

■受領No.1452

ナノ粒子界面の精密設計に基づいた DNA ナノシステムによる感染症のその場診断技術の開発

代表研究者

大石 基

筑波大学 数理物質系 物質工学域 准教授



Development of point of care testing for infectious diseases using DNA nano-systems based on precise design of interface of nanoparticles

Principal Researcher

Motoi Oishi,

Division of Materials Science, Faculty of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba Associate professor

本研究では、ナノ粒子界面の精密設計に基づいて調製した DNA 化金ナノ粒子の長期保存条件の検討および蛍光による核酸検出の検討を行った。-20 °C で DNA 化金ナノ粒子溶液を保存することで、2 か月間 Au-S 結合の切断による DNA の脱離を防ぐことが可能であった。また、この DNA 化金ナノ粒子を用いて、足場介在型 DNA 鎖交換反応を素反応とした酵素フリーな蛍光シグナル増幅機能を有する新規な DNA ナノシステムを金ナノ粒子界面において構築することに成功した。

In this study, optimization of the preservation conditions of DNA-modified gold nanoparticles and fluorescence detection of nucleic acid were investigated. Note that the cryopreservation at -20 °C was capable of preventing the DNA dissociation though the cleavage of Au-S bonds. Furthermore, a new DNA nano-system on the surface of DNA-modified gold nanoparticles was successfully created based on toehold-mediated DNA displacement reactions, and eventually, the system showed enzyme-free amplification of the fluorescence signal.

1. 研究内容

1.1 背景と研究目的

近年、ウイルスおよび細菌を病原体とする感染症（新型コロナウイルスなど）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、感染症の診断には、酵素を用いた病原体由来の核酸の増幅・検出に基づく PCR (polymerase chain reaction) 法が実用化されている。しかし、

PCR 法では、特殊な装置が必要、酵素を用いるが故に手間のかかる検体からの標的核酸の単離（前処理）が必要、増幅・検出に数時間かかるなどの理由から、感染症の「その場」診断には十分とは言いがたいのが現状である。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。

本研究では、申請者が独自に開発した「ナノ界面構築法」を基盤として金ナノ粒子界面にナノ反応場を構築し、酵素および装置フリーな連鎖的（自発的）DNA ハイブリダイゼーション（二本鎖形成）に基づく金ナノ粒子の新奇凝集反応により、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 ナノシステムを開発することを目的にしている。本助成期間においては、「ナノ界面構築法」により調製した金ナノ粒子の長期保存条件および金ナノ粒子を用いた蛍光による核酸検出の検討を行った。

1.2 結果と考察

最初に「ナノ界面構築法」によりチオール (SH) 化ヘアピン型 H1-DNA (H1) とチオール (SH) 化ポリエチレングリコール (PEG) を Au-S 結合を介して共固定させた H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子を調製した。しかし、この H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子は、溶液中において時間の経過とともに Au-S 結合の切断による DNA の脱離が起こるため、長期保存できないことが問題となっている。したがって、調製した H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子を長期保存した際の Au-S 結合の安定性を評価し、保存温度の最適化を行った。この H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の Au-S 結合の安定性を評価には、

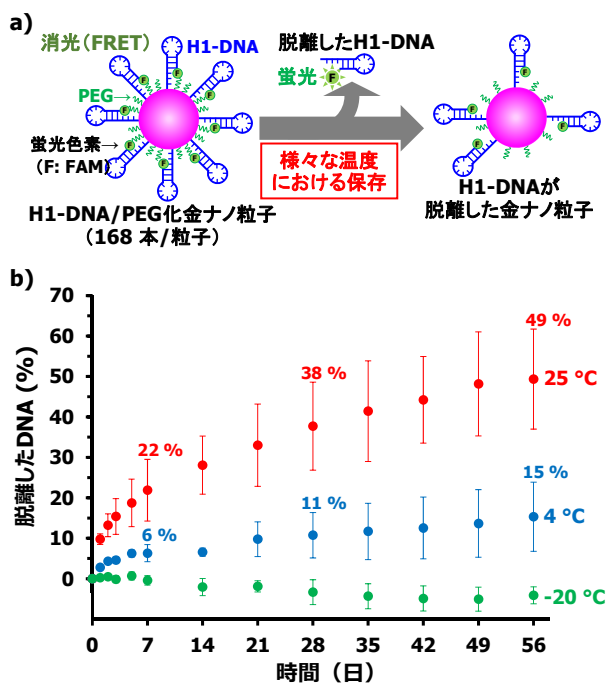


図 1 a) H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の Au-S 結合の安定性評価の概要、b) 異なる温度で長期間保存時における脱離した H1-DNA の割合 (%)

図 1 a) に示すように蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET: Förster Resonance Energy Transfer) を利用した。具体的には、H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子上の 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 FRET が起こるため、FMA が発光することはできない。一方、Au-S 結合の切断を介して金ナノ粒子から脱離した H1-DNA の FAM は、金ナノ粒子からの距離が離れることで FRET が解消され FAM が発光できるようになる。すなわち、各温度で所定期間保存した H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子溶液の遠心分離を行い、その上澄み溶液の蛍光 (FAM) 測定を行うことで Au-S 結合の安定性を評価した。H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子溶液を異なる温度 (25, 4, および -20 °C) で長期間 (56 日間=2 か月間) 保存した際、保存時間に対する金ナノ粒子から脱離した H1-DNA の割合 (%) を図 1 b) 示す。保存温度が高くなるにつれ脱離する H1-DNA の割合は高くなることが明らかとなった。一方、-20 °C で 2 か月間保存した H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子は、凝集を起こさず高い分散安定性を保ち、かつ Au-S 結合の切断による DNA の脱離を全く起こさないことが明らかとなった。

次に、この H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子を用いて新規な DNA ナノシステムを構築し、標的 RNA の検出を行った。この DNA ナノシステムによる標的 RNA の検出の原理を図 2 a) に示す。H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子上の 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 FRET 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

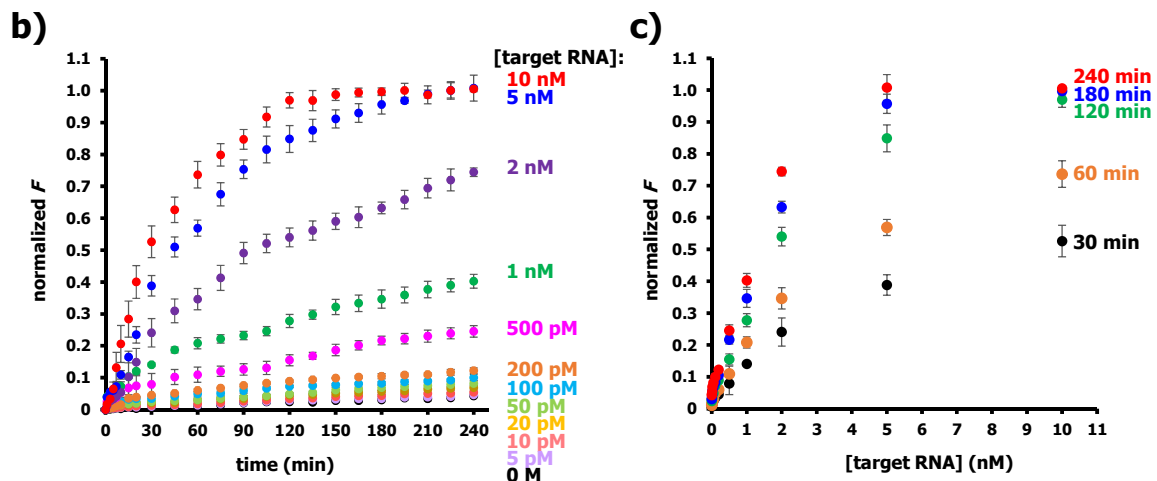
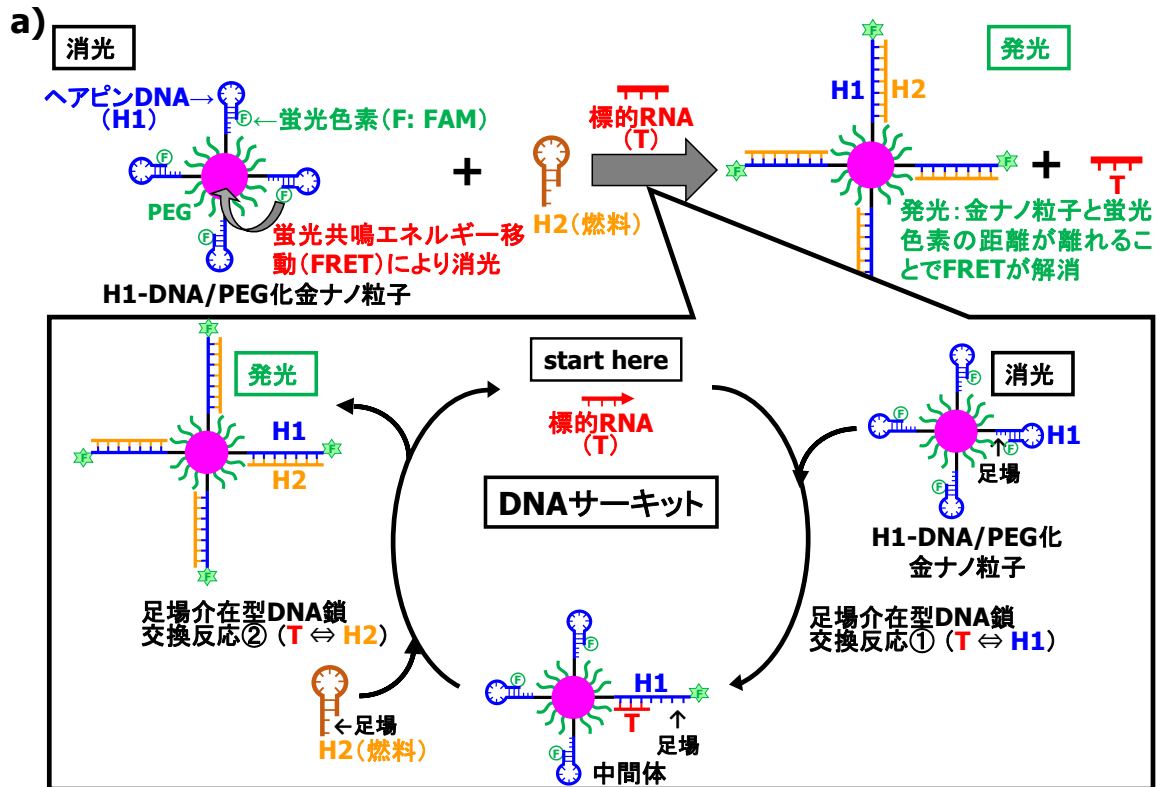


図 2 a) 足場介在型 DNA 鎖交換反応を素反応とした新規な DNA ナノシステムによる標的 RNA の検出原理、b) 様々な標的 RNA 濃度における時間に対する規格化した蛍光強度 (F) の変化。c) 様々な標的 RNA 濃度における各検出時間と規格化した蛍光強度 (F) の変化。

ない。次いで、標的 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、粒子表面に隣接する 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、同一粒子上で足場介在型 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 FAM が発光できるようになる。図 2b)には、様々な標的 RNA 濃度存在下における、時間に対する規格化した蛍光強度 (F) の変化を示す。標的 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 RNA の存在下においては、標的 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 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 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 2 c) に示す。全ての検出時間において、標的 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 RNA 濃度と蛍光強度の直線性は、標的 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 = 24 pM (pM: 10^{-12} M) および検出時間 240 分において LOD = 4.0 pM をそれぞれ達成することができた。

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 日立財団倉田奨励金」に厚く御礼申し上げます。

2. 発表 (研究成果の発表)

国内外の学会誌、学会講演会等における発表があれば 5 件程度記載。

記載内容：氏名、題目、誌名、巻、号、頁 (年次)、学会名 (場所、年次)

1) Shotaro juji and Motoi Oishi “Long-term Cryopreservation of Ready-to-Use DNA-Modified Gold Nanoparticle Derivatives: Effect of Preservation Temperature on Their DNA Dissociation and Functional Stability” *Bulletin of the Chemical Society of Japan* (2022) 95, 3, 410–412.

2) 十字 祥太郎、大石 基 「Au-S結合によってDNAを修飾した金ナノ粒子誘導体の長期保存

における安定性およびDNA鎖交換反応の評価」日本分析化学会第70回分析化学会年会 (オンライン、2021年)