

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24750071

研究課題名(和文)シクロデキストリン-フェロセン相互作用による均一溶液中での電流増加型遺伝子検出

研究課題名(英文)Electrochemical DNA detection using naphthalene diimide having ferrocene and beta-cyclodextrin in homogenous solution

研究代表者

佐藤 しのぶ(Sato, Shinobu)

九州工業大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80510677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：DNA固定化電極を利用しない電気化学的遺伝子検出法の開発は、簡易型リアルタイムPCRの開発等において重要である。β-シクロデキストリン(CyD)に包接されたフェロセンは、その包接が解除されると電位のシフトと電流増加を示す。本研究では、この特性を利用して均一溶液中で電流増加型DNA検出を志向した検出システムを構築する。DNA検出の指示薬として、フェロセンとβ-CyDを単一の分子内に有するDNAインターカレータ、FNC2を合成し、これらとDNAとの相互作用解析および均一溶液中におけるDNAの電気化学的検出について検討した。現在、FNC2によって0.05 nMのPCR産物の検出に成功した。

研究成果の概要(英文)：Electrochemical DNA detection has been studying in light of health-care biochip and other related fields. It is also important to detect double stranded DNA amplified by PCR under homogenous solution to check influenza type or norovirus. This can be achieved our developed detection system of double stranded DNA in homogenous solution. Ferrocenylnaphthalene diimide carrying beta-cyclodextrin (FNC) provides signal-on type electrochemical detection of double stranded DNA without DNA-immobilized electrode. FNC shows intramolecular inclusion complex between ferrocene and beta-cyclodextrin with diminished current signal. After bound to double stranded DNA, the complex is collapsed resulting in recovered current signal with positive shift of redox potential. One can detect PCR product electrochemically with high sensitivity under homogenous solution.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオセンサー DNA PCR インターカレータ 電気化学 フェロセン ナフタレンジイミド シクロデキストリン

### 1. 研究開始当初の背景

現在、遺伝子検出は医療分野、食品分野など多岐に渡る分野で利用されている。遺伝子検出には、二重らせん DNA に結合(インターカレート)すると、蛍光を発する色素を利用した手法が適用されている。しかし、蛍光を利用した方法は蛍光色素が高コストであり、蛍光色素が退色するといった問題に加え、装置が大型になる。申請者はこの問題を解決するために電気化学に着目した。電気化学は装置の小型化が容易であるとともに、酸化還元で安定な化合物を利用することによって高感度な検出が実現できるため、電気化学的手法による遺伝子検出が多く報告されている。

例えば、プローブ DNA 固定化電極と 2 本鎖 DNA 選択的に結合する電気化学指示薬を利用した手法もある。プローブ DNA 固定化電極に対して、ターゲット DNA を作用させ、電極上で 2 本鎖 DNA が形成されると、二本鎖 DNA 上に電気化学指示薬が濃縮されるため、電流増加として目的物を検出することができる。これらはプローブ DNA 固定化電極を利用したものであるが、均一な電極の調整が難しい。これに対して、最近均一溶液中で電流減少型の DNA 検出を利用した電気化学的リアルタイム PCR が報告された。これは、二本鎖 DNA 結合性色素が二本鎖 DNA と複合体を形成すると拡散速度が低下し、電流減少することを利用したものであった (図 1A)。

一方、申請者は 2 本鎖 DNA への結合部位としてナフタレンジイミドを持ち、両置換基末端にフェロセンと  $\beta$ -シクロデキストリン (CyD) を有する FNC1 を利用した電流増加型の均一溶液中の遺伝子検出について報告した。図 1B に検出概念を示す。FNC1 は単独ではフェロセンが  $\beta$ -CyD に包摂され、電流が抑制されるが、DNA に結合するとフェロセンが  $\beta$ -CyD から飛び出し、電流が増加する。実際に PCR 産物の検出を試みたところ、6.5 nM の 745 bp PCR 産物の検出に成功した。しかし、FNC1 と DNA 複合体の AFM 画像から、DNA 上での FNC1 の分子間包摂を示唆する DNA の凝集

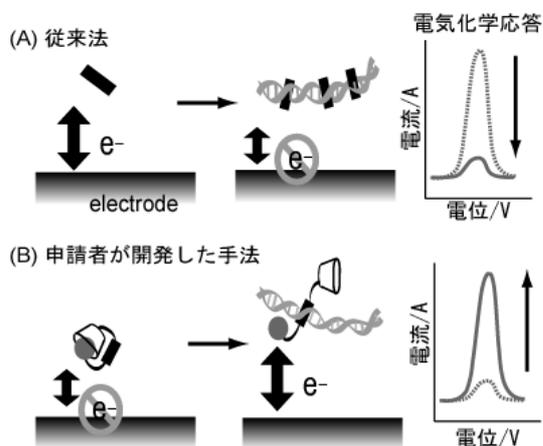


図 1. 均一溶液中における DNA 検出の概念図. 従来法 (A) と本研究 (B) との比較.

体が示唆された。FNC1 は DNA の塩基対 1 塩基置きにインターカレーションするため、最も FNC が近づいた時には分子間包摂体が構築される。これにより検出下限に限界があると推察される。本研究ではこの問題を解決するために、新たな構造の FNC を 2 設計、合成するし、これによる高精度な遺伝子検出を確立する。

### 2. 研究の目的

DNA 固定化電極を利用しない電気化学的遺伝子検出法の開発は、簡易型リアルタイム PCR の開発等において重要である。 $\beta$ -シクロデキストリン (CyD) に包接されたフェロセンは、その包接が解除されると電位のシフトと電流増加を示す。本研究では、この特性を利用して均一溶液中で電流増加型 DNA 検出を志向した検出システムを構築する。DNA 検出の指示薬として、フェロセンと  $\beta$ -CyD を単一の分子内に有する DNA インターカレータを合成し、これらと DNA との相互作用解析および均一溶液中における DNA の電気化学的検出について検討する。

本研究において検討する化合物の構造模式図を図 2 に示した。FNC 構造の最適化を行い、電流増加型の均一溶液中における遺伝子検出法の確立を試みる。

#### (1) 新規 FNC 単独のモルフォロジー評価

分子内包摂体、分子間包摂体 (2 量体もしくはポリマー化) 形成の可能性について検討する。

#### (2) 新規 FNC-DNA 錯体の相互作用解析

結合モードの解明・結合パラメータの算出・他のインターカレータとの比較および DNA 添加に伴う電気化学特性の変化を解析する。

#### (3) DNA 検出

DNA 検出の最適化を行い 10 pM の RCR 産物の電気化学的検出

現在報告されている電気化学的リアルタイム PCR では、5 nM の 283 bp PCR 産物の検出が可能な指示薬で、103 コピーまで検出可能である。1 コピーの検出のため、10 pM PCR 産物 (200-300 bp) の検出を目標とする。

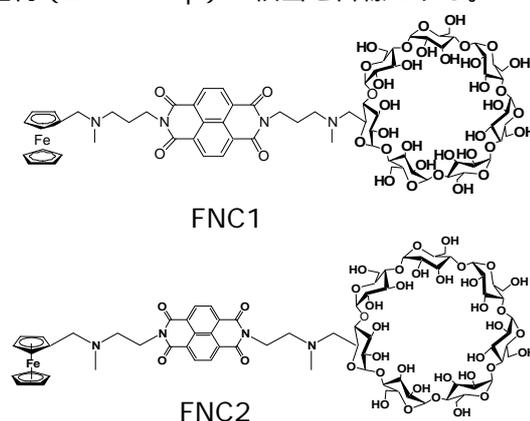


図 2. FNC の構造.

### 3. 研究の方法

#### (1) FNC 単独のモルフォロジー評価

電気化学測定によって、FNC の有するフェロセンの酸化還元電位を観察した。シクロデキストリンと結合するアダマンタンアミンを FNC 溶液に添加した時の、サイクリックボルタメトリー測定を行うことで、酸化還元電位がシフトする

#### (2) FNC-DNA 複合体のモルフォロジー評価

リンカー構造の異なる FNC と DNA 結合色素との相互作用解析について、UV-VIS スペクトル測定、ストップフロー測定による物理化学的評価を行い、結合モードを解析した。

#### (3) FNC を利用した DNA の電気化学的検出

電極の種類や FNC 濃度条件を検討し、癌細胞で特異的に発現している蛋白質テロメラーゼの触媒活性因子である hTERT の一部の配列を PCR によって増幅し、その PCR 産物の検出について検討した。

### 4. 研究成果

新たに合成した FNC は逆相 HPLC、MALDI-TOF-MS で単一成分であることを確認した。

#### (1) FNC 単独のモルフォロジー評価

フェロセンとアダマンタンはともに CyD に包摂されるが、アダマンタンの方がその結合定数は大きい。FNC2 のフェロセンと CyD が分子内で錯体を形成していれば、その酸化還元電位は正側に現れる。これにアダマンタンアミンを添加すると、アダマンタンアミンが CyD に包摂されることに伴い、フェロセンは CyD から飛び出し、その酸化還元電位は負側にシフトする。

もし、FNC2 が単独でも包接錯体を形成していなければ、アダマンタンアミンを添加しても電位シフトは観察されない。

FNC2 および FNC2-アダマンタンアミン混合溶液の電気化学測定結果を図 3 に示す。これより、アダマンタンアミン添加に伴い負側へ

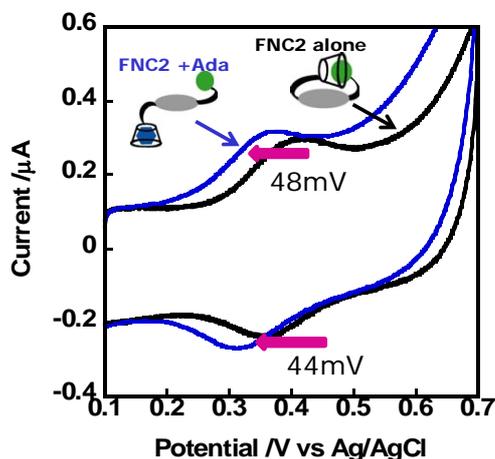


図 3. FNC2 にアダマンタンアミンを添加したときのサイクリックボルタモグラム.

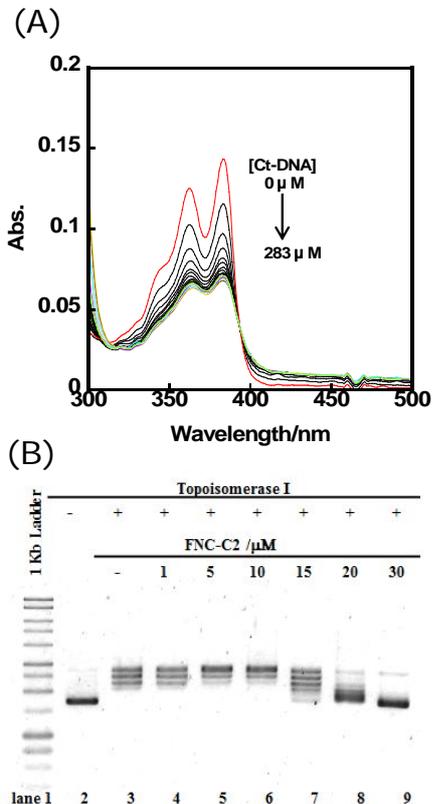


図 4. (A) FNC2 溶液に CT-DNA を添加したときの吸光度変化. (B) プラスミド DNA と FNC2 混合溶液に Topoisomerase I を添加したときの DNA ゲル電気泳動の変化.

の電位シフトが観察されたことから、FNC2 は単独で存在するとき包接錯体を形成していることが示唆された。

#### (2) FNC-DNA 複合体のモルフォロジー評価

5  $\mu$ M FNC 溶液に仔牛胸腺 DNA (CT-DNA) を添加したところ、大きな淡色効果と小さなレッドシフトが観察された (図 4A)。また、プラスミド DNA である pUC19 に FNC を添加し、Topoisomerase I 処理を行った。図 4B に示すように FNC2 の添加に伴い pUC19 のバンドシフトが観察された。これらの挙動は FNC2 が DNA にインターカレーションしていることを示している。

また、FNC と CT-DNA の結合速度パラメータを算出した。その結果 FNC2 は FNC1 に比べ、会合速度が遅くなっていることがわかった。FNC2 の解離速度定数については、FNC1 と比べて 4 倍以上速くなっている。AFM 測定の結果から、FNC1 は DNA に結合すると、DNA 鎖状でフェロセンと CyD が包接錯体を形成していることが確認されている。一方、FNC2 は DNA 鎖状でのフェロセン-CyD 包接ができないように、FNC1 よりもリンカーを短く設計した。解離速度定数の増大は、当初の目的通り FNC2 は DNA 鎖上でのフェロセン-CyD 包接錯体を形成していないことを示唆していると考えられる。

表 1 FNC1 の DNA に対する結合パラメータ

	$10^{-4} k_a / M^{-1}s^{-1}$	$k_d / s^{-1}$
FNC1	16	0.19
FNC2	7.9	0.83

(3) FNC を利用した DNA の電気化学的検出  
FNC2 による DNA 検出のための基礎検討として、FNC2 に DNA を添加したときのサイクリックボルタモグラムを測定した。

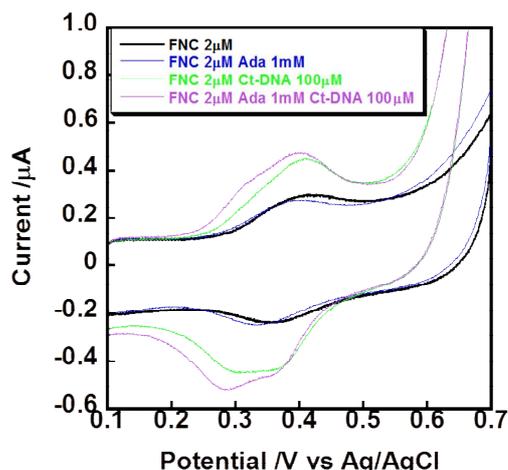


図 5. FNC2 に CT-DNA およびアダマンタンアミンを添加したときのサイクリックボルタモグラム。

図 5 に示す通り、2  $\mu$ M FNC2 溶液では酸化電位は 0.40 V、還元電位は 0.35 V に観察される。これに対し、2  $\mu$ M FNC2, 100  $\mu$ M CT-DNA 混合溶液では、0.3 V に明瞭な還元ピークが観察された。この 0.3 V の還元ピークは、2  $\mu$ M FNC2, 1 mM アダマンタンアミン混合溶液で観察された還元電位と同様の電位で有り、FNC の CyD に包摂されていないフェロセンの応答だと考えられる。2  $\mu$ M FNC2, 100  $\mu$ M CT-DNA, 1 mM アダマンタンアミン混合溶液では、さらに明瞭に 0.3 V の還元ピークが観察されていることから、DNA 鎖上で一部フェロセンと CyD の包接は見られるものの、ほとんどはフェロセンが CyD から除放されている状態であると思われる。

次に癌細胞で特異的に発現しているテロメラーゼの触媒活性因子である hTERT 遺伝子の一部の配列をモデルとした PCR 産物 (121 mer) の検出を試みた。図 6A に示すように、10  $\mu$ M FNC2, 0.25 nM PCR 産物混合溶液のディファレンシャルパルスボルタモグラムは二つのピークが観察され、これをピーク分離したところ、0.33V と 0.44 V のピークに分離された。これより、0.33 V が DNA に結合した FNC2 のフェロセン由来の応答と予想される。0.33 V のピーク電流は PCR 産物の増加とともに増加し、検出下限を算出したところ、0.05 nM であった。同じ PCR 産物を FNC1 で検出したところ、その検出下限は 0.5 nM であったことから、およそ 10 倍の感度向上に成功した。

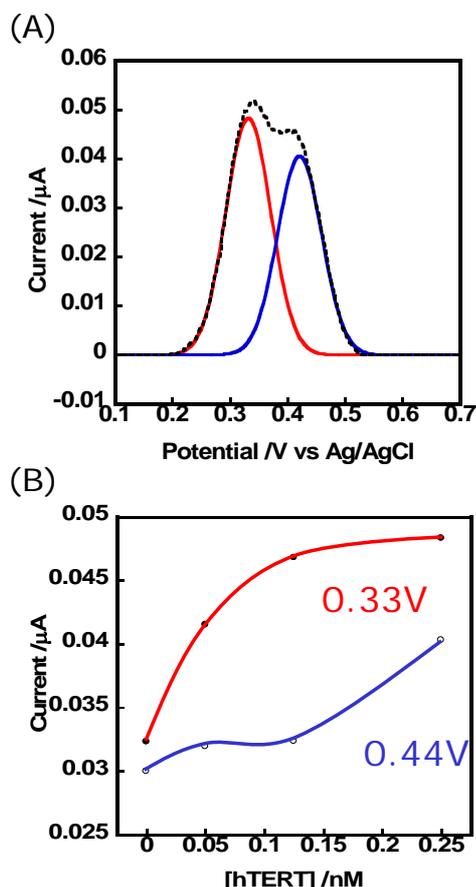


図 6. (A) 10  $\mu$ M FNC2, 0.25 nM PCR 産物混合溶液のディファレンシャルパルスボルタモグラム. (B) 10  $\mu$ M FNC2 溶液に hTERT 遺伝子由来の PCR 産物を添加したときの電流変化。

## 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 4 件)

Hiroto Takekawa, Shinobu Sato, Shigeori Takenaka, Electrochemical DNA duplex detection by an intercalation-triggered decomplexation of ferrocene with  $\gamma$ -cyclodextrin, *Electroanalysis*, 査読有り, Vol.25, 2013, 1827-1830

DOI: 10.1002/elan.201300211

佐藤しのぶ, 竹中繁織, 電気化学的遺伝子検出における超分子形成, *BUNSEKI KAGAKU*, 査読有り, Vol.62, 2013, 627-635

DOI: 10.2116/bunsekikagaku.62.627

Shinobu Sato, Masato Tsueda, Yusuke Kanezaki, Shigeori Takenaka, Detection of an aberrant methylation of CDH4 gene in PCR product by ferrocenylnaphthalene diimide-based electrochemical hybridization assay, *Anal. Chim. Acta.*, 査読有り, Vol. 715, 2012, 42-48

DOI: 10.1016/j.aca.2011.12.010

Shinobu Sato, Shigeori Takenaka,  
Electrochemical DNA Detection Using  
Supramolecular Interactions, Anal. Sci.,  
査読有り, Vol.28, 2012, 643-649  
DOI: 10.2116/analsci.28.643

〔学会発表〕(計 1 1 件)

Shinobu Sato (他 3 名、3 番目)

Synthesis of novel ferrocenylnaphthalene  
diimide carrying  $\beta$ -cyclodextrins  
electrochemical gene detection, 第 40 回  
国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2013),  
2013 年 11 月 13 日-11 月 15 日、神奈川大学  
(横浜)

佐藤しのぶ (他 2 名、2 番目)

フェロセン化ナフタレンジイミドとシクロ  
デキストリンによる均一溶液中での電流増  
加型 DNA 検出の試み、日本分析化学会 第 62  
年会、2013 年 9 月 10 日-9 月 12 日、近畿大  
学東大阪キャンパス(大阪)

佐藤しのぶ (他 3 名、3 番目)

フェロセンと  $\beta$ -シクロデキストリンを有す  
るナフタレンジイミドによる電気化学的遺  
伝子検出、第 23 回バイオ・高分子シンポジ  
ウム、2013 年 7 月 31 日-8 月 1 日、東京工業  
大学西 9 号館デジタル多目的ホール(東京)

佐藤しのぶ (他 3 名、3 番目)

フェロセンと  $\beta$ -シクロデキストリンを有す  
るナフタレンジイミドによる超分子複合体  
形成を利用した電気化学的遺伝子検出、ナノ  
学会第 11 回大会、2013 年 6 月 6 日-8 日、東  
京工業大学百年記念館(東京)

佐藤しのぶ (他 2 名、2 番目)

小分子による DNA 構造制御： $\beta$ -シクロデキ  
ストリンを有するフェロセン化ナフタレン  
ジイミドによる DNA ナノロットの調整、第 62  
回高分子学会年次大会、2013 年 5 月 29 日-31  
日、京都国際会館(京都)

佐藤しのぶ (他 2 名、2 番目)

$\beta$ -シクロデキストリンを有するフェロセン  
化ナフタレンジイミド FNC を利用した遺伝子  
検出の開発、日本分析化学会 第 73 回分析化  
学討論会、2013 年 5 月 18 日-19 日、北海道  
大学函館キャンパス(北海道)

Shinobu Sato (他 2 名、2 番目)

Improvement of preference for double  
stranded DNA of naphthalene diimide  
carrying ferrocene and  $\beta$ -cyclodextrin  
and its application to gene detection  
coupled with DNA probe-immobilized  
electrode, 3rd International Conference  
on Bio-Sensing Technology, 2013 年 5 月 12  
日-15 日, Sitges (Spain)

佐藤しのぶ (他 2 名、2 番目)

$\beta$ -シクロデキストリン-フェロセン化ナフ  
タレンジイミドによる均一溶液中シグナル  
オン型電気化学的遺伝子検出、日本化学会第  
93 春季年会、2013 年 3 月 22 日-25 日、立命館  
大学びわこ・くさつキャンパス(滋賀)

Shinobu Sato (他 2 名、1 番目)

DNA nano wire formation by naphthalene  
diimide carrying ferrocene and  
 $\beta$ -cyclodextrin, 6th International  
Symposium on Nanomedicine (ISNM2012), 2012  
年 11 月 27 日-12 月 1 日, Shimane Prefectural  
Convention Center (Kunibiki Messe, 島根)  
Shinobu Sato (他 2 名、1 番目)

Preparation of rod-like DNA complex by  
supramolecular assembly of a number of  
naphthalene diimide derivative carrying  
ferrocene and  $\beta$ -cyclodextrin on DNA  
duplex, The 39th International Symposium  
on Nucleic Acid Chemistry, 2012 年 11 月  
15 日-17 日, Toyoda Auditorium (名古屋)

佐藤しのぶ (他 2 名、2 番目)

フェロセンと  $\beta$ -シクロデキストリンを有す  
るナフタレンジイミドによる超分子複合体  
形成による DNA ロッドの創製、2012 年 日本  
化学会西日本大会、2012 年 11 月 10 日、佐賀  
大学本庄キャンパス(佐賀)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://takenaka.che.kyutech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 しのぶ (SATO, Shinobu)

九州工業大学・大学院工学研究院・准教授  
研究者番号：80510677