

DNAクリック連鎖反応に最適なナノ界面の構築によるアルツハイマーの客観的早期診断

著者	大石 基
発行年	2018
URL	http://hdl.handle.net/2241/00158807

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04632

研究課題名(和文) DNAクリック連鎖反応に最適なナノ界面の構築によるアルツハイマーの客観的早期診断

研究課題名(英文) Precise control of nano-interface for diagnosis of Alzheimer's disease

研究代表者

大石 基 (OISHI, Motoi)

筑波大学・数理工学系・講師

研究者番号：90419242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、申請者が独自に開発した「ナノ界面構築法」を基盤技術としてナノ粒子界面の最適化を行い、血中に存在するアルツハイマー認知症に關与するマイクロRNA (miRNA：バイオマーカー) を検出・定量できるシステムのプラットフォームを確立することである。具体的には、金ナノ粒子界面におけるDNAハイブリダイゼーションにおいて、金ナノ粒子界面の構造の最適化を行なった。さらに、DNA/PEG化金ナノ粒子とDNA化磁性粒子を組み合わせた、酵素・装置フリーなmiRNAの比色検出システムを構築した。以上のことから、この手法はアルツハイマー認知症の早期診断システムの開発に有用なツールである。

研究成果の概要(英文)：This study described a systematic study of DNA hybridization kinetics on gold nanoparticle (GNPs) with different surface modifications using probe DNA and different molecular weight poly(ethylene glycol)s (PEGs) for detection of Alzheimer's disease-related microRNA (miRNA). A new colorimetric miRNA assay system was developed using DNA/PEG-GNPs and DNA-modified magnetic beads (DNA-MBs). Eventually, target miRNAs could be detected at room temperature without need for other enzymes or instruments, even in the presence of cell lysate and serum. These results show that this system might be a useful tool for usage in Alzheimer's disease diagnosis based on the detection of circulating miRNAs.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノ界面 miRNA DNA 金ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

わが国は世界一の超高齢化社会であり、それに伴いアルツハイマー認知症が社会問題となっている。現在、アルツハイマー認知症に用いられている薬剤は、病気の進行を抑制するだけであり、根治することはできない。さらに、アルツハイマー認知症に対する診断は医師らの認識力検査や脳スキャンのみであり、バイオマーカーも存在しないことから客観的早期診断法がないのが現状である。近年、タンパク質をコードしていない約 20 塩基ほどの 1 本鎖非翻訳 RNA の 1 つであるマイクロ RNA (miRNA) が、様々な疾患に関与していることが知られている。さらに、アルツハイマー認知症に関与する miRNA がエクソソーム (脂質膜のベシクル) に封入された状態で血中に安定に存在することも報告されている。したがって、実質臓器と比べてアクセスしやすい血中から miRNA を高感度に検出できればアルツハイマー認知症に対する客観的早期診断も可能であると考えられる。現在、血中 miRNA を検出する手法としては、酵素を用いた PCR (ポリメラーゼ連鎖反応) 法が用いられている。しかし、従来の PCR 法では、酵素 (逆転写酵素やポリメラーゼ) 阻害物質が血中に含まれているため、血液などから miRNA を再現性良く直接検出・定量することは困難である。そのため、PCR 法では手間・時間・コストのかかる前処理 (エクソソームの単離および miRNA の単離) が必要不可欠となっているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が独自に開発した「ナノ界面構築法」を基盤技術としてナノ粒子界面の最適化を行い、血中に存在するアルツハイマー認知症に関与する miRNA (バイオマーカー) を検出・定量できるシステムのプラットフォームを確立することである。本システムの特徴は、血液サンプルの複雑な前処理 (エクソソームの単離と miRNA の逆転写) をすること無く標的 miRNA を高感度に直接検出・定量でき、かつ高選択性 (ファミリー内の 1 つの miRNA)、高い再現性 (非酵素系により生体物質の阻害を受けない) および簡便性 (目視でも検出可能) を有している。すなわち、本システムは現在の高齢化社会において決定的な診断法がないアルツハイマー認知症の診断・予防に非常に意義深いものである。

3. 研究の方法

本研究のような血中に存在するアルツハイマー認知症に関与する miRNA を検出・定量できるシステムのプラットフォームを開発するうえで以下のように研究を進めた。

(1) 金ナノ粒子界面での DNA ハイブリダイゼーションにおけるナノ界面構造の最適的化

(2) 構造制御されたナノ界面構造を有する金ナノ粒子を用いたアルツハイマー認知症に関与する miRNA の検出システムの開発

4. 研究成果

(1) 金ナノ粒子界面での DNA ハイブリダイゼーションにおけるナノ界面構造の最適的化

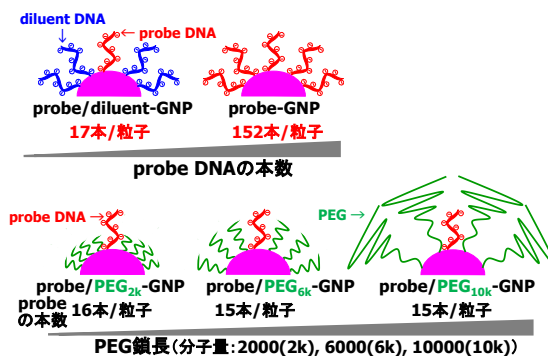


図 1 様々な界面構造 (probe DNA 密度、表面電荷、高分子の分子量) を有する種々の金ナノ粒子 (GNP)

様々な界面構造 (probe DNA 密度、表面電荷、高分子の分子量) を有する種々の金ナノ粒子 (GNP) (粒径 15 nm) を調製した。具体的には、probe DNA (target DNA とハイブリダイズする塩基配列) のみを有する金ナノ粒子 (probe-GNP) および probe DNA と diluent DNA (A₂₀: target DNA とハイブリダイズしない塩基配列) を有する金ナノ粒子 (probe/diluent-GNP) を調製した。さらに、様々な分子量 (2k, 6k, and 10k) を有する非イオン性かつ水溶性のポリエチレングリコール (PEG) と probe DNA を有する金ナノ粒子 (probe/PEG_x-GNP, x = 2k, 6k, and 10k) の調製も行った。また、各 GNP 1 個あたりの probe DNA の本数を図 1 に示す。さらに、動的光散乱 (DLS) による粒径測定から GNP 界面における probe DNA および PEG の鎖長を計算した。その結果、PEG_{10k} (9.0 nm) > probe DNA (7.0 nm) > PEG_{6k} (4.5 nm) > PEG_{2k} (3.0 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、probe DNA は PEG_{2k} 層および PEG_{6k} 層からは突き出ており、一方、PEG_{10k} 層に埋もれている状態であることが示唆された。ここで重要なことは、① probe-GNP と probe/diluent-GNP は 1 粒子あたりの総 DNA 本数 (probe DNA + diluent DNA) は同じであり (152 本/粒子 = 同じ電荷)、1 粒子あたりの probe DNA の本数 (152 本/粒子 vs. 17 本/粒子) のみが異なるだけである。すなわち、この両者の界面における DNA ハイブリダイゼーションを比較することで、1 粒子あたりの probe DNA の本数の影響を明らかにすることが出来る。② probe/diluent-GNP と probe/PEG_x-GNPs (x = 2k, 6k, and 10k) の 1 粒子あたりの probe DNA の本数 (15~17 本/粒子)

はほぼ同じである。すなわち、これら界面における DNA ハイブリダイゼーションを比較することで、PEG（電荷）および PEG 鎖長の影響が明らかにすることが出来る。

表 1 様々な界面構造を有する金ナノ粒子 (GNP) 界面における DNA ハイブリダイゼーションの速度定数 (ppk_h)

	$appk_h$ ($M^{-1} sec^{-1}$)
probe-GNP	$(2.0 \pm 0.7) \times 10^4$
probe/diluent-GNP	$(3.6 \pm 0.7) \times 10^4$
probe/PEG _{2k} -GNP	$(2.7 \pm 0.4) \times 10^5$
probe/PEG _{6k} -GNP	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^5$
probe/PEG _{10k} -GNP	$(6.6 \pm 0.7) \times 10^4$

様々な界面構造を有する金ナノ粒子 (GNP) 界面における DNA ハイブリダイゼーションの測定は、蛍光色素をラベル化した target DNA を用いて GNP と蛍光色素間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用することで行った。すなわち、時間に対する蛍光高強度の減少を測定し、このデータを基に Langmuir モデルを用いてハイブリダイゼーションの速度定数 ($appk_h$) を決定した。各 GNP 界面における DNA ハイブリダイゼーションの速度定数 (ppk_h) を表 1 に示す。まず、probe-GNP と probe/diluent-GNP の比較において、 $appk_h$ の値は probe/diluent-GNP のほうが大きかった。すなわち、1 粒子あたりの probe DNA の本数が少ない probe/diluent-GNP のほうが DNA ハイブリダイゼーションの速度が速いことが分かった。これは、probe/diluent-GNP のほうがハイブリダイズした target DNA 間の距離が長いから、立体障害および電荷反発が probe-GNP に比べ少ないためであると考えられる。

また、probe/diluent-GNP と probe/PEG_x-GNPs (x = 2k, 6k, and 10k) の比較においては、probe/diluent-GNP の $appk_h$ の値は、いずれの PEG 分子量 (2k, 6k, and 10k) を有する probe/PEG_x-GNPs のそれらよりも小さかった。すなわち、マイナス電荷を有する diluent DNA を PEG (電荷を有さない) に置き換えることで DNA ハイブリダイゼーションの速度が向上することが分かった。これは、diluent DNA と target DNA と静電反発 (マイナス電荷同士の反発によるもの) と考えられる。

さらに、probe/PEG_x-GNPs (x = 2k, 6k, and 10k) 内 (PEG 分子量) の比較においては、最も分子量が大きい probe/PEG_{10k}-GNP の $appk_h$ の値は、probe/PEG_{2k}-GNP および probe/PEG_{6k}-GNP のそれらよりも小さかった。これは、probe/PEG_{10k}-GNP における probe DNA は PEG_{10k} 層に埋もれている状態であるため、PEG_{10k} 層が target DNA のハイブリダイ

ゼーションにおいて立体障害として働いたためであると考えられる。

一方、probe DNA が PEG 層より若干突き出ている probe/PEG_{2k}-GNP と probe/PEG_{6k}-GNP の比較においては、 $appk_h$ の値にいずれも大きな違いは認められなかった。このことは、金ナノ粒子界面における DNA ハイブリダイゼーションにおいては、probe DNA の PEG 層からの突き出し構造が鍵となっていることが示唆された。

(2) 構造制御されたナノ界面構造を有する金ナノ粒子を用いたアルツハイマー認知症に關与する miRNA の検出システムの開発

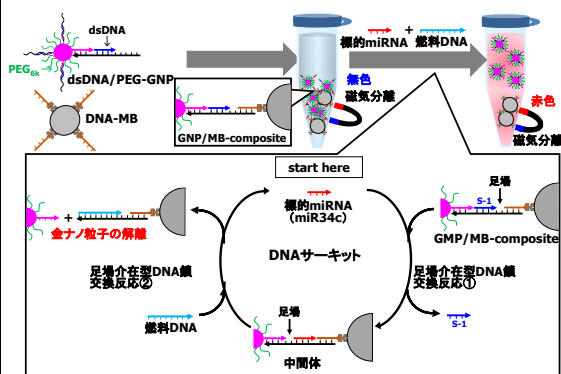


図 2 制御されたナノ界面構造を有する金ナノ粒子を用いたアルツハイマー認知症に關与する miRNA の検出システムの原理

上述 (1) の成果を踏まえ、DNA が PEG 層からの突き出し構造を有する DNA/PEG_{6k}-GNP (DNA の鎖長: 9.4 nm, PEG_{6k} の鎖長: 4.5 nm) を用いてアルツハイマー認知症に關与する miRNA の検出システムの開発を行なった。この検出システムの原理を図 2 に示す。DNA/PEG_{6k}-GNP に相補的な塩基配列を有する DNA をハイブリダイゼーションさせることで、二本鎖 DNA (dsDNA) を有する dsDNA/PEG-GNP を調製した。また、DNA ハイブリダイゼーションを介して dsDNA/PEG-GNP と DNA 化磁性粒子 (DNA-MB) を連結させた複合体 (GNP/MB-composite) を形成させた。この GNP/MB-composite の溶液に標的 miRNA および燃料 DNA を加えると、toe-hold (足場) 介在型 DNA 鎖交換反応を素反応とする DNA サーキットが引き起こされる。この DNA サーキットにおいては、①標的 miRNA と GNP/MB-composite の DNA (s-1) が交換反応を起こし中間体が形成する、次いで②この中間体の toe-hold を介して燃料 DNA がさらに交換反応を誘起し、GNP/MB-composite から DNA/PEG-GNP (シグナル) が脱会合すると同時に標的 miRNA が再生する。したがって、標的 miRNA は脱会合反応 (①~②) の触媒として機能することになる。その結果、磁気分離後の溶液の色は無色から金ナノ粒子由来の赤色に変化する。すなわち、このシステ

ムでは、酵素および装置フリーでシグナル増幅が可能であり、標的 miRNA を目視で検出することが可能となる。

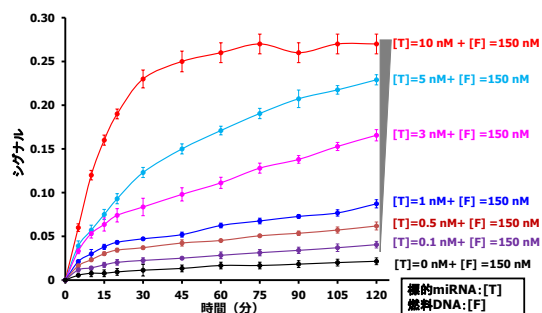


図3 種々の標的 miRNA (miR34c: アルツハイマー認知症由来の miRNA) 存在下における時間に対するシグナルの変化

図3に様々な濃度の標的 miRNA (miR34c: アルツハイマー認知症由来の miRNA) 存在下における、時間に対するシグナルの変化を示す。標的 miRNA 非存在下および燃料 DNA 非存在下においては、シグナルの変化はほとんど確認されなかった。一方、燃料 DNA および標的 miRNA 存在下においては、標的 miRNA の濃度および時間に依存してシグナルの増加(無色→赤色)が確認された。すなわち、標的 miRNA をトリガーとして toe-hold (足場) 介在型 DNA 鎖交換反応を素反応とする DNA サーキットが引き起こされたことが示唆される。

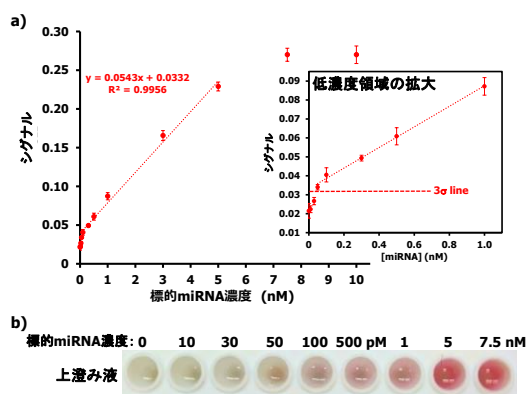


図4 反応時間 (DNA サーキット時間) 120 分後の a)シグナル値と標的 miRNA 濃度との関係および b)上澄み溶液の写真

図4 a)には反応時間 (DNA サーキット時間) 120 分後のシグナル値と標的 miRNA 濃度との関係を示す。標的 miRNA 濃度が、50 pM ~ 5 nM の範囲で直線性が確認されとことより、この検出システムのダイナミックレンジ (定量範囲) は3桁ほどであった。また、検出限界濃度 (LOD) は、およそ 50 pM であることが分かった。さらに、反応時間 (DNA サーキット時間) 120 分後の上澄み溶液の写真を図4 b)に示す。上澄み溶液の色は、標的

miRNA 濃度が高くなるにつれ金ナノ粒子由来の赤色が濃くなっているのが確認された。また、この際、目視での検出限界濃度 (LOD) は、およそ 100 pM であった。

以上のことから、申請者が独自に開発した「ナノ界面構築法」を基盤技術としてナノ粒子界面の最適化を行なった本検出システムは、血中に存在するアルツハイマー認知症に關与する miRNA (バイオマーカー) を検出・定量できるツールとして有用である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Motoi Oishi and Satomi 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. DOI: 10.1002/smll.201601741
- ② Akari Takashima and Motoi Oishi “Kinetic Study of DNA Hybridization on DNA-modified Gold Nanoparticles with Engineered Nano-Interfaces” *RSC Advances* (2015) 5, 76014-76018. DOI: 10.1039/C5RA13116B

[学会発表] (計6件)

- ① 大石 基、杉山聡深、指数関数的な増幅機能を有する DNA サーキットによる酵素フリーおよび室温での miRNA の検出、日本分析化学会第 66 回年会、東京理科大学葛飾キャンパス (東京都葛飾区) 2017 年 09 月 09 日~2017 年 09 月 12 日
- ② 大石 基、杉山聡深、コロイドを用いた DNA サーキットシステム: DNA/PEG 化金ナノ粒子と磁性粒子の複合体の触媒的脱会合による核酸の検出、第 67 回コロイドおよび界面化学討論会、北海道教育大学旭川キャンパス (北海道旭川市) 2016 年 09 月 21 日~2016 年 09 月 24 日
- ③ 大石 基、杉山聡深、DNA/PEG 化金ナノ粒子・磁性粒子複合体の DNA サーキットによる酵素および装置フリーな miRNA の検出、日本分析化学会第 65 回年会、北海道大学札幌キャンパス (北海道札幌市) 2016 年 09 月 13 日~2016 年 09 月 16 日
- ④ 大石 基、高島明里、DNA/PEG 共固定化金ナノ粒子界面における DNA ハイブリダイゼーションの速度論的解析、第 66 回コロイドおよび界面化学討論会、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市) 2015 年 09 月 10 日~2015 年 09 月 12 日

- ⑤ 高島明里、大石 基、DNA 化金ナノ粒子表面における DNA ハイブリダイゼーションの速度論的解析、第 75 回分析化学討論会、山梨大学甲府キャンパス（山梨県甲府市）2015 年 05 月 23 日～2015 年 05 月 24 日
- ⑥ 大石 基、高島明里、異なる界面構造を有する DNA 化金ナノ粒子表面における DNA ハイブリダイゼーションの速度論的研究、ナノ学会第 13 回大会、東北大学片平キャンパス(宮城県仙台市) 2015 年 05 月 11 日～2015 年 05 月 13 日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：複合体、試料中の対象核酸の検出方法及びキット

発明者：大石 基、杉山聡深

権利者：国立大学法人 筑波大学

種類：特許

番号：特願 2016-123934 号

出願年月日：2016 年 6 月 22 日

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 基 (OISHI, Motoi)

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：90419242

(2) 研究協力者

杉山聡深 (SUGIYAMA, Satomi)