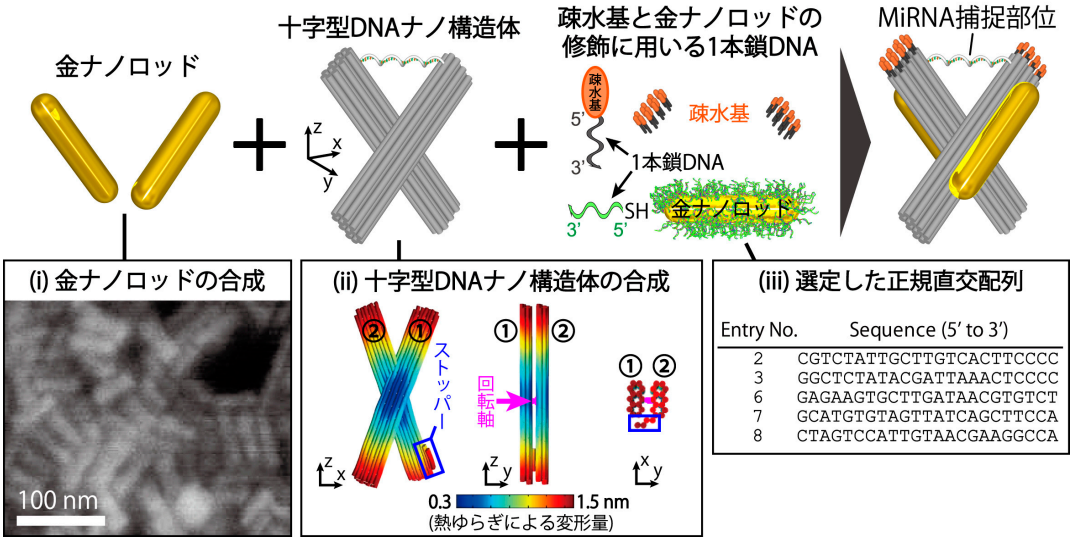
194　光学DNAデバイスによるマイクロRNA超高感度検出	石川　大輔

【目的】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、簡便かつ精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、近年キラルなプラズモン場を利用した光学的な検出法が注目されている。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。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する。

【方法】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］液液二相界面 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、1. 金ナノロッドの合成、2. 十字型 DNA ナノ構造体の設計およびその作製条件の最適化、3. 疎水基および金ナノロッド修飾用 1 本鎖 DNA の設計まで達成した。

【結果】1. 金ナノロッドの合成：固定する足場となる十字型 DNA ナノ構造体に収まるサイズの金ナノロッドを得るために、合成に必要な各種試薬の濃度設定の検討を行い、意図するサイズの金ナノロッドを得ることに成功した。また、金ナノロッドの合成に用いる金シード溶液の濃度と金ナノロッドのアスペクト比の依存性を見出した。2. 十字型 DNA ナノ構造体の設計およびその作製条件の最適化：DNA オリガミを用いて十字型 DNA ナノ構造体を設計した。DNA オリガミによるナノ構造体設計は、フリーソフトウェア caDNAno で行い、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な、かつ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という条件を満たす構造を得ることに成功した。さらに、十字型 DNA ナノ構造体を作製するためのアニーリング時の温度条件とカチオン濃度の最適化を行った。3. 疎水基修飾および金ナノロッド固定用 1 本鎖 DNA の設計：十字型 DNA ナノ構造体への疎水基修飾および金ナノロッド固定を、互いが干渉することなく実施するために、最適な正規直交配列から選定した。これまでに報告されている 37 本の候補に対して 3 つの熱力学的計算をウェブソフトウェア NUPACK で行い、十字型 DNA ナノ構造体に最も干渉しにくい 5 本の正規直行配列を選定した。

キラルプラズモニック DNA ペンチの開発



194. 光学 DNA デバイスによるマイクロ RNA 超高感度検出

石川　大輔

東京工業大学 物質理工学院 応用化学系 原研究室

Key words：DNA ナノテクノロジー，二次元界面膜，キラルプラズモン，マイクロ RNA

緒　言

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、簡便かつ精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。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、その精度は低くならざるを得ない［1］。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おり、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、高精度かつ簡便な手法として実用化が期待されている［2］。

キラルなプラズモン場を利用した miRNA 検出における課題は、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プラズモニック手法が、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・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。

そこで報告者は、検出感度の向上のため、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に着目した［3］。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 1,000 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［4］。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。

本研究は、DNA オリガミを利用して、金ナノロッドを固定した DNA ナノデバイスである、キラルプラズモニック DNA ペンチを作製し、水（高誘電率）－有機溶媒（低誘電率）の液液二相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。

方　法

本研究の目的達成のため、［目標 1］キラルプラズモニック DNA ペンチの開発、［目標 2］液液二相界面 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、1. 金ナノロッドの合成、2. 十字型 DNA ナノ構造体の設計およびその作製条件の最適化、3. 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。

1.　金ナノロッドの合成

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十字型 DNA ナノ構造体の長さ約 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（$HAuCl_4$）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（$NaBH_4$）溶液を、激しく攪拌しながら Au（Ⅲ）-CTAB 溶液に滴下した。2 分間激しく撹拌した後に 25℃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（$AgNO_3$）溶液を加え、溶液を 15 分間静置した後、$HAuCl_4$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撹拌し、25℃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	金シード溶液
(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。

2. 十字型 DNA ナノ構造体の設計およびその作製条件の最適化

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［5］。DNA オリガミによるナノ構造体設計は、caDNAno 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、十字型 DNA ナノ構造体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、設計した十字型 DNA ナノ構造体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阻害を防ぎ、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、十字型 DNA ナノ構造体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。

3. 疎水基修飾および金ナノロッド固定用 1 本鎖 DNA の設計

十字型 DNA ナノ構造体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十字型 DNA ナノ構造体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）［6］。この配列を利用することで、十字型 DNA ナノ構造体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十字型 DNA ナノ構造体を構成する 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。

結果および考察

1. 金ナノロッドの合成

合成した金ナノロッドは走査電子顕微鏡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。

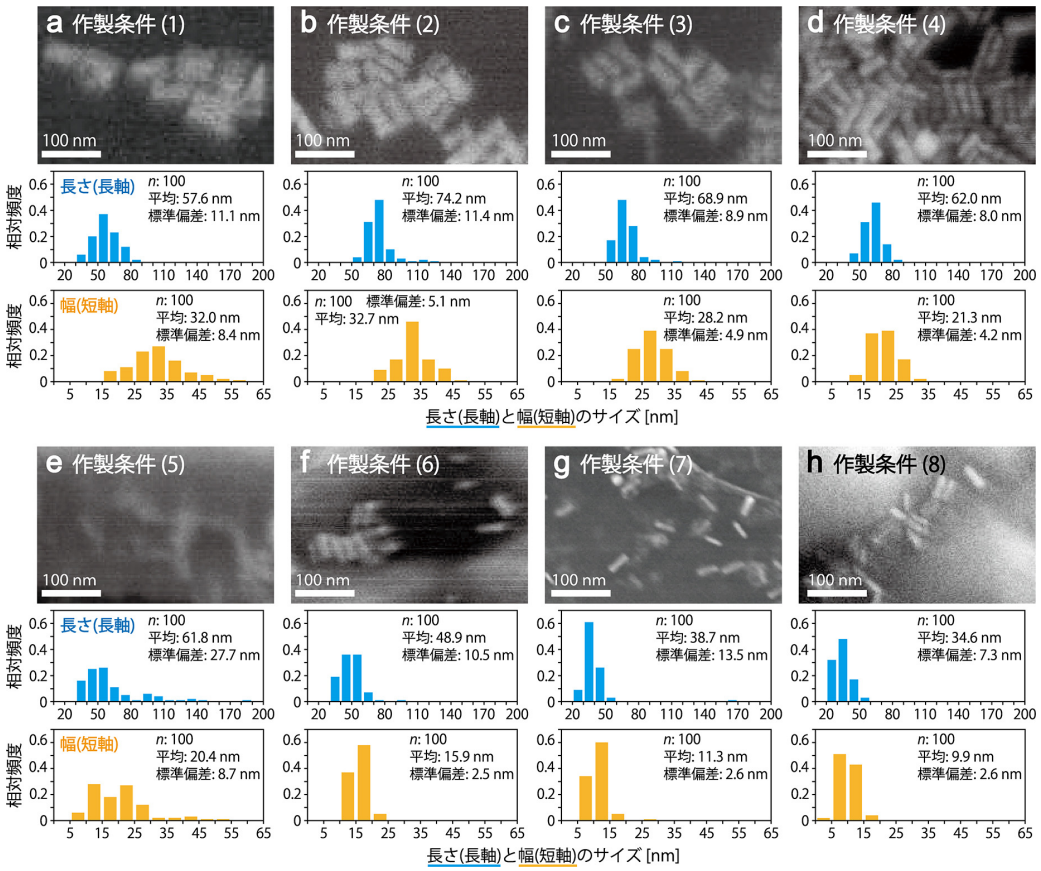


図 1. 合成した金ナノロッドの SEM 像

(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。

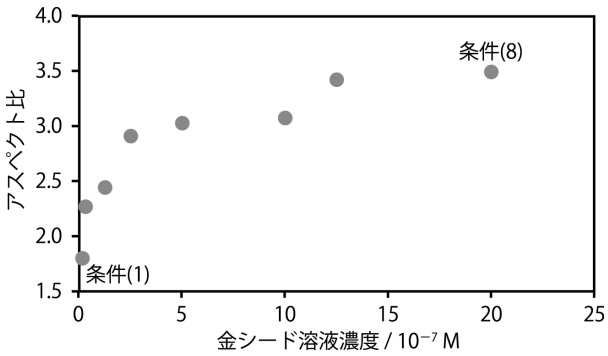


図 2. 得られた金ナノロッドと合成に用いた金シード溶液濃度の相関

アスペクト比は、金ナノロッドの長さと幅のそれぞれの平均値から算出した。

上記 8 つの合成条件のうち、金ナノロッドを固定する十字型 DNA ナノ構造体のサイズ制限（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（図 2）。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。

2. 十字型 DNA ナノ構造体の設計およびその作製条件の最適化

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、またさまざまな 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。

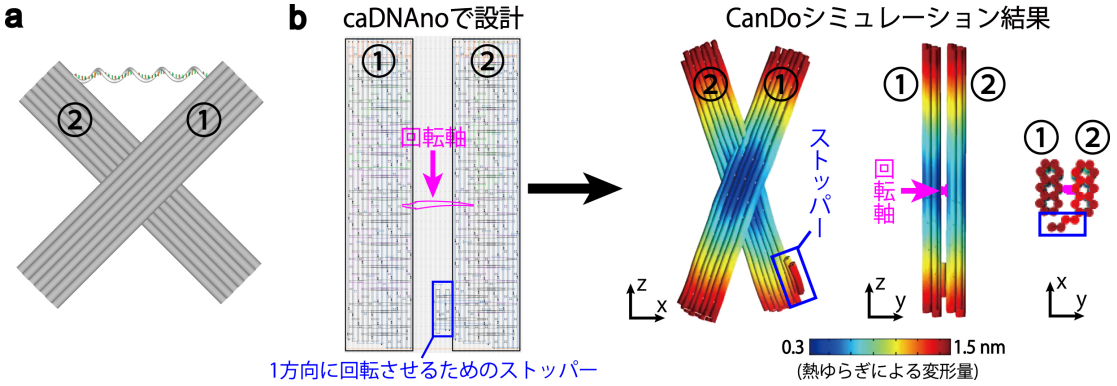


図 3. DNA ペンチの三次元構造

a） DNA ペンチの模式図。

b） DNA ペンチの caDNAno 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℃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［7］。本研究では、上記の温度範囲における十字型 DNA ナノ構造体形成に必要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℃ / 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［8］。二価カチオン（Mg^{2+}）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 ナノ構造体を新規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、Mg^{2+}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十字型 DNA ナノ構造体の形成に最適な濃度を調査したところ、Mg^{2+}濃度 20 mM および Na^{+}濃度 10 mM が最適であると決定した。以降、この条件下で十字型 DNA ナノ構造体の作製を行った。

3. 疎水基および金ナノロッド修飾用 1 本鎖 DNA の設計

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プル 48 本を連結した延長ステープル 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 本とスキャフォルド 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 本と全ステープル 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、十字型 DNA ナノ構造体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′)
1	GCATCTACACTCAATACCCAGCC
2	CGTCTATTGCTTGTCACTTCCCC
3	GGCTCTATACGATTAAACTCCCC
4	GAAGGAATGTTAAAATCGTCGCG
5	GCACCTCCAAATAAAAACTCCGC
6	GAGAAGTGCTTGATAACGTGTCT
7	GCATGTGTAGTTATCAGCTTCCA
8	CTAGTCCATTGTAACGAAGGCCA
9	GTCCCGGAAAATACTATGAGACC
10	GAGTCCGCAAAAATATAGGAGGC
11	CATCTGAACGAGTAAGGACCCCA
12	CGCGATTCCTATTGATTGATCCC
13	GGTGGCTTATTTACAGGCGTTAG
14	TTCGGTTCTCTCCAAAAAAAGCA
15	GGCGCTTAAATCATCTTTCATCG
16	CCGTCGTGTTATTAAAGACCCCT
17	CGAGAGTCTGTAATAGCCGATGC
18	TGGCACTTATAGCTGTCGGAAGA
19	GGCTGTTTACAAAATCGAGCTAG
20	TGCGAAATTTGAAAAATGGCTGC
21	GCATTGAGGTATTGTTGCTCCCA
22	GGCTGTCAATTTATCAGGGAGGC
23	GCCTCAAGTACGACTGATGATCG
24	GAAGCCCTATTTTGCAATTCCCC
25	CGCGGGTACGTTGATGTAACAAA
26	ATGGGAACCTAAAAGTGTGGCTA
27	GAGTCAATCGAGTTTACGTGGCG
28	TTCGCTGATTGTAGTGTTGCACA
29	GCCTCACATAACTGGAGAAACCT
30	CCATCAGGAATGACACACACAAA
31	GGGATAGAACTCACGTACTCCCC
32	CCATATCCGATTATTAGCGACGG
33	GGGATCAGTTGTACACTCCCTAG
34	CTGTGATGATACCGTTCTTCACC
35	CGCGGTTGAAATAACTAATCGCG
36	GGTCGAAACGTTATATTAACGCG
37	TAGCACCCGTTAAAACGGAAATG

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

b 正規直交配列 No.1–37と修飾箇所のステープル48本を連結した延長ステープル計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ナノ構造体のスキャフォルド(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プル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	GGCTCTATACGATTAAACTCCCC
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) Fukui K, Bessho Y, Shimada A, Yokoyama S, Kuramitsu S. Thermostable Mismatch-Recognizing Protein MutS Suppresses Nonspecific Amplification during Polymerase Chain Reaction (PCR). Int J Mol Sci. 2013 Mar 21;14(3):6436-53. doi: 10.3390/ijms14036436. PMID: 23519109; PMCID: PMC3634412.

2) Chandrasekaran AR, Punnoose JA, Zhou L, Dey P, Dey BK, Halvorsen K. DNA nanotechnology approaches for microRNA detection and diagnosis. Nucleic Acids Res. 2019 Nov 18;47(20):10489-10505. doi: 10.1093/nar/gkz580. PMID: 31287874; PMCID: PMC6847506.

3) Sakurai M, Tamagawa H, Inoue Y, Ariga K, Kunitake T. Theoretical study of intermolecular interaction at the lipid-water interface .1. Quantum chemical analysis using a reaction field theory. J Phys Chem B. 1997 June 12;101(24):4810-4816. doi: 10.1021/jp9700591.

4) Onda M, Yoshihara K, Koyano H, Ariga K, Kunitake T. Molecular recognition of nucleotides by the guanidinium unit at the surface of aqueous micelles and bilayers. A comparison of microscopic and macroscopic interfaces. J Am Chem Soc. 1996 Sept 11;118(36): 8524-8530. doi: 10.1021/ja960991

5) Rothemund PW. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. Nature. 2006 Mar 16;440(7082):297-302. doi: 10.1038/nature04586. PMID: 16541064.

6) Kitajima T, Takinoue M, Shohda KI, Suyama A. Design of Code Words for DNA Computers and Nanostructures with Consideration of Hybridization Kinetics. DNA Computing. 2008 June 4;4848:119-129. doi: 10.1007/978-3-540-77962-9_12
7) Sobczak JP, Martin TG, Gerling T, Dietz H. Rapid folding of DNA into nanoscale shapes at constant temperature. Science. 2012 Dec 14;338(6113):1458-61. doi: 10.1126/science.1229919. PMID: 23239734.
8) Douglas SM, Dietz H, Liedl T, Högberg B, Graf F, Shih WM. Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. Nature. 2009 May 21;459(7245):414-8. doi: 10.1038/nature08016. PMID: 19458720; PMCID: PMC2688462.