

酵素および装置フリーな DNA ナノシステムによる感染症の 「その場」診断法の開発

所属：筑波大学 数理物質系 物質工学域

助成対象者：大石 基

共同研究者：

概要

本研究では、酵素および装置フリーな DNA 鎖交換反応を基盤とした DNA サーキットにより感染症の病原体由来の標的核酸を「その場」で検出できる DNA ナノシステムのプラットフォームの開発を行った。実際にこの DNA ナノシステムでは、室温かつ酵素および特別な装置を一切使用せず、蛍光シグナルの増幅が可能であり、高感度 (LOD = 9.6 pM) で標的核酸を検出することが可能であった。

abstract

In this research, a platform of the DNA nano-system for point care testing of target nucleic acids for infection diseases was constructed based on the DNA circuit through enzyme- and instrument-free DNA displacement reactions. The DNA nano-system was capable of amplification of fluorescence signal at room temperature without enzymes and instruments and showed high detection sensitivity (limit of detection: LOD 9.6 pM).

研究内容

【背景】 背景

近年、ウイルスおよび細菌を病原体とする新興感染症（新型インフルエンザなど）および再興感染症（デング熱など）が世界各地で流行し大きな問題となっている。しかし、これら感染症において、未だに効果的なワクチンおよび薬剤が少ないのが現状である。したがって、感染症の早期拡大防止および適切な初期治療の観点から、感染症の「その場」診断の重要性が高まっている。現在、国内外において感染症の診断には、抗原抗体反応と金ナノ粒子を利用したイムノクロマト法および酵素を用いた病原体由来の核酸の増幅・検出に基づく手法（PCR: polymerase chain reaction など）が実用化および研究されている。しかし、これら既存の手法は、低感度、装置が必要、酵素を用いるが故に手間・時間がかかるなどの理由から、感染症の「その場」診断には十分ではない。したがって、感染症の「その場」診断においては、酵素および装置を用いない高感度検出システムの開発が「鍵」となる。

【目的】

本研究では、申請者が独自に開発した「ナノ界面構築法」¹⁾により DNA を固定化した金ナノ粒子（赤色を呈する粒子）を調製し、この DNA 化金ナノ粒

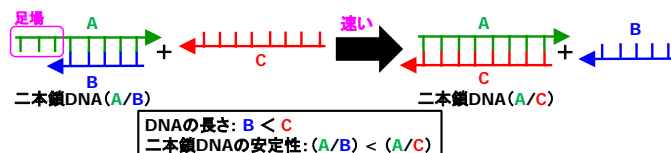


図1 足場介在型 DNA 鎖交換反応

子を用いた DNA サーキットによりシグナルを増幅させることで、酵素および装置を一切用いず、かつ検体を前処理することなく目視にて感染症由来の標的核酸を検出することを最終的な目的にしている。本研究での DNA サーキットにおいて鍵となるのは、足場介在型 DNA 鎖交換反応である（図1）²⁾。この足場介在型 DNA 鎖交換反応は、二本鎖を形成している DNA (A/B) から突き出ている DNA (A) の一本鎖の部分をも足場として別の一本鎖 DNA (C) が足場と塩基対を形成し DNA 鎖 (B) と (C) が置き換わり新しい二本鎖 DNA (A/C) を形成する反応である。この反応において DNA (B) よりも DNA (C) の方が長い（塩基数が多い）ため、二本鎖 DNA の安定性は DNA (A/B) よりも DNA (A/C) の方が高いため反応が一方方向に進行する。また、この反応は血清中においても室温かつ酵素フリーで進行することが明らかになっている³⁾⁻⁵⁾。

本研究における DNA サーキットの原理を図2に示す。具体的には、金ナノ粒子（平均粒

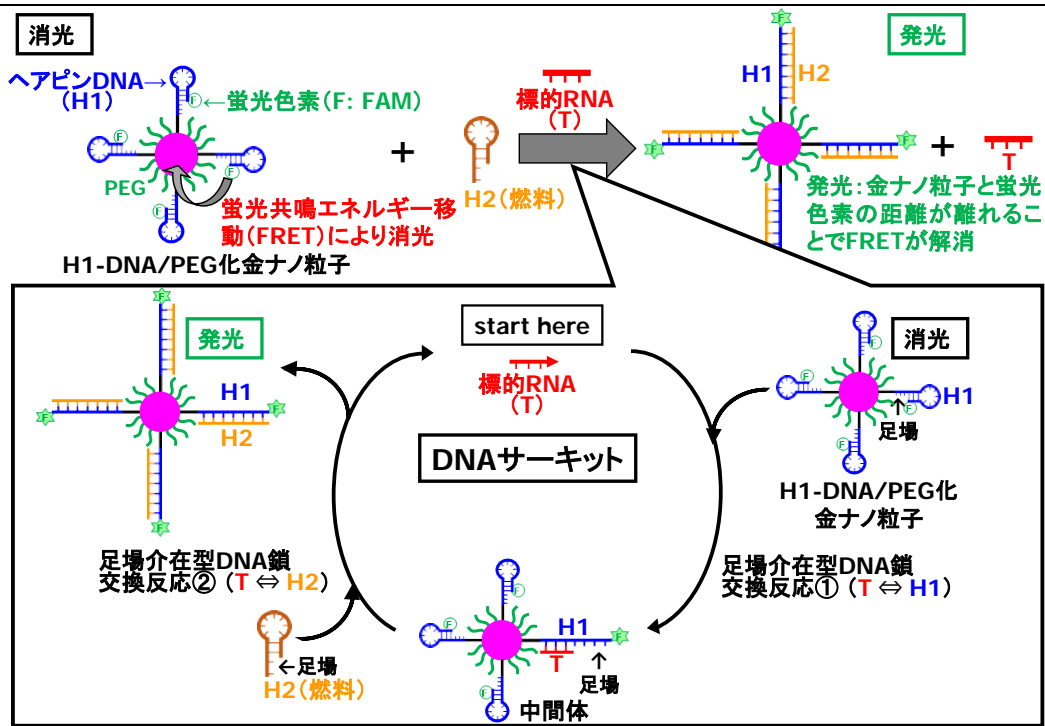


図2 金ナノ粒子における DNA サーキットによる感染症由来の標的核酸 RNA の検出原理

径：40 nm) 表面に PEG と末端に蛍光色素 (Ⓧ) : FAM) を有するヘアピン型 DNA (H1) を共固定した H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子を調製する。この際、H1-DNA はヘアピン構造を形成しているため、蛍光色素である FAM は金ナノ粒子近傍に存在する。この近接している状態では、FAM から金ナノ粒子への蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: Förster Resonance Energy Transfer) が起こるため、FMA が発光することはできない。また、この H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の溶液に別のヘアピン型 DNA (H2: 燃料) を加える。一方、混合した際にヘアピン構造を有する H1 と H2 の間で足場介在型 DNA 鎖交換反応を起こすことはない。次いで、標的核酸 RNA (T) を含む検体を加えると、粒子表面の H1 の足場を介して T との足場介在型 DNA 鎖交換反応①が起こり、ヘアピン構造が直鎖構造に変化 (開環) する。さらに、粒子表面の H1/T は、足場を介して H2 と足場介在型 DNA 鎖交換反応②を起こし、同時に T がリリースされる。このリリースされた T は、再び粒子表面にある H1 と足場介在型 DNA 鎖交換反応①を起こす。すなわち、再生した T は足場介在型 DNA 鎖交換反応①および②の触媒として働くことになる。最終的には、金ナノ粒子と蛍光色素である FAM との距離が離れることで FRET が解消され FMA が発光できるようになる。したがって、理論上 1 分子の標的核酸 RNA (T) が存在しさえすれば、検体を前処理することなく、かつ装置および酵素を一切用いず迅速に発光させることが可能となり、感染症由来の標的核酸 RNA を「その場」で「簡便・迅速」に検出することが可能と思われる。

【結果】

H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の調製は、市販の金ナノ粒子（平均粒径：40 nm）表面に末端にチオール（SH）基を有する PEG（分子量：5000）と末端にチオール（SH）基と蛍光色素（ Φ ）：FAM およびスペーサ部分に T20（チミンの 20 量体）

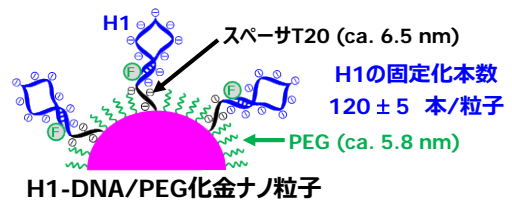


図 3 H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の構造

を有するヘアピン型 DNA（H1）を用いたナノ界面構築法により行った（図 3）。また、1 粒子あたりの H1 の本数は、 120 ± 5 本/粒子 であった。さらに、市販の金ナノ粒子、T20 化金ナノ粒子（T20 のみを固定化）および PEG 化金ナノ粒子（PEG のみを固定化）の粒径から、金ナノ粒子界面における T20（スペーサ部分）および PEG の鎖長を計算した。その結果、鎖長は T20（6.5 nm）> PEG（5.8 nm）の順となり、これらに値はこれまでの報告と近い値であった。すなわち、H1 の足場部分の DNA は PEG 層からは突き出した構造となっており（PEG 層に埋もれていない）、足場介在型 DNA 鎖交換反応がスムーズに進行することが期待される。

様々な標的核酸 RNA 濃度（0 M ~ 10 nM）における H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子および H2 を用いた DNA サーキットの時間に対する蛍光強度（normalized F ）の変化を図 4 a に示す。標的核酸 RNA の非存在下（0 M）においては、蛍光強度の変化はほとんど認められなかった。一方、標的核酸 RNA の存在下においては、標的核酸 RNA 濃度および時間に依存して蛍光強度が増加していることが確認された。これらのことから、標的核酸 RNA を触媒とした DNA サーキット（蛍光シグナルの増幅）が金ナノ粒子界面においても成立していることが明らかとなった。

また、様々な標的核酸 RNA 濃度における、各検出時間（30, 60, 120, 180, 240 分）と蛍光強度（normalized F ）の関係を図 4 b および図 4 c（図 4 b の低濃度領域の拡大）示す。全ての検出時間において、標的核酸 RNA 濃度の蛍光強度の関係は良い直線性が認められた。これら標的 miRNA 濃度と蛍光強度の直線性は、標的核酸 RNA 濃度に対して pM レベル ~ nM レベルの範囲で確認できることから、3 桁ほどの広い定量範囲を有していることが明らかとなった。さらに、検出限界濃度（LOD: Limit of Detection）は、検出時間が長くなるにつれて低くなることが確認された。すなわち、検出時間 30 分において LOD = 96 (pM: 10^{-12} M) および検出時間 240 分において LOD = 9.6 (pM: 10^{-12} M) をそれぞれ達成することができた。

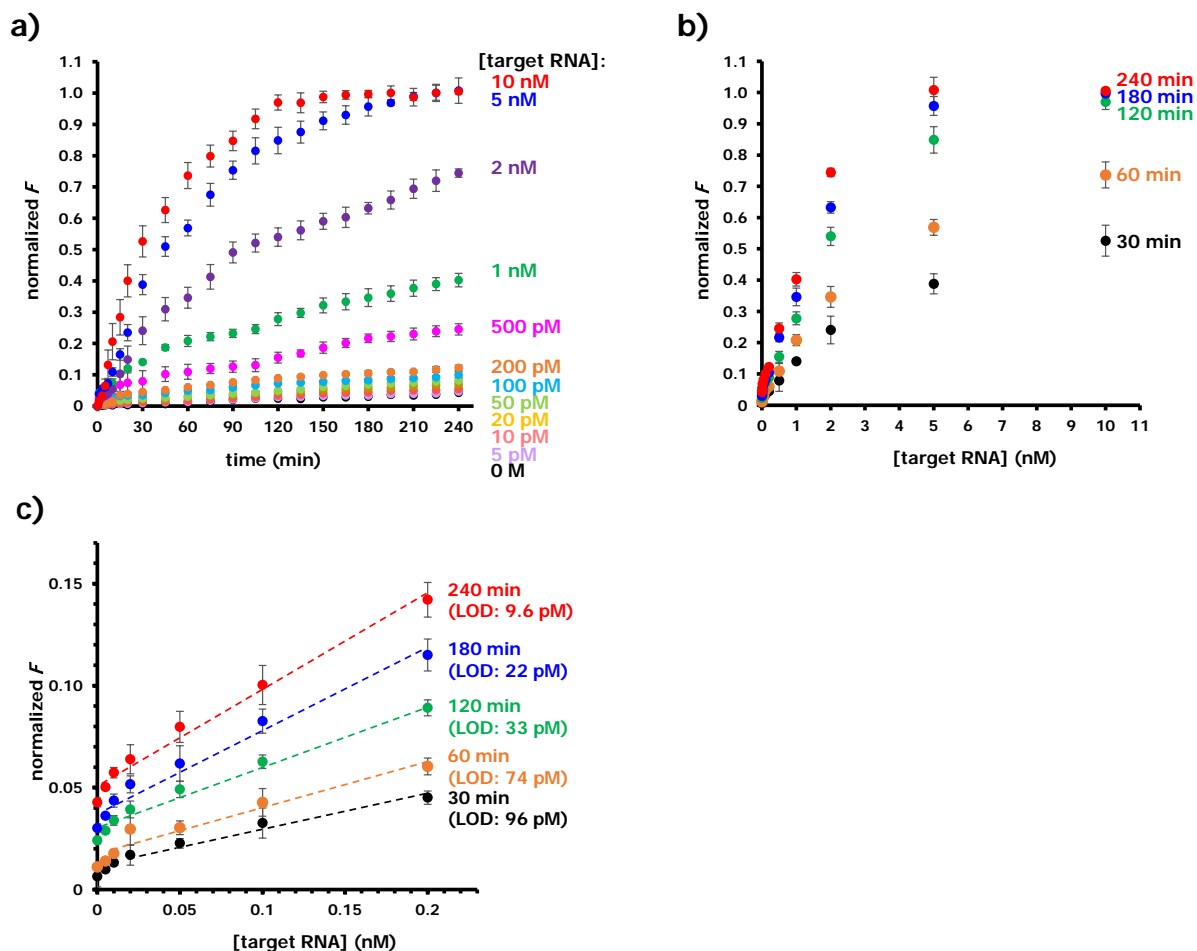


図4 a) 様々な標的核酸 RNA 濃度における H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子および H2 を用いた DNA サーキットの時間に対する蛍光強度 (normalized F) の変化。b) 様々な標的核酸 RNA 濃度における各検出時間と蛍光強度 (normalized F) の関係。c) b) の低濃度領域の拡大。

【今後】

今後、この検出システムを金ナノ粒子の凝集に基づく色の変化（分散状態：赤色→凝集状態：紫色）、比色検出系に展開することを試みる。また、実際に血清および体液を用いて標的核酸の検出を行っていく予定である。

【謝辞】

本研究を遂行するにあたり、多大なご援助を賜りました「公益財団法人 住友電工グループ社会貢献基金」に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) A. Takashima, M. Oishi “Kinetic Study of DNA Hybridization on DNA-modified Gold Nanoparticles with Engineered Nano-Interfaces” *RSC Advances* (2015) **5**, 76014-76018.
- 2) B. Yurke, and A. P., Jr. Mills “Using DNA to Power Nanostructures” *Genet. Program. Evol. M.* (2003) **4**, 111 - 122.
- 3) M. Oishi K. Nakatani “Dynamically Programmed Switchable DNA Hydrogels Based on DNA Circuit Mechanism” *Small* (2019) **15**, 1900490.
- 4) M. Oishi “Comparative Study of DNA Circuit System-Based Proportional and Exponential Amplification Strategies for Enzyme-Free and Rapid Detection of miRNA at Room Temperature” *ACS Omega* (2018) **3**, 3321-3329.
- 5) M. Oishi S. Sugiyama “An Efficient Particle-Based DNA Circuit System: Catalytic Disassembly of DNA/PEG-Modified Gold Nanoparticle-Magnetic Bead Composites for Colorimetric Detection of miRNA” *Small* (2016) **12**, 5153-5158.

本助成に関わる成果物

[論文発表]

なし

[口頭発表]

なし

[ポスター発表]

なし

[その他]

- 1) Motoi Oishi “Point of Care Testing (POCT) for Nucleic Acids at Room Temperature & without Enzymes” BioJapan 2020 in Yokohama (2020, October 14-16th)