

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22250

研究課題名（和文）多数の生体分子同時検出を可能とする蛍光バーコードの開発

研究課題名（英文）Development of fluorobarcode that can detect multiple biomolecules simultaneously

研究代表者

榎田 啓（Kashida, Hiromu）

名古屋大学・工学研究科・准教授

研究者番号：30452189

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：従来の生体分子蛍光イメージングでは励起・検出波長に限りがあることから、同時に検出可能な蛍光色素は多くの場合3，4色に限られていた。本研究では核酸の鎖交換反応を利用することで多数の生体分子を同時にイメージングする蛍光バーコードの開発を目指した。研究の結果、実際に蛍光バーコードが設計通り機能することを明らかにし、多数のビーズの識別や複数種のタンパク質同時検出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりあらかじめ決められた順序に従って蛍光色が変わる蛍光バーコードの開発に成功した。本研究では計27種類の蛍光バーコードを調製したが、利用する蛍光色素の数や蛍光変化回数を増大させることでその種類を指数関数的に増大させることができる。また、その際に必要となる核酸鎖の数が非常に少ないという特長もある。そのため、生物学やバイオテクノロジーにおける有用なツールとしての応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Fluorescent imaging is one of the most essential tools in biology. However, the number of detectable molecules was severely restricted due to spectral overlaps of fluorophores. In this study, we aimed to prepare fluorescent barcode, in which emission color changes depending on the color sequence. We found that emission color of fluorescent barcode can change in pre-determined order. We also succeeded in multiplexed imaging of polystyrene beads and proteins in cell.

研究分野：核酸化学

キーワード：人工核酸 蛍光バーコード 蛍光色素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子の蛍光ラベル化及び蛍光検出は、生物学、バイオテクノロジーにおいて必要不可欠な技術である。しかしながら、蛍光色素の励起・蛍光波長に重なりがあることから、同時検出可能な分子の種類は通常3, 4種類に限られていた。それに対し、蛍光ラベルの種類を指数関数的に増やすことが出来れば、同時検出可能な分子数を飛躍的に増大させることが可能となる。これが実現できれば、生物学やバイオテクノロジーにおける画期的な手法となると考えた。

2. 研究の目的

そこで、本研究では核酸による二重鎖形成を利用することによって、蛍光色が経時変化する蛍光バーコード法を開発することを目指した。具体的には、蛍光色が“配列”に従って変化することによって、多種類の分子を同時に識別することを期待した(図1)。本研究ではこの蛍光バーコードを実際に調製し、その機能評価を行った。また、この蛍光バーコードを利用したポリスチレンビーズイメージングやタンパク質の多重染色などを試みた。

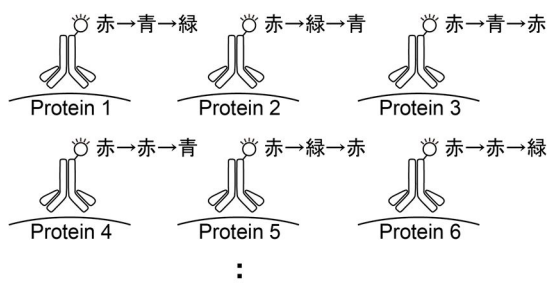


図1. 蛍光バーコードのコンセプト

3. 研究の方法

蛍光バーコードの具体的な設計を図2に示す。半分ずれて相補的な色素修飾核酸二重鎖を蛍光ラベル化剤として使用する。初期状態では蛍光色素及び消光剤が消光されているため、蛍光色素のみが発光する。それに対し、相補鎖(D1', D4', D2')を順番に添加することによって鎖交換反応を介して核酸鎖を解離させる。その結果、→ → のように発光する蛍光色素を決められた順序で変化させることができる。この設計は核酸鎖に結合させる蛍光色素を変化させれば蛍光変化の順番を任意に変更可能である。そのため、蛍光ラベルの種類を指数関数的に増加させることが出来る。

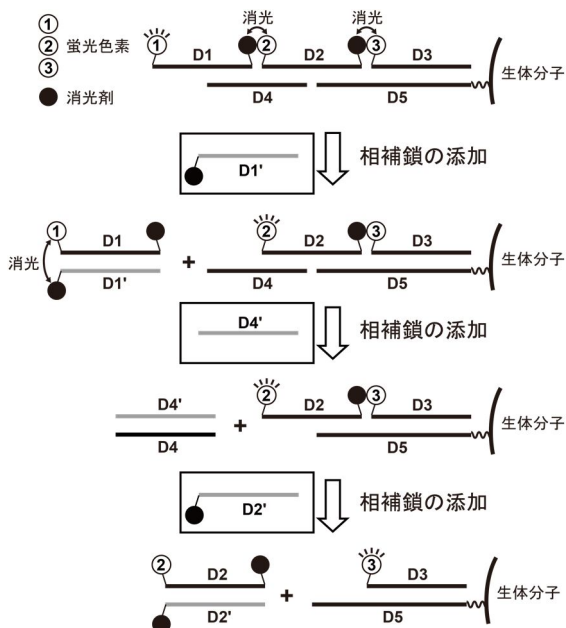


図2. 蛍光バーコードの基本設計

更に、同様の手法を利用すれば三回以上蛍光波長を変化させることも可能である。例えば4種類の蛍光色素を用いて蛍光波長を3回変化させることが出来れば、理論上は $4^3=256$ 種類の蛍光を識別することが可能となる。このように、発光する蛍光色素を経時変化させることで、同時検出可能な蛍光分子の種類を飛躍的に増大させることを目指した。

4. 研究成果

(1) 蛍光バーコードの機能評価

本研究では3色の蛍光色素(FAM, Cy3, Cy5)を利用し、二回蛍光変化する蛍光バーコードを調製した。その結果、3色の蛍光色素のみを利用しているにもかかわらず $3^3=27$ 種類の蛍光ラベルを調製することが出来る。まず、蛍光バーコードに適した核酸構造の検討を行った。DNAで蛍光バーコード複合体を調製し、検討を行った結果を図3Aに示す。なお、消光剤としてはダブシルを利用した。Cy5→Cy3→FAMと蛍光変化する蛍光バーコードについて測定を行ったところ、相補鎖(D1', D4', D2')添加時に設計通りそれぞれの蛍光強度が変化することが明らかとなった。すなわち、蛍光バーコードが設計通り機能することが分かった。しかしながら、DNAを利用した

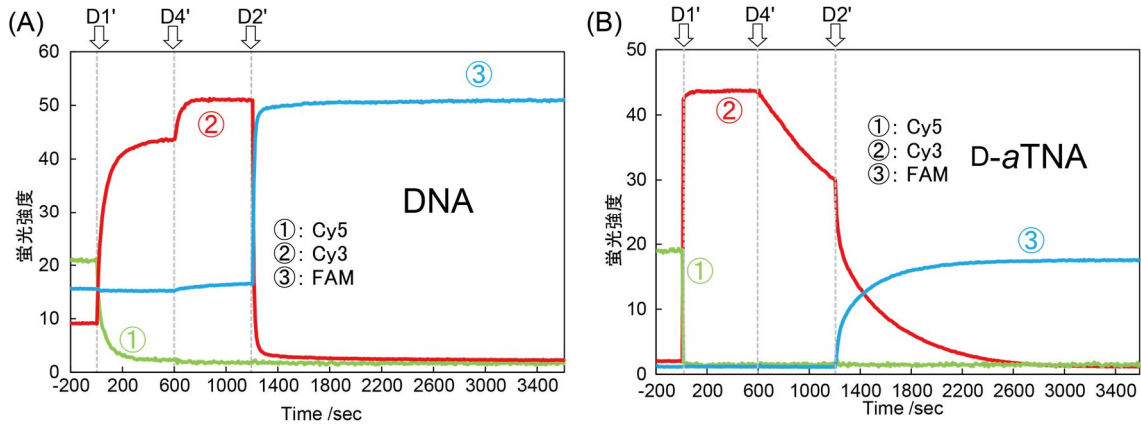


図3 .(A) DNA 及び (B) D-aTNA を利用した蛍光バーコード (Cy5→Cy3→FAM) の機能評価結果

場合、蛍光色素の消光能が低いことも明らかとなった。

そこで、次に D-トレオニノール核酸 (D-aTNA) を利用した蛍光バーコードを調製した。D-aTNA は我々が開発した人工核酸 (図4) であり、単純な構造を持つにもかかわらず極めて安定な二重鎖を形成するという特徴がある。また、天然核酸 (DNA, RNA) と二重鎖形成しないため、細胞内イメージングに応用した際に細胞内夾雑物の影響を排除できると考えた。実際に、D-aTNA で蛍光バーコード

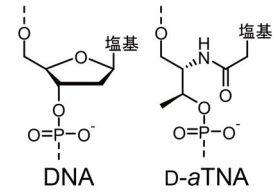


図4 .DNA と D-aTNA の化学構造

(Cy5→Cy3→FAM) を調製し、蛍光強度を測定した結果を図3Bに示す。D-aTNA を利用した場合も、設計通りの順番で蛍光を観察することに成功した。また、図3Aと蛍光消光能を比較したところ、D-aTNAの方が蛍光消光がより強く観察されることが分かった。すなわち、蛍光バーコードを調製する上ではD-aTNAの方が優れていることが明らかとなった。更に、D-aTNAの配列について詳細に検討を行ったところ、7mer ずつ相補的な蛍光バーコード複合体が最も良好な結果を示すことが分かった。

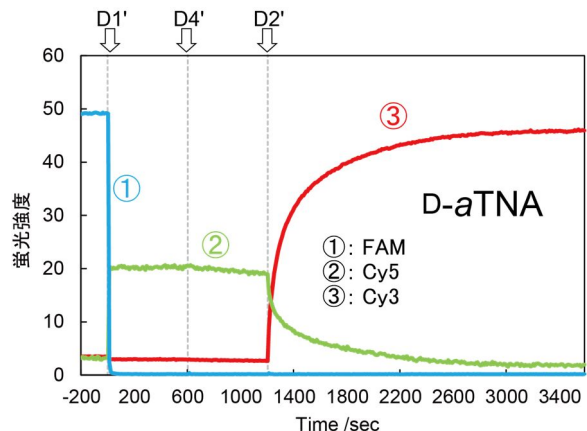


図5 . D-aTNA 蛍光バーコード (FAM→Cy5→Cy3) の機能評価結果

また、異なる蛍光色配列を持つ蛍光バーコードについても測定を行った。

FAM→Cy5→Cy3 という配列を持つ蛍光バーコードについて蛍光強度を測定したところ、図5のように設計通りに蛍光変化が観察されることが分かった。更に全27種類の色配列を持つ蛍光バーコードについて蛍光変化を測定したところ、全ての配列について設計通りの蛍光変化が観察されることが明らかとなった。

このように、人工核酸 D-aTNA を利用することで高性能な蛍光バーコードを開発することに成功した。

(2) 蛍光バーコードを利用したポリスチレンビーズイメージング

(1) で設計通り蛍光バーコードが機能することを明らかにした。そこで、次にこれを利用したポリスチレンビーズのイメージングを試みた。具体的には D-aTNA 末端をビオチン修飾し、ストレプトアビジンがコートされたポリスチレンビーズに添加することで結合させた(図6)。更に、相補鎖を添加することによって、ビーズ上で蛍光バーコード (Cy5→Cy3→FAM) を調製した。相補鎖添加時の蛍光変化を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した(図7)。その結果、設計通り Cy5→Cy3→FAM の順番で蛍光変化が観察されることが分かった。すなわち、蛍光バーコードを利用した蛍光イメージングに成功した。

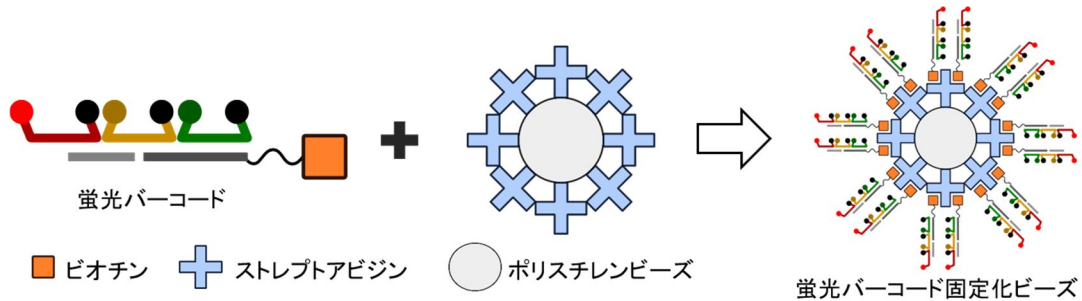


図6．蛍光バーコード固定化ポリスチレンビーズの調製方法

更に、9種類の蛍光色配列を持つポリスチレンビーズを混合し、蛍光イメージングを行った(図8)。それぞれの蛍光バーコードをポリスチレンビーズに固定化し、混合することで実験を行った。その結果、ビーズそれぞれが異なる蛍光色変化を示すことが分かった。蛍光色変化を元に、それぞれの蛍光バーコードを同定したところ9種類の蛍光バーコード配列を全て同定することが出来た(図8右端)。この結果、3種類の蛍光色素のみしか利用していないにもかかわらず、蛍光変化させることで同時識別可能な蛍光ラベルを増大出来ることが分かった。以上のように、蛍光バーコードを利用することで、複数種のマルチプレックスイメージングに成功した。

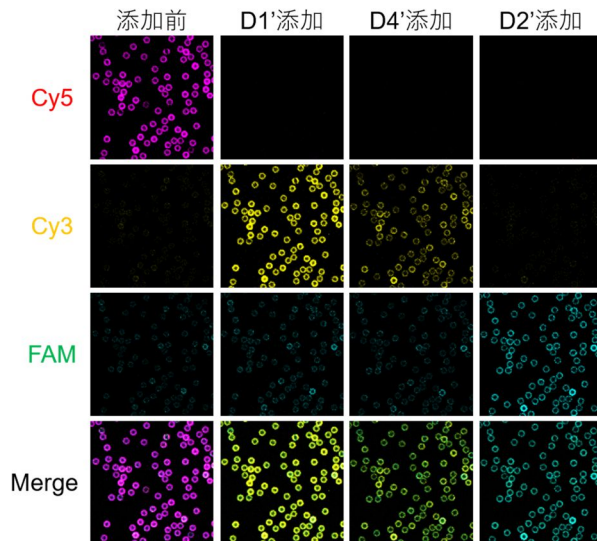


図7．バーコード(Cy5→Cy3→FAM)固定化ポリスチレンビーズの蛍光イメージング結果

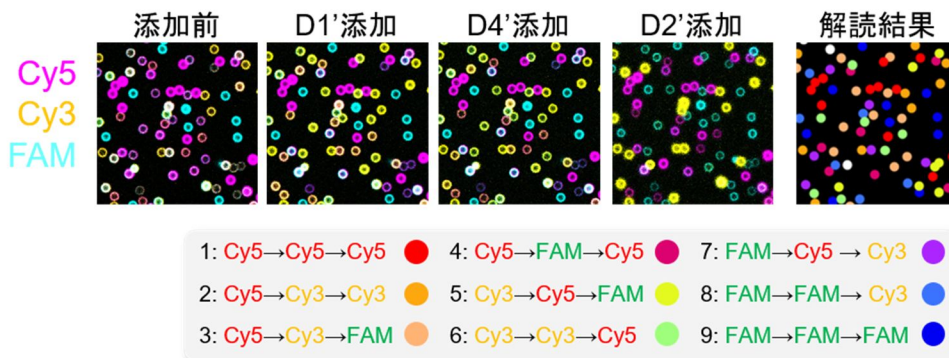


図8．9種類の蛍光バーコード(Cy5→Cy3→FAM)を固定化したポリスチレンビーズの蛍光イメージング結果。用いた蛍光バーコードの蛍光色配列を下に示す。また、蛍光変化より同定した蛍光色配列を一番右図に示す。

(3) 蛍光バーコードを利用したタンパク質イメージング

最後に、開発した蛍光バーコードを抗体と結合させることによってタンパク質イメージングを行った。具体的には、D-aTNA末端をチオール修飾し、二官能性クロスリンカーと反応させた(図9)。その後、ヤギ由来の二次抗体を添加することで、抗体のアミノ基と反応させた。最後に、相補鎖を添加することで二次抗体上に蛍光バーコードを結合させた。D-aTNAと抗体との反応はSDS-PAGEによって確認した。

調製した二次抗体を利用することで蛍光免疫染色を行った。標的としてはゴルジ体に局在す

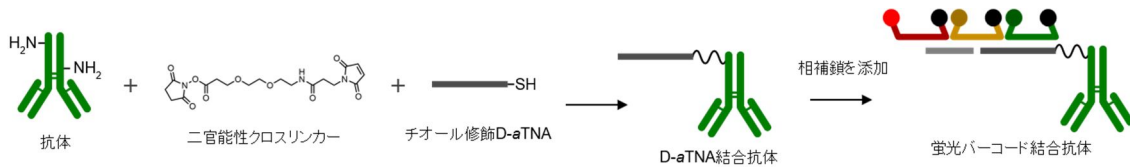


図9 . 蛍光バーコード結合抗体の合成法

る Golgin-97 を選択した。固定化した HeLa 細胞に対して、マウス由来の抗 Golgin-97 一次抗体を添加し、蛍光バーコード (Cy5→Cy3→FAM) で標識した抗マウス抗体を添加し結合させた。共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った結果を図10に示す。ゴルジ体からの発光が観察された。また、相補鎖の添加に伴い、設計通りの蛍光変化 (Cy5→Cy3→FAM) が観察されることが分かった。すなわち、蛍光バーコードを利用したタンパク質イメージングに成功した。

さらに、タンパク質の多重染色についても挑戦した。三種類のタンパク質 (Golgin-97、RPA32、XBP1) それぞれを異なる蛍光色配列

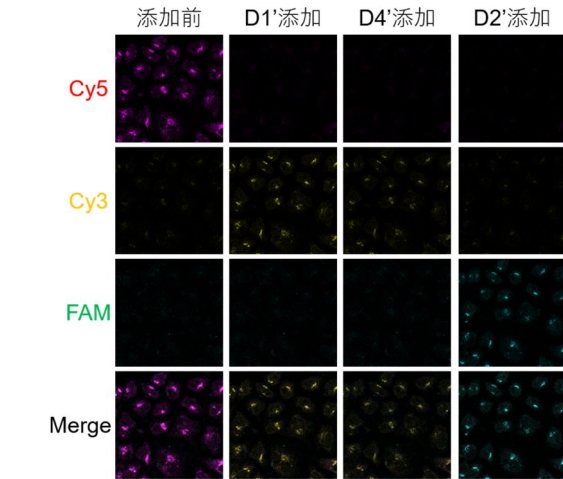


図10 . 蛍光バーコードを利用したゴルジ体染色結果

(Cy5→Cy3→FAM、FAM→Cy5→Cy3、Cy5→FAM→Cy5) を持つ蛍光バーコード標識抗体で染色した (図11)。その結果、それぞれゴルジ体、核、核小体からの発光が観察された。これらはそれぞれの蛍光色素標識抗体を用いて単独で免疫染色した結果と一致した。すなわち、蛍光バーコードを利用して複数種のタンパク質の同時イメージングが可能であることが明らかとなった。

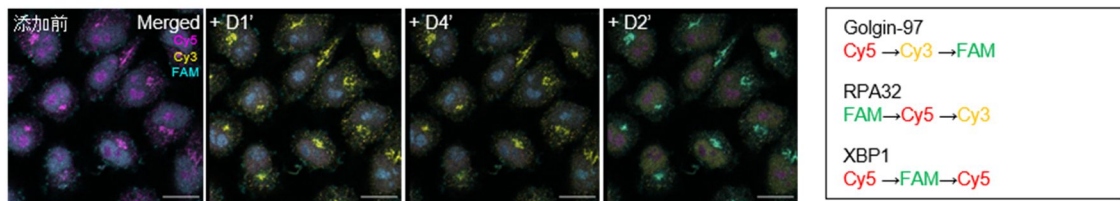


図11 . 蛍光バーコードを利用したタンパク質多重染色結果

以上のことから、蛍光色が配列に従って変化する蛍光バーコードの開発に成功した。また、この蛍光バーコードを利用したポリスチレンビーズの蛍光イメージングやタンパク質の多重染色が可能であることを明らかにした。本手法の大きな特長として、拡張が容易である点が挙げられる。上記のように3色の色素を利用し2回蛍光変化させることで、計27種類の蛍光バーコードを調製した際に必要な核酸鎖は14配列である。この蛍光バーコードの種類は利用する蛍光色素の数や蛍光変化回数を増加させることで指数関数的に増大させることができる。例えば4色の蛍光色素を利用し、3回蛍光変化させることが出来れば $4^3=256$ 種類の蛍光バーコードを調製できる。更に、その際に必要となる核酸鎖はわずか24配列である。このように、蛍光バーコードは単純な設計であるにもかかわらず、設計が容易でありまた容易に拡張可能である。そのため、生物学やバイオテクノロジーにおける非常に汎用性の高い蛍光ラベルとしての応用が期待できる。

これらの成果は現在論文投稿準備中である。

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 Kashida Hiromu, Azuma Hidenori, Maruyama Ryoko, Araki Yasuyuki, Wada Takehiko, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Efficient Light Harvesting Antennae Resulting from the Dense Organization of Dyes into DNA Junctions through Threoninol	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/anie.202004221	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 Kashida Hiromu, Kawai Hayato, Azuma Hidenori, Araki Yasuyuki, Wada Takehiko, Asanuma Hiroyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Quantitative Analyses of Förster Resonance Energy Transfer between Identical Pyrene Chromophores (Homo FRET) In DNA Scaffolds.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemPhotoChem	6. 最初と最後の頁 167 ~ 172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cptc.202000199	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 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎田 啓
2. 発表標題 単純な構造を持つ核酸の開発及びその応用
3. 学会等名 榎田 啓 , 第5回生体分子科学シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野航海, 榎田 啓, 浅沼浩之
2. 発表標題 蛍光変化する核酸蛍光ラベル化剤の開発
3. 学会等名 第169回東海高分子研究会講演会(夏期合宿)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野航海, 櫻田 啓, 浅沼浩之
2. 発表標題 生体分子の網羅的イメージングを可能とする蛍光バーコードの開発
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野航海, 櫻田 啓, 浅沼浩之
2. 発表標題 核酸の鎖交換反応を利用した蛍光変化する蛍光ラベル化剤の開発
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野航海, 櫻田 啓, 浅沼浩之
2. 発表標題 蛍光色が逐次変化する核酸蛍光バーコードの開発
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (開催中止)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 櫻田啓
2. 発表標題 核酸の化学修飾とその応用
3. 学会等名 第69回高分子討論会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧野航海, 櫻田 啓, 浅沼浩之
2. 発表標題 蛍光色が自在に変化する核酸蛍光ラベル化剤の開発
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧野航海, 櫻田 啓, 浅沼浩之
2. 発表標題 鎖交換反応を利用した多数の生体分子のラベル化が可能な蛍光バーコードの開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
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