

補助事業番号 2022M-240
補助事業名 2022年度 二次元界面の集積膜を利用したウイルス由来マイクロRNA検出技術の開発 補助事業
補助事業者名 東京医科歯科大学 石川 大輔

1 研究の概要

極微量なマイクロRNA (miRNA) 検出手法の開発には、疾患の早期発見、簡便かつ正確な診断の実現という社会的に重大な意義がある。これは、がんや新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) など、疾患の原因となる多くのウイルスの遺伝子がDNAではなくRNAだからである。これらの検出に一般に利用されるPCR法に代わって、金属ナノ粒子の光学活性な配置によって生じる、キラルなプラズモン場を利用した光学的な検出法が近年注目されている。特に、DNAナノテクノロジーを利用した水溶液中miRNAの光学的検出は、高精度かつ簡便な手法として実用化が期待されている。

そこで本研究では、キラルなプラズモン場を有する金ナノロッド固定両親媒化DNAペンチを開発し、これを用いて構築した気水界面膜において、水相中miRNAを超高感度で検出することを目的とした。

2 研究の目的と背景

■研究背景

極微量なマイクロRNA(miRNA)検出手法の開発には、疾患の早期発見、簡便かつ正確な診断の実現という社会的に重大な意義がある。これは、がん、HIV、ジカ熱など、疾患の原因となる多くのウイルスの遺伝子がDNAではなくRNAだからである。現在、世界中で感染拡大が報告されている新型コロナウイルス感染症(COVID-19)もRNAウイルスであり、一般にPCR法によってRNAから逆転写したDNAを増幅して検出が行われ、感染の有無が判断されている(図1a)。PCR法は塩基配列同士の特異的な二重らせん形成を利用して特定のDNAおよびRNAの検出に大きな力を発揮しているが、検出対象の増幅過程で対象外DNAの増幅と、異なる配列を含む対象DNAの増幅という2つのエラーが生じるため、その精度は原理上低くならざるを得ない[*Int. J. Mol. Sci.* **14**, 6436 (2013)]。一方、PCR法に代わって、増幅過程を要さない、キラルなプラズモン場を利用した光学的な検出法が近年注目されている[*Nucleic Acids Res.* **47**, 10489 (2019)]。特に、DNAオリガミで形成された光学DNAデバイスによるmiRNAの光学的検出は、高ウイルス量指標の30倍程度の濃度である約100 pMまで検出が可能となっており[*Angew. Chem. Int. Ed.* **57**, 13495 (2018)]、高精度かつ簡便な手法として実用化が期待されている。

■解決しようとする課題

キラルなプラズモン場を利用したmiRNA検出における解決すべき課題は、検出感度(検出下限濃度)の向上である。この本質的な原因は、これまでに報告されているキラルなプラズモン場を利用した光学的な検出法が、いずれも溶液中という等方的な空間を利用していることにある。一般にmiRNAを検出するための光学DNAデバイスは溶液中に存在する場合、その構造は統計力学的に分子認識と捕捉に必ずしも適しているとは限らない。すなわち、上記課題を解決するには、従来の三次元の等方的空間から脱却する必要がある。

■提案する課題解決策

本研究では検出感度の向上のため、申請者は従来の等方的な溶液中では無く、異方的な二次元界面膜における水素結合の結合定数増大効果[*J. Phys. Chem. B* **101**, 4810 (1997)]に着目した。リン酸基とグアニジウムの水素結合の結合定数は、気水界面膜で水溶液中の約1000万倍まで増大することが知られており、これは低誘電率相によって結合部位の水和が阻害されるためと考えられている[*J. Am. Chem. Soc.* **118**, 8524 (1996)]。RNAの検出感度は、核酸塩基同士の水素結合の安定性、すなわち結合定数の大きさに依存するため、上記の効果による文字通り桁違いの検出感度向上が期待できる。さらに光学DNAデバイスを界面膜にすることで、膜の圧縮・拡張によってmiRNAの認識・捕捉に適した構造に変形させ、検出感度を一層向上させることができる。

■研究目的

本研究は、DNAオリガミ[*Nature* **440**, 297 (2006)]を利用して、金ナノロッド固定両親媒化DNAペンチを作製し、大気(低誘電率)–水(高誘電率)の気水界面に構築した界面膜において、水相中miRNAを超高感度検出可能な光学的手法を開発することを目的とする。

3 研究内容

研究目的達成のため、[目標1]キラルプラズモニックDNAペンチの開発、[目標2]気水界面DNAペンチの力学的変形の確認、[到達点]DNAペンチによる水相中RNA検出という目標と到達点を設定した。研究期間中に[目標1]のうち、(i)金ナノロッドの合成、(ii)DNAペンチの設計およびその作製条件の最適化、(iii)疎水基修飾および金ナノロッド固定用1本鎖DNAの設計まで達成した。

(i)金ナノロッドの合成(<https://www.daisuke-ishikawa.com/research>)

キラルプラズモニックDNAペンチを構成する金ナノロッドのサイズには、固定する足場となるDNAペンチの長さ約60 nm、幅約21 nm以内という制限がある。そこで、最適なサイズの金ナノロッドを得るための各種試薬の設定濃度の検討を行った。表1の各濃度条件の下、金ナノロッドの合成を以下(1)、(2)の手順で行った。

(1) 塩化金酸 (HAuCl₄) 溶液をCTAB溶液と混合させ、Au(III)-CTAB溶液を作製した。氷冷した水素化ホウ素ナトリウム (NaBH₄) 溶液を、激しく攪拌しながらAu(III)-CTAB溶液に滴下した。2分間激しく攪拌した後に25 °Cで3時間恒温槽に静置した。これを金ナノロッド成長の核となる金シード溶液として用いた。

(2) CTAB溶液に、硝酸銀 (AgNO₃) 溶液を加え、溶液を15分間静置した後、HAuCl₄溶液を加えた。15分間ゆっくりと攪拌した後、L-アスコルビン酸溶液を添加し、溶液が無色になるまでゆっくり混ぜた。ここに、金シード溶液を加えてから10回上下転倒を行うことで攪拌し、25 °Cで24時間恒温槽に静置した。

上記の手順で合成した金ナノロッドの形状観察には、電界放出形走査電子顕微鏡 (SEM、Hitachi S-4800、日立ハイテクノロジー社製) を用いた。

表1 金ナノロッド合成用試薬の濃度条件の検討

作製条件 No.	金ナノロッド合成用試薬の濃度				
	CTAB	塩化金酸(HAuCl ₄)	硝酸銀(AgNO ₃)	アスコルビン酸	Au seeds
(1)	9.5×10 ⁻² M	4.0×10 ⁻⁴ M	6.0×10 ⁻⁵ M	6.4×10 ⁻⁴ M	1.56×10 ⁻⁸ M
(2)					3.13×10 ⁻⁸ M
(3)					1.25×10 ⁻⁷ M
(4)					2.5×10 ⁻⁷ M
(5)					5.0×10 ⁻⁷ M
(6)					1.0×10 ⁻⁶ M
(7)					1.25×10 ⁻⁶ M
(8)					2.0×10 ⁻⁶ M

作製条件(1)-(8)では、金ナノロッドの核となる金シードを含む溶液の濃度を変化させた。

合成した金ナノロッドはSEMからそのサイズを評価した。表1の条件(1)-(8)で合成した金ナノロッドのSEM像を図1に示す。いずれの条件においても、合成した金ナノ粒子は棒状に結晶成長していたことを確認した。各作製条件における金ナノロッドのSEM像において、長さ(長軸)および幅(短軸)の計測を行った結果をSEM像と併せて図1に示す。アスペクト比は、金ナノロッドの長さ(長軸)と幅(短軸)のそれぞれの平均値から算出した。

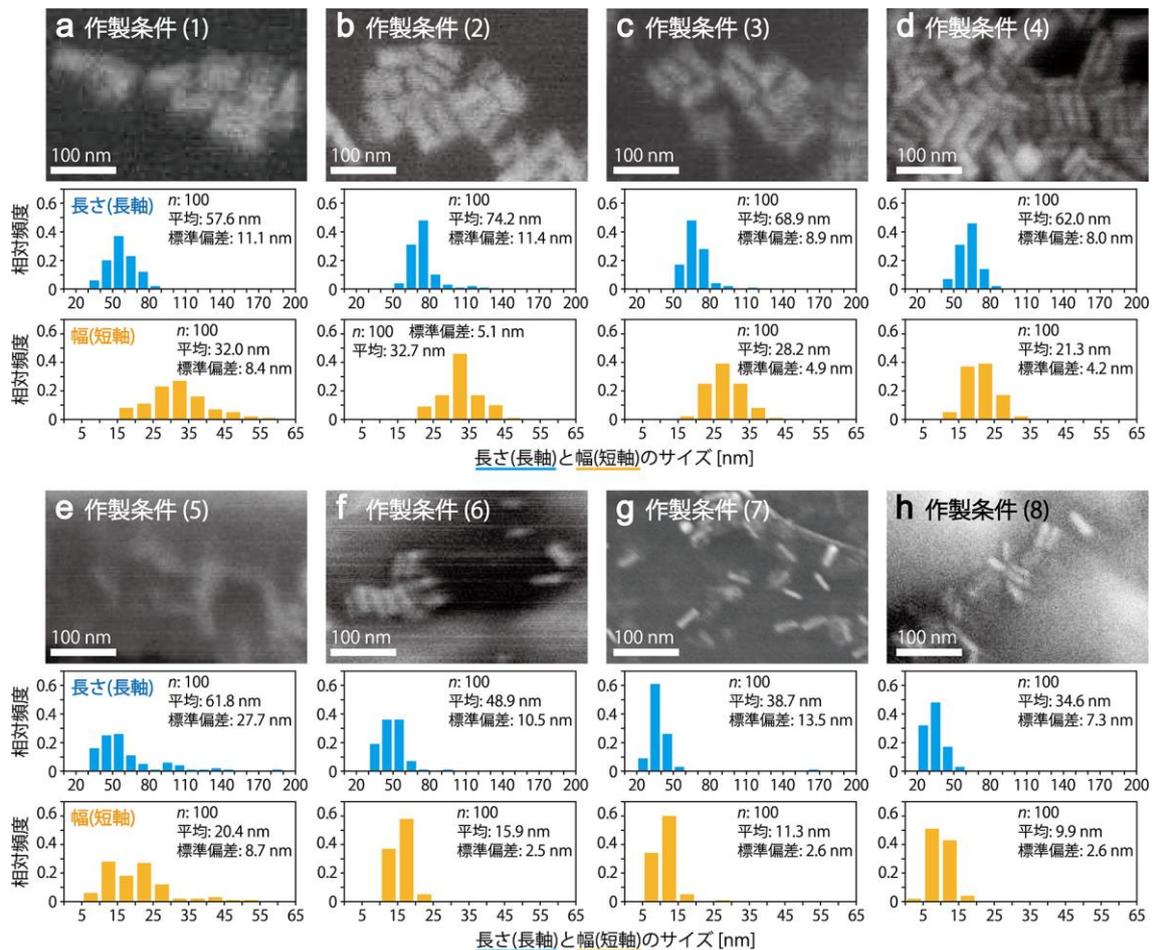


図1 合成した金ナノロッドのSEM像。(a)条件(1)、(b)条件(2)、(c)条件(3)、(d)条件(4)、(e)条件(5)、(f)条件(6)、(g)条件(7)、(h)条件(8)で得られた金ナノロッドを示す。ヒストグラムは金ナノロッドの長さ(上)と幅(下)の分布をそれぞれ表している。

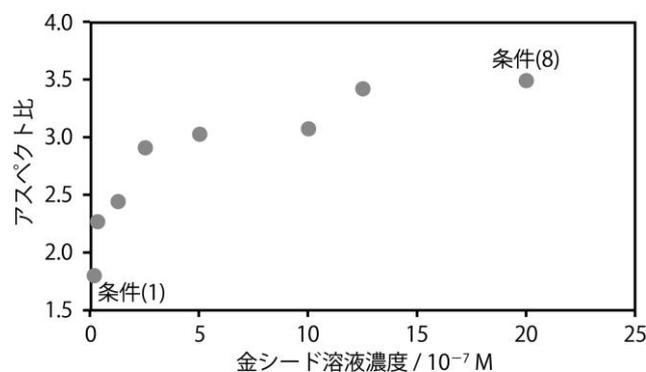


図2 得られた金ナノロッドと合成に用いた金シード溶液濃度の相関

上記8つの合成条件のうち、金ナノロッドを固定するDNAペンチのサイズ制限(長さ約60 nm、幅約21 nm以内)に収まるのは、条件(4)-(8)で合成した金ナノロッドであった。金シード溶液の濃度を増加させた場合、アスペクト比は一次関数的に増加し続けず、ある程度の値で最大となる傾向がみられた。金ナノロッドは金シードの周囲に金イオンが吸着し、これが還元されることで形成される。したがって、金イオン濃度が一定の条件下で金シードの濃度が増加すると、金シードの総量に対する金イオンの総量が相対的に減少し、ロッドの成長が制限されたと考えられる。

(ii) DNAペンチの設計およびその作製条件の最適化

(<https://www.daisuke-ishikawa.com/research>)

キラルプラズモニックDNAペンチの作製に用いたDNAオリガミとは、DNAの塩基配列がその相補鎖とのみハイブリダイゼーションするという特有の性質を活かしたナノ構造体形成手法である[1]。DNAオリガミによるナノ構造体設計は、caDNAoというフリーソフトウェアを用いて誰でも実施することが可能である。本研究では目的上、DNAペンチが常温において開いた十字型の構造をとる必要がある。そこで、設計したDNAペンチの熱力学的安定構造を、ウェブソフトウェアCanDoから予測し、以下の条件を満たす構造を得るまで設計を繰り返した。
[条件1] 常温において開いた十字型を取り、軸を中心に自由回転可能である。
[条件2] 構造体の熱ゆらぎが小さく、常温で設計通りの構造を維持する。

二次元DNAナノ構造体の作製は比較的容易であるが、三次元構造体の作製は綿密なアニーリング条件とカチオン濃度条件の設定が不可欠である。これは、DNAの二重らせん形成に基づくナノ構造体形成を、速度論的に安定な状態ではなく熱力学的に安定な状態へと導く必要があるからである。また、リン酸基が有する負電荷が構造体内で反発することによる安定な構造体形成の障害を防ぎ、かつナノ構造体同士の凝集を避けるための最適な塩濃度が必要だからである。そこで本研究では、DNAペンチ作製におけるアニーリング温度条件とカチオン濃度の最適化を行った。

ウェブソフトウェアCanDoを用いたシミュレーションに基づき、設計を繰り返すことで図3に示す構造を得た。この構造は、設計指針である前述の2つの条件を満たし、また多様なmiRNAを検出可能にするために、その認識部位を任意の配列に交換可能な互換構造をもつ。

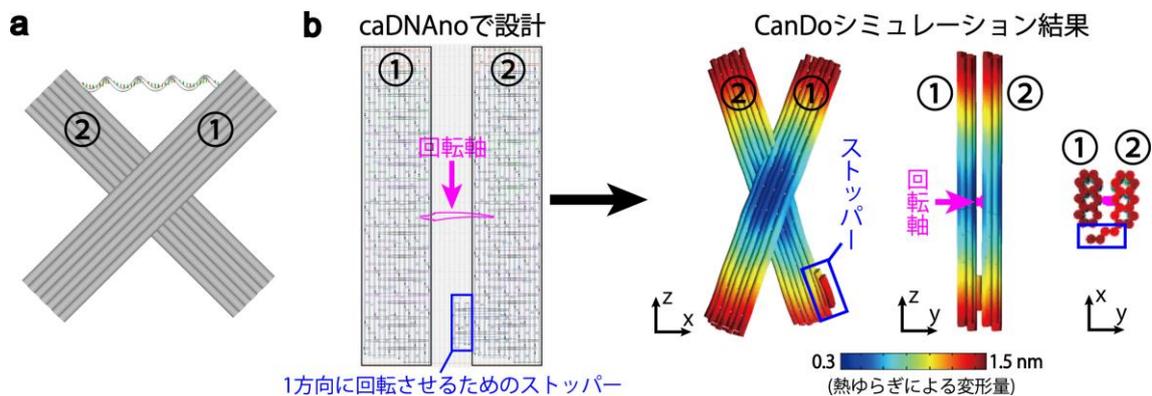


図3 DNAペンチの三次元構造。(a) DNAペンチの模式図。(b) DNAペンチのcaDNAAno設計図とCanDoによるシミュレーション結果に基づく構造予測。

一般的に、DNAナノ構造体は加熱後の冷却過程における60-40 °Cの温度範囲において段階的に形成されることが知られている[3]。本研究では、上記の温度範囲におけるDNAペンチ形成に必要な十分な冷却時間をアガロースゲル電気泳動から調査した結果、アニーリング過程における冷却速度は-1 °C/hが必要十分であると決定した。また、DNAナノ構造体形成において、DNA骨格のリン酸基に由来する静電反発を緩和するために、二価のカチオンが重要な役割を果たしている[4]。二価カチオン(Mg²⁺)の濃度が低い場合はDNAナノ構造体が形成されず、一方濃度が高い場合はDNAナノ構造体同士が凝集してしまうため、DNAナノ構造体を生産設計するごとにその最適な塩濃度を決定しなければならない。本研究では、Mg²⁺イオンと一価カチオン(Na⁺)の各濃度を変化させ、アガロースゲル電気泳動からDNAペンチの形成に最適な濃度を調査したところ、Mg²⁺濃度20 mMおよびNa⁺濃度10 mMが最適であると決定した。

(iii) 疎水基修飾および金ナノロッド固定用1本鎖DNAの設計

(<https://www.daisuke-ishikawa.com/research>)

DNAペンチへの疎水基修飾用および金ナノロッド固定用の1本鎖DNAの設計を行った。疎水基および金ナノロッドをDNAペンチに選択的に導入するための1本鎖DNAとして、正規直交配列を利用した。正規直交配列とは、23塩基数をもつ1本鎖DNAの集合であり、その相補鎖以外とは二重らせんを形成しないように設計された塩基配列である(図3a) [2]。この配列を利用することで、DNAペンチへの疎水基および金ナノロッドのそれぞれの修飾を、互いが干渉することなく実行することができる。正規直交配列はこれまでに37本報告されており、この中から本研究のDNAペンチを構成する1本鎖DNAと互いに干渉しないものを選定するため、3つの熱力学的計算を、ウェブソフトウェアNUPACKを用いて行った。

正規直行配列を選定するための3つの熱力学的計算では、正規直交配列37本(図4a)と導入箇所のステーブル48本を連結した延長ステーブルDNAのセルフフォールディング(分子内二重らせん形成)に要する最小自由エネルギーの算出、正規直交配列37本とスキヤフォールドDNAを混合させたときの平衡時存在率算出、正規直交配列37本と全ステーブル206本を混合させたときの平衡時存在率算出を行い、最小自由エネルギーの絶対値が小さく、また平衡時存在率の高い配列に順位を付けて選定した(図4b)。

その結果、DNAペンチに適した正規直交配列を5本選定して使用優先順位を付けた(図4c)。この中から順位の高い2本を疎水基の修飾と金ナノロッドの固定のそれぞれに使用して現在実験を進めている。

a

正規直交配列37本 [DNA Comput. 4848, 119 (2008)]					
Entry No.	Sequence (5' to 3')	Entry No.	Sequence (5' to 3')	Entry No.	Sequence (5' to 3')
1	GCATCTACACTCAATACCCAGCC	14	TTCGGTTCTCTCCAAAAAAGCA	26	ATGGGAACCTAAAAGTGTGGCTA
2	CGTCTATTGCTTGTCACTTCCCC	15	GGCGCTTAAATCATCTTTCATCG	27	GAGTCAATCGAGTTTACGTGGCG
3	GGCTCTATACGATTAACCTCCCC	16	CCGTCTGTATTATAAGACCCCT	28	TTCCGCTGATGTAGTGTTCACACA
4	GAAGGAATGTTAAAAATCGTCGCG	17	CGAGAGTCTGTAATAGCCGATGC	29	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
5	GCACCTCCAAAATAAACTCCGCG	18	TGGCACTTATAGCTGTCCGGAAGA	30	CCATCAGGAATGACACACACAAA
6	GAGAAGTGCTTGATAACGTGTCT	19	GGCTGTTTACAAAATCGAGCTAG	31	GGGATAGAACTCACGTACTCCCC
7	GCATGTGTAGTTATCAGCTTCCA	20	TGCGAAAATTGAAAAATGGCTGC	32	CCATATCCGATTATTAGCGACGG
8	CTAGTCCATTGTAACGAAGGCCA	21	GCATTGAGGTATTGTGCTCCCA	33	GGGATCAGTTGTACACTCCCTAG
9	GTCCCGGAAAAATACTATGAGACC	22	GGCTGTCAATTTATCAGGGAGGC	34	CTGTGATGATACCCTTCTTACC
10	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC	23	GCCTCAAGTACGACTGATGATCG	35	CGCGGTTGAAATAACTAATCGCG
11	CATCTGAACGAGTAAGACCCCA	24	GAAGCCCTATTTGCAATTCCCC	36	GGTCGAAACGTTATATTAACGCG
12	CGCGATTCTATTGATTGATCCC	25	CGCGGGTACGTTGATGTAACAAA	37	TAGCACCCGTTAAAAACGGAAATG
13	GGTGGCTTATTTACAGCGCTTAG				

NUPACK [http://www.nupack.org/]

- b** 正規直交配列 No.1-37と修飾箇所のステーブル48本を連結した延長ステーブル計1776本のセルフフォールディングに要する最小自由エネルギー[kcal mol⁻¹]の算出
- 正規直交配列 No.1-37(100 nM)と十字型DNAナノ構造体のスキヤフォールド(8064 nt, 10 nM)を混合させたときの正規直交配列の平衡時存在率(%)算出
- 正規直交配列 No.1-37(100 nM)と十字型DNAナノ構造体の全ステーブル206本(100 nM)を混合させたときの正規直交配列の平衡時存在率(%)算出

c 選定した正規直交配列5本

Entry No.	Sequence (5' to 3')
2	CGTCTATTGCTTGTCACTTCCCC
3	GGCTCTATACGATTAACCTCCCC
6	GAGAAGTGCTTGATAACGTGTCT
7	GCATGTGTAGTTATCAGCTTCCA
8	CTAGTCCATTGTAACGAAGGCCA

図4 疎水基および金ナノロッドの修飾に用いる1本鎖DNAの選定。(a) これまでに報告されている37本の正規直行配列。(b) 正規直行配列を選定するための3つの熱力学的計算。(c) 3つの計算結果から選定した5本の正規直行配列。

文 献

- [1] Rothemund, P. W., Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **440**, 297-302 (2006).
- [2] Kitajima, T., Takinoue, M., Shohda, K. I., Suyama, A. Design of Code Words for DNA Computers and Nanostructures with Consideration of Hybridization Kinetics. *DNA Comput.* **4848**, 119-129 (2008).
- [3] Sobczak, J. P., Martin, T. G., Gerling, T., Dietz, H. Rapid folding of DNA into nanoscale shapes at constant temperature. *Science* **338**, 1458-1461 (2012).
- [4] Douglas, S. M., Dietz, H., Liedl, T., Högberg, B., Graf, F., Shih, W. M. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. *Nature* **459**, 414-418 (2009).

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究は、DNAナノ構造体の界面膜を用いたmiRNA超高感度検出のProof of Conceptである。今後、 $aM(10^{-18} M)$ よりもさらに微量な領域への検出感度の向上、究極的にはDNAペンチとmiRNAの一対一対応検出、また検出可能なmiRNAの多様化、さらに複数種のmiRNAの中から特定のものだけを検出する特異的選択制など、本研究の拡張性は非常に高い。多方面から機能の拡張と深化を試み、界面膜を利用した汎用的な生体分子検出技術を開発することで、医療技術へと応用したい。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

本研究を実施するに至るまでに、補助事業者は分子薄膜形成を主とする界面科学を基軸として、DNAナノテクノロジーの一種であるDNAオリガミ手法によるDNAナノ構造体形成、金ナノ粒子の形成とその触媒作用に関する研究に従事してきた。本研究では、DNAオリガミ手法を用いてペンチ状DNAナノ構造体を作製し、これに金ナノロッドを固定したキラルプラズモニックDNAペンチを気水界面で駆動させることで水相中の生体分子を捕捉することを試みている。したがって本研究は、補助事業者がこれまでに培ってきた界面科学、DNAナノテクノロジー、金属ナノ粒子の各知見を融合させた研究である一方で、補助事業者にとって未知の金属ナノ粒子の光学物性を利用した挑戦的な研究としての位置づけを持っている。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

該当なし。

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

該当なし。

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

該当なし。

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 東京医科歯科大学

住 所： 〒101-0062

東京都千代田区神田駿河台2-3-10 21号館309

担 当 者： 講師 石川 大輔（イシカワ ダイスケ）

担 当 部 署： 生体材料工学研究所 精密医工学分野

（セイタイザイリョウコウガクケンキュウシヨ セイミツイコウガクブンヤ）

E - m a i l: ishikawa.daisuke@tmd.ac.jp

U R L: <https://www.daisuke-ishikawa.com/research>