

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02589

研究課題名(和文) ナノ粒子の界面設計に基づいたDNAウォーカーによる感染症のその場診断法の開発

研究課題名(英文) Development of Point of Care Testing for Infectious Diseases Based on DNA Walkers with Precisely Designed Nanoparticles

研究代表者

大石 基 (Oishi, Motoi)

筑波大学・数理工質系・准教授

研究者番号：90419242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、研究代表者が独自に開発した「ナノ界面構築法」によりポリエチレングリコール(PEG)とDNAを共固定したDNA/PEG化金ナノ粒子を精密に調製し、DNA鎖交換反応を介して標的核酸が同じ粒子内の界面のみを歩くように移動するDNAウォーカーを構築し、かつ感染症由来の核酸を検出できるシステムを構築することである。本研究では、本研究で鍵となるDNA/PEG化金ナノ粒子の長期保存法を確立し、様々な界面構造を有するDNA/PEG化金ナノ粒子の調製することで、界面構造とDNAウォーキングの相関を明らかにした。また、最適化されたDNAウォーカーを用いて、標的核酸の検出を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、様々な分野で用いられているDNA化金ナノ粒子(DNA/PEG化金ナノ粒子を含む)の長期保存法を初めて確立した。これにより、ナノ診断およびナノバイオテクノロジーの分野におけるDNA化金ナノ粒子の応用が今まで以上に展開されると思われる。また、本研究では、DNA/PEG化金ナノ粒子の界面構造(特にDNA密度)とDNAウォーキングの相関、および標的核酸の検出能の相関を明らかにすることができた。これにより、今後、感染症を迅速かつ高感度で「その場」診断できるシステムの開発が可能となるとと思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to precisely prepare DNA/PEGylated gold nanoparticles in which polyethylene glycol (PEG) and DNA are co-immobilized by the "nano-interface construction method" originally developed by me and to construct DNA walkers in which target nucleic acids move only at the interface in the same particle via DNA strand exchange reaction, and that can detect nucleic acids of infectious origin. In this study, I established a long-term storage method for DNA/PEGylated gold nanoparticles, which is the key to this research, and prepared DNA/PEGylated gold nanoparticles with various interface structures to clarify the correlation between the interface structure and DNA walking. In addition, optimized DNA walkers were used to detect target nucleic acids.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：金ナノ粒子 ナノ界面 DNA ナノマシン 診断 感染症

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

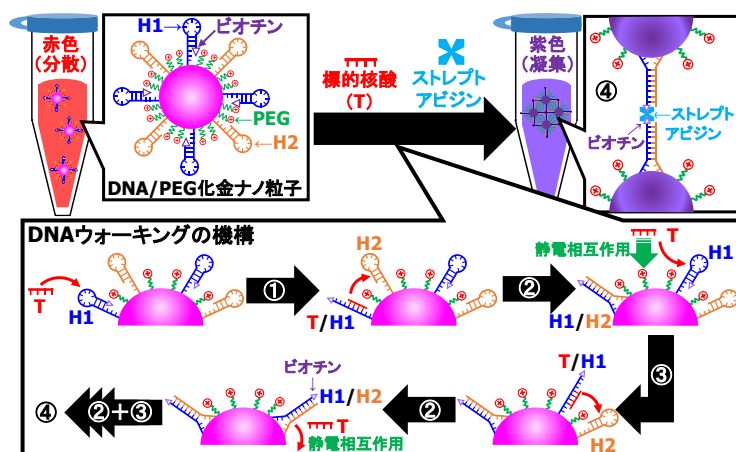
近年、ウイルスおよび細菌を病原体とする感染症（新型コロナウイルス、新型インフルエンザ、デング熱など）が世界各地で流行し大きな問題となっている。したがって、感染症の早期拡大防止および適切な初期治療の観点から、感染症の「その場」診断の重要性が高まっている。現在、酵素を用いた PCR (polymerase chain reaction) 法<sup>1</sup>による病原体由来の標的核酸 (RNA および DNA) の増幅・検出に基づいた診断が行なわれている。この手法は、検出感度が高く感染初期の段階でも診断が可能である。しかしながら、検体 (体液など) には、酵素 (ポリメラーゼおよび逆転写酵素) に対する阻害物質が含まれているため検体の前処理 (核酸の単離) が必要となる。また、標的核酸が RNA の場合には、逆転写酵素による RNA から DNA への変換も必要となる。さらに、特別な装置 (加熱/冷却機能を備えた蛍光検出装置) を用いて長時間 (4~6 時間) にわたり標的核酸の増幅・検出を行なう必要がある。すなわち、既存の PCR 法では、感染症を「その場」診断するのは困難である。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ず、検体を前処理することなく病原体由来の核酸を目視で検出するシステムの開発が必要不可欠となる。

### 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」<sup>2-5</sup>により PEG と 2 種類のヘアピン DNA を固定化した DNA/PEG 化金ナノ粒子を調製し、標的核酸を触媒とした連続した DNA 鎖交換反応を同じ粒子内の界面でのみ起こさせることができる DNA ウォーカーを構築し、酵素および装置を一切用いず、かつ検体を前処理することなく迅速かつ目視にて感染症の病原体由来の標的核酸を「その場」で検出できるシステムを開発することである。

### 3. 研究の方法

本研究の目的を達成するため、**図 1** に示すようにまず「ナノ界面構築法」により金ナノ粒子表面に末端に 4 級アミノ基 (プラス電荷:  $\oplus$ ) を有する PEG および末端にビオチンを有する 2 種類のヘアピン DNA (H1 と H2) を共固定した DNA/PEG 化金ナノ粒子を調製する。この際、ヘアピン構造を形成している状態では H1 と H2 のハイブリダイゼーションは起こらないため、溶液の色は分散している金ナノ粒子由来の赤色を示す。この DNA/PEG 化金ナノ粒子の溶液 (赤色) に標的核酸 (T) を含む検体とストレプトアビジン (ビオチン認識部位を 4 つ有するタンパク質) を



**図 1** DNA ウォーキング機構を介した DNA/PEG 化金ナノ粒子による核酸検出の概念図

加えると、①粒子界面の H1 と T との DNA 鎖交換反応が起こり、ヘアピン構造が直鎖構造に変化 (T/H1 が生成) する。②粒子界面の H1/T は、同じ粒子界面にある近接した H2 と DNA 鎖交換反応を起こし、T がリリースされる。③リリースされた T (マイナス電荷) は、PEG 末端の 4 級アミノ基 (プラス電荷) との静電相互作用により粒子界面に引き寄せられることで、再び同じ粒子界面にある近接した H1 と DNA 鎖交換反応を起こす。その後、T が触媒としては働くことにより②および③の過程が同じ粒子内でのみ繰り返される (粒子間では起こらない)。すなわち、標的核酸 (T) が同じ粒子内の界面をウォーキングすることになる。最終的には、④粒子の外側にビオチンが突き出た金ナノ粒子が増幅され、ストレプトアビジンを介して凝集することで、溶液の色が赤色から紫色 (凝集状態) に変化する。一方、T の非存在下では、ビオチンが粒子表面近傍に存在し、かつ隣接する DNA 同士の間で立体障害のためストレプトアビジンを介した凝集は起こらない。したがって、同じ粒子内の界面でのみ進行するこの DNA ウォーカーは、ナノ粒子界面における近接効果 (局所 DNA 濃度の増大) による反応全体の著しい加速が可能となり、理論上 1 分子の標的核酸 (T) が存在しさえすれば、酵素および装置を一切用いず、かつ検体を前処理することなく迅速に凝集体を形成 (赤色から紫色の変化) させることが可能となり、これまで実現不可能であった感染症の迅速かつ高感度な「その場」診断が可能になる。この本研究の目的を達成するにあたり、(1) DNA/PEG 化金ナノ粒子の保存安定性の評価、(2) 様々な界面構造を有する DNA/PEG 化金ナノ粒子の調製、(3) 界面構造の影響と DNA ウォーキングの評価および蛍光による標的核酸の検出、の項目に絞り研究を遂行した。

#### 4. 研究成果

##### (1) DNA/PEG 化金ナノ粒子の保存安定性の評価

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 (図 2)。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 2 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、FAM 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 2 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。

さらに、凍結 (-20 °C) 保存した H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の機能評価として、凍結保存前後の H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子上の H1-DNA と核酸 (T) との足場介在型 DNA 鎖交換反応の速度の比較を行った (図 3)。図 3 に示すように、凍結保存前後の H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の足場介在型 DNA 鎖交換反応の速度定数 ( $k$ ) は、凍結保存期間に関係なくほぼ一定の値を示した。すなわち、長期の凍結保存により H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の機能は、低下しないことが明らかとなった。

##### (2) 様々な界面構造を有する DNA/PEG 化金ナノ粒子の調製

次に「ナノ界面構築法」により、異なる DNA 密度を有する H1-DNA (H1) および H2-DNA (H2) と PEG を Au-S 結合を介して共固定させた H1/H2-DNA/PEG 化金ナノ粒子を調製した。図 4 には、H1/H2-DNA/PEG 化金ナノ粒子 1 個あたりの H1 および H2 の固定化本数と加えた DNA (H1 および H2) 濃度の関係を示す。加えた DNA (H1 および H2) 濃度が高くなるにつれ、H1 および H2 の固定化本数も増加し、DNA 濃度が 2  $\mu\text{M}$  以下では H1 および H2 の固定化本数はほぼ等しい (H1 : H2 = 1 : 1) ことが明らかとなった。これら異なる DNA 密度を有する H1/H2-DNA/PEG 化金ナノ粒子の中から、高密度 DNA/PEG 化金ナノ粒子 (H)、中密度 DNA/PEG 化金ナノ粒子 (H)、および低密度 DNA/PEG 化金ナノ粒子 (H) の 3 つのサンプルを用いて、次項の「界面構造の影響と DNA ウォーキングの評価および標的核酸の検出」を行った。

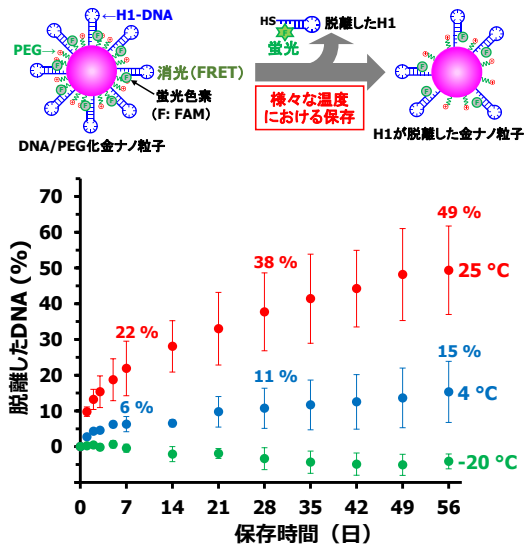


図 2 H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の Au-S 結合の安定性評価の概要、および異なる温度で長期間保存時における脱離した H1-DNA の割合 (%)

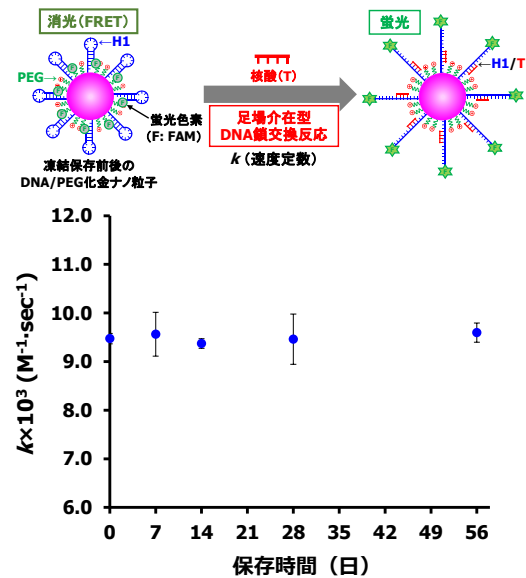


図 3 凍結保存前後における H1-DNA/PEG 化金ナノ粒子の機能評価の概要、および凍結保存期間と足場介在型 DNA 鎖交換反応の速度定数 ( $k$ ) の関係

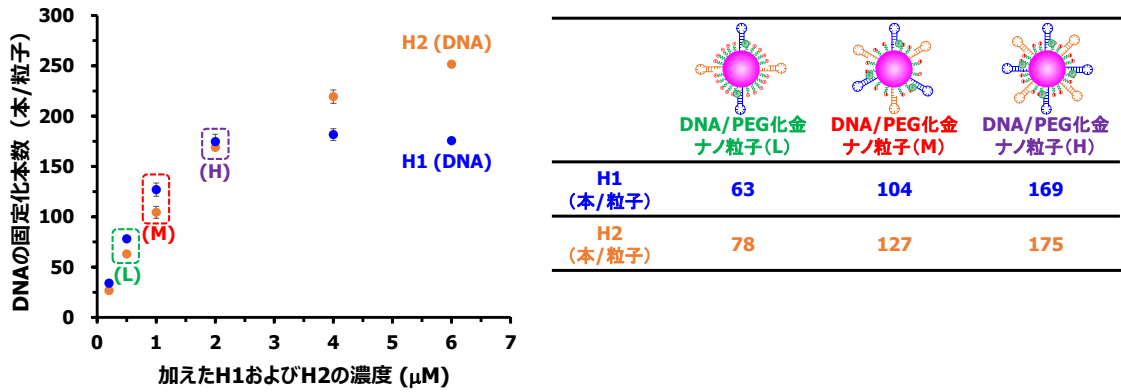


図4 H1/H2-DNA/PEG 化金ナノ粒子 1 個あたりの H1 および H2 の固定化本数と加えた DNA (H1 および H2) 濃度の関係

(3) 界面構造の影響と DNA ウォーキングの評価および標的核酸の検出

異なる DNA 密度を有する 3 つの DNA/PEG 化金ナノ粒子 (H)、(M)、および (L) を用いて新規な DNA ウォーキングシステムを構築し、標的核酸の検出を行った。図 5 には、様々な標的核酸濃度存在下における、時間に対する規格化した蛍光強度の変化を示す。標的核酸の非存在下 (0 M) においては、蛍光強度の若干の変化が認められた。一方、標的核酸の存在下においては、標的核酸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。さらに、標的核酸が高濃度 (=5 nM) の場合は、DNA 密度が低い DNA/PEG 化金ナノ粒子ほど、DNA ウォーキングが効率的に進行し、大きな蛍光強度の増加が観察された (図 5 c)。これは、DNA/PEG 化金ナノ粒子上の DNA 密度が低いほど粒子表面のマイナス電荷も少なくなり、標的核酸と粒子表面のマイナス電荷の反発が減少することで、標的核酸と粒子表面の H1 がより効率的に反応したためであると考えられる。一方、標的核酸が低濃度 (=1 & 0.5 nM) の場合は、DNA 密度が高い DNA/PEG 化金ナノ粒子ほど、DNA ウォーキングが効率的に進行し、より速い蛍光強度の増加が観察された (図 5 a)。これは、DNA/PEG 化金ナノ粒子上の DNA 密度が高いほど粒子表面に存在する DNA (H1 & H2) の局所濃度が増加することで、DNA ウォーキング効率的に進行したためであると考えられる。さらに、DNA/PEG 化金ナノ粒子 (H) の検出限界濃度 (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 240 分において LOD = 約 300 pM (pM:  $10^{-12}$  M) を達成することができた。

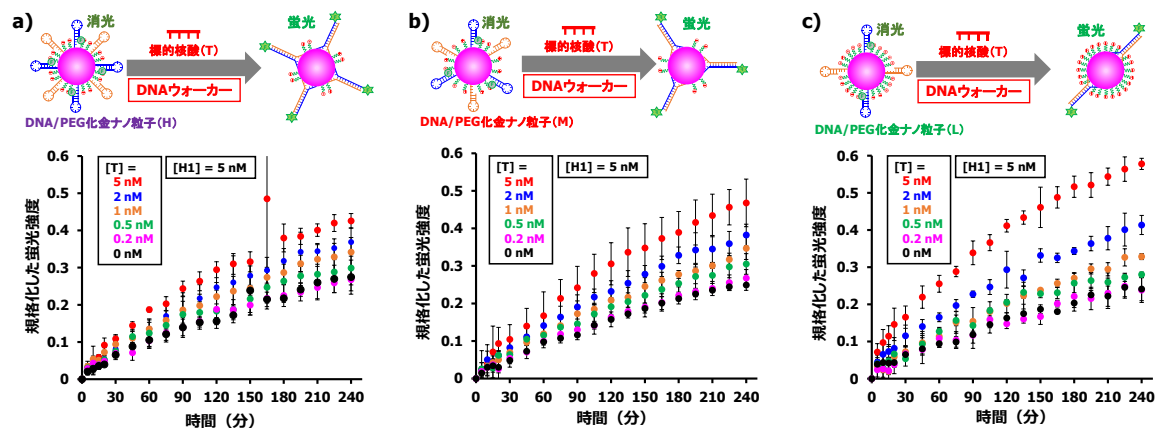


図 5 様々な標的核酸濃度存在下における時間に対する規格化した蛍光強度 a) DNA/PEG 化金ナノ粒子 (H)、b) DNA/PEG 化金ナノ粒子 (M)、および c) DNA/PEG 化金ナノ粒子 (L)

<引用文献>

1. R. Rothman *et al.* *Lance Infect. Dis.* 2004, 6, 337.
2. M. Oishi *et al.* *Langmuir* 2008, 24, 5010.
3. M. Oishi *et al.* *Langmuir* 2008, 24, 6903.
4. M. Oishi *et al.* *Adv. Funct. Mater.* 2009, 19, 827.
5. M. Oishi *et al.* *RSC Adv.* 2015, 5, 76014

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Motoi Oishi and Shotaro Juji	4. 巻 13
2. 論文標題 Acceleration of DNA Hybridization Chain Reactions on 3D Nano-interfaces of Magnetic Particles and Their Direct Application in the Enzyme-Free Amplified Detection of microRNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 35533-35544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsami.1c09631	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shotaro Juji and Motoi Oishi	4. 巻 95
2. 論文標題 Long-term Cryopreservation of Ready-to-Use DNA-Modified Gold Nanoparticle Derivatives: Effect of Preservation Temperature on Their DNA Dissociation and Functional Stability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 410-412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1246/bcsj.20210437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 菅原匠、大石基
2. 発表標題 DNA/バルジループ構造の導入によりバックグラウンドを低減させたDNAサーキットの構築
3. 学会等名 日本分析化学会第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原匠、大石基
2. 発表標題 バルジループを導入した DNA サーキットの最適化と酵素フリーな核酸検出
3. 学会等名 日本分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木佐木大希、大石基
2. 発表標題 核酸の1分子検出を目指したDNA化金ナノ粒子固定化ガラス基板の調製と評価
3. 学会等名 日本化学会第12回CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原匠、大石基
2. 発表標題 DNAパルジループ構造の導入によりバックグラウンドを低減させたDNAサーキットの構築
3. 学会等名 第82回分析化学討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅原匠、大石基
2. 発表標題 パルジループを導入したDNAサーキットの最適化と酵素フリーな核酸検出
3. 学会等名 分析化学会第71年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木佐木大希、大石基
2. 発表標題 核酸の1分子検出を目指したDNA化金ナノ粒子固定化ガラス基板の調製と評価
3. 学会等名 第12回CSJ化学フェスタ2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 十字祥太郎、大石基
2. 発表標題 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の評価
3. 学会等名 日本分析化学会第70年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motoi Oishi
2. 発表標題 Point of Care Testing (POCT) for Nucleic Acids at Room Temperature & without Enzymes
3. 学会等名 BioJapan 2020 in Yokohama (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関