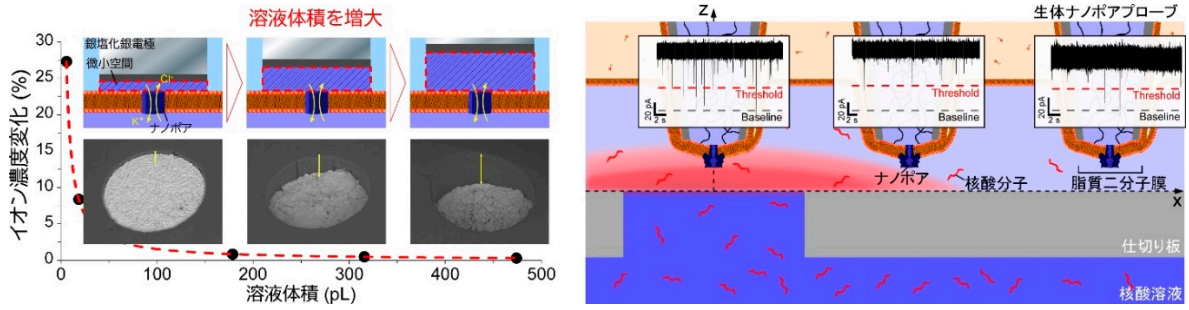
204　分泌型miRNA検出を目指した電気化学プローブの開発	庄司　観

【目的】短鎖のノンコーディング 1 本鎖 RNA であるマイクロ RNA（miRNA）は、細胞の発生・分化・増殖など様々な生命現象を調節する機能を担っている。さらに、細胞外に放出される分泌型 miRNA は、細胞間の情報伝達機能を有し、miRNA の分泌量がガンや心疾患など様々な病気に応じて変化することが知られている。そのため、細胞から放出される miRNA をリアルタイムで計測することは、細胞が関係する様々な生命現象の解明に繋がり、細胞生物学・創薬科学・診断医学など多くの学術分野への貢献が期待できる。分泌型 miRNA の検出・解析方法としては、定量 PCR、miRNA アレイ、RNA シークエンサが従来からよく用いられており、近年では検出感度の向上および検出時間の短縮を目指し電気化学 DNA（e-DNA）センサやナノポアセンサなどの手法が応用されている。しかしながら、どの解析手法においても、前処理プロセスが必要であり、細胞から放出された miRNA のオンサイト・リアルタイム検出は達成されていない。一方我々のグループでは、マイクロ・ナノ電極先端に脂質二分子膜形成しポア形成膜タンパク質を再構築した生体ナノポアプローブを開発することで、ナノポアセンシングによる局所的なケミカルセンシング技術を確立している。本生体ナノポアプローブでは、脂質溶液と水溶液が層となった浴溶液に電極を挿入することで脂質二分子膜を形成可能であり、ナノポアの分子通過を電気的に計測するナノポアセンシングプラットフォームとして非常に有用である。そこで本研究では、本生体ナノポアプローブ技術を応用し、細胞近傍に脂質二分子膜を形成することで細胞から放出される miRNA の検出が可能なプローブ型人工細胞膜システムの開発を目的とする。

【方法】人工細胞膜プローブシステムの基礎的技術を確立させるために、マイクロ電極先端に形成される微小空間の最適化および生体ナノポアプローブの位置制御による局所核酸分子検出実験を行った。プローブ型人工細胞膜システムでは、浴溶液に対しプローブ側の溶液量が非常に少ないため、ナノポアセンシングによる移動によって溶液内のイオン濃度が変化し電流値が減衰するという問題点があった。そこで、電極をエッチングすることでマイクロ電極先端に形成される微小空間サイズを制御し、微小空間サイズに対するイオン電流の減衰の関係性を明らかにした（図左）。局所核酸分子検出実験では、プローブをナノメートルレベルで位置制御可能な走査型プローブ顕微鏡システムを構築し、細胞を模擬したマイクロメートルスケールの細孔から放出される核酸分子の検出実験を行った（図右）。

【結果】微小空間サイズの最適化においては、微小空間サイズを 200 pL 以上とすることでチャネル電流測定における電流減衰を低減可能であることが分かり、生体ナノポアプローブ開発における設計指針を確立することができた。今後は、ナノポアセンシングによる微小空間内への核酸分子の取り込み量の影響に関しても検討し、プローブサイズの最適化を試みる。一方、局所核酸分子検出実験においては、プローブ - 試料間の距離によって変化するイオン電流値からプローブ - 試料間の距離を補正した後に、プローブを試料と水平に移動させることで細孔から放出される核酸分子濃度勾配をマッピングすることに成功した。以上のように本研究では、生体ナノポアプローブの設計指針の確立、生体ナノポアプローブを用いた局所核酸分子の検出に成功した。今後は、新たな細胞観察機能として本システムを応用し、細胞伝達機能の調査および細胞情報伝達に関連する様々な疾患の病理メカニズムの解明を目指す。

生体ナノポアプローブの最適化および局所核酸分子検出実験



204. 分泌型 miRNA 検出を目指した電気化学プローブの開発

庄司　観

長岡技術科学大学 産学融合トップランナー養成センター

Key words：人工細胞膜，ナノポアセンシング，マイクロ電極

緒　言

短鎖のノンコーディング 1 本鎖 RNA であるマイクロ RNA（miRNA）は、細胞の発生・分化・増殖など様々な生命現象を調節する機能を担っている。さらに、細胞外に放出される分泌型 miRNA は、細胞間の情報伝達機能を有し、miRNA の分泌量がガンや心疾患など様々な病気に応じて変化することが知られている［1］。そのため、細胞から放出される miRNA をリアルタイムで計測することは、細胞が関係する様々な生命現象の解明に繋がり、細胞生物学・創薬科学・診断医学など多くの学術分野への貢献が期待できる。分泌型 miRNA の検出・解析方法としては、定量 PCR、miRNA アレイ、RNA シークエンサが従来からよく用いられており、近年では検出感度の向上および検出時間の短縮を目指し電気化学 DNA（e-DNA）センサ［2］やナノポアセンサ［3］などのセンシング手法が応用されている。しかしながら、どの解析手法においても、前処理プロセスが必要であり、細胞から放出された miRNA のオンサイト・リアルタイム検出は達成されていない。

一方、我々のグループでは、マイクロ・ナノ電極先端に脂質二分子膜形成し、ポア形成膜タンパク質を再構築した生体ナノポアプローブを開発することで、ナノポアセンシングによる局所的な分子検出技術を開発している［4，5］。本生体ナノポアプローブでは、脂質溶液と水溶液が層となった浴溶液に表面を親水処理した電極を挿入することで脂質二分子膜を形成する。さらに、脂質二分子膜にポア形成膜タンパク質を再構築することで、ポアサイズに応じたイオン電流を計測することができる。その後、標的分子がナノポアを通過することでポアが一時的に塞がれることで、スパイク状の阻害シグナルが検出される（図 1）。上記のシステムでは、プローブの上下動のみで簡便に脂質二分子膜形成が可能であり、さらに任意の場所に膜形成が可能であるため、ナノポアセンシングによる局所分子検出システムとして有用である。

しかしながら本プローブ型システムでは、プローブ側の溶液量がピコリットルレベルと少なくイオン濃度変化による電流減衰が発生すること、生体ナノポアプローブの位置をナノメートルレベルで制御するプローブ走査システムは開発されておらず本プローブを用いた分子マッピングは達成されていないことが課題として挙げられる。そこで本研究では、上記の課題解決のために、プローブ先端の微小空間制御による溶液量とイオン電流の関係調査［6］およびプローブ走査システムの開発による分子濃度マッピング実験を行った。

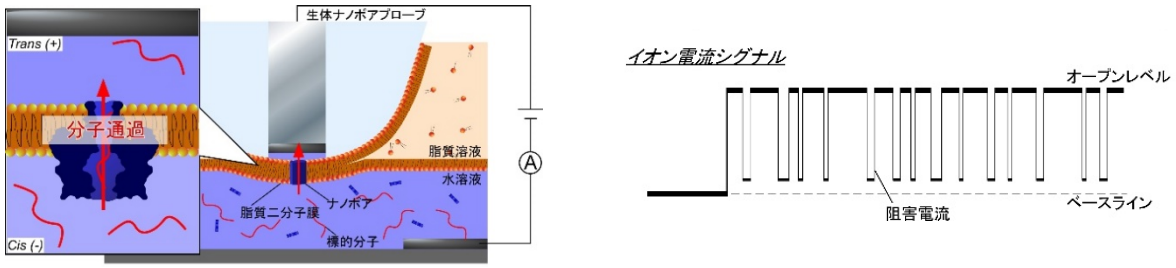


図 1. 生体ナノポアプローブを用いたナノポアセンシングの概略図

方　法

1. プローブ先端の溶液量とイオン電流減衰の関係調査

生体ナノポアプローブの設計指針を確立するために従来研究において課題となっていたイオン電流の減衰に関して、エッチングにより微小空間サイズが制御されたマイクロ電極を作製しポア形成膜タンパク質を通過するイオン電流を計測することで調査した。まず、我々のグループですでに報告している銀塩化銀マイクロ電極を作製後、本電極を銀エッチング溶液に 100、1,000、2,000、3,000 s 静置することで先端の微小空間サイズが異なる電極を作製した。その後、水溶液と脂質溶液が層となった浴溶液に本電極を挿入し電極先端に脂質二分子膜を形成した。水溶液には、一定サイズのポアを再現性良く構築することが可能なポア形成膜タンパク質である α-hemolysin（αHL）を加え、ポアが挿入される際のイオン電流をモニタリングした。

得られた電流波形の解析は、Common Lisp を用いた独自のプログラムを用いて行った。αHL の膜挿入によって得られるステップ状のシグナルを検知し、ステップが得られた電流値、ステップの幅、ステップが得られるまでの Charge Flux（電流の時間積分値）を計算する。その後、図 2 に示すように、ステップ幅とステップが得られた電流値および Charge flux をプロットし近似直線を図示することで電流減衰を評価した。

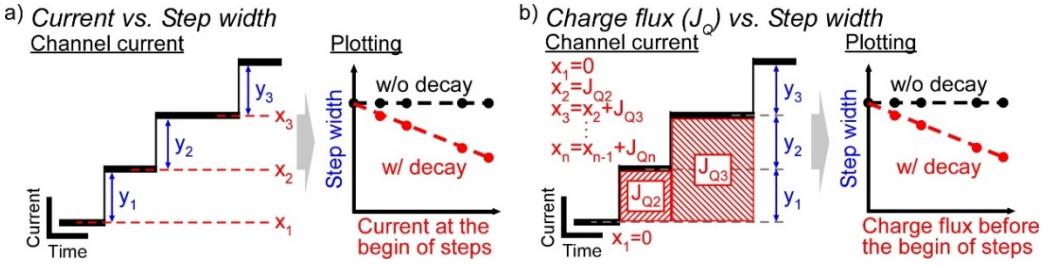


図 2.　電流減衰の解析方法

a)　電流値とステップ幅による電流減衰の解析。

b)　Charge flux とステップ幅による電流減衰の解析。

2. 生体ナノポアプローブを用いた局所核酸分子検出実験

生体ナノポアプローブの走査システムとして、電流フィードバックによってピエゾステージを制御する走査型イオンコンダクタンス顕微鏡を自作した（図 3a）。また、マイクロメートルスケールの細孔から拡散によって分子濃度勾配が形成可能な、濃度勾配形成チャンバ（図 3b）を作製し、本チャンバによって形成された核酸分子の濃度勾配家測実験を行った。まず、パルス電圧を印加することでプローブ先端に形成された脂質二分子膜を割り、アプローチカーブを所得することで細孔とプローブ位置をキャリブレーションした。その後、プローブを上下動させることで脂質二分子膜を再形成し、ポア形成膜タンパク質を再構築した後に、任意の測定位置までプローブを移動させナノポアセンシングを行った。

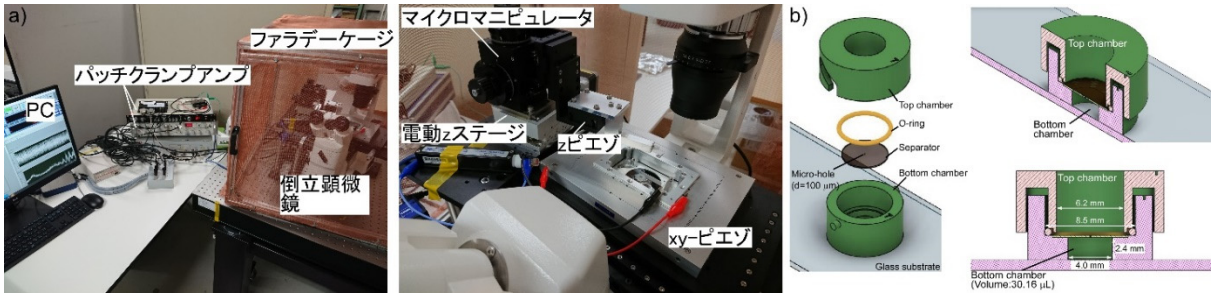


図 3. 走査型プローブ顕微鏡のセットアップと濃度勾配形成チャンバの概略図

a) 走査型プローブ顕微鏡はピエゾステージ、パッチクランプアンプおよび制御用の PC から構築される。

b) 濃度勾配形成チャンバは細孔が構築された仕切り板によって隔てられて 2 つの上下チャンバから構成される。

結果および考察

1. 溶液量に対するイオン電流の減衰

マイクロ電極をエッチングした結果、エッチング時間に比例したエッチング深さが得られ、微小空間体積が 18.5、178.6、315.7、474.0 pL の銀塩化銀マイクロ電極の作製に成功した（図 4）。また、従来研究で報告しているマイクロ電極の微小空間体積が 5.7 pL であるため、微小空間サイズが 80 倍以上の電極作製に成功した。そのため、本電極を使用することによりナノポアセンシングによるイオン濃度変化を 1／80 に低減できると考えられる。

作製したマイクロ電極を用いて脂質二分子膜を形成し、αHL のチャネル電流計測を行い、得られた電流シグナルから源流減衰に関して解析した結果、微小空間サイズが大きくなるに従って電流減衰が低減されることが分かった（図 5）。また、微小空間体積を 200 pL 以上とすることにより電流減衰が明確に改善されており、生体ナノポアプローブの設計指針として溶液量を 200 pL 以上にすることが重要であることが示唆された。さらに、脂質二分子膜の形成確率や寿命に関しても評価した。その結果、形成確率や寿命は微小空間サイズに関係せず同様の結果となり、脂質二分子膜の形成確率は約 75.3%、膜寿命は 1 時間以上であった。以上の結果より、エッチングされたマイクロ電極を用いた生体ナノポアプローブのナノポアセンサへの有用性が示唆された。

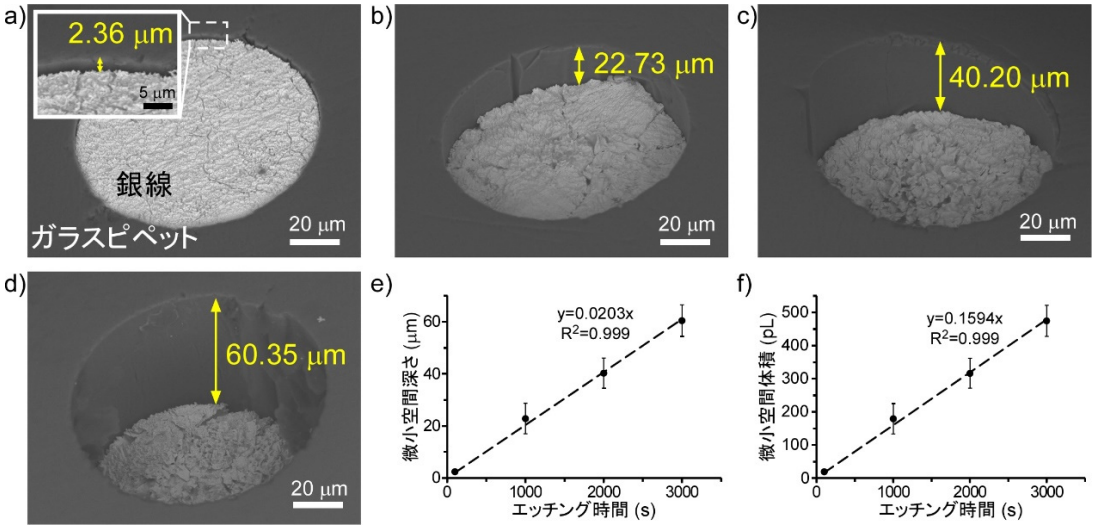


図 4. マイクロ銀電極のエッチング結果

a～d）エッチング時間 100、1,000、2,000、3,000 s のマイクロ電電極。

e) エッチング時間と微小空間深さの関係。

f) エッチング時間と微小空間体積の関係。

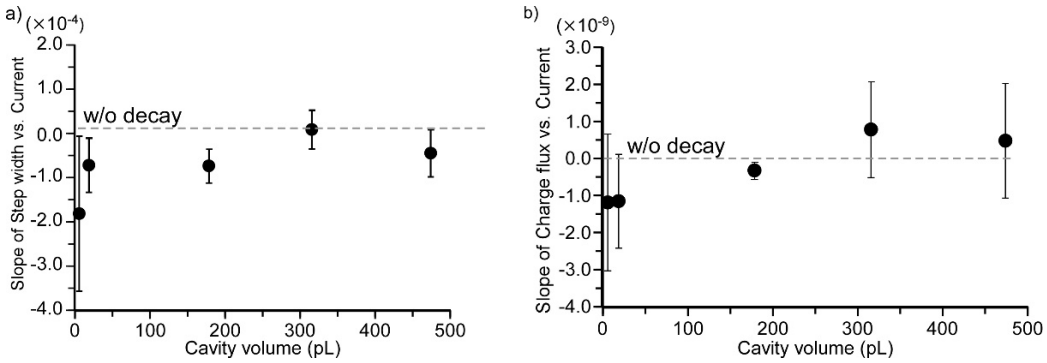


図 5. 各微小空間体積における電流減衰の評価

a) ステップ幅と電流値の関係から得られた近似直線の傾き。

b) ステップ幅と Charge flux の関係から得られた近似直線の傾き。

2. 生体ナノポアプローブを用いた局所核酸分子検出

構築した生体ナノポアプローブ走査システムを用いて局所核酸分子検出実験を行った結果、各計測点において核酸分子のナノポア通過による阻害電流が確認された（図 6a）。得られた阻害電流シグナルの頻度を解析した結果、細孔から遠ざかるにつれて低下していることが確認された（図 6b）。また、有限要素法シミュレーションにより得られた理論値と同様な阻害頻度が得られており、本システムによって局所的な核酸分子の検出に成功したと考えられる。また本実験系は、細胞から放出される miRNA の拡散を模倣したモデルとなっており、本実験により細胞から放出される miRNA 検出の可能性が示唆された。

細胞から放出される分泌物質は拡散によって周囲に広がり他の細胞へ伝達されため、分泌物質の機能を解明するためには、試料となる細胞とセンサの距離を正確に制御し分子検出を行う必要がある。しかしながら、従来の生体ナノポアプローブによる局所分子検出実験においては、試料とプローブ間の距離を計測する機能が無く、正確に位置制御することが困難であった。一方、本研究では生体ナノポアプローブのアプローチカーブを取得し、プローブ-試料間の距離をキャリブレーションすることが可能であるため、試料との距離を正確に制御し分子検出を行うことが可能である。そのため、本システムを用いることで細胞から放出される miRNA の分布を正確にマッピングできる可能性がある。

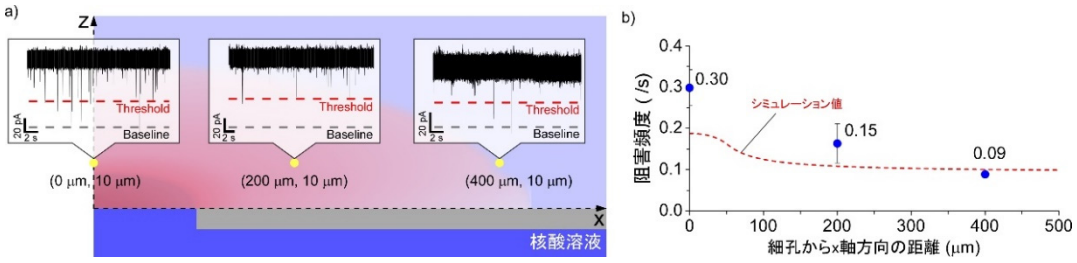


図 6. 生体ナノポアプローブによる局所核酸分子検出結果

a) 各計測位置における電流シグナル。

b) 各計測位置における阻害シグナルの頻度。

謝　辞

本研究の遂行にあたりご支援賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. RNA Biology. 2011 Sep 1;8(5):706–13. PMID: 21712654 DOI: 10.4161/rna.8.5.16154

2) Fan C, Plaxco KW, Heeger AJ. Electrochemical interrogation of conformational changes as a reagentless method for the sequence-specific detection of DNA. PNAS. 2003 Aug 5;100(16):9134–7. PMID: 12867594 DOI: 10.1073/pnas.1633515100

3) Venkatesan BM, Bashir R. Nanopore sensors for nucleic acid analysis. Nature Nanotech. 2011 Oct;6(10):615–24. PMID: 21926981 DOI: 10.1038/nnano.2011.129

4) Shoji K, Kawano R, White RJ. Spatially Resolved Chemical Detection with a Nanoneedle-Probe-Supported Biological Nanopore. ACS Nano. 2019 Feb 26;13(2):2606–14. PMID: 30724558 DOI: 10.1021/acsnano.8b09667

5) 1. Shoji K, Kawano R, White RJ. Recessed Ag/AgCl Microelectrode-Supported Lipid Bilayer for Nanopore Sensing. Anal Chem. 2020 Aug 4;92(15):10856–62. PMID: 32597640 DOI: 10.1021/acs.analchem.0c02720

6) Hasegawa N, Shoji K. Microcavity volume control on a tip of Ag/AgCl electrodes for stable channel current measurements of biological nanopores. Analyst. 2022 Mar 14;147(6):1191–8. PMID: 35195650 DOI: 10.1039/D2AN00014H