

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 7 月 3 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410179

研究課題名(和文) 表面増強ラマン散乱法と重水素化プローブを用いた生体シグナル定量化技術の開発と応用

研究課題名(英文) Development of life-survey methods using SERS probes

研究代表者

小堀 哲生 (KOBORI, AKIO)

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：00397605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年のラマン測定法において、金属ナノ粒子や金基板を利用することでラマンシグナルを10の7～8乗倍程度に増強することの可能な表面増強ラマン散乱(SERS)測定法が報告されたことで、一分子の生体分子からラマンシグナルが観測可能であることが見出されている。さらに、生体成分のラマンスペクトルにおいてシグナルの現れない領域(サイレント領域)があることが報告されている。そこで我々は、本プロジェクトにおいてサイレント領域にシグナルをもつラマンタグとSERSとを組み合わせた高感度核酸検出系の開発および高感度メチル化反応追跡法の開発を目指して研究を行った。

研究成果の概要(英文)：It is reported that concentration of particular RNAs in body fluids is associated with the onset of the diseases. Therefore the RNAs in blood serum, urine, and saliva are anticipated to be used as biomarkers for the diagnosis of severe diseases. Although reverse transcription quantitative PCR is generally used to quantify RNAs, the PCR has been poorly utilized as a diagnostic method due to a complicated operation for amplification of nucleic acids. Until now, we have developed a highly sensitive and simple nucleic acid detection system that does not require the amplification step of nucleic acids. In this study, we developed a chemical tag with a Raman signal in a region that does not appear any signals of the biological component in the Raman spectrum and constructed a sandwich assay system using a SERS positive tag.

研究分野：生体関連化学

キーワード：SERS ラマン散乱 DNA RNA

## 1. 研究開始当初の背景

酸化反応、アルキル化反応などともなう炭素 - 水素結合の解裂反応は、糖や脂質の代謝反応、生合成系、薬剤の代謝反応など、生体内のあらゆる代謝系で見られる化学反応である。その中でもとくに、図 1a に示す DNA 中のシトシンの 5 位で起こるメチル化反応は、エピジェネティック変異の中心反応として知られており、細胞の分化、遺伝子発現の調節に関与している。また、このメチル化異常は、細胞の発ガン、精神疾患、代謝疾患など、後天的に発症する広範囲の疾患の発症に深く関与していることも報告されている。近い将来、iPS 細胞や ES 細胞から分化した細胞の分化度の評価法や、様々な後天性疾患の早期診断法が必要となることが予想されることから、DNA メチル化反応を生体試料中で直接的に解析する方法の開発が強く求められている。しかしながら、生体中で起こる有機化学反応を、対象の生体分子の発するシグナル変化を基にして直接的に追跡する方法自体がほとんど報告されていないため、現在のサイエンスではこのメチル化(ひいては、細胞内で起こる酸化反応やアルキル化反応)を、生体試料中で追跡することは不可能である。

一方で、申請者は、2010 年度に株式会社ニデック社と、“SERS 基盤上での共鳴ラマン散乱増強現象を利用した生体分子間相互作用の解析”に関する共同研究を行い、この共同研究において、生体分子中の特定の結合に由来するラマンシグナルを高感度に定量化する手法として、表面増強ラマン散乱(SERS)法が非常に有効であることを明らかにしている。また、重水素 - 炭素結合、炭素 - 炭素三重結合、炭素 - 窒素三重結合等から生じるラマンシグナルは、生体分子から

生じるラマンシグナルと全くかぶらない位置に出現することも明らかにしている。これらの知見は、シトシンの 5 位の水素原子を重水素原子に置換した重水素化デオキシシチジン等を用いることにより、生体由来のラマンシグナルに影響を受けずに、表面増強ラマン散乱(SERS)法により、DNA メチル化反応の追跡、定量化が可能であることを示唆している。

そこで我々は、重水素 - 炭素結合、炭素 - 炭素三重結合、炭素 - 窒素三重結合等が導入された化合物を用いることで、生体試料中に存在する特定の生体分子を超高感度に定量化するシステムを開発するとともに、そのシステムを用いることにより生体試料中で起こる DNA メチル化反応の新規追跡法を開発する。

## 2. 研究の目的

本研究では、生体試料中で起こるアルキル化反応の定量化、および特定生体分子の高感度検出をめざし、以下の 2 点を柱として研究を執り行う。

### . D-probe を利用したラマン測定法の開発と DNA メチル化反応の追跡

世界的に見ても重水素化された生体分子由来のラマンシグナルに関する知見は、ほとんど蓄積がない。そのため、重水素化化合物の作成法、表面増強ラマン散乱(SERS)法を用いた測定法、*in vitro*系における酵素反応の追跡法などに関する基礎的な知見を獲得するとともに、研究のコンセプトを実証する。

### . 生体分子高感度検出法の応用

人類の生存を脅かす様々な疾患に対処するためには、多くの人々が受診することのできる正確、簡便、高感度、かつ非侵襲的な疾患診断法が開発が求められている。現在、疾患診断法として最も広く汎用されているイムノアッセイ法は、非侵襲的で操作が

簡便である一方で、診断用バイオマーカーの探索に時間がかかるという問題がある。一方、がん、エイズ、インフルエンザ、成人病などの広範囲の疾患の発症にともなう、血液、喀痰、尿などの検体に含まれる核酸成分の量が変化することが近年明らかとなってきている。そのため、核酸成分は、あらゆる疾患の診断に用いることのできる有望な次世代マーカー分子として大きな注目を集めている。

重水素 - 炭素結合、炭素 - 炭素三重結合、炭素 - 窒素三重結合等が導入された化合物のラマンシグナルは、生体直行型のシグナルを有するため、生体分子の観測に優れた性質を持つ。また、ラマンシグナルは、表面増強ラマン散乱(SERS)法を用いることにより  $10^{10}$  倍程度に増幅することができる。その性質を利用することで、疾患に関する核酸成分(miRNA やウイルス RNA)を対象とした疾患診断法の開発を行う。

### 3. 研究の方法

前項、研究目的、に関する研究を以下に示す。

#### .D-probe を利用したラマン測定法の開発と DNA メチル化反応の追跡

D-probe の合成スキームを Fig.3 に示す。

compound 2 の合成 : compound 1 を DMF に溶解し、TBDMSCl を 3.3 当量、imidazole を 6.6 当量加え 1 時間攪拌した。反応後ジエチルエーテルで抽出し、溶媒を脱水留去した。その後、シリカゲル(C-200)フラッシュカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、目的物を得た。(収率 : 96%)

compound 3 の合成 : compound 2 を THF-d8 に溶解し、 $Bu_3SnH$  を 1.2 当量、V-65 を 0.2 当量加え 90 分間還流した。その後、シリカゲル(C-200)フラッシュカラムクロマトグラフィ

ーによる精製を行い、目的物を得た。(収率 : 87%)

compound 4 の合成 : compound 3 を THF に溶解し、 $Et_3N \cdot 3HF$  を 5 当量加え攪拌した。その後、GPC による精製を行い、目的物を得た。(収率 : 90%)

compound 5 の合成 : compound 4 を pyridine に溶解し、DMTrCl を 2.8 当量加え、2 時間攪拌した。その後、GPC による精製を行い、目的物を得た。(収率 : 85%)

compound 6 の合成 : compound 5 を acetonitrile に溶解し、DIPEA を 5 当量、 $i-Pr_2NP(OCH_2CH_2CN)Cl$  を 2.4 当量加え 55 分攪拌した。その後、GPC による精製を行い、目的物を得た。(収率 : 46%)

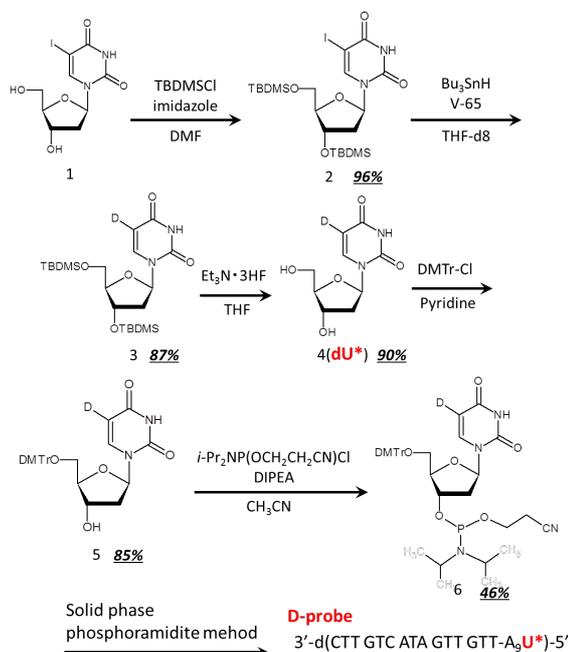


Fig.3 Synthetic scheme of D-probe

#### 2.2 dU\*のラマンスペクトル測定

dU\*とdUのラマンスペクトルを測定した結果をFig.4に示す。その結果、dU\*のC-D結合由来のシグナルが  $2350\text{ cm}^{-1}$  に観測された。

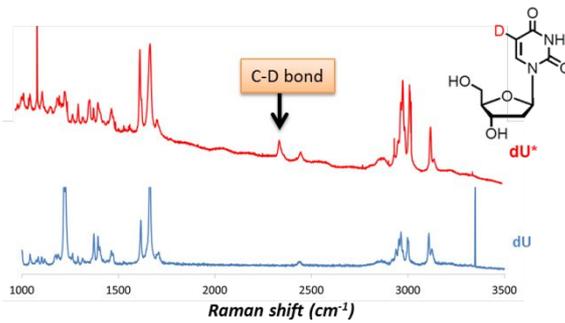


Fig.4 Raman spectra of dU\* and dU  
excitation wavelength was 532 nm, exposure time was 100s

#### D-prrobe のラマンスペクトル測定

D-prrobe の導入条件を種々検討することにより、様々な直径の金ナノ粒子に D-probe を導入した。つぎに、D-probe が導入された金ナノ粒子のラマンスペクトルを、顕微ラマン分光器を用いて測定した。633nm、525nm のレーザー波長を用いた結果、予期に反して重水素-炭素結合に由来するシグナルは得られなかった。今後は、D-probe の配列、金ナノ粒子への導入量、金ナノ粒子の形と大きさ等を検討する必要がある。

#### 生体分子高感度検出法の応用

ラマンプローブの合成法を Figure 5 に示す。長径 40nm、短径 25nm の金ナノロッドにチオール化 DNA を導入した後、シアノベンズアミド誘導体をさらに導入することで標的 DNA 選択的に結合するラマンタグを合成した。核酸導入量については、金ナノロッド表面の核酸をメルカプトエタノールによりはがすことで直接定量した。核酸導入反応時の塩濃度、反応温度、反応時間、また核酸とシアノベンズアミド誘導体の添加する順番等に関して種々検討した結果、核酸誘導体は金ナノロッド一粒あたり最大 70 本程度導入されることが明らかとなった。合成したラマンタグのラマンスペクトルを測定した結果、細胞成分のシグナルが殆ど見られないサイレント領域にニトリル基特有のピーク ( $2240\text{cm}^{-1}$ ) を観測することができた。

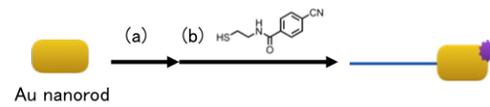


Figure 5. Preparation of Raman probe. 25 nm x 40 nm Au nanorod was used for the probe. (a) 5'-HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-d(A<sub>10</sub>TTG TTG ATA CTG TTC)-3', 0.05 w/v% SDS, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 20 mM NaCl, 1 d, 30 (b) 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 20 mM NaCl, 1 d, 30

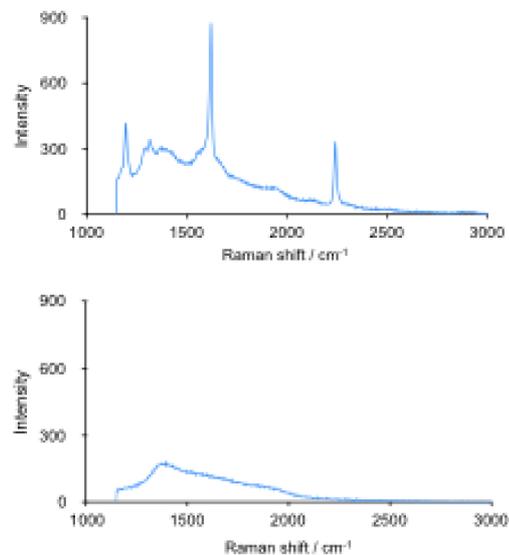


Figure 6. Raman spectra of test samples in the (a) presence and (b) absence of the target DNA: d(GGA GTA AAT GTT GGA GAA CAG TAT CAA CAA). Ex 785 nm.

つぎに、捕捉プローブが担持されたアガロースビーズとラマンプローブを用いた標的核酸検出系の評価を行った。標的核酸には、これまでに Mirkan らが表面増強ラマン測定を利用して低濃度の検出に成功しているエボラウイルスの DNA 配列 (30 量体) を利用した。その結果を Figure 6 に示す。標的 DNA、ラマンプローブ、捕捉プローブ、アガロースビーズの混合溶液を 1 時間反応させた後、洗浄液で数回ビーズを洗浄した。その後、75 の水溶液でを用いてビーズ上の

ラマンプローブを乖離・回収し、ラマン測定を行った。その結果、Figure 6a に示すように  $2250\text{cm}^{-1}$  に大きなシグナルを観測することができた。標的 DNA を添加していない場合 (Figure 6b) においては、ニトリル基由来のシグナルはほとんど観測されなかったことから、SERS を利用したサンドイッチ型の検出系により標的 DNA を検出可能であることが明らかとなった。先に報告されている Mirkan らの測定系では、得られたラマンシグナルは、バックグラウンドシグナルと重なった位置に観測されているのに対し、本検出系ではラマンシグナルがサイレント領域に検出されるという特徴が示された。今後は、アルキンタグと併用することにより、複数種のターゲット核酸の同時検出、シグナルの規格化等について検討する。

#### 4. 研究成果

重水素-炭素結合をもつ重水素化デオキシウリジン誘導体(dU\*)を化学合成し、ラマンシグナルを測定した結果、重水素-炭素結合由来のシグナル( $2350\text{cm}^{-1}$ )は細胞構成成分のシグナル( $1800\sim 2800\text{cm}^{-1}$ )と重ならない位置に観測されることを明らかとした。また、ニトリル導入型ラマンタグを開発し、標的核酸の検出に応用可能であることを示した。今後は、増強ラマン測定で非常に困難であるとされている、シグナルの定量化に取り組む。

#### 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)

Y. Sugihara, S. Tatsumi, A. Kobori. Development of novel photoresponsive oligodeoxyribonucleotides with a 2'-O-diazirine-conjugated adenosine for DNA interstrand cross-linking. *Chem. Lett.* 2017, 46, 236-239.  
J. Ariyoshi, N. Eimori, A. Kobori, A. Murakami, H. Sugiyama, A. Yamayoshi. Characterization of the releasing profile of microRNA from RISC using anti-miRNA

oligonucleotides. *Chem. Lett.* 2017, 46(1), 143-145.

Y. Sugihara; Y. Nakata; A. Yamayoshi; A. Murakami; A. Kobori. Cross-Linking Antisense Oligodeoxyribonucleotides with a Photoresponsive  $\alpha$ -Chloroaldehyde Moiety for RNA Point Mutations. *J. Org. Chem.* 2016, 81(3), 981-986.

J. Ariyoshi; D. Momokawa; N. Eimori; A. Kobori; A. Murakami; A. Yamayoshi. Development of Novel Antisense Oligonucleotides for the Functional Regulation of RNA-Induced Silencing Complex (RISC) by Promoting the Release of microRNA from RISC. *Bioconjugate Chem.* 2015, 26(12), 2454-2460.

##### [学会発表](計 9 2 件)

太田良、高木紀志、永井悠貴、杉原悠太、小堀哲生  
生体直行型 SERS プローブの開発と標的核酸検出への応用  
第 97 回日本化学会春季年会(神奈川)、2017 年 3 月  
太田良、高木紀志、永井悠貴、杉原悠太、小堀哲生  
マイクロ RNA の検出を志向した SERS プローブの開発  
第 2 回日本核酸医薬学会(東京)、2016 年 11 月

##### [図書](計 1 件)

小堀哲生 「人口核酸による miRNA 検出法の高感度化」、miRNA の最新知識～基礎領域から診断・治療応用まで～医薬ジャーナル社、2017, p130-138.

##### [産業財産権]

##### 出願状況(計 4 件)

名称: 「エキソソームの miRNA の機能を抑制することができる複合体複合体、がんの増殖及び/又は転移抑制剤」  
発明者: 山吉麻子、村上章、芦原英司、小堀哲生  
番号: 特願 2016-28924  
出願年月日: 2016/2/18  
国内外の別: 国内

名称: 「アビジン修飾ビーズを用いた核酸検出方法」  
発明者: 村上章、小堀哲生、山吉麻子、野田雄一郎  
番号: 2016-011018  
出願年月日: 2016/1/22  
国内外の別: 国内

名称: 「RNA 分析チップおよび RNA 分析

方法」

発明者：村上章、小堀哲生、山吉麻子、野田  
雄一郎、近藤正幸

番号：2015-10639

出願年月日：2015/1/22

国内外の別：国内

名称：「RNA分析チップおよびRNA分析  
方法」

発明者：村上章、小堀哲生、山吉麻子、野田  
雄一郎、近藤正幸

番号：PCT/JP2016/051925

出願年月日：2016/1/22

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小堀哲生 (KOBORI, Akio)

京都工芸繊維大学・分子化学系・准教授

研究者番号：00397605