

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20550156

研究課題名(和文) 遺伝子タイピング・生体分子センシングのための電気化学DNAデバイス

研究課題名(英文) Electrochemical DNA Devices for Gene Typing and Biomolecular Sensing

研究代表者

山名 一成 (YAMANA KAZUSHIGE)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70192408

研究成果の概要(和文)：われわれは、アントラキノンやフェロセン誘導体をレドックスレポーターとして組み込んだ DNA チップを作成して、DNA 鎖交換を基盤とした遺伝子変異の電気化学検出やバイオ分子のセンシングを検討した。われわれの方法によると、合成が比較的簡単に行なえるレドックスレポーターを用いて、検出対象となる遺伝子のラベルを行なうこと無しに、触媒など他の試薬を検出時にいっさい加えることなく、DNA 一塩基変異の電気化学検出やバイオ分子の電気化学センシングが行なえることを明らかにした。さらに、 π 共役型レドックス-DNA 誘導体の合成にも成功し、一塩基変異の電気化学検出や核酸電子リレーシステムに展開可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We have prepared several DNA devices that involve anthraquinone or ferrocene as a redox reporter at the specific position of DNA. The devices exhibit excellent performances in the sensing of DNA sequences or biomolecules such as ATP and proteins. Our method for the DNA sensing is based on strand exchange reactions of the redox-probe oligonucleotide with target DNA at the surface of the devices. We have shown that a strand exchange approach is applicable in aptamer based biosensors. During the grant research period, we have also succeeded the synthesis of redox-oligonucleotides via the π -electron conjugation between the reporter and the nucleoside base. We anticipate that the redox-oligomers would be used for the new systems in detection of DNA mutation and in electron migration on DNA wires.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：核酸化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能材料

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究の背景

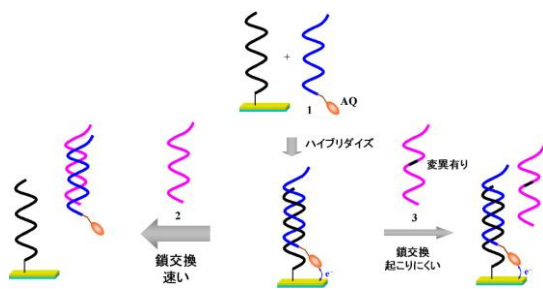
申請者らは、これまでの研究で、アントラキノン(AQ)をオリゴヌクレオチドに導入する一般的な方法を開発し、アントラキノン修飾オリゴヌクレオチド誘導体が相補鎖DN

AとAQのインターカレーションに由来する高い親和性を有することを明らかにした。また、AQをオリゴヌクレオチドに導入しても、相補鎖DNAとのハイブリダイゼーションにおける塩基配列特異性が未修飾オリゴヌクレオチドと同様に保たれていることを示

した。これら **AQ** 修飾オリゴヌクレオチドを金電極表面に自己組織化法により固定化した単分子膜の電気化学的諸特性を検討した結果、**AQ** 修飾DNA 2本鎖を固定化した金電極は1本鎖の場合よりも速い電子移動速度を示すこと、ミスマッチ塩基を含む2本鎖ではフルマッチ2本鎖よりも電子移動速度が遅いことを見出した。さらにこれらの研究成果と知見をもとに **AQ** を修飾した一本鎖DNA固定化した電極を用いて検体DNAをハイブリダイズさせ、**AQ** の電気化学応答をモニターすることにより塩基配列を識別することに成功している。しかしながら、この手法では電気化学応答の **S/N** 比が低く、ダイナミックレンジが狭い等の課題が残されている。また実用化を考えた場合、プローブである **AQ** 修飾DNAを固定化する手法はコストや手間の面で非現実的である。

申請者らは、上述の問題点を解決するために鎖交換法による電気化学センシングに着目し、一塩基変異の識別が可能であることを、予備的に見出している。具体的には、下図に示すように、未修飾の **Capture DNA** を固定化した電極に **AQ** を修飾したプローブDNA

(1) をハイブリダイズさせる、この状態では **AQ** は電極上に存在するため **AQ** の電気化学応答を示す。これに **1** に対して相補的なDNA (2) を添加すると **1** と **2** の鎖交換が起こり **AQ** は電極上から解離するため電気化学応答が鋭敏に減少する。これに対して検体DNAに変異があるDNA (3) では **2** と比べ交換反応が起こりにくく電気化学応答が減少しない。この鎖交換反応の特性を利用することにより検出感度の高い低コスト電気化学DNAデバイスの構築が可能である。



この鎖交換法は、遺伝子の塩基配列の識別だけでなく、プローブDNAの塩基配列をATPや蛋白などの生体分子を選択的に認識するアプタマ-と同じ塩基配にすれば、その生体分子が存在するときにプローブDNAが生体分子と複合体を形成し、電極上から解離するためこれら生体分子を容易に識別・検出することが可能であり、遺伝子を含むバイオ分子センシングの実用化の面で汎用性に優れた手法であるといえる。

(2) 研究の特色

本研究は汎用の装置を使用でき低コスト

でDNA配列のモニター可能である電気化学検出法と、高い検出感度でターゲット分子の識別・検出が可能な鎖交換法を融合したところに特徴があり、現時点では開拓的な研究分野である核酸を半導体デバイスの一部として扱う研究分野において、核酸と異物質との界面の構造および機能制御に関する知識の蓄積に貢献できる。

(3) 研究の位置づけ

ヒトの遺伝子をはじめとするゲノムプロジェクトが進められ、遺伝子が明らかにされてきた。遺伝子構造解析の結果を有効利用した遺伝子機能の研究が、生命現象の謎の解明のみならず、疾患の予防と診断、医薬品の開発等に新しい道を開くための非常に重要なテーマとなっている。これらの研究を進めるためには遺伝子の発現や遺伝子変異(多型性)を解析することが必要になる。このような解析を簡便かつ迅速に行うために、プローブDNAと解析の対象となる遺伝子とのハイブリダイゼーションを効率良くモニターしてDNA配列を検出する方法の開発が望まれている。現在、DNA配列のモニターは蛍光法による方法が主流であるが、蛍光法によるDNA配列の検出では研究のための機器等はすでに存在はするものの高価で信頼性も十分でないこと、及びその取扱いに熟練を要することから、直ちに臨床など広範囲に応用することは困難である。

一方、DNA配列の電気化学検出は汎用の装置を使用できるため低コストでDNA配列のモニター可能であることから、蛍光法とともに魅力的なアプローチであり、国内外で活発に研究されている。現在までに検討されている一般的な方法は、チップ上に固定化したプローブDNAと検出対象である遺伝子のハイブリダイゼーションをおこない、電気化学応答分子を電極チップ表面に物理的に濃縮固定して、電気化学シグナルを得ることを基本にしている。すなわち、竹中らによるDNA 2本鎖に特異的に結合するレドックス修飾インターカレーターを利用する方法、Willnerらによるレドックス修飾DNAをプローブDNAと検体DNA間にサンドウィッチ型に結合させる方法、また、レドックス基で修飾したモレキュラービーコン型DNAを固定化した電極を用いる方法が提唱されている。これらはいずれもDNAを介した電子移動を遺伝子検出の基本原則とした方法ではない。また、Bartonらは、DNA 2本鎖中に存在する一塩基変異やDNAとタンパク質間の相互作用を電気化学的にモニターする方法を提示している。これらは、電極に固定化した2本鎖DNAを介する電極とレドックス基間の電荷応答により検出したものである。

鎖交換反応を利用した遺伝子変異の識別

に関する研究は溶液中で蛍光法を使った方法が開発されているが、本研究のように鎖交換を電気化学検出に応用した研究はまだ行われていない。

2. 研究の目的

近年、ナノバイオサイエンスの進展の中で、核酸をナノ材料として利用する研究が注目されている。すでに、さまざまな機能を化学修飾によりDNAに付与することで、DNA ナノワイヤーやDNA コンピューターなどの核酸デバイスの作成が検討されている。本研究では、レドックス基で化学修飾したDNAをプローブとして用い、電極表面上に固定化したDNAとの鎖交換を基盤とした、遺伝子タイピング、生体分子センシングのための電気化学DNAデバイスを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CaptureDNA固定化電極の表面状態を評価する。均質でDNA配向性を保った膜を構築するためのDNA修飾条件の最適化を行う。またCaptureDNAを固定化した電極にAQ修飾プローブDNAをハイブリダイズさせ電極上での検体DNAによる鎖交換反応について評価する。

(2) 得られた知見をもとに鎖交換反応による疾病遺伝子の一塩基変異 (SNPs) 識別の可能性について検討する。ここでは既知の心筋梗塞遺伝子のSNPsを利用して、プローブDNA, Capture DNAの設計を行い、鎖交換による電気化学応答をモニターすることにより心筋梗塞遺伝子等のSNPs識別が可能か判断する。

(3) 鎖交換による生体分子識別の検討を行う。生体分子としてアプタマーの塩基配列が既知のATP、トロンビン、リゾチームについて、アプタマーの塩基配列と同じ配列を持つAQ修飾プローブDNA、それと相補的な配列を有するCaptureDNAを合成し、生体分子の電極上鎖交換による識別について検討する。

4. 研究成果

われわれは、アントラキノンやフェロセン誘導体をレドックスレポーターとして組み込んだDNAチップを作成して、DNA鎖交換を基盤とした遺伝子変異の電気化学検出やバイオ分子のセンシングを検討した。われわれの方法によると、合成が比較的簡単に行なえるレドックスレポーターを用いて、検出対象となる遺伝子のラベルを行なうこと無しに、触媒など他の試薬を検出時にいっさい加えることなく、DNA一塩基変異の電気化学検出やバイオ分子の電気化学センシングが行なえることを明らかにした。さらに、 π 共役型

レドックス-DNA誘導体の合成にも成功し、一塩基変異の電気化学検出や核酸電子リレーシステムに展開可能であることを明らかにした。

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13件)

- ① Eriko Hayashi, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura and Kazushige Yamana, Electronic Aptamer-based Biosensor for Multiprotein Analyses on a Single Platform, *Chem. Lett.*, **2010**, 39, 454-455. (査読有)
- ② Minoru Fukuda, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada, and Kazushige Yamana, Syntheses and fluorescence of RNA conjugates having pyrene-modified adenosine and nitrobenzene-modified uridine base pairs, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, 51, 1732-1735. (査読有)
- ③ Tadao Takada, Chie Tanaka, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Fluorescence analysis of excess electron transfer through DNA, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 994-996. (査読有)
- ④ Yosuke Tanimizu, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Synthesis and characterization of deoxyuridine triphosphates labeled with pyrene, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2009**, 53, 131-132. (査読有)
- ⑤ Minoru Fukuda, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada, and Kazushige Yamana, Duplex formation of multiple pyrene-modified RNAs, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2009**, 53, 133-134. (査読有)
- ⑥ Yusuke Hasegawa, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada, and Kazushige Yamana, Synthesis and hybridization of oligonucleotides attached to a redox reporter via ethenyl linker at 5-position of pyrimidine base, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2009**, 53, 145-146. (査読有)
- ⑦ Yuta Kawano, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, DNA ligation using photoremovable protecting groups, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2009**, 53, 173-174. (査読有)
- ⑧ Kenji Maie, Kazuyuki Miyagi, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, RNA-Mediated Electron Transfer: Double Exponential Distance Dependence, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 13188-13189. (査読有)

- ⑨ Kenji Maie, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada, and Kazushige Yamana, Fluorescence quenching properties of multiple pyrene-modified RNAs, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 4996-5000. (査読有)
- ⑩ Mariko Watanabe, Satoshi Kumamoto, Mitsunobu Nakamura and Kazushige Yamana, Electronic detection of DNA mutation based on strand exchange reaction, *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, *17*, 1494-1497. (査読有)
- ⑪ Mitsunobu Nakamura, Yohei Murakami, and Kazushige Yamana, Zipper-like assembly of multi-pyrenes covalently attached to RNA sequences via duplex formation, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2008**, *52*, 707-708. (査読有)
- ⑫ Kenji Maie, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Efficient quenching of the excimer fluorescence derived from pyrene arrays on RNA duplexes, *Nucleic Acids Research Symposium Series*, **2008**, *52*, 705-706. (査読有)
- ⑬ Mitsunobu Nakamura, Yohei Murakami, Kazuhiro Sasa, Haruhisa Hayashi, and Kazushige Yamana, Pyrene-Zipper Array Assembled via RNA Duplex Formation, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 6904-6905. (査読有)
- [学会発表] (計42件)
- ① 高田忠雄、大塚友美子、中村光伸、山名一成、DNA内部の疎水空間を利用した分子配列、日本化学会第91春季年会、(横浜、3/26-29、2011)
- ② 長谷川祐介、高田忠雄、中村光伸、山名一成、ポルフィリン-フェロセン-DNAコンジュゲートの合成と性質、日本化学会第91春季年会、(横浜、3/26-29、2011)
- ③ 佐伯友佑、高田忠雄、中村光伸、山名一成、RNA上でのピレンからニトロベンゼンへの電荷移動、日本化学会第91春季年会、(横浜、3/26-29、2011)
- ④ 大塚友美子、高田忠雄、中村光伸、山名一成、結合空間を有するDNAを用いた電荷移動錯体の形成、日本化学会第91春季年会、(横浜、3/26-29、2011)
- ⑤ 中村光伸、核酸をテンプレートにした芳香族分子集合体中の電荷およびエネルギー伝達機構の解明、シンポジウム「2011最先端ビーム機能化学」(吹田、1/29-30、2011) 招待講演
- ⑥ 高田忠雄、DNA上における機能分子の集積と配列、シンポジウム「2011最先端ビーム機能化学」(吹田、1/29-30、2011)
- 招待講演
- ⑦ Kazushige Yamana, Aptamer-based electrochemical biosensor, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2010 Pacificchem)* (Honolulu, USA, Dec. 15-20, 2010)
- ⑧ Mitsunobu Nakamura, Construction of Pyrene Arrays on RNA, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2010 Pacificchem)* (Honolulu, USA, Dec. 15-20, 2010) 招待講演
- ⑨ Tadao Takada, Yumiko Otsuka, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Formation of a charge-transfer complex in DNA duplex, *The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (2010 Pacificchem)* (Honolulu, USA, Dec. 15-20, 2010)
- ⑩ Yusuke Saeki, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada, and Kazushige Yamana, Interstrand charge migration from excited pyrene to nitrobenzene on RNA duplex, *The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010* (Yokohama, Nov. 10-12, 2010)
- ⑪ Tadao Takada, Yumiko Otsuka, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Formation of a charge-transfer complex in a cavity created inside of DNA, *The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010* (Yokohama, Nov. 10-12, 2010)
- ⑫ Mitsunobu Nakamura, Construction of Multichromophoric Arrays Using Nucleic Acids, *The 7th Korea-Japan Symposium on Frontier Photoscience 2010* (Daegu, Korea, Oct. 23-26, 2010) 招待講演
- ⑬ 佐伯友佑、中村光伸、高田忠雄、山名一成、ピレンとニトロベンゼンを導入した二本鎖RNAの蛍光挙動、2010年光化学討論会(千葉、9/8-10、2010)
- ⑭ Yumiko Otsuka, Yusuke Hasegawa, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura and Kazushige Yamana, Electron Transfer Through RNA Duplex, *International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* (Lyon, France, Aug. 29th – Sep. 3rd, 2010)
- ⑮ 谷水陽介、高田忠雄、中村光伸、山名一成、ポリメラーゼ反応を利用した蛍光核酸の作製、第56回高分子研究発表会(神戸、7/16、2010)
- ⑯ 福田稔、中村光伸、高田忠雄、山名一成、AU塩基対にピレンおよびニトロベンゼンを有する二重らせんRNA、第56回高分子研究発表会(神戸、7/16、2010)
- ⑰ 土地貴明、高田忠雄、中村光伸、山名一

- 成、酵素反応を利用したレドックス活性金ナノ粒子の作製、第56回高分子研究発表会(神戸、7/16、2010)
- ⑬ 長谷川裕介、高田忠雄、中村光伸、山名一成、フェロセン修飾DNA固定化電極による電気化学測定、第56回高分子研究発表会(神戸、7/16、2010)
- ⑭ 岡上司、中村光伸、高田忠雄、山名一成、DNAを利用した色素分子集合体、第56回高分子研究発表会(神戸、7/16、2010)
- ⑮ 佐伯友佑、中村光伸、高田忠雄、山名一成、二重らせんRNA中のRNA鎖間光電子移動、第56回高分子研究発表会(神戸、7/16、2010)
- ⑯ 河野裕太、高田忠雄、中村光伸、山名一成、ポリメラーゼ反応を利用した光レドックス活性分子のDNAへの導入、日本化学会第90春季年会(東大阪、3/26-29、2010)
- ⑰ 大塚友美子、高田忠雄、中村光伸、山名一成、ピレン修飾核酸における過剰電子移動、日本化学会第90春季年会(東大阪、3/26-29、2010)
- ⑱ 福田稔、中村光伸、高田忠雄、山名一成、ピレンおよびニトロベンゼン修飾RNAの合成と蛍光、日本化学会第90春季年会(東大阪、3/26-29、2010)
- ⑳ 長谷川裕介、高田忠雄、中村光伸、山名一成、金電極に固定したフェロセン修飾DNAの電気化学測定、日本化学会第90春季年会(東大阪、3/26-29、2010)
- ㉑ 中村光伸、RNA核酸上に集積された芳香族分子の秩序化とその機能、大阪大学産業科学研究所第2回量子ビーム科学研究施設研究会(吹田、10/16、2009)招待講演
- ㉒ Yuta Kawano, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, DNA ligation using photoremovable protecting groups, *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry* (Takayama, Sep. 27-Oct. 1, 2009)
- ㉓ Yusuke Hasegawa, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada, and Kazushige Yamana, Synthesis and hybridization of oligonucleotides attached to a redox reporter via ethenyl linker at 5-position of pyrimidine base, *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry* (Takayama, Sep. 27-Oct. 1, 2009)
- ㉔ Minoru Fukuda, Mitsunobu Nakamura, Tadao Takada, and Kazushige Yamana, Duplex formation of multiple pyrene-modified RNAs, *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry* (Takayama, Sep. 27-Oct. 1, 2009)
- ㉕ Yosuke Tanimizu, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Synthesis and characterization of deoxyuridine triphosphates labeled with pyrene, *The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry* (Takayama, Sep. 27-Oct. 1, 2009)
- ㉖ 福田稔、中村光伸、高田忠雄、山名一成、ピレン修飾RNAのハイブリダイゼーションによるエキシマー形成、光化学討論会(桐生、9/16-18、2009)
- ㉗ 高田忠雄、渡辺小百合、中村光伸、山名一成、ポリメラーゼ伸長反応を利用したDNA光電変換システムの構築、第24回生体機能関連化学シンポジウム(福岡、9/13-15、2009)
- ㉘ 福田稔、真家賢治、中村光伸、高田忠雄、山名一成、RNA二本鎖上に構築されたピレン会合体、日本化学会第89春季年会(船橋、3/27-30、2009)
- ㉙ 谷水陽介、高田忠雄、中村光伸、山名一成、ピレン修飾三リン酸誘導体の合成と評価、日本化学会第89春季年会(船橋、3/27-30、2009)
- ㉚ 河野裕太、高田忠雄、中村光伸、山名一成、光脱離性保護基を利用したDNA連結反応、日本化学会第89春季年会(船橋、3/27-30、2009)
- ㉛ 長谷川裕介、高田忠雄、中村光伸、山名一成、フェロセン共役核酸塩基の合成と性質、日本化学会第89春季年会(船橋、3/27-30、2009)
- ㉜ 真家賢治、中村光伸、高田忠雄、山名一成、電子ドナー、アクセプター修飾RNAの合成と性質、日本化学会第89春季年会(船橋、3/27-30、2009)
- ㉝ 渡辺小百合、高田忠雄、中村光伸、山名一成、ポリメラーゼ伸長反応によるDNAの光機能化、日本化学会第89春季年会(船橋、3/27-30、2009)
- ㉞ 林英理子、高田忠雄、中村光伸、山名一成、レドックス修飾DNAアプタマー固定化チップによる生体分子の電気化学検出、日本化学会第89春季年会(船橋、3/27-30、2009)
- ㉟ 真家賢治、高田忠雄、中村光伸、山名一成、RNAに固定化したドナー・アクセプター間の光誘起電子移動、第3回バイオ関連化学合同シンポジウム(横浜、9/18-20、2008)
- ㊱ Kenji Maie, Mitsunobu Nakamura, and Kazushige Yamana, Efficient quenching of the excimer fluorescence derived from pyrene arrays on RNA duplexes, *Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*

(Kyoto, Sep. 8-12, 2008)

- ④1 Mitsunobu Nakamura, Yohei Murakami, and Kazushige Yamana, Zipper-like assembly of multi-pyrenes covalently attached to RNA sequences via duplex formation, *Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry* (Kyoto, Sep. 8-12, 2008)
- ④2 中村光伸、村上陽平、山名一成、RNA二重らせん形成により構築されるピレンアレイの蛍光特性、光化学討論会（堺、9/11-13、2008）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/msc1/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山名 一成 (YAMANA KAZUSHIGE)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70192408

(2) 連携研究者

中村 光伸 (NAKAMURA MITSUNOBU)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50285342

高田 忠雄 (TAKADA TADAO)

兵庫県立大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：60511699