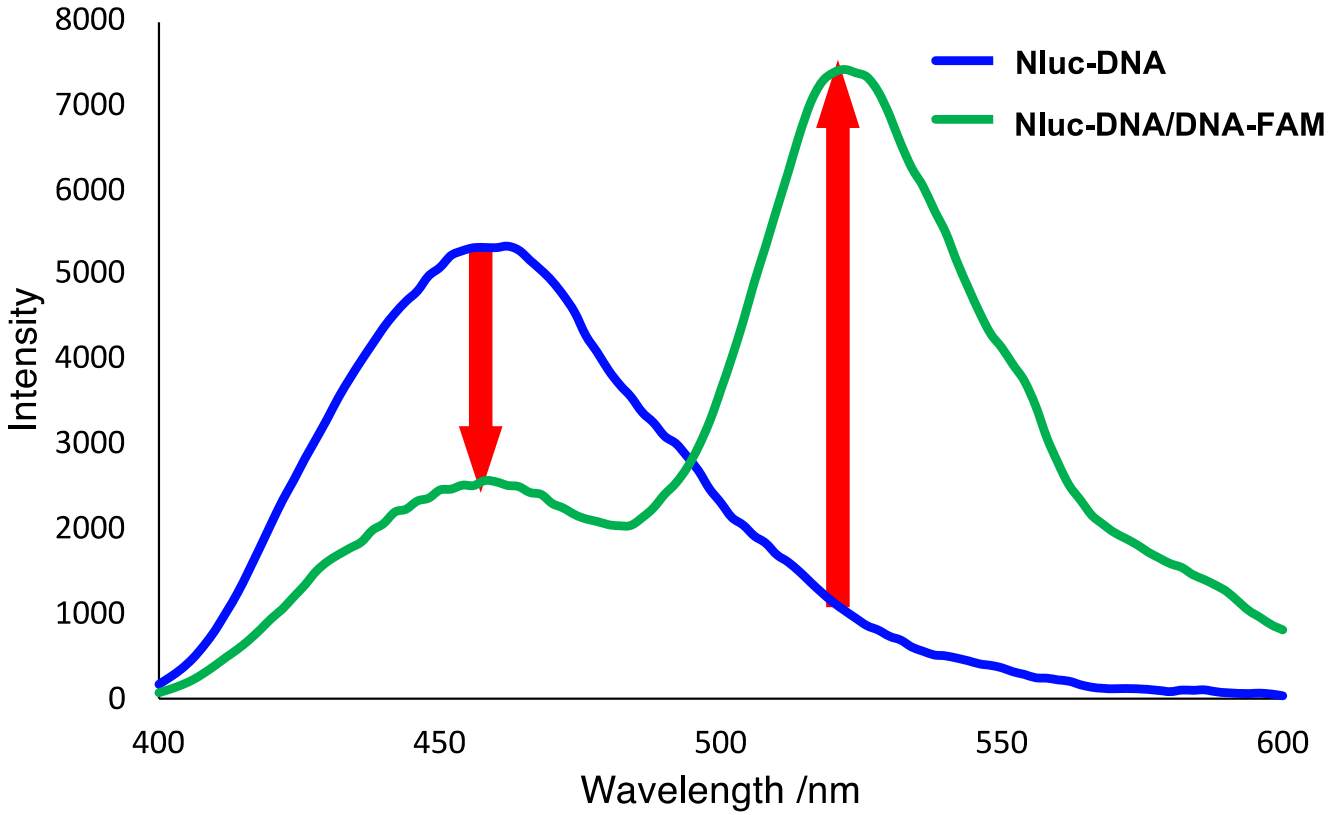
X-3’-ATTCTCCGACCCAAAACGAG-5’

+LgBit

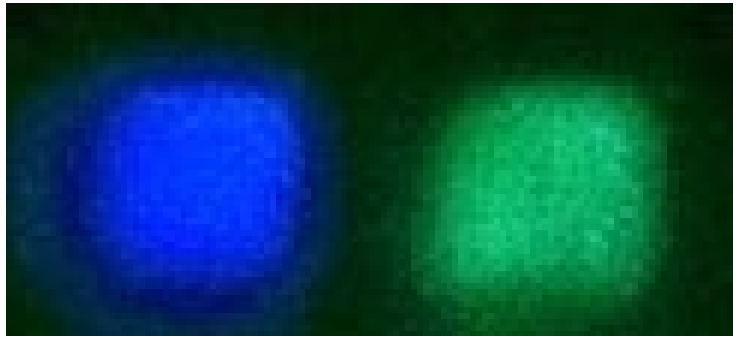
NanoLuc-5'-TAAGAGGCTGGGTTTTGCTC-3’

X-3’-ATTCTCCGACCCAAAACGAG-5’

緑色発光への変調



FAM無し　FAM有り

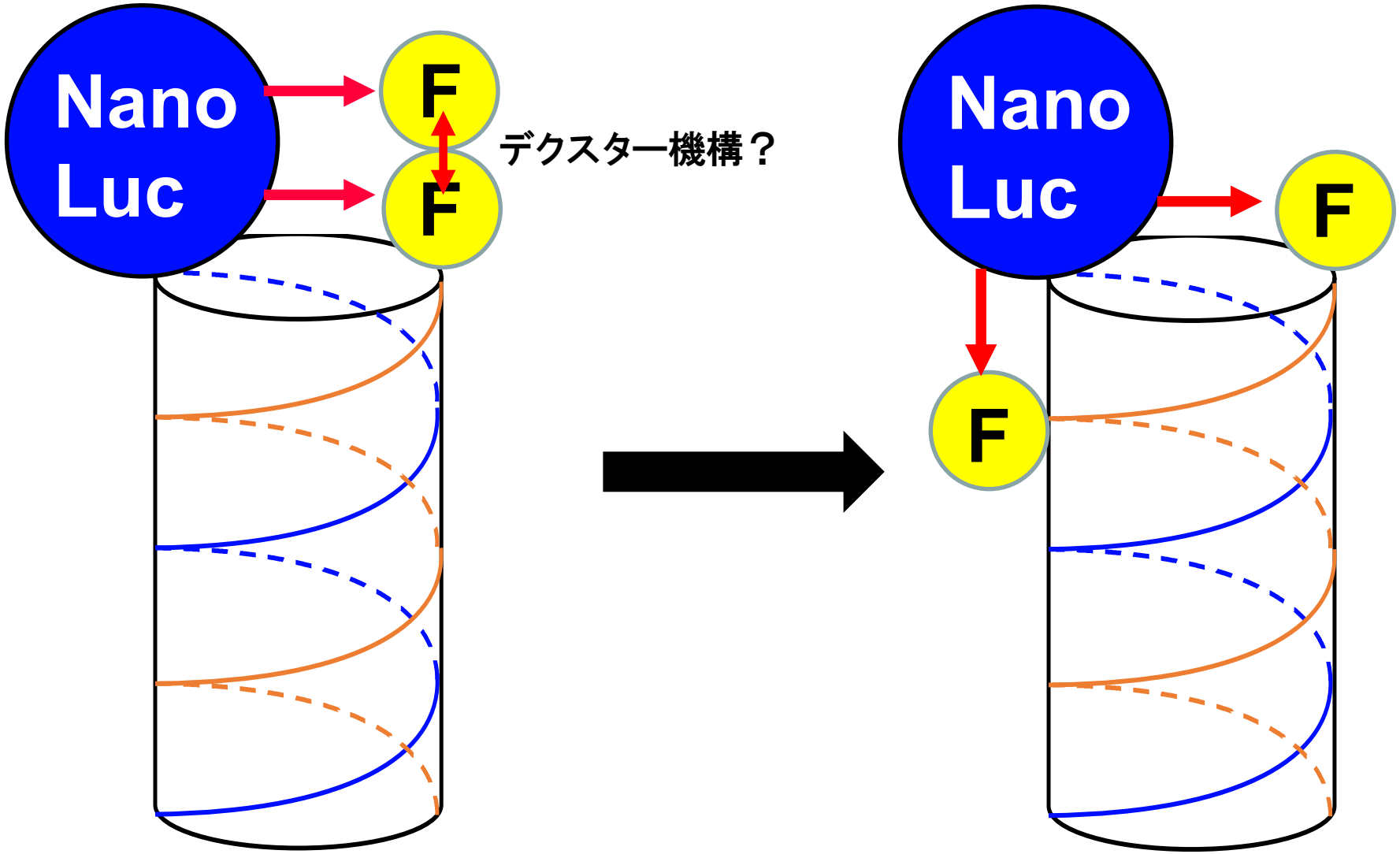


iPhoneで撮影した

Nlucの発光が52%消光し、大きなFAM蛍光が生じた

Int_{458} = 2587, Int_{522} = 7425, Int_{522}/Int_{458} = 2.9

2分子目のFAM導入



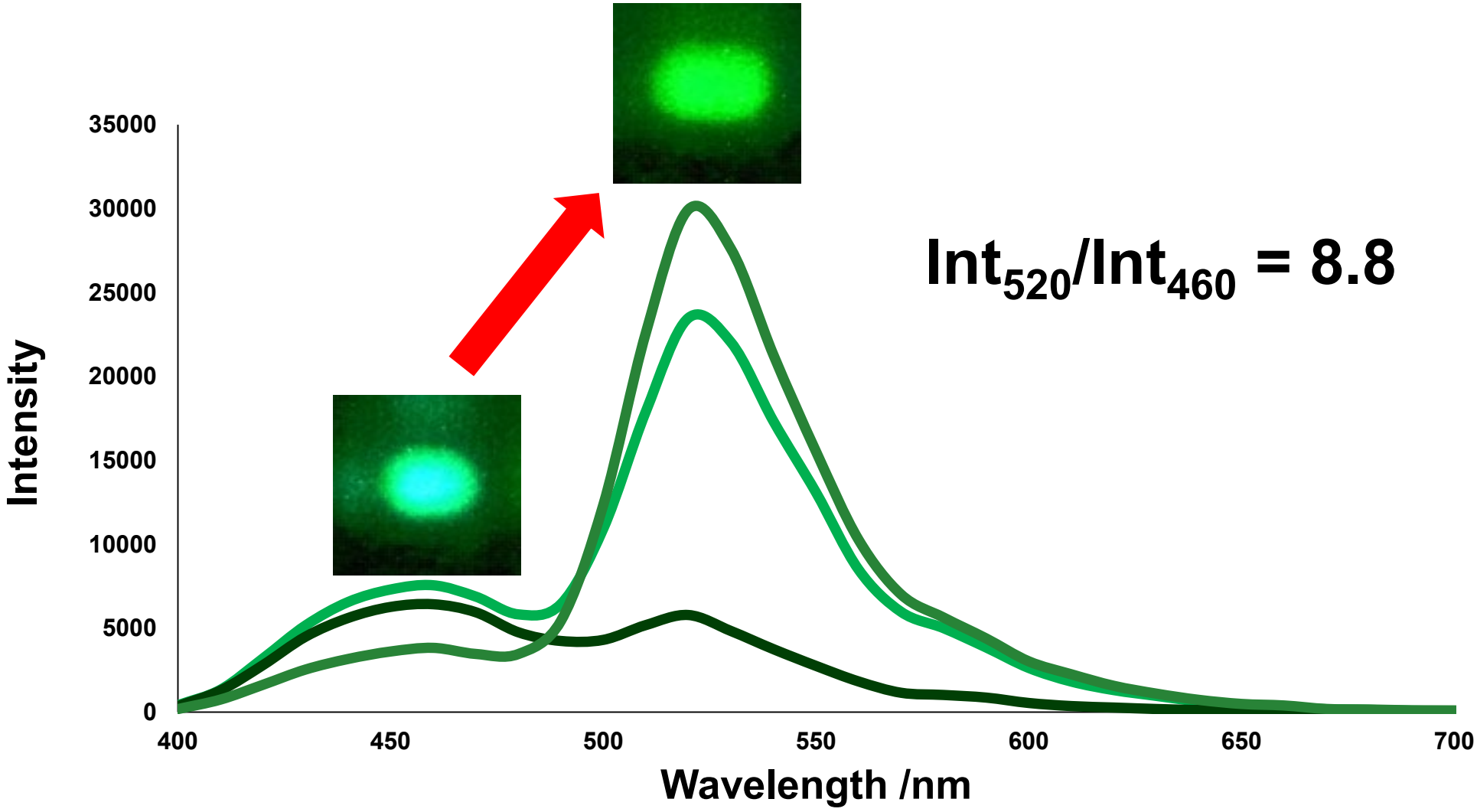
DNA-2FAM

DNA-FAM (Int FAM)

4残基離してdTの塩基にFAMを導入した

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

2分子目のFAM導入



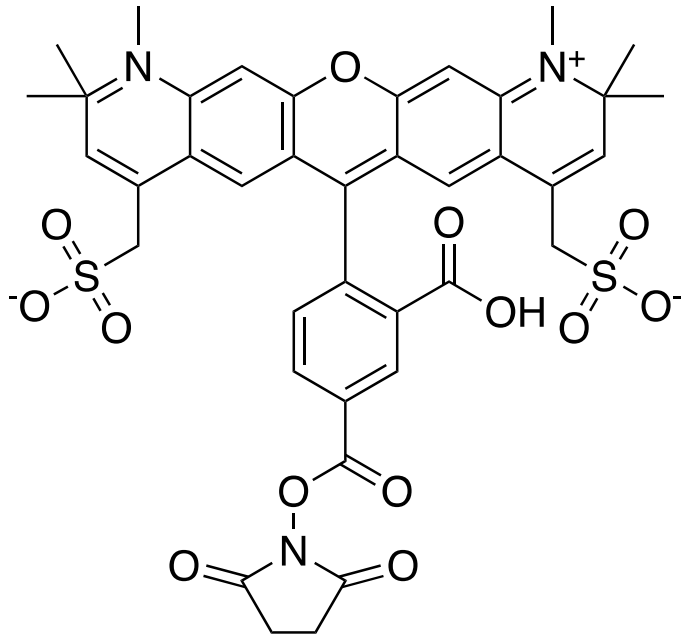
非常に鮮明な緑色発光を実現

赤色蛍光色素へのBRET

- DNA-Alexa594

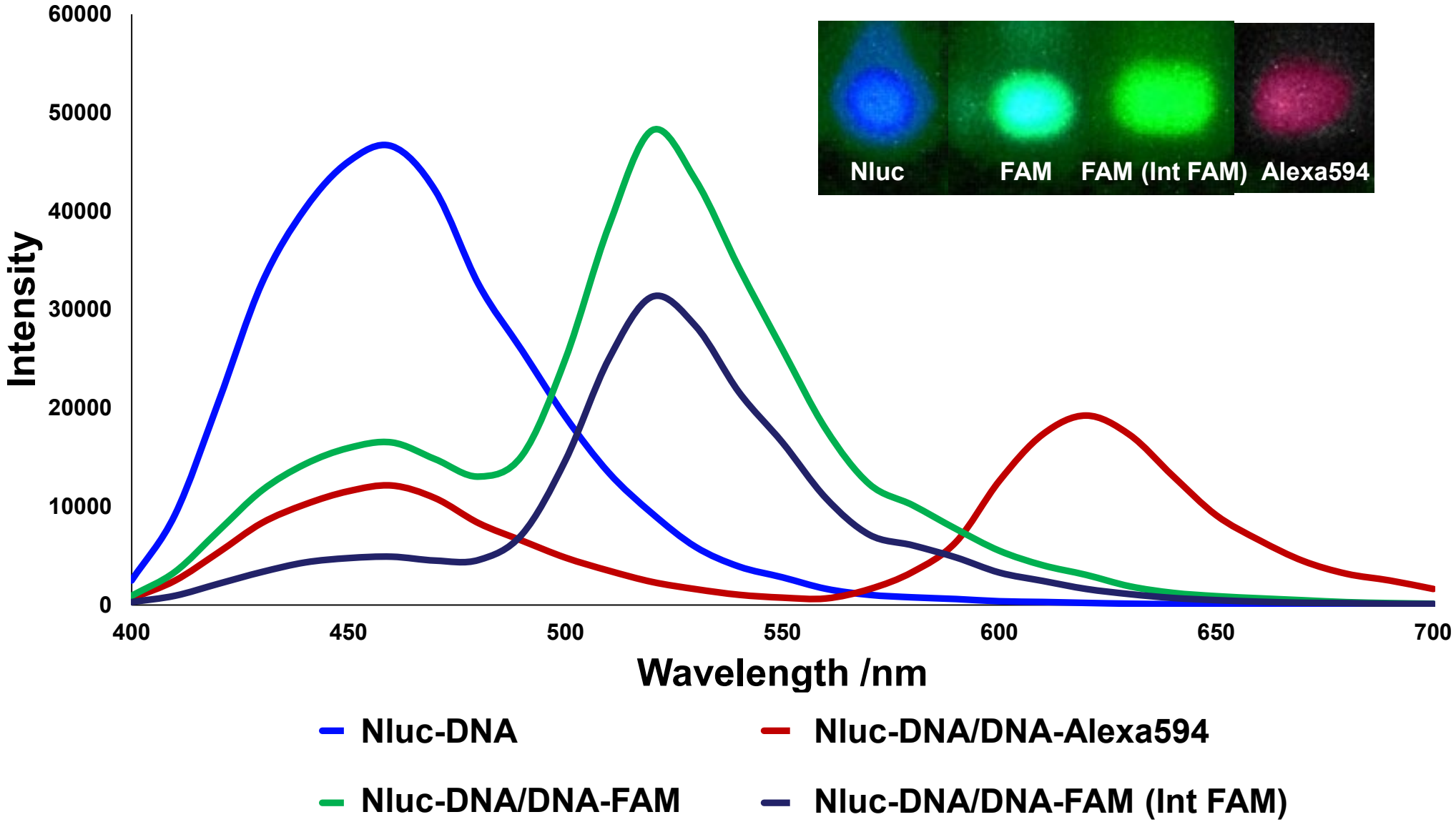
5'-GAGCAAAAACCCAGCCTCTTA-Z-3'

Z : Alexa594



Ex = 594, Em = 617

赤色蛍光色素へのBRET

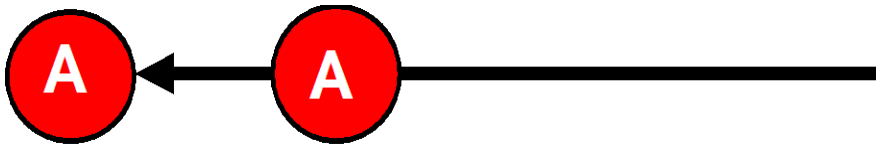


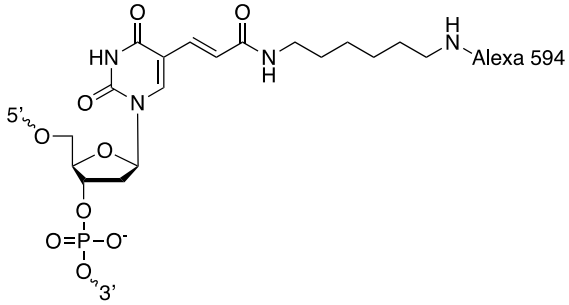
波長を自由に変調可能

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

より鮮明な赤色発光の実現

c123-DNA-Alexa594 (Int Alexa594)

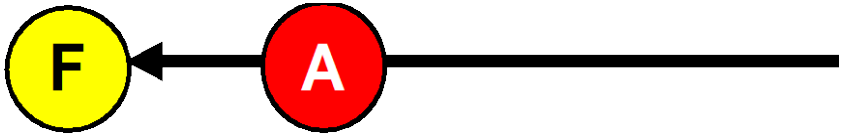


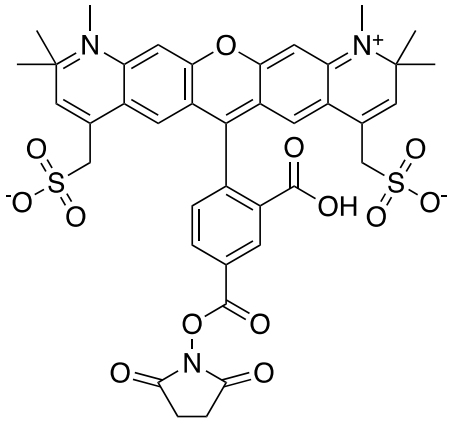


Int Alexa 594 Modifier C6 dT

5’-GAGCAAAACCCAGCC/IntAlexa594T/CTTA-Alexa594-3’

c123-DNA-FAM (Int Alexa594)



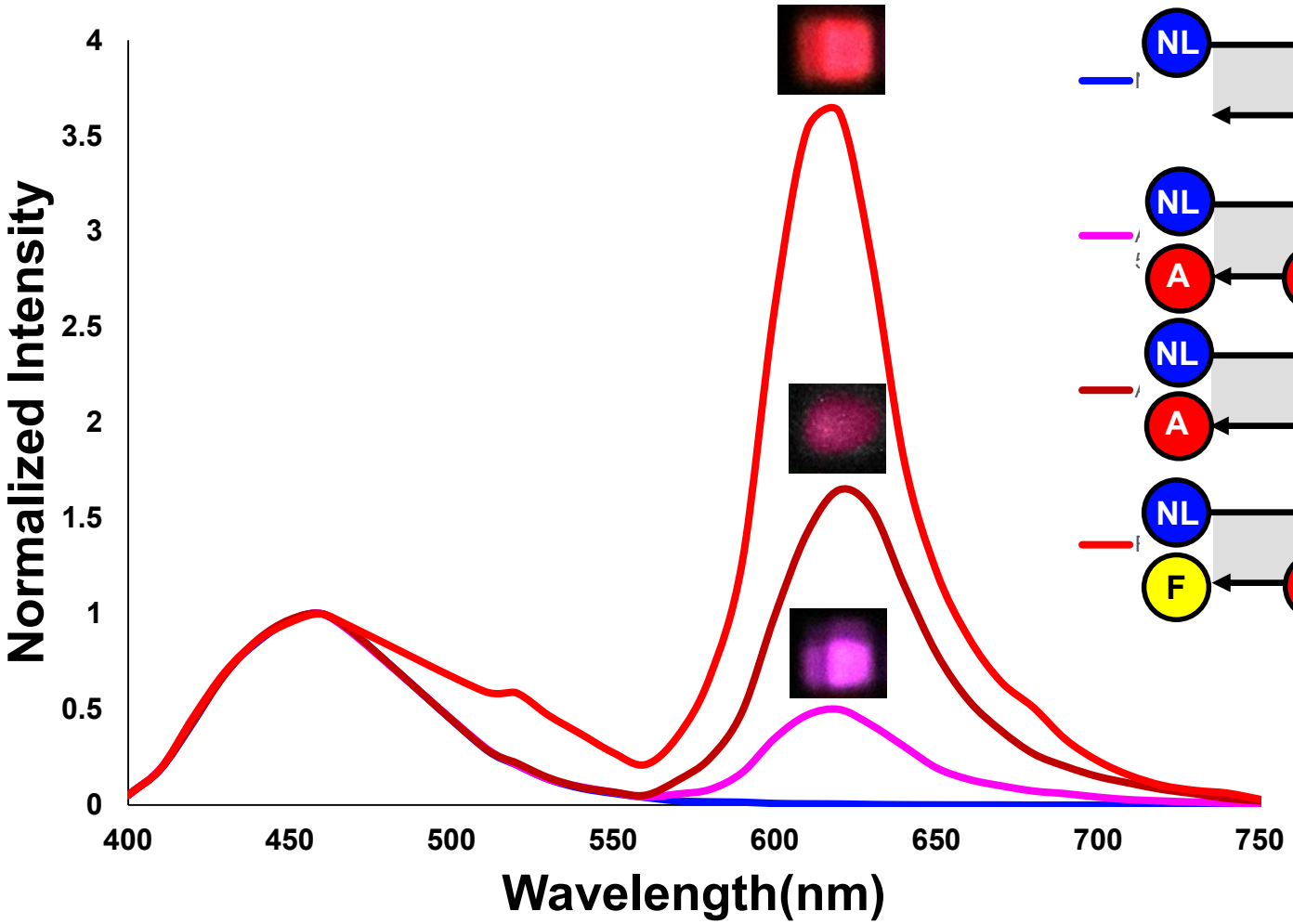


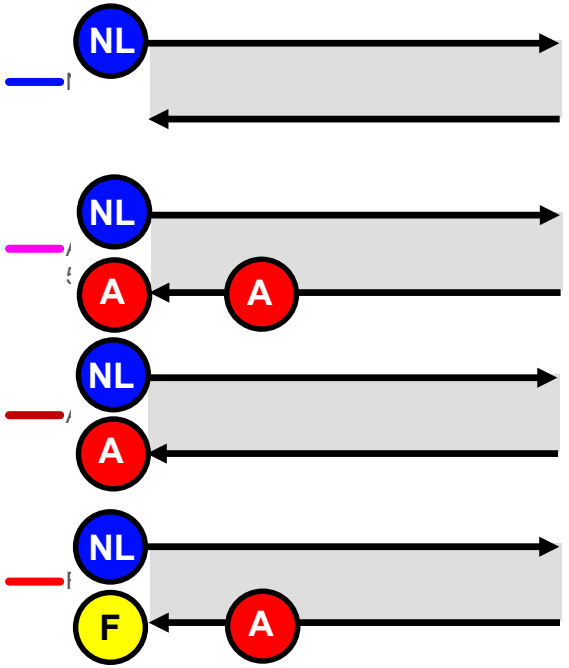
Alexa 594

Ex. = 594
Em. = 617

5’-GAGCAAAACCCAGCC/IntAlexa594T/CTTA-FAM-3’

より鮮明な赤色発光の実現





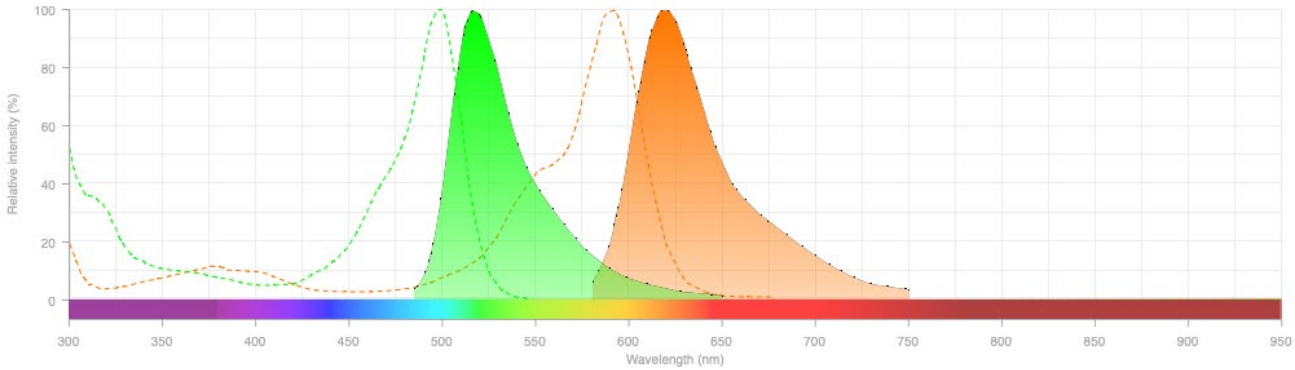
強度比

-

0.50

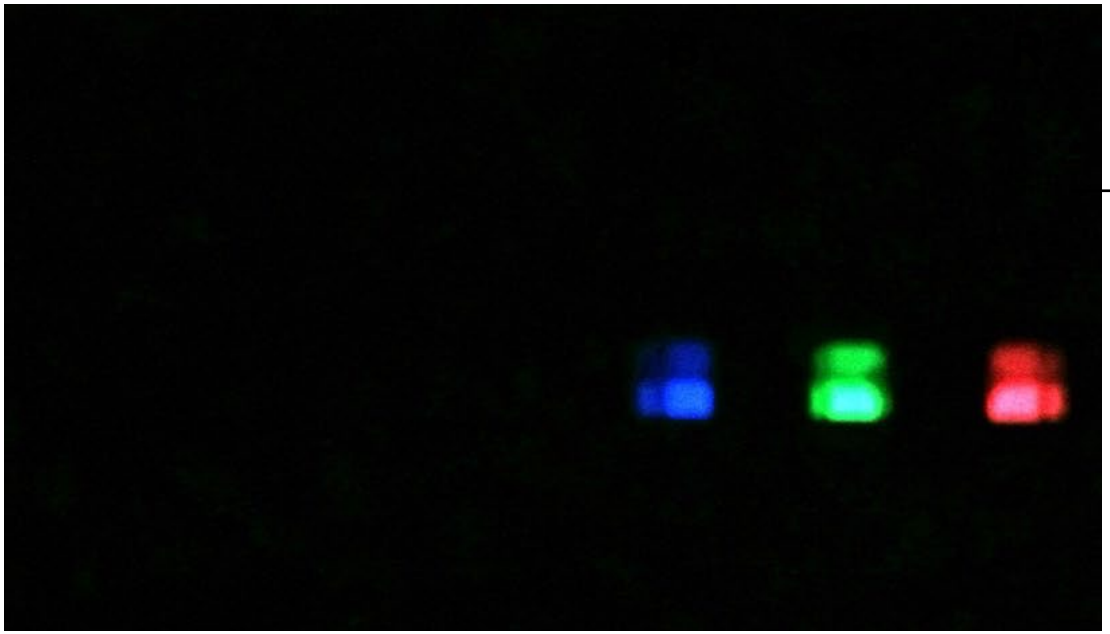
1.64

3.62



新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

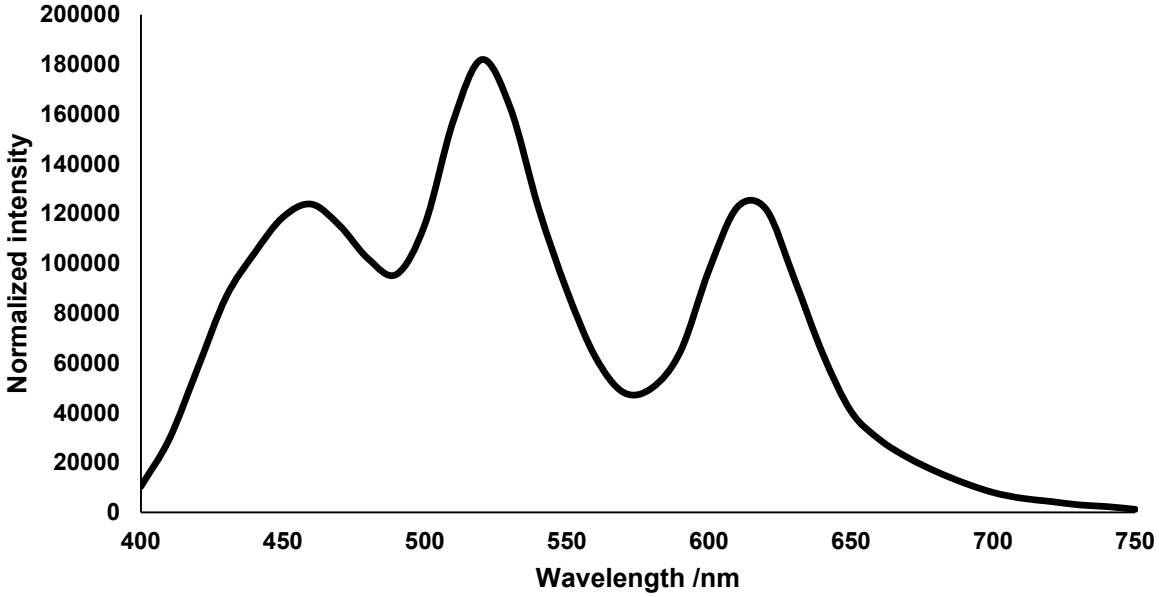
RGBの混合によるマルチカラー発光

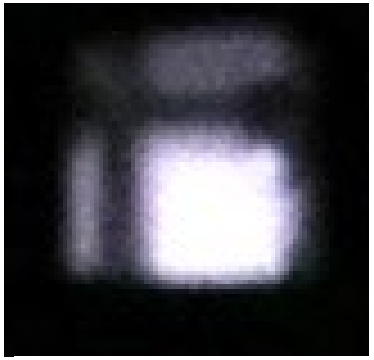


Wavelength (nm)	Blue Intensity	Green Intensity	Red Intensity	SUM
460 nm	1.00	0.104	0.257	1.36
520 nm	0.218	1.00	0.154	1.37
620 nm	0.00491	0.0485	1.00	1.05

この数値をもとに液量を調整

Red 9.5 μL
Green 10.0 μL
Blue 13.5 μL

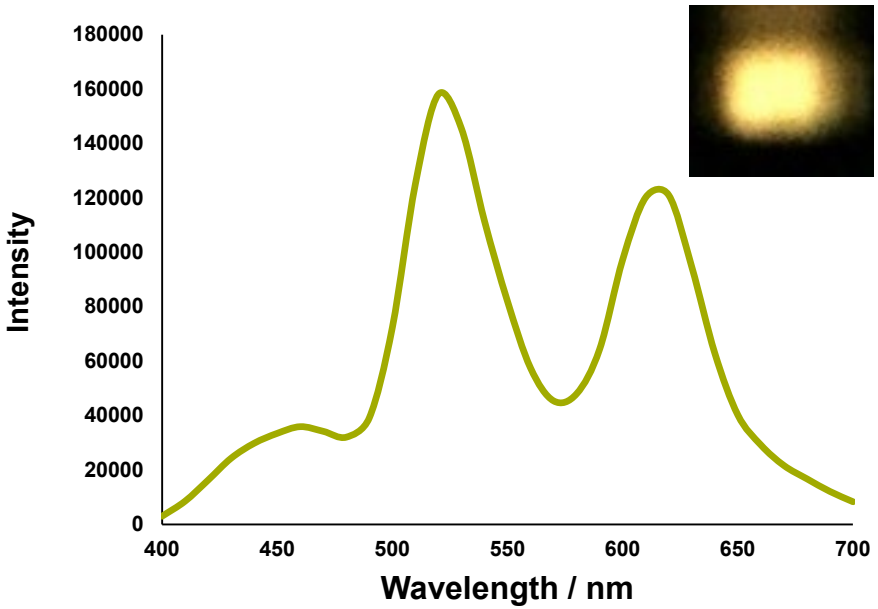




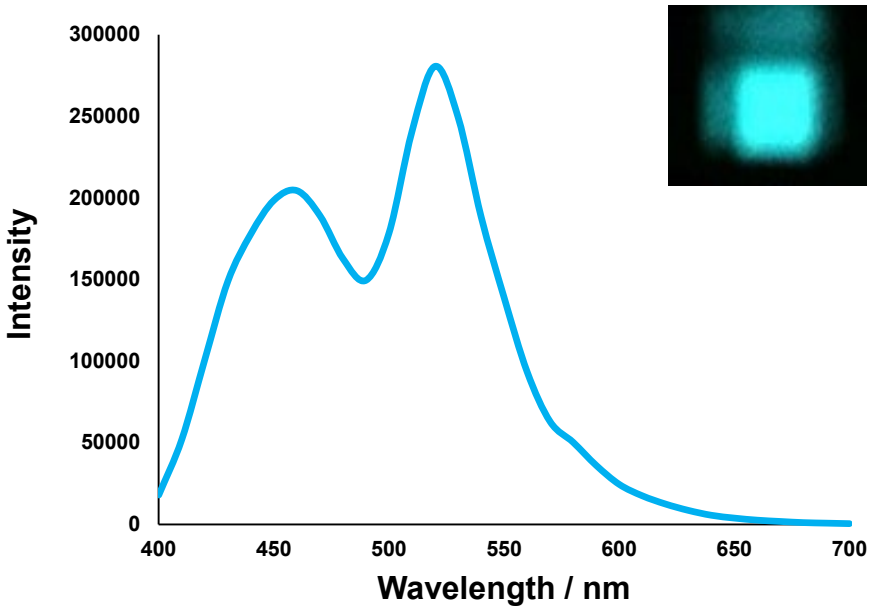
iPhoneで撮影

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

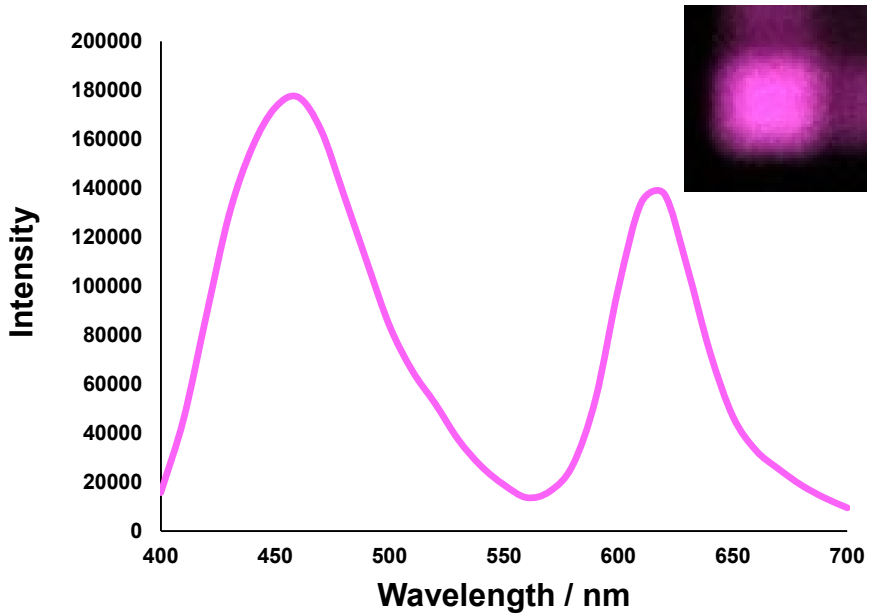
RGBの混合によるマルチカラー発光



R : G = 1.35 : 1



G : B = 1 : 0.95

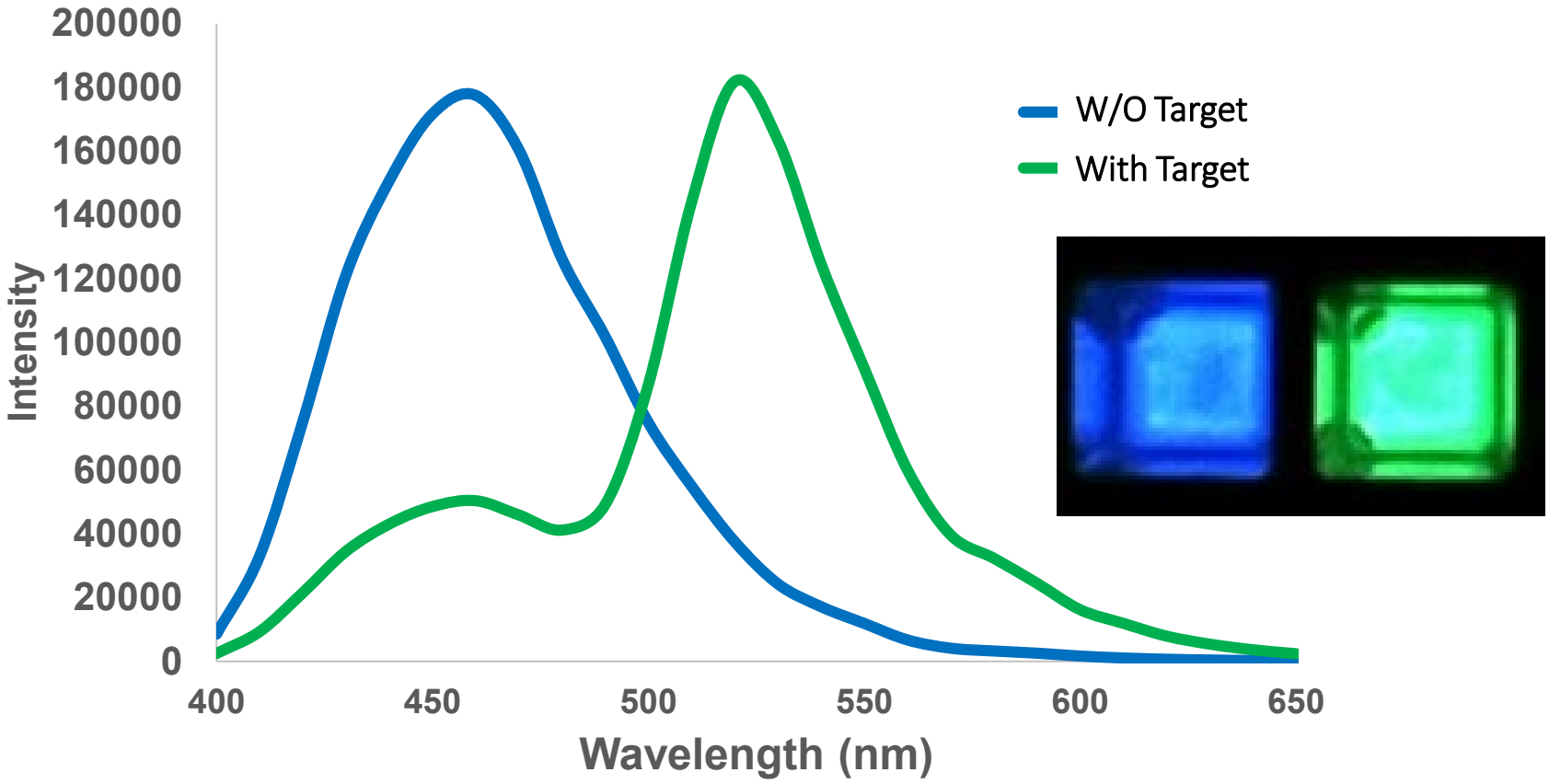


R : B = 1.35 : 0.95

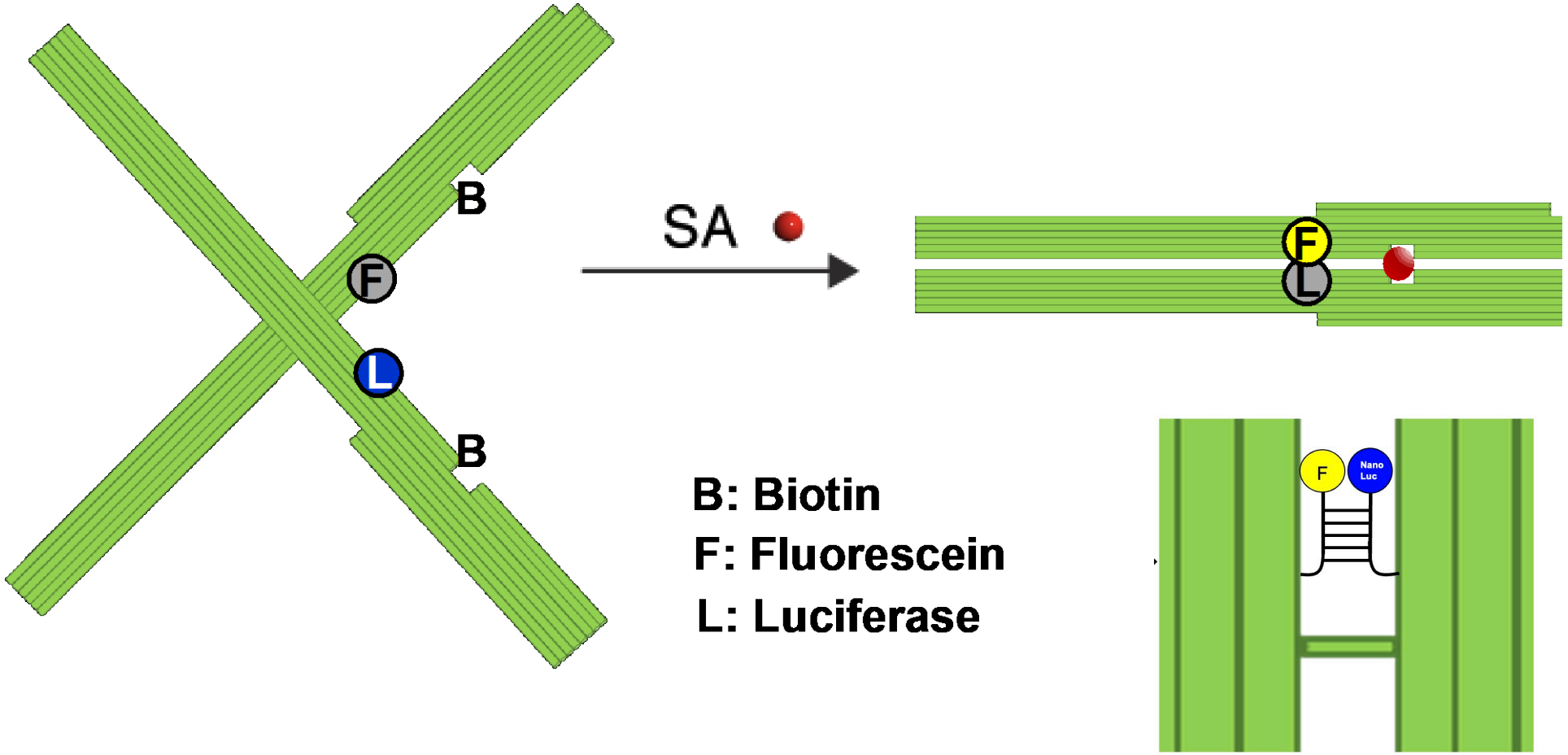
DNAオリガミ（直径約100 nm）上に255分子集積することで、1620万色のフルカラー表示も可能と期待される

一本鎖核酸の検出


BRET
Nano Luc
F
Nano Luc
F

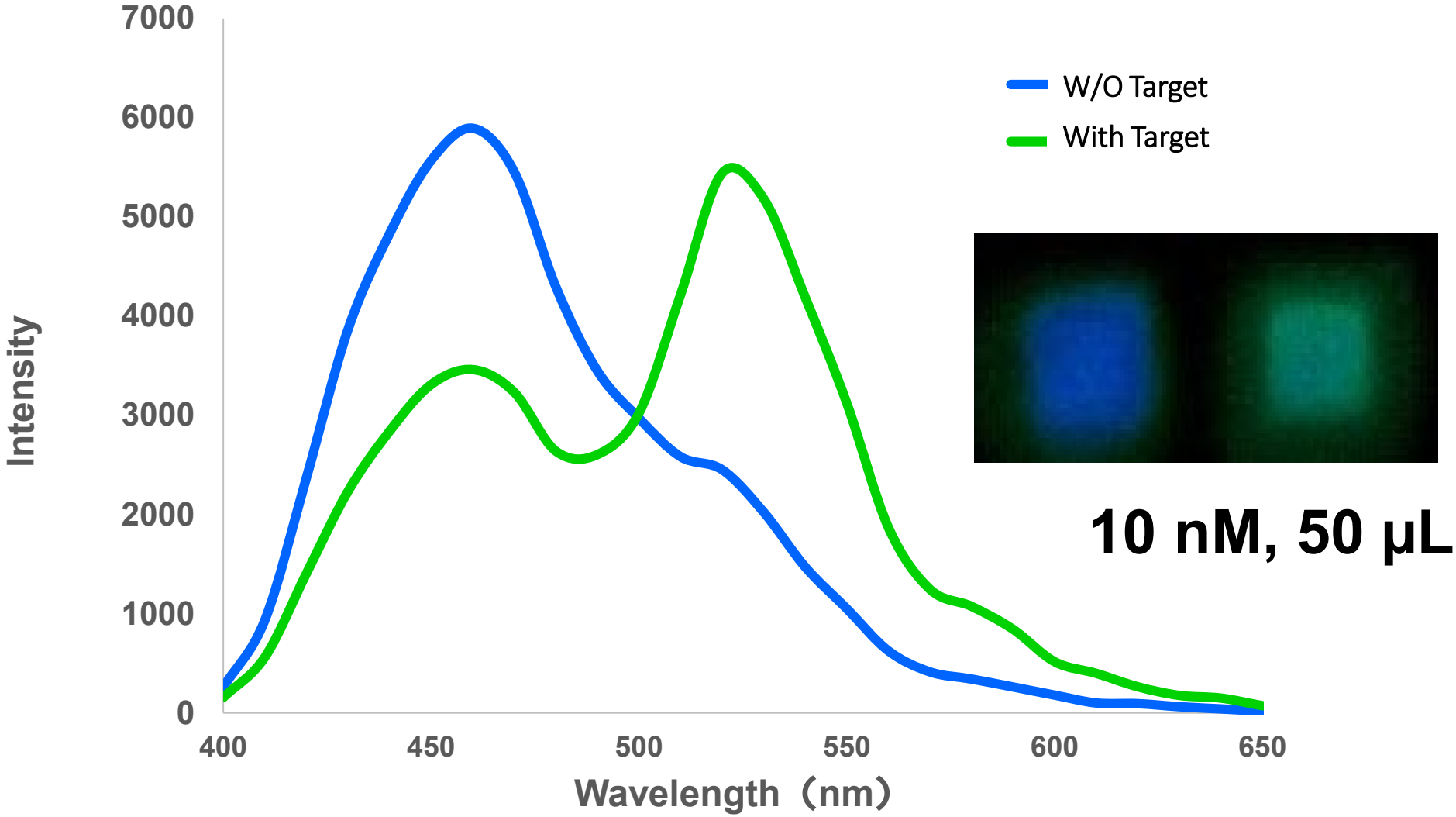

200000
180000
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Intensity
400
450
500
550
600
650
Wavelength (nm)
W/O Target
With Target

DNA Origamiの修飾



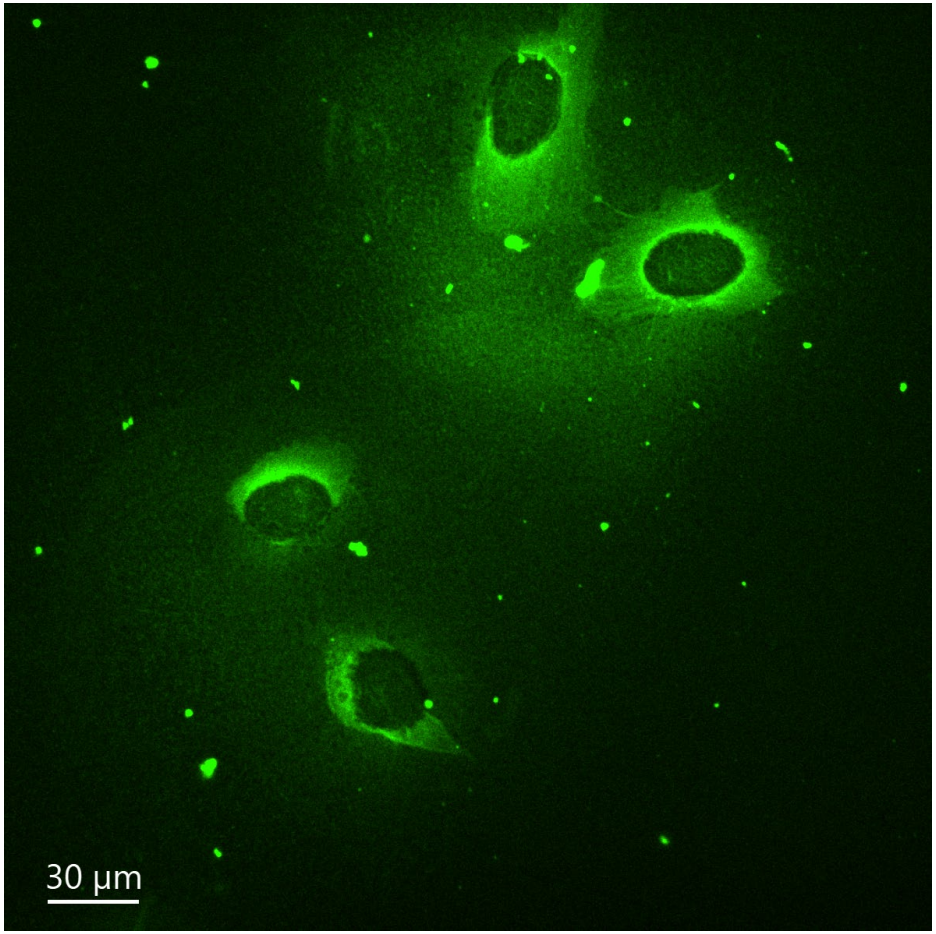
ターゲット分子を摘まんで閉じるDNAオリガミ分子機械に導入

DNA Origamiの修飾

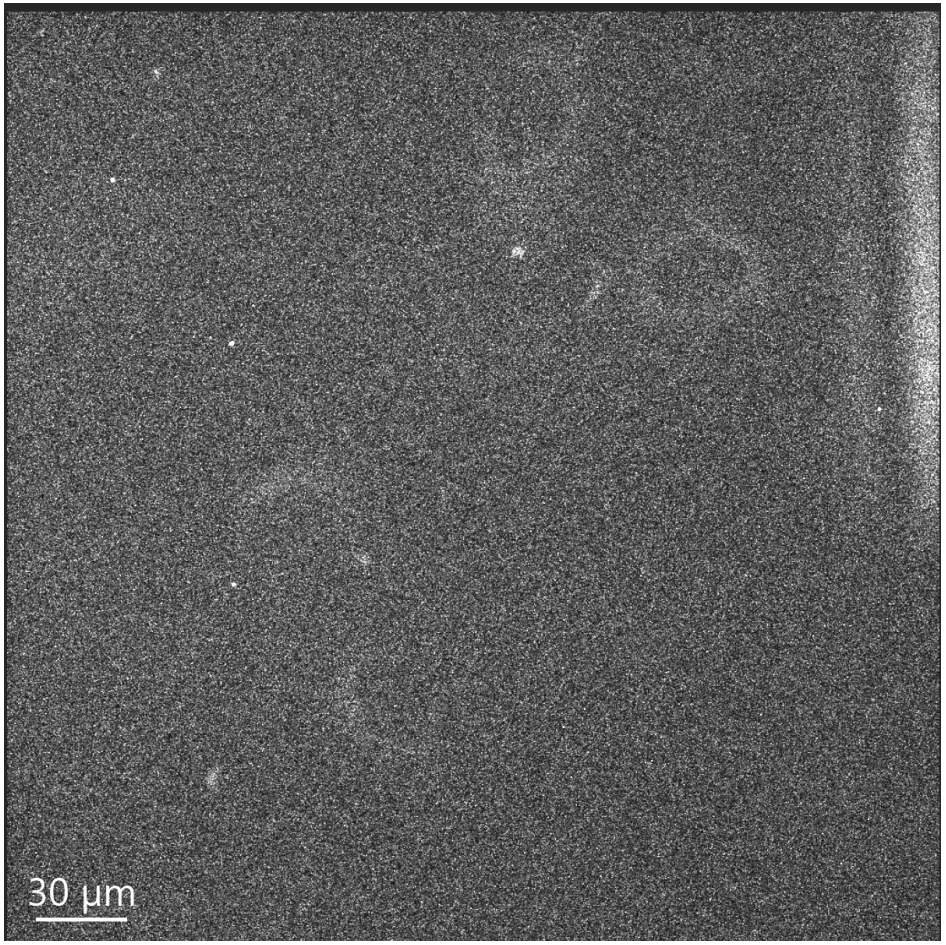


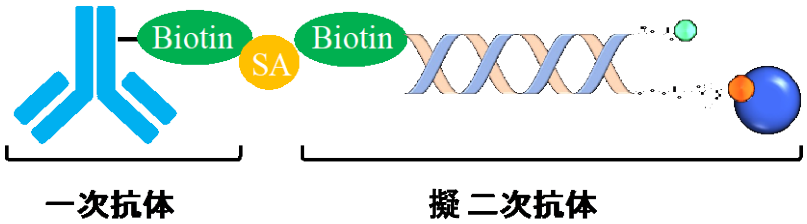
免疫染色試薬としての応用

FAM 488 nm 500 ms



1×Furimazine添加 50 s

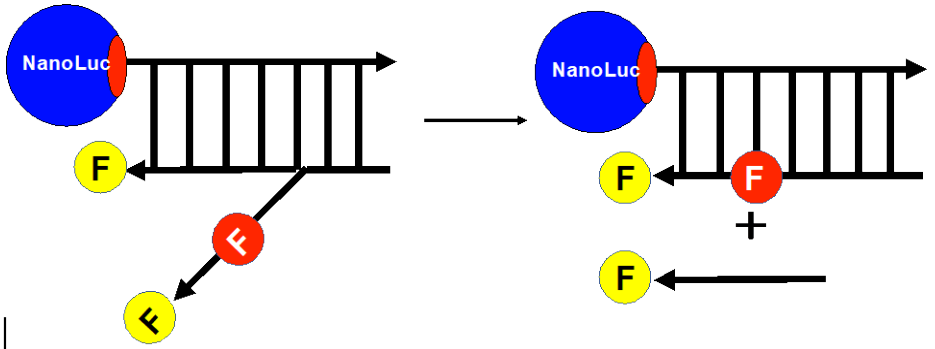


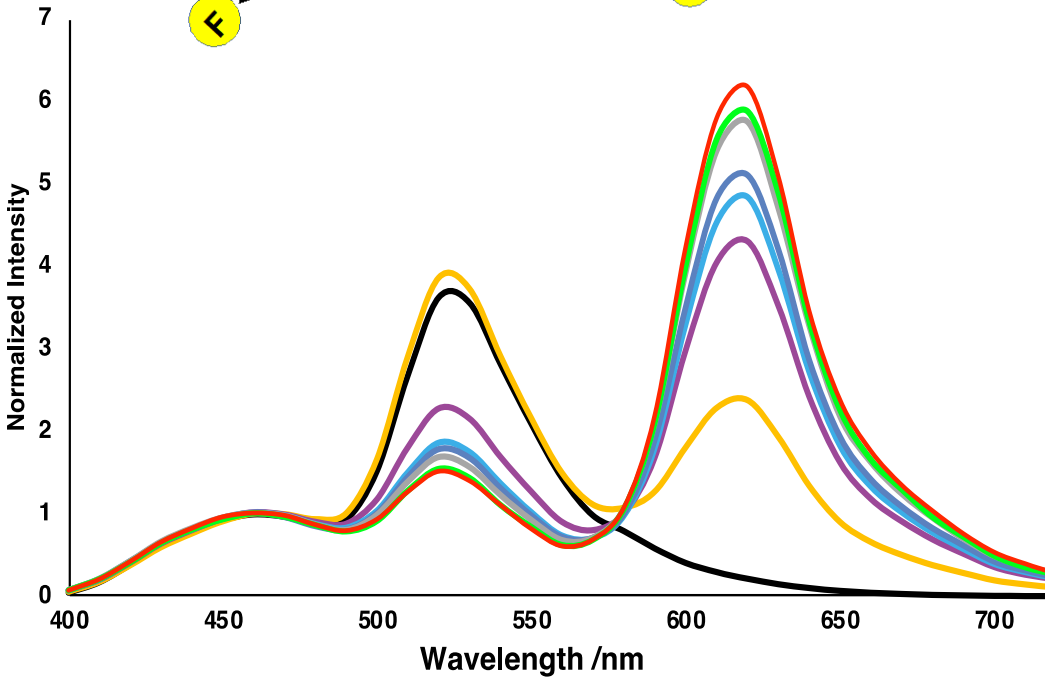


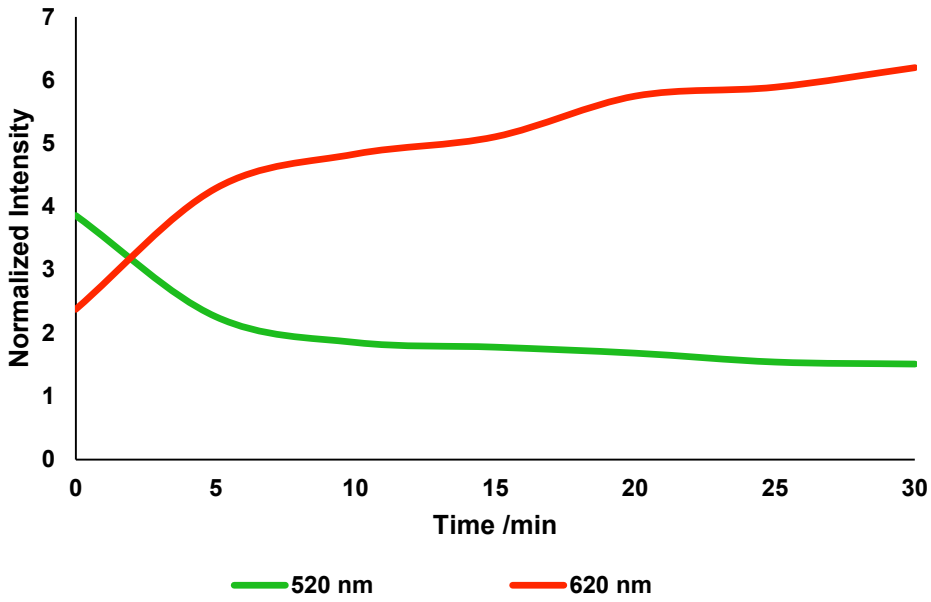
鎖置換反応による波長変調

・Nluc-DNA/DNA-FAM (Int Alexa594) の系

緑色→より鮮明な赤色





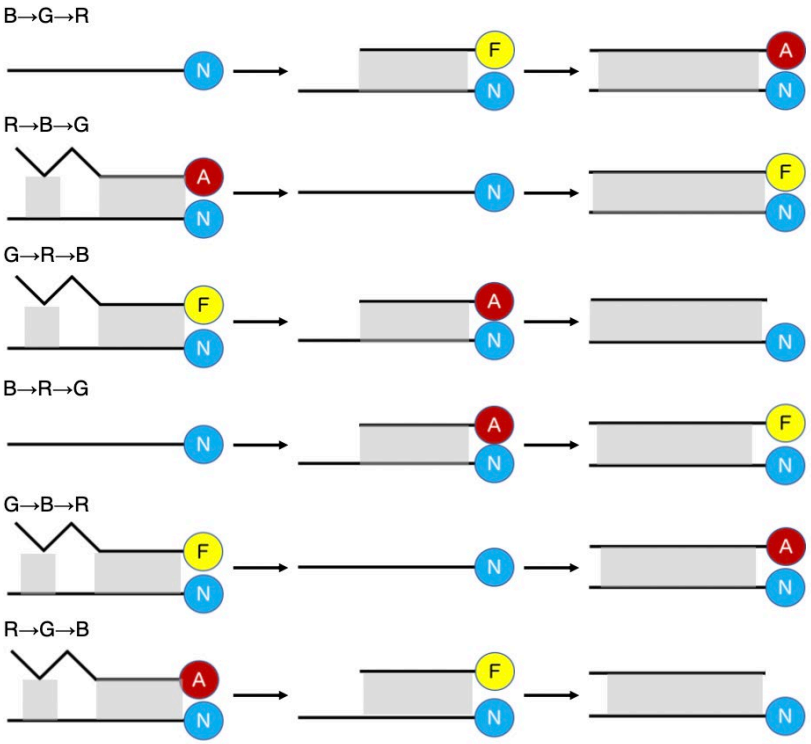


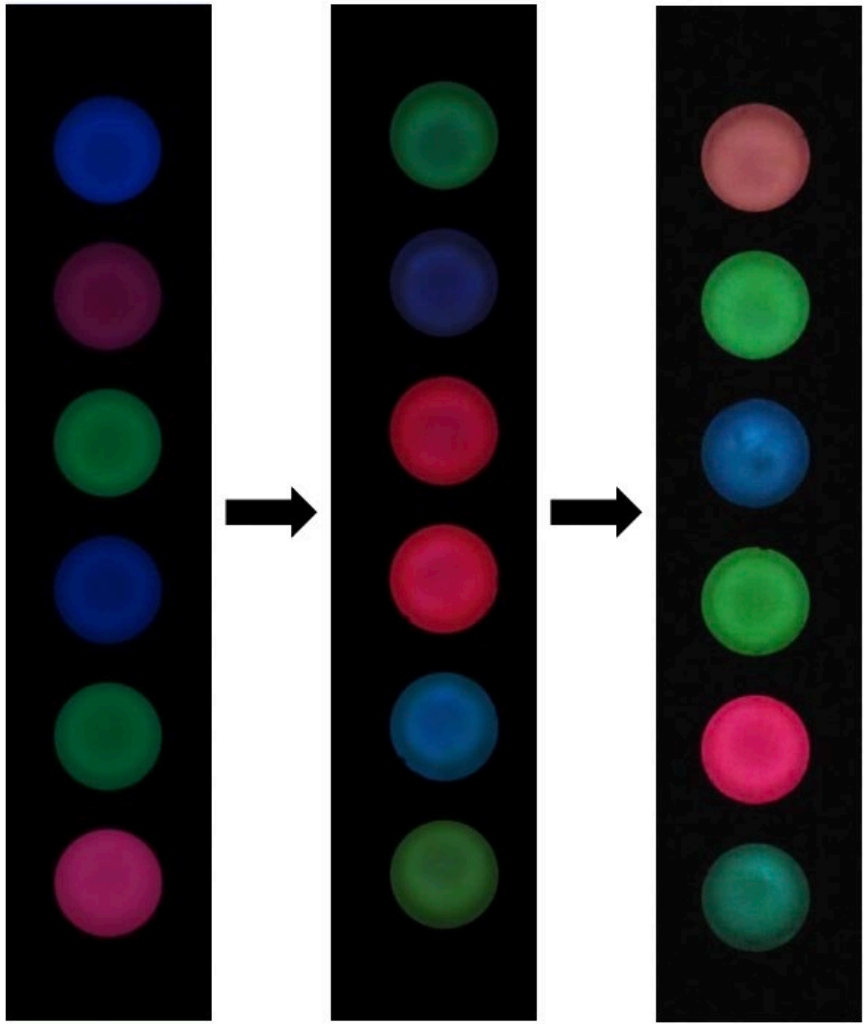
時間における発光強度比は520 nmの減少に伴い、620 nmが増加した

新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

鎖置換反応による波長変調

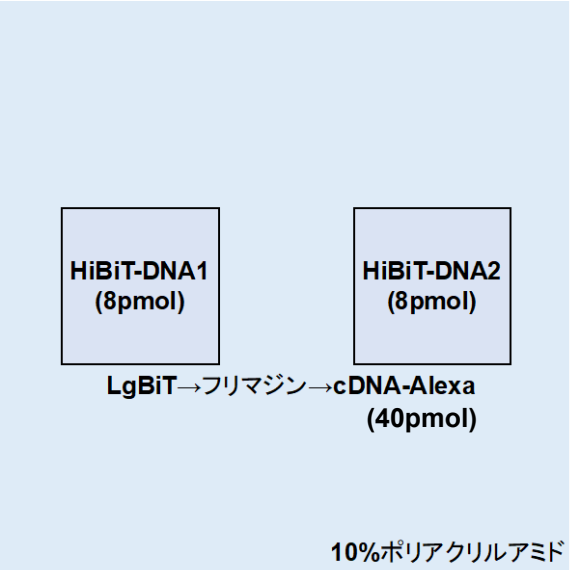
鎖置換反応による波長変調

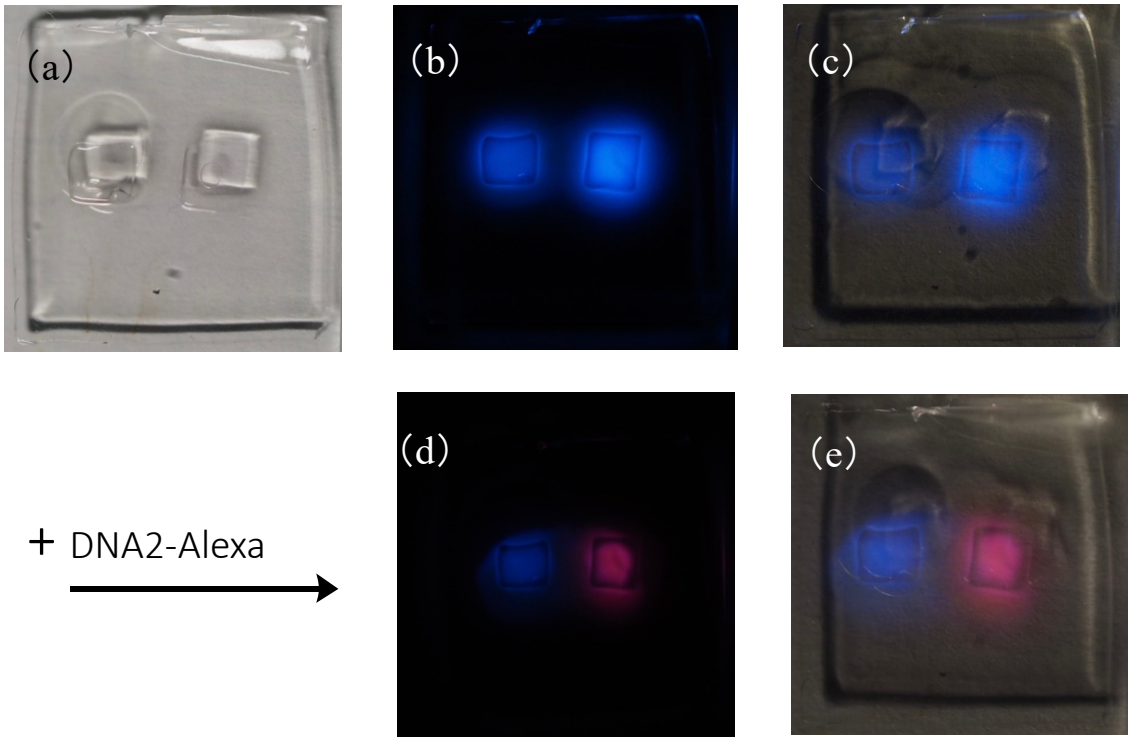




6 h　　1 d

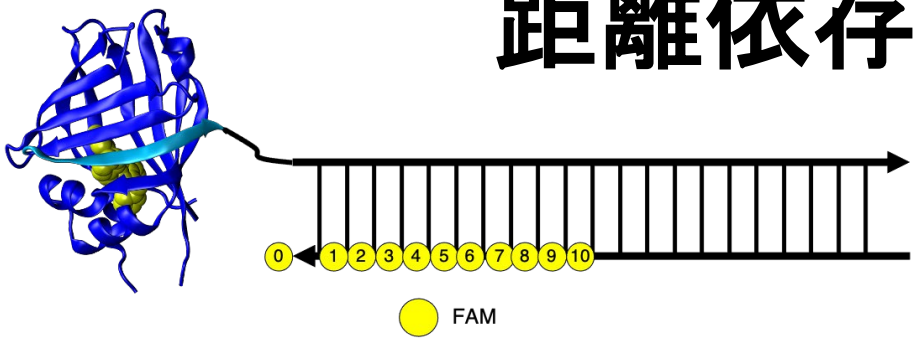
生物発光ゲルディスプレイのプロトタイプ

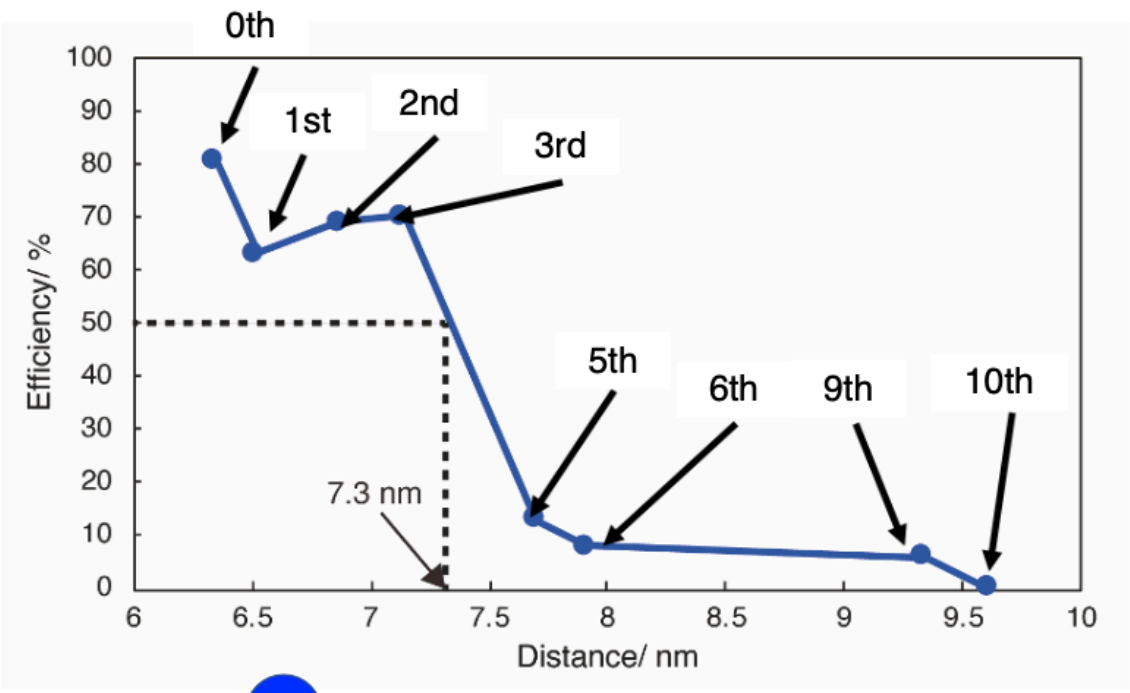


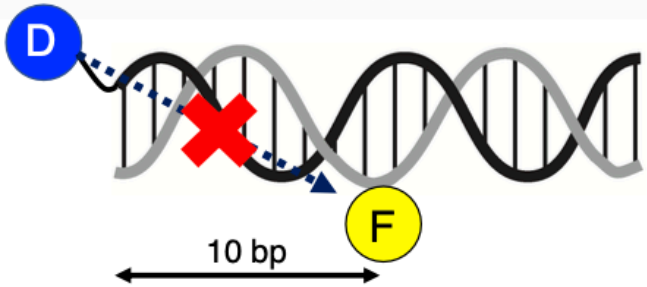


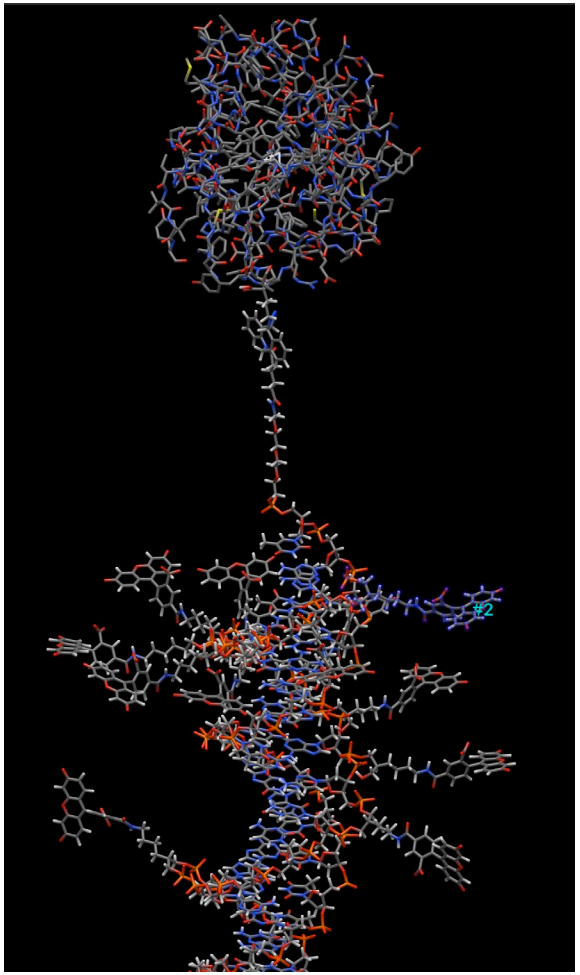
使い捨てコンタクトレンズ内表示デバイス？

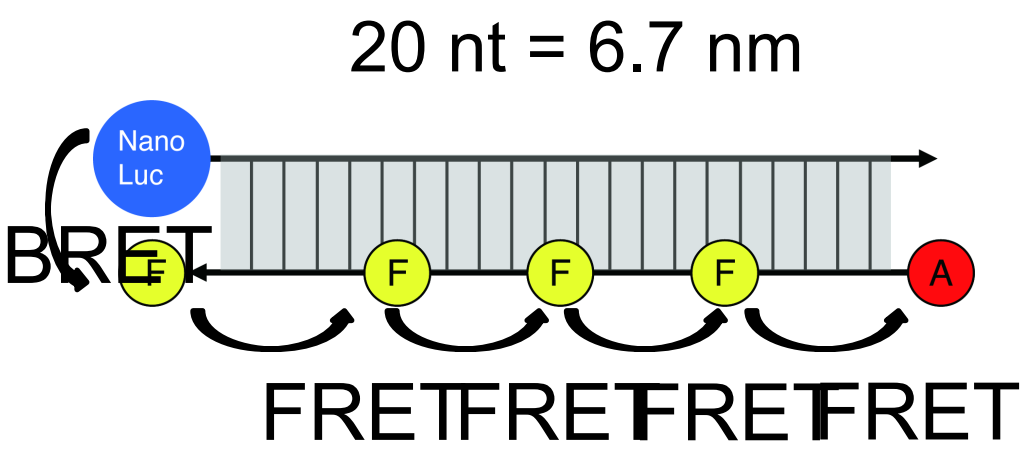
距離依存性

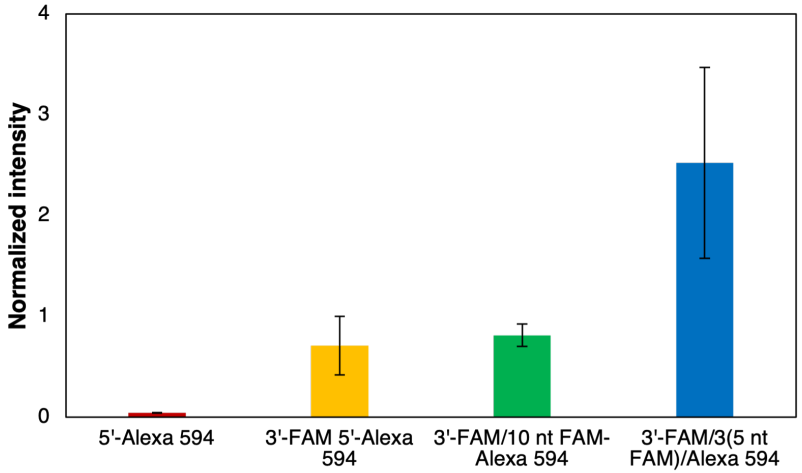

0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
FAM

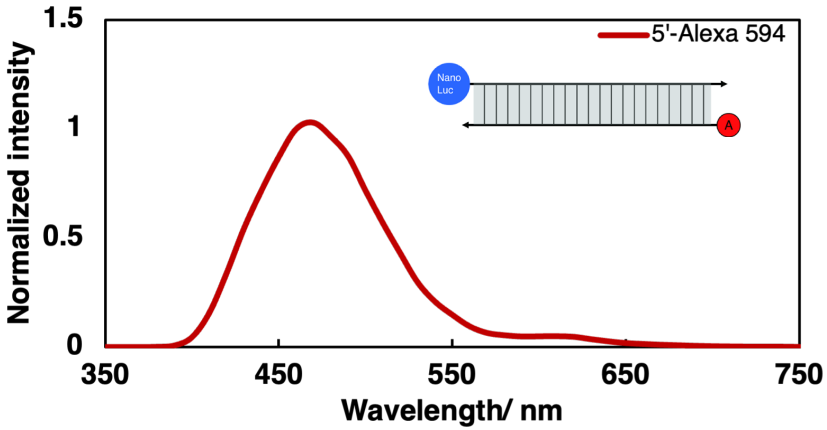

0th
1st
2nd
3rd
5th
6th
9th
10th
7.3 nm
Efficiency/ %
Distance/ nm
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
6
6.5
7
7.5
8
8.5
9
9.5
10

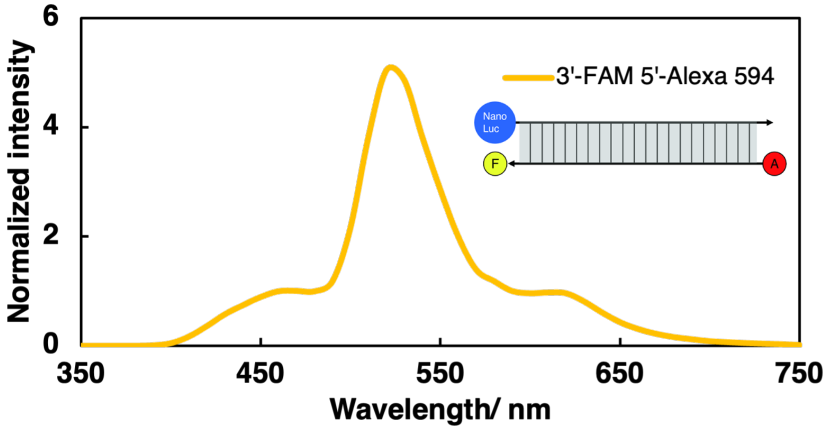

D
F
10 bp

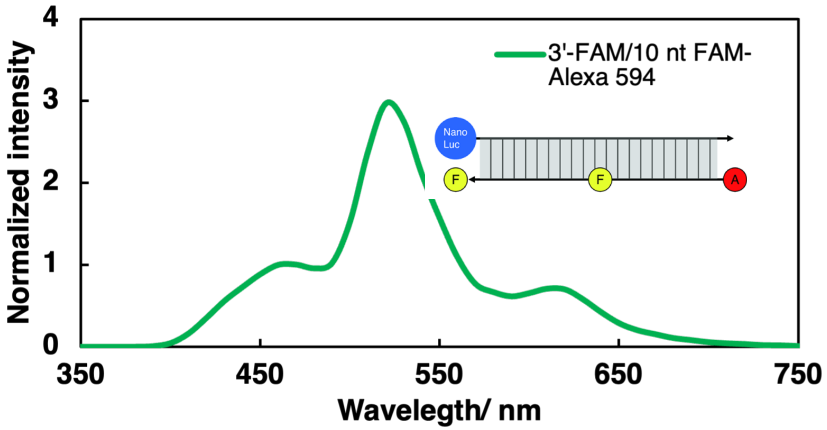


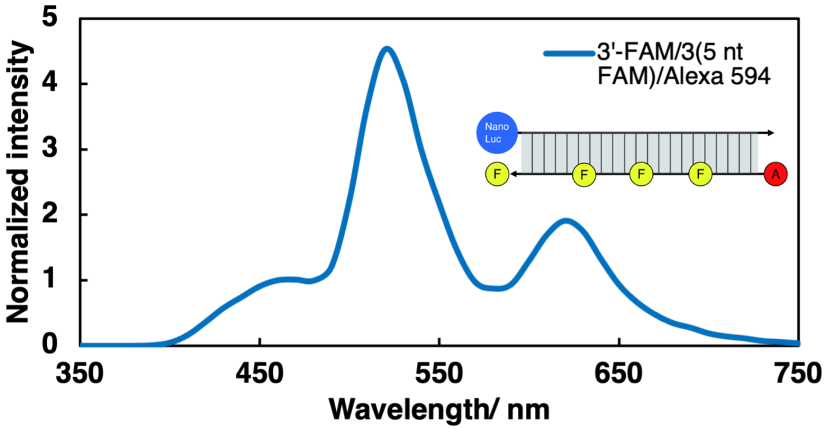

20 nt = 6.7 nm
Nano Luc
BRET
F
F
F
F
A
FRETFRETFRETFRET


Normalized intensity
0
1
2
3
4
5'-Alexa 594
3'-FAM 5'-Alexa 594
3'-FAM/10 nt FAM-Alexa 594
3'-FAM/3(5 nt FAM)/Alexa 594

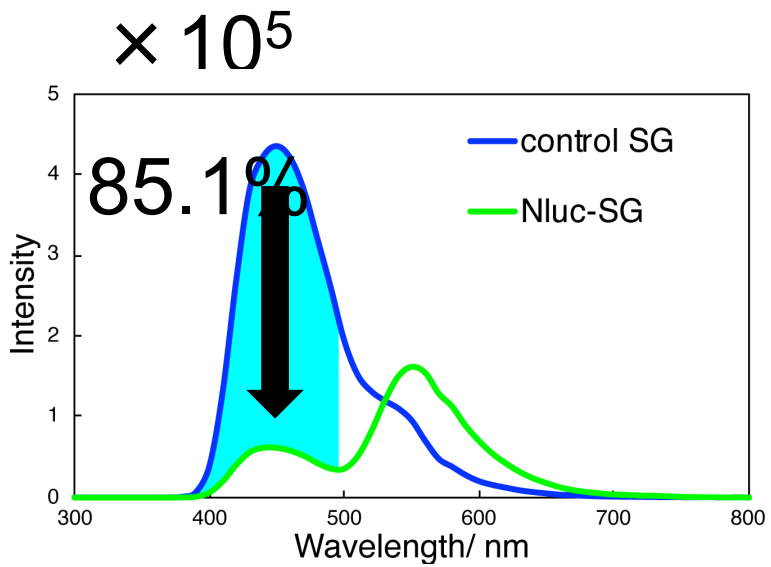

Normalized intensity
0
0.5
1
1.5
350
450
550
650
750
Wavelength/ nm
5'-Alexa 594
Nano Luc
A

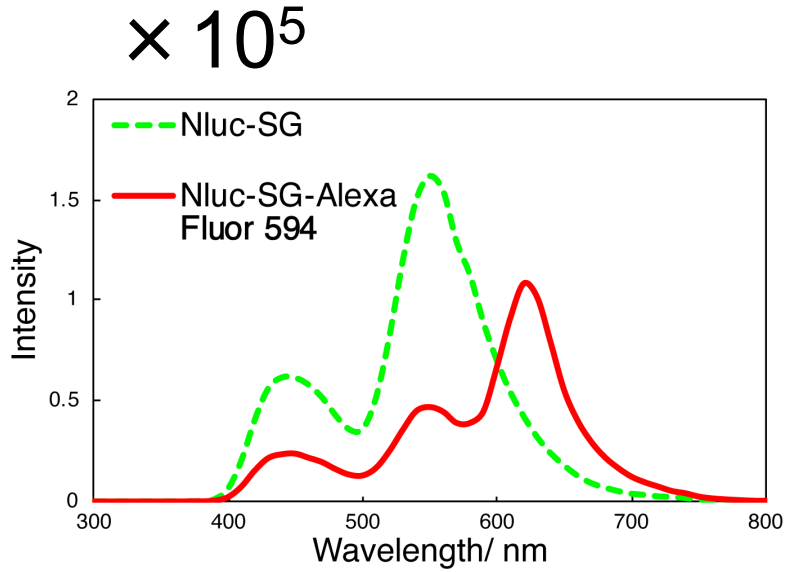

Normalized intensity
0
2
4
6
350
450
550
650
750
Wavelength/ nm
3'-FAM 5'-Alexa 594
Nano Luc
F
A

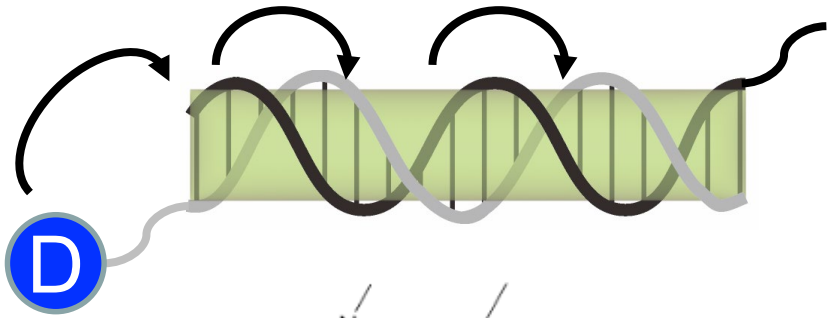

Normalized intensity
0
1
2
3
4
350
450
550
650
750
Wavelength/ nm
3'-FAM/10 nt FAM-Alexa 594
Nano Luc
F
F
A

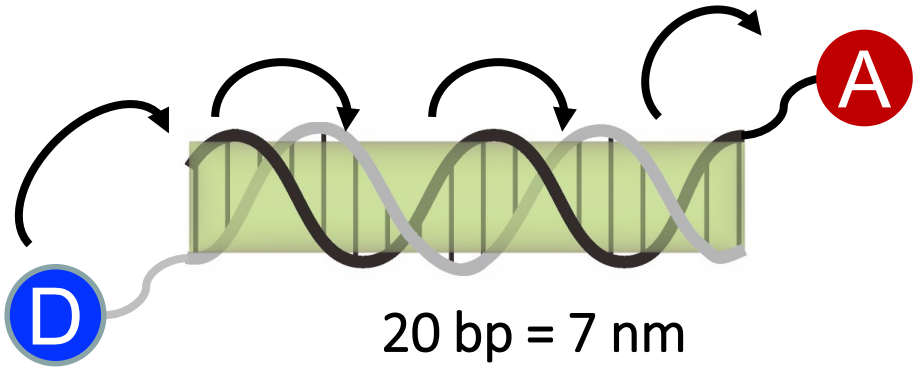

Normalized intensity
0
1
2
3
4
5
350
450
550
650
750
Wavelength/ nm
3'-FAM/3(5 nt FAM)/Alexa 594
Nano Luc
F
F
F
F
A

DNAを足場としたエネルギー伝送



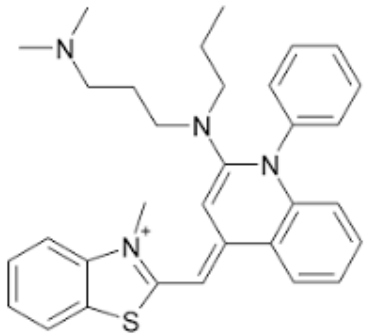






20 bp = 7 nm

up to 63 bp



SYBR Green I: Intercalator

実用化に向けた課題

- DNAのハイブリダイゼーションにより「消光」する機構の開発。
- NanoLuc発光活性の耐久性の調査が必要。LgBiTの交換が必要な場合には、ペプチドの結合性を調整する。
- ヒドロゲルへの埋め込み法の最適化。
- DNAオリガミとの複合化。

企業への期待

- 使い捨てソフトコンタクトレンズ（生物発光ディスプレイのプロトタイプ開発）や点眼薬（発光のための基質の供給）を製造している企業との共同研究を希望。

- リキッドバイオプシー分野への展開を考えている企業にも、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称　：複合分子
- 出願番号　　：特願2021-132865
- 出願人　　：学校法人　関西大学
- 発明者　　：葛谷明紀、高野史、乾俊輝

+2023年8月出願予定

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称　：エネルギー伝送路として利用可能な複合物質
- 出願番号　　：特願2023-131184
- 出願人　　：学校法人　関西大学
- 発明者　　：葛谷明紀、南出悠貴

お問い合わせ先

関西大学
産学官連携センター

ＴＥＬ：０６－６３６８－１２４５
ＦＡＸ：０６－６３６８－１２４７
e-mail：sangakukan-mm@ml.kandai.jp