

蛍光カラー符号化による簡易分子スクリーニング技術の検討

Design of molecular screening technique based on fluorescent color encoding

西村 隆宏 (阪大医, 学振 PD), 小倉 裕介 (阪大情),

山田 憲嗣 (阪大医), 大野 ゆう子 (阪大医), 谷田 純 (阪大情)

Takahiro NISHIMURA, Graduate School of Medicine, Osaka University, JSPS fellow

Yusuke OGURA, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

Kenji YAMADA, Graduate School of Medicine, Osaka University

Yuko OHNO, Graduate School of Medicine, Osaka University

Jun TANIDA, Graduate School of Information Science and Technology, Osaka University

Abstract: Biomolecular detection methods that are inexpensive and convenient have received much attention in accurate clinical diagnosis and the fields of healthcare. The required functions of biosensors include recognizing a specific molecule and transducing molecular signals for readout. In this study, we propose a simple method for biomolecular detection. The detection process is carried out in a one-pot without temperature control for enzymatic reactions and micro-fabrication like DNA microarray. Signals of target biomolecules are amplified by using cascade reactions of DNA and converted into fluorescent signals represented by intensities for a set of wavelengths. The coded signals are detected with simple fluorescent spectroscopy and the measured data are decoded to the original molecular signals. For proof of the concept, we demonstrate that encoding of molecular signal with amplification is achievable using a hybridization chain reaction with fluorescence resonance energy transfer.

Key Words: biomolecular sensing, biosensors, DNA probes, hybridization chain reaction, fluorescent encoding, fluorescence resonance energy transfer

1. はじめに

簡易かつ高感度な生体分子検出は、看護分野において重要と考えられる。例えば、院内感染や衛生管理などにおける課題に対して有効な検査手法を提供するだけでなく、日常的に患者の疾病・感染状態を確度よく把握するためのポイントオブケア検査を可能にする。これにより、迅速かつ適切な診断・看護、感染の早期発見・防止、口腔ケアをはじめとする医療現場での健康管理の質の向上などが、期待できる。

生体分子のセンシングには、対象分子を認識する過程と、分子信号を読み出し可能な物理量に変換する過程が必要となる。また、同時に複数の分子を効率的に検出することが求められる。これまでに、優れた分子認識能を有する DNA が、核酸、タンパク、小分子などの検出に広く応用されている⁽¹⁾。診断や検査に必要な病原菌などから採取される生体分子はきわめて少量であるため、PCR (polymerase chain reaction) などの、酵素反応を利用した分子増幅が利用されている^(2, 3)。しかし、反応時間や正確な温度制御が必要となるなどの課題点がある。また、DNA マイクロアレイなどのバイオチップ技術を利用すれば、同時に莫大な数の分子種の検出が可能であるが、基板への加工が必要となる⁽⁴⁾。

本研究では、DNA 反応を利用した分子信号増幅の手法と蛍光カラー符号化手法を提案する。一つのチューブ内の反応と簡易な蛍光測定により、多種類の分子の同時検出をめざす。相補性を利用して設計された DNA の自律的な反応を利用して、温度制御や基板等の加工チップや専用読み

取り装置などを必要とすることなく、分子信号の増幅と符号化を実現する。蛍光信号による分子情報の読み出しは、分子検出、定量に広く利用されている。しかし、同時に対象にできる分子の種類は、蛍光分子の使用可能な種類により制限される。提案手法では、対象分子の情報を、DNA 反応により蛍光信号へ変換して、蛍光信号を増幅し、蛍光波長と強度を利用して符号化を行う。マイクロアレイ技術のように空間的に分子情報を展開するのではなく、蛍光信号の利用可能な帯域を効率よく利用することにより、one-pot での多数分子の同時検出を可能にする。

本稿では、実現に向けた要素技術として、ハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR)^(5, 6, 7, 8, 9, 10) に基づく蛍光信号の増幅と蛍光強度の階調を利用した符号化法を報告する。

2. 分子信号の増幅との蛍光カラー符号化

提案する HCR に基づく分子情報/蛍光情報変換システムを Fig. 1 に示す。二種類のヘアピン構造 DNA (H1, H2) を利用して、一種類の対象分子 (T) を検出する。一方のヘアピン DNA (H1) には蛍光・消光分子を修飾し、ヘアピン構造の変化で両者の相対位置が変化することにより、蛍光強度を変調する。対象分子が存在しない場合には、ヘアピン DNA は閉構造を形成する。この閉構造の場合では、蛍光・消光分子が近傍であるため、蛍光は生じない。対象分子が存在する場合、H1 と T が結合し、H1 は閉構造から開構造へ変化する。開構造の H1 では、蛍光・消光分子が離れ、蛍光強度が上昇する。H1 の閉構造では二本鎖状態にあった H2 との結合部位が一本鎖状態へ変化し、H1 と

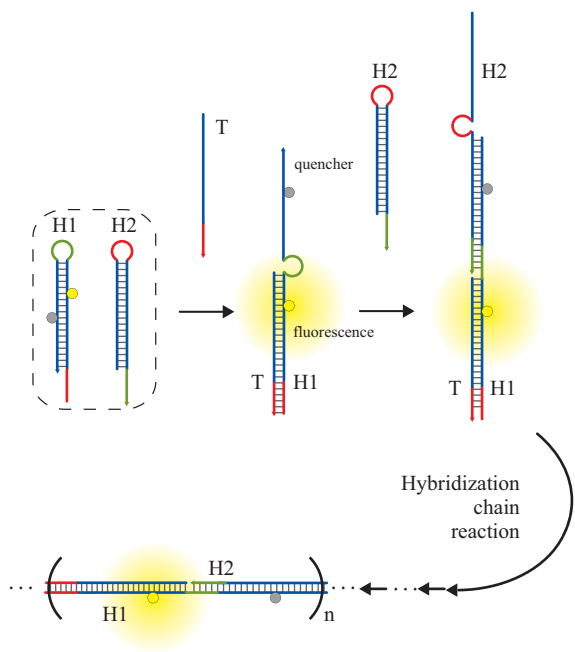


Fig. 1 Schematic illustration of HCR-based amplification of a fluorescent signal.

H2 は結合する．それに伴い，H2 が開構造へ変化して，閉構造の H1 と結合可能な状態となり，他の H1 と結合する．この連鎖的反應の進行に伴い，開状態の H1 が増加することにより，蛍光強度が増幅される．

蛍光カラー符号化の概要を Fig. 2 に示す．分子信号は，蛍光の波長と強度レベルを利用して，符号化する．使用する蛍光波長を n ，信号強度の階調を m とすれば， $m^n - 1$ 通りの符号化が可能となる．例えば，5, 6 種類の蛍光波長と 6 階調を使用すれば 10,000 から 40,000 種類の符号化が可能となる^(11, 12)．蛍光波長は使用する蛍光分子により変更できる．信号強度は HCR の H1 の蛍光修飾の構成比を調節することにより，変調できる．

本手法では，DNA のハイブリダイゼーション反応を利用しており，精緻な温度制御は不要であり，室温での利用が可能となる．また，DNA マイクロアレイなどの基板を利用せずとも，複数の対象分子を蛍光信号へ符号化することにより，同時に多重検出できる．

3. 実験

Table 1 に実験で使用した DNA 配列を示す．HCR の配列は Dirks ら提案されているものを利用した．ただし，H1 には，蛍光分子として FITC，消光分子として BHQ-1 を修飾した．HCR の過程を蛍光信号へ変換する手法は既に提案されているが，対象分子を検出後の蛍光・消光分子の位置は，不均一である⁽⁶⁾．蛍光分子と消光分子の距離は蛍光強度の増幅率に影響するため，蛍光強度の階調を利用する符号化の観点からは，両者が等間隔で配列される方が望ましい．そこで，本研究では，H1 開裂後に FITC/BHQ-1 間隔が 22bp または 26bp とほぼ等間隔になるように H1

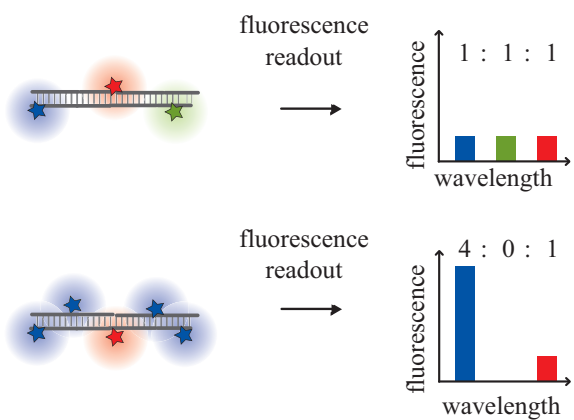


Fig. 2 Examples of encoding by using intensity and wavelength.

Table 1 Sequences used in this study. T* and T** are modified with FITC and BHQ-1.

name	sequence (5'-3')
T	AGTCTAGGATTCGGCGTGGG-TTAA
H1	TTAACCCACGCCGAATCCT*- -AGACTCAAAGTAGTCTAGGA- -T**TCGGCGTG
H2	AGTCTAGGATTCGGCGTGGG- -TTAACACGCCGAATCCTAGA- -CTACTTTG

への修飾位置を設定した．閉構造の H1 における両者の間隔は 5bp であり，FITC は BHQ-1 に十分に消光される．サンプルは，リン酸バッファーへ溶解し，50 μ L とした．蛍光分光光度計により，波長 496 nm の光照射により励起し，蛍光スペクトルを取得した．反応，測定時の温度は 25 とした．

まず，HCR 系による蛍光信号の増幅効果の確認実験を行った．Fig. 3 に，HCR (終濃度：[H1] = 500 nM, [H2] = 600 nM) と nonHCR (終濃度：[H1] = 500 nM, [H2] = 0 M) のサンプルに対して，入力分子 (終濃度：[T] = 250 nM) を加えた際の蛍光強度の時間変化を示す．入力前は，両者とも蛍光強度は一定の値であった．入力後は，両者とも蛍光強度は上昇しているが，HCR での値は nonHCR を比較して高い値となった．nonHCR では入力分子に対応した量のみ H1 が開裂して蛍光可能状態となるが，HCR では，H1 と H2 の開裂反応により，蛍光信号が大きく増幅されていることが分かる．

続いて，HCR の H1 と同配列で修飾がない DNA (nH1) の構成比を調節することにより，増幅強度が変調できることを確認した．構成比 R は， $R = [H1]/([H1] + [nH1])$ とした．実験では， R は 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 の階調を確認した．各 R に対する，蛍光強度ピークの 517 nm での蛍光強度値を Fig. 4 に示す．構成比と信号強度の関係が線形であることが分かる．この実験により，構成比 R により，

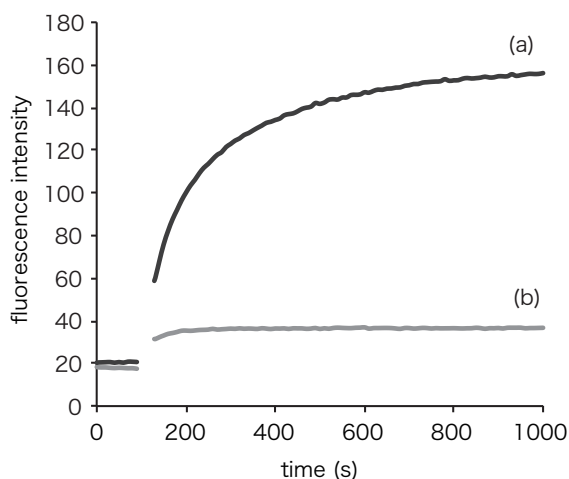


Fig. 3 Time course of fluorescent intensity (a) in amplification by HCR and (b) in detection by nonHCR.

強度変調できることが示された。

本実験では、1 波長 5 階調の符号化の実証にとどまっている。簡易な DNA 検出のために、汎用 Web カメラを用いた蛍光検出装置が実証されている⁽¹³⁾。使用するカメラのカラーフィルタの分光特性を利用すれば、RGB 三波長の分光が可能である。よって、RGB チャネルに対応した蛍光分子を設定することにより、3 波長を符号化に利用できる。これにより、符号化可能な数を増加させることができる。また、複数の対象の同時検出・同時定量を実現するためには、多重化して一括で取得した各対象分子種に対する蛍光信号を分離する必要がある。今後、情報通信におけるデータ圧縮技術などを応用し、カラー符号化法による効率的な分子検出を実現する。

4. まとめ

本研究では、簡易な分子スクリーニング技術の実現をめざし、DNA 反応にもとづく分子信号の増幅手法と蛍光強度への符号化を提案した。実験において、HCR を利用したシグナル増幅効果を確認し、増幅率が分子の構成比により変調できることを確認した。蛍光信号を利用することは、簡易に複数対象分子の同時検出が可能となるだけでなく、蛍光分子間のエネルギー移動を利用した情報処理技術^(14, 15)を応用することにより、より効率的に蛍光信号の帯域を利用した分子検出が期待できる。今後、多波長を利用した符号化による多重検出を実現し、提案手法の有効性を示す。

参考文献

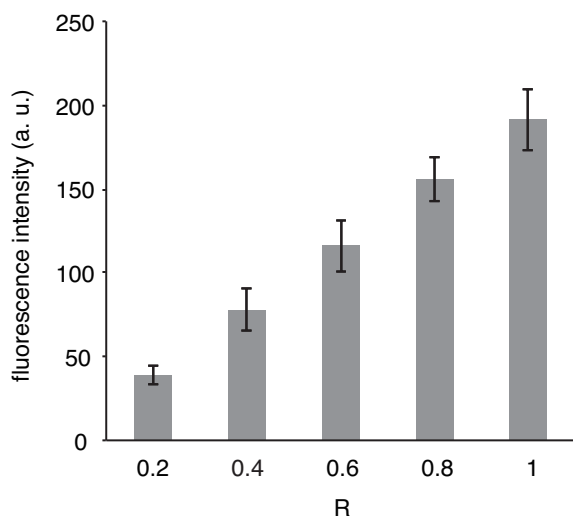


Fig. 4 Composition ratio versus fluorescence intensity at 517 nm.

- (1) K. Wang, Z. Tang, C. J. Yang, Y. Kim, X. Fang, W. Li, Y. Wu, C. D. Medley, Z. Cao, J. Li, P. Colon, H. Lin, and W. Tan, "Molecular engineering of DNA: molecular beacons," *Angewandte Chemie*, vol. 48, no. 5, pp. 856–870, 2009.
- (2) H. Zhang, F. Li, B. Dever, X.-F. Li, and X. C. Le, "DNA-mediated homogeneous binding assays for nucleic acids and proteins," *Chemical reviews*, vol. 113, no. 4, pp. 2812–2841, 2013.
- (3) R. K. Saiki, D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. a Erlich, "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase," *Science*, vol. 239, no. 4839, pp. 487–491, 1988.
- (4) M. Schena, D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown, "Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray," *Science*, vol. 270, no. 5235, pp. 467–470, 1995.
- (5) R. M. Dirks and N. A. Pierce, "Triggered amplification by hybridization chain reaction," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 43, pp. 15275–15278, 2004.
- (6) D. A. Chemeris, Y. M. Nikonorov, and V. A. Vakhtov, "Real-time hybridization chain reaction," *Doklady Biochemistry and Biophysics*, vol. 419, no. 1, pp. 53–55, 2008.
- (7) J. Huang, Y. Wu, Y. Chen, Z. Zhu, X. Yang, C. J. Yang, K. Wang, and W. Tan, "Pyrene-excimer probes based on the hybridization chain reaction for the detection of nucleic acids in complex biological

- fluids.,” *Angewandte Chemie*, vol. 50, no. 2, pp. 401–404, 2011.
- (8) H. M. T. Choi, J. Y. Chang, L. a Trinh, J. E. Padilla, S. E. Fraser, and N. a Pierce, “Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA expression.,” *Nature biotechnology*, vol. 28, no. 11, pp. 1208–1212, 2010.
- (9) Y. Jiang, B. Li, X. Chen, and A. D. Ellington, “Coupling two different nucleic acid circuits in an enzyme-free amplifier.,” *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 17, no. 11, pp. 13211–13220, 2012.
- (10) W. Tang, D. Wang, Y. Xu, N. Li, and F. Liu, “A self-assembled DNA nanostructure-amplified quartz crystal microbalance with dissipation biosensing platform for nucleic acids.,” *Chemical communications*, vol. 48, no. 53, pp. 6678–6680, 2012.
- (11) C. Lin, R. Jungmann, A. M. Leifer, C. Li, D. Lerner, G. M. Church, W. M. Shih, and P. Yin, “Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA Chenxiang,” *Nature Chemistry*, vol. 4, no. 5, pp. 832–839, 2012.
- (12) M. Han, X. Gao, J. Z. Su, and S. Nie, “Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules,” *Nature biotechnology*, vol. 19, pp. 631–635, 2001.
- (13) K. Kakugawa, K. Yamada, H. Maeda, S. Takashiba, “A Novel Real-Time DNA Detection System for Loop-Mediated Isothermal Amplification Method,” *IEEJ Transactions on Electronics, Information and Systems*, vol. 130, Issue 5, pp. 807–812, 2010.
- (14) T. Nishimura, Y. Ogura, and J. Tanida, “Fluorescence resonance energy transfer-based molecular logic circuit using a DNA scaffold,” *Applied Physics Letters*, vol. 101, no. 23, p. 233703, 2012.
- (15) C. Pistol, V. Mao, V. Thusu, A. R. Lebeck, and C. Dwyer, “Encoded multichromophore response for simultaneous label-free detection.,” *Small*, vol. 6, no. 7, pp. 843–850, 2010.