

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05534

研究課題名(和文) 核酸小分子リガンドを用いた電気化学的な遺伝子検出法の開発に関する研究

研究課題名(英文) Development of electrochemical gene detection method using small molecule ligand

研究代表者

武井 史恵 (Takei, Fumie)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・進学課程・准教授)

研究者番号：30252711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：この研究課題では、新たにDNAの特殊構造に特異的に結合する蛍光分子DANPとインピーダンス分光法(EIS法)を組み合わせて高感度の検出法の開発を検討した。グラッシーカーボン塗布電極を用い、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 3 mMとDANP 3 μM を含む溶液にC-バルジ構造DNAを加えていくと、DNA添加前に比べて抵抗値が大きく変化した一方で、完全相補的なDNAの場合抵抗値はほとんど変わらない。これらの結果から、電極表面の近くに存在していたDANPがC-バルジ構造と結合して電極表面から遠ざかることによる変化と考えられ、EIS法によりC-バルジ構造を持つDNAを特異的に検出できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気化学的な遺伝子検出法は、研究室レベルでは様々な方法が発表されているが、その多くはDNAそのもののターゲットDNA認識能、構造変化能を使ったものである。そのため、目的とする遺伝子ごとに検出用DNAプローブの合成・電極上への固定化が必要となり、簡便化されていない。本提案研究ではDNAの特殊構造に特異的に結合する“小分子リガンド”をセカンドメディエータとして使用することで、電極上にプローブ等の固定化をしなくてもDNAの検出ができることを明らかにした。これは今までの方法に比べて、簡単であり今後のDNAの検出技術へと応用でき学術的意義や社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We carried out experiments to develop a PCR monitoring system using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) suitable for PCR with high salt concentration solutions. EIS usually uses $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ as a mediator, but to make this monitoring method even more sensitive a new EIS method using a 2,7-diaminonaphthyrine derivative (DANP), which specifically binds to the cytosine bulge structure of DNA, as a second mediator was investigated to make this monitoring method even more sensitive. First, the effectiveness of DANP as a mediator was measured. The results showed that the EIS signal was reduced to 40% of that before the addition of DANP, indicating that DANP has sufficient capacity as a second mediator. Furthermore, DNA with a cytosine bulge structure was detected by the EIS method, and the signal intensity changed significantly with the addition of DNA, suggesting that DNA with a cytosine bulge structure can be adequately detected by this method.

研究分野：核酸化学

キーワード：DNA EIS 電気化学 蛍光分子 RNA

1. 研究開始当初の背景

遺伝子検出法で多く使われているのは、蛍光分子と DNA の相互作用を用いた蛍光検出法である。酵素を使った PCR 法をはじめとして、様々なキットが開発され、方法としてはかなり簡便化されているが、ハード面では基本電気回路に加えて光学系一式が必要となり、現在以上の小型化が難しい。

一方電気化学的な検出法では、昨今の電気分野のハード面における様々な技術革新に伴い、装置の小型化、安価化に対応できるような技術が開発されている。この技術進歩により現場(フィールドワークやベットのサイド)における遺伝子検査ができる可能性が出てきた。しかし、肝心の方法論の点では、検出感度の高さゆえに生じるシグナル強度の揺らぎや再現性の低さ、取り扱いの難しさなどから特定の研究者のみが研究室で使える技術にとどまっている。

2. 研究の目的

遺伝子の検出を簡便に現場で行うことが可能な、新たな検出法の構築を行うために、我々は電気化学的な検出方法に着目した。電気化学的な遺伝子検出法は、研究室レベルでは様々な方法が発表されているが、その多くは DNA そのもののターゲット DNA 認識能、構造変化能を使ったものである。そのため、目的とする遺伝子ごとに検出用 DNA プローブの合成・電極上への固定化が必要となり、簡便化されていない。本提案研究では DNA の特殊構造に特異的に結合する“小分子リガンド”を用いた電気化学的な高感度遺伝子検出を行う革新的な技術開発を行い、簡便、迅速、安価などでも使える検出法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) 電気化学的方法の選択

我々が用いた電気化学的な測定方法は、電気化学インピーダンス法 (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS)といわれるものであり、遺伝子増幅法 (PCR 法) とを融合して簡便、高感度な電気化学的な遺伝子検出法を構築することを目的としている。EIS 法とは溶液と電極界面間のインピーダンスを測定する方法であり、電極表面の分子吸着、電荷保持状態変化、分子電荷変化、分子形態変化などをインピーダンス変化として検出できる。他の電気化学的な検出法に比べ、溶液の組成の制限が緩いこと、作用極、対極の二本の電極で測定できること、さらに測定時間が短いことなどが特徴である。高塩濃度条件が必要な DNA 溶液の測定にとって溶液組成の制限が緩い EIS 法は、数ある電気化学的な手法のうち、遺伝子検出に最も適した方法であると考えられる。

2) DNA に結合する分子の選択

我々は以前に DNA のシトシンバルジ構造 (C-バルジ構造 : DNA の二本鎖において相手の塩基がない構造) に特異的に水素結合する小分子リガンド (DANP) を見出している。この DANP と C-バルジ構造の特徴を利用すると、溶液に DANP を入れておき、電極と DANP が相互作用している状態から、C-バルジ構造を含む DNA を加えることで、DANP が DNA の C-バルジ構造に結合し、インピーダンスのシグナルに変化が現れるのではないかと考えた。

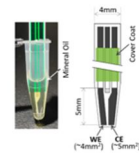
3) 電極の選択

簡便で安価に DNA の検出を行うために、電極としてはグラッシーカーボン電極を用いた。また電極上に DNA が結合することを防ぐため、ポリビニルアルコールの水溶液を使い、電極を浸して電極を PVA コートした電極を調整した。

4. 研究成果

1) 電極の調整

簡便で安価に DNA の検出を行うために電極はグラッシーカーボンの塗布電極に PVA コートしたものをを用いた。溶液調整後、一晩その溶液に電極をつけておくことで、安定した測定を行なった。



2) DANP のインピーダンスに与える影響

我々は今回、DANP と同時に DNA の二本鎖に特異的に結合する分子 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 錯体 (以下[Ru]) についても検討している。この方法では、EIS 法に一般的に利用されている $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 錯体 (以下[Fe]) をメディエータとして使用しているが、もう一つ、小分子リガンド[Ru]もセカンドメディエータとして機能する(Figure 1)。つまり[Fe]の溶液に[Ru]を加えると、2つの錯体が溶液中で相互作用をして溶液の抵抗 (R_{ct}) を下げる。[Ru]の場合、溶液中の二本鎖 DNA の量が多くなると、二本鎖 DNA との相互作用が強い[Ru]が二本鎖 DNA に結合するため、[Fe]と相互作用していた溶液中の[Ru]の濃度が減少し、それに伴って R_{ct} も増大する。また[Ru]を使った方法では PCR のモニタリングもできることが示唆されている。

DANP にもセカンドメディエータとしての機能があるならば[Ru]では不可能な、DNA の特異的な構造を検出できるのではないかと考えた。まずは DANP のインピーダンスに与える特性を調べた。

pH が異なる[Fe]の溶液に DANP を加えていくと、DANP の濃度が上がるにつれて R_{ct} が下がることがわかった(Figure 2)。これは、[Ru]同様に、DANP もインピーダンスの値に影響を及ぼしていることを示唆する。

3) EIS 法における DANP と DNA との相互作用

3 mM の[Fe]と 1 μM DANP を含む pH 7.0 のリン酸バッファ中で、シトシンバルジ構造の DNA と Full match 構造の DNA をそれぞれ加えていくと、Full match 構造の DNA を加えた時は R_{ct} の変化がなかったにも関わらず、シトシンバルジ構造の DNA を加えた時は、 R_{ct} の変化が大きいことがわかった(Figure 3)。これらのことから、明らかに EIS 法でも DANP がシトシンバルジ構造を認識していることが示唆された。

4) EIS 法を使った SNP タイピング

シトシンバルジ構造が認識できることから、他のチミン、アデニン、グアニンのバルジ構造の認識についても検討した結果、蛍光で各々の構造を認識した時と同様に、それぞれのバルジ構造が認識できることがわかった。

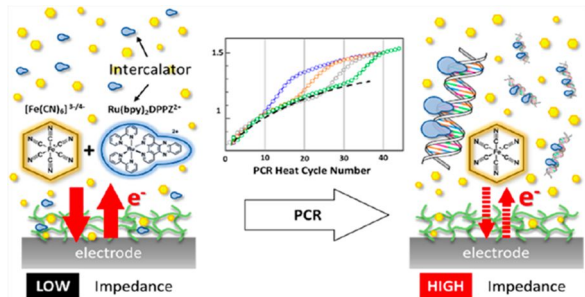


Figure 1. Schematic illustration of PCR detection using impedance modulation mechanism by intercalator.

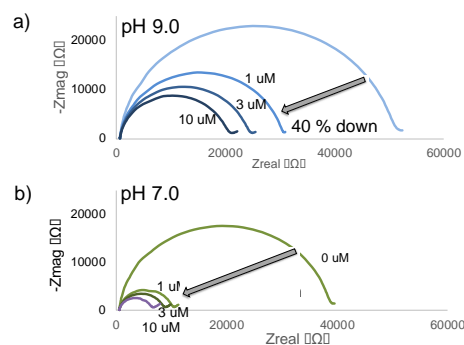


Figure 2. EIS spectra in buffer + 3 mM hexacyanoferrate and DANP with several concentrations. a) pH9.0 Tris-HCl buffer, b) pH7.0 Phosphate buffer

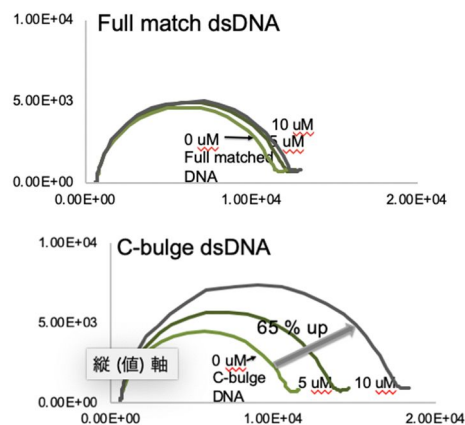


Figure 3. EIS spectra in pH7.0 Phosphate buffer + 3 mM hexacyanoferrate and 1 μM DANP with several concentrations of C-bulge dsDNA or Full match dsDNA. a) C-bulge dsDNA, b) Full match dsDNA

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nobusawa Kazuyuki, Han Huan-Wen, Takei Fumie, Chu Ting-Chieh, Hashida Noriyasu, Yamashita Ichiro	4. 巻 94
2. 論文標題 Electrochemical Impedimetric Real-Time Polymerase Chain Reactions Using Anomalous Charge Transfer Enhancement	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 7747 ~ 7751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c01659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Wada, M. Higashiyama, C. Kurihara, S. Ito, R. Tanemoto, A. Mizoguchi, S. Nishii, K. Inaba, N. Sugihara, Y. Hanawa, K.Horiuchi, N. Shibuya, M. Akiyama, Y. Okada, C. Watanabe, S.Komoto, K. Tomita, F. Takei, R. Hokari	4. 巻 67
2. 論文標題 Protective Effect of Luminal Uric Acid Against Indomethacin-Induced Enteropathy: Role of Antioxidant Effect and Gut Microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci	6. 最初と最後の頁 121-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-021-06848-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fumie Takei, Misaki Akiyama, Minoru Dateki	4. 巻 46
2. 論文標題 (1)High Allele Discrimination in the Typing of Single Nucleotide Polymorphisms of miRNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem	6. 最初と最後の頁 116363-116369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akinori Wada, Masaaki Higashiyama, Chie Kurihara, Suguru Ito, Rina Tanemoto, Akinori Mizoguchi, Shin Nishii, Kenichi Inaba, Nao Sugihara, Yoshinori Hanawa, Kazuki Horiuchi, Naoki Shibuya, Misaki Akiyama, Yoshikiyo Okada, Chikako Watanabe, Shunsuke Komoto, Kengo Tomita, Fumie Takei, Ryota Hokari	4. 巻 67
2. 論文標題 Protective Effect of Luminal Uric Acid Against Indomethacin-Induced Enteropathy: Role of Antioxidant Effect and Gut Microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dig Dis Sci	6. 最初と最後の頁 121-133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-021-06848-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada A; Higashiyama M.; Kurihara C.; Ito S.; Tanemoto R.; Mizoguchi A.; Nishii S.; Inaba K.; Sugihara N.; Hanawa .Y; Horiuchi K.; Shibuya N.; Akiyama M.; Okada Y.; Watanabe C.; Komoto S.; Tomita K.; Takei F.; Hokari R.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Protective Effect of Luminal Uric acid Against Indomethacin-induced Enteropathy: Role of Antioxidant Effect and Gut Microbiota	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestive Diseases and Sciences.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10620-021-06848-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nobusawa, K; Sabani, N. B.; Takei, F.; Nakatani, K. and Yamashita I	4. 巻 49
2. 論文標題 Hydrolytically Stable Monolayers Derived from Epoxy Silane	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 129-132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.190700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takei, F.; Akiyama, M.; Murata, A.; Sugai, A.; Nakatani, K. and Yamashita I	4. 巻 21
2. 論文標題 (2)RT-Hpro-PCR: A MicroRNA Detection System Utilizing a Primer with a DNA Tag	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chembiochem	6. 最初と最後の頁 477-480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 F. Takei, S. Hiruma, K. Kamata, I. Yamashita
2. 発表標題 Development of Electrochemical Detection of PCR products using 2, 7-diamino-1,8-naphthyridine derivatives
3. 学会等名 ISNAC2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fumie Takei, Misaki Akiyama, Minoru Dateki
2. 発表標題 Detection of MicroRNAs with Similar Sequences Using Reverse-Transcription Hairpin-Probe Polymerase Chain Reaction
3. 学会等名 ISNAC 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 韓 煥文、信澤 和行、武井 史恵、朱 鼎傑、橋田 徳康、山下 一郎
2. 発表標題 インピーダンス測定によるPCRのリアルタイムモニタリング
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武井史恵, 秋山美沙紀, 山下一郎
2. 発表標題 一塩基配列が異なるmiRNAの蛍光検出法の開発
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武井 史恵
2. 発表標題 DNA, RNA に特異的に結合する分子の開発とその応用
3. 学会等名 174委員会講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Fumie Takei, Misaki Akiyama
2. 発表標題 Detection of similar sequence microRNA using RT-Hpro-PCR
3. 学会等名 ISNAC2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumie Takei
2. 発表標題 Development of turn-on and turn-off type of PCR monitoring system using secondary structure change of DNA
3. 学会等名 The first InternationalWorkshop by the 174th Committee JSPS on Symbiosis of Biology and Nanodevices (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Development of new compounds using for SNP typing
2. 発表標題 Fumie Takei, Naoki Yamada, Sumiyo Hiruma, Kaori Kamata, Ichiro Yamashita
3. 学会等名 ISNAC 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 武井 史恵、山田 直生、比留間 寿美代
2. 発表標題 新規ミスマッチ認識分子の創生とその特性
3. 学会等名 日本化学会第104回春季年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 miRNA用プライマー及び該プライマーを用いた核酸増幅反応法	発明者 武井史恵	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、6744531	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------