

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2020～2023

課題番号：20KK0252

研究課題名（和文）ナノ粒子拡散の画像解析に基づいたPCR不要な超高感度DNA検出技術の確立

研究課題名（英文）PCR-free ultra-sensitive DNA detection based on image analysis of nanoparticle diffusion

研究代表者

坂元 博昭（Sakamoto, Hiroaki）

福井大学・学術研究院工学系部門・准教授

研究者番号：70552454

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,400,000円

研究成果の概要（和文）：ウイルスRNAの一部を標的対象とし、相補的配列を有したプローブ配列を設計した。そのプローブを半面が金コートされた蛍光ナノ粒子表面へ固定化し、プローブ修飾ヤヌス粒子を開発した。ついで、プローブ修飾ヤヌス粒子と標的RNAとの間にハイブリダイゼーションを形成させることで、複合体を形成した。台湾 Han-Sheng Chuang教授らの開発した画像解析プログラムにより標的ウイルスRNA有無の識別に成功した。その応答は、標的RNA濃度依存し、また、その他の夾雑物質には応答しないという、高感度・高選択性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の生体分子計測は、物質量を情報変換素子（シグナル分子）を介して、電気・質量・熱・色などの信号として計測するというセンサ構成であった。本研究では、ナノ粒子の移動速度という物理変化を指標としてシグナル分子を用いずにセンシングを行う点が独創的である。この手法が確立できれば、B/F分離不要で同時に網羅的検出可能な、従来技術を超える次世代バイオセンシングの基盤技術になることが期待される。したがって、膨大な候補物質からリード化合物を探索する薬剤スクリーニング、食品の安全性評価、水質検査などの多検体分析において成果が発揮されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：A probe sequence with a complementary sequence to the target RNA was designed. The probe was immobilized onto the Janus fluorescent particle surface, which is half of its surface coated with gold was prepared. The probe-modified Janus particles were then hybridized to the target RNA to form a complex. An image analysis program developed by Prof. Han-Sheng Chuang et al. in Taiwan was used to identify the presence or absence of the target viral RNA. The response was highly sensitive and selective, depending on the target RNA concentration and not responding to other foreign substances.

研究分野：バイオセンシング

キーワード：バイオセンサ プローブ粒子 核酸検出 画像解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2020年新型コロナウイルスはパンデミックを起こし、多くの人命が失われ、経済を停滞させた。新型コロナウイルスだけでなく、毎冬猛威を振るうインフルエンザウイルス、細菌による食中毒など私達は見えない敵と共存し社会活動をしなければならない。新型コロナウイルスによる被害は一次的には人命を奪うことであるが、2次的被害として、どこにいるのかわからないという不安により、見通しを立てることができず、経済活動が滞ってしまうことが挙げられる。したがって、ウイルス・微生物の有無を検知する技術が重要であることが、コロナ禍において改めて認識された。以上のことから、見えない敵であるウイルス・有害微生物等の有無を正確に、かつ、短時間で知る技術が強く求められている。

申請代表者らは電気化学的手法とナノ粒子を組み合わせた検出技術に基づき、PCRを用いずに高感度な検出技術を開発してきた。測定対象核酸に相補的なDNAプローブおよびプローブ/レポーター分子(フェロセン)を修飾したナノ粒子を添加し、ハイブリダイゼーションさせる。その複合体中に存在するフェロセンを電気化学的に検出する。本センサは、1pMという超微量の標的核酸を瞬時に検知することに成功し、対象となる核酸以外には応答を示さず、高い選択性を得ることに成功した。しかし電気化学検出では、電気化学的に活性なメディエータを標識したレポータープローブを用いなければならない。その場合、未反応のレポータープローブを除去する工程(B/F分離)が必要であり、遠心分離や磁気分離が必要であるため、オンサイト分析には適していない。また、発症の有無を把握することのできる検出感度にはあと100倍ほど不足していた。

そこで、かねてから研究交流を行ってきた台湾 国立成功大学 Han-Sheng Chuang 教授との共同研究を2017年から開始した。Chuang 教授らは、ナノ粒子の溶液中の移動速度を計測する技術を開発してきた。そこで、申請者が開発したプローブ修飾ナノ粒子が生体分子と相互作用した際の検出に画像解析による計測法の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が開発したプローブ修飾ナノ粒子による生体分子捕捉技術と台湾 Han-Sheng Chuang 准教授らのナノ粒子移動速度の画像解析技術により、標的核酸とプローブ修飾ナノ粒子との結合について、ナノ粒子の移動速度を画像から計測することで判別する。さらに主成分分析を組み合わすことによって、その測定精度の向上を図る。日本と台湾の2グループの技術を集結融合し、ナノ粒子の移動速度を画像解析および高感度化することでPCRによる遺伝子増幅を行わずに直接検出できるような検査システム構築を目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、院内感染の原因として知られるメチシリン黄色ブドウ球菌(MRSA)を検出対象モデルとする。また、新型コロナウイルス SARS-CoV-2 のN 遺伝子由来するRNA 配列(1260 bp)も標的核酸とした。

標的核酸を設定した上で以下の項目について研究を実施した。

- (1) プローブ修飾ナノ粒子の設計
- (2) プローブ修飾ナノ粒子の合成および画像解析 (台湾：国立成功大学)
- (3) センサ性能評価
- (4) 主成分分析による精度向上

4. 研究成果

(1) プローブ修飾ナノ粒子の設計 : MRSA の全ゲノムの内、薬剤耐性を示す遺伝子領域の25bp(5' -TCTGGAACCTTGTTGAGCAGAGGTTTC-3') を MRSA 遺伝子捕捉用のプローブとして設計した。また、新型コロナウイルス N 遺伝子については、SARS-CoV2 の N タンパク質の塩基配列の一部と相補的な配列を持つものを用いた(5' -GGT ATT TCT ACT ACC TGG GC-Thiol-3') をプローブとした。

(2) プローブ修飾ナノ粒子の合成および画像解析
本研究では、溶液中のナノ粒子の回転速度の変化を動画から解析する。そこで、回転を識別する

ためにナノ粒子の半分を金蒸着した。金が蒸着された表面へ、(1)で設計したチオールを末端に有したプローブを修飾することで、ナノ粒子表面の半分だけプローブが修飾されたナノ粒子を作製した。

そのプローブナノ粒子と標的核酸をハイブリダイゼーションさせ、その溶液を顕微鏡で1秒を15フレームで20秒間撮影した。得られた動画からChuang教授が開発した解析プログラムを利用してナノ粒子の回転移動を計測した。プローブ修飾ナノ粒子と標的核酸の相互作用をナノ粒子の回転速度変化から定量的に計測できるかを検証した結果、標的核酸の濃度に応じてその回転拡散が変化していくことを確認した。

(3) センサ性能評価

Chuang教授の技術を用いた計測技術の詳細な性能評価を行った。ウイルスや有害微生物による発症濃度である1fMを目標にセンサ感度、計測誤差、を評価した。併せて、他の遺伝子には応答しないか選択性の評価、計測時の溶液体積、温度といった外環境の影響がどの程度測定に影響を及ぼすかも評価した結果、標的核酸のみにセンサ応答することを確認した。

(4) 主成分分析による精度向上

画像解析において、プローブ修飾ヤヌス粒子の凝集の課題が残されていた。この凝集が、複合体形成によるものなのか、非特異的にナノ粒子同士が凝集しているのかを判別することが画像からだけでは困難であった。そこで、画像から得られたナノ粒子移動速度に影響を与えると予想される蛍光強度、温度、対流速度などの変化に対し、主成分分析を行った。主成分分析アルゴリズムを構築し、各ナノ粒子の動的挙動を、統計的にグループ分けを行った。挙動の違いから、未反応ナノ粒子を統計学的に判別することで、計測精度の向上を図った。その結果、観察時間によりセンサ応答に影響がもたらされることを見出し、それらの知見から画像解析アルゴリズムを再構築し、測定精度の向上を達成した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 WATANABE Yui, YAJIMA Shuto, KODA Maho, KOTO Ayako, TAKAMURA Eiichiro, SAKAMOTO Hiroaki	4. 巻 92
2. 論文標題 Photocrosslinkable Artificial Nucleic Acid Probe Based miRNA Biosensor	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Electrochemistry	6. 最初と最後の頁 022018 ~ 022018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/electrochemistry.23-68119	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 Watanabe Yui, Yajima Shuto, Koda Maho, Kinjou Ayumu, Koto Ayako, Takamura Eiichiro, Sakamoto Hiroaki, Suye Shin-ichiro	4. 巻 247
2. 論文標題 Selective miR-21 detection technology based on photocrosslinkable artificial nucleic acid-modified magnetic particles and hybridization chain reaction	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 115920 ~ 115920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2023.115920	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 Meboso Taichi, Hashimoto Kazuki, Sakamoto Hiroaki, Amaya Satoshi, Torisawa Shinsuke, Mitsunaga Yasushi, Saiki Tsunemasa	4. 巻 35
2. 論文標題 Development of Self-powered Biosensor for Fish Health Monitoring	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 4491 ~ 4491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18494/SAM4558	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 S. Kezuka, H. Nakayama, Y. Morita, H. Sakamoto, T. Kitamura, M. Hashimoto, E. Takamura, and S. Suye	4. 巻 34
2. 論文標題 Development of Colorimetric DNA Sensing System for Methicillin-resistant Staphylococcus aureus without Bond/Free Separation by Size Separation of Gold Nanoparticle Conjugates Using 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPO)-oxidized Cellulose Nanofiber Cross-linked Filters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sens. Mater	6. 最初と最後の頁 3101-3111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18494/SAM3735	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 H. Nakayama, S. Kezuka, Y. Morita, T. Kitamura, E. Takamura, H. Sakamoto	4. 巻 117
2. 論文標題 Preparing a pore-size-controlled TEMPO oxidized cellulose nanofiber substrate for enzyme immunoassay applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Process Biochem.	6. 最初と最後の頁 174-179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.procbio.2022.04.007	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 S. Yajima, A. Koto, M. Koda, H. Sakamoto*, E. Takamura, and S. Suye	4. 巻 7
2. 論文標題 Photo-Cross-Linked Probe-Modified Magnetic Particles for the Selective and Reliable Recovery of Nucleic Acids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 12701-12706
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c07012	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 Ning Li, Hiroaki Sakamoto, Eiichiro Takamura, Haitao Zheng, Shin-ichiro Suye	4. 巻 631
2. 論文標題 A high performance nanocomposite based bioanode for biofuel cell and biosensor application	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Biochemistry	6. 最初と最後の頁 114363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ab.2021.114363	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 該当する

1. 著者名 Ning Li, Hiroaki Sakamoto, Eiichiro Takamura, Haitao Zheng and Shin-ichiro Suye	4. 巻 33
2. 論文標題 Electrochemical Sensor Based on Electroactive Polymer and Sulfo-group-functionalized Graphene Oxide Composite for Detection of Dopamine	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensor and Materials	6. 最初と最後の頁 4347-4360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18494/SAM.2021.3435	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 該当する

1. 著者名 M.S. Bacchu , M.R. Ali, S. Das, S. Akter, H. Sakamoto, S.-I. Suye, M.M. Rahman, K. Campbell, M.Z.H. Khan	4. 巻 1192
2. 論文標題 A DNA functionalized advanced electrochemical biosensor for identification of the foodborne pathogen Salmonella enterica serovar Typhi in real samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytica Chimica Acta	6. 最初と最後の頁 339332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.aca.2021.339332	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 該当する

1. 著者名 SAKI Mori, Yohei Ktta, Hiroaki Sakamoto, Eiichiro Takamura, Shin-ichieo Suye	4. 巻 43
2. 論文標題 Electrochemical characteristics of a gold nanoparticle-modified controlled enzyme-electrode contact junction electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIOTECHNOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 1037-1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-021-03092-3	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 SAKI Mori, Yohei Ktta, Hiroaki Sakamoto, Eiichiro Takamura, Shin-ichieo Suye	4. 巻 43
2. 論文標題 Electrochemical characteristics of a gold nanoparticle-modified controlled enzyme-electrode contact junction electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIOTECHNOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 1037-1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-021-03092-3	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 SAKI Mori, Yohei Ktta, Hiroaki Sakamoto, Eiichiro Takamura, Shin-ichieo Suye	4. 巻 43
2. 論文標題 Electrochemical characteristics of a gold nanoparticle-modified controlled enzyme-electrode contact junction electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIOTECHNOLOGY LETTERS	6. 最初と最後の頁 1037-1042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10529-021-03092-3	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16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 坂元博昭
2. 発表標題 生体内の化学情報を計測するバイオセンサ開発
3. 学会等名 2023年度日本人間工学会関西支部 春季講演会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 渡部 結衣, 神田 真穂, 向當 綾子, 中居 桃花, 高村 映一郎, 坂元 博昭
2. 発表標題 光架橋性人工核酸を用いた電気化学的miRNA検出法の確立
3. 学会等名 電気化学会第91回大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 杉本 真依, 屋敷 大河, 高村 映一郎, 坂元 博昭
2. 発表標題 シュードノットアプタマーを用いた電気化学的コルチゾールモニタリングセンサの開発
3. 学会等名 2023電気化学秋季大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maho Koda, Shuto Yajima, Wei-Long Chen, Han-Sheng Chuang, Eiichiro Takamura, Hiroaki Sakamoto, Shin-ichiro Suye
2. 発表標題 Novel RNA sensor based on image analysis of rotational diffusion of probe-modified Janus Particles
3. 学会等名 Biosensors 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 T. Meboso, T. Kobayashi, S. Amaya, H. Sakamoto, T. Saiki
2. 発表標題 Development of a micro bioanode for vascular implantable glucose biosensors
3. 学会等名 Biosensors 2023 (2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Watanabe, S. Yajima, M. Koda, A. Kinjyo, A. Koto, E. Takamura, Hiroaki Sakamoto, Shin-ichiro Suye
2. 発表標題 MicroRNA detection in human blood using artificial nucleic acid probes and non-enzymatic fluorescent amplification
3. 学会等名 Biosensors 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 神田 真穂, 矢嶋 修登, 高村 映一郎, 坂元 博昭, 末 信一郎, 陳 韋龍, 莊 漢聲
2. 発表標題 プローブ修飾 Janus 粒子の回転拡散の画像解析に基づく新規RNAセンサ
3. 学会等名 2023年繊維学会年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡部結衣, 矢嶋修登, 神田真穂, 向當綾子, 高村映一郎, 坂元博昭, 末信一郎
2. 発表標題 人工核酸プローブおよび非酵素蛍光増幅による血中マイクロRNA検出技術の確立
3. 学会等名 2022年 繊維学会秋季研究発表会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 神田 真穂、矢嶋 修登、向當 綾子、陳 韋龍、莊 漢聲、高村 映一郎、坂元 博昭、末 信一郎
2. 発表標題 プローブ修飾Janus粒子の回転拡散の画像解析に基づく新規RNAセンサ
3. 学会等名 2022年電気化学秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本 真依、小原 宗一郎、峠 知矢子、中津 美智代、高村 映一郎、坂元 博昭、末 信一郎
2. 発表標題 ガルバニック電流に基づいた微生物センサの開発とその応答メカニズム解析
3. 学会等名 第39回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 矢嶋 修登、神田 真帆、向當 綾子、Han-Sheng Chuang、高村 映一郎、坂元 博昭、末 信一郎
2. 発表標題 光架橋性プローブ修飾磁気粒子の拡散度解析に基づく新規RNAセンサ
3. 学会等名 2022年電気化学秋季大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂元博昭、向當綾子、西元奨太、Han-Sheng Chuang、植松英之、田上秀一、高村映一郎、末信一郎
2. 発表標題 蛍光粒子の拡散解析に基づいた高分子薄膜の局所粘性解析
3. 学会等名 2021年繊維学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神田真穂, 向當 綾子, 矢嶋修登, 坂元博昭, 高村映一郎, 末信一朗
2. 発表標題 PCR検査精度向上のための光架橋性プローブ修飾磁気粒子 (PPMP) の開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢嶋 修登, 向當 綾子, 神田 真穂, 坂元 博昭, 高村 映一郎, 末 信一朗
2. 発表標題 プローブ修飾粒子を用いた核酸バイオセンサの開発
3. 学会等名 2021年繊維秋季研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Yajima, A. Koto, M. Koda, H. Sakamoto, E. Takamura, S. Suye.
2. 発表標題 Construction of a highly efficient RNA recovery technique using magnetic particles modified with photo-crosslinkable probes
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松島雛子, 童莊 漢聲, 高村映一郎, 里村武範, 坂元博昭, 末信一朗
2. 発表標題 プローブ粒子液中拡散挙動に基づいた画像解析によるDNAセンサの構築
3. 学会等名 第30回日本MRS年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ
http://ecnfukui.acbio.u-fukui.ac.jp/~lab/index.html

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	坂元 知里 (Sakamoto Chisato) (10711492)	福井工業高等専門学校・物質工学科・助教 (53401)	
研究分担者	高村 映一郎 (Takamura Eiichiro) (30843015)	福井大学・学術研究院工学系部門・助教 (13401)	

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		
その他の国・地域	National Cheng Kung University		