

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22955

研究課題名(和文) 気相中で標的分子を特異的に認識するDNAアプタマーの開発

研究課題名(英文) Development of DNA aptamers recognizing target molecules in the air

研究代表者

池袋 一典 (Ikebukuro, Kazunori)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・卓越教授

研究者番号：70251494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、気相中で分子認識できるDNAアプタマーを設計・開発することを目的とした。現在、金属酸化物センサー等が、気相中のガス分子検出に用いられているが、特定のガス分子を特異的に検出できない。DNAは気相中でも水中での構造を維持している可能性があり、優れた分子認識能を持つDNAアプタマーは、気相中でも3次元構造を維持し、標的分子を認識できる可能性がある。そこで、気相中でのアプタマーによるガス分子認識を、アプタマーを固定化した水晶振動子で検出した。インドールが結合すると、振動数が変化し、メチル基一つを余分に有するスカトールに対しては振動数の変化を観察できなかった。特異的な検出に成功したといえる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ガス分子を特異的に検出することができれば、疾病の早期診断や覚醒剤検知やテロ対策に極めて有効である。しかし現在、異なるガスをパターン解析により区別するシステムは開発されているが、特定のガス分子を、気相中で特異的かつ高感度に検出できるセンシングシステムは開発されていない。本研究では気相中で分子認識できると予想されるDNAアプタマーを水晶振動子に固定化して、香料として汎用されている、インドール、スカトールの検出を試み、構造が類似しており、わずかメチル基一つの差しかない両者を明確に区別できる水晶振動子の振動数変化を観察した。まだ報告例のない、気相中の分子認識の最初の例として意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to develop DNA aptamers which can recognize those target molecules in the air. There are lots of gas sensors composed of metal oxide or semi-conductors but those cannot identify the target molecules in the mixed gases. DNA are reported to maintain its structure in the water even in the air, and it might mean the DNA aptamers which specifically bind to those target molecules can recognize those target molecules even in the air. We used DNA aptamer immobilized quartz crystal microbalance (QCM) to detect the indole and skatol and we got the frequency change only against indole but did not get it against skatol. Indole and skatol has very similar structure apart from one methyl group, so we were able to distinguish one methyl group difference with DNA aptamers in the air. It must be the first example of concrete specific detection of gaseous molecule in the air with the DNA molecules.

研究分野：生物工学

キーワード：気相中の分子認識 アプタマー

1. 研究開始当初の背景

気相中で、ガス分子と分子認識素子が結合している場合に、どのような相互作用が働いているかはこれまでまともに議論されることがないようで、いくら文献を探しても見つけることができない。気相中で分子を認識した、という報告はわずかに数例見つけることができたが、それも分子認識というよりガス分子の吸着量評価の域に留まっている。

生物は優れた匂い検出能力を有するが、それも水相での匂いレセプター蛋白質による分子認識に基づいており、気相中での分子認識は自然界では例がないと考えられる。従って、気相中での分子認識については、自然界にさえその例がなく、参考にする知見さえない、と言える。基礎研究として、匂いレセプターを酵母表面に発現させ、匂い分子の結合によって起こる酵母の電氣的応答等を検出する研究等は行われているが、そもそも水に溶けにくい匂い分子を再び水溶液に溶かして検出を行っており、高感度検出には到っていない。

気相で標的分子を検出する方法として、現在、金属酸化物半導体センサー等が、気相中のガス分子検出に用いられているが、特定のガス分子のみの特異的検知は不可能である。異なるガス分子吸着層を複数用意し、それぞれの吸着量を測定し、測定対象とするガスをパターン解析により識別するシステムは開発されているが、特定のガス分子を特異的に認識する術がない。

申請者らは、標的分子を鋳型として高分子を重合させることにより、標的分子を認識するポリマーを作製し、これを用いたガス分子認識センサーを世界に先駆けて報告している。しかし、この場合、必ずしも標的分子を認識する部位が一樣に形成されるわけではなく、様々なガス分子が混在する場合は、標的分子のみを特異的に検出することは難しい。つまり大気中のウイルスを、現在存在する気相中でのセンシングシステムを用いて検出することはできるが、特定のウイルスを定量することは、極めて難しい。これまで気相中の分子認識は、ほとんど研究されていない為に、極めて難易度の高い研究課題といえるが、グアニン四重鎖(G4)構造を有する DNA アプタマーを分子認識素子とする場合は、実現可能性がある(図1)。

DNA の二本鎖は気相中でも二本鎖を維持していると考えられ、その他の立体構造も維持できる可能性がある。例えば DNA マイクロアレイ上のプローブ DNA に標的核酸をハイブリダイゼーションさせた場合、これを乾燥させた後でも、その二本鎖が維持されていることは、よく知られている。気相中でも立体構造を形成するならば、特定の分子を認識できるはずである。つまり、抗体と同様に優れた分子認識能を持つ DNA アプタマーは、気相中でも三次元構造を維持し、標的分子を認識する可能性がある。そこで、本研究では気相中で分子認識できる DNA アプタマーを設計・開発することを目的とする。

申請者はこれまで、20 以上の様々な標的に対して、グアニン四重鎖(G4)構造を有する DNA アプタマーを取得しており(図1)、この G4 構造は、気相中でもその構造を保っている、という報告が多数発表されている(Vairamani *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 42-43, 2003; Rueda *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 1810-1811, 2005; Gabelica *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 3608-3619, 2008)。

従って G4 構造をもつ DNA アプタマーであれば、気相中でも立体構造を形成し、標的分子の立体構造を認識する可能性はある。水中で複数の分子が相互作用を形成する場合、そこで形成される相互作用は、水素結合、静電的相互作用、ファン・デル・ワールス相互作用、疎水性相互作用、 π - π 相互作用等が知られている。気相中ではこのうち、疎水性相互作用は働かないが、その他の4つの相互作用は、電氣的な相互作用であり、気相中では水中でより強く働くと考えられる(大気の誘電率は水の80分の1)。従って水中での相互作用と比較すると、気相中において形成される、それぞれの相互作用の割合は変わるはずだが、気相中でも、標的分子と DNA アプタマー間で多数の相互作用が形成され、標的分子の立体構造の厳密な認識は可能だと考えられる。

従来の試験管内進化法では、標的分子との結合を利用し、結合していない DNA を洗浄して除去することで、標的分子に結合している DNA アプタマーのみを回収している。気相中では結合していない DNA を除去できないので、この手法は使えない。

しかし、申請者らは、遺伝的アルゴリズムを利用して DNA アプタマーの特定の機能を向上させるように、塩基配列を改変していく、コンピューター内進化 (*in silico* maturation : ISM) 法を開発し 20 を超える優れた結合能や選択性を有する DNA アプタマーを獲得するこ

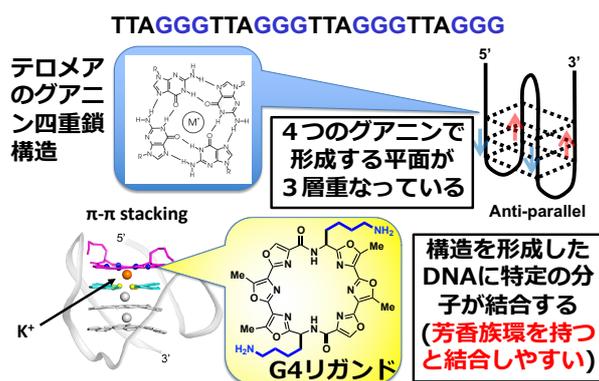


図1 DNAのグアニン四重鎖(G4)構造とその分子認識

とに成功している。*in vitro*で機能を評価するので、実験で評価できる機能であれば、どんな機能でも向上させることができる。従って、気相中での結合を検出して評価すれば、標的分子を特異的に認識する DNA アプタマーの、気相中での結合能と、その結合選択性の両方を向上させることができる。

標的とするウイルスにある程度結合を示す DNA を入手できれば、ISM でその結合能を改良できる。つまり、気相中でのガス分子とアプタマーの相互作用の詳細が不明でも、その結合能や結合特異性を向上させられる。

申請者らはこの他にも、これまでに様々なガス分子に応答を示すことが報告されている DNA (SEQ02, Seq03, Staii et al., Nano lett., 5(9), 1774-1778, 2005; White et al., PLoS Biol., 6(1), e9, 2008) に蛍光分子を標識し、これにジニトロフェノール (DNP) を添加すると、濃度依存的にその蛍光が変化することを確認しており、気相中で何らかの相互作用が形成され、分子認識が可能であることを確信している。

2. 研究の目的

本研究は気相中で分子認識できる DNA アプタマーを設計・開発することを目的とする。気相中のガス分子検出は、疾病の早期診断や覚醒剤検知やテロ対策に極めて有効である。現在、金属酸化物半導体センサー等が、気相中のガス分子検出に用いられているが、特定のガス分子のみの特異的検知は不可能である。

ガス分子を気相中で特異的に分子認識する素子を作製できれば、ガスの濃縮装置と組み合わせることにより高感度検出が可能ならずであり、ガス分子特異的検出システムの開発を加速できる。DNA は、上述した通り、水中で形成した立体構造を気相中でも維持する可能性がある。抗体と同様に優れた分子認識能を持つ DNA アプタマー (通常一本鎖) は、気相中でも 3 次元構造を維持し、標的分子を認識する可能性がある。そこで、本研究は気相中で分子認識できる DNA アプタマーを設計・開発することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

上記の目標を達するために、以下の 4 つの研究を遂行した。

- (1) インドールに結合するアプタマーの取得
- (2) アプタマー固定化水晶振動子 (QCM) を用いたインドール、スカトール の検出
- (3) ミオグロビン結合アプタマーの取得
- (4) アプタマー固定化水晶振動子 (QCM) を用いたミオグロビンの検出

(1) アプタマーの取得

インドールに結合するアプタマーとしては、すでにパラレル型の G4 構造を持つことを NMR 解析により確認している DNA を用いることにした。ミオグロビンに結合するアプタマーは、通常の SELEX 法 (図 2) を用いて探索した。

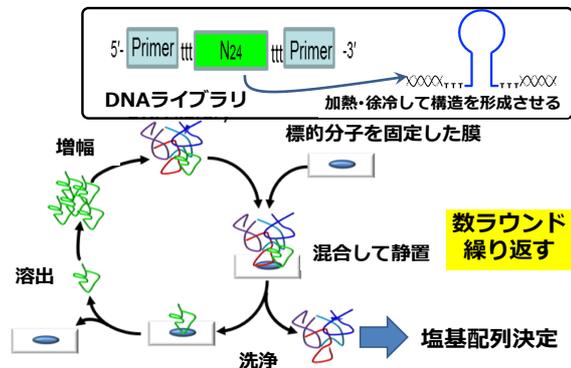


図2 アプタマーの選択法: SELEX

(2) アプタマー固定化水晶振動子 (QCM) を用いたインドール、ミオグロビンの検出

水晶振動子 (QCM) の表面に G4 構造を形成する DNA を固定化し (図 3)、これらに同じ骨格構造を持ち、メチル基一つの有無のみが異なる、インドールとスカトールを認識できるかを確認することにした。QCM は一定の共振周波数で交流電圧を印加すると、極めて安定した振動を示すが (この場合は 30 MHz)、表面に分子が吸着したとき、その分子の大きさ・質量に応じた共振周波数の低下を示す。

G4 構造を有するチオール修飾 DNA アプタマー (1R-20, HA) を QCM の金電極上に、金-チオール間の共有結合を介して固定化した。図 1 に示すように、G4 平面は芳香族環と π 電子を介した相互作用を形成しやすく、芳香族環を主骨格とした様々な分子が強い結合を示すことが報告されている。インドールとスカトール は、芳香族環を有するので、G4 とは相互しやすいはずであり、しかし、G4 のループ部分が特徴的な立体構造を形成しているため、この主骨格に結合している官能基により、結合能が変わると期待できる。実際、様々な G4 リガ

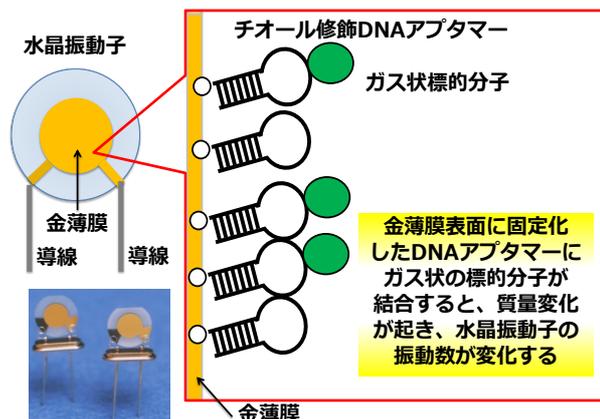


図3 DNAアプタマーを固定化した水晶振動子

ドが報告されているが、それぞれの官能基のごくわずかな違いにより、結合能や結合特異性が大きく変化することは報告されている。

このG4構造を有するDNAアプタマーを固定化したQCMを、図4に示す、ガス検出システムに接続し、スカトールやインドールを含むガスを送気してQCMの周波数変化を検出した。ガス検出システムには通常窒素ガスを送気し、スカトールやインドールを溶かした溶液をパーミエーターに設置して、三方コックを切り替えて、QCMに送気するガスの割合等を制御しながら、QCMの振動周波数変化を測定した。

ミオグロビンの測定の場合は、ミオグロビンをガスとして送気することができないので、ミオグロビンを溶かした水溶液を、ネプライザーを用いて噴霧し、アプタマー固定化QCMを、しばらくミオグロビンを含んだミストに暴露し、そのQCMをガス検出システムに設置して、その振動周波数変化を測定した。

4. 研究成果

(1) インドール、ミオグロビンに結合するアプタマーの取得

インドールに対しては、解離定数が μM レベル、ミオグロビンに対しては、数十nMを示すアプタマーを取得することができた。

(2) アプタマー固定化水晶振動子(QCM)を用いたインドール、ミオグロビンの検出

QCM上にDNAアプタマーが固定化されたかどうかは、蛍光修飾されたチオール修飾DNAアプタマーを、QCMの金電極上に、金-チオール共有結合を利用して固定化し、QCMをMilliQ水で十分に洗浄した上でQCM表面の蛍光像を観察することで確認した。一面に均一にDNAアプタマーが固定化できていることを確認した。

図4に示すガス検出システムに、スカトールを送気したところ、ほとんど周波数変化が得られなかった(図5上図)。しかしインドールを送気した場合は(図5下図)、アプタマーを固定化しなかった場合(図5下左図)に比べて、G4構造形成アプタマーの1R-20、HAはそれぞれ、より大きく、明確に異なる周波数低下を示した。スカトールとインドールの違いは、メチル基一つだけであり、それ以外は同じ芳香族環を有する。この芳香族環は、G4の四つのグアニンが形成する平面と π - π 相互作用を形成すると考えられ、ある程度の結合能を有すると期待できるが、G4のループ部分が立体構造を形成しており、実際にインドール、スカトールがG4平面に接近する際に、メチル基一つが、立体的障害になって、接近しにくくなることありうる。従ってこの結果は、気相中でもDNAアプタマーが十分に厳密な分子認識が行えることを示唆している。

なお、低分子の代わりにミオグロビンを含んだ水溶液を噴霧した場合も周波数の低下を観察でき、ミオグロビンを検出可能なことが示唆された。

以上、得られた成果を以下にまとめる。気相中でのアプタマーによるガス分子認識を、QCMで検出した。QCMの表面にインドールに結合するG4形成DNAアプタマーを固定化し、QCMに交流電圧を印加すると、規則正しく振動する。DNAアプタマーにパーミエーターによりガス状にしたインドールが結合すると、振動数が変化するはずであり、実際にインドールをガス状にして通気したところ、振動数の変化を観察することができた。そして同じ芳香族環を主骨格としてもち、メチル基一つを余分に有するスカトールをガス上にして通気したところ、これに対しては振動数の変化を観察できなかった。つまりインドールの特異的な検出に成功した。また、蛋白質である、ミオグロビンも同様に検出できることが確認できた。

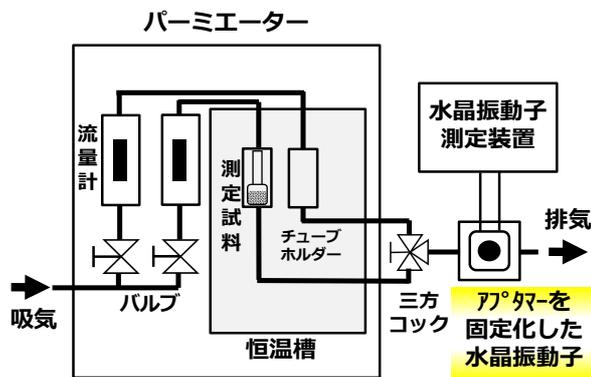


図4 水晶振動子を用いたガス検出システム

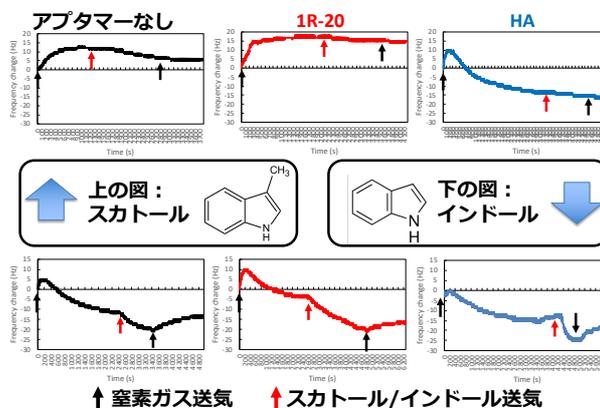


図5 DNAアプタマー固定化QCMによるインドール検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nishio M, Tsukakoshi K, Ikebukuro K	4. 巻 178
2. 論文標題 G-quadruplex: Flexible conformational changes by cations, pH, crowding and its applications to biosensing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosens Bioelectron	6. 最初と最後の頁 113030
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2021.113030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ryo Nozaki ; Takashi Ikuta ; Kinuko Ueno ; Kaori Tsukakoshi ; Kazunori Ikebukuro ; Kenzo Maehashi	4. 巻 257
2. 論文標題 Ethanol Detection at the Parts per Billion Level with Single Stranded DNA Modified Graphene Field Effect Transistors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physica Status Solidi	6. 最初と最後の頁 1900376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pssb.201900376	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hatano Y, Lee JH, Kim SH, Ikebukuro K, Asano R, Gu MB, Sode K
2. 発表標題 Electrochemical Aptasensor Employing Enzyme-Aptamer One-to-One Complex Showing Quasi-Direct Electron Transfer Ability
3. 学会等名 ECS Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ueno K, Tsukakoshi K, Ikebukuro K	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 349
3. 書名 Advances in Synthetic Biology	

1. 著者名 Kinuko Ueno, Kaori Tsukakoshi, Kazunori Ikebukuro	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Elsevier	5. 総ページ数 i14 pages in 409 pages
3. 書名 "Aptameric sensors utilizing its property as DNA", in "Chemical, Gas, and Biosensors for Internet of Things and Related Applications"	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
	UNC at Chapel Hill	UC Riverside	NCSU
米国			