

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01844

研究課題名（和文）分子・光情報変換ナノメディエータを用いた大容量多重分子センシング

研究課題名（英文）Largely multiplexed molecular sensing using nano-mediators that transform molecular information to optical information

研究代表者

小倉 裕介 (Ogura, Yusuke)

大阪大学・大学院情報科学研究科・准教授

研究者番号：20346191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、分子情報を光情報に変換するナノメディエータを作製し、多重分子センシングにおける能力を明らかにすることを目的とした。蛍光分子の配置によって形成されるフェルスター共鳴エネルギー移動（FRET）ネットワークが光符号化に有効であることを確認した。また、DNA構造体を利用して実装したナノメディエータを多重分子センシングに適用し、その機能を実証した。分子・光情報変換の応用にも取り組み、腫瘍イメージングにおける蛍光観察可能時間の拡大に有効であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、光による分子センシング/イメージングにおいて、大容量の分子情報を効率的に取得するという重要な課題を克服する上で有用な、光と分子のサイズおよび情報量のギャップを埋める方法論を提示し、その可能性を示している。さらなる技術の洗練により、さまざまな分子が関わる生命現象の解明などに寄与することが期待される。また、エネルギー移動のネットワークを情報操作に活用する事例としても位置付けられ、ナノスケールの情報科学技術の進展にも有意義であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：This research was performed for the purpose of making nano-mediators, which transform molecular information to optical information, and of clarifying their capability in multiplexed molecular sensing. We confirmed the validity of a Forster resonance energy transfer (FRET) network, which was constructed by arranging fluorescence molecules, for optical encoding. Nano-mediators were implemented using DNA nano-structures, and experimental results demonstrate their function in multiplexed molecular sensing. We also investigated application of molecular-optical information transform, and showed its effectiveness in extending observable time duration in fluorescence tumor imaging.

研究分野：情報フォトニクス

キーワード：ナノメディエータ DNAナノマシン 光符号化 FRET

## 1. 研究開始当初の背景

分子センシング/イメージングにおいてフォトニクス技術が果たす役割はますます増大している。例えば、光学顕微鏡は簡便かつ低侵襲に分子イメージングが可能であり、蛍光たんぱく質などの関連技術の進展と相まって、さまざまな生体分子の振る舞いを明らかにしてきた。高分解能化、三次元化、高速化も進み、病理診断などへの応用もなされている。一方で、センシング/イメージングの重要な対象である細胞には数千から数万種類もの生体分子が存在すると言われるが、光学顕微鏡で同時に可視化できる生体分子は、せいぜい数種類にとどまっている。また、蛍光による可視化を利用する DNA マイクロアレイは多種類の分子情報を網羅的に取得できる手法であるが、対象分子の元々の位置情報や時間発展情報は完全に失われる。

ライフサイエンスのさらなる進展に向けて、多様な分子が関わる大容量情報を効率的に取得する手法の開発は不可欠である。フォトニクス技術がその中核を担うのは間違いないが、光と分子の間にはサイズと情報量のギャップが歴然と存在しており、これを克服する方法論の構築が期待される。そこで、大容量の分子や分子情報の操作に長けている DNA コンピューティングや DNA ナノマシンなどの DNA ナノ情報技術に目をつけた。フォトニクス技術と DNA ナノ情報技術の組み合わせは、大容量分子センシング/イメージングの有効な手段となり得ると考えられる。本研究では、分子と光の間を取り持つ機構をナノメディエータ (ナノの仲介者の意) と名付け、具体的なナノメディエータとして、光符号化機能を搭載した DNA ナノマシンを取り上げる。ナノメディエータの実現手法の開発とセンシング/イメージング応用を通して、フォトニクス技術と DNA ナノ情報技術を組み合わせる手法の特性を整理し、理解を深めることをめざした。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体分子情報と光情報の間に介在し、これらの変換を行なうナノメディエータを作製し、多重分子センシングにおける能力を明らかにすることを目的とする。ナノメディエータは分子情報を解釈しその場 (分子環境内) で符号化光信号に変換する機能を持つ。符号化光信号は多重化された状態で受信され、計算機による復号処理によってそれぞれの分子情報を復元する。

まず、ナノメディエータの構成技術の開発をめざす。DNA ナノマシンの考え方に基づく分子検出に伴う DNA 構造操作法と、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) ネットワークによる光符号化を組み合わせた方式について、有効な構成手法を検討する。FRET 現象をモデル化したシミュレーションにより、光符号化信号の特性を明らかにするとともに、実験でその機能を確かめる。次に分子の多重センシングにナノメディエータを適用し、その性能や特性を明らかにする。これにより、ナノメディエータ活用のための技術基盤の形成をめざす。また、応用に向けた準備として、照射による Protoporphyrin IX (PpIX) の蛍光スペクトルの切り替えによる腫瘍診断を検討する。PpIX による腫瘍蛍光診断では蛍光退色が課題となる。この蛍光退色のプロセスをナノメディエータによる蛍光信号のスイッチと捉え、蛍光診断の蛍光観察可能時間の拡大を試み、実応用における潜在能力を検証する。

## 3. 研究の方法

研究目的の達成をめざし、研究課題として、(1) DNA ナノマシンに基づく分子センシング、(2) FRET ネットワークによる光符号化法の開発、(3) センシング/イメージングにおける評価の 3 つを設定し、研究を進めた。

### (1) DNA ナノマシンに基づく分子センシング

ナノメディエータは DNA のナノ構造形成能力と、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) などの光学現象に基づき実現する。FRET は蛍光分子間距離に敏感であり、FRET の様相の変化を利用して光符号化信号を生成するには、分子入力に伴って蛍光分子の物理的な配置を変える必要がある。これを実現するため、DNA の特異的反応特性に基づき入力された分子情報を特定し、構造を変化させる機構を設計した。具体的にはヘアピン形状の DNA の開裂反応を利用している。異なる分子入力に応答する DNA 構造を実際に作製し、その機能を確認する実験を行なった。

### (2) FRET ネットワークによる光符号化法の開発

複数蛍光分子間のエネルギー移動の様相変化に基づく蛍光スペクトル変調手法の有効性を確認するため、エネルギー移動のモデルに基づく動作シミュレーションを行なった。利用する光信号として、蛍光スペクトル、および、励起スペクトルを想定し、分子入力時の変化などの特性を調べた。励起スペクトルの測定においては検出側での分光が不要であり、システムを簡便化できる可能性がある。多重化した光符号化信号を識別するアルゴリズムを構築し、それを用いて各符号の識別性能などを調べた。また、DNA 構造体により実装したナノメディエータを用いて、分子入力に応答して蛍光スペクトルが変化することを確認する実験を行なった。一方、より多数の光符

号を形成するための手法として偏光次元の利用が有効であると考え、計算機合成プログラムによる構造化偏光光パターン生成法を開発した。

### (3) センシング/イメージングにおける評価

#### ① 多重分子センシング

ナノメディエータを用いた多重センシングの実証のため、複数種類の分子を同時検出する系を設計した。クロストーク低減などの観点から蛍光分子の配置を決定し、実際にセンシング系を構築した。本手法では、入力分子に対する蛍光スペクトルを測定し、多重化した光符号信号の識別アルゴリズムを適用して入力分子の濃度を推定する。さらに、機能の拡張をめざして、複数のセンシング部位を DNA 構造体に配置する系についても検討した。この系により、分子の構造を対象とした光符号化センシングの実現が期待される。

#### ② 分子イメージングにおける分子・光情報変換の応用

組織中の腫瘍イメージングにおいて、ナノメディエータが持つ分子・光情報変換機能の応用を検討した。組織中の腫瘍に対する蛍光診断を波長 505nm の光により PpIX を励起して行う。この過程において、PpIX は蛍光退色から Photoporphyrin (Ppp) が生成される。Ppp を励起する波長 450nm によって Ppp の蛍光を検出することができる。これにより、蛍光退色後も、再度、腫瘍の蛍光診断が可能となる。in vitro、マウスによる in vivo 実験から原理実証を行った。

## 4. 研究成果

### (1) DNA ナノマシンに基づく分子

#### センシング

分子入力に対する蛍光スペクトルの時間変化の測定結果を図 1 に示す。スペクトルの 2 つのピークの強度比が変化しており、作製したナノメディエータの構造変化により、分子の検出と構造を対応づけられることを確認した。また、一部の配列を変えることで、異なる入力分子に対応するナノメディエータを構成できることを示した。これらにより、検出した分子の情報を光信号に変換・送出するナノメディエータの基本機能を確認できた。

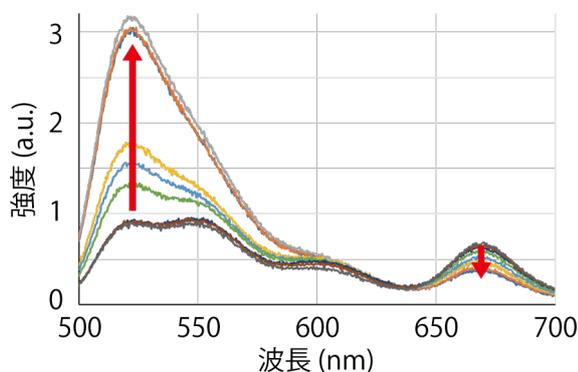


図 1 分子入力にตอบสนองする DNA 構造の時間変化を蛍光により測定した結果。

### (2) FRET ネットワークによる光符号化法の開発

蛍光スペクトル、励起スペクトルの双方において、蛍光分子の配置によりそのスペクトルが変化することを確認できた。図 2 に蛍光スペクトルの計算例を示す。これは各ナノメディエータを識別するための指紋として利用できる。実際、蛍光分子の配置を変えて実験でも検証を行ない、特有のスペクトルが生成されることを確認している。また、蛍光スペクトルの計測誤差が推定誤差に与える影響などを明らかにするとともに、蛍光体配置の工夫による信号強度やコントラストの上昇効果など有効な解決法を示した。この手法では、利用する蛍光分子が同じ組み合わせでもその配置によって特性が変化するため、極めて多数の光符号を少ない種類の蛍光分子で実現でき、多様な分子の多重センシングに道筋をつける成果として考えられる。

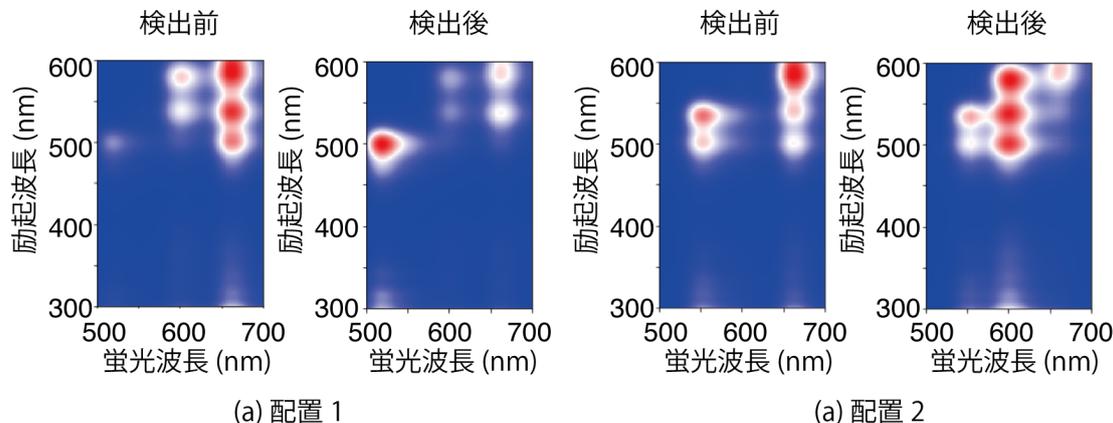


図 2 蛍光分子の配置が異なる FRET ネットワークにおける励起波長と蛍光スペクトルの関係。配置によって全く異なる応答特性を示す。

(3) センシング/イメージングにおける評価

① 多重分子センシング

多重化センシング実験の結果を図 3 に示す。入力分子の組み合わせに応じて推定される相対濃度が変化しており、分子の多重化センシングにおける本手法の正当性が示された。また、複数のセンシング部位を配置した系についても、その機能を確認した。分子センシングと光符号化をその場で同時に行うナノメディエータの機能は、ナノスケール物理空間とサイバー空間をつなぐ手法としての有用であり、本研究により幅広い応用への技術基盤を構成できた。

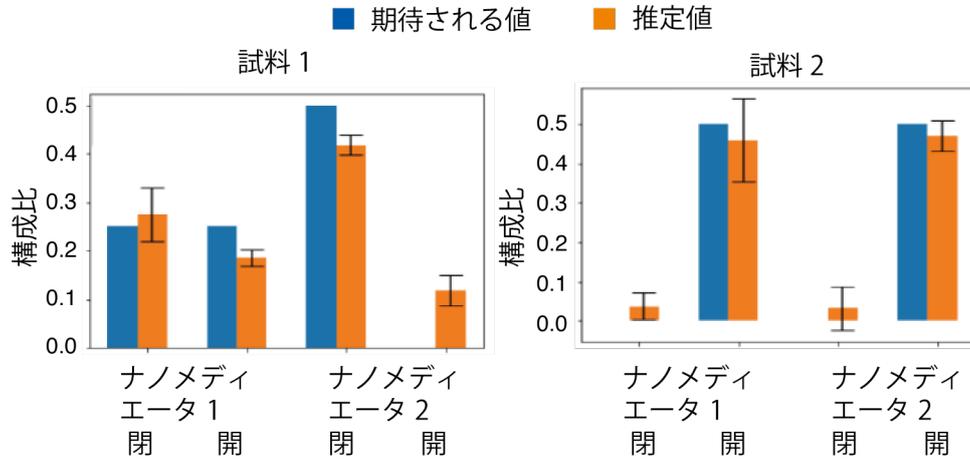


図 3 多重センシングの結果. ナノメディエータ 1 と 2 に対応する検出対象分子の濃度比は、0.5:0.0 (試料 1) および 1.0:1.0 (試料 2)。

② 分子イメージングにおける分子・光情報変換の応用

PpIX 溶液の蛍光退色前後の波長 505nm および波長 450nm での励起による蛍光スペクトルを測定した。波長 505nm での励起による PpIX 溶液の蛍光スペクトルでは、蛍光退色後に 673nm 付近に蛍光ピークが現れた。一方、波長 450nm での励起では、PpIX 蛍光退色後に蛍光強度が増加し、特に波長 673nm の蛍光強度は波長 505nm 励起よりも大きくなった。波長 450nm での励起によって PpIX の蛍光退色後に生成される Ppp の蛍光が確認できた。

図 4 に、PpIX を蓄積させたマウスの腫瘍部位の PpIX 蛍光退色前後の蛍光像を示す。実証実験で使用した波長 450nm の光源がバンド幅を有しており、PpIX の Q バンドに重なったことから、蛍光退色前においても波長 505nm 励起の検出蛍光強度と比較して大きくなった。蛍光退色前後の蛍光強度を比較すると、波長 450nm 励起の方が、病変部位での蛍光強度が大きく増加した。蛍光退色による Ppp 生成により、波長 450nm 励起による蛍光強度上昇が確認できた。PpIX の蛍光退色は、励起波長の切り替えによる Ppp の蛍光スイッチを利用することで克服できることが確認できた。

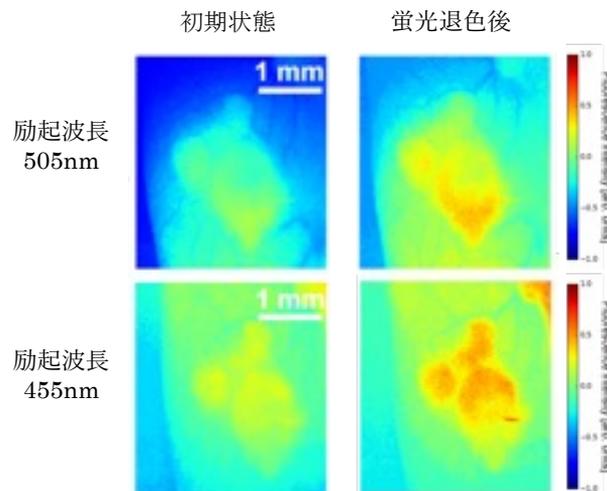


図 4 pIX 初期状態と蛍光退色後の腫瘍蛍光画像。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sochi J. Ogbonna, William Y. York, Takahiro Nishimura, Hisanao Hazama, Hideo Fukuhara, Keiji Inoue, Kunio Awazu	4. 巻 28
2. 論文標題 Increased fluorescence observation intensity during the photodynamic diagnosis of deeply located tumors by fluorescence photoswitching of protoporphyrin IX	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biomedical Optics	6. 最初と最後の頁 55001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1117/1.jbo.28.5.055001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 6件/うち国際学会 10件）

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Taiki Suzaki, Elena Ghanem, Jun Tanida
2. 発表標題 Polarization-structuring holography and its application to polarization imaging
3. 学会等名 The 13th Japan-Korea International Workshop on Digital Holography and Information Photonics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉裕介, エレーナ ガーネム, 洲崎泰輝, 谷田純
2. 発表標題 偏光構造化スポットアレイを用いたシングルショット偏光イメージング
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2023 (OPJ2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 洲崎泰輝, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 計算機合成ホログラムを用いた構造化偏光スポットアレイ生成
3. 学会等名 第9回日本光学会関西支部講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 洲崎泰輝, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 構造化偏光スポットアレイ生成
3. 学会等名 第23回 情報フォトンクス研究グループ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 洲崎泰輝, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 軸対称偏光入力による構造化偏光スポットアレイ生成
3. 学会等名 第84回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Taiki Suzaki, Jun Tanida
2. 発表標題 Polarization-structured computer generated holography
3. 学会等名 Information Photonics 2023 (IP'23) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Taiki Suzaki, and Jun Tanida
2. 発表標題 Computer generated holograms that generate a polarization-structured spot array
3. 学会等名 The Fourteenth Japan-Finland Joint Symposium on Optics in Engineering (OIE2023) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小倉裕介, 洲崎泰輝, 谷田純
2. 発表標題 偏光構造化を志向した計算機合成ホログラフィ
3. 学会等名 情報フォトニクス研究討論会2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Keita Hayashi, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 Numerical evaluation of fluorescence probe using excitation spectrum of FRET network
3. 学会等名 Biomedical Imaging and Sensing Conference 2023 (BISC 2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sochi Ogbonna, William York, Takahiro Nishimura, Hisanao Hazama, Kunio Awazu
2. 発表標題 Analyses of protoporphyrin IX fluorescence photoswitching for prolonging the photodynamic diagnosis time of deeply located tumours
3. 学会等名 2023 European Conferences on Biomedical Optics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Keita Hayashi, Takehiro Mori, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 A wavelength-selectively excitable fluorescence system based on FRET towards photonically addressable nanoscale light sources
3. 学会等名 Information Photonics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keita Hayashi, Yusuke Ogura, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 Experimental Verification of Fluorescence Tags Using FRET Networks Responding to Molecular Inputs
3. 学会等名 13th International Conference on Optics-photonics Design & Fabrication (ODF'22) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Keita Hayashi, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 Optical encoding for fluorescence addressing
3. 学会等名 SPIE Biomedical Imaging and Sensing Conference 2022 (BISC2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Keita Hayashi, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 Addressing of fluorescence signals by spectral encoding
3. 学会等名 The 12th Korea-Japan Workshop on Digital Holography & Information Photonics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉 裕介, 林 啓太, 下村 優, 西村 隆宏, 谷田 純
2. 発表標題 蛍光の光アドレッシングと符号化
3. 学会等名 第16回新画像システム・情報フォトンクス研究討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小倉裕介
2. 発表標題 光ナノ情報技術に基づく分子トランスデューサ
3. 学会等名 第61回日本生体医工学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Keita Hayashi, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 Fluorescence sensing based on dynamic FRET networks
3. 学会等名 The 11th Japan-Korea Workshop on Digital Holography & Information Photonics（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林 啓太, 小倉 裕介, 下村 優, 西村 隆宏, 谷田 純
2. 発表標題 FRETネットワークを用いた蛍光タグの識別性能評価
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小倉 裕介, 林 啓太, 下村 優, 西村 隆宏, 谷田 純
2. 発表標題 FRETネットワークを用いた蛍光タグ
3. 学会等名 第15回新画像システム・情報フォトンクス研究討論会
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	西村 隆宏  (Nishimura Takahiro)  (10722829)	大阪大学・大学院工学研究科・助教   (14401)	

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			
フランス	Bordeaux Institute of Technology			
米国	National Institute on Aging			