

## 次世代型デジタルバイオアッセイのための動的フェムトリアクタ技術

Dynamic femtoreactor technology for next-generation digital bioassays

課題番号：19H05624

野地 博行 (Hiroyuki Noji) 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻



### 研究の概要

本プロジェクトは、能動的な分子取り込み・交換・排出などの機能を搭載した「動的フェムトリアクタ技術」を開発する。これによって、これまでの微小溶液リアクタ技術を刷新し、オンサイト診断を能にするアッセイ技術を開発する。加えて、分子・ウイルスの「個性」を定量解析し、その発現機構や生物学的意義を明らかにする。

研究分野：総合理工

キーワード：1分子計測、デジタルバイオ分析、フェムトリアクタ、ウイルス粒子

#### 1. 研究開始当初の背景・動機

我々は、フェムトリットルサイズの超微小溶液リアクタアレイ技術 (fL リアクタ技術) を開発し、これを利用した1分子バイオ分析分野を牽引してきた。しかしながら、これまでの fL リアクタ技術は受動的に溶液を収納するだけであり、その応用範囲には制限があった。

#### 2. 研究の目的

動的機能を有する「動的 fL リアクタ技術」を確立する。例えば、分子選択的な濃縮技術、連続的溶液交換技術、リアクタからの個別溶液回収技術などを開発し、これらを効果的に統合した統合型デバイスを開発する。これによって、デバイス外での溶液調製を必要としない次世代型のデジタルバイ分析法を確立し、オンサイト迅速診断やパーソナル医療の技術的基盤を構築する。さらに、定量的多次元デジタルバイオ分析により、ウイルス粒子や酵素分子の「個性」を定量計測し、その生物学的意義及び個性発現分子メカニズムを解明する。

#### 3. 研究の方法

本プロジェクトは、①「動的 fL リアクタデバイスの基盤技術開発」、②「on-chip 統合型デジタルバイオ分析法の確立」、③「分子個性の多次元解析と個性発現メカニズムの解明」の3つに大別される。項目①では、溶液交換や能動的濃縮の技術開発に取り組む。項目②では、B/F 分離不要なデジタルバイオ分析法を開発し、多項目検出法の検討を行う。項目③では、インフルエンザウ

イルス粒子の1分子定量解析に取り組む。

#### 4. これまでの成果

項目①では以下3つの技術開発を行った。  
i) 分子濃縮：高分子混合溶液による相分離を検討した結果、fL リアクタの DEX ドロプレットに DNA やタンパク質を数十倍以上に濃縮するリアクタ技術の開発に成功した。また、IR 照射による局所加熱によって相分離が誘発される新現象を発見した。

ii) 連続溶液交換：これまでの fL リアクタはリアクタ上部にオイルを重層することで fL リアクタを封入していたが、上部に空気を導入して fL リアクタを封入する系を開発した。これによって、残留オイルによって汚染しない連続溶液交換技術が確立し (Honda et al. Analytica chemistry 2021)、インフルエンザ1粒子の多次元デジタル計測が可能になった。

iii) リアクタ回収：IR レーザーによる fL リアクタデバイスの局所加熱によって fL リアクタからの w/o ドロプレットの個別回収が可能であることを見出し、fL デバイスを用いた進化分子工学的スクリーニングの歩留まりが向上した。また、PEG 修飾した fL リアクタデバイスを指でタッピングすると全ての w/o ドロプレットを一括回収できることを発見した。この現象を利用して、マイクロ流体デバイスでは作成が困難である粒径サイズ数ミクロン (0.5-5.0 $\mu$ m) の均一径 w/o ドロプレット作成技術を確立し、これを鋳型として均一系 fL リポソーム (均一系 femto-liposome) を作成することにも成功した (Soga et al. ACS Nano 2020)。

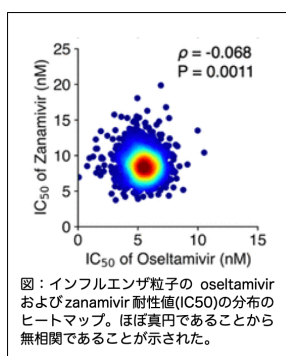
項目②では以下2つの技術開発を行った。  
**i) 溶液交換を必要としないホモジニアス抗原計測法**：抗体を結合したナノ粒子のブラウン運動解析から抗原1分子を計測する新手法 digital homogeneous non-enzymatic immunosorbent assay (digital HoNon-ELISA)を開発し、これまでのdigital ELISA法に匹敵する感度を達成した (Akama et al. *ACS Nano* 2019)。また、異なるナノ粒子を用いることで、複数のターゲット分子を1分子計測できるmultiplex型digital HoNon-ELISA法の開発にも成功した (Akama et al. *Lab on a chip* 2020)。さらに、データ解析の高速・効率化にも成功した (Akama et al. *Analyst* 2020)。



図：Digital HoNon-ELISA法の概念図。fLリアクタ内部に捕捉したターゲット分子とブラウン粒子の複合体のブラウン運動解析を行う。運動特性からデジタル検出する(*ACS Nano* 2019)。

**ii) RNAウイルスのデジタル計測法**：当初計画にはなかったが、新型コロナウイルスの超高感度検出系の開発に取り組んだ。現在までに、1分子RNAを10分で検出する系の開発に成功しが、RT-PCR法と比較して感度が劣るため、上述の相分離dropletによる濃縮機能を利用した超高感度化を目指している。

項目③では、**インフルエンザ粒子の多次元解析**を行なった。具体的には、項目①で開発した空気封入法を利用した連続溶液交換技術を活用し、インフルエンザ粒子のノイラミニダーゼ活性を複数の基質濃度および阻害剤 (oseltamivir および zanamivir) 濃度で計測することで、各粒子の速度論的パラメーター ( $k_{cat}$  および  $K_m$  値) に加え、2種類の阻害剤に対する50%阻害濃度 ( $IC_{50}$  値) を測定した。その結果、 $k_{cat}$  および  $IC_{50}$  値には相関がないことから、粒子の酵素能と阻害剤耐性を決定する分子機構は異なることが示された (Honda et al. *Analytica chemistry* 2021)。



図：インフルエンザ粒子の oseltamivir および zanamivir 耐性値 ( $IC_{50}$ ) の分布のヒートマップ。ほぼ真円であることから無相関であることが示された。

## 5. これまでの進捗状況と今後の計画

項目①では、動的 fL リアクタデバイスの基盤技術開発を更に加速し、無細胞 DNA 連結・合成・スクリーニング技術との統合を目指す。また、項目②では、独自開発し

た DEX/PEG fL リアクタ技術を活用し、既存の RT-PCR 法や他のウイルス RNA 検出法とは異なり、核酸増幅工程が一切不要な新型コロナウイルスの迅速高感度検出法を開発する。さらに、項目③では、fL リアクタから RNA を回収する技術を確認し、インフルエンザウイルス1粒子毎に RNA ゲノム解析を行い、ゲノム配列とノイラミニダーゼ活性/阻害剤耐性の相関を解明する。

## 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- Honda S, Minagawa Y, Noji H\*, and Tabata KV\*. "Multidimensional Digital Bioassay Platform Based on an Air-Sealed Femtoliter Reactor Array Device" (2021) *Anal. Chem.*, (DOI:10.1021/acs.analchem.0c05360)
- N. Soga, A. Ota, K. Nakajima, R. Watanabe, H. Ueno, and H. Noji\*. "Monodisperse Liposomes with Femtoliter Volume Enable Quantitative Digital Bioassays of Membrane Transporters and Cell-Free Gene Expression" (2020) *ACS Nano*, **14** (9), 11700-11711
- K. Akama\*, H. Noji\*. "Multiplexed homogeneous digital immunoassay based on single-particle motion analysis" (2020) *Lab Chip*, **20** (12), 2113-2121
- S. Sakamoto, T. Komatsu\*, Rikiya Watanabe\*, Y. Zhang, T. Inoue, M. Kawaguchi, H. Nakagawa, T. Ueno, T. Okusaka, K. Honda, H. Noji\*, and Y. Urano\* "Multiplexed single-molecule enzyme activity analysis for counting disease-related proteins in biological samples" (2020) *Sci. Adv.*, **6**, eaay0888, 1-8
- H. Ueno, Y. Kato, K. V. Tabata, and H. Noji\* "Revealing the Metabolic Activity of Persisters in Mycobacteria by Single-Cell D2O Raman Imaging Spectroscopy" (2019) *Anal. Chem.* **91** (23), 15171-15178
- K. Akama\*, N. Iwanaga, K. Yamawaki, M. Okuda, K. Jain, H. Ueno, N. Soga, Y. Minagawa and H. Noji\* "Wash- and Amplification-Free Digital Immunoassay Based on Single-Particle Motion Analysis" (2019) *ACS. Nano*, **13** (11), 13116-13126

\* corresponding author

## 【受賞】

野地博行、令和元年度 中谷賞大賞「デジタルバイオ分析法」 (<https://www.nakatani-foundation.jp/news/nakataniaward2019/>)

ホームページ等

<http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>