

ナノポア計測による高粘度流体中のウイルスベクター識別

Identifying genome-derived difference in vector characteristics by viscous nanopores

阪大産研¹, 東大², 名古屋大³, 量子研⁴

○筒井 真楠¹, 恒川 雄二², 和田 美加子², 有馬 彰秀³, 馬場 嘉信⁴, 川合 知二¹, 岡田 尚巳²

Osaka Univ.¹, Univ. Tokyo², Nagoya Univ.³, QST⁴ ○Makusu Tsutsui¹, Yuji Tsunekawa², Mikako

Wada², Akihide Arima³, Yoshinobu Baba⁴, Tomoji Kawai¹, Takashi Okada²

E-mail: tsutsui@sanken.osaka-u.ac.jp

固体ナノポアは液中の微小物体を1粒子・分子レベルで検出する超高感度なセンサである¹。これまでの研究において、我々はその高い空間分解能をウイルスベクターの1粒子識別に応用し、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターの粒子径には内包するDNAの長さに応じた数nmレベルの差が存在することを明らかにすると共に、ベクターが内包するゲノムの長さを非破壊的に1粒子レベルで検査可能な分析手法が可能になることを報告した²。一方、水中におけるAAV検出においては、AAV粒子が100 μ 秒に満たない時間でナノポアを通過する挙動も確認され、その際にはナノポアセンサの時間分解能が不十分であり、AAVの識別は偶発的に当該粒子がナノポア壁面で吸脱着を経て100 μ 秒以上の時間をかけてナノポアを通過する少数のAAVについてしか行えない、という課題も明らかとなった。そこで本研究ではこの課題を解決するために、水溶性有機溶媒をリン酸緩衝液と混合し³、電解質液の粘度を増大させることでAAVの泳動速度をイオン電流計測が追従できるレベルまで減速できるか実験検証を行った⁴。

AAVの1粒子検出には、電子線描画法と反応性イオンエッチングにより厚さ40nmのSiN_xメンブレン中に加工した直径約70nmの単一ナノポアを用いた。計測対象とするAVは、既知の分子長の単鎖DNAを内包したAAV9を用いた。AAV9は、リン酸緩衝液とグリセロールを0~80%の体積分率で混合した溶液中に懸濁し、ナノポア計測に供した。

AAV9を含むグリセロール/リン酸緩衝液混合溶液中において、1対の銀/塩化銀を用いたイオン電流計測を一定直列電圧0.3Vのもとで実施した。グリセロールを含まない緩衝液中では、AAVがナノポアを電気浸透流による流体抗力を駆動力として通過したことに起因するイオン電流信号が観測されたが、その信号波高は波幅が短いほど低くなる傾向が現れたことから、ナノポアセンサの時間分解能がAAVの泳動速度に十分に追従できていないことが示唆された。一方、グリセロールを混合すると、粘度の増大に伴いAAVの通過時間は長くなり、その効果によって信号波高と波幅の依存性が混合割合に比例して小さくなることを確認した。そして、この高粘度流体中におけるナノポア計測により、正常なAAVベクター・中間体・空ベクターの識別をより高い精度で実施可能なことを明らかにした⁴。

[参考文献]

¹ A. Arima et al., *Anal. Chem.*, 93, 215 (2021). ² M. Tsutsui et al., *ACS Nano*, 18, 15695-15704 (2024).

³ T. Kawaguchi et al., *Small Methods*, 8, 2301523 (2024). ⁴ M. Tsutsui et al., *Small Methods*, doi: 10.1002/smt.202401321.