

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：11301
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23750074
 研究課題名（和文） AP サイト結合リガンドと RCA 反応に基づく高感度アプタマーセンサーの開発
 研究課題名（英文） Development of sensitive aptasensors based on AP-site-binding ligands and Rolling cycle amplification.
 研究代表者
 徐 志愛 (XU ZHIAI)
 東北大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：50562336

研究成果の概要（和文）：本課題の研究成果の一つとして、脱塩基部位(AP サイト)含有 DNA 二重鎖、RNA 二重鎖、および DNA/RNA ハイブリッド二重鎖に対して結合するリガンドの結合特性の評価が挙げられる。もう一つの研究成果としては上記のリガンドに基づいた新しい種類の AP サイト含有アプタマーの構築が挙げられる。

研究成果の概要（英文）：In one part of this project, we have examined the binding of several different ligands such as flavones and naphthyridines to AP-site-containing DNA, RNA or DNA/RNA hybrid duplexes. The other part of this project is to develop new kinds of aptasensors based on these ligands and engineered AP-site-containing aptamers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分析化学

科研費の分科・細目：生物分析化学

キーワード：アプタマー， モルキュラービーコン， 蛍光リガンド， L-アルギニアミド， アデノシン， DNA， RNA

1. 研究開始当初の背景

生体分子の正確かつ高感度な検出は、病気の診断、予防そして治療にとって必要不可欠なものである。アプタマーはインビトロセクション法により作られたオリゴヌクレオチドである。合成の容易さ、十分な安定性、設計の柔軟性、高親和性、そして標的に対する特異性などの利点を有するので、近年アプタマーは分子認識可能な物質として広く用いられてきた。しかし、これらのシグナルアプタマーは、DNA または RNA 配列の中に信号変換部位となる色素を共有結合でラベル化することが必要である。そのため、ラベルフリーかつ高感度な生体分子検知法の開発は非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、AP サイト結合性リガンドを用いた、重要な生体分子に選択的に結合するラベルフリーかつ高感度なアプタマーバイオセンサーの開発および実際の検出系への適用である。

3. 研究の方法

- (1). 高い結合定数と優れた対面塩基選択性を有するリガンドを見出すため、数種のリガンドについて DNA 二重鎖、RNA 二重鎖、および DNA/RNA ハイブリッド二重鎖への結合親和力を調べた。
- (2). AP サイト含有 DNA 二重鎖をもとに、新規のアプタマーを開発した。
- (3). AP サイトとリガンドの位置関係に基づいたアプタマー配列の合理的設計により、生体分子を標的としたラベルフリーかつ高感

度なアプタセンサーを開発した。

4. 研究成果

(1). Flavone 類は微視的環境の変化に敏感に
 応答するため、励起状態でのプロトントラン
 スファー (ESPT) に基づく応答を示す有望な
 蛍光プローブである。我々は四種類のフラビ
 ン (3-hydroxyflavone,
 3,3',4',7-tetrahydroxyflavone,
 3,3',4',5,7-tetrahydroxyflavone,
 4'-dimethylamino-3-hydroxyflavone) と AP
 サイトを有する DNA と RNA の二重鎖の相互
 作用を考察した。AP サイト隣接塩基がアデ
 ニンとチミンの場合では、Tautomer 状態
 から蛍光は四種類のフラビンともに増加す
 る。しかし、AP サイト隣接塩基がシトシン
 とグアニンの場合では、3-HF は蛍光強度
 が減る一方で、ほかの三つのフラビンは増
 加するままである。そこで、AP サイト対
 面塩基の影響を考察した。AP サイト対
 面塩基がシトシンとチミンの場合にはグ
 アニンとアデニンの場合よりも蛍光強度
 が強くなる。このアデニンとシトシンの
 レスポンスの大きな違いを利用すること
 で miRNA の識別に応用可能となった。

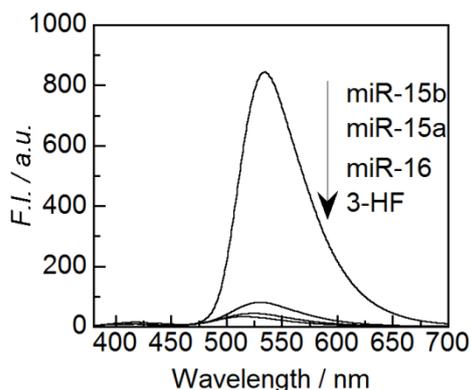


Fig. 1 Fluorescence spectra of 3-HF (5 μ M) in the absence and presence of miR-15a, miR-15b and miR-16 (5 μ M each).

(2). AP サイト結合性リガンドは一塩基の
 違いを区別する能力が高いため、一連の AP
 サイト結合性リガンドと DNA 二重鎖以外
 の二重鎖との相互作用を詳しく考察した。
 AMND, ADMND, ATMND などのナフチリ
 ジンリガンドと AP サイトを含む DNA
 二重鎖, RNA 二重鎖, DNA/RNA, RNA/
 DNA ハイブリッド二重鎖への結合能力
 を考察した。結合定数の結果から、AMND
 は RNA 二重鎖の中のウラシルよりもシ
 トシンへ一番高い選択性を示すことがわ
 かった。ATMND は三つのリガンドの中
 で一番強い結合定数を有する。この高い
 結合能力からこれらのリガンドは RNA
 検出プローブに使用可能と言える。

Table 1. The binding constants of AMND, ADMND and ATMND to DNA duplex (first two line), RNA duplex (the third and fourth line), target RNA/probe DNA duplex (the fifth and sixth line) and target DNA/probe RNA duplex (the last two lines).

	AMND ($\times 10^6 M^{-1}$)	ADMND ($\times 10^6 M^{-1}$)	ATMND ($\times 10^6 M^{-1}$)
C	6.27	12.59	31.07
T	0.28	2.71	9.42
C	14.63	5.59	23.1
U	0.22	0.87	5.27
C	3.93	12.4	28.5
U	0.17	0.83	2.21
C	2.08	1.35	8.11
T	0.24	1.03	4.22

(3). AP サイト含有 DNA を用いた研究結果
 から、DNA 中の望むところに蛍光性リガ
 ンドを導入することを考えた。リボフラ
 ビン (riboflavin) をモデルとしてリガ
 ンドと核酸塩基の PET 効果を考察した。
 四種類の核酸塩基の違いの効果、位置、
 グアニン塩基の数、及び AP サイトに
 結合するリガンドの蛍光強度への影響
 を考察した。2つのグアニンが AP
 サイトに隣接する場合は、DNA 二重鎖
 は最も強く riboflavin の蛍光を消光す
 る。アプタセンサーの場合、DNA 配
 列は SNPs typing に使う配列と一致す
 る必要がないので、蛍光を消光ある
 いは増強する最もよい配列が存在す
 るはずである。種々の AP-DNAs 存在
 下でのリガンドの蛍光応答挙動を比較
 することで、アプタセンサーに最もふ
 さわしい配列がみつけられる。したが
 って、riboflavin とグアニンとの間の
 光誘起電子移動について研究すること
 は、さらに効率的なアプタセンサーの
 分子設計で重要である。

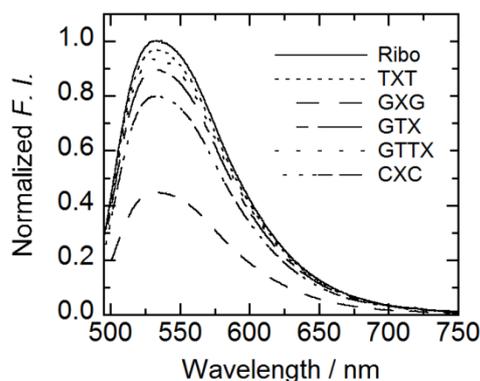


Fig. 2 The fluorescence spectra of

riboflavin in the presence of DNA duplexes with different guanine location.

(4). ある核酸とこれに相補的な配列を持つ AP サイト含有 DNA (AP-DNA) との結合能力を融点測定と ITC 法とにより研究した。その結果、プリン塩基は AP-DNA と高い結合能力を示すことが分かった。この相互作用は、主としてエンタルピーの変化により生じたと考えられ、DNA インターカレータの場合と似ている。一方、ピリミジン塩基の場合には AP-DNA との結合を検出できなかった。ITC 測定で示されるように、AP サイトとの stacking 相互作用はプリン塩基の方が顕著であり、AP-DNA への結合に重要な役割を果たす。次に、AP-DNA をアデノシンに対するアプタセンサーとして使用するために、アデノシンと AP-サイトに結合する蛍光リガンドとの競合アッセイを行った。(Fig. 3) この測定では、蛍光リガンドであるリボフラビン (riboflavin) が DNA 二重鎖中の AP サイトに結合し、蛍光消光することを利用している。アデノシンを riboflavin/AP-DNA の複合体に加えることにより、アデノシンは AP サイトに結合し、riboflavin が AP サイトから放出される。その結果、riboflavin の蛍光が回復する。AP-DNAs は新たなアプタセンサーとして応用でき、アデノシンに対する LOD は 0.7 μM であった。これまでのアデノシンのアプタセンサーとは違い、本研究で報告する方法は、AMP, ADP, ATP よりもアデノシンへの高い選択性を示している。この方法は蛍光団を共有結合でラベルする必要がないのでコスト的にも高くなく有利であると言える。本方法を馬血清中のアデノシン検出に応用し、その有効性を確認できた。

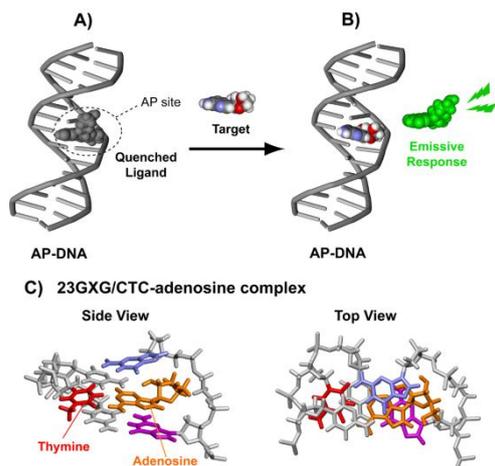


Fig. 3. (A, B) Schematic illustration of the detection principle for nucleosides that bind to the AP site in a DNA duplex. (C) Energy minimized structures of the complex between adenosine (orange) and

thymine (red) opposite the AP site in the 23GXG/CTC DNA duplex.

(5). モレキュラービーコン (MB) は一本鎖の RNA または DNA で、stem-loop 構造を有する。通常は、蛍光団と消光団を一本鎖核酸の両末端にラベル化する。標的となる DNA や RNA 分子が存在すれば、両末端の stem 部位が開いて蛍光団と消光団が距離的に離れて発光応答が生じる。一方、AP-DNAs に結合する蛍光リガンドを利用すると、一塩基の違いを識別可能なリガンドと stem-loop AP-DNAs との組み合わせは新しい MB システムとして機能し得ると考えられる。これを用いて、PCR 増幅生成物の一塩基多型の検出に成功している。従来の MBs に比べて、蛍光団と消光団を有する DNA のように色素のラベル化の必要がない。そこで、AP-DNA と一塩基の違いを識別可能な蛍光リガンドを含む MB を新たな signal-on 型 ATP アプタセンサーとして設計した。ATP がいない場合、ATP のアプタマーと AP DNAs は二重鎖を形成する。ATP が存在する場合は、アプタマーは ATP と錯体を形成し、AP DNAs はフリーの一本鎖となり、stem-loop 構造を形成して AP サイトが stem 部位に位置するようになる。したがって、AP サイトに結合するリガンドを信号応答分子として利用可能となる。このようにして、signal-on 型 ATP アプタセンサーを開発した。

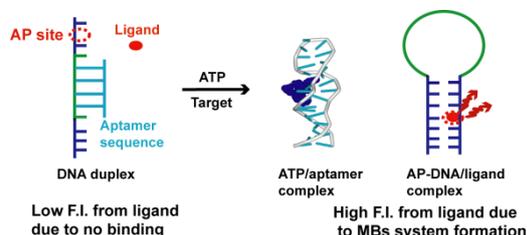


Fig. 4 Schematic illustration of the detection principle for ATP based on the formation of label-free molecular beacon system.

(6). 核酸アプタマー配列のコンフォメーション変化に基づく小分子の検出法を開発した。stem-loop アプタマーの中で標的に結合する配列近傍に AP サイトを有する stem 部位を形成し、この AP サイトに蛍光リガンドを結合させる。DCPC は水素結合を介して AP-DNA に結合し、標的分子のアプタマー結合時のコンフォメーション変化により AP サイト周辺の構造変化が誘起され DCPC の蛍光応答が変化する。この蛍光応答機構を利用して L-アルギニアミド (L-Arm) の検出を検討した。この方法により、2.1 μM まで、感度よく L-Arm を検出できることが確認された。この方法はま

たアデノシンの検出にも利用可能であった。APサイトを有するアプタマーとAPサイトに結合するリガンドを併用する本方法により、馬血清中の標的分子の検出に成功した。

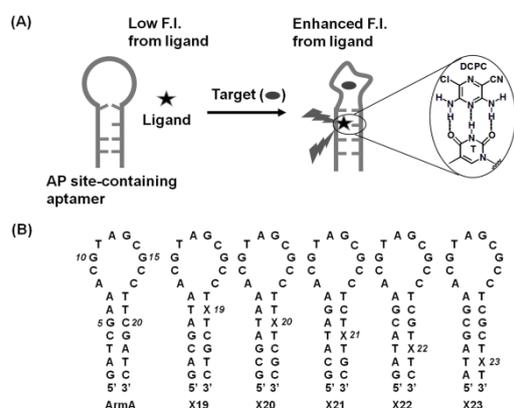


Fig.5 (A) Schematic representation for fluorescence detection of a target based on conformational adaptability of an AP site-containing aptamer in combination with an AP site-binding ligand (DCPC). (B) The sequences of L-Arm aptamer and modified aptamers with different AP site positions in the stem. (X denotes the AP site).

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

(1) Pang, Z. Xu, Y. Sato, S. Nishizawa and N. Teramae. Base-Pairing at the Abasic Site in DNA Duplexes and Its Application for Adenosine Aptasensor. *ChemBioChem* 2012, 13, 436-442.

DOI: 10.1002/cbic.201100666

(2) Z. Xu, Y. Sato, S. Nishizawa, and N. Teramae. Fluorescent aptasensors based on conformational adaptability of abasic site-containing aptamers in combination with abasic site-binding ligands. *Biosensors & Bioelectronics* 2011, 26, 4733-4738.

DOI: 10.1016/j.bios.2011.05.051

[学会発表] (計3件)

① Z. Xu, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae. A signal-on ATP aptasensor based on nucleobase-specific fluorescent ligands. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC 2011), 2011/12/9, Sapporo, Japan.

② 徐志愛 Label-free aptasensors

based on abasic site-containing DNA and nucleobase-specific fluorescent ligands. 第28回無機分析コロキウム 2011/6/10 東北大学 川渡共同セミナーセンター.

③ Z. Xu, Y. Pang, Y. Sato, S. Nishizawa, N. Teramae. Adenosine sensor based on AP site-containing DNA duplex and fluorescent ligand. IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011 (ICAS 2011), 2011/5/25, Kyoto, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://www.anal.chem.tohoku.ac.jp/>

(東北大学大学院理学研究科化学専攻分析化学研究室)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徐志愛 (XU ZHAI)

東北大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号: 50562336

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: