

令和元年6月14日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01829

研究課題名(和文) 単一生細胞での細胞内遺伝子センシング技術の開発とチップデバイス化

研究課題名(英文) Development of a novel sensor array chip device for the detection of genes from a single living cell

研究代表者

青木 寛 (AOKI, Hiroshi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エネルギー・環境領域・主任研究員

研究者番号：00392580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：環境・健康指標となる生細胞由来の核酸バイオマーカーの簡便迅速スクリーニング技術実現のため、電気化学的手法およびSPRイメージング法に基づき非標識検出が可能なセンサアレイのチップデバイス開発と新規バイオマーカーの探索を行った。電気化学的手法による開発では、生細胞実試料に比較的近い核酸増幅産物を用い、1枚のチップデバイス上で測定対象核酸を含む複数試料の配列特異的な並列検出に成功した。SPRイメージング法による開発では、複数の信号増幅因子を活用し、アトモルレベルの高感度RNA検出に成功した。バイオマーカー探索では、化学物質の刺激に対して鋭敏に応答する複数の新規miRNAバイオマーカーを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トランスクリプトームバイオマーカーなどの多数の細胞内遺伝子活動を並列的に同時観測を可能とする簡便迅速な検出法は、臨床や環境の現場で使用可能な一次スクリーニング技術として重要である。本研究成果であるセンサアレイチップデバイスは、複数の核酸バイオマーカーを配列特異的に高感度・並列検出を可能とすることから、この課題解決に大きく貢献すると期待される。また今回見出したmiRNAバイオマーカーは環境由来の化学物質刺激に対する鋭敏な応答を示すため、環境・健康評価をより簡便迅速化すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming at a simple and rapid screening technique for DNA or RNA biomarkers from living cells as environmental and biomedical indicators, we developed novel sensor array chip devices enabling non-labeling detection of the biomarkers based on electrochemical and SPR imaging methods, and explored novel biomarkers. The electrochemical sensor array devices revealed to enable sequence-specific and parallel/simultaneous biomarker detection on a single device by using plural PCR-amplified products. The SPR imaging-based sensor array devices revealed to enable high sensitive detection of miRNAs as lung cancer biomarkers at an atto-mole level by employing multiple enzymatic reactions for signal enhancement. Moreover, we found several novel miRNA biomarkers sensitive to chemical stresses in the environment.

研究分野：分析化学

キーワード：バイオセンサ 生体物質計測 電気化学 核酸 DNAチップ バイオ素子 バイオチップ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

遺伝子検出技術は従来、測定対象遺伝子に蛍光標識を行い、プローブとのハイブリッド形成を蛍光標識からのシグナルの有無で判定する手法が主流であった。しかし、測定対象遺伝子への蛍光標識化や細胞からの遺伝子抽出に多大な労力を要することから、研究所内での利用に留まっている。一方、この技術を臨床や環境の現場でのツールとして発展できれば、遺伝子診断結果に基づくテーラーメイド医療や遺伝子レベルでの化学物質の生体影響評価などを一次スクリーニング技術として簡便に利用できること期待されている。

この期待に応えるため、簡便な手法の開発に有利な電気化学的原理に基づく遺伝子センサが多数開発されてきた。申請者は遺伝子検出法の根本的な問題を解決するため、対象遺伝子の標識化を行うことなく遺伝子を検出できる技術を開発してきた。この手法は具体的には、試料溶液中の測定対象核酸が電極表面に固定したプローブ核酸とハイブリッド形成を行うことで、電気化学信号が変調する仕組みを利用した手法である。遺伝子等の測定対象核酸を含む測定試料溶液自身に、何ら手を加える必要がないため、非常に簡便に遺伝子検出を行うことができる。

2. 研究の目的

本研究課題では遺伝子の標識化等の煩雑なプロセスを必要としない、簡便・迅速な次世代型遺伝子診断技術を開発し、多数の細胞内遺伝子活動の並列的な同時観測ツールの構築を目指す。具体的には、臨床や環境の現場で使用可能な一次スクリーニング技術として、テーラーメイド医療や化学物質の生体影響評価に貢献するため、遺伝子等のトランスクリプトームバイオマーカーなど多数の細胞内遺伝子活動指標を並列的に同時観測可能とし、簡便かつ迅速な遺伝子診断技術の構築とそのチップデバイス化を目指す。

3. 研究の方法

本研究期間では、特に、細胞内活動を反映する細胞由来の遺伝子等のトランスクリプトームの並列的な同時観測を目的とした、センサアレイ型検出ツールの開発を行うとともに、本センシング技術の単一細胞での計測に向けた高感度化に取り組んだ。具体的には、簡便・迅速な核酸検出に利点を有する電気化学的手法および表面プラズモン共鳴 (SPR) イメージング法に基づく、センサアレイ型核酸検出技術の開発および高感度化を行った。対象としたターゲットとして、環境中の内分泌攪乱物質に対して生体応答を生じることが知られている遺伝子バイオマーカー配列および肺がん患者の血液中に含まれるマイクロ RNA (miRNA) バイオマーカー配列を選択した。配列は NCBI (米国生物工学情報センター) データベースを参照した。

(1) 電気化学的手法に基づくセンサアレイ型核酸検出技術

金マイクロ電極が多数アレイ状に配列された金マイクロ電極アレイ上に、測定対象核酸ターゲットと相補的な配列を有する人工核酸プローブを固定化してセンサアレイを作製した。マイクロ電極アレイは、光リソグラフィの手法によりガラス基板上に作製し、直径：300 μm、間隔：1 mm の電極寸法を有する。

(2) SPR イメージング法に基づくセンサアレイ型核酸検出技術

金スポットが多数アレイ状に配列された金スポットアレイ上に、測定対象核酸ターゲットと相補的な配列を有する人工核酸プローブを固定化してセンサアレイを作製した。金スポットアレイは、ステンシルを用いたスパッタ成膜法によりガラス基板上に作製し、直径：800 μm、間隔：1.7 mm のスポット寸法を有する。

(3) 環境化学物質の生体影響評価用バイオマーカーの探索

センサアレイ型核酸検出技術の開発のために既存のデータベースに掲載のバイオマーカーを活用することに加えて、環境中に含まれる化学物質が与える生体影響評価用の新規バイオマーカーの探索も合わせて行った。化学物質を曝露したマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) から全 RNA を抽出して調製した試料を、次世代シーケンサーにより解析することで、化学物質特異的に発現する RNA バイオマーカーを見出した。

4. 研究成果

本研究では、当初電気化学的手法を中心に研究開発を行う予定だったが、電気化学的手法が本質的に有する課題である片面実装型のセンサにおけるアレイ状配列化と微細化とがトレードオフの関係にある課題が判明した。そのため、単一細胞由来の遺伝子検出を目指した高感度・高機能遺伝子センシング技術の開発とそのチップデバイス化を中心に、SPR イメージング法も検出原理に合わせて取り入れることで本課題に対応したので、以下に年度ごとに開発の経緯を追いながら記載する。

(1) H27 年度

H27 年度は、微細孔を有するチップデバイスの開発と細胞活動評価の基礎となるバイオマーカー探索とを行った。

微細孔を有するチップ開発では、電気化学的手法との一体化を前提として、レーザー加工法、インクジェット印刷による方法、光硬化性樹脂を用いた手法、熱収縮樹脂による方法の4法を検討しプロトタイプを作製し検討した。その結果、これらの手法ではレーザー加工法および光硬化性樹脂を用いた方法の組み合わせが、望みの微細加工に最も適していることが判明した。

一方で、電気化学的手法で必要な、電気信号を取り出すための配線引き回しが、かえって微細加工を妨げる可能性があることが判明した。別の非標識・非侵襲検出法である表面プラズモン共鳴（SPR）顕微イメージング法では配線引き回しの必要がなく、ナノサイズの単一粒子の高感度顕微検出が可能であることから、電気化学的手法と併せて検討を開始した。

また、バイオマーカー探索では、本技術の基礎となるバイオマーカーmiRNAについて、化学物質暴露したマウス ES 細胞試料を高速シーケンサーおよびリアルタイム PCR により解析し、化学物質暴露に依存せずに発現するハウスキーピングと思しきバイオマーカーmiRNA を見出した。

このように H27 年度は、微細加工による微細孔を有するチップデバイスの開発において、当初の目的を達成するためには電気化学的手法のみならず SPR 顕微イメージング法も併せて検討を進める必要があることが判明したことで、当初の計画より検討事項が増えた。そのため、以後の目標を単一細胞由来の遺伝子検出を目指した高感度・高機能遺伝子センシング技術の開発とそのチップデバイス化とし、研究を継続した。一方で、遺伝子活動評価の基礎となるバイオマーカー探索を進め、化学物質暴露に依存せずに発現するバイオマーカーmiRNA を見出したことで、研究計画の後半に行うべき検討事項を先んじて達成した。

(2) H28 年度

H28 年度は、SPR イメージング法／顕微イメージング法に基づく検討を行った。

まず SPR イメージング測定では、相補的な配列を有する DNA をプローブとして金表面上に固定化して配列選択的なターゲット認識を行い、その後の酵素反応によりシグナル増幅を図ることとした（図1）。具体的には、ターゲットである miRNA の認識後、酵素反応により miRNA 末端に poly(A) 鎖を伸長させ、複数のシグナル増幅因子を添加した後、TMB（3,3',5,5'-tetramethylbenzidine）/H₂O₂ 混合溶液添加により酸化 TMB（Ox-TMB）の青色沈殿を生成させることで、シグナル増幅を行った。この際、酵素反応後にタンパク質分解酵素を反応させることでバックグラウンドシグナルを減少させて S/N 比を向上させるとともに、シグナル増幅因子の添加割合や添加方法を検討することで最適化を行った。本研究の結果、肺がんマーカーである鎖長 22 mer の miRNA に対して、検出下限が pM レベルであることを確認した。次に、SPR 顕微イメージング測定法に基づく高感度検出では、生体試料のモデルとして単糖類マンノースをターゲットとし、これを選択的に捕捉するレセプターであるコンカナバリン A を表面固定化したハイドロゲルナノ粒子を用いた。この研究では、ナノ粒子表面でマンノースが選択性良く分子認識されることを見出し、この手法が微量生体試料測定に有用であることが分かった。

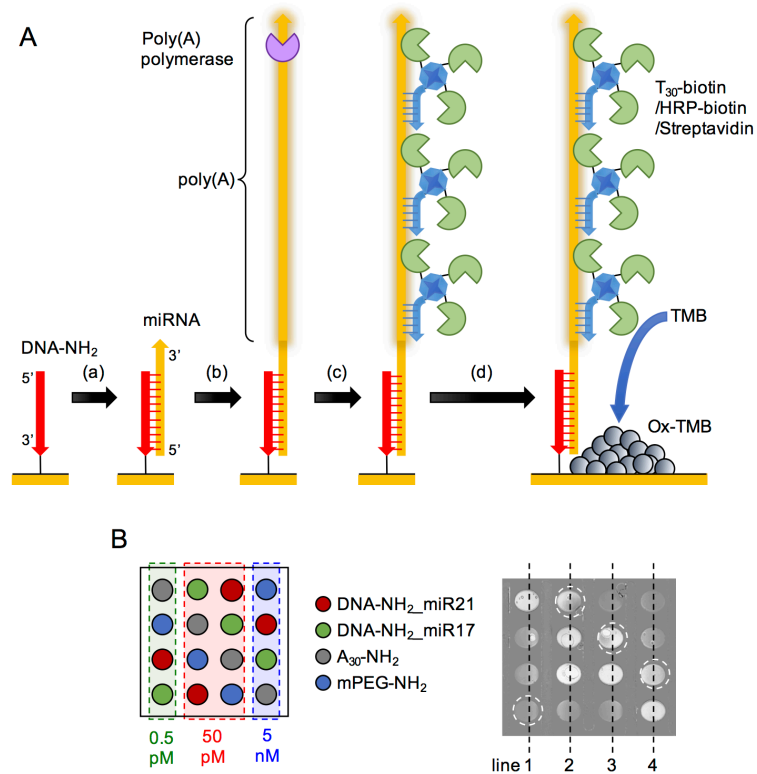


図1 SPR イメージング法に基づくセンサレイ型 miRNA 検出技術(A)。TMB の酸化反応に基づくシグナル増幅により、50 pM のターゲットが配列選択的に検出された(B)。詳細な検討により、アトモレベルの miRNA を検出できた。

このように H28 年度は、H27 年度に判明した新たな検討事項である SPR イメージング法／顕微イメージング法による miRNA の高感度検出法の開発に取り組んだ。具体的には、簡便・迅速な測定のための新規プローブと測定原理の開発、および酵素反応を活用した高感度測定法の開発を試みた。さらに、高感度検出に不可欠な、酵素反応後のバックグラウンドシグナルの除去手法、および酵素反応におけるシグナル増幅の最適化手法も開発した。最終的に、肺がんのバイオマーカーとなる miRNA の配列選択的な非標識検出に成功した。併せて、SPR 顕微イメージング測定法に基づいたナノ粒子表面での微量生体試料の高感度検出にも挑戦した。

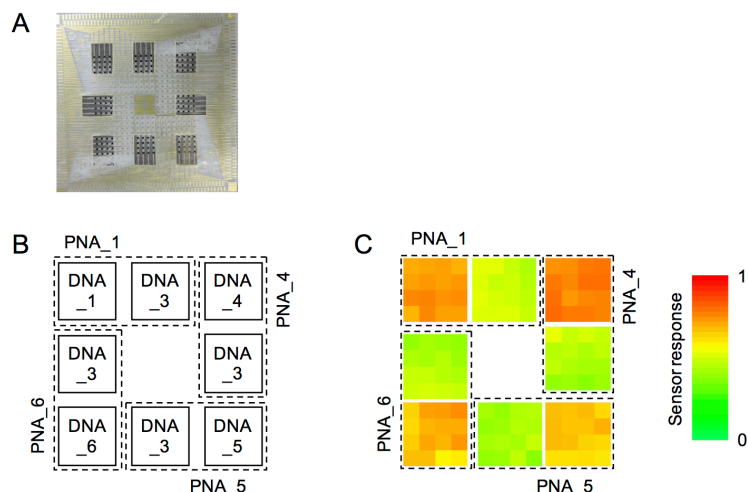


図2：電気化学的手法に基づくセンサアレイ型核酸検出技術。センサアレイ(A)に人工核酸プローブ(B, PNA_1, 4, 5, 6)を固定化しターゲット核酸(B, DNA_1, 3, 4, 5, 6)に対する配列選択的な応答(C)を観測した。

(3) H29 年度

H29 年度は、前年度までの成果から明らかになった SPR イメージング法および電気化学的手法に基づくデバイス化検討に加え、生体影響評価に供するバイオマーカー探索を行った。

デバイス化検討では、RNA バイオマーカー配列を有するターゲット核酸との分子認識により、電気化学および SPR シグナルを発するマルチセンサチップを開発し、RNA バイオマーカー配列 4 種の識別に成功した。ここで、1 つのセンサチップ検出系を 2 つの電気化学および SPR 検出法により測定することで高感度・高選択検出の基礎技術に繋がることを見出した。また、生体影響評価用バイオマーカー探索では、化学物質の刺激に対して鋭敏に応答する RNA バイオマーカー探索を行った。ベンゼンなど 9 種類の有害化学物質を曝露したマウス ES 細胞の全 RNA からチップデバイス化に有利な miRNA を抽出し、RNA 発現量変化を測定・解析して化学物質評価用バイオマーカー（曝露後増加：7 種、減少：5 種）を見出した。この解析では、miRNA 解析に特化した解析手順構築と条件最適化を行い、miRNA バイオマーカーの探索に成功した。

このように H29 年度は、H28 年度における SPR イメージング法の成果を受けて、SPR イメージング法と電気化学的手法の両方に基づくデバイス化検討を行い、電気化学および SPR シグナルを発するマルチセンサチップを開発し、RNA バイオマーカー配列 4 種の識別に成功した。また、化学物質の刺激に対して鋭敏に応答する RNA バイオマーカーの探索を行い、有害化学物質の曝露に反応する化学物質評価用 RNA バイオマーカー（曝露後増加：7 種、減少：5 種）を見出した。これは、現場利用可能な一次スクリーニング技術としての基礎技術として重要な成果である。なお、研究協力者（海外）所有の SPR イメージング装置が利用不可能となったため、当該装置と同等以上の性能を有する装置の新規手配に時間を要したことから、H30 年度への研究機関延長が必要となった。

(4) H30 年度

H30 年度は SPR イメージング法および電気化学センサアレイデバイスに基づくバイオマーカー配列の検出技術の開発を行った。

SPR イメージング法では、金スポットアレイを有するセンサチップに基づき、複数の酵素反応を組み合わせて用いた SPR シグナル増幅による miRNA の並列的微量検出を行った。測定対象の miRNA として、肺がんバイオマーカー由来の配列を有する miRNA を用いた。H28 年度に得られた検出条件をさらに改良することで、最終的にアトモレベルでの miRNA 検出に成功した。この際、タンパク質分解酵素と界面活性剤とに基づく非特異吸着種の洗浄により、大きな配列選択性の向上が見られた。この選択的応答に対して、ポリメラーゼやペルオキシダーゼによる酵素反応により、さらなる SPR シグナル増幅を図った。

電気化学センサアレイデバイス化研究では、生細胞実試料に比較的近い PCR 増幅産物を用い、環境中の内分泌攪乱物質応答性遺伝子バイオマーカー配列に基づき、簡便迅速な、1 枚のデバイス上での複数試料の並列的配列検出に成功した(図2)。同時に、PCR 産物配列上のプローブ認識配列の位置関係が検出感度にどのように影響するか検討したところ、センサ表面とプローブ

との間の距離が適切であれば、プローブ認識配列の位置に影響を受けずに、検出が可能であることも見出した。合わせて、微量試料の検出を可能とすることで、細胞試料など限られた試料量での検出に貢献できる可能性も見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Hiroshi Aoki, Masaki Torimura, Tetsuya Nakazato, 384-Channel electrochemical sensor array chips based on hybridization-triggered switching for simultaneous oligonucleotide detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 76-83, 136 (2019). 10.1016/j.bios.2019.04.047.
2. Hidenori Tani, Taro Matsutani, Hiroshi Aoki, Kaoru Nakamura, Yu Hamaguchi, Tetsuya Nakazato, Michiaki Hamada, Identification of RNA biomarkers for chemical safety screening in neural cells derived from mouse embryonic stem cells using RNA deep sequencing analysis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 641-646, 512 (2019). 10.1016/j.bbrc.2018.11.141.
3. 青木 寛, 生体応答を利用した環境・バイオセンシングの新展開, *化学工業*, 52-59, 7 (2017).
4. 青木 寛, 遺伝子検出センサの高集積チップデバイス化と環境診断応用への展開, *JIR News*, 14-17, 3 (2017).
5. Hidenori Tani, Jun-ichi Takeshita, Hiroshi Aoki, Kaoru Nakamura, Ryosuke Abe, Akinobu Toyoda, Yasunori Endo, Sadaaki Miyamoto, Masashi Gamo, Hiroaki Sato, Masaki Torimura, Effect of methyl p-hydroxybenzoate on the culture of mammalian cell, *Drug discoveries & therapeutics*, 276-280, 11 (2017). 10.5582/ddt.2017.01054.
6. Hidenori Tani, Jun-ichi Takeshita, Hiroshi Aoki, Kaoru Nakamura, Ryosuke Abe, Akinobu Toyoda, Yasunori Endo, Sadaaki Miyamoto, Masashi Gamo, Hiroaki Sato, Masaki Torimura, Identification of RNA biomarkers for chemical safety screening in mouse embryonic stem cells using RNA deep sequencing analysis, *PLOS ONE*, e0182032, 12 (2017). 10.1371/journal.pone.0182032.
7. Kan Takeshima, Kanako Mizuno, Hitoshi Nakahashi, Hiroshi Aoki, and Yasumasa Kanekiyo, Ratiometric Sensing of Hydrogen Peroxide Utilizing Conformational Change in Fluorescent Boronic Acid Polymers, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 7829438 (2017). 10.1155/2017/7829438.
8. 青木 寛, 「飛び出すカード」で血液を診断する, *ぶんせき*, 496-496, 11 (2016).
9. Hidenori Tani, Jun-ichi Takeshita, Hiroshi Aoki, Ryosuke Abe, Akinobu Toyoda, Yasunori Endo, Sadaaki Miyamoto, Masashi Gamo, and Masaki Torimura, Genome-wide gene expression analysis of mouse embryonic stem cells exposed to p-dichlorobenzene, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 329-333, 122 (2016). 10.1016/j.jbiosc.2016.02.007.
10. Haoyi Wu, Xiao-Li Wu, Zheng-Ming Wang, Hiroshi Aoki, Shuzo Kutsuna, Keiko Jimura, Shigenobu Hayashi, Anchoring Titanium dioxide on Carbon Spheres for High-Performance Visible Light Photocatalysis, *Applied Catalysis B-Environmental*, 255-266, 15 (2016). 10.1016/j.apcatb.2017.02.027.
11. Hiroshi Aoki, Electrochemical label-free nucleotide sensors, *Chemistry-An Asian Journal*, 2560-2573, 10 (2015). 10.1002/asia.201500449.
12. 青木 寛, 血液循環腫瘍細胞 (CTC) に基づく高速がん診断用マイクロチップデバイス, *ぶんせき*, 52-53, 10 (2015).

[学会発表] (計 25 件)

1. Hiroshi Aoki, Environmental and biomedical applications of label-free oligonucleotide sensing arrays based on hybridization-triggered "on/off" switching, The 3rd National Conference on Water Treatment and Reuse of China, 2019 年. (招待講演) (国際学会)
2. 青木 寛, 水環境診断用マルチセンサチップ –非標識核酸センシングで環境・バイオ診断–, *InterAqua 2019*, 2019 年.
3. 青木 寛, 電気化学センサアレイを用いた非標識核酸検出に基づく水環境・バイオ診断技術, *InterAqua 2019*, 2019 年. (招待講演)
4. 青木 寛, 環境診断・ヘルスケア管理のための電気化学核酸検出デバイス開発, 北見工業大学超分子化学特論, 2019 年. (招待講演)
5. 青木 寛, 非標識核酸センシングで環境・バイオ診断 –多種微量試料を無駄なく精密分注しセンサをアレイ化–, *アグリビジネス創出フェア 2018*, 2018 年.
6. 青木 寛, 環境診断・ヘルスケア管理のための簡便核酸検出センサデバイス, 応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会講習会「バイオセンサの最前線; プラットフォー

- ムから実測定まで」, 2018 年. (招待講演)
7. 青木 寛, 環境診断・ヘルスケア管理のための電気化学核酸検出デバイス開発, 埼玉工業大学生命環境化学ゼミ, 2018 年. (招待講演)
 8. Hiroshi Aoki, Oligonucleotide sensor arrays based on hybridization-triggered "on/off" switching for environmental and biomedical application, Biosensors 2018, 2018 年. (国際学会)
 9. 青木 寛, 非標識核酸センシングで環境・バイオ診断, 計測・分析フェア in 京都, 2018 年.
 10. 青木 寛, 多種類の微量試料を必要な分だけ吸引・吐出する分注技術, 医薬品原料・機器・装置展 (P-MEC Japan 2018), 2018 年. (招待講演)
 11. 青木 寛, 非標識核酸センシングで環境・バイオ診断, InterAqua 2018, 2018 年.
 12. Hiroshi Aoki, Search of RNA biomarkers for chemical safety screening aiming at "on-site" oligonucleotide sensor devices feasible in environmental and biomedical fields, Bio4Apps 2017, 2017 年. (招待講演) (国際学会)
 13. 青木 寛, 環境診断・ヘルスケア管理のための電気化学核酸検出デバイス開発, 埼玉工業大学特別講義, 2017 年. (招待講演)
 14. 青木 寛, 高集積核酸センサアレイで環境・バイオ診断, テクノブリッジフェア in つくば 2017, 2017 年. (招待講演)
 15. 青木 寛, 環境診断・ヘルスケア管理のための電気化学核酸検出デバイス開発, 学際生命科学東京コンソーシアム, 2017 年. (招待講演)
 16. 青木 寛, 環境・バイオ診断のための簡便核酸検出センサデバイス, 日本分析化学会 第 77 回分析化学討論会, 2017 年. (招待講演)
 17. Hiroshi Aoki, Integrated sensor array chips for simple and rapid diagnosis of biologically-significant RNA sequences, Global Research Effects on Energy and Nanomaterials (GREEN 2016), 2016 年. (招待講演) (国際学会)
 18. Hiroshi Aoki, Label-free sensor array chips: application to simultaneous oligonucleotide detection, Special Seminar in Kansas State University, 2016 年. (招待講演)
 19. Hiroshi Aoki, Variable-pitch array spotter: a new "dead volume-free" spotter aspirating and dispensing nanoliter-level samples, Pacifichem 2015, 2015 年. (国際学会)
 20. Hiroshi Aoki, Label-free sensor array chips: application to simultaneous RNA sequence detection, Pacifichem 2015, 2015 年. (国際学会)
 21. 青木 寛, 環境・バイオ分析のための多種同時微量高精度アレイスポット, テクノブリッジフェア, 2015 年. (招待講演)
 22. 青木 寛, 機能性プローブに基づくラベル化フリー電気化学的核酸検出技術, 第 35 回歯工学連携講演会, 2015 年. (招待講演)
 23. 竹下 潤一, 阿部 亮介, 豊田 章倫, 遠藤 靖典, 宮本 定明, 谷 英典, 青木 寛, 鳥村 政基, 佐藤 浩昭, 蒲生 昌志, 遺伝子発現データに基づく化学物質感の類似度について, 日本動物実験代替法学会第 28 回大会, 2015 年.
 24. 谷 英典, 小沼 泰子, 伊藤 弓弦, 竹下 潤一, 蒲生 昌志, 青木 寛, 鳥村 政基, 佐藤 浩昭, 哺乳動物細胞を用いた化学物質の生体影響評価技術の開発, 第 1 回 E&E フォーラム, 2015 年.
 25. 青木 寛, 環境・ヘルスケア管理のための非標識オリゴ核酸センサ, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年.

[図書] (計 1 件)

1. 青木 寛, 「研究開発の俯瞰報告書『環境・エネルギー分野 (2019 年)』」, 科学技術振興機構研究開発センター, 2019 年

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名 : Robert M. Corn
ローマ字氏名 : Robert M. Corn

※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。