

令和元年6月20日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16408

研究課題名(和文) 蛍光符号化による超多重分子情報伝送に基づくマイクロRNAの簡易測定システムの開発

研究課題名(英文) Development of a microRNA measurement system based on a multiplexed fluorescence readout technique

研究代表者

西村 隆宏 (Takahiro, Nishimura)

大阪大学・工学研究科 助教

研究者番号：10722829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、マイクロRNA(miRNA)バイオマーカーのその場検査に向けた、蛍光信号を用いた効率的な分子情報伝送技術を開発することを目的とする。基盤技術として、蛍光増幅の時間発展と蛍光波長の組み合わせを利用した蛍光符号化と、一括多重に取得した蛍光信号から同時に複数の分子種を同定する手法を実験により確認した。また、蛍光信号への符号化プロセスにおけるエラー耐性を評価し、拡張に向けた設計指針を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色として、光・分子情報処理をmiRNA検出へ応用することにより、情報通信技術のナノ領域への実用展開の一例を与えることが挙げられる。分子検出において、分子レベルでの情報加工と蛍光読み出しへ高度な情報通信技術を適用できれば、物質により制限された条件において最大限に情報を伝送することができる。本研究の成果は、安価で簡単な操作によるmiRNAバイオマーカー検出を可能にし、癌の超早期発見や進行ステージの確かつ迅速な診断につながる。これは、医療現場に留まらず、日常生活における健康状態の把握を高精度で可能にし、未病段階での予防や早期治療の普及につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop a multiplexed fluorescence readout method using time varied fluorescence signals for point of care testing of microRNA (miRNA) biomarkers. Multiplexed fluorescence readout was experimentally confirmed with fluorescence coded DNA strands and three molecular beacons. Numerical simulation demonstrated that the time-varied fluorescence signals can enhance the readout accuracy.

研究分野：情報フォトンクス

キーワード：光情報処理 蛍光計測 生体分子計測 簡易診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血液や唾液などの体液中に含まれるマイクロ RNA (miRNA) は、疾病状態を客観的・定量的に示す有用なバイオマーカーとして期待されている。癌の超早期発見や個別化医療などにおいて miRNA バイオマーカーを利用するためには、臨床現場のその場にて低コスト・簡便・迅速に複数種類の miRNA を検出・定量する必要がある。miRNA 計測には、対象 miRNA の認識と検出信号を読み出し可能な物理量へ変換することが必要となる。リアルタイム PCR による増幅と DNA マイクロアレイを使用した空間的な超並列検出手法などが利用されている [Pritchard 他: *Cancer Prev. Res.* **19**, 631 (2012)]。これら手法の高速化・低コスト化によるアプローチが考えられるが、各手法の原理に根本的な課題点を有するため困難である。例えば、増幅反応のための温度制御、検出用電極や分子を分画するための微細加工されたチップ、専用の検出装置が必要などの点が挙げられる。サンプルの温度制御、基板チップの加工、専用の検出装置を必要としない、新しい分子スクリーニング技術が求められる。

蛍光検出は、生体分子計測において広く使用されているが、同時多重に蛍光測定可能な分子の種類は、スペクトル分離可能な蛍光分子の数の制限される。この制限を超える手法として、蛍光波長とその強度の組み合わせによる蛍光符号法が提案され [Y Li: *Nat. Biotech.* **23**, 885 (2005)]、使用可能な蛍光分子より多数の対象分子を蛍光符号として検出できる。しかし、同時検出は、基板やマイクロビーズなどの固層へ固定し、各蛍光符号を空間的に分離しなければならない。顕微観察やフローサイトメトリーなどが必要となり、測定手法や装置の簡便性・低コスト化に課題がある。

2. 研究の目的

本研究は、マイクロ RNA (miRNA) バイオマーカーのその場検査を実現するために、簡易な操作で超多重 miRNA 測定を可能にする分子情報の光伝送技術を開発する。miRNA 情報の効率的な伝送のための蛍光符号化を提案し、DNA の自己組織過程を利用して実証する。試薬の混合と簡易な蛍光計測により、トレーニングフリーで利用可能な、miRNA の検出・定量技術の実証を目的とする。具体的には、DNA の連鎖的な伸長反応を利用した蛍光増幅、蛍光増幅の時間発展と蛍光波長の組み合わせを利用した蛍光符号化、一括多重に取得した蛍光信号のベイズモデル選択に基づく miRNA 情報の復号を実証する。

3. 研究の方法

DNA の自律的反応を利用した蛍光符号化に基づく効率的な分子情報伝送を実現し、超多重 miRNA 測定手法を実証する。DNA の連鎖的に進行する伸長反応を設計し、微量な miRNA バイオマーカーの検出信号の増幅を実現する。また、各 miRNA に割り当てた蛍光符号に応じて、増幅される蛍光強度を変調する。一括多重に取得した蛍光信号から、ベイズ解析に基づく蛍光符号の復号アルゴリズムを構築する。蛍光符号化反応過程のパラメータを事前情報とし、miRNA の検出・定量を実現する。混合と簡易な蛍光測定による複数 miRNA の多重計測を実証し、保健医療的な観点からの評価により、提案手法の有効性と実用に向けた課題点を明らかにする。

本手法で提案する一括取得した多重蛍光信号からの miRNA 情報複合のプロセスを図 1 に示す。miRNA を入力として、ヘアピン構造 DNA と酵素反応を組み合わせるなどして、蛍光符号を割り当てた符号化 DNA を出力する。符号化 DNA は、蛍光プローブ DNA と反応し、miRNA ごとに割り当てられた蛍光符号を出力する。蛍光符号は、蛍光強度、蛍光波長、蛍光信号生成速度を用いて、miRNA ごとに割り当てる。各蛍光符号化反応の速度定数、蛍光符号化の規則、蛍光取得時の読出しノイズなどのパラメータを使用して、符号化過程と蛍光信号取得過程をモデル化する。設計した蛍光符号化反応におけるパラメータを使用して、多重化して取得した蛍光信号から、ベイズ推定によりサンプルに含まれている miRNA 種類を推定する。

原理実証のために、10 種の符号化 DNA と 3 種の DNA ビーコンを用意した。符号化 DNA を構成するサイトおよび DNA ビーコンの配列を表 1 に示す。MB-A555、MB-A594、MB-A647 は、それぞれ Alexa555、Alexa 594、Alexa647 で修飾された DNA 分子ビーコンである。xxA555、xxA594、xxA647 (xx = 15、16、17) は、それぞれ MB-A555、MB-A594、MB-A647 と結合するサイトとなる。各サイトの長さは 15-17 塩基とした。符号化 DNA の配列を表 2 に示す。配列 T20 は符号化 DNA 鎖のサイト間のスペーサーとして配置した。分子ビーコンを含むサンプルを 95 °C で 5 分間加熱し、室温 (22 °C) まで急冷し、ヘアピン構造を形成させた。符号化 DNA 鎖を分子ビーコン溶液に添加して蛍光シグナルを得た。各プローブおよび各コード鎖の最終濃度は、32 μ L 緩衝液 (10mM リン酸緩衝液および 250mM NaCl) 中でそれぞれ 6.25 μ M および 0.625 μ M であった。符号化 DNA の組み合わせを各実験ごと変更した。Alexa 555、Alexa594 を波長 450nm にて励起し、Alexa647 を波長 660nm にて励起した。ファイバーカップリング分光計を用いて 5 秒間の間隔で 100 秒間測定した。測定された蛍光スペクトルは、最小二乗曲線を用いて各蛍光分子のスペクトル成分に分解した。実験はすべて室温 (22 °C) で行った。

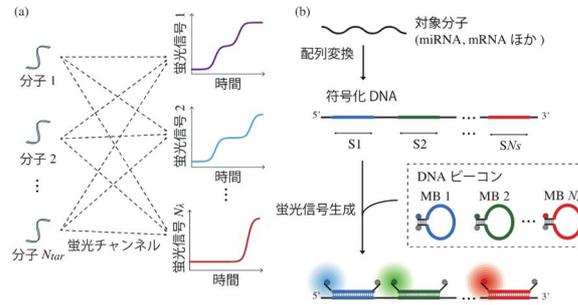


図 1: (a) 蛍光符号化による分子取得と (b) 符号化 DNA による蛍光信号プロセスの概要。

名前	配列 (5'-3')
MB-A555	*1CGAGCATAGGACCACGGGATGCAGCTCG*2
MB-A594	*3GGAGTGGGTCAACCCGACAGCCTCC*2
MB-A647	*4CTTGCCATGAGATTCACAGTCAACG*2
15A555	ATCCCGTGGTCCAT
16A555	CATCCCGTGGTCCAT
17A555	GCATCCCGTGGTCCAT
15A594	TGTCGGGGTTGACCC
16A594	TGTCGGGGTTGACCCA
17A594	CTGTCGGGGTTGACCCA
15A647	CTGTTGAATCTCATG
16A647	CTGTTGAATCTCATGG
17A647	ACTGTTGAATCTCATGG
T20	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

表 1: 使用した配列。*1、*2、*3、*4 は Alexa555, BHQ-2, Alexa594, Alexa647 の修飾位置を示す。

#	構成 (5'-3')
1	16A555+T20+16A555+T20+16A555
2	16A594+T20+16A594+T20+16A594
3	16A647+T20+16A647+T20+16A647
4	15A555+T20+15A594
5	15A594+T20+15A647
6	15A555+T20+15A647
7	17A555+T20+15A594+T20+15A594
8	15A555+T20+15A555+T20+17A647
9	17A555+T20+17A555+T20+15A594
10	15A555+T20+17A647+T20+17A647

表 2: 符号化 DNA の配列構成リスト。

4. 研究成果

(1) 単一の符号化 DNA の読み出し

まず、単一の符号化 DNA を読み出して重検出を確認した。10 種の符号化 DNA をそれぞれ読み出した際の、十分反応時間を置いた際の蛍光スペクトルと、蛍光信号をそれぞれの符号化 DNA によるものとして考えた場合の対数尤度を図 2 に示す。全てのサンプルで、対数尤度は、含まれるコード化ストランド番号が一致するとき最大となった。結果は、使用した蛍光シグナル数より多数のターゲットが同定されたことを示した。これにより、多重検出に必要とされる蛍光プローブの数を減らすことが可能となる。また、設計された符号化 DNA と 3 種のユニバーサルビーコンにより、多重分子検出のための復号可能な分子シグナルの生成を可能にした。

(2) 符号化 DNA の多重読み出し

多重検出を実証するために、我々は異なるコード鎖を含む 2 つのサンプルを調製した、サンプル A には符号化 DNA #1、#2、サンプル B には符号化 DNA #7、#9 とした。両サンプルは、MB-A555 および MB-A594 に対応するサイトを同数有する。すなわち、信号生成速度のみがことなる。それぞれのサンプルの蛍光信号を取得し、符号化 DNA の全組み合わせから対数尤度が最大となる符号化 DNA の組み合わせは、サンプル A では符号化 DNA #1、#2、サンプル B では符号化 DNA #7、#9 となり、正しく読み取れた。また、多重度をあげた場合として、符号化 DNA #1、#5、#7、#8、#9、#10 を含むサンプル C を用意した。符号化 DNA はランダムに選択した。蛍光信号を読み取り、含まれる符号化 DNA を推定したところ、正しく読み出すことに成功した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

T. Nishimura, H. Kimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Experimental assessment and analysis of super resolution in fluorescence microscopy based on multiple-point spread function fitting of spectrally demultiplexed images," *Optical Review*, 査読有, 25, pp. 384-390 (2018).

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10043-017-0379-y>

S. Shimomura, T. Nishimura, H. Kimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Photothermal Fabrication of Microscale Patterned DNA Hydrogels," *Royal Society Open Science*,

査読有, 5, pp.171779 (2018).

DOI: <https://doi.org/10.1098/rsos.171779>

T. Nishimura, H. Kimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Fluorescence encoded super resolution imaging based on a location estimation algorithm for high-density fluorescence probes," *Optical Review*, 査読有, 24, pp. 212-218 (2017).

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10043-016-0286-7>

T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Multiplexed fluorescence readout using time responses of color coded signals for biomolecular detection," *Biomedical Optics Express*, 査読有, 7, pp. 5284-5293 (2016).

DOI: <https://doi.org/10.1007/s10043-016-0286-7>

〔学会発表〕(計 8 件)

Y. Ogura, T. Nishimura, K. Yamada, and J. Tanida, "Photonically driven DNA nanomachine with hybrid functions towards cell measurement," Proc. SPIE 10510, *Frontiers in Biological Detection: From Nanosensors to Systems X*, SPIE Photonics West 2018 BIOS (20 February 2018) [oral].

T. Nishimura, K. Tsuchida, Y. Ogura, and J. Tanida, "A molecular-sized optical logic circuit for digital modulation of a fluorescence signal," Proc. SPIE 10714, *the third International Conference on Photonics Solutions (ICPS2017)*, 1071409 (November 2017, Pattaya) [oral].

S. Shimomura, T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Photo-induced formation of DNA hydrogel using quenchers," the 23rd International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (DNA23), P.127 (September 2017, Austin) [poster].

T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "A photonic DNA processor using excitation energy transfer-based signaling," the 23rd International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (DNA23), P.117 (September 2017, Austin) [poster].

S. Shimomura, T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Quantitative evaluation of DNA hydrogel growth induced by light," the Twelfth Japan-Finland Joint Symposium on Optics in Engineering (OIE '17), P1 (September 2017) [poster].

T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Optical fabrication of patterned DNA hydrogel," Collaborative Conference on Materials Research (June 2017, Jeju) [invited].

S. Shimomura, T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Optical Fabrication of DNA Hydrogel Using Holographic Pattern," *Information Photonics 2017*, (April 2017, Yokohama) [oral].

T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, "Bayesian based fluorescence coded imaging using quantum dots," *The 3rd Biomedical Imaging and Sensing Conference 2017 (BISC'17)*, Proc. SPIE 10251, 102510Z (April 2017, Yokohama) [oral].

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年 :

国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。