

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H03829

研究課題名(和文) 核酸の動的構造をプログラムして汎用の増幅型バイオセンサをつくる

研究課題名(英文) Versatile biosensors with signal amplification based on dynamic programming of DNA structure

研究代表者

井原 敏博 (Ihara, Toshihiro)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・教授

研究者番号：40253489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸を基体とするバイオセンサを自律的連鎖反応であるDNA circuitと組み合わせることでシグナルを増幅したい。これは、発シグナル系とDNA circuitなどのサブルーチンを構成要素とするDNAの“動的構造のプログラミング”とみなせる。アプタマーをインターフェースとして利用すれば核酸以外の多様な生理活性物質も検出可能である。CyD-DNA/Fc-DNAを用いた増幅型電気化学バイオセンサ、およびEDTA-DNA/Phen-DNAを用いた希土類金属錯体の発光を利用した増幅系に関しては、標的DNA存在下、Fc由来の酸化電流の増大、およびTb<sup>3+</sup>やEu<sup>3+</sup>錯体からの特徴的な発光を観察できた。

研究成果の概要(英文)：We have developed the signal amplification systems consisting of chemically-modified DNA conjugates. The luminescence and electrochemical signals were catalytically amplified with autonomous successive DNA strand exchanges such as HCR (hybridization chain reaction) and DNA circuits. The luminous signal amplification was performed with EDTA- and Phen (1, 10-phenanthroline)-modified DNA in the presence of lanthanide (Tb<sup>3+</sup> or Eu<sup>3+</sup>) ion. The complexes formed on the certain DNA structures such as tandem duplex DNA, long tandem DNA wire, and cruciform DNA. Their luminescence lifetimes were extremely long as those of the typical luminous Ln complexes and their luminescence quantum yields were moderate, ca. 10%. Electrochemical signals were amplified through entropy-driven DNA circuit consisting of Fc (ferrocene)- and CyD (cyclodextrin)-modified DNA. We succeeded in enhancing the signals more by trapping Fc-DNA on the electrode modified with its complementary DNA.

研究分野：生物分析化学、核酸化学

キーワード：DNAサーキット HCR 鎖交換反応 発光性希土類金属錯体 フェロセン シクロデキストリン 電気化学 シグナル増幅反応

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまで、発光性、電気化学活性、光反応性などを有する機能分子を DNA に導入した種々の DNA コンジュゲートを合成し、核酸やその他の生理活性分子の検出を行ってきた。標的分子に対して特異的に応答するが、その検出感度に関しては必ずしも満足できるものではなく、更なる改善が望まれた。DNA をセンサー基体として用いているため種々の酵素反応との組合せによりシグナルを増幅することは可能であるが、取扱が容易で堅牢な分子センサーシステムを目指す場合にはできれば酵素を用いることは避けたいと考えた。そこで着目したのが(酵素フリーで)自律的に特定の反応(鎖交換)を繰り返す DNA circuit である。幾つかのタイプの DNA circuit が報告されているが、反応前後で形成する DNA 複合体の構造はいずれも明らかであるので、化学修飾 DNA 間の協同性を活用してシグナル変換を実現してきた代表者の発シグナル技術との親和性は非常に高い(相性が良い)。

DNA circuit には、大きく分類して、ヘアピン開放型、エントロピー駆動型の2つのタイプがある。また、HCR (hybridization chain reaction) のような、核酸とのハイブリダイゼーションをトリガーとする連鎖反応による二本鎖形成反応も酵素反応に依存しない増幅系として利用することができる。これら連続的鎖交換反応システムを、構造の安定性予測から論理的に設計(dynamic programming)できるのが DNA の強みである。これらの自律的分子増幅システムが考案されたのは、数年前のことであるが、既に海外においてはバイオセンシング系におけるシグナル増幅の手段として利用されはじめている。しかしながら、現時点では DNA、RNA をターゲットとした基本的な構成にとどまっている。

## 2. 研究の目的

代表者はこれまで、複数の DNA コンジュゲートを協同的にはたらかせて、標的分子に結合してはじめて「光る」分子システム(発シグナル系)を設計し、様々な種類のシグナルに基づくバイオセンサを報告してきた。本研究では、このバイオセンサを自律的連鎖反応システムである DNA circuit と組み合わせることでシグナルを増幅して高感度化をはかる。酵素を使わない堅牢なバイオセンサである。このセンサーシステム設計は、発シグナル系と幾つかの DNA circuit などの動作の保証された「サブルーチン」を構成要素とする DNA の「動的構造のプログラミング」とみなすことができる。アプタマーをインターフェースとして利用すれば核酸以外の多様な生理活性物質も検出可能であり、最終的には近

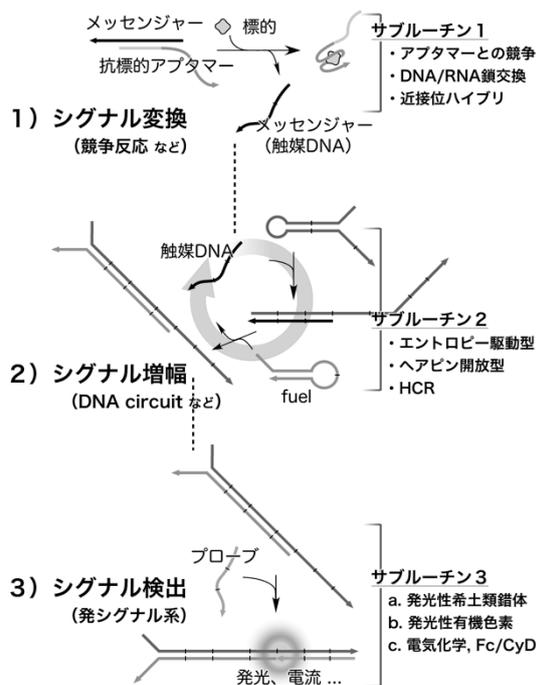


図1 バイオセンシングシステム 1)変換(認識)、2)増幅、3)検出の各ステップの適当なサブルーチンを組み合わせて、酵素フリーの高感度で汎用のバイオセンシングシステムとなる。図では一例として、1)シグナル変換反応としては単純な競争反応を、2)増幅反応としてはヘアピン開放型の DNA circuit を示した。核酸が標的の場合1は必要ないので2→3の、核酸以外のタンパクや細胞の場合には1→2→3の構成のプログラムとなる。

接位ハイブリダイゼーション (proximity hybridization) により感度と特異性を上げてガン細胞の1細胞検出を実現したい。

核酸、特に DNA の (static な) 構造構築に関する研究は進んでおり、Watson-Crick 塩基対のような比較的簡単な (canonical な (標準型) 塩基対形成に基づく) ルールに従えばその構造 (ヘアピン、二本鎖、三本鎖...など) をプログラムすることができる。一方、DNA circuit は、時間軸を意識した DNA の dynamic な構造プログラミングとみなすことができる。本研究では申請者がこれまで報告してきた DNA 上での発シグナル系とこの DNA circuit を組み合わせることにより酵素フリーで汎用の高感度バイオセンシングを実現したい (図 1)。DNA を基体としたシステムであるので、ctDNA、mRNA、miRNA などを直接標的にできることはもちろんである。アプタマーをインターフェースとすることで、低分子からタンパク質までの核酸以外の生理活性分子の検出が可能になる。最近では、ある種のガン細胞は特殊なタンパク質 (たとえば、EpCAM など) をその表面に提示していることがわかってきており、これらのタンパク質に対するアプタマーを採用するとガン細胞検出も可能になる。これらのシステムでは、標的タンパク質とトリガーDNAの、アプタマーに対する競争反応を利用して、たとえば「標的タンパク (細胞) あり」の情報を、

定量的な「トリガー（または触媒）DNA（メッセンジャー）」のリリースというかたちで増幅系（DNA circuit）に伝える（図1-1）。感度が充分でない場合には複数の DNA circuit を重層的に使用すればシグナルを指数関数的に増幅することも可能である。この原理で最終的にはガン細胞ひとつを検出できるシステムの構築を目指す。

**学術的特色** DNA を基体とする複合体においてはその（敢えていえば“static な”）構造をプログラムすることは容易であるが、本研究で行うのは標的分子との相互作用に始まる時間軸に沿った構造変化の制御、すなわち動的構造のプログラミングである。研究代表者はこれまで数多くの DNA や DNA コンジュゲートを合成し、その複合体の安定性を考慮して、多くの発シグナルシステムを設計してきた。全体のプログラム構成においては、1) 標的認識（シグナル変換）のための競争反応、次いで、既に動作が保証されている 2) DNA circuit（シグナル増幅）最後に、上記 3) 発シグナルシステム（シグナル検出）を“サブルーチン”として利用する。1→2→3 のサブルーチンを適当に組み合わせた動的構造のプログラミングにより、多様な標的に対応できる汎用のシグナル増幅型のバイオセンシングが可能になる（図1）。

**独創的試み** ある種のガン細胞は、その細胞表面に数百万個にも及ぶ特定のタンパク質等を提示していることが分かっている。この表面分子に対するアプタマーが取得されているのでこれを標的とする。EpCAM に関しては2つの分子間距離は平均すると数～数十 nm と計算できる。最近、細胞表面の膜構造は決して均一でないことが分かってきた。このタンパクがもし脂質ラフト上に濃縮されていれば互いにもっと接近していることになる。これは近接位ハイブリダイゼーション（proximity hybridization）を行うのにたいへん適した系である。すなわち、単独の標的分子でなく、互いに近い位置に2つの標的が存在している時のみ circuit が走る仕組み（“and”回路）をプログラムすることで偽陽性を抑え特異性を飛躍的に向上させることが

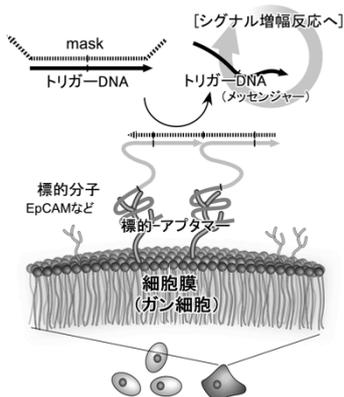
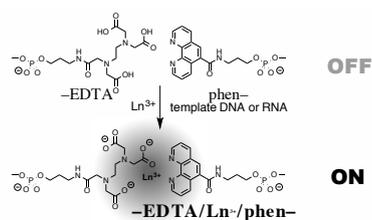
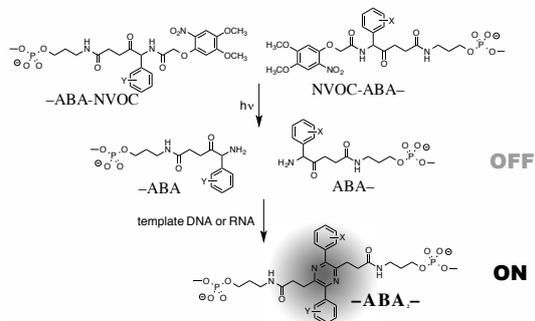


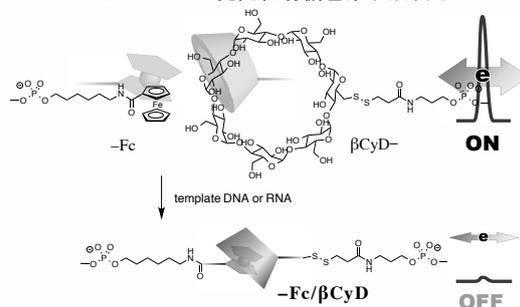
図2 近接位ハイブリダイゼーションによるガン細胞の識別 ガン細胞表面には高密度で特定のタンパク質などが提示されている。互いに近傍に2つの標的があるときのみ ON になる仕組み（“and gate”）により特異的にガン細胞を検出する。



a. DNA 上での発光性希土類錯体形成反応



b. DNA 上での発光性有機色素形成反応



c. Fc/CyD 包接体形成による電気化学応答の抑制

図3 3つの発シグナル系 いずれも特定の塩基配列のDNAをテンプレートして進行する。a: 発光性希土類金属錯体 (EDTA/Ln<sup>3+</sup>/phen) の形成、b: 発光性有機色素 (ABA<sub>2</sub>) の形成、および c: 包接複合体 (Fc/βCyD) 形成による電流シグナルのクエンチング

可能となる（図2）。申請者の知る限り同様な取り組みは国内外を問わず行われていない。

### 3. 研究の方法

これまで代表者らが開発した発シグナル系（図1の3）、すなわち DNA 上での a) 発光性希土類錯体、b) 発光性有機色素、および c) フェロセンβ-シクロデキストリン包接体 (Fc/βCyD) の形成を、その前段階であるシグナル変換系 (1)、および DNA circuit (2) と組み合わせてセンサの基本構成とする。ctDNA、miRNA など核酸を標的とする場合には直接増幅系 (2) に導入する。核酸以外の標的に関しては、抗標的アプタマーの一部に相補的な塩基配列（メッセンジャー）が標的との競争反応によって放出され、これが DNA circuit を始動させる仕組みとする。

具体的には、申請者らの考案した3つの発シグナル系を利用した（図3）。それぞれ、標的濃度依存的な a) 発光性希土類錯体の形成 (EDTA/Ln<sup>3+</sup>/phen)、b) 発光性有機色素の形成 (ABA<sub>2</sub>) (アシルベンジルアミン×2)、および c) フェロセンと β-シクロデキストリン

の相互作用による Fc の電気化学シグナルのクエンチング (Fc/ $\beta$ CyD) を利用した系である。これらの発シグナル系と増幅系となる幾つかの自律反応系 (DNA circuit、HCR (hybridization chain reaction)) をサブルーチンとして DNA の動的構造をプログラムした。

#### 4. 研究成果

本研究推進に必要な DNA コンジュゲート、および DNA サーキットを用いたシグナル増幅に必要なすべての DNA の合成に成功した。DNA コンジュゲートに関しては、具体的には ABA-DNA、CyD-DNA、Fc-DNA、EDTA-DNA、Phen-DNA である。DNA コンジュゲートは、ABA-DNA 以外はポストモディフィケーションにより合成した。修飾末端にアミノ基を導入した DNA を自動合成装置を用いて合成し、フェロセンカルボン酸、および 1,10-フェナンスロリンカルボン酸の活性エステルや EDTA 無水物とのカップリングにより、それぞれ Fc-DNA、Phen-DNA および EDTA-DNA を得た。CyD-DNA については、DNA 末端のアミノ基に SPDP を修飾し、チオールを一点修飾した  $\beta$ -CyD とのカップリングにより得ることができた。ABA-DNA の合成は ABA (アミノベンジルアミン) 部分をアミダイト試薬として合成した。

このうち、CyD-DNA/Fc-DNA を用いた増幅型電気化学バイオセンサ、および EDTA-DNA/Phen-DNA を用いた希土類金属錯体の発光を利用した増幅型発光センサに関しては、鑄型 DNA 存在下においてのみ、Fc 由来の酸化電流の増大、および  $Tb^{3+}$  や  $Eu^{3+}$  錯体からの特徴的な発光を観察することができ、期待した発シグナル機構が有効にはたらくことを確認することができた。

##### a. 希土類発光錯体の触媒的生成を利用した検出系

EDTA-DNA/Phen-DNA を用いた希土類金属錯体の発光を利用した増幅型シグナル検出に関する検討を行った。シグナルを増幅させるための DNA サーキットとしてはエントロピー駆動型の鎖交換反応を採用した。EDTA-DNA コンジュゲートに二つの短い DNA がハイブリダイズしたタンデム 2 本鎖を初期の 2 本鎖とし、この 2 本鎖に対してターゲットを触媒とする鎖交換反応が自律的に進行して最終生成物として 2 本鎖 DNA、EDTA-DNA/Phen-DNA が生じ、その末端で発光性の希土類金属錯体を生成する仕組みである。ターゲット DNA (フルマッチ、またはミスマッチ) /DNA コンジュゲート (EDTA-DNA と Phen-DNA) /Fuel DNA の比、温度、増幅時間など様々に条件を変えて系統的に最適化条件を検討した。その結果、 $Eu^{3+}$ 、および  $Tb^{3+}$  存在下、それぞれ赤と緑の発光により、10 倍以上の高いコントラストでターゲットの検出が可能であることを示すことができた。希土類錯体に特徴的な長寿命の特性を利用して、時間分解発光測定法により高感

度計測が可能であった。

また、両末端に EDTA と Phen を修飾したそれぞれ 2 つのヘアピン型 DNA、併せて 4 種の DNA コンジュゲートを合成した。トリガー DNA (または RNA) を加えることによりヘアピンが開き、この反応が次々に連鎖してタンデム型のリニアな DNA 複合体が形成する反応、すなわちハイブリダイゼーションチェインリアクション (HCR) の検討を行った。生じる長いタンデム二本鎖のすべてのジャンクション部分には EDTA と Phen が対峙するかたちになり、ここで発光性の希土類錯体が形成する。この系がうまく動作することを確認し、感度向上に成功した。さらに、ヘアピン DNA の極性を一部反転させ、DNA の 4 量体 (十字形) を生じる系の検討も行なった。十字形 DNA の 4 つの先端部分に  $Ln^{3+}$  錯体が生じ、発光シグナルを与えることを確認した。HCR と比較すると生成物の分子量が限定されるため反応時間を短縮することができた。

##### b. 発光性有機色素形成反応

ABA (アシルベンジルアミン) は、連続するシッフ塩基形成による環化、およびその後の自動酸化を経てピラジン環を形成し、蛍光性の生成物  $ABA_2$  を与えると考えられる (DFT 計算で予測済み)。当初は ABA の活性エステル体の合成を行なったが、最終段階のメチルエステルのけん化反応において光保護基が分解してしまう問題が生じた。そこで、合成ルートを変え、カルボン酸を使用せず、アルコール誘導体からアミダイト試薬とすることにした。この方法により、ABA 構造を末端に修飾した DNA (ABA-DNA) の合成に成功した。ABA の修飾は、DNA 合成の最終ステップ、すなわち固相担体上での反応になったので 5'末端のみの修飾となった。そのため、ライゲーションの検討は  $C_2$  対象な二本鎖構造のシークエンスに ABA を内向きにして三本鎖形成により結合した二つのコンジュゲート間で行なった。残念ながら、実験条件下、HPLC による生成物分析においてライゲーション生成物を単離同定することはできなかった。三本鎖の向かい合う 5'末端間の距離は非常に長く、反応しにくいことはわかっている。タンデムに形成した二本鎖構造、あるいは三本鎖であれば 3'末端間のライゲーション、あるいは脱水能をもつ触媒等を用いることで反応を進行させることができるかもしれない。

##### c. 増幅型電気化学的検出系

CyD-DNA/Fc-DNA を用いた Fc の電気化学シグナルを利用した増幅型バイオセンシングに関する検討を行った。希土類の系と同様のエントロピー駆動型の DNA サーキットを採用した。初期のタンデム 2 本鎖末端に  $\beta$ -CyD/Fc の包接錯体を形成させておき、ターゲット添加に伴って 2 本鎖が触媒的に解離して本来の Fc の活性が回復する仕組みである。改善の余地はまた大きい、上記と同様

の条件検討の結果、電気化学シグナルを増幅することに成功した。

CyD-DNA/Fc-DNA 系による DNA の増幅型電気化学検出 これまで、CyD-DNA/Fc-DNA 系の DNA サーキットによる DNA 複合体の解離により Fc が CyD から脱離してシグナルが触媒的に回復することを確認することができたが、その増幅率は期待したほどではなかった。そこで、Fc-DNA に相補的な DNA を電極上に固定化し、系からリリースした Fc-DNA を電極上に濃縮することで格段の感度向上を目指した。結果、電極上で Fc-DNA を選択的にトラップすることで感度を数倍増大させることに成功した (図 4)。

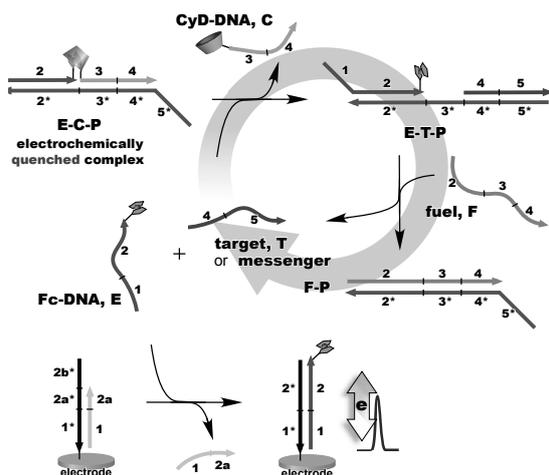


図 4 Fc/ $\beta$ CyD 包接体形成に伴う電気化学応答変化を利用した DNA circuit 触媒 DNA (図 1 のシグナル変換系からメッセジャーとして放出) によって進行するエントロピー駆動型の DNA circuit の例を示した。反応前には包接体を形成しているため Fc が遮蔽されシグナル OFF であるが、circuit 生成物では解離して Fc がフリーになりシグナル ON となる。Fc-DNA を電極上に濃縮することでさらに感度が向上した。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. T. Ihara, H. Ohura, C. Shirahama, T. Furuzono, H. Shimada, H. Matsuura, Y. Kitamura, "Metal Ion-directed Dynamic Splicing of DNA through Global Conformational Change by Intramolecular Complexation" *Nat. Commun.*, **6**, 6640 (2015). 10.1038/ncomms7640
2. Y. Kitamura, T. Miyahata, H. Matsuura, K. Hatakeyama, T. Taniguchi, M. Koinuma, Y. Matsumoto, T. Ihara, "Graphene Oxide-based Amplified Fluorescence Sensor for Nucleic Acid Detection through Target-catalyzed Hairpin Assembly" *Chem. Lett.*, **44**, 1353-1355 (2015). 10.1246/cl.150564
3. K. Nishiyama, K. Tsuruta, M. Ikeda, S. Yoshimoto, H. Shimada, Y. Kitamura, T. Ihara, "Sensitive Electrochemical Detection of Nereistoxin by Reductive Desorption from Au(111) and Au(100)"

*Electrochemistry*, **84**, 349-353 (2016). 10.5796/electrochemistry.84.349

4. H. Shimada, S. Noguchi, M. Yamamoto, K. Nishiyama, Y. Kitamura, T. Ihara, "Electrochemical Sensing of Neurotoxic Agents Based on Their Electron Transfer Promotion Effect on an Au Electrode" *Anal. Chem.*, **89**, 5742-5747 (2017). 10.1021/acs.analchem.6b04229

[学会発表] (計 20 件)

1. K. Yoshimura, T. Wasano, Y. Kitamura, T. Ihara, "Electrochemical signal amplification for DNA detection in homogeneous solution" 8th Asian Cyclodextrin Conference 2015年4月, 熊本
2. B. Ikeda, C. Imoto, K. Mishio, R. Nakatake, Y. Kitamura, T. Ihara, "Design of electrochemical molecular beacon and its application to DNA detection" 8th Asian Cyclodextrin Conference 2015年4月, 熊本
3. 井原敏博, "DNA 構造の動的プログラミングに基づくバイオセンシング" 第52回化学関連支部合同九州大会 2015年6月, 北九州, 依頼講演
4. 井原敏博, "核酸の構造制御およびバイオセンシングへの応用" 核酸化学最前線フォーラム FIBER未来大学シリーズSeries 17 2015年7月, 神戸, 招待講演
5. T. Ihara, "Metal Complexation on DNA -For DNA Structure Control and Biosensing-" 16th IUPAC International Symposium on MacroMolecular Complexes (MMC-16) 2015年8月, Wroclaw, Poland, 基調講演
6. 井原敏博, 古谷英長, 松尾朋弥, 成合裕哉, 北村裕介, "可逆的  $\Omega$  型構造形成に基づく DNA の機能制御" 第64回高分子討論会 2015年9月, 仙台, 依頼講演
7. Y. Kitamura, R. Ozaki, K. Yoshimura, Y. Azuma, T. Ihara, "Nucleic Acid Sensor Amplified with DNA Circuit" The 42nd International Symposium on Nucleic Acid Chemistry 2015年9月, 姫路
8. 井原敏博, "DNA 上での錯生成反応 -核酸の構造制御および分析系への応用-" 鳥取大学大学院講演会 2015年11月, 鳥取, 招待講演
9. 井原敏博, "DNA 上での錯生成反応 -核酸の構造制御および分析系への応用-" 第4回熊本和光ライフサイエンスフォーラム 2015年11月, 鳥取, 招待講演

10. 井原敏博, “核酸上での錯生成反応 -核酸の構造制御およびバイオ分析への応用”  
第一回産学・分子組織シンポジウム  
2016年1月, 福岡, 招待講演
11. 井原敏博, “核酸の構造制御およびバイオ分析への応用 -核酸上での錯生成反応-”  
生体機能関連化学部会第二回国際シンポジウムミニワークショップ  
2016年5月, 東京, 依頼講演
12. T. Ihara, Y. Azuma, R. Ozaki, A. Nozaki, T. Miyahata, Y. Kitamura, “Nucleic Acid Sensor Amplified with DNA Circuit”  
Rare Earths 2016 in Sapporo  
2016年6月, 札幌, 依頼講演
13. T. Ihara, “Metal Complexation on DNA -For DNA Structural Control and Biosensing-”  
FIBER International Summit for Nucleic Acids 2016  
2016年7月, 神戸, 依頼講演
14. 井原敏博, “DNA 上での錯生成反応 -バイオ分析・機能制御を目指して-”  
名古屋大学大学院物質制御工学専攻セミナー  
2016年12月, 名古屋, 招待講演
15. 井原敏博, “核酸を基体とするバイオセンシング”  
高分子学会九州支部有機材料研究グループ研究会  
2017年3月, 熊本, 招待講演
16. T. Ihara, “Target Recognition by Global DNA Structural Control”  
FIBER International Summit for Nucleic Acids 2017  
2017年7月, 神戸, 依頼講演
17. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御 -バイオ分析・機能制御を目指して-”  
九州大学大学院工学研究府応用化学部門 (分子) 教室セミナー  
2017年7月, 福岡, 招待講演
18. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御 -バイオ分析・機能制御を目指して-”  
大阪府立大学大学院理学系研究科セミナー  
2017年9月, 大阪, 招待講演
19. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御”  
第50回歯工連携講演会  
2017年10月, 北九州, 招待講演
20. 井原敏博, “人工 DNA の構造制御を利用したバイオ分析・機能制御”  
先端分析・機能創発研究会2017  
2017年11月, 福岡, 依頼講演

[図書] (計3件)

1. S. Obata, K. Saiki, T. Taniguchi, T. Ihara, Y. Kitamura, Y. Matsumoto, “Graphene Oxide: A Fertile Nanosheet for Various Applications”

*J. Phys. Soc. Jpn.*, **84**, 121012–121018 (2015).  
10.7566/JPSJ.84.121012

2. 井原敏博, 北村裕介, “酸化グラフェンの生体への応用”  
酸化グラフェンの機能と応用 (2016)  
監修 松本泰道, シーエムシー出版
3. T. Ihara, “Organometallic complexes for biosensing”  
*Advances in Bioorganometallic Chemistry*, Elsevier, in press

[その他]

ホームページ

<http://www.analyticalchemistry-ihara.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井原 敏博 (IHARA, Toshihiro)

熊本大学大学院先端科学研究部・教授  
研究者番号: 40253489

(2) 研究分担者

吉本 惣一郎 (YOSHIMOTO, Soichiro)

熊本大学大学院先端機構・准教授  
研究者番号: 30323067

(3) 研究分担者

今堀 龍志 (IMAHORI, Tatsushi)

東京理科大学工学部・講師  
研究者番号: 90433515