

核酸の動的構造のプログラミングを利用した 標的分子の高感度検出

北村 裕介, 井原 敏博

1 はじめに

本進歩総説は、主に 2015 年前後から 2020 年までの進歩について記述した。

互いに特異的に結合するタンパク対を合理的にデザインすることは容易ではない。一方、核酸に関しては、相補的な関係にある塩基を順に配列するだけで互いに結合する分子対が得られる。平衡状態における核酸構造（静的構造）やその熱力学的安定性の予測や調整も可能であるため、分子認識素子からナノ材料に至る様々な用途で利用されている。近年における核酸科学の進歩によって、核酸構造の非平衡ダイナミクスデザインの（動的構造のプログラミング）も容易になってきており、核酸を基体とした分子デバイスや分子マシンも次々と創出されている。本稿ではその中でも特に、分析化学的应用に特化した研究例を紹介する。

2 動的構造のプログラミングと鎖交換反応

リボスイッチは、部分的に形成する一本鎖構造（ローカルな構造）へのイオンや小分子の相互作用をトリガーとし、熱力学的により安定な構造へと全体構造を変化させている。この機構は様々な生体内反応の制御に利用されており、まさに天然の分子デバイスといえよう¹⁾。

近年、様々な人工の核酸ナノデバイスが創出されてきているが、それらの動的プログラミングに広く利用されているのが一本鎖突出（トーホールド）領域を利用した鎖交換反応である。二本鎖形成反応の平衡を支配する環境パラメーター（塩濃度、pH、温度）を変化させることで動作する分子デバイスとは異なり、鎖交換反応を原理として動作する核酸デバイスは、一定環境下において、インプット（標的）分子に応答して動作するのが特徴である。

図 1a に鎖交換のモデル反応を示す。末端にトーホールド領域を残してプラットフォーム鎖（**P**）とマスク鎖（**M**）に二本鎖を形成させる。この **P/M** 二本鎖に対し、**P** と完全に相補的である侵入鎖（**I**）を加えると、**I** は Amplified Detection of Target Molecules Based on the Dynamic Programming of Nucleic Acids Structure.

トーホールドから **P** にハイブリダイズする。**P/I** 二本鎖が **M** が結合している領域に差し掛かると **P** との塩基対形成において **M** と **I** は競合するようになる。生じた分岐構造において **M** の一塩基と **I** の一塩基のどちらが **P** と結合しても系の正味の自由エネルギーは変化しないため、**I** が **M** の領域に侵入しながら結合する反応と、**I** が形成した塩基対がほどこ **M** が **P** と再結合する反応が同程度に起こる（ランダムウォーク）。**M** と **I** が **P** と形成する塩基対を交換する度に分岐点の位置が前後に移動するが、このランダムウォークを経て前方に駆動し終わった複合体からは **M** が放出され、熱力学的に最安定構造である **P/I** 二本鎖となる。鎖交換反応の駆動力となる自由エネルギーは、トーホールド領域において形成した塩基対分のエンタルピーゲインに起因する²⁾。図 1b に示すとおり、鎖交換の反応速度はトーホールドの長さとともに上昇し、約七塩基以上であれば最大速度で進行する³⁾。

トーホールドより内側の分岐構造が生じる領域（以後、侵入領域）におけるミスマッチ塩基が鎖交換効率に与える影響は、その場所とトーホールドの長さによって異なる。図 1c に示すとおり、トーホールドの長さが六、七塩基の場合、トーホールドから近い位置にミスマッチ塩基が存在すると鎖交換の速度は大幅に減少する。一方、遠い位置にミスマッチ塩基が存在する場合は、鎖交換反応の進行に対して与える影響は限定的であり、その鎖交換効率はフルマッチの場合とほとんど差異がない。トーホールドの長さが十塩基以上になると、全体的にミスマッチ塩基による鎖交換速度の低下幅が小さくなる。これらの理由から、トーホールド長の設計は、高い選択性を担保する際に非常に重要な要素となる⁴⁾。

トーホールドにおけるミスマッチ塩基についても、トーホールドと侵入領域の境界付近に存在すると、鎖交換反応が大きく抑制されることが明らかになっている。また同様に、長いトーホールドではミスマッチ塩基対が鎖交換効率に与える影響が低下する傾向にある⁴⁾。

また、図 1d に示すとおり、Chen はトーホールド (**I**₁) と侵入領域 (**I**₂) を会合させることで得た **I** 鎖を用いると、これらが協同的に鎖交換反応を進行させるため、反

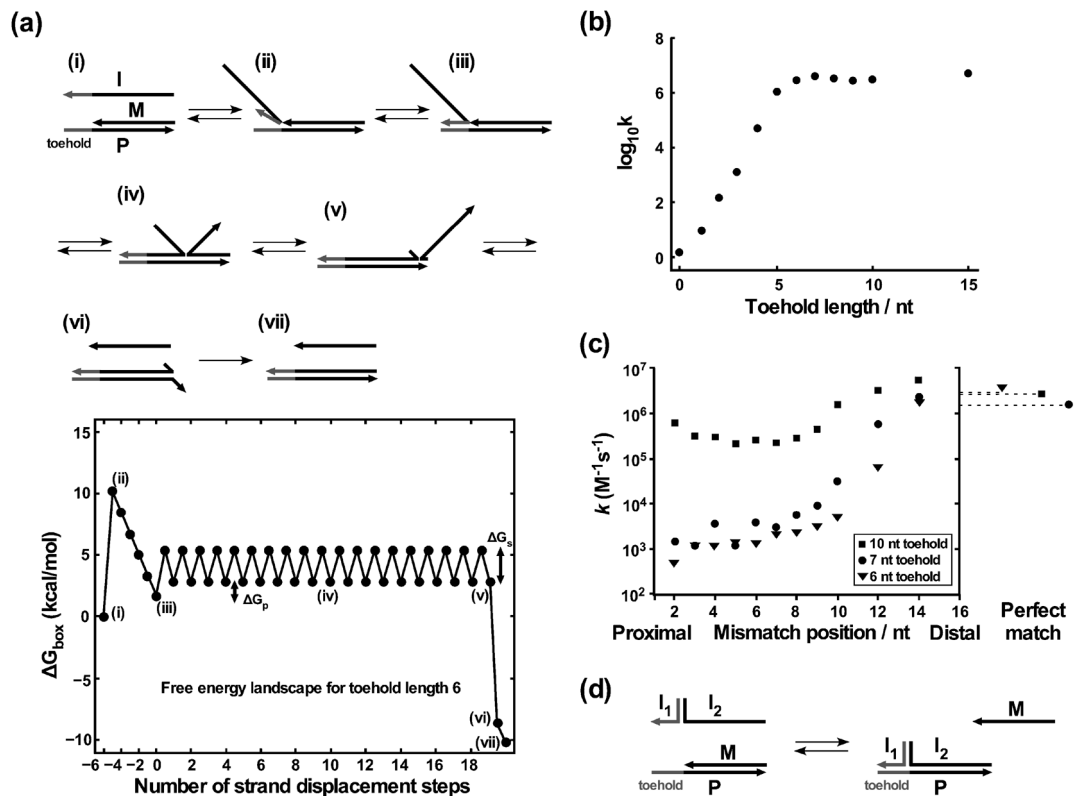


図 1 (a) プラットホーム鎖 (P) とマスク鎖 (M) から形成される二本鎖 (矢印側が 3' 末端を意味する) に対し、トーホールドへの結合をきっかけとして侵入鎖 (I) が鎖交換反応を起こし、M が放出される概要図 (上図)。並びにその過程における自由エネルギー変化 (下図)。(iv) の状態では両側に突出領域を有する分岐構造が形成される。両突出領域間の静電的反発などを考慮すると (iii) より ΔG_p 分不安定な構造であると考えられる。I が侵入する際、ペナルティーを支払って P を剥がすが、境界領域で塩基間のスタッキングが起こるため、ローカルな安定化状態に陥る (ΔG_s)。トーホールド領域での塩基対形成に起因する自由エネルギー変化量より ΔG_s が大きい場合、鎖交換反応速度は極めて遅くなる [Oxford University Press より許諾を得た上で改変後、転載²⁾]。 (b) トーホールドの長さ と鎖交換速度の関係性 [American Chemical Society より許諾を得た上で改変後、転載³⁾]。 (c) 侵入領域におけるミスマッチ部位と鎖交換反応速度の関係性。部位 2 はトーホールド領域と侵入領域の境界点から二塩基分内側の箇所を示す。図外右側のプロットは完全相補鎖の鎖交換反応の速度定数を示す。 [Nature Publishing Group より許諾を得た上で改変後、転載⁴⁾]。 (d) I_1 と I_2 の会合による協同的鎖交換反応。

応特異性が向上することを見出した⁵⁾。この協同的な鎖交換技術を利用して様々なバイオセンシングが達成されており、特に近接結合分析(プロキシミティーアッセイ)への応用が効果的である⁶⁾。

3 核酸を基体としたセンサーデバイス

標的分子との相互作用をきっかけとした核酸の構造変化に応じて、あらかじめ修飾しておいた分子の機能の発現を制御できれば、核酸を基体とした分子ナノデバイスを構築できる。なかでもモレキュラービーコンは最も著名なセンサーデバイスであろう。ヘアピン型のオリゴヌクレオチドの両末端にそれぞれ導入された蛍光色素とその消光剤は近接しているため、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) により、発光がオフの状態にある。ループ部分 (もしくは

ループとステム部位) に相補的な配列を有する標的核酸が加えられるとヘアピン構造が開き、両末端間の距離が広がる。これにより FRET が解消されるため、蛍光応答を得ることができる⁷⁾。この FRET 解消の原理は、上述の鎖交換反応と組み合わせる用いられることが多い (図 2a)。

また、核酸アプタマー (抗体のように標的分子と特異的に結合する核酸) を利用することで核酸以外の分子を標的とするセンサーを設計することもできる (図 2b)^{8)~11)} また、特定の核酸配列に変換し、アウトプットすることも可能である (図 2c)。

なお、蛍光剤と消光剤を、電気化学的に活性な分子 (フェロセン) とその電気化学的クエンチャー (シクロデキストリン) との組み合わせに代えることで、電気化学的センサーデバイスを構築することもできる¹²⁾。

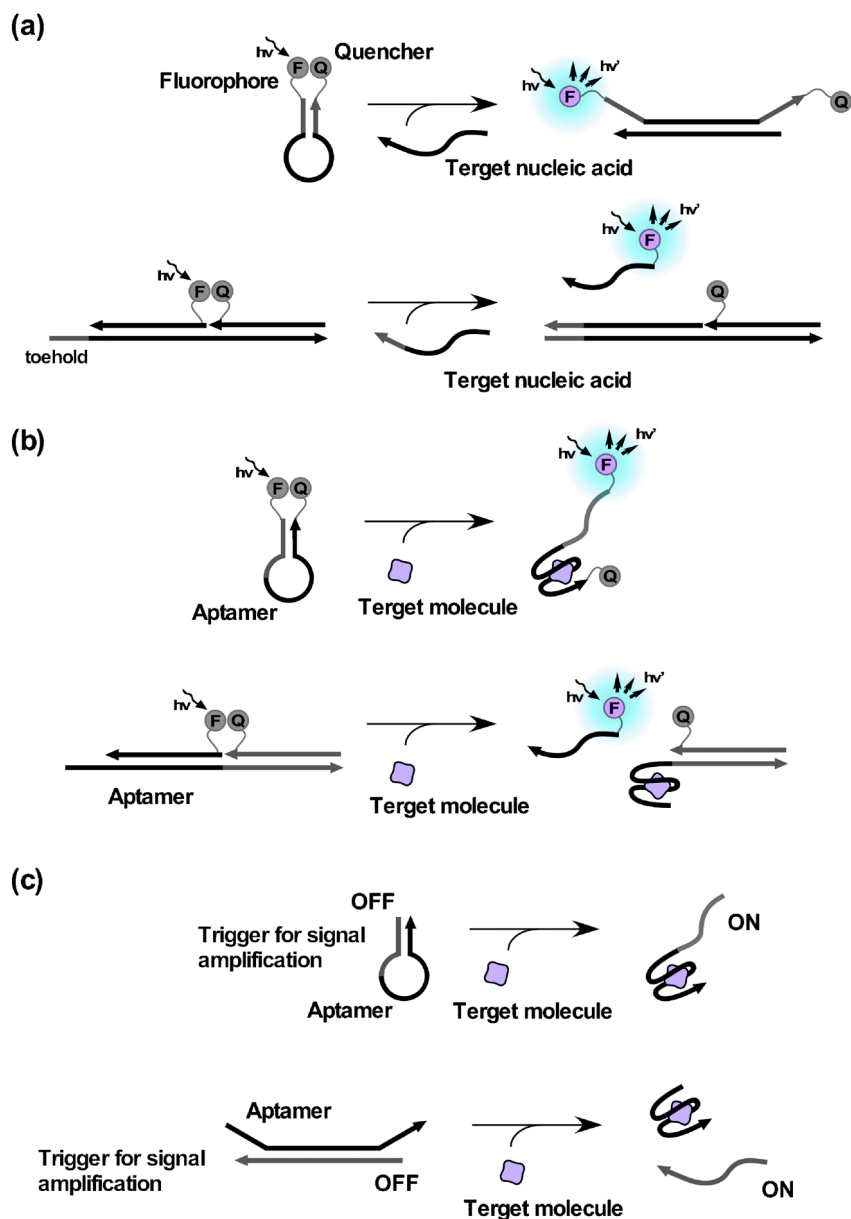


図2 (a) モレキュラービーコンの開閉ならびに鎖交換反応を利用した核酸センサー。(b) アプタマーを利用した分子センサー。(c) アプタマーを介した標的分子検知情報の変換。

これらはすべて一般性が高くシンプルな動作原理であるが、インプット(標的分子)の量に比例するアウトプット(検出シグナル)量しか得られない¹³⁾。そのため、図2cにおいて放出された核酸(アウトプット核酸)を、次項以降で紹介するシグナル増幅反応のトリガーとして利用することが検討されている^{14)~16)}。

4 鎖交換反応を連鎖させたシグナル増幅

4.1 DNA サーキット

現在、バイオ分子の検出シグナルの増幅には、酵素反応、もしくは以下の二種の核酸を基体とした連鎖的反応(DNA サーキット)が利用されている¹⁷⁾。

- ① 連鎖的鎖交換反応によるシグナル増幅。
- ② デオキシリボザイム(酵素機能を有する核酸)の触

媒サイクルを利用したシグナル増幅。

ここでは①に絞って話をする。鎖交換反応を組み合わせたシグナル増幅において主に以下の三種の動的構造プログラミングが利用される。

- (i) エントロピー駆動型触媒反応(entropy-driven catalysis, EDC)。
- (ii) ハイブリダイゼーション連鎖反応(hybridization chain reaction, HCR)。
- (iii) 触媒的ヘアピン会合反応(catalytic hairpin assembly, CHA)。

(i), (iii)においては、反応中間体が、一本鎖核酸もしくは一本鎖ドメインを有するヘアピン状核酸と結合した際に、トリガーとなるインプット核酸を再生するようにプログラムされている。(ii)においては、反応中間体が続

鎖交換反応を次々に誘起するようプログラムされている。そのため、いずれの場合においてもインプットからより多くのアウトプットを得ることができる。

生体中では、その化学結合にエネルギーを貯蓄した ATP のような燃料分子が消費され、種々の連鎖的反応が進行している。これに対して、人工の核酸による連鎖的反応①では、反応前の核酸は、熱力学的に準安定な構造として一本鎖ドメインに自由エネルギーを貯蔵している燃料とみなすことができ、これを消費することで反応を進行させている。

4.2 エントロピー駆動型触媒反応 (EDC)

図 3a に示すとおり、それぞれマスク 1 (M1)、マスク 2 (M2)、プラットフォーム (P) の三本の鎖から形成されるタンデム二本鎖複合体に標的一本鎖核酸を加えると、末端のトーホールドから結合が起こり、M2 が外れる。その際、新たに出現したトーホールドをきっかけとし、標的と M1 を剥ぎ取りながら燃料となる一本鎖 (F) が結合する。反応前後で形成される塩基対の種類と数は同じだが、一本の鎖が結合し、二本の鎖が放出されるため、他の二つとは異なり、エントロピーゲインを駆動力として進行する連鎖反応である。タンデム二本鎖複合体と F を過剰に入れておけば、放出された標的は、触媒的に次の鎖交換反応を開始する。その過程で放出された多数の M1 がそれぞれ発光を与える鎖交換反応を実行するように設計しておけば、微量の標的から増幅発光シグナルを得ることができる¹⁸⁾。図 3b に示すとおり、Zhang らは標的と M1 を同じ配列にすることで、サイクルごとに触媒が二倍になる系を設計した。これは生成物が次の反応の触媒になる自己触媒反応であり、反応時間に対して指数関数的にシグナルが増幅する¹⁸⁾。また、彼らは、アロステリックな触媒鎖を用いたシグモイドな応答を示す EDC についても報告している¹⁹⁾。

電気化学的な検出にも適応可能である。筆者らは M1

の末端にフェロセンを、M2 の末端にシクロデキストリンを修飾し、P 上で形成したタンデム二本鎖複合体を形成させた。その境界領域で近接効果により包接化合物が形成し、フェロセンは物理的に遮蔽される (電気化学シグナルオフ)。ここに標的核酸と F を加えると両者が P から放出され、電気化学的な増幅シグナルが得られる²⁰⁾。Yin らは金電極上に修飾した一本鎖 DNA にフェロセン修飾 DNA を相補的に結合させ、その電極を EDC 溶液に浸漬した。標的の添加に伴い、メチレンブルー修飾 M1 が遊離し、これが鎖交換反応によって電極上のフェロセン修飾 DNA と置き換わる設計である。結果、レシオメトリック (フェロセンのシグナルの減少とメチレンブルーのシグナルの増加) な標的の検出に成功している²¹⁾。

4.3 ハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR)

Dirks らによって開発された HCR では、トーホールドを有する二つのヘアピン DNA から、数千塩基長の直鎖状ポリマーが形成される (図 4a, 4b)。両 DNA は、互いに相補的な配列を部分的に有してはいるが、その領域はヘアピン構造のステム中に埋もれているため、速度論的にトラップされ、熱力学的な準安定状態として溶液中で共存可能である。そこに標的が添加されると、トーホールドから結合し、一つ目のヘアピン DNA が開環する。続いて新たに出現した一本鎖領域が二つ目のヘアピン DNA のトーホールドに結合し、これを開環する。ここで、二つ目から出現した一本鎖領域が一つ目のヘアピン DNA を開環するように設計しておくことで、コンカテマー様の交互会合体が得られる²²⁾。その各境界領域にて多数の発光体が形成されるように蛍光色素を修飾しておくことでシグナルを増幅することができる²³⁾。この会合伸長反応を図 4c に示すように分岐させるような配列設計にすれば (分岐 HCR)、さらに高密度の発光シグナルを得ることも可能である^{24)~26)}。

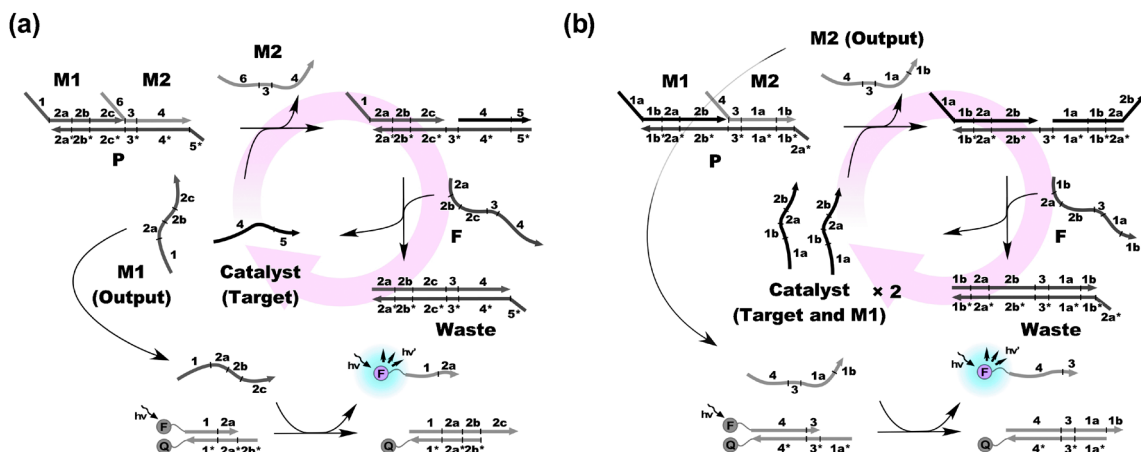


図 3 (a) エントロピー駆動型触媒反応 (EDC) を利用したシグナル増幅。(b) 指数関数的に発光シグナルを増幅可能な EDC。

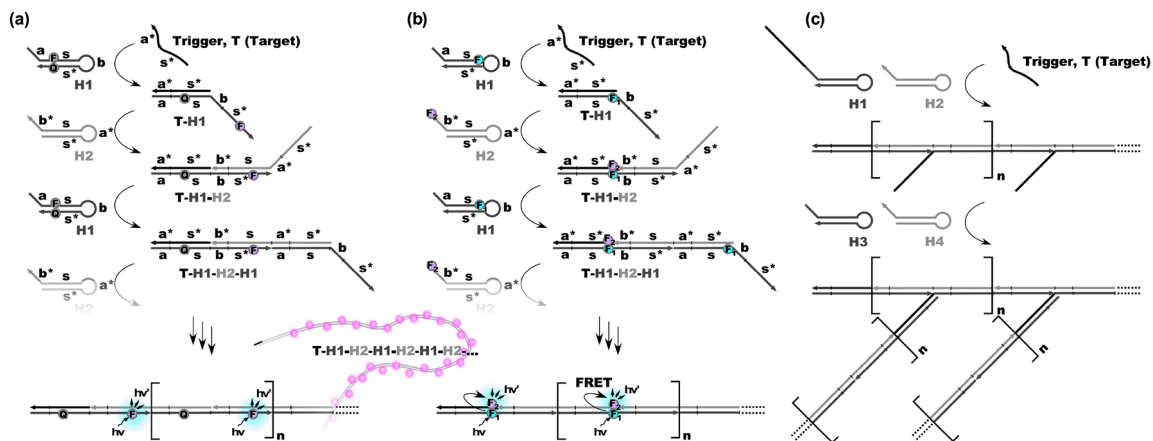


図4 ハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR) を介したナノワイヤー状の発光体の形成。(a) FRET 解消を利用したシグナル増幅。(b) FRET を利用したレシオメトリックなシグナル増幅。(c) 分岐 HCR の概要図。

Yang らは金電極上に標的の相補鎖を修飾した。この電極上に捕捉された標的遺伝子を用いて HCR を開始し、電極上に長鎖二本鎖 DNA (アニオンポリマー) を生成させた。これに対してカチオン性の酸化還元活性を有するマーカー分子を多数静電的に結合させることで電気化学的手法にて 1 aM の標的遺伝子の検出に成功している²⁷⁾。Chang らは標的細胞に高発現している二種類の膜タンパクに着目した。これらに対するアプタマーにスプリットした HCR のトリガーをそれぞれ連結し、両タンパクに結合させた。これらの高発現タンパクは細胞膜上で近接するため、そこで協同的に HCR 反応を開始するトリガーが形成される。結果、高選択的な標的細胞の検出が達成されている²⁸⁾。Tang らも同様な原理を利用して、200 μ L 中のわずか 20 個の標的細胞の高選択的検出に成功している²⁹⁾。

4.4 触媒的ヘアピン会合反応 (CHA)

図 5a に示すとおり、CHA は二つ (もしくはそれ以上) のヘアピン DNA が触媒的に会合する反応である。標的核酸が一つ目のヘアピン DNA を開環するところまでは HCR と同じである。CHA では、二つ目のヘアピン DNA は標的核酸と置き換わりながら一つ目のヘアピン DNA と結合する。放出された標的核酸は、再生された触媒のように次のヘアピン DNA の開環会合反応を開始する³⁰⁾。HCR ではヘアピン DNA を消費し続けるまで構造が拡大し続けていくが、CHA では同じ構造を多数与える。また、CHA は HCR より速い速度で進行する。

二つ目のヘアピン DNA が開環した際に新たに出現する一本鎖領域を利用すると発シグナル応答を与えるシステムを構築できる。同領域が、同時に加えておいた蛍光色素修飾 DNA と消光剤修飾 DNA からなる二本鎖からその一方を引き剥がす設計にすることで、増幅型の発光シグナルが得られる。また、同領域をトリガーとして第

二の CHA サイクルが開始するように設計すれば、シグナルを指数関数的に増加させることも可能である (図 5b)。Li らは同領域に相補的な核酸を修飾した電極とメチレンブルー修飾ヘアピン DNA を用い、シグナル増幅型電気化学センサーを構築した³¹⁾。Hu らは、患者の血清中のマイクロ RNA を用いて得られた CHA 産物を、全反射照明蛍光顕微鏡のイメージングチャンネル表面に修飾された核酸との二本鎖形成により捕捉し、一分子観察することに成功している³²⁾。

また、適切にデザインされた複数のヘアピン DNA を用い、これらを会合させてユニークな DNA 会合体を形成させることが可能である。三種のヘアピン DNA を収束的に会合させると三分岐構造が形成され (図 5c)、四種を会合させると十字形の複合体が形成される。発散的に会合させれば dendritic 様の構造も形成可能である (図 5d)³⁰⁾。

5 細胞内イメージングへの応用

5.1 固定化細胞における微量標的分子のイメージング

等温条件下でシグナルを増幅可能な enzyme-assisted target recycling (EATR), loop-mediated isothermal amplification (LAMP), rolling circle amplification (RCA), transcription-mediated amplification (TMA), tyramide signal amplification (TSA), nitro blue tetrazolium/5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (NBT/BCIP) 発色法, enzyme-labeled fluorescence signal amplification (ELF) などのような酵素反応を用いれば、細胞の固定化と透過処理が必要とはなるが、細胞内の微量なバイオマーカーのイメージングが可能である。DNA サーキットによる代用も可能であり、分岐 HCR を利用し、標的メッセンジャー RNA の高解像度かつ高感度なイメージングが実現している^{33)~36)}。Lin らは二次抗体にトリガーとなる一本鎖 DNA を修飾し、一次抗

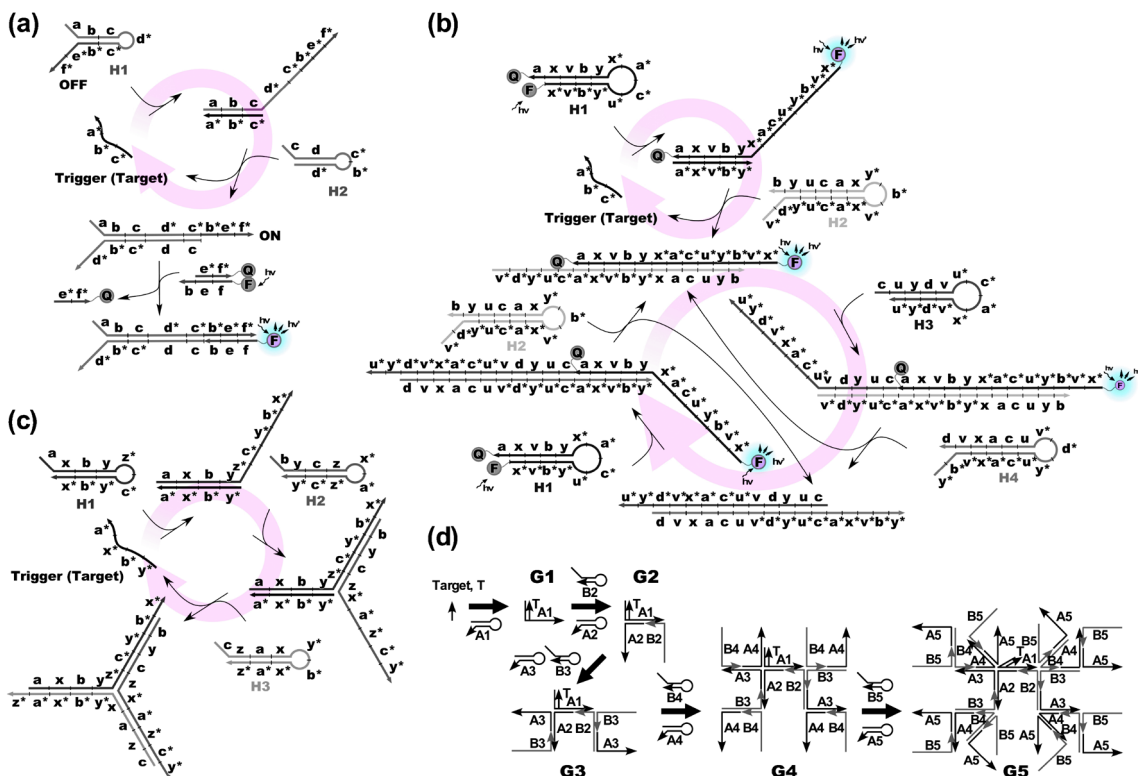


図5 (a)触媒的ヘアピン会合反応 (CHA) を利用したシグナル増幅。(b) 指数関数的に発光シグナルを増幅可能な CHA。(c) 三分岐構造の産物を生成する CHA。(d) デンドリマー様産物を生成する CHA。

体に認識された標的タンパク質上に HCR の開始点を導入した。HCR 反応を行ってみると、その検出感度はウエスタンブロットの 100 倍程度高く、化学発光を使った手法と同等の検出感度を示すことがわかった³⁷⁾。

5.2 生細胞内における微量標的分子のイメージング

酵素や抗体を安全かつ高効率に生細胞内へ輸送することは困難である。一方、トランスフェクション試薬やキャリアを利用して導入した核酸は、生細胞内においても問題なく機能することが知られている。そのため、微量バイオマーカーの生細胞イメージングに DNA サーキットによるシグナル増幅技術の利用が検討されている。実際に HCR³⁸⁾³⁹⁾, CHA⁴⁰⁾, EDC⁴¹⁾ 用の核酸を代表的なトランスフェクション試薬であるリポフェクタミンを用いて生細胞内に導入し、これらの DNA サーキットを駆動させることで、微量な標的マイクロ RNA の検出に成功している。

DNA サーキット核酸の細胞内導入用キャリアの開発も活発に行われている。Wu らは、表面をカチオン性ペプチドで修飾した金ナノ粒子に蛍光色素を修飾した二つのヘアピンループ DNA を静電的に吸着させ、細胞内に導入した。金ナノ粒子は細胞内導入剤としてだけでなく、消光剤としての役割も担っている。HCR のトリガーとなる標的メッセンジャー RNA の結合にともなって長鎖生成物を生じ、金ナノ粒子から遊離するため、細胞内にて HCR 産物が強く発光する様子が確認された⁴²⁾。

Chu らは HCR 用の一つのヘアピン DNA の骨格中に光切断性リンカーを導入し、アップコンバージョンナノ粒子に吸着させて生細胞内に導入した。細胞にダメージが少ない近赤外光の照射により骨格が切断され、トーホールドが出現する設計となっており、光照射による HCR 反応の時空間的制御に成功している⁴³⁾。Shen らも同様な原理にて、生細胞内における CHA の時空間的制御を実現している⁴⁴⁾。

Wang らは CHA の一つのヘアピン DNA の片末端を金ナノ粒子で、逆末端を蛍光色素で修飾したナノビーコン (FRET により蛍光オフ) を作成し、これを細胞に導入した。もう一方のヘアピン DNA はリポフェクタミンで導入したところ、標的とするマイクロ RNA (miR-21) により両者が会合し、FRET が解消されて細胞内から発光が確認された⁴⁵⁾。

He らは EDC の **M1** を多数修飾した金ナノ粒子上で、量子ドットを修飾した **M2**, ならびに **P** とタンデム二本鎖複合体を形成させ、これを細胞内に導入した。標的とする miR-21 がこの複合体に結合すると、その量に応じた量子ドットが金ナノ粒子から解離する。しかしながら、miR-21 は微量であるため、量子ドットの発光はわずかにしか確認されない。ここに **F** を加えると、miR-21 が触媒的にこの反応を繰り返すため、細胞内から得られるシグナル強度が十倍程度増加し、生細胞イメージングが可能になることがわかった⁴⁶⁾。

酸化グラフェン (GO)⁴⁷⁾, 酸化マンガン (MnO₂)^{48)~50)},

窒化炭素⁵¹⁾等のナノシートは核酸の吸着剤ならびに消光剤としての機能を併せもつ。これらをキャリアとして HCR や CHA 用の蛍光色素修飾ヘアピン DNA を細胞内に導入することで、標的マイクロ RNA の生細胞内イメージングに成功している。中でも MnO₂ ナノシートは細胞内に高濃度に存在するグルタチオンによって還元され、溶解する。したがって、細胞内に輸送したヘアピン DNA を迅速にリリースすることが可能である。Hong らは GO や金ナノ粒子を用いて細胞内に HCR を起動する核酸を導入し、得られた HCR 産物を利用して生細胞内のテロメラーゼの検出に成功している⁵²⁾。細胞毒性が低いことで知られる硫化モリブデン (MoS₂) ナノシートもまた、核酸の吸着剤、消光剤としての機能を有する。Zhu らは CHA 用のヘアピン DNA と MoS₂ ナノシートを用いて miR-21 の検出を試みたところ、試験管内での実験にて検出感度 75.6 aM を達成し (非増幅系より五桁向上)、生細胞内においても高感度にイメージング可能であることがわかった⁵³⁾。

6 課題点とその解決に向けた取り組み

以上のとおり、核酸を基体としたシグナル増幅技術は近年、著しい発展を遂げている。しかしながら、実用レベルに至るまでには、一層の高感度化、高速化、高解像度化、ヌクレアーゼ耐性の向上、細胞内導入効率の向上、キャリアの細胞毒性の軽減、非特異的な反応のリークの高減など解決すべき多くの課題が残されている。

高感度化に関しては、主に増幅反応を重畳して実行する戦略が検討されている。Kim らはルテニウム錯体を修飾した二つのヘアピン DNA に標的 miR-21 を添加し、両末端に一本鎖領域とルテニウム錯体を有する CHA 産物を触媒的に生成させた。一本鎖領域にケージド蛍光色素を修飾した核酸プローブを結合させ、光を照射することで、光触媒的アンケージ反応 (二段階目の増幅反応) を進行させた。この核酸プローブはあえて四塩基と短い核酸部位から構成されているため、触媒反応場となる一本鎖領域への結合と解離を高速に繰り返している。同プローブを過剰に加えておき、二段階目の増幅反応を反復して起こすことで、fM オーダーの標的の検出を達成している⁵⁴⁾。Chen らは CHA 産物において生成される一本鎖領域を利用して次の CHA 反応を実行する仕組みを重ね、計四段から成る CHA を構築した。結果、60 万倍にシグナルを増幅することに成功した⁵⁵⁾。Xiong らは一段階目の増幅として EDC を行い、そこで触媒的に放出された **M1** を二段階目の CHA のトリガーとして利用することで 15.6 fM の検出感度を達成した⁵⁶⁾。Wang らは一段階目に CHA を実行し、得られた産物の末端において協同的に形成される一本鎖配列をトリガーとして、二段階目として HCR を行うことで、miR-21 の生細胞イメージングに成功している⁵⁷⁾。

HCR 産物のタンデム構造の境界部分において、ペルオキシダーゼ様の活性⁵⁸⁾や RNA 切断活性⁵⁹⁾⁶⁰⁾を示す DNA ザイムを形成させ、これらの触媒反応を二段階目の増幅反応として利用することも可能である。

筆者らは、バックグラウンド蛍光の抑制を目的とし、時間分解法への応用を試みた。HCR⁶¹⁾、CHA⁶¹⁾、EDC⁶²⁾のいずれを利用した場合においても、長寿命発光を与える希土類金属錯体を触媒的に形成させることが可能であることを報告している。

ヘアピン DNA の会合反応である CHA と HCR を比較してみると、CHA は高速に進行する反面、HCR 産物のような巨大な生成物を生じないため、より拡散し易い。そのため、高解像度なイメージングには不向きであると考えられている。そこで CHA 産物同士を会合し、巨大化する戦略が検討されている。Huang らはデオキシ化ヘアピン DNA 間で形成した CHA 産物同士をストレプトアビジンを用いてクロスリンクすることによって⁶³⁾、Yue らは三分岐構造の核酸を用いて CHA 産物同士を会合させることによって⁶⁴⁾、生細胞内の標的とするメッセンジャー RNA を高解像度でイメージングすることに成功している。

細胞導入に関しても新しい技術の開発が進んでいる。四面体の DNA がカベオラ介在性エンドサイトーシスによって高速に細胞内に導入されるという現象が近年、注目を集めている。図 6 に示すように He らは EDC 用のタンデム二本鎖複合体、ならびに燃料核酸にこの四面体 DNA を細胞内導入用キャリアとして付与した。また、この四面体は立体障害が要因となりヌクレアーゼによる分解を受けにくいことが知られており、これを付与した EDC 用の核酸も細胞内での安定性が向上することがわかった。六時間後においても核酸の分解に起因すると考えられるような発光シグナルの非特異的なリークは確認されなかった。また、細胞導入剤からシグナル増幅剤すべてが核酸で構成されているため、免疫原性や細胞毒性がほぼ確認されることがわかった⁶⁵⁾。Liu らは正方形の DNA 構造体を作成し、その内側に Cy3 もしくは Cy5 を修飾した二種類のヘアピン DNA を配置した。細胞内において miR-21 が CHA を開始し FRET シグナルを与える仕組みとなっている。この正方形 DNA は前述の四面体 DNA と同様にトランスフェクション試薬を用いることなく細胞内への導入が可能であり、高いヌクレアーゼ耐性を示した。また、ヘアピン DNA が互いに近接位に配置されているため、反応速度が約 7 倍上昇し、かつ反応効率が 2.6 倍上昇することがわかった⁶⁶⁾。これらの立体的な核酸を用いた細胞内導入技術は、細胞導入効率の改善、細胞毒性の軽減、ヌクレアーゼ耐性の向上という課題を一度に解決する可能性があり、大きな期待が寄せられている。新しい生体適合性キャリア、生分解性キャリアの探索も行われてきており、ポリマーナ

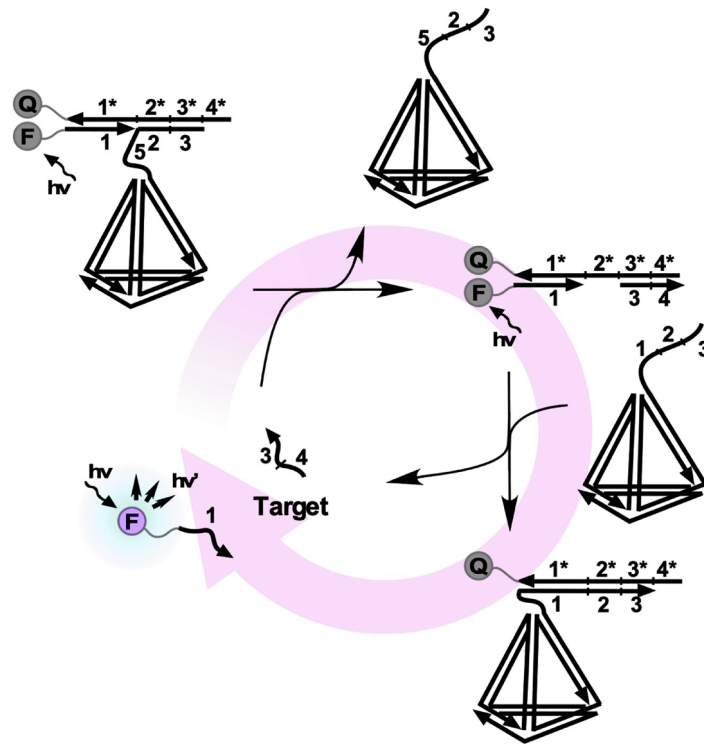


図6 四面体部位を有するDNA複合体を用いたEDCの概要図

ノ粒子⁶⁷⁾⁶⁸⁾やDNAオリガミ⁶⁹⁾なども注目されている。

酵素を介したシグナル増幅と比較すると、一連のDNAサーキットを用いたシグナルの増幅速度は遅い。そのため、鎖交換反応の高速化に関する研究も行われており、丸山らは、カチオン性の楕円コポリマーを分子シャペロンとして用いると鎖交換反応の速度定数が約四桁上昇することを見いだしている⁷⁰⁾⁷¹⁾。

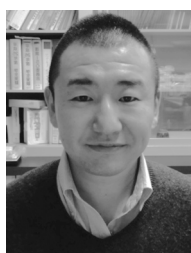
7 まとめと今後の展望

現在までのところ、生細胞内におけるDNAサーキットを用いた微量バイオマーカーのシグナル増幅型検出に関する研究の多くは、定性的な検出を最終ゴールとしており、詳細な増幅のプロセスやバイオマーカーの検出効率に関しては比較的曖昧である。標的分子の生細胞内ダイナミクスがプローブの結合や増幅のスピードより圧倒的に速い場合、これらの標的を高精度で追跡することは不可能といえよう。ヌクレアーゼによるプローブの分解のリスクを考慮すると、反応速度は単なる分析時間的コストの低減だけではなく、分析精度にも大きくかかわってくる。今後、反応の非特異的リークを抑えながら増幅反応を高速化する技術が開発されることで、この研究分野に大きなブレイクスルーがもたらされるであろう。

文献

- 1) A. Serganov, E. Nudler : *Cell*, **152**, 17 (2013).
- 2) N. Srinivas, T. E. Ouldridge, P. Šulc, J. M. Schaeffer, B. Yurke, A. A. Louis, J. P. K. Doye, E. Winfree : *Nucl. Acids Res.*, **41**, 10641 (2013).
- 3) D. Y. Zhang, E. Winfree : *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17303 (2009).
- 4) R. R. F. Machinek, T. E. Ouldridge, N. E. C. Haley, J. Bath, A. J. Turberfield : *Nat. Commun.*, **5**, 5324 (2014).
- 5) X. Chen : *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 263 (2012).
- 6) H. Liang, S. Chen, P. Li, L. Wang, J. Li, J. Li, H.-H. Yang, W. Tan : *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 4186 (2018).
- 7) S. Tyagi, F. R. Kramer : *Nat. Biotechnol.*, **14**, 303 (1996).
- 8) R. Nutiu, Y. Li : *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4771 (2003).
- 9) R. Nutiu, Y. Li : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 1061 (2005).
- 10) X. Zuo, S. Song, J. Zhang, D. Pan, L. Wang, C. Fan : *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 1042 (2007).
- 11) N. Hamaguchi, A. Ellington, M. Stanton : *Anal. Biochem.*, **294**, 126 (2001).
- 12) Y. Kitamura, K. Mishio, P. Arslan, B. Ikeda, C. Imoto, Y. Katsuda, T. Ihara : *Anal. Sci.*, **36**, 959 (2020).
- 13) H. Peng, A. M. Newbigging, M. S. Reid, J. S. Uppal, J. Xu, H. Zhang, X. C. Le : *Anal. Chem.*, **92**, 292 (2020).
- 14) S. Cheng, B. Zheng, M. Wang, M. H.-W. Lam, X. Ge : *Anal. Biochem.*, **446**, 69 (2014).
- 15) Y. Qin, D. Li, R. Yuan, Y. Xiang : *Nanoscale*, **11**, 16362 (2019).
- 16) D. Han, Z. Zhu, C. Wu, L. Peng, L. Zhou, B. Gulbakan, G. Zhu, K. R. Williams, W. Tan : *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 20797 (2012).
- 17) D. Zhao, Q. Yin, Y. Chang, M. Liu : *Trends Anal. Chem.*, **122**, 115706 (2020).
- 18) D. Y. Zhang, A. J. Turberfield, B. Yurke, E. Winfree : *Science*, **318**, 1121 (2007).
- 19) D. Y. Zang, E. Winfree : *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13921 (2008).
- 20) Y. Kitamura, K. Yoshimura, R. Kuramoto, Y. Katsuda, T. Ihara : *Anal. Sci.*, **37**, 533 (2021).
- 21) D. Yin, Y. Tao, L. Tang, W. Li, Z. Zhang, J. Li, G. Xie : *Microchim Acta*, **184**, 3721 (2017).

- 22) R. M. Dirks, N. A. Pierce : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15275 (2004).
- 23) J. Huang, Y. Wu, Y. Chen, Z. Zhu, W. Yang, C. J. Yang, K. Wang, W. Tan : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 401 (2011).
- 24) Y. Xu, Z. Zheng : *Biosens. Bioelectron.*, **79**, 593 (2016).
- 25) S. Bi, M. Chen, X. Jia, Y. Dong, Z. Wang : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **54**, 8144 (2015).
- 26) J. Wei, X. Gong, Q. Wang, M. Pan, X. Liu, J. Liu, F. Xia, F. Wang : *Chem. Sci.*, **9**, 52 (2018).
- 27) H. Yang, Y. Gao, S. Wang, Y. Qin, L. Xu, D. Jin, F. Yang, G.-J. Zhang : *Biosens. Bioelectron.*, **80**, 450 (2016).
- 28) X. Chang, Chao, Zhang, C. Lv., Y. Sun, M. Zhang, Y. Zhao, L. Yang, D. Han, W. Tan : *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 12738 (2019).
- 29) J. Tang, Y. Lei, X. He, J. Liu, H. Shi, K. Wang : *Anal. Chem.*, **92**, 10839 (2020).
- 30) P. Yin, H. M. T. Choi, C. R. Calvert, N. A. Pierce : *Nature*, **451**, 318 (2008).
- 31) B. Li, A. D. Ellington, X. Chen : *Nucl. Acids Res.*, **39**, e110 (2011).
- 32) X. Hu, J. Fan, B. Duan, H. Zhang, Y. He, P. Duan, X. Li : *Anal. Chim. Acta*, **1042**, 109 (2018).
- 33) H. M. T. Choi, J. Y. Chang, L. A. Trinh, J. E. Padilla, S. E. Fraser, N. A. Pierce : *Nat. Biotechnol.*, **28**, 1208 (2010).
- 34) H. M. T. Choi, J. Y. Chang, L. A. Trinh, J. E. Padilla, S. E. Fraser, N. A. Pierce : *ACS Nano*, **8**, 4284 (2014).
- 35) J. Huang, H. Wang, X. Yang, K. Quan, Y. Yang, L. Ying, N. Xie, M. Qu, K. Wang : *Chem. Sci.*, **7**, 3829 (2016).
- 36) Y. Tang, X.-L. Zhang, L.-J. Tang, R.-Q. Yu, J.-H. Jiang : *Anal. Chem.*, **89**, 3445 (2017).
- 37) R. Lin, Q. Feng, P. Li, P. Zhou, R. Wang, Z. Liu, Z. Wang, X. Qi, N. Tang, F. Shao, M. Luo : *Nat. Methods*, **15**, 275 (2018).
- 38) Z. Cheglakov, T. M. Cronin, C. He, Y. Weizmann : *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 6116 (2015).
- 39) F. Yang, Y. Cheng, Y. Cao, H. Dong, H. Lu, K. Zhang, X. Meng, C. Liu, X. Zhang : *Chem. Sci.*, **10**, 1709 (2019).
- 40) C. Wu, S. Cansiz, L. Zhang, I.-T. Teng, L. Qiu, J. Li, Y. Liu, C. Zhou, R. Hu, T. Zhang, C. Cui, Li. Cui, W. Tan : *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 4900 (2015).
- 41) K. Zhang, K. Wang, X. Zhu, M. Xie : *Anal. Chim. Acta*, **949**, 53 (2017).
- 42) Z. Wu, G.-Q. Liu, X.-L. Yang, J.-H. Jiang : *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 6829 (2015).
- 43) H. Chu, J. Zhao, Y. Mi, Y. Zhao, L. Li : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **58**, 14877 (2019).
- 44) Y. Shen, Z. Li, G. Wang, N. Ma : *ACS Sens.*, **3**, 494 (2018).
- 45) J. Wang, J. Huang, K. Quan, J. Li, Y. Wu, Q. Wei, X. Yang, K. Wang : *Chem. Commun.*, **54**, 10336 (2018).
- 46) X. He, T. Zeng, Z. Li, G. Wang, N. Ma : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55**, 3073 (2016).
- 47) L. Li, J. Feng, H. Liu, Q. Li, L. Tong, B. Tang : *Chem. Sci.*, **7**, 1940 (2016).
- 48) M. Ou, J. Huang, X. Yang, X. He, K. Quan, Y. Yang, N. Xie, J. Li, K. Wang : *ChemBioChem*, **19**, 147 (2018).
- 49) J. Li, D. Li, R. Yuan, Y. Xiang : *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 5717 (2017).
- 50) S. Wang, L. Wang, X. Xu, X. Li, W. Jiang : *Anal. Chim. Acta*, **1063**, 152 (2019).
- 51) X. Liao, Z. Li, T. Peng, J. Li, F. Qin, Z. Huang : *Luminescence*, **32**, 1411 (2017).
- 52) M. Hong, L. Xu, Q. Xue, L. Li, B. Tang : *Anal. Chem.*, **88**, 12177 (2016).
- 53) D. Zhu, J. Huang, B. Lu, Y. Zhu, Y. Wei, Q. Zhang, X. Guo, L. Yuwen, S. Su, J. Chao, L. Wang : *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11**, 20725 (2019).
- 54) K. T. Kim, S. Angerani, D. Chang, N. Winssinger : *J. Am. Chem. Soc.*, **141**, 16288 (2019).
- 55) X. Chen, N. Briggs, J. R. McLain, A. D. Ellington : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 5386 (2013).
- 56) E. Xiong, D. Zhen, L. Jiang : *Chem. Commun.*, **54**, 12594 (2018).
- 57) H. Wang, C. Li, X. Liu, X. Zhou, F. Wang : *Chem. Sci.*, **9**, 5842 (2018).
- 58) F. Wang, J. Elbaz, R. Orbach, N. Magen, I. Willner : *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 17149 (2011).
- 59) S. Shimron, F. Wang, R. Orbach, I. Willner : *Anal. Chem.*, **84**, 1042 (2012).
- 60) D. He, X. He, X. Yang, H.-W. Li : *Chem. Sci.*, **8**, 2832 (2017).
- 61) Y. Kitamura, A. Nozaki, R. Ozaki, Y. Katsuda, T. Ihara : *ACS Appl. Bio Mater.*, **2**, 2988 (2019).
- 62) Y. Kitamura, Y. Azuma, Y. Katsuda, T. Ihara : *Chem. Commun.*, **56**, 3863 (2020).
- 63) D.-J. Huang, T. Cao, Z.-M. Huang, Z. Wu, L.-J. Tang, J.-H. Jiang : *Chem. Commun.*, **55**, 3899 (2019).
- 64) S. Yue, X. Song, W. Song, S. Bi : *Chem. Sci.*, **10**, 1651 (2019).
- 65) L. He, D. Lu, H. Liang, S. Xie, X. Zhang, Q. Liu, Q. Yuan, W. Tan : *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 258 (2018).
- 66) L. Liu, Q. Rong, G. Ke, M. Zhang, J. Li, Y. Li, Y. Liu, M. Chen, X.-B. Zhang : *Anal. Chem.*, **91**, 3675 (2019).
- 67) A. Reisch, P. Didier, L. Richert, S. Oncul, Y. Arntz, Y. Mely, A. S. Klymchenko : *Nat. Commun.*, **5**, 4089 (2014).
- 68) N. Melnychuk, A. S. Klymchenko : *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 10856 (2018).
- 69) S. M. Douglas, I Bachelet, G. M. Church : *Science*, **335**, 831 (2012).
- 70) W. J. Kim, T. Akaike, A. Maruyama : *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12676 (2002).
- 71) S. W. Choi, A. Kano, A. Maruyama : *Nucl. Acids Res.*, **36**, 342 (2007).



北村裕介 (Yusuke KITAMURA)

熊本大学大学院先端科学研究部 (〒860-8555 熊本市中央区黒髪 2-39-1)。熊本大学大学院自然科学研究科博士後期課程修了。博士 (工学)。《現在の研究テーマ》核酸を基体としたバイオセンサーの開発。《主な著書》“酸化グラフェンの機能と応用”, (シーエムシー出版)。《趣味》旅行, サッカー観戦。
E-mail : ykita@kumamoto-u.ac.jp



井原敏博 (Toshihiro IHARA)

熊本大学大学院先端科学研究部 (〒860-8555 熊本市中央区黒髪 2-39-1)。九州大学大学院工学研究科博士後期課程修了。博士 (工学)。《現在の研究テーマ》核酸構造の制御を利用した生命現象の分析・制御。《主な著書》“分析化学”, (東京化学社)。《趣味》映画, ロードバイク。
E-mail : toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp