

令和 5 年 4 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K18737

研究課題名(和文) 反応場をナノサイズにした高感度病原性微生物センサーの開発

研究課題名(英文) Development of highly sensitive pathogenic microbial sensors with nano-sized reaction fields

研究代表者

佐藤 久 (Satoh, Hisashi)

北海道大学・工学研究院・教授

研究者番号：80326636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：水中の病原体由来RNA(例えば、RNAウイルス)を検出するための、単純で、迅速で、感度が高く、費用対効果の高いアッセイが、トランスクリプトーム解析に必要である。ここでは、オリゴヌクレオチド機能化金ナノ粒子プローブ(Auナノプローブ)の光散乱特性に基づいて、増幅されていないRNAを検出するための高感度アッセイを提示する。このアッセイは、RNA抽出の10分以内に逆転写およびcDNA増幅を伴わずに、細菌16S rRNAおよびmRNAの高感度定量(約10 Rピー/μL)を可能にする。さらに、このアッセイは、直接RNA定量のための以前に報告されたアッセイよりも3桁感度が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、世界全体では約20億人が安全な飲料水を利用できていない。2016年には安全でない飲料水供給施設や衛生設備の不足が原因で世界で87万人の関連死が発生した。そのため、高感度病原性微生物センサーの開発が望まれている。本法が完成すればPCR法によらずに、遺伝子抽出後は簡易に(DNAプローブとサンプルを混合するのみ)、迅速に(10分)、低コストで(1サンプル1円)病原体を検出できる。熟練の技術者がいない過疎地域や開発途上国でも飲料水中や公共用水域の病原体濃度を測定できるようになる。水の汚染発覚後、自治体は迅速に問題に対応できる。

研究成果の概要(英文)：RNA is a crucial diagnostic biomarker for several human diseases. Hence, a simple, rapid, sensitive, and cost-effective assay for detecting pathogen-derived RNAs (e.g., RNA viruses) in water is necessary for transcriptomic analysis. Here, we present a highly sensitive assay to detect unamplified RNA based on the light scattering properties of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticle probes (Au-nanoprobes). In this assay, Au-nanoprobes recognize and hybridize to the target RNA. Subsequently, they scatter light when the sample solution is placed onto a quartz waveguide slide and is excited with an evanescent wave. This assay enables highly sensitive quantification (approximately 102 copies/μL) of bacterial 16S rRNA and mRNA without reverse transcription and cDNA amplification within 10 min of RNA extraction. Moreover, this assay was three orders of magnitude sensitive than previously reported assays for direct RNA quantification.

研究分野：水環境工学

キーワード：センサ 病原体 水系感染症 核酸 簡易分析

### 1. 研究開始当初の背景

理系の大学を卒業した方なら誰しも細菌の測定をした事があるはずである。これが記憶に残るのは、シャーレを用いた細菌の測定に、培地の準備、サンプルの希釈、24 時間の培養、コロニーカウントなど、多大な労力を要するためであろう。PCR 法はこの概念を根本から変えた。サンプルから DNA を抽出し、DNA 合成酵素などの必要な試薬を添加し、DNA 複製装置で DNA を増幅することで DNA 濃度を測定する。新型コロナウイルスの検出ですっかり有名になった方法ではあるが、試薬や装置が高価であるため、インフルエンザ検査キットほどには臨床現場で普及していない。そこで、サンプルから抽出した核酸量を PCR 法によらずに測定するセンサーを開発することに心血をそそぐこととした。本研究では金ナノ粒子を修飾した DNA をプローブとして、光導波路にてナノサイズの領域で反応を起こし、さらに光シグナルを増幅させることで高感度に遺伝子を検出する。Storhoff ら (2004) はこの方法で多剤耐性黄色ブドウ球菌 (純菌) の遺伝子を検出した (参考文献) が、これ以降本技術は進展しておらず土木分野での適用例はない。

### 2. 研究の目的

本研究では PCR 法によらない病原体センサーを開発する。研究期間 (2 年間) では、金ナノ粒子が結合した DNA (DNA プローブ) と病原性遺伝子のハイブリダイゼーション (結合) 条件の最適化、センサーの高感度化、河川水中や下水中の病原体濃度の測定を行う。病原体の目標検出下限値を 1mL 中 100 個とする。

### 3. 研究の方法

角度を付けて切り取られた厚さ 1mm のガラス (光導波路) に可視光を照射する。入射光角度を臨界角以上に設定することで、入射光は光導波路内を全反射しながら進み、反対側から射出する。これが「光導波路」の名称の由来である。より屈折率の高い光導波路とより屈折率の低い水が接している界面において、波数の境界面に対する垂直成分が虚数になっている為に、1 波長 (可視光なので数 100nm) 程度の光が水溶液の内部に浸透する。この浸み出した光はエバネッセント光と呼ばれる。

光導波路表面に DNA プローブを滴下する (図 1 下)。エバネッセント光 (電磁波) は金ナノ粒子表面の電子の振動 (電磁波) と相互作用を起こす。これを局在表面プラズモン共鳴という。金ナノ粒子中の電子はエバネッセント光により励起され高エネルギー状態となり、基底状態に戻るときに光 (散乱光) が発せられる。単一の金ナノ粒子の散乱光は非常に小さいが、2 つの金ナノ粒子がナノメートルのオーダーで近接したとき電場が増強されることが知られている。電場増強は散乱光強度を著しく高めるので、近接する 2 つの金ナノ粒子の数が増えるほど散乱光強度は高まる (図 3 参照)。

本研究ではこの原理を利用し高感度の病原体センサーを開発する。検出したい病原体の遺伝子の PCR プライマーを参考にして、標的遺伝子内の近接する 2 カ所にのみ結合する 2 種類の DNA プローブを設計する。これをサンプルから抽出した標的遺伝子を含む液に 1 $\mu$ L 添加する。結合のため 10 分待ち、光導波路にこれを滴下し散乱光スペクトルを測定する。サンプル中に検出したい病原体が存在した場合にのみ、サンプルは強い緑色の散乱光を発する。散乱光スペクトルを解析し遺伝子濃度を測定する。

### 4. 研究成果

まず、光導波路 (LSEW) バイオセンサの測定条件を最適化した。金ナノプローブ中のオリゴヌクレオチドと金ナノ粒子 (AuNP) との間に挿入されたスペーサーの長さが、この研究で検討された主要なパラメータであった。これは、オリゴヌクレオチドと AuNP との間の距離が、金ナノプローブのハイブリダイゼーション効率および凝集に影響を及ぼす可能性があるためである。スペーサーはポリチミン塩基 (T<sub>n</sub>; n=チミン塩基数) で構成されていた。陽性対照 (POS) 試料の散乱光スペクトルは、約 540 nm にピークを示した (図 2 左)。チミン塩基 T25 以上のスペーサーを含む Au ナノプローブとハイブリダイズした POS 試料の散乱光強度 (SIs) は、170-185 の範囲であった (図 2 左)。対照的に、陰性対照 (NEG) 試料の SIs は約 50 であった。平均 SI は、450 から 650 nm の波長範囲で計算された。チミン塩基 T25 以上のスペーサーを含む Au ナノプローブとインキュベートした POS 試料の平均 SIs は、150-165 であった (図 2 右)。反対に、NEG 試料の平均 SIs

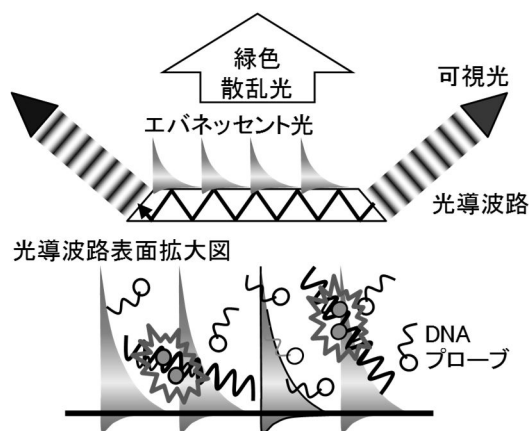


図 1 本センサーの検出原理の概念図

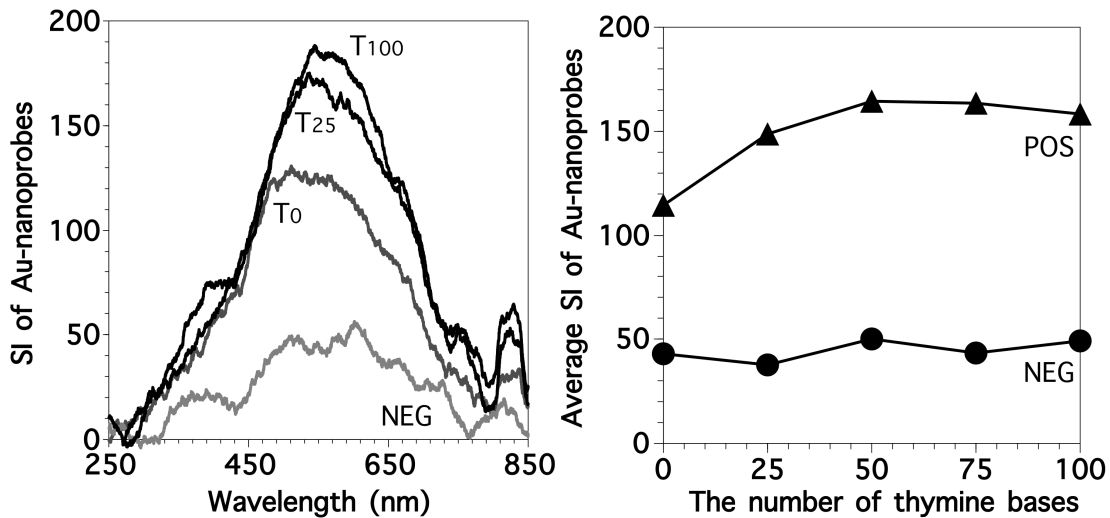


図 2

は約 40 であった。POS および NEG 試料の平均 SIs の差は約 110 であった(図 2 右)。これらの値は、チミンSpacerを欠く Au ナノプローブの値(72)よりも高かった。特に、SIs の差はアッセイの感度に対応していた。したがって、T50 は最適なSpacer長と考えられた。実際、より長いSpacerは、金ナノプローブ中のオリゴヌクレオチドが標的 RNA と容易にハイブリダイズすることを可能にし得る。

次に、Au ナノプローブの濃度が SI に及ぼす影響を検討した。437 pM および 875 pM の Au ナノプローブの平均 SI は、試料 RNA 濃度にかかわらず、249 pM の Au ナノプローブの平均 SI よりも高かった(図 3)。これは、高い Au ナノプローブ濃度が Au ナノプローブと標的 RNA との間のハイブリダイゼーションの確率を増加させることを示した。Au ナノプローブ濃度はアッセイのコストに直接影響するので、Au ナノプローブの 437 pM 濃度は、我々の実験条件において効率的な hybridization に最適であると考えられた。

二価陽イオンが核酸骨格中に存在するリン酸基の負電荷を中性化し、オリゴヌクレオチドの核酸とのハイブリダイゼーションを容易にすることは十分に確立されている(参考文献)。そこで、我々は、SIs に対するマグネシウムイオン ( $Mg^{2+}$ )濃度の影響を調べた。平均 SI は、POS 試料の  $Mg^{2+}$ 濃度の増加とともに増加し、1.5 mM の  $Mg^{2+}$ で最も高い SI が観察された(図 4)。しかし、NEG 試料の平均 SI は、2.5 mM の  $Mg^{2+}$ の存在下でのみ増加した。これは、負に帯電した Au ナノプローブの凝集が増加したためである可能性が高い。POS 試料と NEG 試料の平均 SI の差は、1.5 mM の  $Mg^{2+}$ で最も高かった。この差はアッセイ感度に対応するので、我々の実験には 1.5 mM の  $Mg^{2+}$ が最適であると考えた。

従来、標的 RNA およびハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを加熱することは、任意の二次構造を切断し、hybridization 効率を増加させるために必要である。予想されたように、POS 試料の平均 SIs は、温度が 37°C から 95°C まで 30 秒の増分で増加したときに増加した(図 5)。対照的に、NEG 試料の平均 SIs は、POS 試料のそれよりも有意に低かった。これは、サンプルの加熱が、ハイブリダイズしていない Au ナノプローブの光散乱特性に影響を与えないことを示した。しかし、これらの試料間の SIs の差は、アッセイ感度に対応するので、我々は、試料を 95°C で加熱することが必要であると判断した。

アッセイパラメータを最適化した後、LSEW バイオジェンサーを用いてアンモニア酸化菌(AOB)の 16S rRNA 濃度を測定した。試料の散乱光スペクトルは約 540 nm にピーク SI を示した

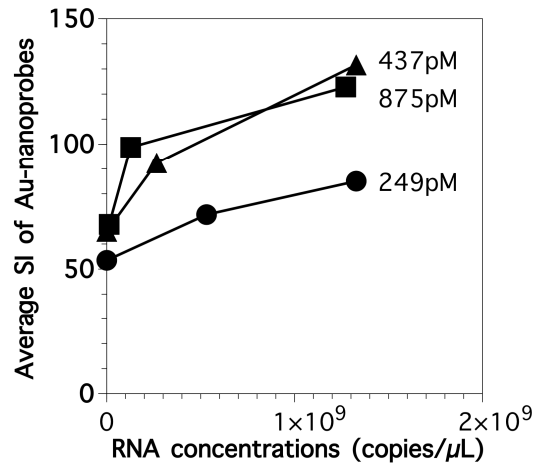


図 3

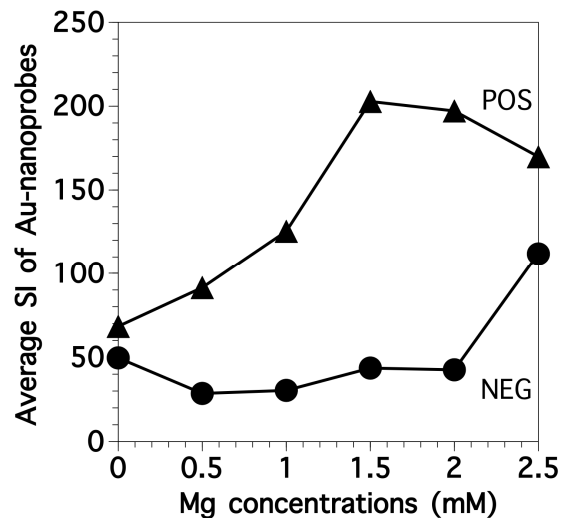


図 4

が、SI は標的 RNA 濃度の低下とともに減少した(図 6 左)。続いて、qRT-PCR を用いて決定した RNA 濃度に対して平均 SI をプロットした(図 6 右)。相関式は、 $4.0 \times 10^1 \sim 4.0 \times 10^6$  コピー/ $\mu\text{L}$  の RNA 濃度に対して、べき関数  $y=15.6 \times 0.14(R^2=0.991)$  であった。

予想に反して、NEG 試料の平均 SI は  $<4.0 \times 10^2$  RNA コピー/ $\mu\text{L}$  よりも高かった。これは、NEG 試料中の凝集した Au ナノプローブが、RNA 含有試料中の導波管スライドを覆う非標的 RNA が存在しなかったために、エバネッセント波および散乱光によって励起されたという事実起因する可能性がある(図 1)。この仮説は、NEG 試料に DNA(T48)を添加し、再び SI を測定したときに証明された。T48 を添加していない NEG 試料の平均 SI は 380 であったが、 $6.0 \times 10^3$  コピー/ $\mu\text{L}$  の T48 を含有する NEG 試料の平均 SI は 122 で有意に減少した(図 7)。NEG 試料中の T48 濃度のさらなる増加は、SI のさらなる減少をもたらした。したがって、我々は、NEG 試験試料中の合成ヌクレオチド(例えば、T48)の添加を、その SI を減少させるために改善する。

試料によって散乱された光の色は、裸眼で見ることができた(図 8 左)。水晶導波管スライド上にスポットされた NEG 試料の  $1\mu\text{L}$  のアリコートは、オレンジ色の光を散乱した。対照的に、POS 試料は緑色の光を散乱した。興味深いことに、両方の試料を乾燥させると、散乱光の色と強度が変化した。例えば、乾燥した NEG および POS 試料は、それぞれ、非常に強い赤色および黄色の光を散乱した。特に、乾燥した POS 試料の SI は、湿った POS 試料の SI よりも 4 倍高く、それによってアッセイ感度が改善された(図 8 右)。さらに、乾燥した試料は、湿った試料よりも安定した信号を放出した。可能であれば、evanescent 波場における Au ナノプローブの濃度は、試料の乾燥時に増加した。さらに、乾燥および湿った NEG 試料は、POS 試料と比較して、散乱光スペクトルにおいて、より長い波長の肩を有するより広いバンドを有した。これは、NEG 試料によるオレンジ色または赤色の光の散乱を説明した。

さらに、LSEW バイオセンサーを用いて、腸管出血性大腸菌の表面への付着に必要なタンパク質であるインチミンをコードする *eae* 遺伝子の mRNA を定量した。AOB を用いた我々の結果と同様に、この mRNA の平均 SI は、RNA 濃度が  $1.2 \times 10^5$  コピー/ $\mu\text{L}$  から  $1.2 \times 10^2$  コピー/ $\mu\text{L}$  に減少するにつれて減少した(図 9)。NEG 試料の平均 SI は、RNA 濃度が  $1.2 \times 10^1$  コピー/ $\mu\text{L}$  の場合よりも高かったが、我々の方法は、病原性細菌における病原性遺伝子の mRNA を定量することに成功した。

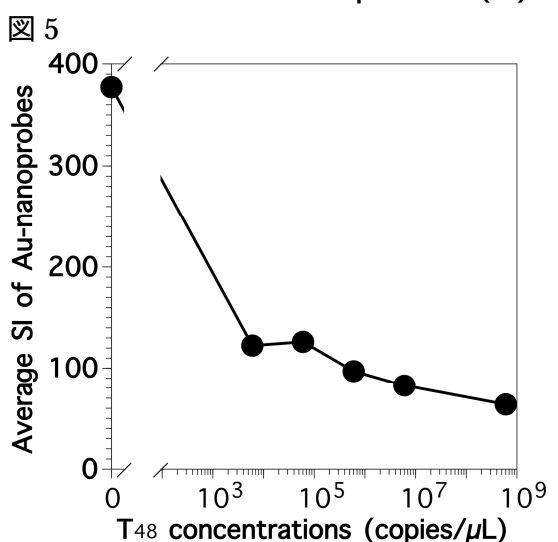
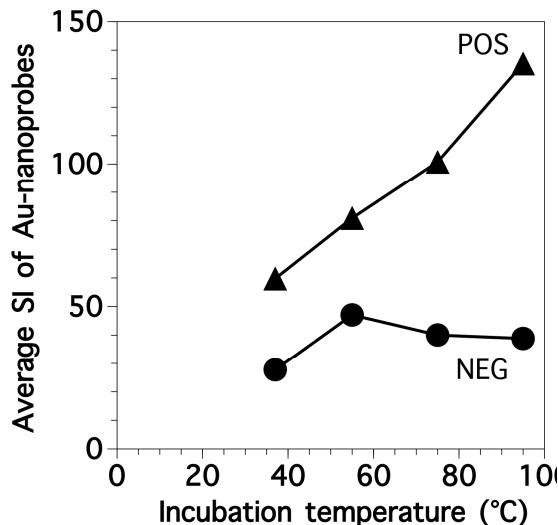


図 7

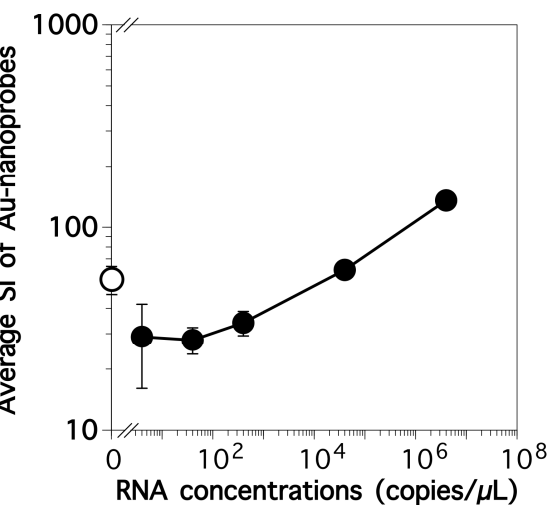
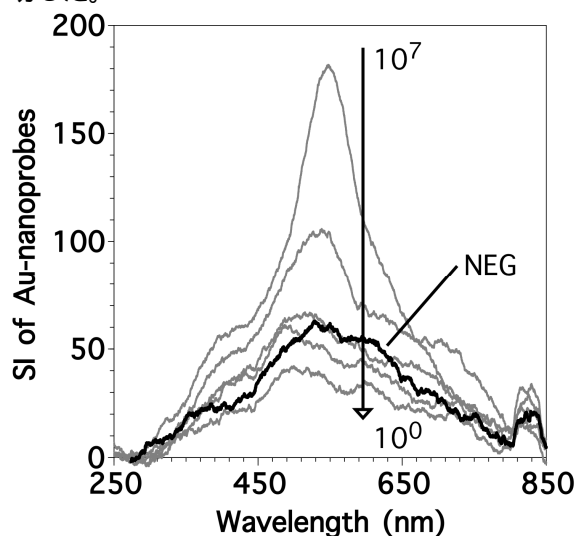


図 6



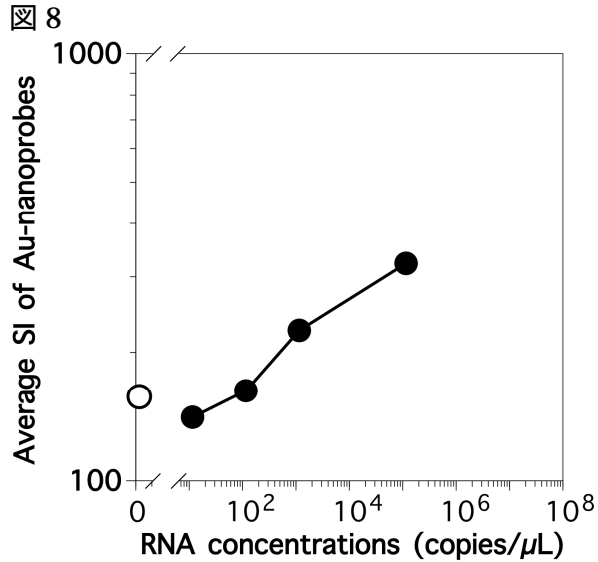
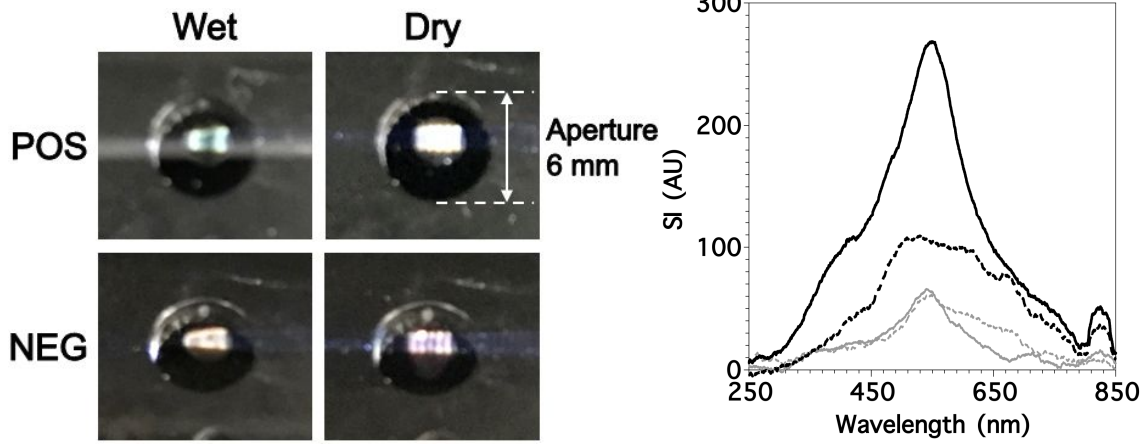


Figure 9

< 引用文献 > \_

Storhoff, J. J.; Lucas, A. D.; Garimella, V.; Bao, Y. P.; Müller, U. R. *Nature Biotechnology* 2004, 22 (7), 883–887.

Srivastava, A.; Timsina, R.; Heo, S.; Dewage, S. W.; Kir-mizialtin, S.; Qiu, X. *Nucleic Acids Research* 2020, 48 (13), 7018–7026.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Matsunaga Koji, Satoh Hisashi, Hirano Reiko	4. 巻 1
2. 論文標題 Development of the simple analytical method for determination of arsenate(V) ion using fluorescence-labeled DNA and cerium oxide nanoparticles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Water Supply	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2166/ws.2022.148	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中島芽梨, 平野麗子, 中屋佑紀, 佐藤 久
2. 発表標題 金ナノ粒子プローブを用いた環境中の病原体の検出
3. 学会等名 第56回日本水環境学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島芽梨・中屋佑紀・佐藤久・平野麗子・高橋浩三
2. 発表標題 光導波路分光装置を用いた高感度簡易核酸モニタリング法の開発
3. 学会等名 第 58 回環境工学研究フォーラム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Meri Nakajima, Hisashi Satoh
2. 発表標題 Simple assay for spectroscopic quantification of 16S rRNA of ammonia oxidizing bacteria using DNA-modified gold nanoparticles
3. 学会等名 International Conference on the challenges in Environmental Science and Engineering (CESE 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北大 佐藤久研究グループ  
<https://www.eng.hokudai.ac.jp/labo/aqua/contents/HisashiSato/index-HisashiSato.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
--	---------------------------	-----------------------	----

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