

特集 Le Polymère – 考える高分子

ナノポア計測によるDNA演算情報の復号化



滝口創太郎

東京農工大学工学部生命工学専攻
[184-8588] 小金井市中町2-24-16
博士後期課程在学中。

s-takiguchi@st.go.tuat.ac.jp



川野竜司

東京農工大学工学部生命機能科学部門
同左
教授, 博士(工学).
専門はマイクロ分析化学.
rjkawano@cc.tuat.ac.jp
http://web.tuat.ac.jp/~rjkawano/

1. はじめに

DNA コンピューティング (DNA 分子による演算) において、入出力の情報媒体はDNA分子である¹⁾。これにより入力情報をDNA塩基配列として自由に設計できる一方で、DNA分子に符号化された出力情報は人間の目に見える形に変換して解読する必要がある。この復号化ステップには、これまでPCRなどによる核酸増幅、電気泳動や蛍光ラベルを用いた核酸検出が用いられてきた。これらの操作は時間と手間がかかる上に、出力分子やその情報を次の入力として扱づらいという課題があった。本稿では、最近筆者らが取り組んでいるナノポア計測を用いたDNA演算情報の復号化と病理診断への応用について概説する。

2. ナノポア計測

ナノポア計測は、細胞をカウントするコールターカウンター法をナノスケールに拡張させたものだと考えることができる。ここで用いるナノサイズの細孔(ナノポア)には、ポア形成膜タンパク質を利用する生体ナノポアと、ナノ微細加工により人工的に作製する固体ナノポアがある。生体ナノポア計測では、脂質二分子膜中にナノポアタンパク質を再構成し、膜の両側に電圧を印加する。これによりポアを通過するイオンの流れをイオン電流として計測できる(図1a)。印加電圧

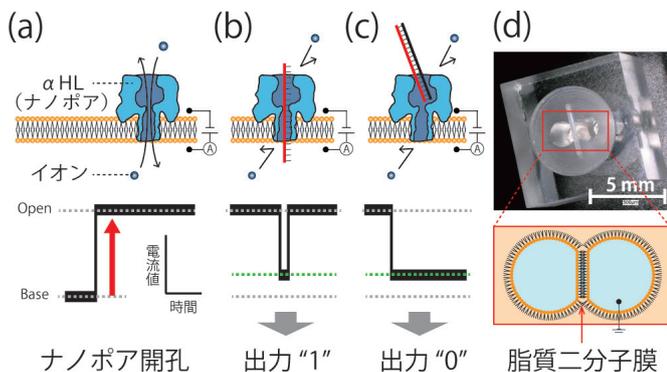


図1 (a) ナノポア計測の原理. (b, c) 出力0, 1の核酸構造と電流阻害シグナル. (d) ナノポア計測デバイス.

下で電気泳動により分子がナノポアの中を通過すると、その間はイオンの流れが阻害されるため、一分子の通過を電流阻害シグナルとして観測できる。 α -hemolysin (α HL) という黄色ブドウ球菌由来のナノポアタンパク質は、直径が1.4 nmと一本鎖DNA (直径約1 nm) の計測に適していることから、一分子DNAシーケンスを目的として膨大な研究が行われてきた²⁾。実際にナノポアDNAシーケンサーは α HLとは異なるナノポアで実装され、2015年に市販化されている。このようにナノポア計測ではDNAを一分子レベルで電氣的に計測でき、原理的にはその配列もリアルタイムで読むことができる。

3. ナノポア計測による復号化と応用

3.1 情報科学的DNA演算の復号化

筆者らはこれまでに二つの液滴の接触界面に安定的な脂質二分子膜を形成させ、そこでナノポア計測を行うマイクロデバイスを提案してきた(図1d)。これを利用し、この液滴中でDNA演算を行い、その出力情報を液滴界面に再構成したナノポアで計測する復号化システムを紹介する。はじめに入出力の情報を“1”, “0”で扱うDNA分子によるNAND演算の実装とナノポア計測による復号化を試みた³⁾。出力DNAがポアを通過可能な一本鎖もしくはポアに詰まる二本鎖を形成するように、入力DNAを配列設計した。これにより、ナノポア計測で得られる瞬時の電流阻害から出力“1”, “0”を容易に見分け(図1b, c)、演算から復号化までを約10分で実装した。次に、より高度な情報処理として酵素反応を組み込んだAND演算の実装と復号化に取り組んだ³⁾。出力“1”として転写反応により一本鎖RNAが増幅される分子反応系を設計することで、RNAが示す電流阻害シグナルの頻度から出力“1”の検出を可能にし、約1時間での情報処理に成功した。DNA演算は、上述のように単純な“1”, “0”の演算に加えて、さらに複雑な情報処理ができる。そこでDNA演算のバイオニック的研究である並列計算に関してナノポア計測による復号化に取り組んだ。

実際には1994年にAdlemanが報告したハミルトン閉路問題を計算するDNA演算(巡回セールスマン問題の

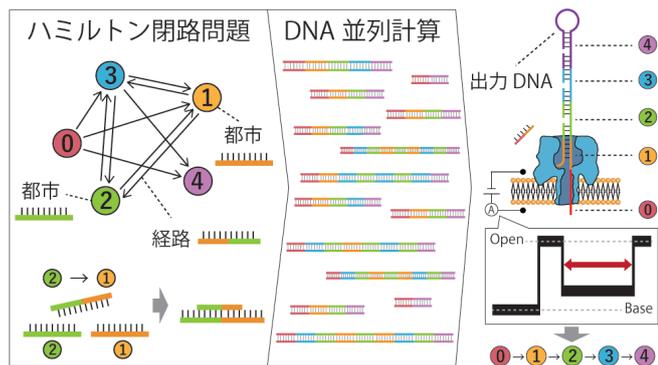


図2 ハミルトン閉路問題に対するDNA並列計算とナノポア計測による出力情報の復号化

ように各都市を一筆書きで巡回できる経路を探索する組み合わせ最適化計算)の復号化を目指した⁴⁾。ここでは、出力DNAが図2に示す特殊な二本鎖構造をとるように計算用DNAを配列設計した。この出力DNAは、結合した相補鎖を乖離しながらゆっくりとナノポアを通過するため、その阻害時間を統計解析することで出力情報を復号化することに成功した。以上より、ナノポア計測による復号化システムの利点として、DNAの配列設計次第で多岐にわたる出力情報を復号化できる点、演算直後に迅速復号化できる点が挙げられる。またDNA演算情報を電気信号に変換するため、従来の半導体型コンピューターとの組み合わせが期待できる。

3.2 病理診断への応用

DNA演算は並列計算や論理演算といった情報科学的な研究に加えて、DNA分子の生体親和性を利用した病理診断への応用が期待されている。ここでは最近筆者らのグループが取り組んでいる、DNA演算とナノポア計測の組み合わせを液体生検(リキッドバイオプシー)に応用する研究を紹介する。標的としているmicroRNA(miRNA)は短鎖(18~25 nt)ノンコーディングRNAで、がんの早期診断マーカーとして注目されている。腫瘍細胞からがん種特異的な配列のmiRNAが分泌され、体液中で複数種類miRNAの発現量が上昇・低下といった複雑なパターンを示す。筆者らはDNA演算がこのmiRNAのパターン認識に有用だと考え研究に取り組んでいる。はじめに単純な系として2種類のmiRNAが発現上昇する小細胞肺癌に関して検討した⁵⁾。標的miRNAをAND演算における入力分子として利用し、ナノポア計測により出力情報を復号化する診断システムを構築した。ここでは2種類の標的miRNAが存在する場合のみ4-way junction(4WJ)構造を形成するように診断(計算)用DNAを設計した(図3)。どちらのmiRNAも存在しない場合、どちらか一方しか存在しない場合には4WJのような高次構造を形成しないため、核酸分子はナノポアを高速に通過し、瞬時の電流阻害シグナルが得られる。一方、2種類のmiRNAが同時に存在する場合、4WJはナノポアを

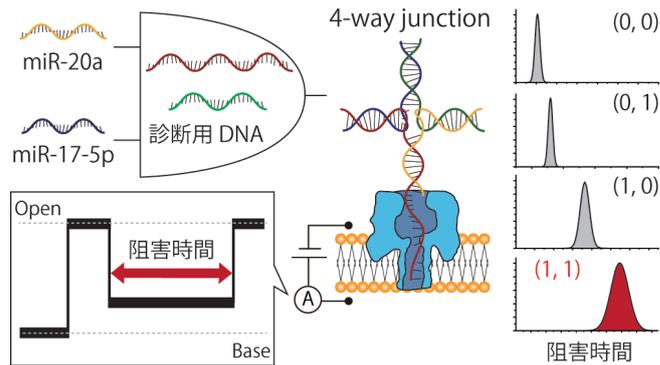


図3 診断用DNAと標的miRNAによるAND論理演算を用いたmiRNAパターン認識と復号化

通過できずに時間の長い電流阻害シグナルを示す。これによりmiRNAの濃度が低い健康状態と、がん罹患しmiRNAの発現量が上昇した状態を区別できた。さらに複雑なmiRNA発現パターンを認識できるか確かめるため、5種類のmiRNAが発現上昇する胆管がんに関して検討した⁶⁾。五つのmiRNA結合サイトを有する診断用DNAを設計した。これにより診断用DNAに結合するmiRNAのパターンがシグナルの阻害時間として出力され、実際に実検体を用いて健常患者とがん患者を識別できた。以上のようにDNAのプログラマブルな配列設計を活かして出力分子に任意の構造を形成させることで、ナノポア計測により複雑な情報を復号化できる。またpMオーダーの低濃度核酸を検出可能なナノポア計測は、簡易診断ツールとしての実用化が期待できる。

4. おわりに

本稿ではナノポア計測の原理から、DNA演算情報の復号化への応用、そして病理診断への応用に関して概説した。DNA分子をラベルフリーに検出し、DNA演算情報を電気信号へと変換可能なナノポア計測は、DNA分子と従来型の電気デバイスの橋渡しになると期待できる。さらにDNA演算と組み合わせることで、次世代のリキッドバイオプシーにおける強力な病理診断ツールの一つになる可能性が高い。また欧米や中国ではナノポア計測に関する研究が盛んに行われ、急速に技術が発展してきているが、日本ではまだ研究者の数が少ない。今後日本でもナノポア関連研究が発展することを期待したい。

文 献

- 1) L. M. Adleman, *Science*, **226**, 1021 (1994)
- 2) J. J. Kasianowics, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13770 (1997)
- 3) R. Kawano, *Biotechnol. J.*, **13**, 1800091 (2018)
- 4) S. Takiguchi and R. Kawano, *Nanoscale*, **13**, 6192 (2021)
- 5) M. Hiratani and R. Kawano, *Anal. Chem.*, **90**, 8531 (2018)
- 6) N. Takeuchi, M. Hiratani, and R. Kawano, *ChemRxiv* (2021)

Nanopore Decoding for DNA Computing and Its Development for Diagnostic Applications 0



Sotaro TAKIGUCHI

Tokyo University of Agriculture and Technology
Student
s-takiguchi@st.go.tuat.ac.jp



Ryuji KAWANO

Doctor of Engineering
Tokyo University of Agriculture and Technology
Professor
rjkawano@cc.tuat.ac.jp
http://web.tuat.ac.jp/~rjkawano/index_en.html

DNA computing has attracted attention as a tool for implementing various mathematical models. However, decoding the output information to a human-recognizable signal generally requires time-consuming processes or fluorescence detection. To employ rapid and label-free decoding, nanopore technology, an emerging tool for single-molecule sensing, is proposed as a promising candidate for the electrical decoding of DNA computations. Nanopores can recognize and identify the individual molecules as an ionic current blockage, leading us to take advantage of the sequence-programmability of DNA. We here briefly review our recent results of nanopore decoding for mathematical DNA computing. In addition to such mathematical applications, DNA computing is expanding the research field to diagnostic applications due to the biocompatibility of DNA. As a real-life application of our proposed method, we here introduce our recent work on nanopore-based microRNA detection and DNA computing-assisted pattern recognition for cancer diagnosis. We believe that nanopore technology paves the way for the social implementation of DNA computing/storage technology.

Keywords: Nanopore / DNA / Computing / Decoding / MicroRNA / Pattern Recognition / Diagnosis / Liquid Diopsy / Microfluidics