

報道関係者 各位
2020年8月17日
国立大学法人 東京農工大学

ナノポアを用いた DNA の一塩基変異位置の検出に成功

国立大学法人東京農工大学大学院工学研究院生命機能科学部門の川野竜司准教授と同大学大学院生 劉娉は、一分子の DNA を検出できる「ナノポア(注1)」を用いて、DNA 断片に存在する変異位置検出に成功しました。本技術は体液からがんの早期発見、抗がん剤の感受性に関する簡易診断への応用が期待されます。

本研究成果は、**Wiley Publishing** が発行する **Small Methods** (IF=12.13) に掲載されました。

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/smt.202000101>

論文名: Recognition of Single-Point-Mutation using a Biological Nanopore

著者: Ping Liu and Ryuji Kawano

現状：最近、血液や尿などの体液を利用した液体生検がん診断法（リキッドバイオプシー）が、患者への負担が少ないがん診断法として注目されています。がん細胞が免疫によって破壊される際に、血中に漏れ出した血中循環 DNA (cfDNA) はがん由来の遺伝子情報を持つことから、がんの早期診断への応用が期待されています。また、個人の遺伝子変異位置によって、抗がん剤に対する感受性が異なる場合があるため、cfDNA の変異位置情報を読み取れば、患者の負担を抑えた個人遺伝子の特徴に合った治療を最適化する医療（オーダーメイド医療）が実現できます。しかしながらリキッドバイオプシーで用いる cfDNA は急速に分解されてしまうため、採血から迅速に変異を検出する必要があります。

従来の方法では、主に PCR 法による DNA 増幅後に、蛍光プローブもしくは DNA の配列を直接読むことで塩基の変異を検出しています。PCR 法では変異を検出するまでに時間がかかることや、適切なプライマー設計に課題がありました。そこで本研究ではナノポアを用いて、変異を持つ核酸断片をラベルフリーで電氣的に迅速検出する方法を開発しました。

研究体制：本研究は、大学院工学研究院生命機能科学部門の川野竜司准教授と大学院生物システム応用科学府大学院生 劉娉らによって実施されました。本研究は JSPS 科研費 17K19138、19H00901 の助成を受けたものです。

研究成果：本研究では生体ナノポアを用いて DNA 断片中の一塩基変異を迅速かつ簡便に検出する手法を開発し、またその変異位置の特定を試みました。肺がん罹患時に検出される cfDNA の配列を参考にモデル配列 DNA を合成しターゲット DNA とし、それに対応するナノポア計測用プローブ DNA を設計しました。ナノポア計測より得られる DNA の電流阻害時間と電流阻害レベルを組み合わせることで解析することにより DNA 変異の有無だけでなく、その位置を一塩基レベルで検出することに成功しました (図 1)。ナノポア計測では、マイクロ加工技術で作製した微小デバイスを用いており、これにより小型で迅速な装置による変異検出を実現できました。

今後の展開：本研究によって、がんの次世代早期診断マーカーに利用される DNA 断片において、変異の有無だけでなく、その位置まで特定することに成功しました。本成果は従来の PCR 法に替わる迅速・簡易的に癌の診断を実現できる可能性を示しています。今後は、各種医療機関と共同で実際のがん由来 cfDNA の変異位置検出に関して検証を行い、診断だけでなく予後治療評価や転移性度の診断にも適用可能か検討します。また将来的には大規模診断の現場において各種がんの簡易診断法としての展開を目指します。

注1) ナノポア

膜タンパク質やイオンチャネルによって、脂質二分子膜中に形成されるナノメートル（1 ミリメートルの 100 万分の 1）サイズの微細な孔（ポア）。

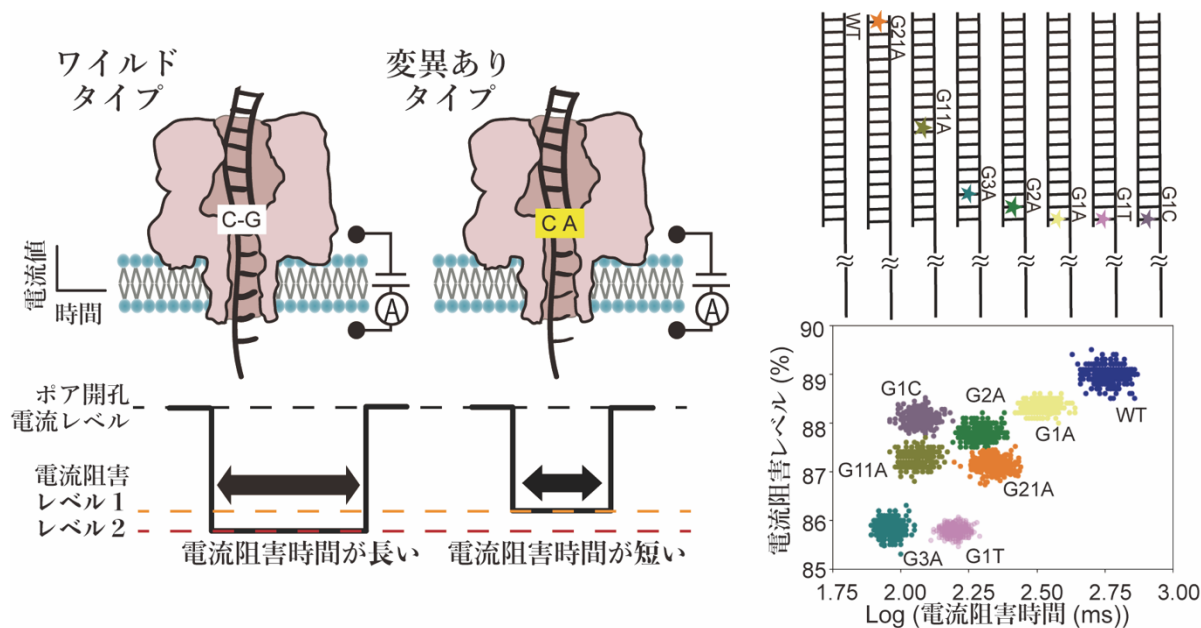


図 1. 本システムの概要。マイナス電荷を持つ直径約 2 ナノメートル (nm) の二本鎖 DNA は電気泳動され、内径約 1.4 nm のポアに侵入し、二本鎖 DNA が解離しながらポアを通過します。ターゲット DNA に変異があると、アデニン (A) -チミン (T) , グアニン (G) -シトシン (C) 間の塩基は結合しなくなるため、変異のあるターゲット DNA はワイルドタイプよりも二本鎖 DNA の結合力が小さくなり、DNA 二本鎖の解離時間（電流阻害時間）も短くなります。変異位置や異なる変異によっても、結合力やイオン阻害レベルが異なるため、DNA 変異位置は電氣的検出が可能です（左）。

8 種類のターゲット DNA とプローブ DNA の混合物をナノポア電流計測し、二本鎖 DNA がナノポアを通過する際に生じる電流の阻害時間と電流阻害レベルから検出することに成功しました（右）。

◆ 研究に関する問い合わせ ◆

東京農工大学大学院工学研究院
生命機能科学部門 准教授
川野 竜司 (かわの りゅうじ)
TEL/FAX : 042-388-7187
E-mail : rjkawano@cc.tuat.ac.jp