

(報道資料提供)

平成 28 年 12 月 6 日 (火) 提供

大阪科学・大学記者クラブ 様

お問い合わせ先
公立大学法人大阪府立大学 理学系研究科物理科学専攻 准教授 飯田琢也 工学研究科応用化学分野 准教授 床波志保 Tel: 072-254-8132 Fax: 072-254-8132 e-mail: t-iida@p.s.osakafu-u.ac.jp tokonami@chem.osakafu-u.ac.jp

～より速く、精度の高い遺伝子検査の実現に期待～

## DNA の二重鎖形成を「光」で加速する新原理を世界に先駆けて解明

大阪府立大学 (学長: 辻 洋) キープロジェクト(※)の研究チーム (飯田 琢也 准教授、床波 志保 准教授、西村 勇姿 大学院生ら)は **レーザー照射によって、わずかzeptomol(約600個)のDNAとナノ粒子の表面に修飾したDNAが二重鎖を形成するプロセスを加速し、光学顕微鏡で観測可能なサイズ(約0.1ミリメートル)のマクロな集合体を数分程度で形成**できることを世界に先駆けて解明しました。

(※)大阪府立大学キープロジェクト:2016年6月に大学が認定した、大学のプレゼンスを高め、その顔となる4つのプロジェクト

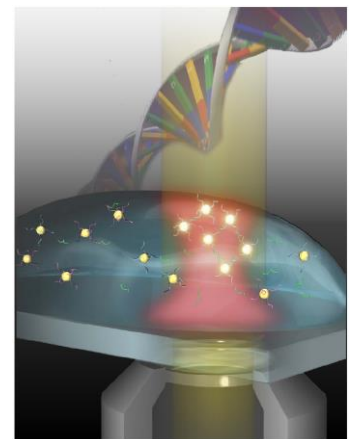
### 研究成果のポイント

1. DNAの二重鎖形成をレーザー光照射により加速できる新原理を解明
2. たった2分程度の光照射で、わずか5zeptomolのDNAから光学顕微鏡で観測可能な約0.1ミリメートルの集合体形成に成功
3. 塩基配列の違いによって集合体形成の速度と光吸収特性が敏感に変化することを解明

レーザー光照射による集合現象を利用し、ナノ粒子表面に修飾した一本鎖DNAと浮遊状態の一本鎖DNAの衝突確率を高めることで、二重鎖形成プロセスを加速できることを解明しました(特許出願中:PCT/JP2014/064496)。

従来、フェムトモル(約6億本)程度のDNAを検出するのに数時間を要していましたが、本研究で得られた原理を利用すれば、**わずか数分で100万分の1に当たるzeptomolオーダーの微量のDNAの二重鎖形成から0.1ミリメートルに迫るマクロな集合体を形成して検出**できるため、遺伝子検査の飛躍的な迅速化、および高感度化が期待できます。将来的には、予防医療(遺伝子疾患や悪性新生物・成人病などの遺伝子検査時間の短縮)や食品の遺伝子検査の簡素化など、21世紀の重要課題の革新に貢献する成果といえます。

なお、本研究成果は英国Nature Researchの論文誌である『Scientific Reports』にオンライン公開されました。



研究論文名: Submillimetre Network Formation by Light-induced Hybridization of Zeptomole-level DNA (zeptomol・レベルのDNAの光誘起ハイブリダイゼーションによるサブミリメートル・ネットワーク形成)

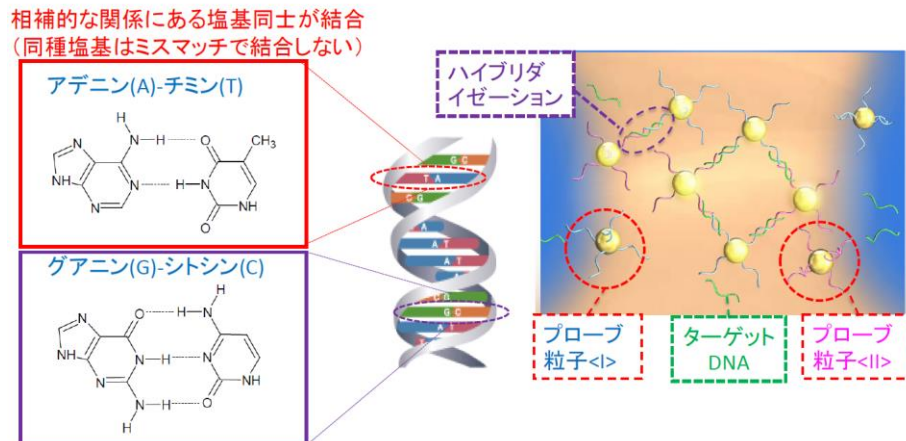
著者: 飯田琢也<sup>1,2\*,#</sup>, 西村勇姿<sup>1,2,#</sup>, 田村守<sup>1,2</sup>, 西田敬亮<sup>2,3</sup>, 伊都将司<sup>4</sup>, 床波志保<sup>2,3\*,#</sup>,  
<sup>(1) 大阪府立大学大学院理学系研究科, <sup>(2) 大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター,</sup>  
<sup>(3) 大阪府立大学大学院工学研究科, <sup>(4) 大阪大学大学院基礎工学研究科)</sup></sup></sup>

公表雑誌: Scientific Reports (英国Nature Researchの科学論文雑誌)

公表日時: 日本時間2016年12月5日(月)19時 (英国時間2016年12月5日10時)

# 1. 背景

図1: DNAの二重鎖形成の光誘導加速のアイデア



超高齢化社会における予防医療への要求の高まりから、遺伝子疾患や悪性新生物(がん)、成人病などの遺伝子レベルでの検査も重要視されており、DNAやタンパク質などの生体ナノ物質を短い時間で被験者に負担をかけずに検査する技術が医療分野で切望されています。また、近未来の超スマート社会のセルフケア医療や遠隔医療においても、低コスト・コンパクトな検査技術が要となると考えられており、DNAを対象とした遺伝子検査の迅速・高感度化が必要不可欠です。また、近年の輸出入の自由化の問題、新興国での産業活動の急伸による環境汚染などの問題などに伴い、大量の食品の産地や安全性のハイスループットな検査技術が食品メーカーや税関で切望されており、遺伝子レベルでの検査の需要も益々高まると考えられています。これらの検査のため、生体由来の化学物質が持つ分子認識機構(解説1)と呼ばれるメカニズムを利用して、検出対象物質を選択的に検出するバイオセンサに関する研究が盛んにおこなわれています。DNAを対象とした先行技術としては、例えば、DNAチップなどが挙げられますが、最新のキットでも前処理を含めて検出時間に数時間を要する場合があります。また、蛍光染色法は高度な前処理が必要で試薬や装置が高価という問題があり、ELISA法も確立された簡便な方法ではありますが、検出に要する時間は長く多量の検体が必要という問題があります。

一方、これまで、光物性物理も専門とする飯田らは、金属ナノ粒子(解説2)をレーザー光がおよぼす光誘起力(解説3)により高密度に集合化することで、粒子中の電子が光電磁場を介して相互作用して光応答スペクトルが広帯域化して長波長側にシフトすることを理論的に予言していました。また、分析化学を専門とする床波らはDNAを表面修飾した金属ナノ粒子に検出対象となるDNAを添加することで、上述の分子認識機構により各DNAの間の相性(相補性)が良い時に選択的に二重鎖形成が起こり、大きな集合体の形成と電気特性の大幅な変化が得られることを利用して塩基配列の違いを検出できることを実験的に示していました。これら異分野の研究者らの技術と知識を融合し、プローブ粒子とターゲットDNAを混合した溶液にレーザー照射して光誘起力で濃縮すれば、集合現象とスペクトルの変化を通じて微量のターゲットDNAでも短い時間で検出できるはずとの着想の下で本研究を行いました(図1)。

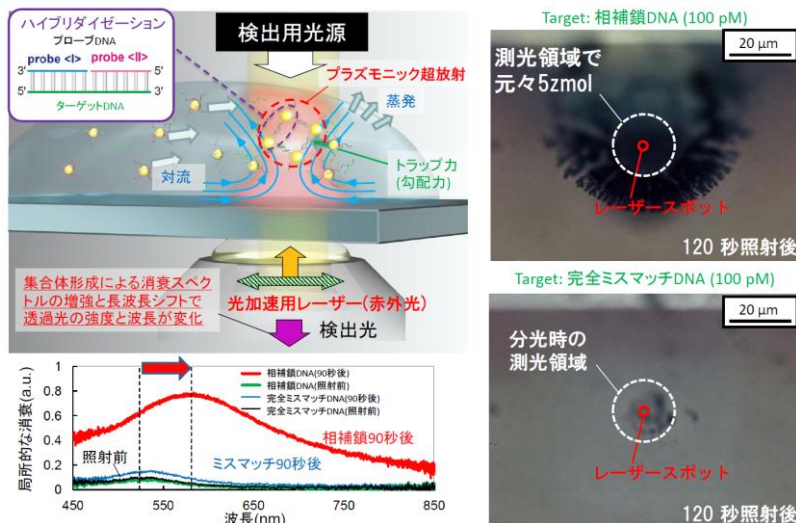
## 2. 研究方法

図1のようにDNAは4種類の塩基（アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、シトシン(C)）から成る鎖状構造をしており、A-TおよびG-Cの組合せが相補性が高いため分子認識機構により選択的に結合して二重鎖形成(ハイブリダイゼーション)をすることが知られています。また、同じ種類の塩基は相補性が低くミスマッチとなることが知られています。本研究では、末端にチオール基を付けた12塩基で長さ4.08 nm（ナノメートル）の1本鎖DNAを表面に化学修飾した直径30 nmの金ナノ粒子をプローブ粒子<1>とし、その末端の化学構造が反転した同じ長さの1本鎖DNAを修飾した同サイズの金ナノ粒子をプローブ粒子<2>とし、各々をリン酸緩衝液に分散して用いました（ナノメートルは100万分の1ミリメートル）。これらのプローブ粒子<1>および<2>の各分散液と検出対象となる1本鎖のターゲットDNA（24塩基）の分散液をガラス基板に滴下・混合して十分に拡散するのを待ってから、高倍率の対物レンズで強く集光した赤外レーザーを照射してプローブ粒子表面の1本鎖DNAとのハイブリダイゼーションの制御を試みました。

ここでは、全ての塩基がプローブ粒子<1>,<2>の表面のDNA（ここでは12塩基全てがT）と相性が良く強く結合する「相補鎖DNA」（24塩基全てがA）、全てが同種で結合し難い「完全ミスマッチDNA」（24塩基全てがT）、半分（12塩基）ずつミスマッチとなった「半分ミスマッチ」、1塩基ずつ交互にミスマッチとなった「交互ミスマッチ」の4種類のターゲットDNAを用いた場合の結果を紹介します(論文中では実用上大切なランダムな塩基配列の場合の実験結果も紹介しています)。

## 3. 研究成果

図2: 気液界面でのDNA二重鎖形成の光誘導加速の実験結果



試行錯誤を重ねた結果、液滴の表面近傍にレーザーを集光すると効率良くプローブ粒子とターゲットDNAがハイブリダイゼーションして、100 pM（ピコモラー）という希薄な濃度（今回使用した5マイクロリットル全体で約3億本）の相補鎖DNAの分散液を用いた場合でも、わずか**2分程度で0.1ミリメートル程度の大きさのネットワーク状の集合体を形成**できることを解明しました(図2)。一方で、同じ濃度の完全ミスマッチDNAを用いた場合には大きな集合体は得られず、塩基配列の違いが光照射による集合現象にも影響を及ぼすことを確認しました。また、破線で囲まれた領域を透過した白色光の変化量を表わす**光学的なスペクトル(局所的な消衰)**を測定し、波長の関数としてプロットしたところ相補鎖DNAを添加した場合のみ数分程度で理論的予言と同様の大幅な広帯域

化と長波長シフトが観測されました。レーザー照射前にこの測光領域に存在していたDNAの数は上記濃度から約5zeptomolと見積もられ、**極微量のDNAの二重鎖形成を引き金にわずか数分で光学顕微鏡で十分観測できる大きさの集合体形成ができる**ことを解明しました。同じ濃度のプローブ粒子とターゲットDNAの混合液を遠沈管と呼ばれる容器の中で3時間静置しても自然には顕微鏡で観測できる大きさの集合体を得られないことも確認しており、**極めて迅速にマクロな集合体を形成できることを示した画期的な成果です(光照射無しで液滴の表面近傍において図2と同様のサイズに成長させるには1万倍以上の濃度のターゲットDNAと20分程度の時間が必要です)**。

図3は「研究方法」で述べた4種類のDNAをターゲットとして用いて、塩基配列の違いによってレーザー照射下での集合体形成や光学スペクトルがどのように変化するかを調べた結果です。プローブ粒子表面のDNAと相補性が高いDNAを添加した場合ほど大きな集合体が形成し、光学スペクトルも大幅に変化することが分かりました。このような状況を研究者らが独自に開発した光誘起力と分子認識を同時に取扱える新しい理論手法を用いて解析した結果を図4に示しています。ここでは、ターゲットDNAとプローブ粒子表面のDNAの間の結合の強さを表す相補性の指標として「結合エネルギー」の大きさを変えてエネルギー的により低く安定な状態をランダムに粒子の配置を変化させて探索し、光照射下での集合体の空間配置と光学スペクトルの変化を調べました。図3と同様に、結合エネルギーが大きく相補性が高いほど集合体を形成し易く長波長シフトと広帯域化が顕著となりますが、結合エネルギーが小さくなり完全ミスマッチに近づくると集合体は形成し難くなり光学スペクトルの変化は小さくなります。また、ここで示した光誘起力の影響と分子認識の効果のみを考慮した理論計算では偏光に平行な方向に伸びた集合体が形成することが分かりました。一方で、実験で得られた集合体はレーザースポットを中心に放射状の広がりを示しています。このような理論と実験の整合性と不一致は、光がプローブ粒子に及ぼす電磁気学的な相互作用による光誘起力だけでなく、集合したプローブ粒子の光発熱効果(解説4)によって生じた対流が大きな集合体形成に重要な役割を果たすことを示唆しています。これらの結果は光により加速された二重鎖形成を通じて**塩基配列の違いも検出できる**可能性を示しており遺伝子検査において極めて重要な成果です。

図3: DNA二重鎖形成の光誘導加速の塩基配列依存性

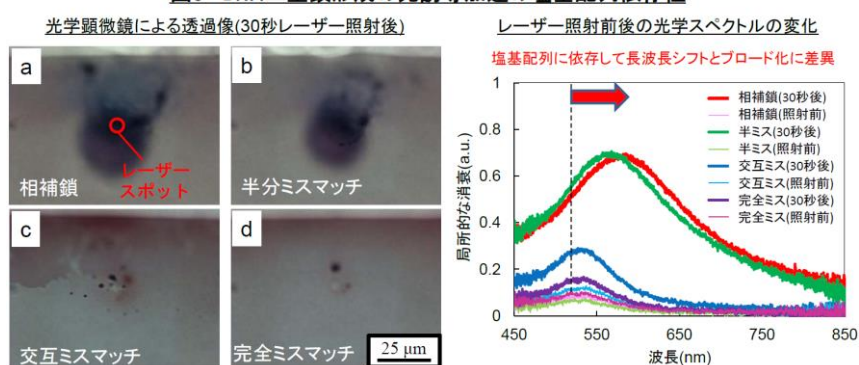
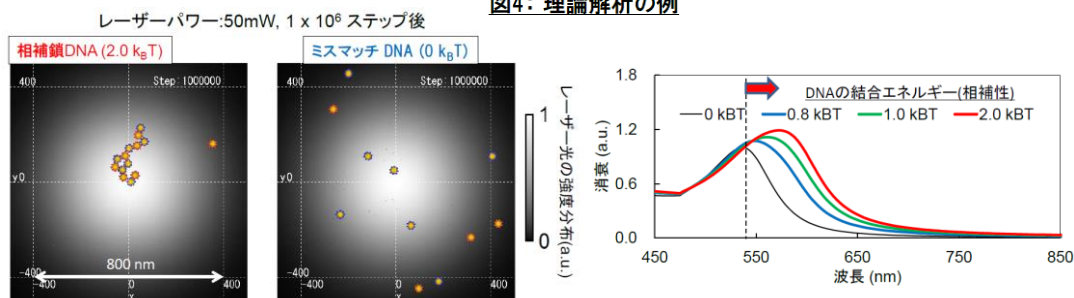


図4: 理論解析の例



なお、本研究は、生体光物理を専門とする飯田琢也 准教授と分析化学を専門とする床波志保 准教授が共同で研究計画のデザインを行い、その主導の下、大学院生の西村勇姿 特別研究員（大阪府立大学生体光物理グループ）が実験の大部分を担当し、同所属の田村守 特認助教が理論解析の大部分を担当して遂行されました。また、光物理化学を専門とする伊都将司 准教授（大阪大学基礎工学研究科）の光学系全般に関する技術指導と、西田敬亮 氏（平成25年度床波研修士）の試料作製技術に関する技術指導の下で実施されたものです。

## 4. 今後への期待

今回、DNAにおける分子認識機構を光で制御することができることを解明し、ナノスケールの生体分子が選択的に結合するプロセスをレーザー光で加速することでマクロな集合体を形成できることを示しました。この成果はDNAのハイブリダイゼーションだけでなく、生体の防御反応で重要な役割を果たす抗原-抗体反応など多種多様な生体分子の選択的な結合を光で制御する全く新しい次世代バイオフォトンクス基礎を成すものと言って過言ではありません。また、光物性物理や分子細胞生物学、医療科学の革新につながる学術的にも重要な成果であると同時に、ボトムアップ的なナノ製造技術にも新しい選択肢を与えるものと期待されます。特に、**図5**のように、より身近な応用例として、医療機関で採取する血液等のサンプル量と検査に要する時間の大幅な削減、大量の野菜・果物や食肉などの輸入食品の産地検査や放射線が魚介類などに遺伝子レベルで与える影響評価など、持続可能な社会における安全・安心や健康長寿のための課題解決に役立つため、極めて高い波及効果を示すものと言えます。

今後の課題として、より低濃度のDNAの二重鎖形成を様々な混合物が存在する状況で光により加速するための条件探索や、多種多様な生体関連物質を対象とした実証実験や、システム開発のための継続的な研究が必要不可欠と考えられます。



## 5. 研究助成資金等

本研究は、大阪府立大学キーププロジェクト、文部科学省 若手研究者の自立的な研究環境整備促進「地域の大学からナノ科学・材料人材育成拠点」プログラム（大阪府立大学）、科学技術振興機構研究成果展開事業（先端計測分析技術・機器開発プログラム）「生体分子認識の光加速システム開発のための調査研究」、キヤノン財団、中谷医工計測技術振興財団、日本学術振興会 科学研究費補助金基盤研究（B）（No. 26286029, No. 15H03010, 16H03827）、挑戦的萌芽研究（No. 24654091, No.15K14697）、若手研究（A）（No. 24685013）、特別研究員奨励費（No. 15J09975, No. 14J08760）、および新学術領域（提案型）「光圧によるナノ物質操作と秩序の創生」（No. 16H06507, No. 16H06505）、その他の支援を受けて完成しました。

## 6. 用語解説

**解説1：分子認識機構**：例えば、水素結合、金属配位相互作用、疎水性力、分子間力、 $\pi$ - $\pi$ 相互作用、ハロゲン結合、静電気力などの非共有結合的な比較的弱い相互作用によって、ホスト分子（本研究のプローブ粒子表面のDNAに相当）およびゲスト分子（本研究のターゲットDNAに相当）が高い相補性を示して選択的に結合する機構のことを指します。生命活動において重要となるDNAやRNAなどの核酸のハイブリダイゼーションや、タンパク質に関する抗原-抗体反応などが挙げられ「鍵と鍵穴モデル」でしばしば説明されます。このような性質を利用してプローブとなるホスト分子をあらかじめ仕掛けることでターゲットとなるゲスト分子との特異的な（選択的な）結合過程を電氣的、光学的な信号の変化を通じて検出できるため、分子認識機構は生体関連物質を検出する様々なタイプのバイオセンサ技術に利用されています。

**解説2：金属ナノ粒子**：典型的には金属から成る100ナノメートル（nm：ナノメートルは100万分の1ミリメートル）以下のサイズの粒子を指します。金属はその内部を電子が自由に走り回ることができるため高い導電性を示すことは良く知られています。一方で、このような自由電子がナノサイズ物質の表面に強く束縛されます。このような表面に束縛された自由電子の状態を「局在表面プラズモン」と呼びます。局在表面プラズモンの共鳴波長は金属ナノ粒子のサイズや形、粒子間の相互作用に応じて敏感に変化します。このため、例えば、500～600ナノメートルに共鳴波長を有する金ナノ粒子の溶液は、サイズに応じて共鳴波長の補色（緑色～赤橙色）である赤色～青色に変化します。

**解説3：光誘起力**：光が物質に及ぼす電磁気学的な力の総称です。例えば、直進するレーザー光を物質に照射すれば押す力を与えることができ、レンズで強く絞ったレーザー光の強度の強いスポット付近に物質を捕捉ことができ、光ピンセットにも利用されています。それぞれのタイプの力は基本的には散逸力と勾配力に分類でき、前者の散逸力は、光散乱や光吸収などのエネルギー散逸を伴う過程で、光の運動量が物質に乗り移った時に生じる押す力に相当します。一方、後者の勾配力は光が電磁場の性質を有することに起因する力で、特に不均一な強度分布を有する光場中に置かれた物質が電磁気学的なポテンシャル勾配を感じてその安定位置に押しやられる時に生じる力として理解できます（複数のレーザー光を干渉して生じた光定在波の周期的な光強度の高い山の部分に物質を引き寄せる力も勾配力に分類されます）。この他、

物質間の距離が光の波長以下になると照射する光の偏光や波長に応じて磁石のように引力・斥力が切り替わる「物質間光誘起力」もナノ粒子をボトムアップ的に集積する際には重要となります。

**解説4：光発熱効果**：物質が光を吸収した際に局所的に発生する熱の効果を指します。この光発熱効果により発生した対流やバブルなどの光が誘起する流体効果を利用して対象とするナノ物質やマイクロ物質を集合させることができ、光発熱集合法として近年盛んに研究が行われています。例えば、本研究で示したように分散した金属ナノ粒子を光発熱集合法により集合化することで光発熱効果が高まり、対流による集合効果をさらに高めることが可能です。