

2025年1月24日

大阪公立大学

科学技術振興機構 (JST)

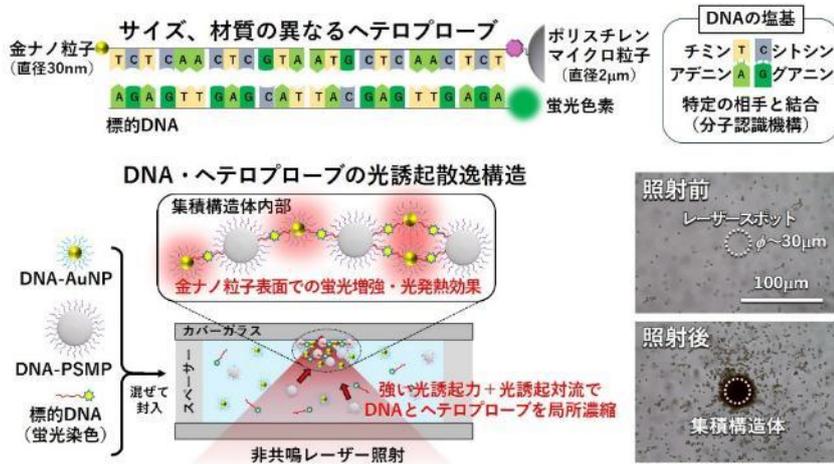
標的核酸分子をレーザー照射で濃縮 一滴の試料から 1000 兆分の 1 グラムの超微量 DNA を 5 分で検出

<ポイント>

- ◇本手法の検出下限は 7.37 fg/μL で、デジタル PCR 法 (検出下限: 約 200 fg/μL) と比較して、1~2桁高感度かつ簡便な遺伝子検査が実現可能。
- ◇PCR 法による増幅なしで、DNA 中の 1 塩基の違いをわずか数分で高精度に識別。

<概要>

大阪公立大学 研究推進機構 協創研究センター LAC-SYS 研究所の飯田 琢也所長、床波志保副所長、豊内 秀一特任講師らの研究チームは、PCR 法で標的 DNA を増幅せずに、光照射だけで超高感度かつ迅速に DNA を分析する「ヘテロプローブ光濃縮法^{*1}」を新たに開発しました (図 1)。この手法は、蛍光染色した一本鎖の標的 DNA (蛍光 DNA) と選択的に結合する一本鎖 DNA を修飾した、サイズや材質が異なる二種類のプローブ粒子を用い、選択性と濃縮効率を向上させます。標的 DNA を含む溶液に光照射し、標的 DNA とプローブ粒子を光の力 (光誘起力) とその力が引き起こす対流 (光誘起対流) により局所的に濃縮させ、DNA の二重鎖形成を加速することに成功しました。5 分間の光照射により大きさ約数十 μm の集合体が形成され、その間隙 (かんげき) に蛍光 DNA が捕捉されます。金ナノ粒子への光照射によって生じる光の熱 (光発熱効果) で二重鎖の結合を緩め、標的 DNA の計測の選択性を高めることができます。本手法の検出下限は 7.37 fg/μL であり、μL (= 10⁻⁶L、読みはマイクロリットル) レベルのゴマ粒程度の量の液体試料から 1fg=10⁻¹⁵g (1000 兆分の 1 グラム、読みはフェムトグラム) の DNA を計測できるため、従来の DNA 検出法であるデジタル PCR 法 (検出下限: 約 200fg/μL、通常 2.5~5 時間を要する) よりも 1~2桁高感度となります。また、PCR 法による増幅なしで、DNA 中の 1 塩基の違いを高精度に識別することにも成功しました。本研究結果は、がん等の遺伝子疾患の早期診断や食品・環境中の遺伝子検査の革新につながるものと期待されます。



本研究成果は、2025年1月24日 (金) (日本時間) に、米国化学会が発行する国際学術誌「ACS Sensors」にオンライン掲載され、さらに同誌の Supplementary Cover Art にも採用される予定です。

遺伝子検査は新型コロナのような感染症の検査、がんの早期診断、食品産地検査、環境中の生物由来遺伝子 (環境 DNA) などさまざまな分野で必要不可欠な技術です。本技術を発展・普及させ、人類の「健康・食品・環境」の保全に貢献したいと思っています。



豊内特任講師



床波副所長



飯田所長

<研究の背景>

近年、がん患者の細胞から血液中に流れ出した血中遊離 DNA には、遺伝子変異を有する血液循環腫瘍 DNA が含まれていることが分かり、腫瘍マーカーとして注目を集めています。一方、従来の DNA 分析法は、PCR 法などの増幅法が主流で、工程が複雑で検査時間が長く、標的 DNA 以外も増幅してしまうなどの問題がありました。本研究グループの初期の研究では、一本鎖 DNA を修飾した金ナノ粒子（プローブ AuNP）と標的ターゲット DNA を含む液滴の気液界面にレーザー照射することで、数 zmol (10^{-21} モル、読みはzeptomol) の極微量の標的 DNA とプローブ AuNP 表面の DNA の二重鎖形成を光誘導加速^{*2}して高感度計測に成功しました。しかし、二重鎖形成により形成されたプローブ AuNP 集合体が、ある程度大きく成長してから光圧と光発熱効果による対流が顕著となることを利用しており、蒸発による液面の変形などの影響で測定結果のバラつきが大きく、さらなる感度向上には光濃縮の高効率化と界面の安定化が必要でした。

<研究の内容>

本研究では、蛍光染色した一本鎖の標的 DNA (蛍光 DNA) と選択的に結合する一本鎖 DNA を修飾したサイズや材質が異なる 2 種類のプローブ粒子（金ナノ粒子 Probe1、ポリスチレンマイクロ粒子 Probe2）を用い、これらを含む溶液にレーザー照射して、標的 DNA とプローブ粒子を光の力（光誘起力）とその力が引き起こす光誘起対流によって局所濃縮することで DNA の二重鎖形成の加速を試みました。その結果、5 分間の光照射により Probe1、2 から成る約数十 μm の大きさの集合体が形成され、その間隙に蛍光 DNA が濃縮・捕捉され、プローブ粒子表面の DNA と強く結合する相補性の高い塩基配列（マッチ DNA）の場合ほど、強い蛍光信号を発することを解明しました（図 2 左）。特に本研究で用いたマイクロ粒子では、そのサイズとレーザー波長が同程度の時に強く光を散乱する「ミー散乱」が起こり、光の力が増大することを利用して濃縮効率が向上しました。また、光の力の増大に伴い集合化が安定したため、これまで困難であった固液界面での二重鎖形成の光誘導加速が実現できたと考えられます。この機構を利用し、検出下限濃度 $7.37 \text{ fg}/\mu\text{L}$ を達成し、従来法であるデジタル PCR 法（検出下限：約 $200 \text{ fg}/\mu\text{L}$ ）と比較して、1~2 桁高感度な DNA 検出に成功しました（図 2 右）。通常、このような希薄な DNA 溶液中での二重鎖形成は、相補的な DNA 同士の衝突確率が低いため非常に長い時間を要します。ヘテロプローブ光濃縮法による DNA 検出の高い感度と迅速性は、集合体内部の DNA 局所濃度を劇的に上昇させることで、これら極微量 DNA の二重鎖形成が加速された結果と考えられます。さらに、金ナノ粒子への光照射によって生じる光の熱（光発熱効果）により二重鎖結合を緩めて結合が切れる確率を高めることで、集合体からの蛍光信号は非常に高い塩基配列特異性を示し、長さ 24 塩基の標的 DNA 中にわずか一塩基しか含まれない変異を場所依存性も含め明瞭に検出・識別できることも解明しました（図 3）。用いているレーザーの波長（1064 nm）に対して光発熱効果のほとんどないポリスチレン（Probe2）のみの場合を同種ということで「ホモプローブ」としてヘテロプローブと比較しました。金ナノ粒子（Probe1）の光発熱効果がないため、一塩基変異による相対蛍光強度の変化が小さいことも確認しており、光発熱効果が選択的に重要な役割を果たしていることも分かりました。本研究成果は、がん等の遺伝子疾患の早期診断や食品・環境中の遺伝子検査の革新につながるものと期待されます。

PCR フリーに高感度・簡便・迅速な DNA 検出を実現

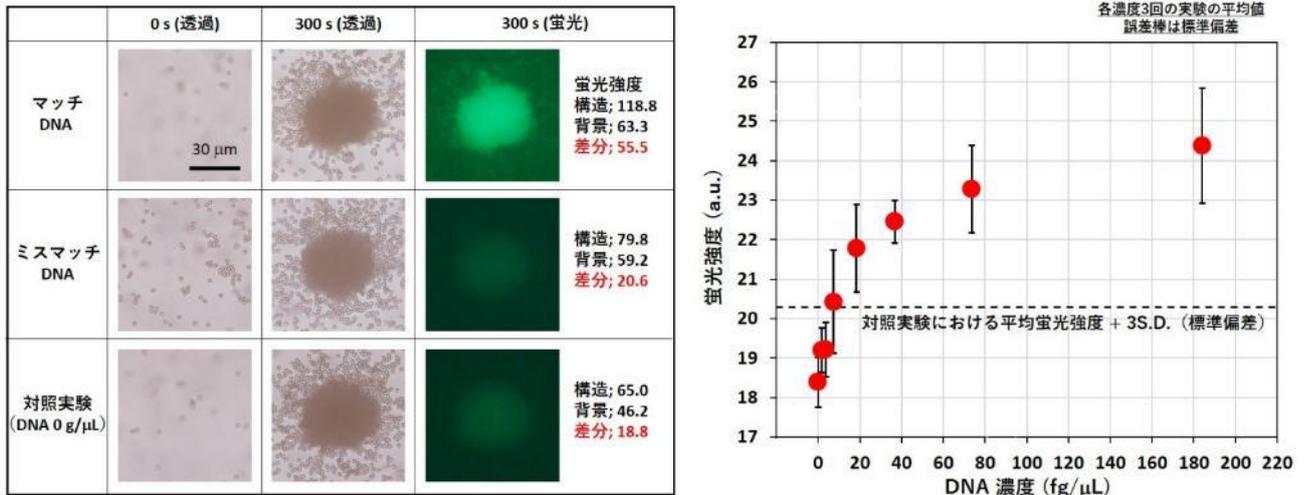


図 2 (左) ヘテロプローブ光濃縮前後の透過像と蛍光像 (右) 蛍光強度のターゲット DNA 濃度依存性

一塩基変異の検出・識別に成功

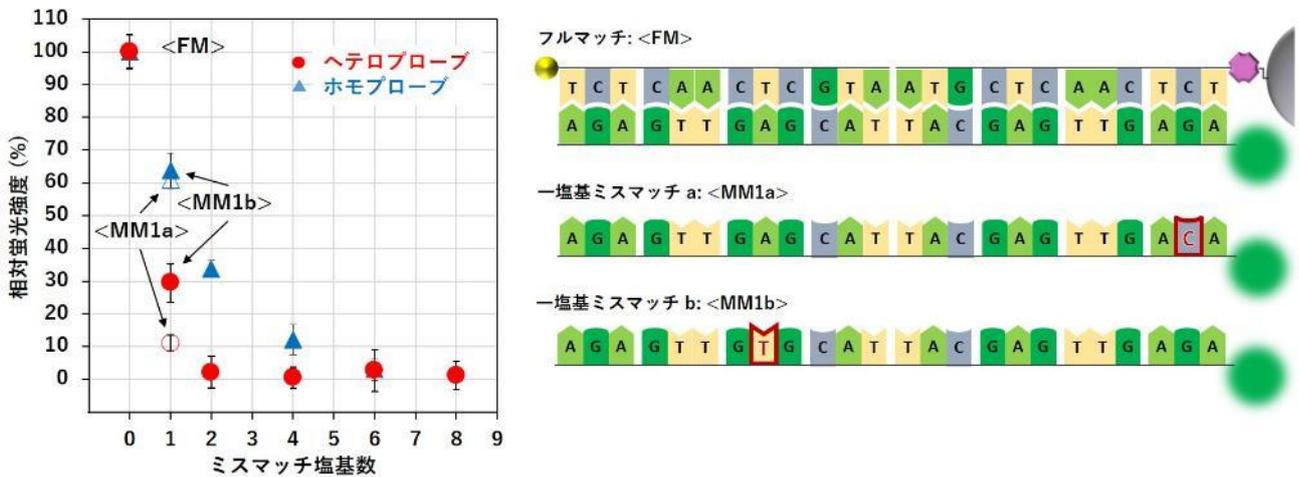


図 3 (左) 相対蛍光強度のミスマッチ塩基数依存性 (右) 測定した塩基配列の例

<期待される効果・今後の展開>

今後は、本成果の特徴を活かし、がん患者の血液サンプルの計測も計画しており、血中遊離 DNA のハイスループット定量測定や、極微量の変異遺伝子の高感度検出にも取り組みたいと考えています。また、量子生命科学で注目されている量子トンネル効果^{*3}による遺伝子変異の確率論的プロセスの解明への応用も目指します。そして、本研究の成果は遺伝子の増幅を必要とせず (PCR フリー)、ワンコイン大 (1 円玉程度の大きさ) のチップで検査ができるため、ポータブル光濃縮デバイスと組み合わせることで在宅検査・オンライン診断が可能になることが期待されます。簡便に遺伝子検査ができる特徴を活かせば、近年注目を集めている環境 DNA のフィールドワークでの利用にも展開して海や川・湖沼・土壌などに存在する生物由来 DNA の計測に活用して環境保全にも貢献できることも期待されます。

<資金情報>

本研究は、JST 未来社会創造事業 (JPMJMI21G1)、創発的研究支援事業 (JPMJFR2010)、科研費基盤研究 (A) (JP21H04964)、科研費研究活動スタート支援 (22K20512)、科研費若手研究 (20K15196)、特別研究員研究奨励費 (21J21304)、大阪府立大学キーププロジェクトの支援の下で実施されました。

<用語解説>

- ※1 ヘテロプローブ光濃縮法：ヘテロとは「異種」という意味。異なる種類の微粒子の表面に、標的となる分子に選択的に結合するプローブとなる分子（検出対象となる生体物質に選択的に結合する分子）を修飾して光濃縮効果を高めた方法。
- ※2 光誘導加速：大面積に光の力や光誘起対流を発生させて生体分子間の衝突確率を飛躍的に高めて分子認識を高効率に引き起こすこと。
- ※3 量子トンネル効果：古典力学では粒子は物質（固体、液体などの原子集団）から成るポテンシャル障壁を透過することはできないが、量子力学では電子などの量子力学的性質を持つ粒子の存在確率を表す波動関数がポテンシャル障壁よりエネルギーが低い場合でも透過できる場合がある。これをマクロなトンネルになぞらえた効果のこと。

<掲載誌情報>

【発表雑誌】 ACS Sensors

【論文名】 Single Nucleotide Polymorphism Highlighted via Heterogeneous Light-Induced Dissipative Structure

【著者】 Shuichi Toyouchi, Seiya Oomachi, Ryoma Hasegawa, Kota Hayashi, Yumiko Takagi, Mamoru Tamura, Shiho Tokonami,* and Takuya Iida*

【掲載 URL】 <https://doi.org/10.1021/acssensors.4c02119>

【研究内容に関する問い合わせ先】

大阪公立大学

大学院理学研究科/LAC-SYS 研究所

教授/所長：飯田 琢也（いいだ たくや）

TEL : 072-254-8132

E-mail : t-iida[at]omu.ac.jp

大学院工学研究科/LAC-SYS 研究所

准教授/副所長：床波 志保（とこなみ しほ）

E-mail : tokonami[at]omu.ac.jp

【報道に関する問い合わせ先】

大阪公立大学 広報課

担当：谷

TEL : 06-6967-1834

E-mail : koho-list[at]ml.omu.ac.jp

科学技術振興機構 広報課

TEL : 03-5214-8404

E-mail : jstkoho[at]jst.go.jp

【JST 事業に関すること】

科学技術振興機構 未来創造研究開発推進部

幸本 和明（こうもと かずあき）

TEL : 03-6272-4004

E-mail : kaikaku_mirai[at]jst.go.jp