

トピックス

# ナノポア計測によるDNAコンピューティングのデコーディング

川野竜司 東京農工大学工学研究院生命機能科学部門

## 1. はじめに

DNA コンピューティングは、DNA 分子を使った演算である<sup>1)</sup>。単純な例として“AND”演算は、2種類のDNA分子が入力されると一種類のDNA分子が出力され、入力分子が存在しない、または一種類しかない場合、分子は出力されない。電気信号による演算とは異なりDNA分子を用いた演算では、入力分子、出力分子ともに分子それ自身が情報を持っていることである。したがって分子演算では単純な“0”、“1”の演算に加え、より高度な情報を共役して使用することができる。これまでDNA分子を用いた演算は一般的にチューブ内で行われ、その結果の検出（デコーディング）は、出力されたDNAが低濃度の場合PCRなどで増幅し、電気泳動、または蛍光タグを用いて行われている。これらの操作は時間や手間がかかる上に、計算の結果、出力される分子を次の入力に使いづらいという課題があった。本トピックスでは最近筆者らが取り組んでいるナノポア計測による計算結果のデコーディングとDNAコンピューティングの医療診断応用について概説する。

## 2. ナノポア計測によるデコーディング

ナノポア計測は、細胞をカウンティングするコールターカウンター法をナノスケールで行っていると考えるとわかりやすい。ポア形成膜タンパク質を利用した生体ナノポア計測だと、脂質二分子膜中に再構成したナノポアタンパクのポアを通過するイオンの流れをイオン電流として計測する<sup>2)</sup>。このポアの中に標的となる分子が入り通過すると、その間はイオンの流れを阻害するので、一分子の通過を阻害電流として観測できる。 $\alpha$ -hemolysin ( $\alpha$ HL) という溶血毒素のタンパクナノポアは直径が1.4 nmであり一本鎖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いる<sup>3)</sup>。最近 $\alpha$ HLとは別のナノポアを用いたナノポ

アシーケンサが実用化され市販されはじめた。このようにナノポア計測では、DNAを一分子レベルで計測でき、原理的にはその配列までリアルタイムで読むことが可能である。

これまでマイクロデバイスを用い、二つのマイクロ液滴の接触界面に脂質二分子膜を安定に形成させ、そこでナノポア計測を行うシステムが提案されている<sup>4),5)</sup>。これを利用し筆者らは、はじめにドロップレットの中でDNAを用いた演算を行い、その結果出力されるDNA分子を液滴界面に再構成したナノポアで計測することで、リアルタイムかつ高速に演算を行うデバイスを開発した（図1）。実際にはNAND演算回路を作製し、入力のドロップレットから出力のドロップレットに計算したDNAがナノポアを通過しつつ移動し、それを電氣的に観測することで、約10分程度で計算ができた<sup>6)</sup>。より高度なコンピューティングがドロップレットシステムで行えるかを確かめるために、次に入力分子をDNAにし、それを酵素を用いて増幅しながらRNAにトランスクリプションする系を組み込んだ（図2a）<sup>7)</sup>。これをANDゲートとして動作するように設計し、(00), (10), (01), (11)の4種類の演算を同時に行えるようなマルチデバイスを作製した（図2b）。脂質分子で覆われたドロップ

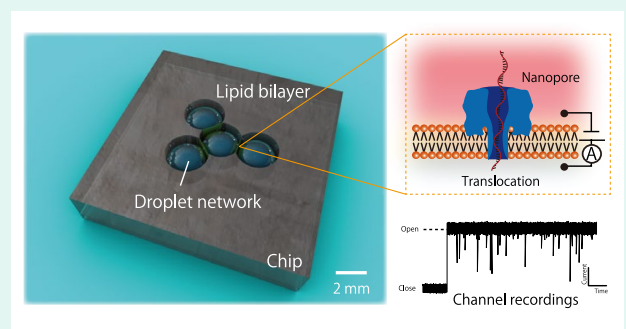


図1 マイクロデバイス中の液滴の界面に脂質二分子膜を作製。チャンネル膜タンパク質ナノポアにより分子の移動を電氣的に一分子レベルで計測。

Decoding of DNA Computing by Using Nanopore Measurement  
Ryuji KAWANO  
Department of Biotechnology and Life Science, Tokyo University of Agriculture and Technology

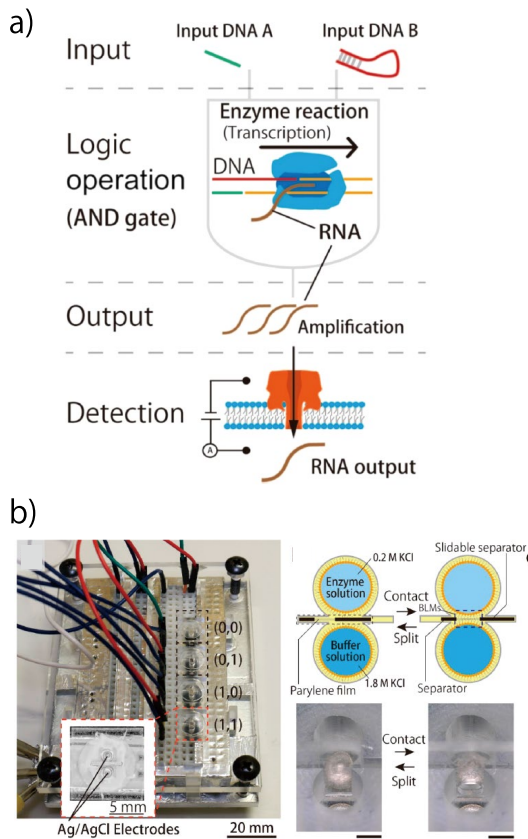


図 2

ナノポア DNA コンピューティングシステム。a) DNA を RNA に変換増幅する AND ゲートをナノポアで検出。b) マイクロデバイス中の 4 箇所の液滴で同時に (0 0) から (1 1) までの演算を行う。酵素反応中に膜に影響が出ないよう液滴同士をセパレータで区切り、反応後出力分子をナノポアで検出する (右図)。

レット内では、多少反応効率の低下が見られたが、酵素反応の時間も含めおよそ 1 時間で全ての演算を行いナノポアにより結果の検出ができた。また 2 種類のゲート、OR と NOT をドロップレットデバイスで別々に作製し、両者を接続することで NOR 回路を作ることに成功している<sup>8)</sup>。これらの検討を通し、ドロップレットシステムによるナノポア計測で出力分子を計測する利点として、1) 演算結果を反応直後に読める (高速化)、2) 出力を分子情報と電気情報の 2 系統で取り出せる、の 2 つがあげられる。これにより従来の電気デバイスとの組み合わせが容易になる。以上の利点を活かし、次に実際の医療診断への展開を試みたので紹介する。

### 3. | DNA コンピューティングによる診断応用

DNA コンピューティングは、はじめ NP 困難のような並列計算に有利であるとし研究が行われてきた。典型的には巡回セールスマン問題のように各都市を

一筆書きで巡回するような計算を比較的高速で解けるとされた。しかしながら、計算するまでの事前準備の煩雑さ、上述したようなデコーディングの問題、また半導体型のコンピュータの性能向上により最近では並列計算よりも、生体分子であることを利用した *in vivo* での情報処理や、医療診断などへの応用が研究されはじめている<sup>9)</sup>。これまで筆者らのグループでも DNA コンピューティング技術を液体生検 (リキッドバイオプシー) に応用するためいくつかの検討を行っている。特に癌の早期診断マーカーとして期待される microRNA (miRNA) の診断に取り組んでいる。miRNA は短鎖 (~ 20 nt) ノンコーディング RNA で、癌腫瘍細胞からその癌固有の配列を持った miRNA が分泌される。現在エクソソーム中の miRNA を用いた診断が中心であるが、エクソソーム外にも存在することが知られている。体液中の miRNA から癌の種類や進行度が診断できれば、例えばこれまで早期診断の難しかった膵臓癌や胆管癌などを早期に診断できる可能性がある。一方で miRNA は癌の種類によって複数種類の miRNA の発現度が上昇、または下降するという複雑なパターンを示すことがわかっている<sup>10)</sup>。従来法によりこれを正確に診断するためには、全ての miRNA の定量が必要になる。我々は、DNA コンピューティング技術がこの 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 (SCLC) に関して検討を行った。SCLC になると miR-20a と miR-17-5p という 2 種類の miRNA の濃度が上昇する。この 2 種類を AND ゲートの入力分子として用いナノポアにより演算結果を検出するシステムの構築を行った。診断 (計算) 用の DNA をあらかじめ設計しておき、2 種類の miRNA が存在する時のみ 4-way junction (4WJ) 構造を作り、ナノポアに詰まることで得られる阻害電流の検出を試みた。miRNA がどちらも無い場合、もしくはどちらか片一方のみ存在するとき、全ての分子は一本鎖構造を取りナノポアを高速に通過しスパイク状の阻害電流が観測できる。これに対し 2 種類の miRNA が同時に存在する場合、4WJ はナノポアを通過できず、長い阻害電流を示す。このとき塩濃度や印加電圧を調整することで、特定の濃度以上の分子のみを検出できるように最適化を行った。これにより miRNA の濃度が低い状態 (健康状態) の時と癌になって発現が上昇した時を区別することができた (論文投稿中)。

DNA コンピューティングでは入力分子の情報を変換し異なる分子「情報」として出力できる。これを診

断系にも利用するために、SCLC 由来の miRNA が存在すると SCLC 腫瘍細胞を標的とするアンチセンス DNA 薬剤を自律的に放出し、「診断」と「治療」を同時に行うセラノスティクスの構築に取り組んだ<sup>11)</sup>。このとき問題となるのは、通常の DNA コンピューティングで用いられる鎖置換反応では入力分子に対し出力分子が等量で出力される。腫瘍を抑制するためには発現する miRNA の濃度よりも DNA 薬剤の濃度を高くする必要があった。そこで核酸の等温増幅系を用い、標的となる miRNA が存在するとそれを自律的に診断し、薬となる DNA 薬剤を大量に放出するシステムを開発した。ナノポア計測により液滴内で分量の薬剤合成が 30 分で完了することをリアルタイム計測に確認できた。今後実際に体内で動作可能なシステムを構築するために分子ロボット技術<sup>12)</sup>と組み合わせていく予定である。

最新の取り組みとして、この等温増幅系を利用しナノポア計測による超低濃度 miRNA 検出にも挑戦している。miRNA はエクソソーム外の体液中にも低濃度存在し、また体内の循環腫瘍由来 DNA (ctDNA) も最近癌のマーカーとして期待されている。これらの血中濃度はおよそ fM ~ pM であり、この濃度領域を計測する必要がある。我々も上記の等温増幅系と組み合わせこれまでのナノポア計測の下限であった 1 pM よりもさらに低濃度の 1 fM の miRNA の検出に成功している<sup>13)</sup>。これにより既知の配列の核酸であれば、比較的簡単な前処理により体液中の有用な情報を持つ核酸分子を直接計測可能になると期待する。

#### 4. | おわりに

ナノポア計測により DNA コンピューティングの出力分子を検出することで、高速にまた分子から電気情報に変換できる。これを利用した医療診断システム構築に関しても筆者らの最近の取り組みを含めて概説した。最近ではナノポアシーケンサも実用化され、ナノポア計測によるその場診断も期待されている。しかしながら依然 *in vitro* での検討が多く、今後実際の体液や *in vivo* での検討が必須である。また生体ナノポア

は脂質膜に埋め込んで作動するので、上述した DNA コンピューティングシステムをリポソームやドラッグデリバリーシステム (DDS) 系と組み合わせることで、自律的に診断治療を行う分子ロボットの構築も期待できる。

#### 文 献

- 1) Adleman, L. M. (1994) *Science* **266**, 1021-1024. DOI: 10.1126/science.7973651.
- 2) Gu, L.-Q. *et al.* (1999) *Nature* **398**, 686-690. DOI: 10.1038/19491.
- 3) Kasianowicz, J. J. *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13770-13773. DOI: 10.1073/pnas.93.24.13770.
- 4) Funakoshi, K. *et al.* (2006) *Anal. Chem.* **78**, 8169-8174. DOI: 10.1021/ac0613479.
- 5) Kawano, R. *et al.* (2013) *Sci. Rep.* **3**, 1995. DOI: 10.1038/srep01995.
- 6) Yasuga, H. *et al.* (2016) *PLoS ONE* **11**, e0149667. DOI: 10.1371/journal.pone.0149667.
- 7) Ohara, M. *et al.* (2017) *ACS Synth. Biol.* **6**, 1427-1432. DOI: 10.1021/acssynbio.7b00101.
- 8) Yasuga, H. *et al.* (2017) *PLoS ONE* **12**, e0180876. DOI: 10.1371/journal.pone.0180876.
- 9) Jung, C., Ellington, A. D. (2014) *Acc. Chem. Res.* **47**, 1825-1835. DOI: 10.1021/ar500059c.
- 10) Di Leva, G. *et al.* (2014) *Annu. Rev. Pathol.* **9**, 287-314. DOI: 10.1146/annurev-pathol-012513-104715.
- 11) Hiratani, M. *et al.* (2017) *Anal. Chem.* **89**, 2312-2317. DOI: 10.1021/acs.analchem.6b03830.
- 12) Hagiya, M. *et al.* (2014) *Acc. Chem. Res.* **47**, 1681-1690. DOI: 10.1021/ar400318d.
- 13) Zhang, H. *et al.* (2017) *Nanoscale*, in press. DOI: 10.1039/C7NR04215A.



川野竜司

#### 川野竜司 (かわの りゅうじ)

東京農工大学工学研究院生命機能科学部門テニユアトラック特任准教授

2005年横浜国立大学工学研究科博士課程修了、博士(工学)。その後学振海外特別研究員(ユタ大学)、KAST 竹内プロジェクト研究員を経て14年から現職。

研究内容:人工細胞膜, ナノポア, 分子ロボット  
連絡先: 〒184-8588 東京都小金井市中町 2-24-16  
E-mail: rjkawano@cc.tuat.ac.jp  
URL: <http://www.tuat.ac.jp/~rjkawano/>