

令和 2 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H02084

研究課題名(和文) 蛍光ナノマルチプレクサを利用した多重分子イメージング

研究課題名(英文) Multiplex molecular imaging by use of fluorescence nano-multiplexer

研究代表者

小倉 裕介 (Ogura, Yusuke)

大阪大学・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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛍光ナノマルチプレクサのコアとなるナノ光論理回路の構築を行なった。蛍光ナノマルチプレクサは光により出力蛍光信号を選択する機構である。蛍光分子間のエネルギー移動(FRET)を利用した論理ゲートを接続した回路を設計し、蛍光分子修飾DNAの自己組織化により作製した。定常入力および時系列入力に対する応答を計測することで、その動作を実証できた。また、複数の蛍光分子の配置に基づき多様な蛍光スペクトルを生成する手法を考案し、24種類の配置による実験から、多重分子イメージングへの適用可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一段のみのFRETを用いてナノ光論理回路を構成できることを示した最初の実施例であり、簡便な実装法や低エネルギー損失を実現する方法を示していることの意義は大きい。また、本手法は、単一種類の出力光信号で複数種類の対象分子の情報を送出するための方式を示している。これにより、より多くの種類の分子の空間分布や時間発展をまとめて捉えることが可能となり、多重分子イメージングの発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We constructed nanoscale optical logic circuits as a core structure of a fluorescence nano-multiplexer. Some circuits by connecting Förster resonance energy transfer (FRET) gates were designed, and they were fabricated by self-assembly of DNA with fluorescence molecules. The behavior was demonstrated by measuring responses to static and time series inputs. We also investigated a method for synthesizing diverse fluorescence spectra based on arrangements of multiple fluorescence molecules. Experimental results on 24 arrangements demonstrated applicability of the method for multiplex molecular imaging.

研究分野：光DNA計算，情報フォトニクス

キーワード：DNAコンピュータ 応用光学 蛍光顕微鏡 バイオイメージング

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体分子が綾なす生命機能の解明は、QOLの向上や新しい医療、薬剤の創出などに直接関わる極めて重要な課題である。その中で、光学顕微鏡をはじめとするさまざまなイメージング技術が大きな役割を果たしてきた。例えば、蛍光イメージングは簡便かつ高コントラストに対象分子を可視化することが可能である。しかし波長帯域の制限などにより、同時に可視化できる生体分子は数種類程度にとどまっている。一方で、細胞などの観察対象には数万種類もの生体分子が存在し、これらの情報をまとめて取得する手法が求められている。蛍光イメージングにおいて、同時検出可能な分子の種類を増やすために、蛍光プローブの組み合わせによる符号化法が提案されている[1]。このような組み合わせ符号化は、出力光信号数の増大に有効であるが、使用する蛍光分子の種類数に出力信号数が制限される。

研究代表者らは研究開始時点までに、生体分子に関する情報を分子が存在するその場で処理する手法として、フォトニクス技術とDNA技術を融合したフォトニックDNAコンピューティングの研究を進めてきた。例えば、DNAスキャットホルド(足場)論理は、DNA自律反応に基づくDNA足場上への蛍光分子の精密配置と、フェルスター共鳴エネルギー移動(FRET)を利用して、DNAを入力、蛍光を出力とする論理演算を実行する枠組みである[2]。これらの考え方や技術を集積し、蛍光プローブの機能を高めることで、膨大な種類の分子のイメージングを可能にする技術の開発につながると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、制御光信号により蛍光出力の様体を変化させる蛍光ナノマルチプレクサを利用した多重分子イメージング技術を開発する。その特性や性能を示すとともに、技術課題を明らかにする。

蛍光ナノマルチプレクサ本体はDNAナノ構造および蛍光分子で構成される。制御光信号を受信・解釈し、それによって応答を変化させるために、FRETを用いたナノ光論理回路が組み込まれていることが特徴である。回路の構造を簡易にするため、回路中のFRETは一段のみとし、FRETの繰り返しによるエネルギー損失を抑制する。FRETゲートを適切に組み合わせることでAND、OR、NOT演算を実行し、一段階のFRETのみでさまざまな論理回路を実装できることを示す。また異なった入力に対するナノ光論理回路の出力応答を測定し、その性能を評価する。さらに、出力する蛍光信号の種類を増大させるため、複数の蛍光分子を異なる配置で並べることによりFRETの発生様式を変え、多様な蛍光信号を生成する手法を構築する。実験による動作検証を通して、蛍光プローブとしての性能を示す。

### 3. 研究の方法

本研究の内容は、(1) ナノ光論理回路の構築と評価、および、(2) 多様な蛍光信号の生成手法の開発に大別される。

(1) 蛍光ナノマルチプレクサは、AND、OR、NOTゲートを適切に配置した論理回路と等価である。蛍光プローブとして、この論理回路はnmサイズである必要がある。そこで、DNA自己組織化と、nmオーダーの距離変化でエネルギー移動効率が非線形的に変化するFRETを用いて回路を実装する。FRETを一段のみに制限した上で論理回路を実現するために、回路の構成要素として1入力1出力のFRETゲートを用意する。具体的にはYESゲートとNOTゲートの2種類である。2波長の入力光に対応するFRETゲートをそれぞれ実装する。定常入力と時系列入力に対する応答から、FRETゲートの動作を確認する。

また、ナノ光論理回路はFRETゲートを適切に接続することで構成する。加法標準形に基づく任意の論理演算を一段のFRETのみで実装できる方式とする。その概念を図1に示す。AND演算はFRETのドナーを共通化して複数のFRETゲートを接続することで得られる。OR回路は、異なる入力光をもつFRETゲートやAND回路を並列に配置することによって実現される。実験では、いくつかのナノ光論理回路を作製し、定常入力における出力や、時系列入力信号に対する出力の変化を測定することで、回路の性能を評価する

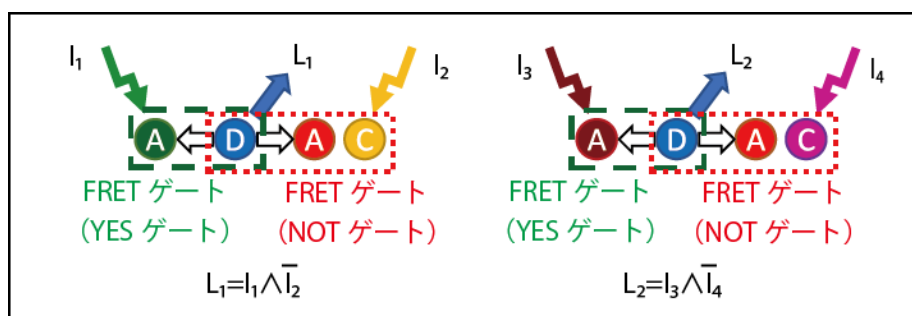


図1 ナノ光論理回路の動作概要。A: アクセプタ, D: ドナー, C: アクティベータ。

(2) 多様な蛍光信号を生成するために、蛍光分子の配置の違いを利用する。複数の蛍光分子を 1nm オーダー間隔で配置すると、蛍光分子の組み合わせと位置にしたがって FRET が発生する。FRET 効率は各蛍光分子間の距離によって決まるため、蛍光分子の配置に依存して FRET の発生様式が変化し、多様な蛍光信号が生成される。蛍光分子の配置を制御するために DNA を利用する。まず、蛍光分子配置によって多様な蛍光信号が生成されることを実験的に検証する。この際、すべて異なる蛍光分子を利用する場合のみならず、同一種の蛍光分子を複数利用する場合についても検討する。また、複数の蛍光分子間の FRET によるスペクトル合成の数値モデルを作製し、シミュレーションによってその特性を示すとともに、実験と比較検討する。さらに、多重化された蛍光スペクトルを定量的に分離する性能について調査し、多重分子イメージングへの適用能力を示す。

#### 4. 研究成果

##### (1) ナノ光論理回路の構築と評価

FRET ゲートの検証実験を行なった。実験では YES ゲートと NOT ゲートを 2 種類ずつ実装した。これらは”1”を入力するための光波長が異なっており、具体的には波長 532nm のレーザーと 589nm のレーザーを用いた。すべての FRET ゲートで Alexa488 をドナーとして用いており、出力はドナーからの蛍光として得る。

まず、定常入力における FRET ゲートの動作確認を行なった。得られる蛍光スペクトルは、使用する蛍光分子の発光スペクトルの合算とみなせる。そこで可視光波長領域における自乗誤差の波長積分が最小となるような各蛍光スペクトルの重み係数を算出し、ドナー蛍光の係数を出力とした。測定の結果、ON/OFF 比は YES スイッチで最大 1.29、NOT スイッチで 1.18 であった。次に、入力状態が変化した場合の FRET ゲートの出力蛍光強度の変化を測定した。入力”1”と”0”を交互に与えた。入力状態が変化するたびに読み出し光を照射し、出力蛍光強度を測定した。結果を図 2 に示す。直前の入力状態に対する出力蛍光強度との差を値として示している。また、出力蛍光強度は、初期の”0”入力での蛍光強度値により規格化した。全ての FRET ゲートにおいて入力状態に応じて変化しており、FRET ゲートの動作を確認することができた。

FRET ゲートを接続し、ナノ光論理回路を作製した。AND、OR、NOT は任意の論理演算を実装するための基本要素であり、それらを含む 2 つの論理回路  $C_1 = I_1 \wedge \bar{I}_2$ 、 $C_2 = I_1 \vee I_2$  を実装した。各入力状態における回路の出力蛍光強度を図 3 に示す。出力強度は 3 回測定し、(0, 0) 入力の出力強度値で規格化している。回路  $C_1$  では (1, 0) 入力時の出力が最も高く、回路  $C_2$  では (0, 1)、(1, 0)、(1, 1) の出力強度がほぼ等しく、(0, 0) 入力の出力強度値より高い。

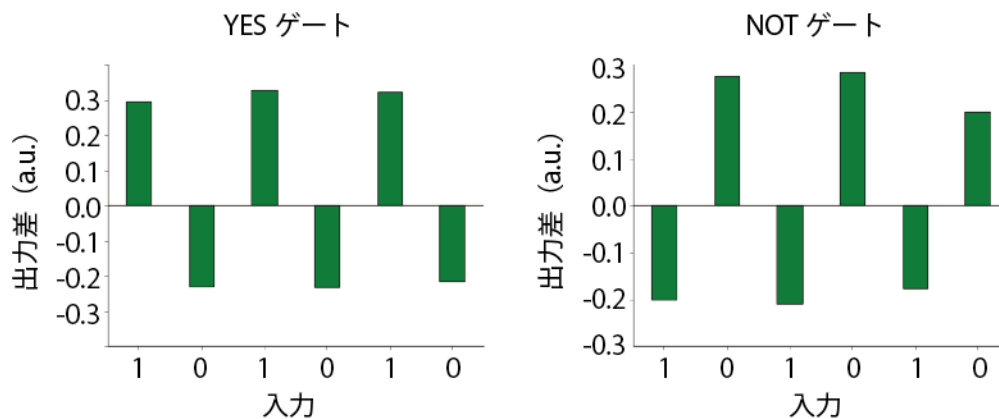


図 2 FRET ゲートの繰り返し動作の結果。

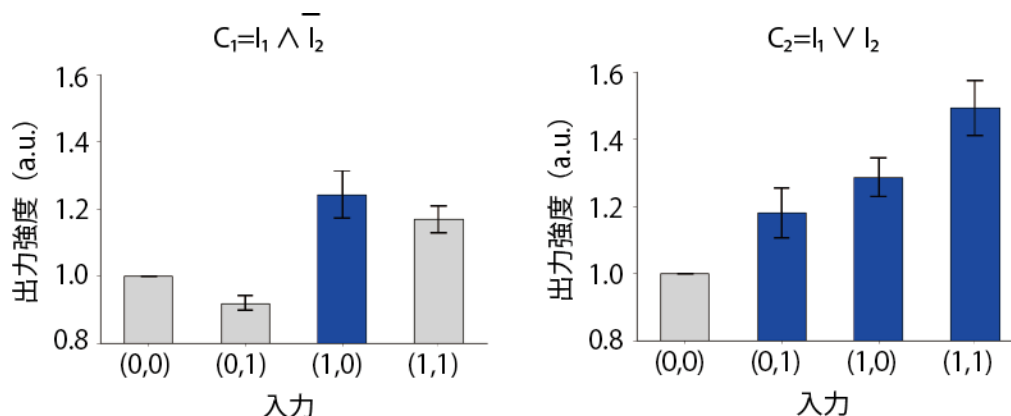


図 3 定常入力に対するナノ論理回路の出力結果。

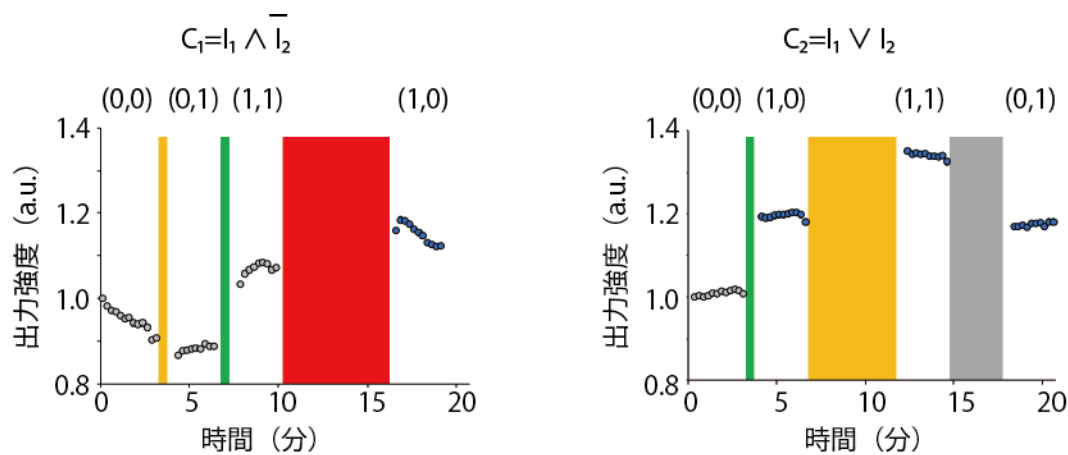


図4 時系列入力に対するナノ論理回路の出力結果.

(1, 1)入力時の出力が高くなっており、所望の動作をしていることがわかる。回路の時間応答を評価するために、時系列入力信号に伴う出力蛍光強度の変化を測定した。C<sub>1</sub>の入力状態は(0, 0), (0, 1), (1, 1), (1, 0)の順、C<sub>2</sub>の入力状態は(0, 0), (1, 0), (1, 1), (0, 1)の順でそれぞれ変化させた。測定結果を図4に示す。どちらの回路でも、入力の時系列変化に伴って出力応答が変化している。

蛍光ナノマルチプレクサは上記のナノ光論理回路を用いて作製される。その動作を、一段のみのFRETを用いて実現していることが本手法の特徴であり、本結果は最初の実装例として重要な意味を持つ。

## (2) 多様な蛍光信号の生成手法の開発

蛍光信号の多様性を確認するため、DNA上での異なる蛍光分子配置に対する蛍光スペクトルを測定した。使用した蛍光分子はAlexa488, Alexa532, Alexa568, Cy5の4種類である。24種類の配置が得られる。いずれかの蛍光分子を修飾した3本の短鎖DNA(10 mer)を足場となる長鎖DNA(30 mer)に結合することで蛍光分子を配置した。最も励起波長が短いAlexa488を励起することを想定し、励起光には波長450 nmのレーザーを使用した。取得した蛍光スペクトルの一部を図5に示す。重複したスペクトルはなく、スペクトルを構成する蛍光分子の蛍光ピーク強度の比にも違いがみられたことから、蛍光スペクトルの多様性が確認できる。

実装条件を緩和し、さらに多様な蛍光スペクトルを取得するため、同一の蛍光分子を複数使用する配置についても検証した。各蛍光分子の蛍光ピーク波長における強度の比を求めたところ、誤差(3回測定した標準偏差)を考慮しても重複はなかった。このことは、同一の蛍光分子が含まれる配置でも、各配置によるスペクトルを識別することが可能であることを示唆している。

多重分子イメージングにおいては、多重化した蛍光信号を分解し、イメージングの対象となる各分子の構成比を算出することが求められる。そこで複数の蛍光分子配置をもつ試料に対して蛍光スペクトルを測定し、そこから各対象分子の構成比を求めるアルゴリズムを考案した。2種類の蛍光分子配置を含む試料の実験結果に適用したところ、約3%の誤差で構成比を得ることができた。

この手法は、用いる蛍光分子の種類よりも多くの種類の蛍光符号を簡便な方法で生成することが特徴であり、多重分子イメージングにおいて同時イメージング可能な分子種を飛躍的に向上することにつながると期待される。

## 参考文献

- [1] E. Lubeck et al., Nature Methods 9, 743 (2012).
- [2] T. Nishimura et al., Appl. Phys. Lett. 101, 233703 (2012).

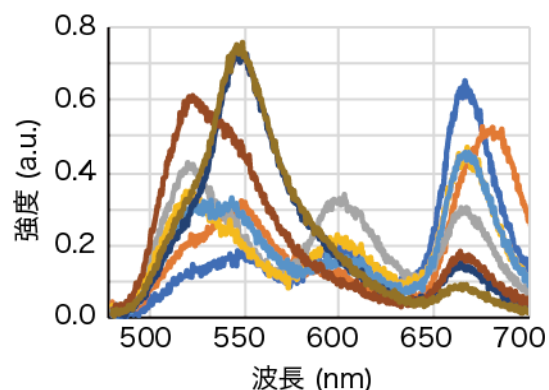


図5 蛍光分子配置の違いによる蛍光スペクトルの変化.

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 2件）

1. 著者名 Jinya Inoue, Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, Jun Tanida	4. 巻 12
2. 論文標題 Nanoscale Optical Logic Circuits by Single-Step FRET	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 IEEE Photonics Journal	6. 最初と最後の頁 6500112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/JPHOT.2020.2976489	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 -

1. 著者名 Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, Jun Tanida	4. 巻 5
2. 論文標題 Photothermal Fabrication of Microscale Patterned DNA Hydrogels	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Royal Society Open Science	6. 最初と最後の頁 171779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsos.171779	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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件/うち国際学会 8件）

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Jinya Inoue, Suguru Shimomura, Takahiro Nishimura, Jun Tanida
2. 発表標題 Integration of DNA and Photonics for Computing, Sensing, and Fabrication
3. 学会等名 15th International Conference on Polymers and Advanced Materials (ICFPAM2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上仁哉, 西村隆宏, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 FRETネットワークに基づく多種蛍光信号の生成
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jun Tanida, Karin Tsuchida
2. 発表標題 Digital computational imaging based on digital encoding and an application to real-space sensing for internet of things
3. 学会等名 Information Photonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Tanida
2. 発表標題 Application of optical digital computing to functional extension of computational imaging
3. 学会等名 OSK-OSA-OSJ Joint Symposia (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jinya Inoue, Takahiro Nishimura, Yusuke Ogura, and Jun Tanida
2. 発表標題 Nanoscale optical logic circuits based on FRET switches
3. 学会等名 The 8th Japan-Korea Workshop on Digital Holography and Information Photonics (DHIP2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上仁哉, 西村隆宏, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 FRET スイッチに基づくナノ光論理回路
3. 学会等名 Optics & Photonics Japan 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上仁哉, 西村隆宏, 小倉裕介, 谷田純
2. 発表標題 FRET スイッチの開発とナノ光論理回路への展開
3. 学会等名 第19回情報フォトニクス研究グループ研究会 (秋合宿)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Nishimura, Suguru Shimomura, Yusuke Ogura, Jun Tanida
2. 発表標題 Optical fabrication of patterned DNA hydrogel
3. 学会等名 2017 Collaborative Conference on Materials Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takaniro Nishimura, Yusuke Ogura, Jun Tanida
2. 発表標題 A photonic DNA processor using excitation energy transfer-based signaling
3. 学会等名 The 23rd International Conference on DNA Computing and Molecular Programming (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takahiro Nishimura, Karin Tsuchida, Yusuke Ogura, Jun Tanida
2. 発表標題 A molecular-sized optical logic circuit for digital modulation of a fluorescence signal
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Photonics Solutions (ICPS) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yusuke Ogura, Takahiro Nishimura, Kenji Yamada, and Jun Tanida
2. 発表標題 Photonically driven DNA nanomachine with hybrid functions towards cell measurement
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2018 BIOS (国際学会)
4. 発表年 2018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	谷田 純  (Tanida Jun)  (00183070)	大阪大学・情報科学研究科・教授   (14401)	
研究分担者	西村 隆宏  (Nishimura Takahiro)  (10722829)	大阪大学・工学研究科・助教   (14401)	
研究分担者	山田 憲嗣  (Yamada Kenji)  (70364114)	大阪大学・医学系研究科・特任教授   (14401)	