

令和元年6月7日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14023

研究課題名(和文)固定化不要な電気化学アプタマーセンサの開発

研究課題名(英文)Development of aptamer sensors without an immobilization steps

研究代表者

安川 智之 (YASUKAWA, TOMOYUKI)

兵庫県立大学・物質理学研究科・教授

研究者番号：40361167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：トロンビンアプタマーとその相補的配列を有する1本鎖DNAを混合した場合の触媒還元電流を評価できた。トロンビンの添加によってプロトン触媒還元電流が増加することから、トロンビンを計測することが可能となった。また、アプタマー-白金錯体の解離定数を評価できた。アプタマー修飾微粒子の誘電泳動を利用したトロンビンセンサの開発を行った。微粒子の表面導電率と交差周波数の関連を調査し、理論と一致することを示した。さらに、微粒子に固定化したアプタマーにトロンビンが結合すると微粒子表面の電荷量が減少し交差周波数が低周波数側にシフトした。微粒子サイズの減少に伴い、計測できるトロンビンの濃度領域を低濃度化できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

計測に必要とする分子認識素子およびシグナル変換素子を固定化することなく溶液中に溶解させた状態で、ターゲット分子を検出可能な簡便で高感度なセンサを構築することに、大きな意義がある。さらに、「認識して初めてシグナル変換機能をON」にする新規機構に、プロトン触媒還元電流を組み込んだ積極的な感度の向上に学術的な特色がある。本手法の確立は、研究開発中であるアプタマーやDNAザイムを利用した新規なセンシングシステムの創出のための有用な指針となりうる。よって、DNAアプタマーをシグナル変換と連動した認識素子として捉えた研究に対する方向性を決定する大きな学術的意義を含んでいる。

研究成果の概要(英文)：The catalytic reduction currents of proton has been estimated after thrombin aptamer was added to the solution containing ssDNA with the complementary sequence to thrombin aptamer. The reduction current increased with increasing the concentration of thrombin added to the solution containing aptamer. We can also estimate the dissociation constant of the complex between the aptamer and platinum complex.

A simple detection system based on dielectrophoresis of particles modified with aptamer has been investigated. The particles modified with aptamer was mixed with solutions containing different concentrations of thrombin. The cross-over frequency decreased with increasing the concentration of thrombin. The decrease of the cross-over frequency could be due to the decrease of the surface conductivity of particles by capturing of thrombin to the immobilized aptamer. The present procedure is absolutely simple because of the needless of the separation step for unreacted thrombin.

研究分野：電気分析化学

キーワード：電解還元析出 DNAアプタマー 白金錯体 インターカレーション プロトン触媒還元

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特定の分子と特異的に結合できる核酸分子やペプチドであるアプタマーは、バイオセンサの認識素子、生理活性阻害型の医薬品として注目されている。現在のバイオセンシング素子の主流である酵素標識抗体は、分子認識素子である抗体とシグナル変換素子である酵素を物理的に結合させただけであるため、相互に連動しておらず、分子認識した素子と認識していない素子を分離 (BF 分離) してシグナル変換能を計測する必要がある。アプタマーは分子を特異的に認識することにより、その 3 次元構造を大きく変化させる。その変化にシグナル変換素子の ON/OFF を組み込むことができる可能性に大きな魅力がある。すなわち、アプタマーには、認識素子がターゲット分子を認識して初めてシグナル変換素子が機能する理想的なシステム構築の可能性がある。例えば、相補的な DNA hybridization の結果、HRP 活性を発現するグアニン四重鎖 (G-quadruplex) を再構築するシステムが報告されている (JACS, 2004, 126, 7430)。このシステムでは、hybridization により DNA は HRP 活性を発現するため、BF 分離を必要とせずターゲットを計測できる利点がある。また、電極に固定化したコカインアプタマー (電気化学活性種を片末端に結合) のコカイン認識による構造変化に起因した電流増加型センサ (JACS, 2006, 128, 3138) やコカイン認識による 3 次元構造変化による微小孔通過阻害を指標としたセンサ (JACS, 2011, 133, 8474) が開発された。我々は、白金錯体の有する「DNA との分子間相互作用」と「電気化学的還元によるプロトン触媒還元能」を利用した DNA の高感度センサの開発を行ってきた。そこで、アプタマーによる標的分子の認識捕捉現象を、電気化学法や誘電泳動による微粒子操作法を用いてシグナル変換することにより、均一系において溶液を混合するだけで、標的分子を計測可能なバイオセンサの構築を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ターゲット分子を含む溶液中に分子認識素子である DNA アプタマーとシグナル変換素子である白金錯体を混合するだけで、高感度計測可能な電気化学システムを構築することにある。DNA アプタマーがターゲット分子を認識することにより、白金錯体が溶液中に遊離され、その遊離したフリーの白金錯体を電気化学的に電解還元する。このシステムでは、認識していないアプタマーにインターカレートしている白金錯体は電解還元されないため、「認識して初めてシグナル変換」が可能となる。さらに、白金錯体の電解還元により電極表面上に白金のナノ粒子を析出させることにより、元来プロトンの還元能のないカーボン電極にプロトン触媒還元能を付与する。これにより、簡便な高感度計測法を実現する。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、分子認識能を有する DNA アプタマーを用いて、その認識対象を計測できるシステムへと拡張した。DNA アプタマーとシスプラチンの混合液にトロンピンを加え、電極表面に析出させた白金微粒子によるプロトン触媒電流からトロンピン計測を行った。電気化学セル (160 μ L) に single stranded DNA (ssDNA) アプタマー (5'-GGT TGG TGT GGT TGG-3') およびシスプラチンの混合溶液にトロンピンを加えた。インジウム-スズ酸化物 (ITO) 電極電位をシスプラチンおよびプロトンの還元される -0.95 V にステップし、プロトンの還元電流を測定した。

(2) インジウムスズ酸化物 (ITO) 製ののこぎり歯型交互くし型バンドアレイ電極を作製した。アミノ基修飾ポリスチレン微粒子 (直径 500 nm) に化学架橋剤を利用してトロンピンアプタマーを固定化した。このアプタマー修飾微粒子に異なる濃度のトロンピンを含む溶液を添加し、誘電泳動デバイスに導入した。バンド電極に 15 V_{pp} の交流電圧を印加し、周波数を 1 kHz-10 MHz の範囲で変調させた際の微粒子の挙動を顕微鏡下で撮影した。

4. 研究成果

(1) 異なる濃度のアプタマー存在下においてシスプラチンの電解還元を行った。Fig. 1 に、シスプラチンの電解還元に伴うプロトンの触媒還元電流を示す。ssDNA アプタマーを含まないシスプラチン溶液中では、スパイク状の電流が観測され、電流は徐々に増加しほぼ定常に達した。これはシスプラチンの電解還元により白金が析出し、析出した白金上でプロトンが還元されるためである。得られた電流はアプタマー濃度の増加に伴って減少した。未結合のシスプラチンが減少したことにより起因する。アプタマーとシスプラ

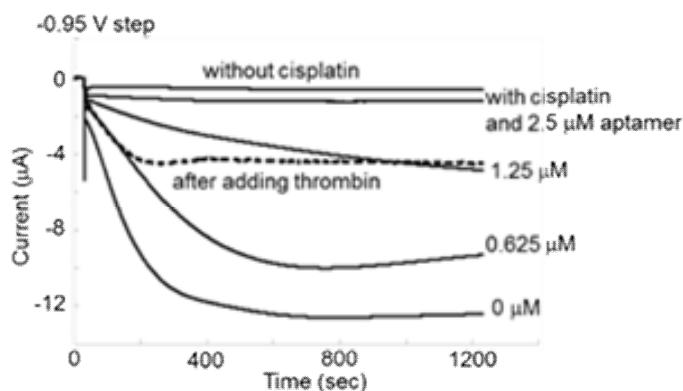


Fig. 1. Catalytic current of proton by the electrodeposition of platinum particles with the reduction of cisplatin.

チン複合体は立体障害とみかけの分子量の増加による拡散係数の減少により、電極上での電解還元が抑制される。このアプタマーは4つのGG配列を有するため、2.5 μM アプタマーを加えた場合、ほとんどすべてのシスプラチンがアプタマーと結合し電流が観測されない。さらに、2.5 μM トロンピンを加えると2.5 μM アプタマーだけの場合と比較して電流が増加した。これはトロンピンにアプタマーが結合することによりシスプラチンが遊離し、濃度が増加したことに起因すると考えている。

(2) リン酸緩衝液(導電率 15 mS/m)中においてポリスチレン微粒子およびアミノ基修飾微粒子の交差周波数を測定すると、交差周波数は、それぞれ3 MHz および2 MHz 程度であった。これらは理論計算とよく一致することがわかった。この微粒子表面のアミノ基を起点として架橋剤とアプタマーを修飾した。その粒子の交差周波数は、アミノ基修飾微粒子と比較して高周波数側にシフトし7 MHz 程度であった。異なる溶液導電率の緩衝液を用いて交差周波数計測を行い、表面導電率を求めると40 mS/m と増加した。これは、微粒子表面のアミノ基の数が減少したことに起因すると考えている。すなわち、アミノ基に起因する微粒子表面の正電荷が減少し、相対的にスルホ基に起因する負電荷が増加すると考えられる。

トロンピンを含む溶液中でアプタマー修飾微粒子の交差周波数の測定を行った。各濃度のトロンピンを含むリン酸緩衝液(導電率 25 mS/m)中にアプタマーを結合させた微粒子を懸濁し、印加する交流電圧の周波数を変調させて交差周波数を測定した。Fig. 2 に、異なる濃度のトロンピン溶液に懸濁したアプタマー修飾微粒子の交差周波数を示す。トロンピン濃度の増加に伴って交差周波数は低周波数側へシフトした。これは、トロンピンがアプタマーに結合することにより、アプタマー修飾微粒子表面の電気二重層中に存在していた正の荷電粒子(カチオン)が排除され、微粒子の表面導電率が減少したためと考えている。トロンピンと結合したトロンピンアプタマーの解離定数は200 nM と報告されているため、トロンピン濃度が200 nM 付近で交差周波数が減少する。これは、解離定数付近の濃度で微粒子表面の全アプタマー数に対するトロンピンを結合したアプタマーの割合が大きく変化するためである。400 nM 以上のトロンピンを添加した場合には、全ての領域で負の誘電泳動が作用した。アプタマーを修飾していないアミノ基修飾微粒子を用いて交差周波数を測定すると、トロンピンの存在に関わらず交差周波数は同じであった。よって、トロンピンは、この微粒子表面にほとんど非特異吸着しない。このように、アプタマー修飾微粒子とトロンピンを含有する溶液とを混合して反応させた後、DEP デバイスを用いて交差周波数を測定することにより、トロンピンの標識化や未反応トロンピンの除去操作なしで、溶液中のトロンピン濃度を簡便に定量できる。

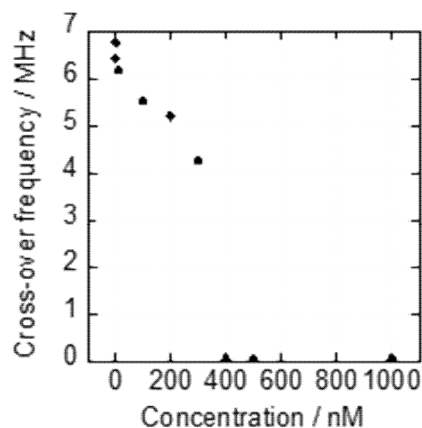


Fig. 2. Cross-over frequencies for the particles in different concentrations of thrombin

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

Tomoyuki Yasukawa, Takuma Gotoh, Takashi Yasuda, Masato Suzuki, and Fumio Mizutani, Particle Patterning Based on Positive Dielectrophoresis Using a Scanning Microelectrode, *Sensors and Materials*, 2019, 31(1), 23-32.

doi.org/10.18494/SAM.2019.2038

Takatomo Sugano, Yui Sasaki, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Simple Formation of Cell Arrays Embedded in Hydrogel Sheets and Cubes, *Anal. Sci.*, 2018, 34(2), 127-130.

DOI: 10.2116/analsci.33.531

Kohei Tominaga, Satoshi Arimoto, Ken Shimono, Toshihiko Yoshioka, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Quantitative and single-step enzyme immunosensing based on an electrochemical detection coupled with lateral-flow system, *Anal. Sci.*, 2017, 33(4), 531-536.

DOI: 10.2116/analsci.33.531-536.

Toshiki Hokuto, Tomoyuki Yasukawa, Ryota Kunikata, Atsushi Suda, Kumi Y. Inoue, Kosuke Ino, Tomokazu Matsue, Fumio Mizutani, Imaging of enzyme activity using bio-LSI system enables simultaneous immunosensing of different analytes in multiple specimens, *Biotechnol. J.*, 2016, 11(6), 838-842.

DOI: 10.1002/biot.201500559

Taishu Tanaka, Fumio Mizutani, Tomoyuki Yasukawa, Dielectrophoretic Tweezers for Pickup and Relocation of Individual Cells Using Microdisk Electrodes with a Microcavity, *Electrochemistry*, 2016, 84(5), 361-363.

<http://dx.doi.org/10.5796/electrochemistry.84.361>

Satoshi Arimoto, Ken Shimono, Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Toshihiko Yoshioka, Improvement of Electrochemical Response of Cocaine Sensors Based on DNA Aptamer by Heat Treatment, *Anal. Sci.*, 2016, 32(4), 469-472.

<http://doi.org/10.2116/analsci.32.469>

〔学会発表〕(計 78 件)

Tomoyuki Yasukawa, Masati Suzuki, Fumio Mizutani. Rapid formation of single-cell pairs for producing hybridomas, 17th International Meeting on Chemical Sensors, University of Vienna, Austria, July 15 - 19, 2018

安川智之, 迅速で簡便な細胞操作法の「創る」と「測る」への応用, 静電気学会 2017 年度シンポジウム - 静電気工学が拓くナノバイオテクノロジー: 細胞・分子操作の最新動向 -, 東工大蔵前会館ロイヤルブルーホール(目黒区), 2017 年 11 月 20 日

安川智之, 水谷文雄, 動く小動物を対象とした電気化学, 第 77 回分析化学討論会, 龍谷大学(京都市), 2017 年 5 月 27 - 28 日

Tomoyuki Yasukawa, Fumio Mizutani, Rapid Formation of Single-Cell Pairs for Hybrid Cells, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-State Science, Hawaii Convention Center & Hilton Hawaiian Village (Honolulu, Hawaii, USA), October 2 - 7, 2016.

Tomoyuki Yasukawa, Simple and rapid biosensing system based on manipulation techniques of particles and cells, The 16th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS2016), Ramada Plaza Jeju, Juju Island, Korea, July 10 - 13, 2016.

〔図書〕(計 2 件)

安川智之 誘電泳動による操作 細胞の特性計測・操作と応用 第 1 編第 2 章第 4 節 ,147-159 , コロナ社, 2016 .

安川智之, 電場を利用した細胞分離, 細胞の特性計測・操作と応用, 第 1 編第 3 章第 5 節 , 237-248 , コロナ社, 2016 .

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: アプタマーを利用する標的物質の定量方法

発明者: 安川智之, 岡崎 仁

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-69360

出願年: 2018 年

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/material/analytical_chem/index-j.html

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。