

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22244

研究課題名(和文)量子DNAシーケンサーを用いた修飾核酸塩基の1分子計測

研究課題名(英文)Single Molecule Analysis of Modified Nucleotides Using Quantum DNA Sequencer

研究代表者

山東 信介(SANDO, SHINSUKE)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・教授

研究者番号：20346084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：1. o-フェニレンジアミンと修飾核酸塩基5-formyl-dU (5-fdU)との酸化的環化反応で、5位benzimidazole構造をもつ5-BzImが定量的に形成されることを確認した。2. 5-BzImは金のフェルミ準位に近いHOMO軌道を持ち、dT、5-fdU、dGに比べて高いトンネル電流を示した。3. 金電極と官能基との相互作用に着目した。エチニル基、シアノ基、アミノ基を5位に持つ修飾dUのうち、5位にエチニル基を持つEtdUは、優位に大きいトンネル電流を示した。4. トンネル電流値の大きさとCV値の2変数による解析により、EtdUの識別精度が向上できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

量子シーケンサーは、核酸の配列解析を可能にする次々世代シーケンサーとして、その実現が期待されています。本研究成果は、検出が困難と考えられてきた「修飾を受けた塩基」に対する解析に向けた方法を提案しています。

研究成果の概要(英文)：1. 5-BzIm, dU derivative having benzimidazole structure at 5-position, was quantitatively formed by the oxidative cyclization of the modified nucleobase, 5-formyl-dU (5-fdU), with o-phenylenediamine. 2. 5-BzIm has a HOMO orbital close to the Fermi level of gold, resulting in a higher tunneling current than dT, 5-fdU, and dG. 3. We also focused on the interaction between the gold electrode and the functional groups; among the modified dUs with ethynyl, cyano, and amino groups at the 5-position, EtdU with ethynyl group exhibited a larger tunneling current. 4. It was confirmed that the base calling accuracy of EtdU can be improved by analysis using the two variables, the magnitude of the tunneling current and CV value.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：量子シーケンサー DNA 配列解析 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

核酸塩基配列の1分子配列解析を可能にする次々世代シーケンサーとして、量子シーケンサーに注目が集まっており、その実現が期待されている。量子DNAシーケンサーでは、DNAやRNAが、微小な金ナノ電極近傍を通過する際に、各核酸塩基が与えるトンネル電流の値から、その塩基配列を決定する。量子シーケンサーは固体を基盤とする電極を利用するため、高速かつ直接的な配列解析が可能になるだけでなく、コスト、大量生産への適合性、さらには繰り返し分析に適した耐久性など、1分子シーケンサー候補として期待されているタンパク質ナノポアベースに比して多くの利点を有する。

量子シーケンサーは、原理上、1分子の核酸塩基配列を直接計測できるため、DNAやRNAの配列情報だけでなく、核酸塩基の化学修飾情報を計測できる点は、PCR増幅を利用する従来の配列読法に比した利点であり、その実現、適応範囲の拡大が強く望まれていた。

2. 研究の目的

一方、量子DNAシーケンサーには克服すべき大きな課題がある。微小な金ナノ電極近傍を通過する際に各種核酸塩基から得られるトンネル電流値の差が小さい。分子運動の影響もあって、それぞれの塩基由来のトンネル電流値の分布が重なってしまうため、トンネル電流値からDNA配列情報を正確に決定することが難しい。この要因の1つは、「分子構造に基づく電気化学的特性によって支配されるヌクレオチド間の分子導電性」が非常に似通っていることにある。

例えば、5-formylU(5-fdU)は、dT塩基の重要なエピゲノム修飾体であるが、分子構造や電気化学的特性が似通っているため、トンネル電流値の差から5-fdUと非修飾dT塩基と区別することは難しい。

本研究では、核酸塩基の化学的特性と量子トンネル効果の学術的理解から、特定修飾塩基のトンネル電流値のみを選択的に増大/変化/区別化させる分子技術を利用し、量子シーケンサーを用いたエピゲノムなどのDNA修飾1分子高精度計測に向けた基盤技術の開拓を目指した。

3. 研究の方法

量子シーケンサーに流れるトンネル電流値は下記の(1)式で表される。

$$G = \frac{e^2}{\pi \hbar} \frac{4\Gamma_L \Gamma_R}{(E_F - \epsilon_{MO})^2} \quad (1)$$

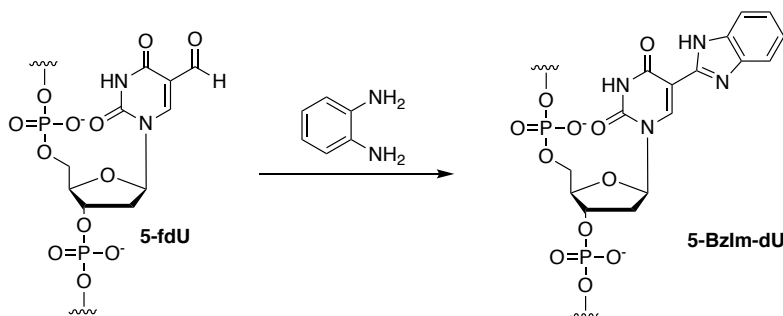
ここで、 E_F は金のフェルミエネルギー、 ϵ_{MO} は分子の軌道エネルギー、 $\Gamma_{L(R)}$ は金と分子の軌道相互作用である。つまり、金のフェルミエネルギーと分子の軌道エネルギーのエネルギー差である($E_F - \epsilon_{HOMO}$)や金と分子の軌道相互作用を変化させることで、トンネル電流の値を変化させることが可能である。実際、研究代表者らは、同様の分子骨格を持ち金電極との相互作用様式が近いと考えられるが、($E_F - \epsilon_{HOMO}$)が異なるdAと7-deaza-8-aza dAが異なるトンネル電流値を示すことを見出し、これが本提案の着想につながっている[1]。

dT塩基のエピゲノム修飾である5-fdUに着目し、研究を展開した。dTと5-formylUは、HOMO分子軌道エネルギーの値が近い。実際に、Mechanically Controlled Break Junction法でナノギャップ間のトンネル電流を測定したところ、これら2つの分子が示すトンネル電流値に大きな差はない。そこで、修飾核酸塩基特徴的な化学反応を利用し、5-fdUに官能基を付与することでトンネル電流値を大きく変化させ、dTとの区別を可能にすることを試みた。5-fdU選択的に蛍光色素やビオチンを付与する修飾反応は既に報告されており[2,3]、これらの報告を参考に5-fdUとo-フェニレンジアミンの酸化的環化反応を用いた。また、HOMO分子軌道レベルだけでなく、金電極との相互作用を変化させる核酸修飾についても検討した。

4. 研究成果

(1) 修飾核酸塩基特異的な化学反応を用いた 5-formyldU の 1 分子検出 [ChemBioChem 2020, 21, 335–339.]

o-フェニレンジアミンと 5-fdU を含むオリゴヌクレオチド (5-fdU 両端は abasic mimic) との反応を検討し、中性水溶液条件下、2h の反応において、非常に高い収率 (5-fdU に対して) で酸化的環化反応が進行することを HPLC 等を用いて確認した。この反応によって、5-fdU は 5-benzimidazole-dU(5-BzIm-dU)へと変換された。



次に、5-BzIm-dU が示すトンネル電流値を Mechanically Controlled Break Junction 法を用いて計測した。その結果、5-BzIm-dU は dT, 5-fdU, dG と比べて有意に大きなトンネル電流値を示し、他の塩基との識別が可能であることが示された。実際に、DFT 計算の結果、5-BzIm-dU の HOMO エネルギーは金のフェルミエネルギーに近くなっており、 $(E_F - \epsilon_{\text{HOMO}})$ の項が小さくなったために、大きなトンネル電流が得られたことが示唆された。

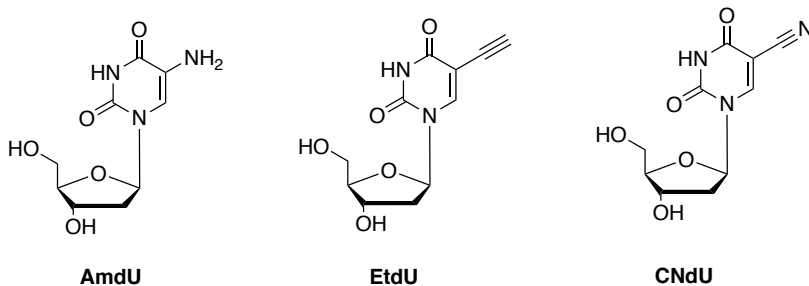
更に、オリゴヌクレオチド中での識別可能性を検討するため、5'-TXXT-3'配列 (X = 5-fdU or X = 5-BzIm-dU) を設計、合成した。これらのオリゴヌクレオチドのトンネル電流値を計測し、比較したところ、X = 5-BzIm-dU のオリゴヌクレオチドでは、より大きな電流値側にもヒストグラムのピークが得られた。

この結果は、修飾核酸塩基特異的反応により修飾核酸のトンネル電流値を変化させることができることを表しており、DNA 修飾 1 分子計測への可能性を示した。

(2) 金電極との特徴的相互作用をもつ修飾核酸塩基の探索と核酸マーカーとしての可能性 [Chem. Sci. 2020, 11, 10135-10142.]

上記(1)では、 $(E_F - \epsilon_{\text{HOMO}})$ に着目し、修飾核酸塩基の 1 分子検出を試みた。加えて、金電極との軌道相互作用 $\Gamma_{L(R)}$ に着目した研究を試みた。具体的には、金電極と特徴的な軌道相互作用が期待される、5 位修飾 dU として AmdU, CNdU, EtdU を準備し、トンネル電流値を測定した。その結果、Ethyynyl 基を 5 位に有する EtdU は有意に大きなトンネル電流値を示した。

また、トンネル電流値の大きさに加えて、特徴量として CV 値に着目した。2 変数による解析により、EtdU の識別精度が向上できることを確認した。



[引用文献]

- [1] *ACS Nano* **2019**, *13*, 5028.
- [2] *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1610.
- [3] *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 4505.

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 1件）

1. 著者名 Takafumi Furuhashi, Takahito Ohshiro, Yuichi Izuhara, Tomoaki Suzuki, Ryosuke Ueki, Masateru Taniguchi, and Shinsuke Sando	4. 巻 21
2. 論文標題 Chemical Labeling-Assisted Detection of Nucleobase Modifications by Quantum Tunneling-Based Single Molecule Sensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 335-339
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201900422	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 Takafumi Furuhashi, Yuki Komoto, Takahito Ohshiro, Masateru Taniguchi, Ryosuke Ueki, and Shinsuke Sando	4. 巻 11
2. 論文標題 Key aurophilic motif for robust quantum-tunneling-based characterization of a nucleoside analogue marker	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Sci.	6. 最初と最後の頁 10135-10142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/x0xx00000x	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山東信介
2. 発表標題 量子DNAシーケンサーの実現に向けた化学的アプローチ
3. 学会等名 日本分析化学会 第68年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古畑 隆史, 大城 敬人, 出原 優一, 鈴木 智瑛, 植木 亮介, 谷口 正輝, 山東 信介
2. 発表標題 核酸塩基の電子物性制御戦略に基づいたDNA 修飾の電気的一分子解析
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

〔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
---------	---------