

アルツハイマー認知症の客観的早期診断を目指した血中マイクロ RNA の超高感度・直接検出デバイスの開発

代表研究者 筑波大学数理物質系 講師 大石 基

【まとめ】

本研究では、アルツハイマー認知症の客観的早期診断を目指した超高感度・直接検出デバイスを開発するうえで極めて重要である金ナノ粒子界面における DNA ハイブリダイゼーションを検討した。具体的には、様々な界面構造を有する金ナノ粒子を調製し、金ナノ粒子の界面での DNA ハイブリダイゼーションを行ったところ、probe DNA の PEG 層からの突き出し構造が重要であることが明らかとなった。

1. 研究の目的

わが国は、平均寿命、高齢者数、高齢化のスピードという点において世界の超高齢化社会であり、65歳以上の人口は3186万人となり総人口に占める割合は25.0%と、実に人口の4人に1人が高齢者となっている（2013年9月現在）。その中で問題となっているのが認知症である。この認知症の中で、最も発生頻度が高く、その半数以上を占めるといわれているのがアルツハイマー型認知症である。現在、アルツハイマー型認知症に対する診断は医師らの認識力検査や脳スキャンのみであり、客観的な診断マーカーなどがなく、決定的な早期診断法がないのが現状である。

本研究ではアルツハイマー型認知症に対する血中バイオマーカーとして期待されているマイクロ RNA (miRNA) を超高感度で検出できるデバイスの開発を目指している。また、このデバイスは金ナノ粒子界面での DNA ハイブリダイゼーション（二本鎖形成）および DNA ライゲーション（連結反応）を素反応としており、特に DNA ハイブリダイゼーションの過程

が律速段階となっていることが明らかになっている。したがって、本研究では、金ナノ粒子界面の構造を最適化することで金ナノ粒子界面での DNA ハイブリダイゼーションの速度・効率を改善することを目的とした。

2. 研究方法と経過

本研究では様々な界面構造 (probe DNA 密度、表面電荷、高分子の分子量) が異なる種々の金ナノ粒子 (粒径 15 nm) を調製した。具体的には、probe DNA (target DNA とハイブリダイズする塩基配列) のみを有する金ナノ粒子 (probe-GNP) および probe DNA と diluent DNA (A₂₀: target DNA とハイブリダイズしない塩基配列) を有する金ナノ粒子 (probe/diluent-GNP) を調製した。さらに、様々な分子量 (2k, 6k, and 10k) を有する非イオン性かつ水溶性のポリエチレングリコール (PEG) と probe DNA を有する金ナノ粒子 (probe/PEG_x-GNP, x = 2k, 6k, and 10k) の調製も行った (図 1)。

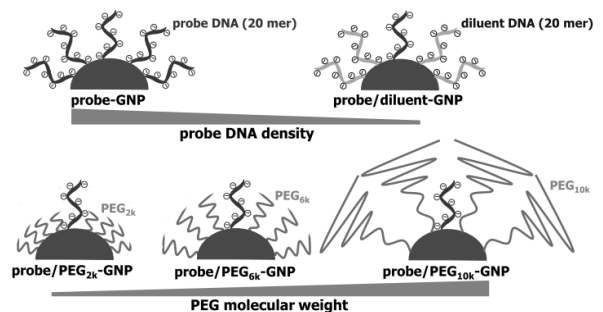


図 1 様々な界面構造を有する金ナノ粒子 (GNP)

次に蛍光色素をラベル化した target DNA を用いて、上述の各金ナノ粒子表面での DNA ハイブリダイゼーションを行った。その際、DNA ハイブリダイゼーションの進行過程を金ナノ

粒子と蛍光色素間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用することで確認した。

さらに、上述の FRET のデータからハイブリダイゼーション効率 (HE) を求め、かつ Langmuir モデルを用いたフィッティングからハイブリダイゼーションの速度定数 ($_{app}k_h$) および結合定数 ($_{app}K_{eq}$) を求めた。

これら一連の評価を通じて、DNA ハイブリダイゼーションに最適な金ナノ粒子表面の構造を明らかにした。

3. 研究の成果

様々な界面構造を有する金ナノ粒子 (GNP) の粒径 (界面に存在する DNA および PEG を含む粒径) および 1 粒子あたりの probe DNA の本数を表 1 に示す。また、表 1 の粒径から GNP 界面での probe DNA および PEG の鎖長を計算した。その結果、PEG_{10k} (9.0 nm) > probe DNA (7.0 nm) > PEG_{6k} (4.5 nm) > PEG_{2k} (3.0 nm) の順となり、これらに値はこれまでの報告と近い値であった。すなわち、probe DNA は PEG_{2k} 層および PEG_{6k} 層からは突き出ており、一方、PEG_{10k} 層に埋もれている状態であることが示唆された。

ここで重要なことは、① probe-GNP と probe/diluent-GNP は 1 粒子あたりの総 DNA 本数 (probe DNA + diluent DNA) は同じであり (152 本/粒子 = 同じ電荷)、1 粒子あたりの probe DNA の本数 (152 本/粒子 vs. 17 本/粒子) のみが異なるだけである。すなわち、この両者の界面における DNA ハイブリダイゼーションを比較することで、1 粒子あたりの probe DNA の本数の影響を明らかにすることが出来る。② probe/diluent-GNP と probe/PEG_x-GNPs (x = 2k, 6k, and 10k) の 1 粒子あたりの probe DNA の本数 (15~17 本/粒子) はほぼ同じである。すなわち、これら界面における DNA ハイブリダイゼーションを比較することで、PEG (電荷) および PEG 鎖長の影響が明らかにすることが出来る。

様々な界面構造を有する金ナノ粒子 (GNP)

表 1 様々な界面構造を有する金ナノ粒子 (GNP) の粒径と 1 粒子あたりの probe DNA の本数

金ナノ粒子 (GNP)	粒径 (nm)	1 粒子あたりの probe DNA の本数
probe-GNP	33.6	152 ± 8
probe/diluent-GNP	33.2	17 ± 1
probe/PEG _{2k} -GNP	29.7	16 ± 1
probe/PEG _{6k} -GNP	29.6	15 ± 1
probe /PEG _{10k} -GNP	37.8	15 ± 1

界面における DNA ハイブリダイゼーションの測定は、蛍光色素をラベル化した target DNA を用いて GNP と蛍光色素間の蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用することで行った。また、得られたハイブリダイゼーション効率 (HE) のデータを基に Langmuir モデルを用いたフィッティングにより、ハイブリダイゼーションの速度定数 ($_{app}k_h$) および結合定数 ($_{app}K_{eq}$) を決定した。各金ナノ粒子 (GNP) 界面における DNA ハイブリダイゼーションのハイブリダイゼーション効率 (5400 秒後の HE)、速度定数 ($_{pp}k_h$) および結合定数 ($_{app}K_{eq}$) を表 2 に示す。

まず、probe-GNP と probe/diluent-GNP の比較においては、HE, $_{app}k_h$ および $_{app}K_{eq}$ いずれも probe/diluent-GNP のほうが大きかった。すなわち、1 粒子あたりの probe DNA の本数が少ない probe/diluent-GNP のほうが DNA ハイブリダイゼーションが効率的に起こっていることが分かった。これは、probe/diluent-GNP のほうがハイブリダイズした target DNA 間の距離が長いこと、立体障害および電荷反発が probe-GNP に比べ少ないためであると考えられる。

また、probe/diluent-GNP と probe/PEG_x-GNPs (x = 2k, 6k, and 10k) の比較においては、probe/diluent-GNP の HE, $_{app}k_h$ および $_{app}K_{eq}$ は、いずれの PEG 分子量 (2k, 6k, and 10k) を有する probe/PEG_x-GNPs のそれらよりも小さかった。すなわち、マイナス電荷を有する diluent DNA を電荷を有さない PEG に置き換えることで DNA ハイブリダイゼーションの効率・速度が向上することが分かった。これは、diluent

表 2 様々な界面構造を有する金ナノ粒子 (GNP) 界面における DNA ハイブリダイゼーションの効率 (5400 秒後の HE)、速度定数 (${}_{app}k_h$) および結合定数 (${}_{app}K_{eq}$)

	HE at 5400 sec (%)	${}_{app}k_h$ ($M^{-1} sec^{-1}$)	${}_{app}K_{eq}$ (M^{-1})
probe-GNP	14 ± 4	$(2.0 \pm 0.7) \times 10^4$	$(2.3 \pm 0.7) \times 10^7$
probe/diluent-GNP	17 ± 2	$(3.6 \pm 0.7) \times 10^4$	$(2.9 \pm 0.4) \times 10^7$
probe/PEG _{2k} -GNP	45 ± 3	$(2.7 \pm 0.4) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.3) \times 10^8$
probe/PEG _{6k} -GNP	44 ± 4	$(2.0 \pm 0.2) \times 10^5$	$(1.1 \pm 0.1) \times 10^8$
probe/PEG _{10k} -GNP	37 ± 4	$(6.6 \pm 0.7) \times 10^4$	$(1.0 \pm 0.3) \times 10^8$

DNA と target DNA と静電反発 (マイナス電荷同士の反発によるものと考えられる。

さらに、probe/PEG_x-GNPs (x = 2k, 6k, and 10k) 内 (PEG 分子量) の比較においては、最も分子量が大きい probe/PEG_{10k}-GNP の HE, ${}_{app}k_h$ および ${}_{app}K_{eq}$ は、probe/PEG_{2k}-GNP および probe/PEG_{6k}-GNP のそれらよりも小さかった。これは、probe/PEG_{10k}-GNP における probe DNA は PEG_{10k} 層に埋もれている状態であるため、PEG_{10k} 層が target DNA のハイブリダイゼーションにおいて立体障害として働いたためであると考えられる。

一方、probe DNA が PEG 層より若干突き出ている probe/PEG_{2k}-GNP と probe/PEG_{6k}-GNP の比較においては、HE, ${}_{app}k_h$ および ${}_{app}K_{eq}$ いずれも大きな違いは認められなかった。このことは、金ナノ粒子界面における DNA ハイブリダイゼーションにおいては、probe DNA の PEG 層からの突き出し構造が鍵となっていることが示唆された。

4. 今後の課題

本研究では、「アルツハイマー認知症の客観的早期診断を目指した血中マイクロ RNA の超高感度・直接検出デバイス」を開発するうえで極めて重要である金ナノ粒子界面における DNA ハイブリダイゼーションにおいて、金ナノ粒子界面の構造を最適化することに成功した。今後、この最適化した界面構造を有する金ナノ粒子を用いて、実際にアルツハイマー認知症に由来するマイクロ RNA を検出するデバイスを構築していくことが課題である。

5. 研究成果の公表方法

本研究の成果は、「A. Takashima and M. Oishi *RSC Advances* **2015**, *5*, 76014.」として既に公表済みである。また、今後、アルツハイマー認知症に由来するマイクロ RNA 検出デバイスに関しても、開発出来次第、学術雑誌に投稿することを計画している。

以上