

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410146

研究課題名(和文)酸化グラフェンを用いた光化学反応の自在な制御と高感度遺伝子解析への応用

研究課題名(英文) Regulation of photochemical reaction by graphene oxide and its application to gene analysis

研究代表者

北村 裕介 (Kitamura, Yusuke)

熊本大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：80433019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：酸化グラフェン(GO)を消光剤として利用し、高感度DNA検出法の開発を試みた。5'末端に蛍光色素を修飾したプローブDNAと捕捉DNAとが形成する2本鎖をGO上に吸着させた。捕捉DNAは3'末端側に長い1本鎖領域を有しており、GOに強く吸着する。プローブの3'末端側にも1本鎖突出領域があり、標的DNAが添加されると、この領域をきっかけとして鎖交換が起こり、プローブが遊離する仕組みとした。プローブ遊離後は、捕捉DNAがGO上の吸着サイトを埋めることで、標的DNAの非特異的な吸着が抑制される。また、捕捉DNAによって非特異的なプローブの放出が抑制されており、高いシグナルコントラストを達成した。

研究成果の概要(英文)：Partially oxidized graphene (graphene oxide, GO) is an atomically thin, two-dimensional sheet that contains nanometer-scale graphene-like sp<sup>2</sup> domains in an amorphous sp<sup>3</sup> carbon matrix. It can strongly adsorb single-stranded DNA (ssDNA) via non-covalent hydrophobic and  $\pi$ -stacking interactions with the exposed nucleobases. Meanwhile, GO affinity for double-stranded DNA is much lower because the nucleobases are shielded inside the hydrophilic double helix backbone. GO is also a very effective fluorescence quencher owing to its efficient, long-range energy transfer properties.

In this research, fluorescent-dye-labeled probe DNA was immobilized on fluorescence-quenching graphene oxide (GO) through a capture DNA. When targets were added, the probes were released from the GO through toehold-mediated strand exchange. Higher emission recovery and more signal contrast were achieved relative to conventional methods that are based on direct adsorption of probes.

研究分野：分析化学

キーワード：DNA グラフェン バイオセンサー 遺伝子解析

## 1. 研究開始当初の背景

酸化グラフェン (GO) は、原子一層分の薄さの炭素の二次元シートであり、グラフェン様の  $sp^2$  炭素領域と、アモルファス様の  $sp^3$  炭素領域から成る。GO は水への分散性が高く、その表面やエッジへの化学修飾も容易であること、広い表面積を有していることなどの理由から、バイオセンサー素子、バイオイメージング材料、ドラッグデリバリーシステムなどへの応用が期待されている。

一本鎖 DNA は、その塩基部位と GO 表面との間にはたらく疎水性相互作用や  $\pi$ -スタッキング相互作用によって、GO に強く吸着される。ところが、二本鎖を形成すると、塩基部位が親水的な DNA 骨格中に埋まってしまうため、GO との親和性は低下する。つまり、GO は一本鎖選択的な吸着剤である。

均一溶液中で標的 DNA を検出したい場合、標的と結合した場合のみシグナルを発するようなプローブが必要となる。モレキュラービーコン (一方の末端に蛍光色素を、もう一方の末端に消光剤を修飾したステムループ型のプローブ DNA) はその代表例であり、標的 DNA 非存在下では蛍光色素と消光剤が近接しているため、消光しているが、標的と結合するとステムループ構造が開環し、両部位が離れるため発光するしくみとなっている。このような標的 DNA を刺激として蛍光色素と消光剤の距離を大きく変化させるような分子設計は、最もポピュラーである。GO は紫外可視領域にいて強力な消光能を有しており、多くの研究者はこれに着目し、均一溶液中で標的 DNA の検出を試みている。具体的に述べると、図 1a に示すように、蛍光色素を修飾したプローブ DNA を GO に吸着させて消光させ、そこに、標的 DNA (プローブの相補鎖) を添加する。すると、標的 DNA とプローブが二本鎖を形成し、GO から遊離し、発光が回復する仕組みである。同原理は、プローブへの消光剤の化学修飾を必要としない新たな核酸検出法として注目されている。しかし、この検出システムには、いくつかの欠点が存在する。例えば、GO 表面に隙間なくプローブを吸着させた場合、検出感度は高くなるが、非相補鎖による非特異的なプローブの脱着 (非特異的置換) が起こりやすくなる。一方、吸着させるプローブの量を減らせば、非特異的な脱着は抑制されるが、標的 DNA が GO 上の空いたスペースに吸着するため、検出感度が低下してしまう。

## 2. 研究の目的

高い確率 (人口の 1%以上) で見られる遺伝子内での一塩基の個体差を一塩基多型 (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) という。SNPs は個人の体質、疾病易罹患性、薬剤感受性等を識別する重要な遺伝子マーカーとして考えられている。現在、溶液ハイブリダイゼーション法をベースにした様々な SNPs のスクリーニング戦略が試みられて

いるが、代表的な手法では、酵素反応 (増幅、伸張、連結、切断) を利用しているため操作が煩雑である。また、マイクロアレイ、プレートリーダー、質量分析装置、PCR、シーケンサー等の分析装置は高価な上、熟練技術者による取り扱いおよび解析を必要としている。今後、“必要な患者に、必要な量の、必要な薬剤を”といった理念に基づく「個々人の身体的特徴に合わせた副作用のない医療」(テーラーメイド医療) を展開するためには、SNPs 塩基を簡便に判断し (SNPs タイピング)、個々人の遺伝子を次々に診断していく必要がある。よって、より安価で簡便な SNPs タイピング法の開発並びにそのハイスループット化は革新的課題である。そこで本研究では、膨大な遺伝情報を簡便かつ迅速に解析するために、「高感度、ハイスループットでかつ酵素フリーな SNPs 解析システムの構築」を目的とする。酸化グラフェン (GO) の DNA 吸着能、並びに高い消光能を積極的に活用し、システムの構築を行う (図 1b)。

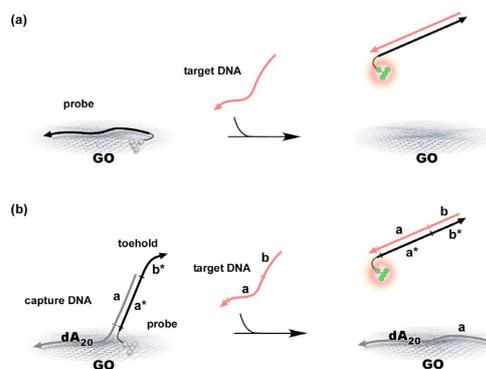


図 1. GO を用いた核酸センシングシステム。(a) GO への蛍光性 DNA プローブの直接吸着・脱着を利用した一般的な手法。(b) 捕捉 DNA を介した間接的な GO へのプローブの固定と、toehold をきっかけとする鎖交換反応によるプローブの遊離を利用した手法。

## 3. 研究の方法

### 3.1. プローブの合成

DNA は、自動合成装置を用いてホスホロアミダイト法により合成した。プローブは、5'末端にアミノ基を有する DNA と 6-カルボキシフルオレセイン (FAM) 活性エステルとのカップリング反応により得た。

### 3.2. GO 分散液の調製

GO は、ハマーズ法を用いてグラファイト粉末から作製した。グラファイト粉末 (12 g)、硝酸ナトリウム (2 g)、濃硫酸 (92 mL) を混合し、30 分攪拌した後、過マンガン酸カリウム (12 g) を加えて 35 °C で 1 時間攪拌した。さらに、水 (92 mL) を徐々に加えて 95 °C で 45 分間攪拌した後、過酸化水素水 (2 mL) を加え、3000 rpm で 10 分間遠心し、上澄みを除去した。沈殿物を 5%塩酸および水で 3

回ずつ洗浄した後、乾燥させた沈殿物 (50 mg) を水 (45 mL) に溶解させ、2 時間超音波照射によって GO の剥離を行った。10000 rpm で 30 分間遠心し、その上澄みから濃度 0.4 mg/mL の GO 分散液を得た。得られた GO は、AFM により単層、もしくは数層であることを確認した (図 2)。

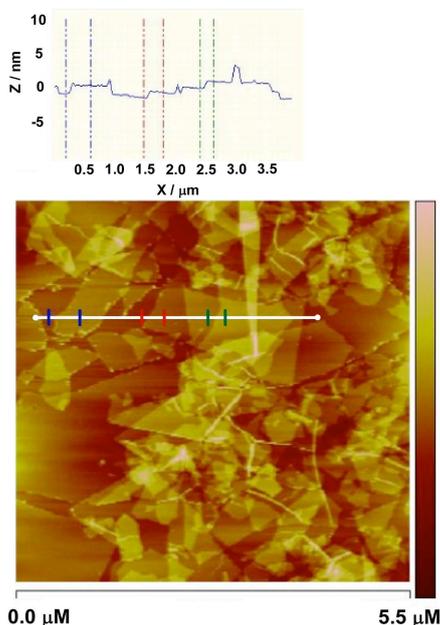


図 2. GO の AFM 像。

### 3.3. DNA の GO への吸着挙動の確認

50 pmol のプローブおよび捕捉 DNA を 5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0, 500 mM 塩化ナトリウムおよび 2 mM 塩化マグネシウムを含む) に溶解し、50 nM プローブ/捕捉 DNA 二本鎖溶液を調製した。そこに GO を徐々に滴下し、FAM の発光強度の減少からプローブの GO への吸着挙動を確認した。図 3 に示すように、ほぼ全てのプローブが吸着するまでに要した GO の量は、50 nM プローブ溶液 (一本鎖) で 6.0 μg/mL、50 nM プローブ/捕捉 DNA 二本鎖溶液で 9.6 μg/mL であった。標的 DNA の非特異的な吸着を抑制するため、以後の実験は GO の表面がプローブ (もしくはプローブ/捕捉 DNA 二本鎖) によって完全に覆われた (吸着飽和) 状態で行った。

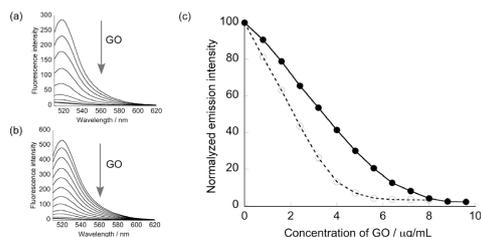


図 3. (a) 50 nM プローブ溶液、または、(b) 50 nM プローブ/捕捉 DNA 溶液に 0.4 mg/mL GO を 2 μL ずつ添加した際の蛍光スペクトル変化 (励起波長: 490 nm)。(c) 517 nm における蛍光強度のプロット。

### 3.4. 配列特異性

捕捉 DNA (50 nM) を用いてプローブ (50 nM) を間接的に GO 上に固定化した後、プローブと完全に相補的な DNA (fmDNA)、非相補鎖 (ncDNA)、または一塩基ミスマッチを有する DNA (misDNA1, misDNA2, misDNA3) を添加し (100 nM)、FAM の発光強度の変化を確認した。同様に、プローブ (50 nM) を直接 GO に吸着させる従来法を用いて実験を行い、結果を比較した。

### 3.5. シグナル増幅による高感度検出

高感度化を目指し、この GO 上での鎖交換反応を DNA サーキット (自律的に連鎖する鎖交換反応系) と組み合わせることを試みた。図 4 に示す通り、標的 DNA を触媒とし、2 種のヘアピン DNA (H1, H2) が開環し、会合体を作る設計とした。この会合体は捕捉 DNA によって GO 上に捕捉されているプローブと完全に相補的な一本鎖部分を有しており、プローブは鎖交換反応によって、GO 上から遊離し、会合体と結合することが可能である。

上記の非増幅系と同様、まず 50 nM の捕捉 DNA (C) とプローブ (P) から形成される二本鎖を GO 上に固定化した。50 nM の H1 と H2 混合溶液中に 1 nM の標的 DNA (T) を加え、一定時間インキュベートした。なお、インキュベート時間、温度は最適化を行った。その後、P-C/GO 溶液と混合し、1 時間 10°C でインキュベートした後、発光スペクトルを測定した。

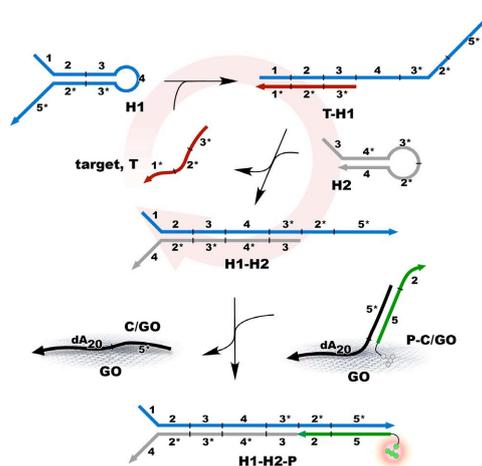


図 4. DNA サーキットを用いたシグナル増幅

## 4. 研究成果

### 4.1. 非特異的吸着ならびに脱着の抑制

図 5 に示すように、fmDNA を添加すると、FAM の蛍光が回復したことから、期待したとおり GO 上での鎖交換反応によってプローブが溶液中に放出されたと考えられる。また、その蛍光回復量は、従来の直接吸着法よりも

大きくなった。従来法では、プローブが遊離した後の GO 上のスペースに **fmDNA** が非特異的に吸着し、検出感度を低下させていたと考えられる。一方、本研究における間接固定化法では、プローブの放出にともなってスペースが生じないことに加え、捕捉 DNA は一本鎖となり、逆に GO 表面を覆う仕組みになっている。これら複数の要因がはたらいて **fmDNA** の非特異的な吸着が効果的に抑制されたと考えられる。

**fmDNA** の代わりに **ncDNA** を添加した場合、本手法の方が従来法より蛍光回復量が少ないことがわかった。これは、捕捉 DNA が GO 吸着領域 (20 塩基のアデニン) によって強く GO と結合し、プローブを GO 上に効果的に固定できているためと考えられる。本手法では、標的 DNA に対する蛍光シグナル応答値の増加と、プローブの非特異的脱着の抑制を同時に実現したため、従来法よりも高いシグナルコントラストを達成できたと考えられる。

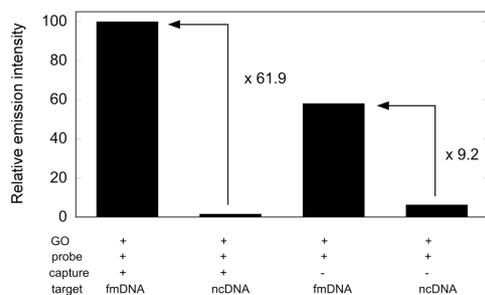


図 5. GO 上に間接的に固定化または直接吸着させたプローブによる標的 DNA の検出。プローブを GO 上に固定化した後、**fmDNA** または **ncDNA** を添加した。5 °C で 2 時間インキュベーションした後、蛍光スペクトルを測定した。プローブを GO 上に間接的に固定化した場合には、非特異的なプローブの遊離が抑制され、蛍光回復量も増大した (励起波長 490 nm、測定波長 517 nm)。

#### 4.2. 配列特異性

一塩基ミスマッチ部位を有する標的 DNA (**misDNA1**、**misDNA2**、**misDNA3** : それぞれ **toehold** の根元からミスマッチ部位を 1 塩基ずつ場所を端に向けて移したもの) を用いて同様な実験を行った。図 6 に示すように、プローブを直接吸着させた場合では、**fmDNA** 添加時のプローブ脱着量を 100 % とすると、**misDNA1** および **misDNA2** ではおよそ 65 %、**misDNA3** では 98 % のプローブが遊離してしまった。プローブを間接的に固定化させた場合でも、**misDNA2** および **misDNA3** を添加すると、やはり 50 % 以上の遊離が確認された。しかし、興味深いことに **misDNA1** では、プローブの遊離が 20 % にまで抑制されていた。DNA 鎖交換反応は、標的 DNA の一部がプロ

ーブの **toehold** 部位と二本鎖を形成し、これを足がかりとして捕捉 DNA と標的 DNA とが入れ替わる、という二段階で進行している。**misDNA1** のように、**toehold** の根元部分にミスマッチが存在すると、二つのステップの連続性が阻害されるため、鎖交換反応の効率が大きく低下し、プローブの遊離が抑制されたものと考えられる。肉眼でも高いコントラストで一塩基ミスマッチを識別可能であった。

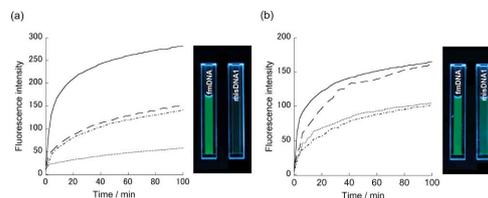


図 6. (a) GO 上に間接的に固定化、(b) または直接吸着させたプローブによる 1 塩基ミスマッチの識別。プローブを GO 上に固定化した後、100 nM 標的 DNA (**fmDNA** : 実線または **misDNA1** : 点線、**misDNA2** : 鎖線、**misDNA3** : 破線、) を添加し、蛍光強度の時間変化を測定した。写真は、標的 DNA 添加 2 時間後の溶液をハンディランプで波長 254 nm の UV 光を照射しながら撮影したものである。プローブを GO 上に間接的に固定化した方が、より高いコントラストで一塩基ミスマッチを識別できた。

#### 4.2. シグナル増幅

さらに DNA サーキットを用いたシグナル増幅に関する検討を行った。DNA サーキットによるシグナル増幅反応の最適化を行ったところ、35°C で 4 時間インキュベートした際が最もシグナルの増幅効率が高いということが分かった。1 nM の標的濃度においてはサーキット非存在下と比較して 17 倍、それ以下の濃度では 50 倍から 100 倍程度のシグナル増幅効率が得られることがわかった。標的 DNA 存在下と非相補的な DNA 存在下のシグナルコントラストを比較するとサーキット存在下で 7 倍程度コントラストが上昇することもわかった。

#### 5. まとめ

GO 上での鎖交換反応を利用した新規 DNA 検出法を開発した。捕捉 DNA を使い、プローブの間接的固定化と、配列特異的な鎖交換反応を組み合わせることで、非特異的な DNA の吸脱着を抑制し、一塩基の差を高いシグナルコントラストで識別することができた。本手法では、GO を化学修飾不要な消光剤として利用しているだけであり、プローブの吸脱着に直接関与しない。プローブの GO 上への固定化・遊離はあくまでも捕捉 DNA との結合・解離で制御されている。したがって、均一溶液中で得た DNA の結合・解離に関する熱力学的知見を、分子設計に活用することも本手法の大きな利点である。また、DNA サ

ーキットと組み合わせることで酵素を使用することなく高感度化することが可能である。本手法は、DNA の検出以外にもアプターを用いた標的分子の検出や RNA の検出にも応用できる一般的なセンシングシステムとなることが期待される。

#### 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)

- ① Takaaki Miyahata, Yusuke Kitamura, Akika Futamura, Hirotaka Matsuura, Kazuto Hatakeyama, Michio Koinuma, Yasumichi Matsumoto, and Toshihiro Ihara, (DNA analysis based on toehold-mediated strand displacement on graphene oxide), *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 10139-10141. 速報誌・査読有. DOI: 10.1039/c3cc45531a
- ② 宮端 孝明、北村 裕介、二村 朱香、松浦 博孝、畠山 一翔、鯉沼 陸央、松本 泰道、井原 敏博、(酸化グラフェン上での DNA 鎖交換反応を利用した高選択的核酸検出システムの開発)、*ナノ学会会報*、2014年、12巻、63頁～67頁. 会報誌・査読有.
- ③ Yusuke Kitamura, Takaaki Miyahata, Hirotaka Matsuura, Kazuto Hatakeyama, Takaaki Taniguchi, Michio Koinuma, Yasumichi Matsumoto, and Toshihiro Ihara, (Graphene oxide-based amplified fluorescence sensor for nucleic acid detection through target-catalyzed hairpin assembly), *Chem. Lett.*, 2015, **44**, 1353-1355. 速報誌・査読有. DOI: 10.1246/cl.150564
- ④ Seiji Obata, Koichiro Saiki, Takaaki Taniguchi, Toshihiro Ihara, Yusuke Kitamura, and Yasumichi Matsumoto, (Graphene Oxide: A Fertile Nanosheet for Various Applications), *J. Phys. Soc. Jpn.*, 2015, **84**, 121012-121018. レビュー・査読有. DOI: <http://dx.doi.org/10.7566/JPSJ.84.121012>

[学会発表] (計 5 件)

- ① 北村 裕介、宮端 孝明、井原 敏博、(酸化グラフェン上での鎖交換反応を利用した新規 DNA 検出法の開発)、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 09 月 27 日～ 29 日、名古屋大学豊田講堂 (愛知県)

- ② Yusuke Kitamura, Takaaki Miyahata, and Toshihiro Ihara, (Sequence-specific release of immobilized DN from the surface of graphene oxide through toehold-mediated strand exchange), 第 40 回国際核酸化学シンポジウム、2013 年 11 月 13 日～ 15 日、神奈川大学 (神奈川県)
- ③ 北村 裕介、宮端 孝明、井原 敏博、(酸化グラフェンを用いたシグナル増幅型核酸検出法の開発)、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 09 月 11 日～ 23 日、岡山大学 (岡山県)
- ④ 北村 裕介、宮端 孝明、松尾 朋弥、井原 敏博、(酸化グラフェン上での DNA 鎖交換反応を利用したシグナル増幅型核酸分析法の開発)、日本分析化学会第 63 回年会、2014 年 09 月 17 日～ 19 日、広島大学 (広島県)
- ⑤ Yusuke Kitamura, Takaaki Miyahata, and Toshihiro Ihara, (Graphene oxide-based DNA sensor with catalytic signal amplification), 第 41 回国際核酸化学シンポジウム、2014 年 11 月 05 日～ 07 日、北九州国際会議場 (福岡県)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

北村 裕介 (KITAMURA YUSUKE)  
熊本大学・大学院自然科学研究科・助教  
研究者番号：8043301