

研究終了報告書

「塩基配列からナノ粒子配列への自在変換が拓く生命情報検出」

研究期間:2020 年 12 月～2024 年 3 月

研究者:太田 誠一

1. 研究のねらい

金属、半導体などの物質は、ナノ粒子化するとバルクとは異なるサイズ特異的な光機能を発現する。例えば金ナノ粒子は局在表面プラズモン共鳴によって赤色に鋭い光吸収を示し、半導体ナノ粒子(量子ドット)は量子サイズ効果によってサイズ依存的な蛍光を示す。これらの光機能は粒子間距離に依存して変化し、プラズモンカップリングによる吸収波長のシフトや、蛍光のエネルギー移動による波長シフト/消光などを生じる。他方、DNA は材料科学の視点からは、距離制御性が高く着脱可能なリンカーとして捉えることができる。アデニン(A)とグアニン(G)、シトシン(C)とチミン(T)の塩基のペアで構成される二重らせんは剛直であり、両端の距離が精密に制御されている。また、この二重らせんの一部にらせんを組んでいない一本鎖のミスマッチ領域が存在する場合、これに対して相補的な配列を有する別の一本鎖 DNA が近接すると、ミスマッチ領域を足掛かりとして既存の二重らせんとの組み換えが誘起される。最終的に熱力学的により安定なペアが二重らせんに残り、他の一本鎖 DNA が系外に遊離することで、元々存在したリンカー構造が解離する。これらを組み合わせ、DNA をリンカーとしてナノ粒子を配列化し、さらにこの配列構造をリンカーの着脱性を活かして環境応答的に変化させることで、ナノ粒子の光機能をより高度に引き出すことができると期待される。

本研究では、DNA を用いたナノ粒子の配列化技術を基盤とし、疾患に関連した生体分子(バイオマーカー)を簡便・高感度かつマルチに検出する、新しい概念の検査技術を開拓することを目的とした。粒子の配列化のリンカーとして DNA を用いることで、バイオマーカーに応答した配列構造の変化と、これに伴う光機能のシフトを誘起することができる。また、複数種のバイオマーカーを同時測定する場合、その数だけリンカー構造の種類が必要となるが、DNA の場合は塩基配列の組み合わせで無数のバリエーションを作ることができるため、それぞれのマーカーに対応したリンカーを自在に設計することが可能である。これにより、酵素反応などを利用した従来技術とは異なるアプローチで生体分子検出に取り組むことで、新たな検査機能を創出することを目指した。またこの過程で、ナノ粒子を配列化した際の光機能や外部物質との反応挙動の変化などについての新たな基礎的知見を得ることを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、DNA をリンカーとして用いたナノ粒子の配列化技術を基盤とし、以下の4つの研究テーマに取り組んだ。

テーマ A 「DNA 触媒反応を用いた核酸マーカ由来シグナルの簡便・マルチ増幅」

テーマ B 「金ナノ粒子配列体の構造変化を利用した核酸マーカの検出」

テーマ C 「ナノ粒子のサイズを”ラベル”として用いた核酸マーカ検出の超マルチ化」

テーマ D 「Pdot の on-membrane 配列化による細胞表面マーカの高感度検出」

研究テーマ A では、DNA の触媒反応を用いて、検体中の微量の標的核酸から任意の塩基配列に設計した人工 DNA を”人工バイオマーカ”として増幅する系を構築した。これをトリガーとして金ナノ粒子などのクエンチャーと蛍光分子との配列構造を解離させて蛍光シグナルを ON にすることで、常温で混合するのみの簡便な操作により、がんの核酸マーカ(miRNA)を従来法である PCR と同程度の感度で検出することができた。また、シグナルを測定した後に再び蛍光をクエンチする機構を導入することで、ON/OFF のサイクルを繰り返すことが可能となり、これと蛍光の多色化により、同一の検体から複数種の核酸マーカをマルチ検出できることを示した。

研究テーマ B では、DNA を介して金ナノ粒子をコア-サテライト型の三次元構造に配列化し、これが標的核酸に応答して解離するように設計を行うことで、局在表面プラズモン共鳴由来の吸収波長のシフトから、がんの miRNA マーカを色の変化で簡便に検出することができた。また、ナノ粒子配列の解離挙動のその場観察と吸収波長シフトの経時測定により、構造変化の速度過程についての新たな知見を得ることができた。

研究テーマ C では、金ナノ粒子のサイズをバイオマーカの識別ラベルとして利用することで、複数種の核酸マーカを一括で検出する新たな概念の検出系の構築に取り組んだ。様々なサイズと蛍光修飾の組み合わせの金ナノ粒子を基板上に DNA を介して固定化し、それぞれが別々の核酸マーカに応答して遊離するように設計を行った。遊離した複数種の金ナノ粒子を遠心 Field Flow Fractionation (FFF)でサイズごとに分離して蛍光測定を行うことで、無数の核酸マーカを簡便に一括検出できる可能性を示した。

研究テーマ D では検出対象をタンパク質である細胞表面マーカに拡張し、蛍光ナノ粒子(Pdot)を DNA を介してマーカ上で逐次的に集積化することで、抗体の結合能を阻害することなく、マーカ由来の蛍光シグナルを増幅する技術を開発した。フローサイトメトリーによる測定により、従来の蛍光色素を用いた手法と比較して 125 倍の感度で細胞表面マーカを検出できることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「DNA 触媒反応を用いた核酸マーカ由来シグナルの簡便・マルチ増幅」

核酸マーカの検出手法の代表例として PCR 法が挙げられる。この手法は酵素反応によって標的マーカの塩基配列を正確に複製・増幅した後、蛍光によって検出を行うものである。これにより、微量の標的を正確に定量することが可能である一方、複雑な温度操作を伴うため

測定には専用の装置が必要となる。本研究では、酵素反応が生体中での触媒反応であることに着目し、人工 DNA を用いた触媒反応によって標的核酸マーカーから”人工バイオマーカー”として任意に塩基配列を設計した人工

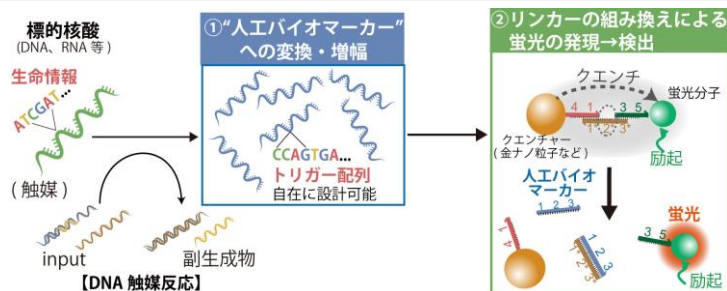


Figure 1. DNA 触媒反応を用いた標的核酸検出の概念図

DNA を増幅して書き出し、これを蛍光によって検出することで、常温で混ぜるのみでシグナルの増幅・検出を行う新たな検査技術基盤の構築を目指した(Fig. 1)。

触媒反応による標的核酸から人工バイオマーカーへの変換・増幅のスキームを Fig. 2 に示す。DNA が塩基配列同士の親和性に応じて動的に二重らせんのペアを組み替えることを利用し、標的核酸を起点として連鎖的に組み替え反応を起こすことで、人工バイオマーカーを生成する。

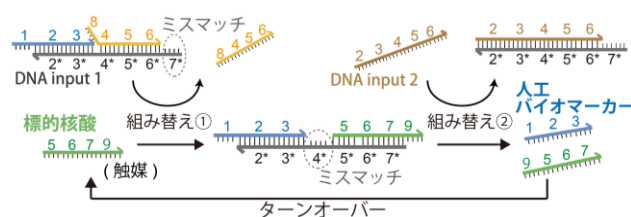


Figure 2. 人工バイオマーカーの増幅反応のスキーム。各核酸上の数字 n は配列の種類を表し、 n と n^* が相補的に結合する。

反応の最後に標的核酸がフリーの形で遊離するため、これを起点に同じサイクルが繰り返されることで、標的核酸が消費されることなく、触媒反応のように人工バイオマーカーが増幅されていく。増幅された人工バイオマーカーの検出は、金ナノ粒子などのクエンチャーと蛍光分子で構成される配列体を用いて行う(Fig. 1 右)。DNA の二重らせんをリンカーとしてクエンチャーと蛍光分子を近接した配置で配列すると、Förster 共鳴エネルギー移動(FRET)によって蛍光が消光する。このリンカーが人工バイオマーカーに応答して二重らせんの組み換えを起こし、蛍光分子がクエンチャーから離れて蛍光を発現するように設計を行うことで、蛍光強度からマーカー濃度を定量する。

がん細胞に特異的に多く存在する miRNA である miR-21 を標的として検出反応を行った結果を Fig. 3 に示す。時間の進行に伴い、蛍光強度の濃度依存的な上昇が観察され、触媒反応の進行が確認された。30 分後の蛍光強度を標的である miR-21 の濃度に対してプロットした結果、両者には線形の相関が確認され、蛍光強度から標的核酸の濃度が定量可能であることが示された。本系において少なくとも 100 pM の濃度までは miR-21 の測定が可能であることが確認されており、従来法である PCR と同等の感度で、常温で混合するのみの簡便な検出が実現可能であることが示された。

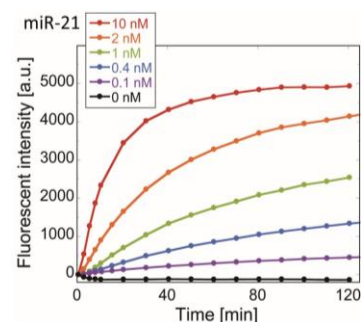


Figure 3. miR-21 を標的とした蛍光シグナル増幅の時間変化

従来の臨床検査では、疾患に関連した数個の分子(バイオマーカー)を検査項目として測定し、これが基準値を超えるかどうかで診断を行っている。これに対し近年、複数種のマーカーをセットで使用し、この濃度のパターンが患者のものに近いかどうかで診断を行う、新たなアプローチが期待されている。この実現のためには、限られた検体のボリュームから複数種のマーカー

一を簡便に検出する必要があるが、これに適した検出方法は確立されていない。

まず何種類のマーカーを測定すれば十分な診断精度が確保できるかを検証するために、悪性リンパ腫(DLBCL)の患者の miRNA の発現プロファイルの網羅的なデータを用いて、機械学習モデルを構築した。その結果、診断精度は 20~40 種程度で頭打ちとなり、これ以上では逆に診断精度が下がることが確認された(N. Nakamura, S. Ohta* et al: *J. Biosci. Bioeng.* 4 (2023) 341)。そこで、一つの検体(血液や尿など)から数十種の miRNA を簡便に測定することを目指し、上述の検出系をマルチ化することを検討した。人工バイオマーカーとの二重らせんの組み換えで遊離した蛍光色素修飾一本鎖 DNA は、さらにこれと二重らせんを形成するクエンチャー付きの配列を加えることで再び蛍光を消光させることができる。これにより、蛍光の ON/OFF のサイクルを繰り返すことで、同一の検体から複数のマーカー濃度を測定できると期待される。さらに複数色の蛍光色素を同時に使用することで、各サイクルごとに複数種のマーカーを同時測定できる。これにより、n 色の蛍光増幅反応を m 回繰り返すことで、 $n \times m$ 種のマーカーを同一の検体から測定できることが期待される。Fig. 4 に、クエンチによる繰り返し測定、および多色の蛍光色素を用いた同時測定の例を示す。上述のコンセプトに基づき、

miR-15b-5p、
miR-9-5p というがん関連の miRNA が、マルチ検出できることが確認された。現在、実際のがん細胞を用いたマルチ検出の実証を行っており、この結果が出次第、論文を投稿する予定である。

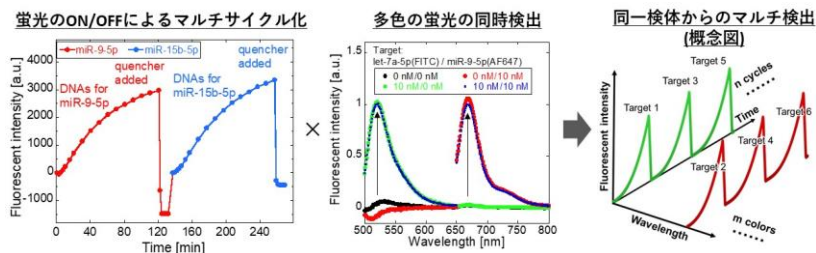


Figure 4. 再クエンチの導入によるマルチサイクル化と蛍光の多色化の組み合わせによる、標的核酸(miRNA)のマルチ検出

研究テーマ B 「金ナノ粒子配列体の構造変化を利用した核酸マーカーの検出」

研究テーマ A では、核酸マーカーの検出に蛍光を使用した。これに対し研究テーマ B では、3 次元に配列した金ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴を利用した、吸光により核酸マーカー検出に取り組んだ。検出に吸光を用いることで、スペクトル測定による定量に加え、目視での色の変化の観察による、より簡便な判定も可能になると期待される。このために、まず、DNA を用いて金ナノ粒子をコア-サテライト型の 3 次元構造に配列し、これが標的核酸に応答した 2 重らせんの組み換えによって解体するよう設計を行った (Fig. 5)。この構造体に標的核酸を添加した

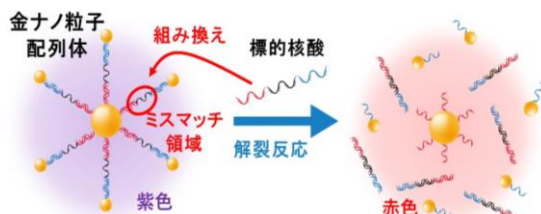


Figure 5. 金ナノ粒子配列体の構造変化を利用した核酸マーカー検出の概念図

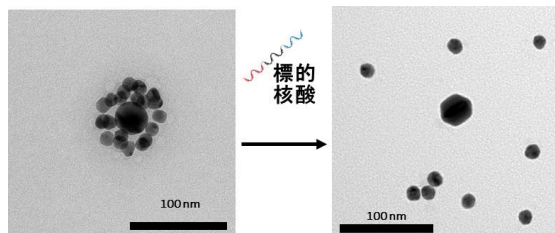


Figure 6. 標的核酸の添加によるコア-サテライト型金ナノ粒子配列体の構造変化

結果、3次元配列が解体し、粒子がバラバラに分散していることがTEM観察によって確認された(Fig. 6)。この構造変化に伴う、吸光スペクトルのシフトをFig. 7aに示す。

初期の状態では、金ナノ粒子が近接して配列されていることによりプラズモンカップリングが起こり、吸収ピークが長波長側に存在するのに対し、標的核酸を加えた後では配列の解体に伴いピークが短波長側にシフトし、最終的に1次粒子と同一のピークとなることが確認された。このピークシフトの変化速度は標的核酸の濃度と線形に相関し、これを用いることで、がんのマーカーである

miR-21の濃度を定量可能であることが示された(Fig. 7b)。この実験では標的核酸を直接構造変化のトリガーとして使用したが、研究テーマAの触媒反応と組み合わせて、トリガーとして人工バイオマーカーを用いることで、検出感度のさらなる向上も期待される。

この反応の速度過程をより詳細に検討するため、長さや反応点となる配列の位置が異なる様々なDNA配列をモデル標的として調整し、吸光シフトの速度過程の違いを検証した。その結果、マーカーが長いほど、また反応点となる相補配列の位置が中心寄りになるほど反応速度が初期に低下し、その後徐々に加速していく自触媒的な挙動を示すことが明らかとなった(Fig. 8)。このメカニズムを明らかにするために、本領域の森川先生のご紹介で環境制御型SEMを使用し、3次元配列構造の解体反応過程の直接観察を試みた(理研 橋爪先生との共同研究)。その結果、コア粒子の周囲に配位したサテライト粒子は等方的に外れていくのではなく、あるところが外れるとそこを起点としてさらに粒子が外れていく、という非等方的な解体挙動を示すことが唆された(Fig. 9)。短い標的核酸

の場合は、標的が比較的容易にコア-サテライト構造の内部の反応点にアクセスできると考えられる。これに対し、標的核酸が長くなると立体障害によってこの過程が遅くなり、反応が進行してサテライト粒子が外れるとこの位置で立体障害が低減するため、ここを起点として局所的に反応が進行・加速され、上述のような自己触媒的な反応挙動を示したものと考えられる。

ナノ粒子の液中での高次構造をその場観察することができたのは本研究が初めてであり、さらにこの構造変化の過程まで捉えることができ、得られた成果の学術的価値は非常に高いと考えられる。当初は前半のがん関連のmiRNA検出の部分までで論文を投稿することを予定して原稿を用意していたが、最後にこのその場観察の結果が得られたことでストーリーを変更することとし、より速度変化に重きを置いた形で論文投稿を準備中である。

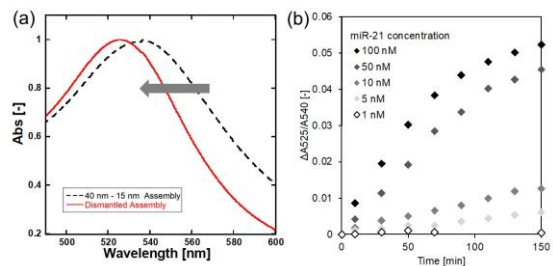


Figure 7. 標的核酸の添加による(a)吸収スペクトルの変化と(b)吸収ピークシフトの時間変化

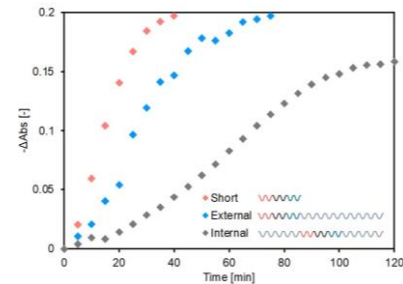


Figure 8. 吸収ピークシフトの時間変化に対する標的核酸の長さや構造の影響

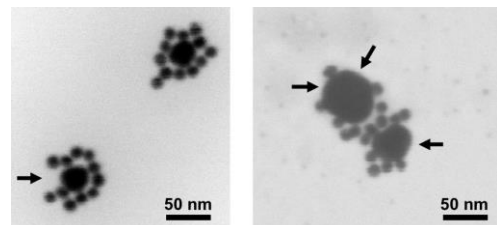


Figure 9. 液中での粒子配列体の解離挙動の直接観察の予備検討結果。矢印が粒子の外れた箇所を表す。

研究テーマ C 「ナノ粒子のサイズを”ラベル”として用いた核酸マーカー検出の超マルチ化」

金ナノ粒子を用いた研究テーマ B での検出手法は個々の核酸マーカーを個別に測定するのに適しているのに対し、前述の通り、近年は数十～100 種程度のマーカーをセットで診断に使用するアプローチも期待されている。特定のマーカーを標的にして検出を行うアプローチにおいて、検出をマルチ化するために共通して課題となるのが、識別に使用できるラベルの種類である。例えば蛍光色素などを用いて標的分子を標識して検出を行う場合、同時に識別できるマーカーの種類は別々に識別できる色の種類で決まってしまう、通常 4 色程度が限界である。これに対し本研究では、ナノ粒子のサイズを識別ラベルとして用いることを着想した。金ナノ粒子は数 nm 単位で精密なサイズの作り分けが可能であり、その制御幅も 3 nm 程度から数 μm に至るまで、非常に広い。これを従来の色に加わる新たな概念の識別ラベルとして使用することで、サイズ×色の組み合わせで無数のバリエーションを作り出せることが期待される。これを実現するためには、色の場合のスペクトル測定のように、ナノ粒子のサイズごとの存在量を定量する必要がある。このために、本研究では微粒子の分級技術として開発されてきた遠心 Field Flow Fractionation (FFF) 法に着目した。遠心 FFF では、流路に遠心力等とこれに直行した流れをかけることで、粒子を小さいサイズから順に流路から溶出させることができ、さらにその先に UV や蛍光の検出器を設置することで、サイズフラクションごとの粒子の検出・定量が可能となる。これを「識別ラベルとしてのナノ粒子サイズ」の検出手法として用いることで、新たなマルチ検出が可能になると期待される。

これに基づき、本研究では様々なサイズの金ナノ粒子を合成し、さらにこれらに様々な色の蛍光色素を修飾することで、標的とする miRNA の種類ごとに異なるサイズ・色の組み合わせをもつ、マトリックス状の識別ライブラリーを作製した(Fig. 10)。これらの粒子を DNA の二重らせんを介して基板上に固定化し、

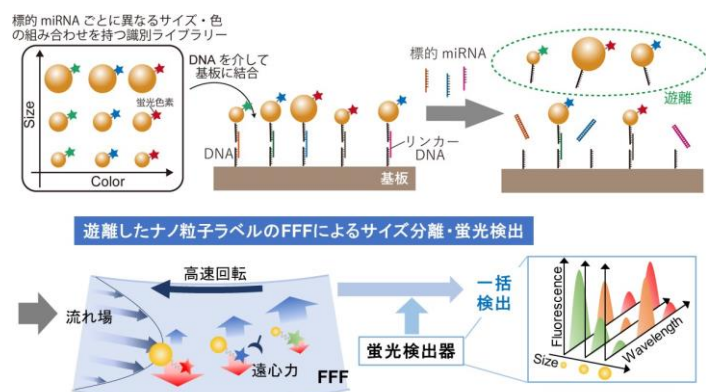


Figure 10. 金ナノ粒子のサイズと色の組み合わせを識別ラベルとして用いた miRNA の一括マルチ検出の概念図

この結合が特定の標的 miRNA に応答した二重らせんの組み換えによって切れるように設計を行った。この基板を血液などの検体中に浸漬すると、標的とする miRNA の存在量に応じて、対応したサイズ・色を持った金ナノ粒子が遊離することが期待される。これらの遊離した粒子の混合物を先述の FFF に導入することで、各サイズの金ナノ粒子に修飾された蛍光分子の蛍光スペクトルを一括で測定する。これにより、検体に基板を浸した後 FFF に注入するだけで、数十～百種の miRNA を一括で検出可能な、新たなマルチ検出法の開発を目指した。

まずマルチ検出のコンセプトを実証するために、6 種の異なるサイズの金ナノ粒子を合成し、FFF の溶出カーブを比較した結果を Fig. 11a に示す。全てのサイズのピークが重なることなく別々の位置に検出され、粒子サイズの識別ラベルとしての使用可能性が示された【代表的論文 1】。さらに、同じサイズの粒子に異なる 3 種の蛍光色素を修飾し、FFF によって同時検出した結果を Fig. 12b に示す。同じ溶出位置から、3 色の蛍光色由来のピークが別々に検出され、

粒子サイズごとに、蛍光色を別々に識別できることが示された。以上の結果より、本系を用いて「サイズ×色」の識別マトリクスを用いた一括マルチ検出が可能であることが示された【特許 1】。

さらに、これらの粒子を実際に DNA を介して基板上に固定化し、標的核酸 (miR-21) に応答した遊離を AFM 観察により評価した結果を Fig. 12 に示す。固定化後に無数の粒子が基板上に観察されるのに対し、miR-21 の添加後には粒子がほとんど観察されなかったことから、標的核酸に応答した金ナノ粒子の遊離が示唆された。さらに遊離反応後の溶液を FFF によって測定した結果、miR-21 に対応した金ナノ粒子のピークを確認することができた。現在、複数種の miRNA に対応した粒子を基板上に同時に固定化し、マルチ検出を実証する実験を進行中である。

本成果の内、前半のマルチ検出のコンセプトの実証については島津製作所と共同で特許出願を行った【特許 1】。また、FFF を用いた金ナノ粒子のサイズ分離のパートのみを切り出し、まず基礎的な検討として成果を投稿論文にまとめた【代表的論文 1】。miRNA のマルチ検出の実証については、現在ヒト検体を用いた実証実験を計画中であり、このデータをハイライトとして、投稿論文にまとめる予定である。

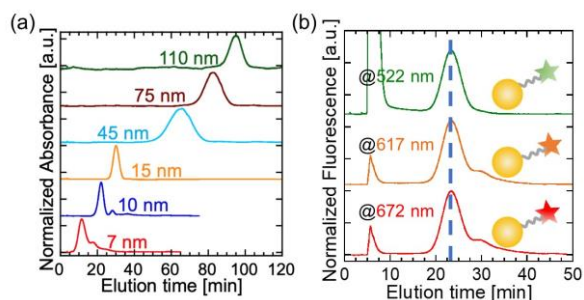


Figure 11. 遠心 FFF を用いた(a)金ナノ粒子のサイズと(b)修飾された蛍光色素の蛍光波長による分離・検出例

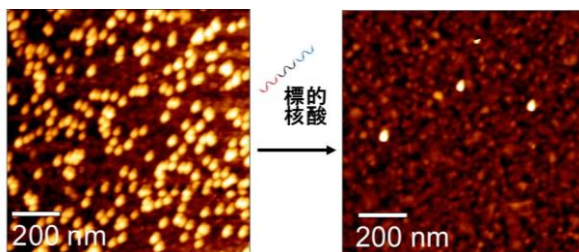


Figure 12. 標的核酸(miR-21)添加前後の基板の AFM 観察像

研究テーマ D 「Pdot の on-membrane 配列化による細胞表面マーカーの高感度検出」

研究テーマ A～C では、核酸マーカーを検出対象として研究を行ってきた。これに対し研究テーマ D では対象をタンパク質マーカーに拡張し、ナノ粒子の配列化を用いた細胞表面マーカーの高感度検出を検討した。細胞表面マーカーは、細胞膜表面に発現した各細胞を特徴づけるタンパク質である。この解析のため、従来は蛍光修飾した抗体で表面マーカーを標識し、フローサイトメトリー (FCM) によって検出する手法がとられてきた。しかし、疾患に関連したマーカーの中には発現量が低く FCM の検出限界を下回ってしまうものも少なくなく、1 マーカーあたりの蛍光シグナルを増強させる手法が求められていた。そこで本研究では、表面マーカーに対する抗体と蛍光ナノ粒子表面にそれぞれ一本鎖 DNA を修飾し、これらと相補的な配列を有する DNA をリンカーとして用いてナノ

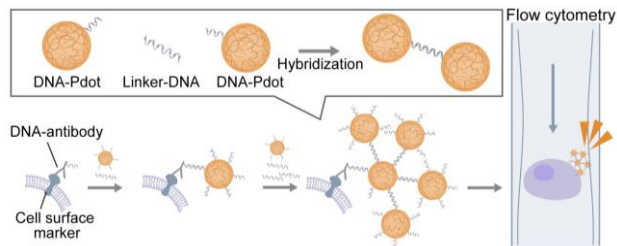


Figure 13. Pdot の細胞膜上での逐次集積による細胞表面マーカーの高感度検出の概念図

粒子をマーカー上に次々と集積することで、希少な細胞表面マーカーを超高感度に検出することを試みた(Fig. 13)。

蛍光ナノ粒子として、本研究では新たなバイオイメーシング用ナノ粒子として期待されている、有機半導体ポリマーナノ粒子(Pdot)を使用した。有機半導体ポリマーは分子鎖中に発達した π 共役系によって蛍光を示し、これをナノ粒子化することで画像診断やバイオセンシングに利用できることが近年報告されつつある。これを上記の集積化に用いるためには、粒子サイズが重要なパラメータとなるが、既報の合成手法ではその精密なサイズ制御が困難であった。そこでまず、粒径を数十～100 nm 程度の範囲で精密に制御可能な、新たな合成法の検討を行った。有機半導体ポリマーである F8BT とスチレン/無水マレイン酸共重合体(PSMA)を THF に溶解し、超音波照射下で純水に滴下すると、F8BT と PSMA の溶解性が急激に下がり粒子核が形成する。その後、核成長によって粒径が増加していく過程において、PSMA 中の無水マレイン酸が加水分解されることで、粒子表面がカルボキシ基によって徐々に被覆されていく。最終的に、粒子表面がカルボキシ基によって十分に被覆されたところで成長が止まり、安定に水系に分散した Pdot を得ることができる。ここで得られる Pdot のサイズが PSMA の加水分解速度とカルボキシ基一つあたりの静電反発力によって決まるという仮説の下、これらの支配因子である pH と塩濃度を変化させて、Pdot の合成を行った。その結果、適切な塩濃度下(80 mM 程度)において pH を高くするほど加水分解速度の上昇に伴い Pdot の粒径が小さくなることを見出し、これにより 20～200 nm 程度の範囲で Pdot のサイズを任意に制御することが可能となった【代表的論文 2】。

上記の手法で合成された Pdot を用いて、DNA を介した細胞膜の表面マーカー上における集積による、高輝度ラベル化の検討を行った。まず表面マーカー CD19 に対する抗体と Pdot それぞれに異なる一本鎖 DNA を修飾した。続いて、得られた DNA 修飾抗 CD19 抗体でヒト B 細胞白血病細胞由来細胞株 Nalm-6 をラベル化した後、一本鎖 DNA 修飾 Pdot と、両者と相補的な配列を有するリンカー DNA とを加えることで、抗体上に Pdot を結合させた。このプロセスを繰り返すことで、CD19 に結合した抗体上に、Pdot の集積を行った。ラベル化前後の Nalm-6 を共焦点顕微鏡で観

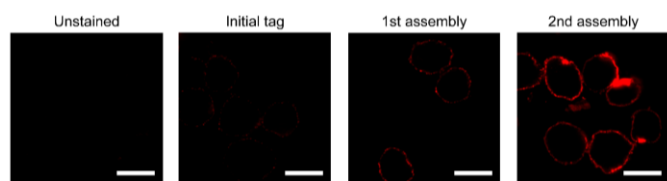


Figure 14. 共焦点顕微鏡観察による、Pdot の逐次集積に伴う CD19 由来の蛍光強度変化の評価

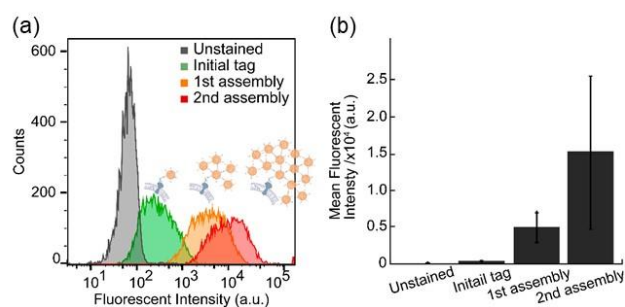


Figure 15. フローサイトメトリーによる、Pdot の逐次集積に伴う CD19 由来の蛍光強度変化の評価 (a) 細胞一つあたりから検出される蛍光強度のヒストグラム (b) 細胞一つあたりの平均蛍光強度の比較

察した結果を Fig. 14 に示す。Pdot の集積回数が増えるのに伴い、細胞膜上での蛍光強度が顕著に増加していく様子が観察された。さらにフローサイトメトリーで CD19 由来の蛍光強度を評価した結果、蛍光強度は集積回数の増加に伴い上昇し、3 回の集積によって 36 倍まで上昇することが示された(Fig. 15) 【代表的論文 3】。粒子一つあたりの輝度自身も、従来法の蛍光

色素と比べると大幅に高いため、本手法により従来法と比較して125倍の感度上昇が達成できた。これにより、これまで FCM による定量が困難だった低発現マーカーの高感度な検出が可能となり、免疫疾患をはじめとする様々な疾患の診断に寄与していくことが期待される。

3. 今後の展開

研究テーマ A～D それぞれについて、生体分子検出のコンセプトを示すところまでは、本研究期間内でおおよそ達成することができた。今後、臨床検査への実用化に向けて、病院等と連携しながら臨床検体での検討を実施し、さらなる課題を抽出して技術を深化させていく予定である。特に研究テーマ C については、企業と共同でマルチ検出のコンセプトの特許を出願し、ヒト検体での検証に向けて現在準備を進めている。

基礎的な観点からは、研究テーマ B において、ナノ粒子配列体の配列構造変化の速度過程が、トリガーとなる DNA 配列の長さ等によって非等方的に変化することが明らかとなった。これを利用し、片側だけの粒子が外れた Janus 型の配列構造などの異方的な構造を速度論的制御で作製する、新たな方法論が構築できると考えている。また、研究テーマ C では、従来の色などに加え、ナノ粒子のサイズを生体分子の識別ラベルとして使用するという、新しいコンセプトを示すことができた。ナノ粒子はサイズ以外にも形状や表面電位など、その様々な物理化学的性質を精密に作り分けることができる。これらを同様に識別ラベルとして用いることで、多次元のアイデンティティでの分子識別に基づく新たな研究領域を開拓できることが期待される。

4. 自己評価

研究開始当初は研究テーマ A-B の実施を計画していたが、領域内でのディスカッションから発展して研究テーマ C、D を着想し、当初考えていなかった方向にも研究を展開することができた。それぞれについて、生体分子検出のための技術的なコンセプトを実証することまでは到達することができ、今までになかった検出概念の提案や、将来的な臨床検査への応用に向けた基盤を構築できたのではないかと考えている。テーマの幅が広がったり、想定していなかった展開が出てきたりした分、研究期間の中で投稿論文がアクセプトにまで至っていない内容がいくつかあるが、今後継続的に研究に取り組んで成果を発展させ、論文にまとめる予定である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:9件

1. H. Tsuchiya, N. Nakamura, and **S. Ohta**, “Centrifugal Field-Flow Fractionation enables detection of slight aggregation of nanoparticles that impacts their biomedical applications”, *Analytical Chemistry*, 96, 5976 (2024).

本論文において、遠心 FFF という手法を用いることで、抗体等が修飾されたナノ粒子をサイズに応じて精密に分離できることを見出した。さらにこの応用として、医療用ナノ粒子の開発で特に問題となる粒子の凝集を、従来手法より高感度で検出できることを示した。この分級技術が、研究テーマ C におけるナノ粒子のサイズを識別ラベルとして用いた核酸マーカーのマルチ検出の基盤となった。

2. N. Nakamura, N. Tanaka, and S. Ohta, “Facile and wide-range size tuning of conjugated polymer nanoparticles for biomedical applications as a fluorescent probe”, *RSC Advances*, 12, 11606-11611 (2022).

バイオマーカーを高感度に検出するための蛍光ナノ粒子として、 π 共役高分子のナノ粒子である Pdot が注目されている。これを本さがけ研究で開発している粒子配列化技術に適用するためには、粒径が重要な因子になるが、これまで Pdot のサイズ制御手法は十分確立されていなかった。本論文では、合成時の pH と塩濃度によって核成長の速度を制御することで、Pdot を任意の粒径に制御可能な新たな合成手法を開発した。

3. Y. Maeda, N. Nakamura, and S. Ohta, “DNA-Mediated, on-Membrane Sequential Assembly of Conjugated Polymer Nanoparticles for Sensitive Detection of Cell Surface Markers”, *Advanced Functional Materials*, 34, 2315160 (2024).

細胞表面マーカーは細胞を特徴づけるタンパク質である。蛍光標識した抗体でラベル化することで検出が行われているが、発現量の少ないマーカーでは感度不足で正確に検出できないことも多い。本論文では、細胞表面マーカーを捕捉した抗体上で、蛍光ナノ粒子である π 共役高分子ナノ粒子(Pdot)を DNA によって逐次的に集積していくことで、一分子あたりの蛍光シグナルを増幅できることを示した。これにより、フローサイトメトリーを用いた検出において、従来法と比較して 125 倍の高感度化を達成した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数:1 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】

1. Seiichi Ohta, “DNA-mediated Nanoparticle Assembly Technology for Biomarker Detection”, iCANX Youth Talks, vol.49
2. Seiichi Ohta, “Nanoparticle-based micro-RNA detection via catalytic DNA reaction”, Mac-UT-UT Workshop 2022
3. Seiichi Ohta, “miRNA detection system based on DNA-mediated catalytic reaction and nanoparticle assembly”, International Congress on Pure & Applied Chemistry 2022
4. Seiichi Ohta, “Controlling physicochemical property of synthetic nanoparticles and its application for the detection of immune-related biomarkers”, The 51st Annual Symposium of the Japan Society for Immunology

【受賞】

1. 2020 年 12 月 令和 3 年度東京大学卓越研究員