

研究開発構想(個別研究型)
「生体分子シーケンサー等の先端研究分析機器・技術」

「集積化 DNA オリガミナノポアによるトランスクリプトームシーケンシング
の開発」

研究開発実施報告書(年次)
令和6(2024)年度

研究代表者
ガネシュ パンディアン ナマシヴァヤム
京都大学 高等研究院物質—細胞統合システム拠点・講師

1. 当該年度における研究開発の実施概要

(1) 研究開発概要

RNAの構造情報と配列情報を確実に読み出すための迅速な生体分子シーケンシング技術の開発に取り組めます。DNAオリガミで形成される空間にナノポアを包含した“DNAオリガミナノポア”を使ったシーケンシング法(NanORI-Seq)を開発し、多様なRNA修飾や高次構造の検出と配列の同時読み出しを行います。これを基盤に、最先端のマイクロ流体チャンネルを備えた統合型NanORI-Seq搭載デバイスの開発を目指します。

(2) 実施内容と成果の概要（研究開発開始から当該年度末まで）

令和6(2024)年度

今年度は、研究開発項目[1]「DNAオリガミナノポアシーケンシングの開発」では、DNAオリガミナノポアの中核となるナノポアの構築とその特性の評価を行いました。開発したDNAナノポアは作製後、そのポア特性は脂質膜を介したイオン電流測定によって評価しました。脂質膜を貫通するポアの形成を示すシグナルが得られ、グアニン四重鎖(GQ)構造や1本鎖DNAなどターゲットとなるDNA鎖の電気化学的な検出が可能となりました。また、機能導入やポアサイズの制御のためナノポア内部の化学修飾を行いポアの特性をイオン電流測定によって評価しました。一方、DNA-ペプチドハイブリッド型のナノポアを作製し、DNAオリガミとペプチドナノポアの複合化を行い、イオン電流測定を行うと、比較的長時間、ポアの開状態が観測されました。これらの結果から、DNAナノポア、化学修飾DNAナノポア、DNAオリガミ-ペプチドナノポアのポア形成とイオン電流測定、並びに分析するDNA鎖の検出を検証できました。

研究開発項目[2]「新規トランスクリプトーム解析法の開発」では、グアニン四重鎖(GQ)やステムループなど構造要素を組み込んだRNAを使い、架橋化学プローブ(XCP)の反応性とナノポアシーケンシングを使用したシグナル挙動を評価しました。ステムループドメインを標的とするUV活性化ジアジリン架橋剤(XCP1)と、GQ構造に選択的に結合するように設計されたイミダゾールベースの反応性プローブ(XCP2)の2種類のXCPを検討しました。その結果、ジアジリン修飾RNAは、予測されるステムループの位置に合わせて、シャープで局所的なシグナルの変化が観察され、予想される立体障害や構造の歪みと一致しました。対照的に、イミダゾール標識RNAでは、グアニンに富んだ領域で、電流振幅がより緩やかで、GQモチーフ全体に反応性が広がっていることが示されました。また、8-オキソグアニン(8-OG)の検出をアリアルボロン酸誘導体をXCPとして、グアニン位置でのシグナル振幅と滞留時間の変化から、微小な化学修飾を十分な精度で検出できることを示しました。

研究開発項目[3]「機械学習による精密配列解析法の開発」では、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて、6本のDNA二重らせんを束ねたDNAナノポア構造の振る舞いを脂質二重膜に埋め込んだ状態で解析しました。この計算により、DNAナノポアの安定構造やDNAナノポアと周囲の脂質分子の間の動的な相互作用に関して、微視的な情報を得ることに成功しました。また、一本鎖DNAの通過過程の動力学およびエネルギー障壁に対する考察が得られました。これらの結果をもとに、実験的に観測されるイオン電流シグナルと、配列および分子の立体構造を対応づけることが可能なモデル系の確立に成功しました。

研究開発項目[4]「DNAナノポアシーケンサーデバイスの開発」では、DNA、RNA、タンパクなどの標的生体分子を分離できるマイクロ流体デバイスの作製を目指しています。今年度は、UV照射によ

って架橋がなされたポリマーフィルムとクラック状の多層多孔構造(OM 構造)を利用した OM マイクロ流路を利用した生体分子の分離を検討しました。流路の構造色で可視可能な 2 種類の高さをもつ流路を用いて、GFP(分子量 27 kDa)と RNA(分子量 13 kDa)を混合した水溶液のサイズによる分離効果を蛍光顕微鏡で検証しました。その結果、作製した流路のサイズにより高さ切り替え箇所での GFP と RNA の分離に成功しました。

2. 主たる研究分担者一覧【公開対象】

遠藤 政幸 (関西大学 研究推進部・特別任命教授)