

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：24506
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K05280
研究課題名（和文）医療現場での感染症や遺伝子迅速診断のためのフォトニックDNAバイオセンサーの開発

研究課題名（英文）Development of Photonic DNA Biosensors for Rapid Diagnosis of Infections in Point of Care Testing

研究代表者
高田 忠雄（Takada, Tadao）

兵庫県立大学・工学研究科・准教授

研究者番号：60511699
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、体液由来の核酸を高感度で検出することが可能な光電気化学センサーを開発した。DNAの分子認識能力と金ナノ粒子（AuNP）の近接場を利用し、高感度かつ迅速な検出技術の確立を目指した。DNA二本鎖を用いて金ナノ粒子を配置し、光増感分子を励起することで光電流が増強されることを見出した。等温ハイブリダイゼーション連鎖反応（HCR）や酵素TdTを用いたシグナル増幅系の構築に成功した。また、カリウムイオンやATP、トロンビンに結合するアプタマーを用いた光電気化学センサーを開発した。これらの研究成果は、迅速で正確な病原体や生体分子の検出に貢献する新しいツールとして期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した光電流検出型フォトニックDNAセンサーは、感染症やがん診断、遺伝子解析などの医学領域での核酸の高感度検出を可能にし、迅速かつ正確な病原体の検出を実現すると期待される。これにより、病気の早期診断や治療の改善に大きく貢献する。また、小型で安価な分析デバイスの開発により、医療現場での即時診断が可能となり、ヘルスケアの向上にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a photoelectrochemical sensor capable of highly sensitive detection of nucleic acids derived from body fluids. By utilizing the molecular recognition ability of DNA and the near-field effect of gold nanoparticles (AuNPs), we aimed to establish a highly sensitive and rapid detection technique. We found that by arranging gold nanoparticles using double-stranded DNA and exciting photosensitizing molecules, the photocurrent was enhanced. We successfully constructed signal amplification systems using isothermal hybridization chain reaction (HCR) and the enzyme TdT. Additionally, we developed photoelectrochemical sensors using aptamers that bind to potassium ions, ATP, and thrombin. These research results are expected to contribute as a new tool for the rapid and accurate detection of pathogens and biomolecules.

研究分野：核酸化学

キーワード：DNA 光電流 光化学 光増感剤 電子移動反応 金ナノ粒子 近接場光

1. 研究開始当初の背景

診断や遺伝子型判定等への応用を目的とし、様々な分子に対して認識機能を持つ核酸(DNA, RNA)を利用した分光測定による標的分子や小分子の検出センサーの開発が盛んに行われている。リアルタイム PCR や電気泳動法などの多くの基盤技術が確立されているが、検査機関や医療現場への導入、ヘルスケア機器への適用が容易な分析デバイスの開発が求められている。DNA の分子認識機能を利用した電気化学センサーの開発も広く行われている。電気化学装置は小型化が容易であり、かつ安価なことから、分析デバイスとしての期待が高まっている。

通常の電気化学測定と比較して、光照射によって生じる電流を検出シグナルとする光電気化学測定には多くの利点がある。光による応答制御、極めて低いバックグラウンド電流、照射光波長を変えることによる複数の情報読み出しなどの特性があり、サブピコアンペアの電流を検出することも可能であるため、極微量サンプルの検出が可能である。ただし、シグナルを得るために光源が必要という欠点があるが、この問題が解決されれば新しいタイプの電気化学バイオセンサーとしての応用が期待できる。

感染症診断やがん診断、遺伝子解析等への応用を目的とし、体液(尿、血液、粘液など)由来の遺伝子断片である核酸を分析・検出する技術の有用性が近年急速に高まっている。リアルタイム PCR や電気泳動法などの基盤技術が確立されているものの、操作の煩雑さ、時間を要する PCR 反応、高額な検出装置などの課題があるため、信頼できる感度と精度を保ちながら医療現場への導入が可能な診断デバイスの開発が求められている。検体中の極微量核酸を簡便かつ PCR 増幅無しに検出可能な技術が確立されれば、感染症や遺伝子診断の”その場診断”を実現する医療機器デバイスの開発につながると期待される。

2. 研究の目的

感染症やがん診断、遺伝子解析等の医療分野への応用を目的とし、体液(尿、血液、粘液)由来の核酸(DNA, RNA)を対象とした高感度検出技術の有用性が急速に高まっている。これまでに、申請者は DNA が有する分子認識機能と電子移動特性に着目し、核酸の高感度検出を可能とする光電気化学センサーの開発を行ってきた(図1)。本研究では、迅速性や検出感度の飛躍的な向上を目指し、DNA の分子認識と金ナノ粒子(AuNP)表面に生じる近接場を組み合わせた光応答システムの基本原理を確立し、増幅光電流シグナルによって極微量核酸の迅速検出を可能とするフォトニック DNA センサーの開発を目指した。具体的には、近接場光を利用した電子移動反応システムの確立とフォトニック DNA センサーを作製し、AuNP ナノ構造体における局在電場増強を利用した光電流増幅の実現、及び等温増幅法を組み合わせたターゲット核酸 RNA の超高感度検出システムの開発を行った。これにより、標的核酸を PCR-free で直接検出可能とする革新的な検出技術を確認し、医療現場における”その場診断”を実現する診断デバイスの開発を目指した。

3. 研究の方法

末端にチオール基を修飾した一本鎖 DNA を化学合成し、チオール基と Au の反応を利用して、DNA 修飾金ナノ粒子(DNA/AuNP) および DNA 修飾金電極(DNA-electrode) を作製した(図2)。続いて、DNA の二本鎖形成を利用して目的とする AuNP を表面に固定した金電極を作製した。表面修飾効率は、脱ハイブリダイゼーション後に回収した AuNP の吸収

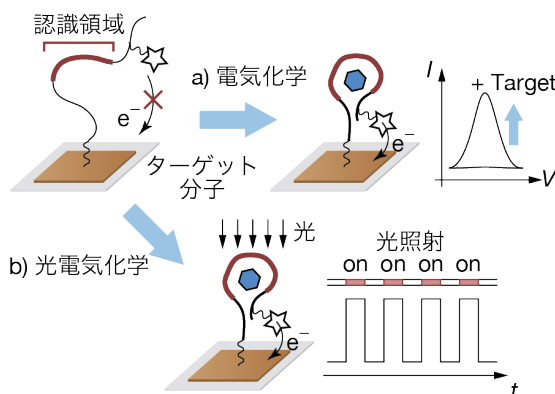


図1. DNA (光) 電気化学バイオセンサー。DNA の認識を電流シグナル変化と結びつけることで、物質の検出を行うことができる

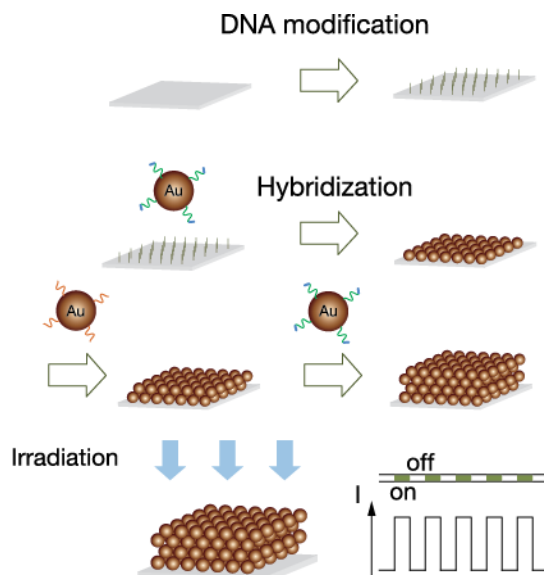


図2. DNA の二本鎖形成を利用した電極表面修飾スキーム

スペクトルによって同定した。光増感剤分子の合成を行い、さらに DNA の特定の位置にそれらの分子を化学合成によって導入した修飾 DNA を合成した。最後に、電極に光を照射することで得られる光電流強度、また照射波長を変化させることで光電流アクションスペクトルの測定を行った。

4. 研究成果

(1) AuNP 多層化電極の光電気化学測定

SH 基を 5' 末端に修飾したアデニン 30 量体(A30)およびチミン 30 量体(T30)配列を持つ DNA を化学合成し、Au-S 結合形成によって AuNP 表面に DNA を修飾した複合体(AuNP/DNA)を作製した。相補的な配列の DNA のハイブリダイゼーションによる AuNP/DNA の会合を吸収スペクトル変化から調べた。A30-AuNP 単独では NaCl の濃度を増加させても大きなスペクトル変化は観測されなかった。一方、相補配列の T30 を修飾した DNA (T30-AuNP) を共存させて NaCl 濃度を増加させると、プラズモン吸収の長波長シフトとブロードニングが観測された (図 3)。これにより、設計通り二本鎖形成によって AuNP の会合が起こることが確認された。

次に、DNA のハイブリダイゼーションによって AuNP を表面修飾した電極を作製し、光電流測定を行った。光増感分子ペリレンジイミド(PDI)の存在下、AuNP のプラズモン吸収に対応する可視光を照射し、光電流アクションスペクトルを得た (図 4)。AuNP を電極に固定すると、光電流の顕著な増加が観測され、AuNP 表面の増強電場によって光電流が増幅されることが確認された。犠牲剤のアスコルビン酸(Asc)存在下で同様に測定を行ったところ、光電流の上昇が見られたが、AuNP の増強電場による増幅効果は強くは見られなかった。

さらに、T30-AuNP、A30-AuNP 溶液で繰り返し処理し、AuNP の多層膜を構築した電極を作製し、その光応答の照射光強度依存性を調べた。20 nm の AuNP では AuNP を 2 層としたときに極めて強い光電流が観測された。サイズの大きな 40 nm の AuNP を用いた場合、3 層にしたときに最も強い光電流が得られた。この差は、AuNP をランダムに積層させた結果、光電流を強く生じる元となる“ホットスポット”の形成に違いが生じたためと考えられる。

(2) HCR を利用した光電流増幅

PCR フリーな核酸検出法を目的とし、等温で二本鎖形成が連続的に進行する hybridization chain reaction (HCR)に着目し、HCR と光電流検出法を組み合わせた新規核酸検出センサーの開発を行った (図 5)。DNA 自動合成機を用いて DNA 合成を行い、電極に DNA を固定するために末端をチオール基で修飾を行った。ハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR) の進行は、アガロースゲル電気泳動で確認し、電極上での HCR 反応はクロノクーロメトリー測定によって調べた。HCR 後の電極に、光応答性 DNA 結合性分子の水溶性ポルフィリンを DNA に結合させた後、420 nm の光を照射して光電流測定を行った。

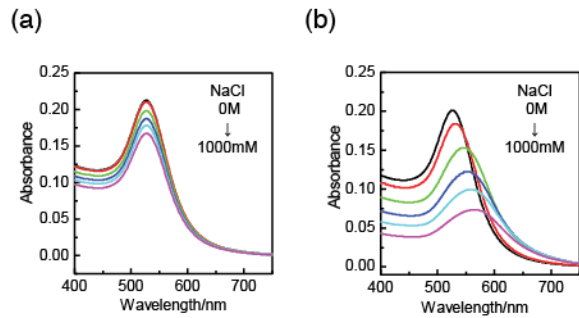


図 3. (a) AuNP/A30 の吸収スペクトルの塩濃度依存性。(b) 塩濃度を増加させたときの AuNP/A30, AuNP/T30 混合溶液の吸収スペクトル変化。

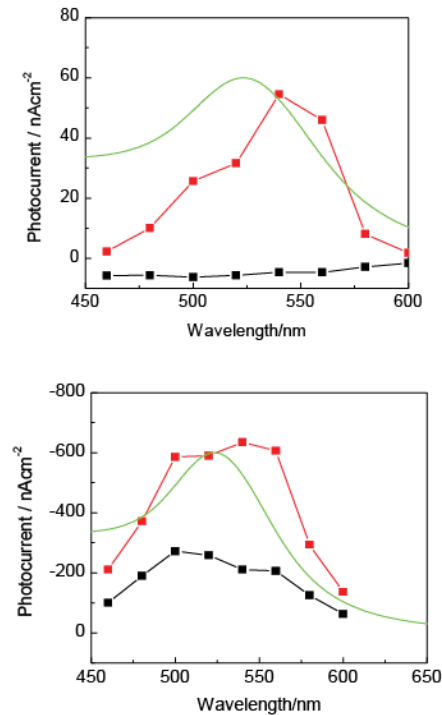


図 4. AuNP を固定した電極における光電流アクションスペクトル。

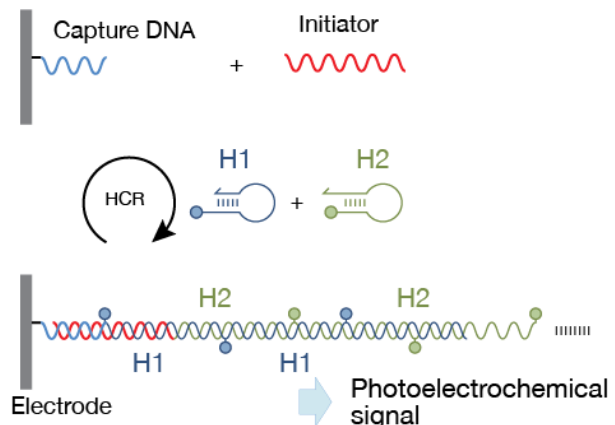


図 5. 電極上での標的核酸の検出のためのハイブリダイゼーション連鎖反応 (HCR)。

Initiator DNA を固定し、相補的な配列を持つヘアピン DNA (H1)、および H1 と相補的な配列を持つヘアピン DNA (H2) を連鎖的に反応させることで連続的に二本鎖 DNA を伸長させた。電極表面に固定した Capture DNA によって Initiator を固定し、H1 と H2 を加えることでハイブリッドチェーンリアクション (HCR) を行った。二本鎖 DNA に結合する Ru 錯体の電気化学応答を用いて表面 HCR を調べた結果、HCR の進行に対応して Ru 錯体の電気化学シグナルが増加することが確認された (図 6a)。

HCR 反応を行った後、DNA インターカレーターである水溶性ポルフィリンを共存させて、420 nm の光を照射し光電流測定を行った。光照射に対応した電流応答が観測され、一本鎖 DNA と比較して、二本鎖 DNA では電流が大きくなり、HCR によってさらに電流が増幅することが分かった。Initiator DNA をトリガーとした等温増幅により電極表面の DNA 量を増やすことで、光電流の増幅が可能であることが示された (図 6b)。

(3) まとめ

AuNP 多層化電極の光電気化学測定では、SH 基を修飾したアデニン 30 量体 (A30) およびチミン 30 量体 (T30) を化学合成し、Au-S 結合により AuNP 表面に DNA を修飾した。相補的な T30 修飾 DNA と NaCl 共存下でプラズモン吸収のシフトとブロードニングが観測され、二本鎖形成による AuNP 会合が確認された。次に、光電流測定で AuNP 固定電極の増強電場効果を確認した。さらに、AuNP 多層膜電極の光応答強度依存性を調査し、ホットスポット形成による光電流増加を示した。また、HCR を利用した光電流増幅では、PCR フリーの核酸検出センサーを開発し、電極上で HCR を行い、ポルフィリンを用いた光電流測定で電流の増幅を確認した。以上の結果より、金ナノ粒子による光電流増幅と連続ハイブリダイゼーションによる増幅を組み合わせることで、微量核酸検出への応用が期待される。

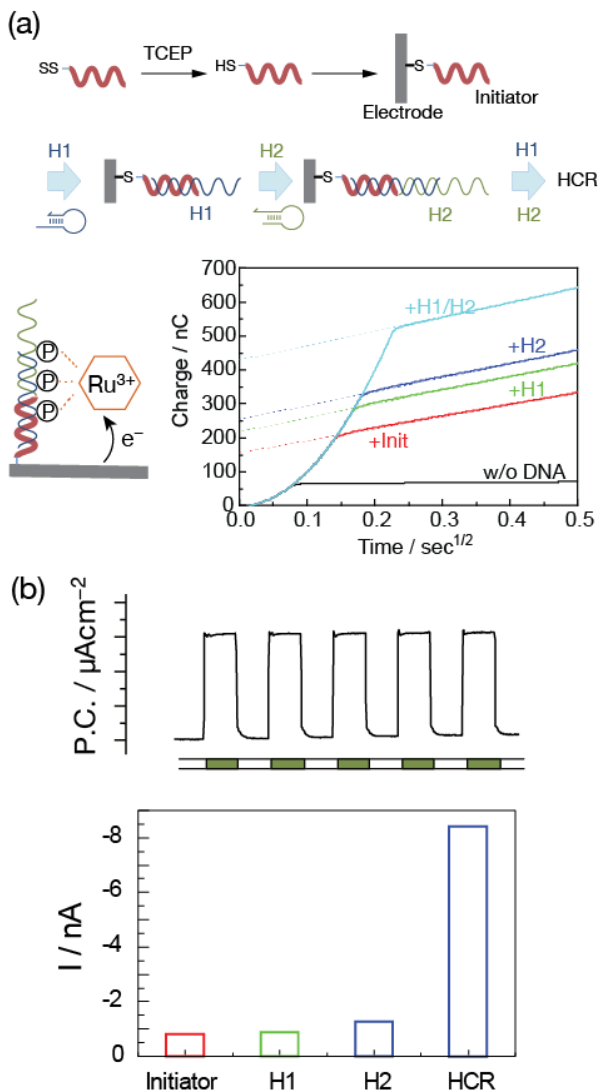


図 6. (a) 電極上の DNA の表面修飾と HCR。RuHex アッセイを使用した HCR 反応の評価。(b) ポルフィリン誘導体の存在下での DNA 修飾電極の光電流応答

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2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 Takada Tadao, Shimogaki Nao, Naruo Moe, Nakamura Mitsunobu, Yamana Kazushige | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 Photoresponsive Porphyrin DNA Complexes Constructed through Intercalation like Binding | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ChemPhotoChem | 6. 最初と最後の頁 e202200093 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptc.202200093 | 査読の有無 無 |
| 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 Fan Shuya, Takada Tadao, Maruyama Atsushi, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko | 4. 巻 95 |
| 2. 論文標題 Large Heterogeneity Observed in Single Molecule Measurements of Intramolecular Electron Transfer Rates through DNA | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Bulletin of the Chemical Society of Japan | 6. 最初と最後の頁 1697 ~ 1702 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/bcsj.20220220 | 査読の有無 無 |
| 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 Nakamura Mitsunobu, Yoshioka Hibiki, Takada Tadao | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Conformational Switching of Pyrenes Associated on Hairpin Loop Region by DNA B Z Transition | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ChemistrySelect | 6. 最初と最後の頁 e202200696 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/slct.202200696 | 査読の有無 無 |
| 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 Fan Shuya, Takada Tadao, Maruyama Atsushi, Fujitsuka Mamoru, Kawai Kiyohiko | 4. 巻 29 |
| 2. 論文標題 Programmed Control of Fluorescence Blinking Patterns based on Electron Transfer in DNA | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Chemistry - A European Journal | 6. 最初と最後の頁 e202203552 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.202203552 | 査読の有無 無 |
| 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 Takada Tadao, Shimogaki Nao, Naruo Moe, Nakamura Mitsunobu, Yamana Kazushige | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Photoresponsive Porphyrin DNA Complexes Constructed through Intercalation like Binding | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 ChemPhotoChem | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cptc.202200093 | 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 Takada Tadao, Nishida Koma, Honda Yurika, Nakano Aoi, Nakamura Mitsunobu, Fan Shuya, Kawai Kiyohiko, Fujitsuka Mamoru, Yamana Kazushige | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Stacked Thiazole Orange Dyes in DNA Capable of Switching Emissive Behavior in Response to Structural Transitions | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 ChemBioChem | 6. 最初と最後の頁 2729 ~ 2735 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.202100309 | 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7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 高田 忠雄 |
| 2. 発表標題 生体分子の超高感度検出を可能とする光化学バイオセンサーの開発 |
| 3. 学会等名 2022年度 有機光化学研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 田中亜季・中村 光伸・高田 忠雄 |
| 2. 発表標題 等温増幅反応を利用した核酸検出光バイオセンサーの開発 |
| 3. 学会等名 2022年光化学討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 由里 拓也・中村 光伸・高田 忠雄 |
| 2. 発表標題 核酸の構造変化を利用した光電気化学アプタマーセンサーの開発 |
| 3. 学会等名 2022年光化学討論会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 田中亜季・中村 光伸・高田 忠雄 |
| 2. 発表標題 ハイブリダイゼーション連鎖反応を利用した核酸検出光バイオセンサーの開発 |
| 3. 学会等名 日本化学会第101春季年会2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 由里 拓也・中村 光伸・高田 忠雄 |
| 2. 発表標題 光電流を観測シグナルとした電気化学アプタマーセンサーの開発 |
| 3. 学会等名 日本化学会第101春季年会2022 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shiori Sugano, Ken Nishioka, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada |
| 2. 発表標題 Biochemical applications of long polynucleotides prepared with terminal deoxynucleotidyl transferase |
| 3. 学会等名 ISNAC2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akiho Kawamoto, Aki Tanaka, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada* |
| 2. 発表標題 Bioconjugation reaction of nucleoside derivatives by water-soluble nanoparticles possessing photoredox catalysis |
| 3. 学会等名 ISNAC2023 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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 |
|---------|---------|
| | |