

第7章 ナノポア計測によるマイクロRNA 検出技術の現状

保 皓大*¹, 平谷萌恵*², 川野竜司*³

1 はじめに

ナノポア計測は直径数 nm のナノ孔を通過する分子を一分子レベルで電氣的に計測する方法である。ナノポアとしては、チャンネル構造を有する膜タンパク質を利用する生体ナノポアと、電子ビームで窒化ガリウムなど無機の薄膜にナノ孔を形成して利用する固体ナノポアがある。1996年に生体ナノポアによる核酸の一分子計測が報告されて以来、生体ナノポアを中心にナノポア計測が発展し、固体ナノポアがそれを追隨している。本稿では主に生体ナノポアを利用した核酸、特に microRNA (miRNA) のナノポア計測に関して述べる。

2 ナノポア計測技術

1996年に初めて核酸の一分子計測に用いられたナノポアタンパク質は、黄色ブドウ球菌が産生する溶血毒素 α -ヘモリシン (α HL) である¹⁾。 α HLは直径 1.4 nm のナノポアを細胞膜中に形成し、このポア直径と 1 本鎖 DNA/RNA の直径 (~ 1 nm) が近いこと核酸分子の計測によく用いられている。実際の計測では、電解質溶液中 (典型的には 1 M KCl 緩衝液) に作製した平面状の脂質二分子膜中に α HL を再構成し、膜の両側に配置した銀 / 塩化銀電極により印加した電位差により流れる微小なイオン電流を高性能アンプ (パッチクランプアンプ) により計測する (図 1)。この時、分子が印加電圧により泳動しこのナノポアを通過すると、流れているイオンの流れを阻害し、電流が減少する。この阻害電流の阻害量と阻害時間、阻害する頻度の 3 つパラメータが主にナノポア計測から得られる結果である。阻害電流量はナノポア内を通過する分子の体積を反映し、分子サイズの情報を得ることができる。阻害時間は分子がナノポアを通過する時間であり、核酸分子の場合、その長さに比例する。阻害頻度は分子が通過する頻度であるので、溶液内の標的分子の濃度の情報を含んでいる。ナノポア計測では、特に複雑な前処理を行う必要はなく、核酸分子をラベルフリーかつ迅速に検出できることから近年その応用展開が期待されている。直接計測可能な核酸分子の長さは、1 塩基から数十 k と報告されており^{2, 3)}、測定下限濃

*1 Akihiro Tamotsu 東京農工大学 工学府 生命工学専攻

*2 Hiratani Moe 東京農工大学 工学府 生命工学専攻

*3 Ryuji Kawano 東京農工大学 工学研究院 生命工学専攻 准教授

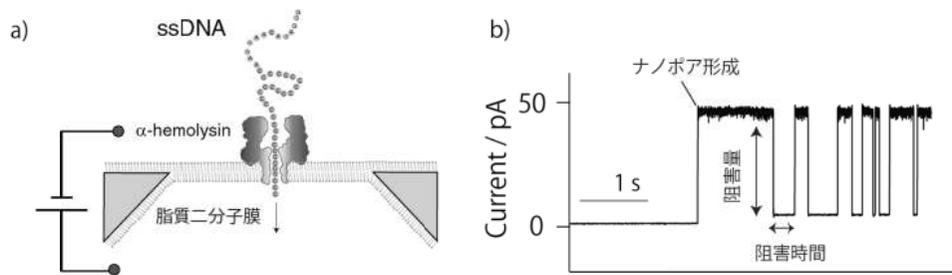


図1 (a) α HL による典型的なナノポア計測。(b) ナノポア計測で得られる電流データ。阻害電流と阻害時間により一分子の状態を分析する。

度としては $\sim 0.1 \text{ pM}^4$), 外部から交流電場を印加するような少し複雑な工夫をすると $\sim 10 \text{ fM}^5$ まで計測可能であることが報告されている。

ナノポア計測の最も期待される応用はDNA/RNAのシーケンスであり、高速、安価なナノポアシーケンスの実用化に向け膨大な研究が行われている^{6,7)}。DNAがナノポアを通過するときATGCの異なる体積を持つ塩基が異なる阻害電流値を示すことが理論的に考えられていた。実際、4種類のモノヌクレオチドは4つの異なる阻害電流レベルを示すが、それが繋がったポリヌクレオチドの阻害電流には各塩基に対応する阻害電流の差異が見られなかった。この主な原因としてDNAの通過速度が速すぎて現状の計測器では電流差が観測できないことが挙げられる。そこでこれまで核酸の通過速度を遅くする取り組み、DNAポリメラーゼなどのタンパク質とナノポアを組み合わせることにより、標的DNAをゆっくりとポア通過させる研究が行われてきた⁸⁾。2016年Oxford nanopore社はこれらの技術を高度に融合することで、ポータブルで安価(\$1,000)なナノポアシーケンサを上市した。

これまでナノポア計測は実験室レベルでの計測技術であったが、ナノポアシーケンサが実用化されたことで、一気にナノポアによる様々な展開が期待される。miRNAに関するナノポア計測はまだ数グループからの論文報告に留まっているが、今後飛躍的な進展が見込まれる。次からはmiRNAのナノポア計測に関し、これまでの研究例と筆者らの最新の研究例について解説する。

3 ナノポア計測によるmiRNA検出技術

miRNAは最初期の癌細胞中で異常な発現を示し、さらに体液中へと放出されるため非侵襲の超早期癌診断バイオマーカーとして注目を浴びている⁹⁾。また、異常な発現を示すmiRNAは癌の種類に対応して固有の発現パターンを持つことが知られている。そのため、体液中から選択的かつ定量的にmiRNAを検出する方法が期待されている。ナノポア計測は、分子がナノポア内を通過することにより生じる阻害電流の変化から1分子の検出が可能である。またナノポア計測では得られる核酸分子の通過信号の発生頻度が計測系に含まれる核酸分子の濃度に依存して変化

第7章 ナノポア計測によるマイクロRNA 検出技術の現状

するため、高い定量性を有する。しかしこれまで α HL を用いた miRNA の阻害電流は、miRNA の配列長が種類によらず 20 塩基程度と短いため類似しており、阻害電流のみで種類を判別することが難しいという問題がある。この問題を解決する方法としてナノポア計測に選択性を付与する研究が報告されている。miRNA をナノポア計測する研究はまだその初端であり、本項では先駆的に研究を進めているミズーリ大学 Li-Qun Gu らの研究例について紹介する^{4,10)}。

α HL ポアは ssDNA の直径と近いポアサイズを有し、ssDNA は通過するが dsDNA は通過できないというサイズ選択性を持つ。Gu らのグループはこの性質を利用し、miRNA に相補的な配列を有するプローブ DNA タグを用いた手法を報告している (図 2)。プローブ DNA は標的となる miRNA と部分的に相補鎖を形成し、このプローブ DNA が結合したままではナノポアを通過できない。測定中に印加している電圧によりプローブ DNA が解離すると miRNA は通過可能になり、この場合 1 本鎖の miRNA のときより電流阻害時間が長くなるため miRNA を特異的に検出できる。この研究では、初めに肺癌患者の血液中で過剰に発現する miR-155 を標的に本手法を検証し、標的濃度が 0.1 pM でも計測可能であると報告している。また肺癌患者の血液中で発現量が下がる *Let-7a* と、2カ所塩基が異なった類似配列の *Let-7b* を用いてこの方法の選択性を評価しており、 $P < 0.005$ で識別できることがわかった。次に実際の肺癌患者の血漿と健常者の血漿から miR-155 の検出を行い、肺癌患者の血液中での発現上昇を確認している。このとき定量的逆転写 PCR と比較し、ナノポア計測から得られたデータの方が発現上昇率の分散が小さく良好な再現性があることを報告している。以上の結果から著者らは、ナノポア計測は定量的逆転写 PCR と比較しても、ラベルや増幅を必要としない miRNA の迅速検出法として有用である

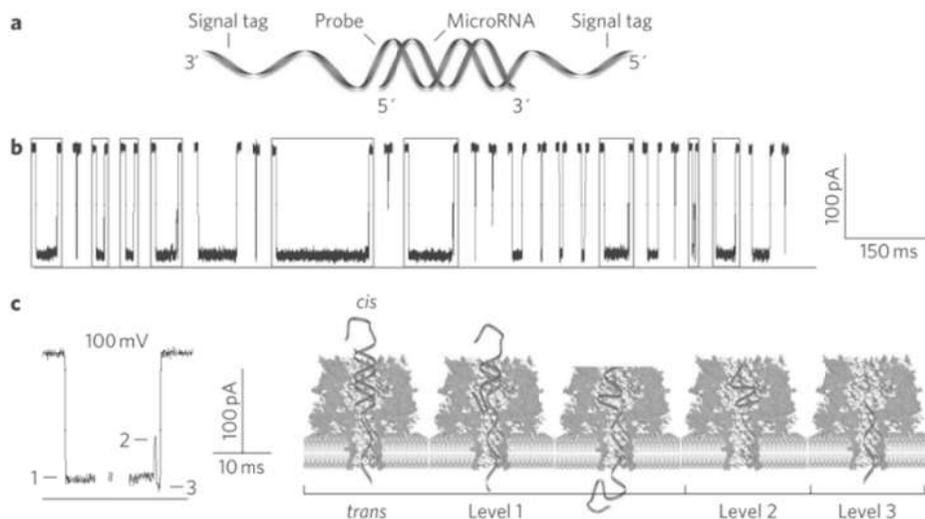


図2 (a) miRNA 特異的なプローブ DNA。(b) ナノポア通過の際に生じる電流阻害の様子。(c) 特徴的な電流阻害の原理。

(文献 4 から引用)

と結論付けている⁴⁾。

癌細胞中で異常な発現を示す miRNA は癌の種類により異なり、中には 2 種類以上の癌の診断マーカーとなるものも存在する。例えば miR-21 は脳腫瘍と肺癌患者で、miR-141 は卵巣癌と前立腺癌患者の血中で異常な発現を示すことが知られている¹¹⁾。そのため体液中から癌の診断を行うには 1 種類の miRNA の検出だけでは不十分であり、複数種類の miRNA を同時に検出する必要がある。これを達成するため、次に Gu らのグループはプローブ DNA にポリエチレングリコール (PEG) 修飾をし、識別可能な検出信号に種類を持たせることで miRNA の複数種類同時検出を試みている (図 3)。PEG 修飾された DNA がナノポアを通過する際、PEG の長さに応じてイオン電流の阻害率が異なることが知られている¹²⁾。これを利用して、検出する miRNA の種類分 PEG の長さを変えたプローブ DNA を用意することで、イオン電流の阻害率から miRNA の判別を行っている。この方法により Gu らは肺癌患者で過剰に発現する 4 種類の miRNA (miR-155, miR-182-5p, miR-210, miR-21) の同時検出を試みている。この場合の miRNA 選択性はかなり良好で、4 種類の miRNA のイオン電流阻害率は分散を考慮しても全く重ならず配列特異的な検出が可能であることが示された。また本方法の検出限界は、濃度を定量した際の誤差が 10% になる 10 pM としている。濃度によって誤差が変化するのは低濃度になると miRNA の通過が発生しにくくなり、統計的に十分なデータを確保できなくなるためである。逆に言えば miRNA の通過頻度を上昇させる工夫をすることで感度の上昇が見込めると筆者らは述べている。以上よりこの方法は複数種類の miRNA の同時検出法として、定量性・選択性を十分に有していると結論づけている¹⁰⁾。現在のところ使用された miRNA は合成したものであるため、実際の患者の体液に対して適用可能かどうかは不明であるが、癌診断法として有用である可能性は高い。

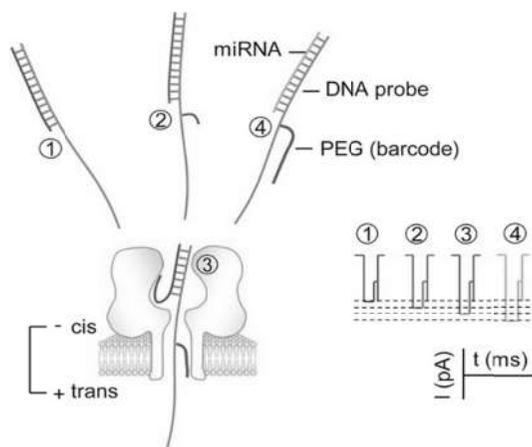


図 3 PEG を付けたプローブ DNA による miRNA 特異的検出

(文献 10 から引用)

第7章 ナノポア計測によるマイクロRNA 検出技術の現状

上記で紹介した研究はどちらも生物由来の膜タンパク質が有する生体ナノポアを用いた研究である。生体ナノポアを用いる場合、ナノポアを脂質二分子膜上に再構成させるというプロセスが必要になり、膜の安定性の問題や溶液などの使用条件が限定される場合が出てくる。それに対して固体ナノポアは半導体微細加工技術により、窒化シリコンや最近ではグラフェンなどの固体材料に電子ビーム（典型的には透過型電子顕微鏡のビームを使用する）によりナノポアを形成したものである^{13,14}。固体ナノポアは作製するために大規模な装置が必要であり、生体ナノポア研究の後発の研究と位置づけられている。次にこの固体ナノポアを用いた miRNA 計測に関する研究を簡単に紹介する。意外なことに miRNA のナノポア検出に関しては生体ナノポアよりも先に固体ナノポアが2010年に報告されている¹⁵。この方法の基本的な戦略としては Gu らの研究と同様に、特定の miRNA と相補的なプローブ RNA を用いて検出を行う。Wanunu らは既存のマグネットビーズを用いた精製法によりラットの肝臓から抽出した miR-122a に関して固体ナノポアによる計測を行った（図4）。この方法によりラット肝臓内に含まれる miRNA を 78 ± 2 pg miR122a/ μ g liver と決定でき、これは他の方法での結果に近いものであった。固体ナノポア計測では、生体ナノポアを用いた場合よりも高い電圧を印加でき、miRNA の泳動速度を高くすることができるため、結果として阻害電流の観測頻度も上昇し低濃度域でも精度の高い定量が期待できる。固体ナノポアは生体ナノポアに比べ上述したような優位性があるが、実用化を考えた場

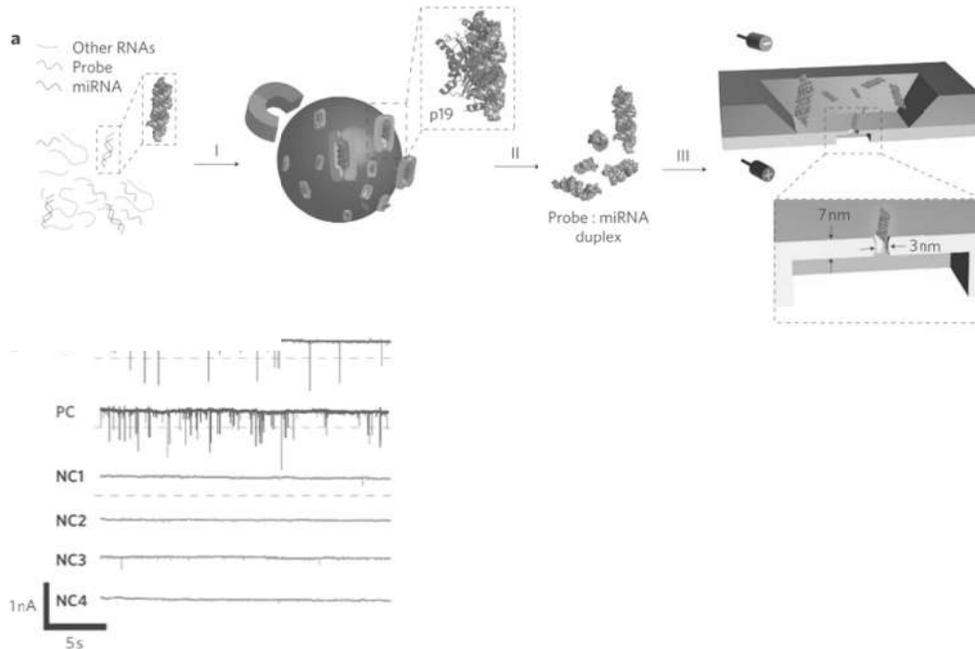


図4 (a) マグネットビーズによる特定の miRNA 精製。(b) 精製した miRNA のナノポア計測結果と既知濃度による対象結果およびネガティブコントロールの結果。

(文献 15 から引用)

合作製のコストや信頼性にまだ課題が残り、実際に販売されたナノポアシーケンサでは生体ナノポアが採用されている。

4 DNA コンピューティング技術を用いた miRNA ナノポア計測

癌の種類によって異なる種類の miRNA が同時に発現増加、減少するようなパターンを示すことが知られている⁹⁾。そのため、癌の早期診断を行うには、癌特異的な miRNA の発現パターンを認識する必要がある。本稿では、DNA コンピューティングとナノポアセンシングを組み合わせることで、miRNA の発現パターンの自律的な認識を目指した取り組みについて紹介する。

DNA コンピューティング技術は 1994 年に Adleman が発表した研究によって始めて実証された¹⁶⁾。Adleman は DNA が特異的に相補鎖を作るという性質を利用し、NP 困難と呼ばれる数学的問題が解けることを初めて実証した。NP 困難のような並列計算が必要な問題を現在のコンピュータで解く場合、最適解の変数が増えると回答を得る時間が指数関数的に増えることが知られている。量子コンピュータや、DNA コンピュータなどは並列計算に向いていると言われており、指数関数的であった問題を線形的な問題へと簡略化した。Adleman は、有向ハミルトン経路問題を DNA の塩基配列のパターンに対応させ、答えとなる DNA を PCR やゲル電気泳動を段階的に利用することで解いた。この研究は大きな反響を呼び、DNA を用いたコンピューティングに関する研究が注目されるようになった。その後追従するように Shapiro らのグループは DNA と酵素反応を用いた二状態有限オートマトンを作り出し¹⁷⁾、Hagiya のグループは NP 困難の一つである充足可能性問題に関し、ヘアピン型の DNA を用いて解くことに成功した¹⁸⁾。しかし、最近のシリコン型コンピュータのマシンパワーの向上から、DNA で単純な計算を行うよりも生体分子で演算可能であることを利用し生体内での診断・治療に応用する研究が行われている¹⁹⁾。Shapiro らは癌の診断と癌の治療薬の合成を自律的に行う DNA コンピューティングを報告している²⁰⁾。このシステムでは、肺癌特異的な mRNA 転写量の変化を DNA が認識し、癌だと診断された場合にアンチセンス DNA が合成され放出される。このように、多種の DNA、RNA の中から診断マーカーとなる特定の核酸分子が「存在する場合」と「存在しない場合」の二状態を二進数の演算に適用することで、出力された診断結果から癌の治療などの次の反応に用いることができる。しかし、従来の DNA コンピューティングの手法では、計算結果として出力される分子情報のエンコーディングに、PCR での出力分子の増幅やゲル電気泳動といった多段階のステップを要し、結果を得るまでに長い時間がかかることが課題であった。

これまで我々は、液滴接触法デバイスを用いて形成したマイクロドロップレットシステムを用いたナノポア計測により、出力分子を迅速・ラベルフリーに検出する手法を提案している^{21, 22)}。液滴接触法では、微細加工技術で作製したデバイス上で、脂質単分子膜を有する 2 つのマイクロドロップレットを接触させることで脂質二分子膜を安定に作製することができる (図 5a)²³⁾。液滴接触法デバイス上の「∞」型のウェルにマイクロピペットで脂質溶液、水滴 (バッファー溶

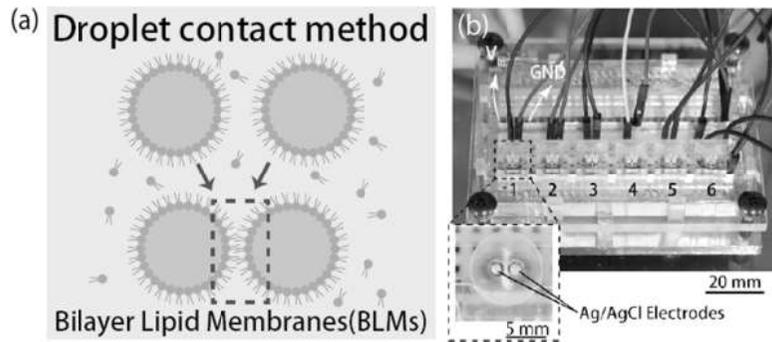


図5 (a) 液滴接触法による脂質二分子膜の形成。(b) 液滴接触法デバイス。

(文献 24 から引用)

液)の順に滴下するだけで簡単に脂質二分子膜を作製でき、さらに「∞」型のウェルの底部に電極を配線することで、脂質二分子膜中に再構成したナノポアのイオン電流の計測も可能である(図 5b)²⁴⁾。我々は液滴接触法によって用意された2つのマイクロドロップレットのうち1つを入力用、もう1つを出力用とすることで、DNA コンピューティングに向けたシステム化を行った。このシステムでは入力用ドロップレット中で行われたDNA コンピューティングによる演算の結果、出力された核酸分子をナノポア計測によってリアルタイムに検出、電気信号への変換を可能とした。

このような既存の電気デバイスとの親和性が高く、迅速・ラベルフリーに出力分子を検出できるマイクロドロップレットシステムを用いて、我々は配列の異なる2種類の入力DNAが入力された場合のみ、RNAが出力分子として合成されるという情報処理を行う分子変換型のANDゲートを構築した²⁵⁾。入力用ドロップレットにあらかじめ内包されたDNAが2種類の入力DNAの入力を認識し、その後自動的にT7 RNAポリメラーゼが出力RNAを合成・増幅する(図 6a)。T7 RNAポリメラーゼを用いることにより、入力DNAから出力RNAへの変換と、出力RNAの増幅を可能とした。さらに、増幅された出力RNAは α HLナノポアを通過し出力用ドロップレットに移動するため、出力情報を分子情報と電気情報の2種類の異なる情報として迅速・ラベルフリーに取り出すことを可能とした(図 6b)。

この研究を基盤として次に、マイクロドロップレットシステムを利用した小細胞肺癌の診断と治療を同時に行うセラノスティクスシステムを構築した²⁶⁾。小細胞肺癌の早期診断マーカーとなるmiR-20aを入力分子とし、あらかじめ入力用ドロップレットに内包させたProgrammable DNAが入力を識別・診断する。その後miR-20aが存在した場合にのみ、酵素反応によって小細胞肺癌の治療薬となるアンチセンスDNAが出力分子として合成・増幅される(図 7a)。本システムでは、アンチセンスDNAのドロップレット内合成をナノポア計測によってリアルタイム定量できた(図 7b)。本研究では30分の間に1エクソソームに含まれるmiR-20a量(0.8 ng)から治療に十分な量のアンチセンスDNA量(3 mg/kg/day)の合成に成功しており、今後DDS

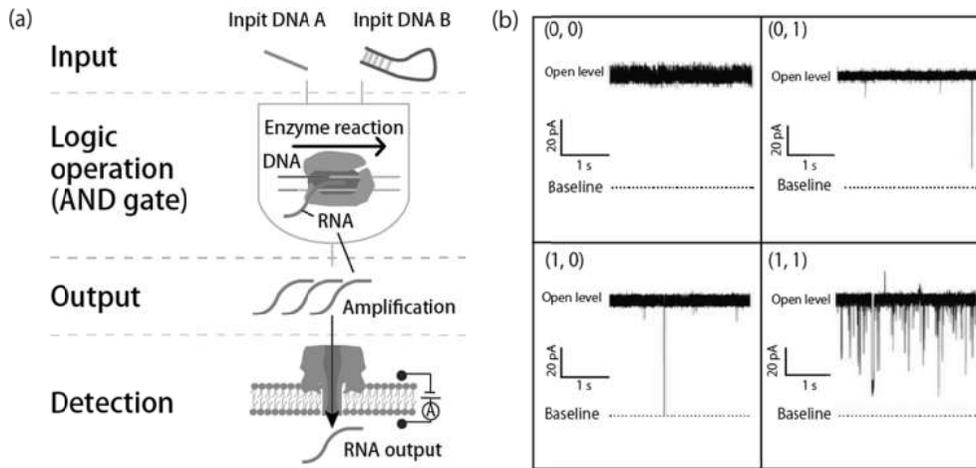


図6 (a) マイクロドロプレットシステムを用いて構築したANDゲート。(b) 出力RNAのナノポア計測結果。

(文献 25 から引用)

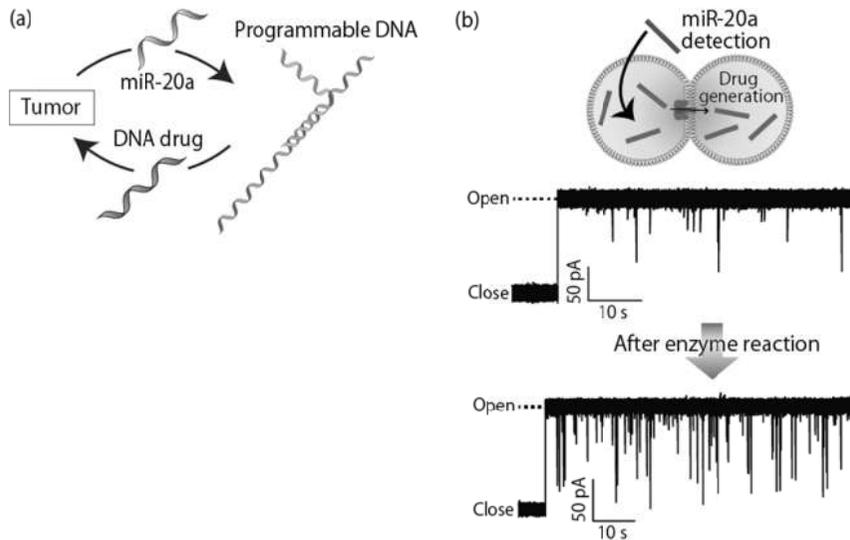


図7 (a) Programmable DNA による miRNA の検出と薬剤の合成。(b) 合成された薬剤 DNA のナノポア検出結果。

(文献 26 から引用)

の技術と組み合わせで *in vivo* 系への応用展開を試みる。

また最近では、DNA コンピューティング技術だけでなく情報工学の手法による周波数解析を利用することで miRNA の癌特異的な発現パターンをナノポア計測からダイレクトに同定する取り組みも行っている²⁷⁾。miRNA のナノポア計測によって得られる電流障害に miRNA 固有の周

波数成分が現れることが明らかになりつつある。周波数解析とナノポアセンシングを組み合わせることで、体液中の miRNA を網羅的に検出できる癌の簡易診断デバイスの構築を目指している。

5 おわりに

2016 年生体ナノポアを用いた安価なシーケンサが販売され、これまで研究レベルの技術であったナノポア計測に関し、製品レベルでの有用性が実証されつつある。ナノポア計測の原理自体はコールターカウンター法と同様にシンプルであり、ナノスケールでの一分子計測を比較的容易に行うことができる。本稿では今後飛躍的な応用展開が期待されるナノポア計測のうち、miRNA に関するこれまでのパイオニア的研究と情報工学を組み合わせた最近の研究例について紹介した。これらの方法は、充分低濃度領域でもラベルフリーかつ迅速な計測が可能であり、今後実際に生体サンプルや生体内での計測について研究開発が進められ、miRNA の計測技術の核となることが期待される。

文 献

- 1) J. J. Kasianowicz *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13770 (1996)
- 2) A. Meller *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **86**, 3435 (2001)
- 3) J. A. Cracknell *et al.*, *Nano Lett.*, **13**, 2500 (2013)
- 4) Y. Wang *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 668 (2011)
- 5) K. J. Freedman *et al.*, *Nat. Commun.*, **7**, 10217 (2016)
- 6) D. Branton *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **26**, 1146 (2008)
- 7) M. Wanunu, *Phys. Life Rev.*, **9**, 125 (2012)
- 8) G. M. Cherf *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **30**, 344 (2012)
- 9) R. Garzon *et al.*, *Annu. Rev. Med.*, **60**, 167 (2009)
- 10) X. Y. Zhang *et al.*, *ACS Nano*, **8**, 3444 (2014)
- 11) N. Kosaka *et al.*, *Cancer Sci.*, **101**, 2087 (2010)
- 12) S. Kumar *et al.*, *Sci. Rep.*, **2**, 684 (2012)
- 13) J. Li *et al.*, *Nature*, **412**, 166 (2001)
- 14) S. Garaj *et al.*, *Nature*, **467**, 190 (2010)
- 15) M. Wanunu *et al.*, *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 160 (2010)
- 16) L. M. Adleman, *Science*, **266**, 1021 (1994)
- 17) Y. Benenson *et al.*, *Nature*, **414**, 430 (2001)

- 18) K. Sakamoto *et al.*, *Science*, **288**, 1223 (2000)
- 19) C. Jung *et al.*, *Acc. Chem. Res.*, **47**, 1825 (2014)
- 20) Y. Benenson *et al.*, *Nature*, **429**, 423 (2004)
- 21) R. Kawano *et al.*, *Sci. Rep.*, **3**, 1995 (2013)
- 22) R. Kawano *et al.*, *PLoS One*, **9**, e102427 (2014)
- 23) K. Funakoshi *et al.*, *Anal. Chem.*, **78**, 8169 (2006)
- 24) M. Ohara *et al.*, *Electrochemistry*, **84**, 338 (2016)
- 25) M. Ohara *et al.*, *ACS Synth. Biol.* (2017), DOI: 10.1021/acssynbio.7b00101.
- 26) M. Hiratani *et al.*, *Anal. Chem.*, **89**, 2312 (2017)
- 27) A. Tamotsu *et al.*, *Proc. MicroTAS*, p.579 (2016)