

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H01799

研究課題名(和文)核酸構造体を用いた生細胞内分子応答解析 遺伝子組換えフリーの汎用的な手法の提案

研究課題名(英文) Development of a nucleic acid-based molecular probe for the analysis of the intracellular response without genetic recombination

研究代表者

舟橋 久景 (Funabashi, Hisakage)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・准教授

研究者番号：60552429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が開発した、標的核酸を検出すると酵素活性を示すDNAナノピンセット構造体(DNA-NT)作製技術を基盤とした、「遺伝子組換えを必要としない、汎用的な生細胞内分子応答解析法の提案」を目指した。進化分子工学的アプローチによる任意の標的に対するDNA-NT作製法の開発を目指したが、現在の条件では「設定した選択圧以外の効果」が優先されていることが示唆された。磁性ビーズ修飾DNA-NTを用いることにより、生細胞内へDNA-NTを導入可能であることが示された。また、大きさの異なるビーズを修飾することにより、イメージングによって複数の標的を同時に検出可能であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子組換えを用いない細胞内情報解析手法は、疾病診断や、再生医療に用いる細胞の品質評価など様々な応用が期待される。現段階では、任意の標的を検出するとシグナルを発するDNA-NTを自在に作製するまでには至っていないが、進化分子工学的手法によって任意のDNA-NTを作製するための条件を着実に絞りつつある。また、磁性ビーズ修飾DNA-NTを利用すると、標的の細胞内へDNA-NTを導入できる可能性を示した。さらに、サイズの異なる磁性ビーズを活用すると、シンプルなデバイスで複数の標的を同時に観察・検出可能であることを見出した。ポータブルデバイスを活用した、その場検出法などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have tried to develop a universal method to analyze molecular responses inside living cells without genetic recombination techniques.

Although a molecular evolutionary method to create a new DNA-NT for a desired target was designed, it has been revealed that DNA-NTs were selected from random pools with an unknown pressure rather than the selection pressure we set in the current condition.

It was suggested that the modification of DNA-NTs with magnetic beads allowed us to introduce DNA-NTs inside living cells. Also, it has been proved that the utilization of magnetic beads with different sizes enabled the imaging detection of multi-targets.

研究分野：生物学

キーワード：DNAナノピンセット構造体 イメージング検出 分割アプタマー 蛍光共鳴エネルギー移動 進化分子工学

1. 研究開始当初の背景

生命現象を理解し、それを治療や健康長寿に活用するためには、細胞の状態を的確に解析、評価することが必要である。当然細胞は生きておりその状態は刻一刻と変化するものである。しかし従来法の多くでは、まとまった数の細胞集団を破碎して内容物を抽出し、標的因子の解析を行う。したがって従来法では、標的因子の状態変化や細胞個体差を的確に評価できない。そこで真の生命現象の理解という問いに対する答えを得て、それを利用するためには、一つ一つの細胞を生かしたまま解析する新しい技術の開発が必須である。しかも、成熟したヒト体細胞を対象にした疾病診断や、再生医療に用いる細胞の品質評価などへの応用を考えるならば遺伝子組換えを用いない手法の開発が重要であるが、生細胞内の任意の標的に対して、そのような解析を自在に実現する汎用的な手法は存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が独自に開発した核酸検出用 DNA ナノピンセット構造体(DNA nano-tweezer ; DNA-NT) 作製技術を基盤として、細胞を生かしたまま解析が可能な「遺伝子組換えを必要としない、汎用的な生細胞内分子応答解析法の開発」を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の二つの課題を設定し、研究を推進した。

課題(1): 任意の生体分子を検出する DNA-NT 作製法開発

これまでに研究代表者は、標的核酸を検出すると蛍光色素間の FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) シグナルを生じる FRET-based DNA-NT を開発している。この DNA-NT の標的を核酸以外の生体分子に拡張できれば、汎用的な生細胞内分子イメージング技術開発へ活用できると考えた。そこで標的認識部位にランダム配列を有するランダム DNA-NT の中から、進化分子工学的的手法により任意の標的を特異的に認識する DNA-NT を取得する方法の開発を行った。

課題(2): DNA-NT 用いたイメージング法開発

FRET-based DNA-NT を細胞内へ効率よく導入する手法の開発を行った。DNA-NT を磁性ビーズで修飾し、培養細胞上へ引き付けることによって生細胞内へ導入する手法の開発を行った。

以上の課題遂行により、「遺伝子組換えを必要としない、汎用的な生細胞内分子応答解析法」の要素技術確立を狙った。

4. 研究成果

課題(1): 任意の生体分子を検出する DNA-NT 作製法開発

(1) - 進化分子工学的 DNA-NT 作製法の開発

核酸検出用 DNA-NT の標的認識部位にランダム配列を導入したランダム DNA-NT を作製し、その中から標的と結合する分割アプタマー(標的に対し特異的な結合能を有する核酸配列)の組合せを持つ DNA-NT を進化分子工学的スクリーニングによって取得する、「進化分子型 DNA-NT 作製法」の開発を行った。腎疾患のタンパク質バイオマーカーである Liver-type Fatty Acid-Binding Protein(L-FABP) をモデルとして用い、スクリーニング条件の検討を進めた。種々のスクリーニ

ング方法や、洗浄・選択圧等の条件検討を行ったが、当初の予想に反し、目的外の DNA-NT が取得されてしまうことが明らかとなった。そこで、スクリーニングで取得された DNA-NT の標的認識配列を詳細に解析した。その結果、得られた DNA-NT には、類似性の高い標的認識配列をもつものが含まれていることが明らかとなった。このことから、これまでに挑戦したスクリーニング方法・条件では、「設定した選択圧効果による目的 DNA-NT の取得」よりも「PCR によって増幅されやすい等の別の選択圧効果による目的外 DNA-NT の取得」が優先的に起こっていることが示唆された。

(1) - 分割 Gq 再構成誘導型 DNA-NT の改良

(1) - において、「設定した選択圧効果」が弱いことが示唆された。そこで、「進化分子型 DNA-NT 作製法」への活用を念頭に、研究代表者が開発した核酸検出用 DNA-NT の一つである分割 G-quadruplex (Gq) 再構成誘導型 DNA-NT のシグナル産生能の強化を目指した。分割 Gq は、連続した 3 個のグアニン (G) が 4 セット並んだ配列を基本としている。セット間の塩基配列や分割の仕方を再デザインし、計 14 種類の新しい分割 Gq 再構成誘導型 DNA-NT を作製した。それぞれの分割 Gq 再構成誘導型 DNA-NT のペルオキシダーゼ活性を評価した。その結果、従来の分割 Gq 再構成誘導型 DNA-NT に対し、約 3 倍のペルオキシダーゼ活性を示す分割 Gq 再構成誘導型 DNA-NT の開発に成功した。この分割 Gq 再構成誘導型 DNA-NT は従来の分割 Gq 再構成誘導型 DNA-NT よりも強いシグナル応答を示すことから、今後、選択法や選択圧の改良を中心とした進化分子型 DNA-NT 作製法開発への適用が期待される。

課題(2): DNA-NT 用いたイメージング法開発

(2) - ダメージの少ない DNA-NT 生細胞内導入法の検討

Molecular Beacon などの核酸プローブを細胞内へ導入する場合には、毒素で細胞膜に穴をあけ、外来物を導入する手法が頻りに利用されてきた。しかし、この方法は生細胞へのダメージが大きいことから、今後の応用を考えると DNA-NT を導入する際には利用を避けたい。外来遺伝子などを生細胞に取り込ませる各種試薬が市販されているが、これらの試薬の多くは、核酸そのものに吸着して細胞へ取り込ませる手法であることから、本研究の様な DNA 構造体の場合は、構造自体や機能への悪影響が懸念される。そこで研究代表者は、DNA-NT を磁性ビーズで修飾し、細胞表面へ磁石で引き寄せることにより、DNA-NT を生細胞へ導入できるのではないかと考えた。そこで以下の実験を行った。ビオチン化した FRET-based DNA-NT を直径 1 μm のストレプトアビジン修飾磁性ビーズで修飾した。この磁性ビーズ修飾 DNA-NT を Hepa 1-6 細胞の培養液中に添加後、培養下面から磁石で引き寄せた。その結果、磁性ビーズ修飾 DNA-NT が生細胞内へ取り込まれている様子が、共焦点レーザー顕微鏡などによって観察された。さらなる解析を行ったところ、磁性ビーズ修飾 DNA-NT は磁力によって直接細胞内へ導入されるのではなく、磁力により細胞膜表面へ引き寄せられた後、細胞によって取り込まれていることが示唆された(図 1)。

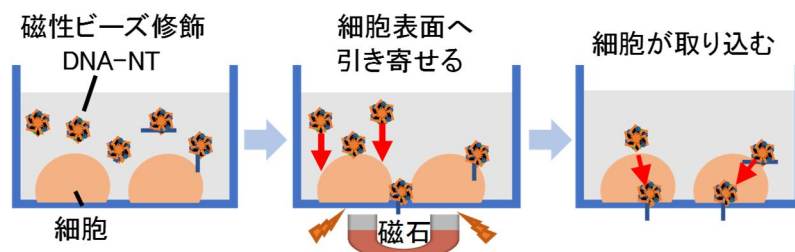


図 1 磁性ビーズ修飾 DNA-NT の生細胞内への導入

(2) - 複数標的のイメージング検出法開発

FRET-based DNA-NT では蛍光色素間で生じる FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) 現象をシグナルとして利用している。したがって、複数種の標的を同時に検出するためには複数の蛍光色素の組合せを用いる必要があり、今後の測定法構築において大きな負担・障壁となることが想定される。そこで、蛍光波長以外の識別パラメータとして、イメージングの特長に着目し「ビーズの大きさ」というパラメータの導入を考案した。すなわち、標的の異なる DNA-NT にそれぞれ大きさの異なる磁性ビーズを修飾すれば、修飾された磁性ビーズの大きさをイメージングによって区別することにより、同じ蛍光色素の組合せでも、複数種の標的に対する DNA-NT の応答を見分けられると考えた (図 2)。そこで以下の実験を行った。標的 A を認識する DNA-NT には大きい磁性ビーズを、標的 B を認識する DNA-NT には小さいビーズを標識した。それぞれの標的と混合後、磁石を用いて磁性ビーズ修飾 DNA-NT をガラス平面状へ引き寄せた。FRET 強度とともにビーズの大きさを蛍光イメージングにより判別したところ、一つの蛍光色素の組合せによる FRET 現象を測定するための設備でも、2 種類の標的核酸を別々に検出することが可能であった。

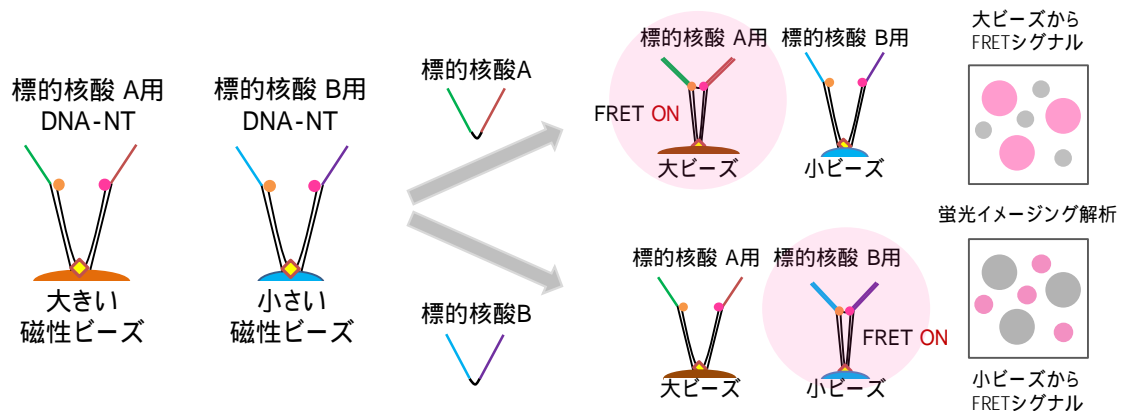


図 2 大きさの異なる磁性ビーズで修飾した DNA-NT による複数標的のイメージング検出

以上の様に本研究では、研究代表者が独自に開発した核酸検出用 DNA-NT 作製技術を基盤として、細胞を生かしたまま解析が可能な「遺伝子組換えを必要としない、汎用的な生細胞内分子応答解析法の開発」を目指した。現段階では、任意の標的を検出するとシグナルを発する DNA-NT を自在に作製するまでには至っていないが、進化分子工学的手法によって任意の DNA-NT を作製するための条件を着実に絞りつつある。また、磁性ビーズ修飾 DNA-NT を利用すると、生細胞内へ DNA-NT を導入できることを示した。さらに、大きさの異なる磁性ビーズを活用すると、シンプルなイメージングデバイスで複数の標的を同時に観察・検出可能であることを見出した。

これらの要素技術で開拓される「遺伝子組換えを用いない生細胞内情報解析手法」は、疾病診断や、再生医療に用いる細胞の品質評価など様々な応用が期待される。さらには、ポータブルデバイスを活用した、その場検出 (Point-of-care testing) 法などへの応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hisakage Funabashi, Keisuke Nakatsuka, Shuhei Yoshida, Hajime Shigeto, Ryuichi Hirota, Takeshi Ikeda, and Akio Kuroda	4. 巻 -
2. 論文標題 Design of Split G-quadruplex-based DNA-Bridged Nucleic Acid Chimera Nanotweezers that Recognize Short Nucleic Acids with a Single-base Mismatch	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	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） 10.18494/SAM3709	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 黒田章夫, 西村智基, 石田丈典, 吉永圭佑, 吉田知哲, 藤野美穂, 舟橋久景	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 スマートバイオセンシング	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Environmental Biotechnology	6. 最初と最後の頁 29 ~ 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Shigeto Hajime, Ono Takuto, Ikeda Takeshi, Hirota Ryuichi, Ishida Takenori, Kuroda Akio, Funabashi Hisakage	4. 巻 144
2. 論文標題 Insulin sensor cells for the analysis of insulin secretion responses in single living pancreatic cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Analyst	6. 最初と最後の頁 3765 ~ 3772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/C9AN00405J	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 2件）

1. 発表者名 Hisakage Funabashi and Hajime Shigeto
2. 発表標題 A Protein-Based Artificial Receptor for Insulin Sensing
3. 学会等名 Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science (PRIME 2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 舟橋久景
2. 発表標題 新しいバイオセンシング分子を創り出す
3. 学会等名 令和元年度 富山大学生命融合科学教育部シンポジウム ヘルスケアとバイオセンシング ~Society5.0時代を迎えて~ (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田知哲, 池田丈, 石田丈典, 廣田隆一, 黒田章夫, 舟橋久景
2. 発表標題 DNAナノ構造体修飾ビーズを用いた標的核酸のイメージング検出
3. 学会等名 第70回日本生物工学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田知哲, 藤野美穂, 池田丈, 石田丈典, 廣田隆一, 黒田章夫, 舟橋久景
2. 発表標題 DNAナノ構造体修飾マイクロビーズを用いたイメージングによる標的核酸のPOCT法開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム -第33回生体機能関連化学シンポジウム、第21回バイオテクノロジー部会シンポジウム-
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 舟橋久景, 重藤元, 小野拓人, 石田丈典, 池田丈, 廣田隆一, 黒田章夫
2. 発表標題 イメージングによる単一生細胞のインスリン分泌応答解析に資するセンサー細胞の開発
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム -第33回生体機能関連化学シンポジウム、第21回バイオテクノロジー部会シンポジウム-
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田知哲, 藤野美穂, 池田丈, 石田丈典, 廣田隆一, 黒田章夫, 舟橋久景
2. 発表標題 DNAナノ構造体修飾マイクロビーズを用いた標的核酸の簡便なイメージング検出法の開発
3. 学会等名 2018年電気化学秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田知哲, 藤野美穂, 池田丈, 石田丈典, 廣田隆一, 黒田章夫, 舟橋久景
2. 発表標題 mRNA検出用DNAナノ構造体修飾磁性ビーズを生細胞内に導入するための基礎検討
3. 学会等名 電気化学会第86回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisakage Funabashi
2. 発表標題 Development of biosensing molecules for POCT systems
3. 学会等名 JSPS Bilateral Joint Research Projects/Seminars FY2020, Korea-Japan symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 重藤元, 舟橋久景	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)シーエムシー出版	5. 総ページ数 10
3. 書名 代謝センシング -健康, 食, 美容, 薬, そして脳の代謝を知る-, 第24章 インスリンが関わる生細胞応答のセンシング	

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学舟橋研究室ホームページ
<https://funabashilab.hiroshima-u.ac.jp/>

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
---------	---------