

## 生体ナノポアを用いた核酸検出と DNA 演算技術との融合による診断応用

滝口創太郎、竹内七海、川野竜司  
東京農工大学  
rjkawano@cc.tuat.ac.jp

### 1. はじめに

ナノポア計測は、ナノサイズの孔を通過した分子を電氣的に計測する高感度な一分子検出法である。ここで用いるナノポアには、ポア形成膜タンパク質である生体ナノポアと、ナノ微細加工により人工的に作製する固体ナノポアがある。特に生体ナノポアに関しては、1996年に核酸の一分子検出が報告されて以来<sup>1)</sup>、DNA シーケンスへの応用に向けた研究が行われ、2015年にはナノポア DNA シーケンサが実用化された<sup>2)</sup>。核酸検出に優れた生体ナノポアの応用先は幅広く、その一つに病理診断におけるバイオマーカー核酸検出がある。本稿では最近筆者らが取り組んでいる、塩基配列の人工設計によりプログラムされた核酸分子の自律的な情報処理 (DNA コンピューティング) と生体ナノポア計測による核酸検出を組み合わせた次世代のバイオマーカー検出技術について概説する。

### 2. 生体ナノポアを用いた DNA 演算情報の復号化

まず初めに、DNA 分子を用いた情報処理技術である DNA コンピューティング (DNA 演算) について紹介したい。DNA の配列特異的な結合能を利用して自律的な計算を実装する DNA 演算は、1994年に Leonard M. Adleman が提唱した<sup>3)</sup>。情報科学者である Adleman は DNA 分子を「計算素子」として捉え、塩基配列を緻密に人工設計することで数学的な問題 (有向ハミルトン閉路問題) を解いてみせた。これに追随して論理演算やストレージ、ニューラルネットワークなど DNA 分子を用いた計算・情報処理に関する幅広い研究が展開されてきた。これらの研究では、計算における入力情報を DNA の塩基配列として自由に設計できる一方で、DNA 分子に符号化された出力情報は人間の目に見える形に変換して解読する必要がある。

この復号化ステップには、これまで核酸増幅 (PCR) や電気泳動、ラベリングによる蛍光検出が用いられてきた。これらの操作は時間と手間がかかる上に、出力分子やその情報を次の入力として扱いづらいという課題があった。

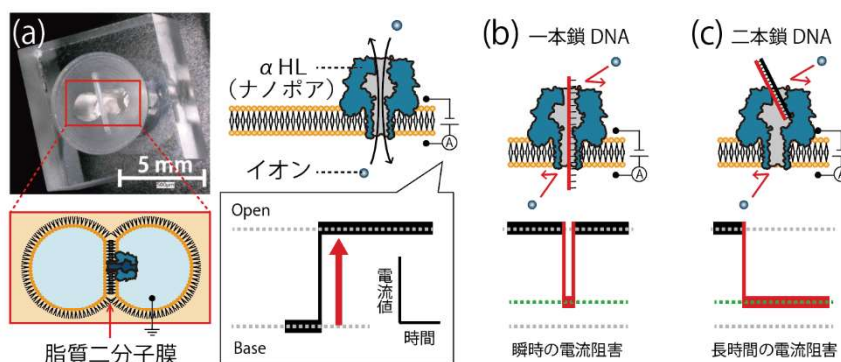


図 1. (a) マイクロデバイスを用いた生体ナノポア計測のイメージ図  
(b) 一本鎖 (c) 二本鎖 DNA を検出した際の電流阻害シグナル

核酸分子を迅速・電氣的・ラベルフリーに検出できる技術としてナノポア計測がある。本項では我々が開発してきた、マイクロデバイス中の二つの液滴界面に安定的な脂質二分子膜を形成させ、そこにポア形成膜タンパク質を再構成する生体ナノポア計測法とその応用について概説する<sup>4)</sup>。生体ナノポア計測では、脂質二分子膜の両側に電圧を印加することで、ナノポアを通過したイオンを電流値として計測する(図 1a)。印加電圧下で電気泳動により分子がナノポアの中を通過すると、その間はイオンの流れが阻害されるため、一分子の通過を電流阻害シグナルとして観測できる。ここで用いる黄色ブドウ球菌由来の生体ナノポア  $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ HL) は直径が 1.4 nm であり、一本鎖 DNA (直径約 1 nm) はナノポアを通過できるが、二本鎖 DNA (直径約 2 nm) はポア直径よりもサイズが大きいためナノポアを通過できずに狭窄部で詰まる。この分子挙動はそれぞれ瞬時(図 1b) / 時間の長い(図 1c) 電流阻害シグナルとして観察される。このように DNA の構造情報を電気シグナルとして検出できる生体ナノポア計測の利点に着目し、我々は緻密な塩基配列設計により DNA 演算の出力情報を DNA の高次構造に落とし込むことで、ナノポア計測による電氣的・ラベルフリーな復号化が可能になると考えた。

はじめに入出力の情報を“0”、“1”で扱うシンプルな DNA 論理演算 (NAND 回路) の実装とナノポア計測による復号化に取り組んだ<sup>5)</sup>。出力情報としての DNA 分子がポアを通過可能な一本鎖もしくはポアに詰まる二本鎖を形成するよう、入力 DNA を配列設計した。これにより、ナノポア計測で得られる電流阻害から出力“0”、“1”を容易に見分け(図 2a)、演算から復号化までを約 10 分で実装した。次に、より高度な情報処理として酵素反応を組み込んだ AND 回路の実装と復号化に取り組んだ<sup>6)</sup>。出力“1”として転写反応により一本鎖 RNA が増幅される分子反応系を設計することで、RNA が示す電流阻害シグナルの頻度から出力“1”の検出を可能にし、約 1 時間での情報処理に成功した(図 2b)。さらに最近、DNA 演算のバイオニクス的研究である並列計算に関してナノポア計測による復号化に取り組んだ<sup>7)</sup>。実際には Adleman が報告した有向ハミルトン閉路問題を計算する DNA 演算 (巡回セールスマン問題のように各都市を一筆書きで巡回できる経路を探索する組み合わせ最適化計算) の復号化を目指した。ここでは出力 DNA の構造として二本鎖領域に加えて一本鎖領域を付加した。これにより出力 DNA は一本鎖領域からナノポアに入り、印加電圧下で結合した相補鎖を解離しながらゆっくりとナノポアを通過

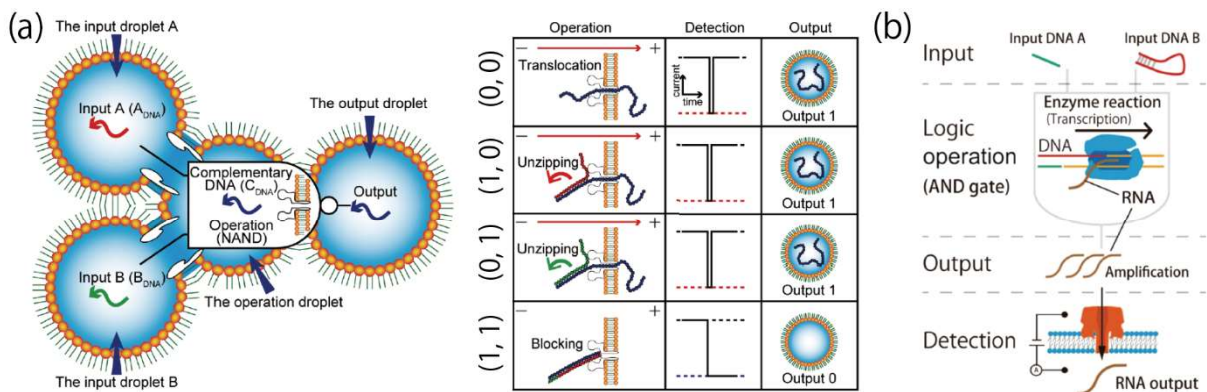


図 2. (a) DNA 分子による NAND 回路の実装と生体ナノポア計測による電氣的復号化<sup>5)</sup> (b) より高度な情報処理として酵素反応を組み込んだ AND 回路の実装と生体ナノポア計測による復号化<sup>6)</sup>

できる (図 3)。この通過時間は、ナノポア計測において電気シグナルの阻害時間に変換される。そこで二本鎖 DNA の結合力 (熱力学的な安定性:  $\Delta G$ ) と阻害時間 (通過時間) が相関することを利用して塩基配列設計を行うことで、電流阻害時間の統計解析により出力情報を復号化することに成功した (図 3)。以上より、我々が開発してきた生体ナノポア計測法を用いることで様々な DNA 演算の出力情報を電氣的・ラベルフリーに復号化できることを示した。また DNA 演算情報を電気信号へと変換可能なナノポア計測は、DNA 演算と従来の半導体型コンピュータの橋渡しになると期待できる。

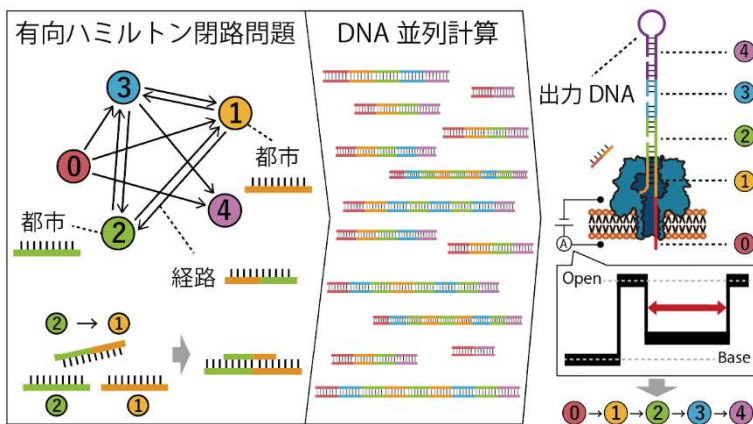


図 3. 有向ハミルトン閉路問題を解く DNA 並列計算とその塩基配列デザイン、およびナノポア計測による出力情報の復号化

### 3. MicroRNA を標的とした病理診断への応用

DNA 演算は前述のような情報科学的研究に加えて、DNA 分子の生体親和性・配列設計の柔軟性を利用した医学的応用が期待されている。本項では最近我々が取り組んでいる、DNA 演算とナノポア計測の組み合わせを液体生検 (リキッドバイオプシー) に応用する研究を紹介する。標的としているバイオマーカー microRNA (miRNA) は 18-25 塩基の短鎖ノンコーディング RNA で、がんの早期診断マーカーとして注目されている<sup>8)</sup>。がん罹患すると早期に体液中で複数種類の miRNA 発現量が増減し、その発現パターンががん種特異的であることから、miRNA のパターン認識が早期診断・がん種の特定に重要である。我々は DNA 演算による自律的な情報処理が、この miRNA パターン認識に有用だと考えて研究に取り組んでいる。はじめに単純な系として 2 種類の miRNA (miR-20a, miR-17-5p) が発現上昇する小細胞肺癌に関して検討した<sup>9)</sup>。標的 miRNA を AND 回路における入力分子として利用し、ナノポア計測により出力情報を復号化する診断システムを構築した。ここでは 2 種類の標的 miRNA が存在する場合のみ 4-way junction (4WJ) 構造を形成するように診断 (計算) 用 DNA を配列設計した (図 4)。どちらの miRNA も存在しない場合、またはどちらか一方しか存在しない場合には 4WJ のような高次構造を形成しないため、核酸分子はナノポアを高速に

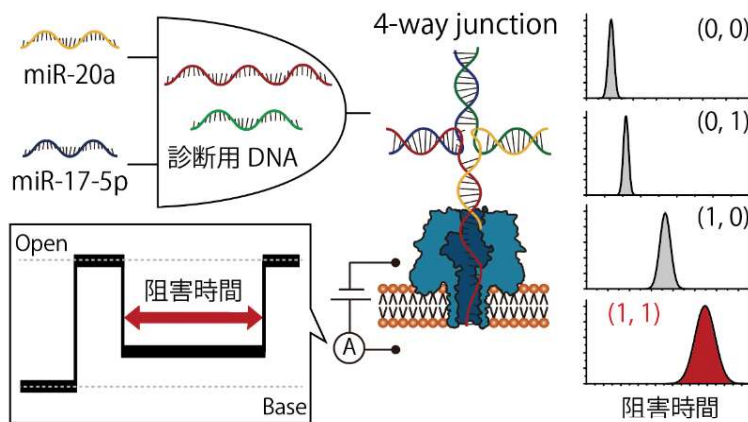


図 4. 診断用 DNA と 2 種類の標的 miRNA による AND 演算を用いた miRNA パターン認識と出力情報の復号化

通過し、瞬時の電流阻害シグナルが得られる。一方、2種類の miRNA が同時に存在する場合、4WJ のような高次構造はナノポアを通過できずに時間の長い電流阻害シグナルを示す。これにより miRNA の濃度が低い健康状態と、がん罹患し miRNA の発現量が上昇した状態を区別できた。さらに、我々は発現低下を含む miRNA パターン認識にも取り組んでいる。ここでは口腔扁平上皮がんにおいて血清中で発現上昇する miR-19a と発現低下する miR-5100 を標的として検討した。ナノポア計測による miRNA 検出では、標的 miRNA の発現量上昇に伴う電流阻害時間の増加を検出原理としているため、miRNA 発現低下パターンの認識は難しいとされてきた。そこで我々は Adleman の DNA 並列計算に使用された配列設計を応用して、発現上昇・低下を示す2種類の miRNA を同時に認識できる診断用 DNA を配列設計した。これにより DNA 演算の出力情報を溶液中に含まれる3種類の二本鎖分子(ナノポア計測で識別可能な異なる構造を持つ)の割合へと落とし込み、得られた電流阻害シグナルから各分子の存在比を定量することで miRNA の発現上昇・低下を含む4種類の発現パターンを識別することができた(論文準備中)。

#### 4. MicroRNA パターン診断システムの実検体を用いた検証と今後の展望

前項で紹介した手法により2種類の標的 miRNA のパターン認識に成功したが、実応用を考えるとより多くの種類を同時にパターン検出することが望ましい。そこで我々は、胆管がんで発現量が上昇する5種類の miRNA (miR-193, miR-106a, miR-15a, miR-374, miR-224) を標的として検討した<sup>10)</sup>。5種類の miRNA と相補的に結合する診断用 DNA を設計し、miRNA を入力分子、診断用 DNA を計算実行分子、診断用 DNA/miRNA 二本鎖分子を出力分子とする並列計算を行った(図 5a)。ここで設計した診断用 DNA は一本鎖領域からナノポアに入り、結合した miRNA を解離しながらゆっくりとナノポアを通過する。5種類の miRNA の発現パターンを模倣したモデル実験にて、標的 miRNA 量が多いほど時間の長い電流阻害シグナルが観察され、コンセプト通りの結果が得られることを確認した。さらに本診断システムの実用性を問うため、実検体を用いた検証実験を試みた。ナノポア計測で得られた電流阻害シグナルの阻害時間を比較すると、胆管がん患者群の方が健常者群より時間が長く、その分布は完全に異なるという結果が得られた(図 5b)。以上より、本診断システムを用いることで実検体中のがん種特異的な miRNA 発現パターンを識別できることが示された。今後は本システムを市販のナノポアデバイス<sup>2)</sup>に搭載す

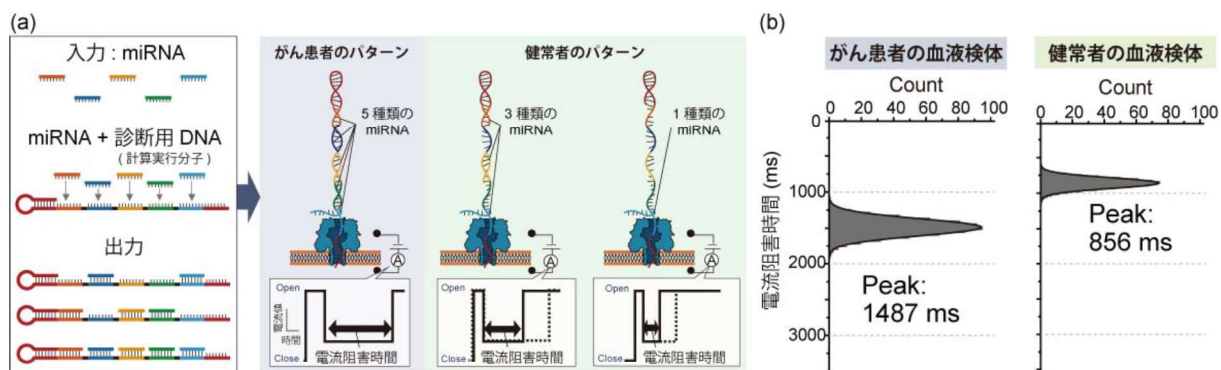


図 5. 5 種類の miRNA を同時に認識可能な診断用 DNA を用いた miRNA パターン認識 (a) 本診断システムの概要 (b) 血漿検体由来 miRNA を用いた実験で得られた電流阻害時間の分布

ることでハイスループット化を実現し、実用化への展開を目指す。

## 5. おわりに

本稿では、人工配列設計した DNA が自律的に情報処理する DNA コンピューティングと呼ばれる研究分野の紹介から、筆者らが取り組んできた生体ナノポア計測による DNA 演算情報の復号化と病理診断への応用に関して概説した。ATGC の 4 塩基で任意の情報処理をプログラムできるというシンプルさゆえ、DNA 演算技術は情報科学的研究から医学的応用へと幅広く展開されてきた。ここで分子情報を高速に電気信号へと変換できるナノポア計測と組み合わせることで、次世代のリキッドバイオプシーにおける強力な病理診断ツールの一つになることが期待できる。また欧米や中国ではナノポア計測に関する研究が盛んに行われ、急速に技術が発展してきているが、日本ではまだ研究者の数が少ない。今後日本でもナノポア関連研究が発展することを期待したい。

## 謝辞

胆管がん患者・健常者の血漿サンプルは、国立国際医療研究センター (NCGM) バイオバンクよりご提供いただきました。また本研究は科研費基盤 (A) 及び新学術領域「分子ロボティクス」の助成により進めることができました。ご支援、ご協力に感謝いたします。

## 参考文献

- 1) J. J. Kasianowics et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93 (1996) 13770.
- 2) M. Jain et al.: Genome Biol., 17(2016) 239.
- 3) L. M. Adleman: Science, 226 (1994) 1021.
- 4) R. Kawano: Biotechnol. J., 13 (2018) 1800091.
- 5) H. Yasuga†, R. Kawano†, et al.: PLoS ONE, 11 (2016) e0149667.
- 6) M. Ohara, M. Takinoue, and R. Kawano: ACS Synth. Biol., 6 (2017) 1427.
- 7) S. Takiguchi and R. Kawano: Nanoscale, 13 (2021) 6192.
- 8) M. Cui et al.: Front. Genet., 10 (2019) 626.
- 9) M. Hiratani and R. Kawano: Anal. Chem., 90 (2018) 8531.
- 10) N. Takeuchi, M. Hiratani, and R. Kawano: JACS Au, 2 (2022) 1829.