

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22350072

研究課題名（和文）電極基板に固定された生体高分子のダイナミクス変化を指標とする生体分子検出法の開発

研究課題名（英文）Development of electrochemical detection methods of biomolecules based on dynamics of biopolymer that immobilized on electrode

研究代表者

井上 将彦 (INOUE MASAHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授

研究者番号：60211752

研究成果の概要（和文）：近年、本申請者らは、申請者オリジナルのフェロセン修飾 DNA プローブを用いて電気化学的一塩基多型検出法を報告した。本課題では、電極に固定化したプローブ分子のダイナミクスを指標として、様々な生体重要分子を検出できる電気化学的手法を開発した。その例として、(1) 矩形波ボルタンメトリー中のパルス電位周波数の調整による、挿入・欠損多型の電気化学的検出法を確立した。(2) 新規なフェロセン修飾ペプチドプローブを用いた電気化学的タンパク質検出法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Recently, we have reported an electrochemical single nucleotide polymorphism detection by use of the ferrocene-modified DNA probe. In this study, new electrochemical methods based on dynamics of the probe molecules that immobilized on the electrode were developed in order to detect various biomolecules. For example: (1) We established an electrochemical detection method for insertion/deletion polymorphism by tuning the pulse potential frequency in square-wave voltammetry. (2) We developed an electrochemical protein detection method by using the new ferrocene-modified peptide probes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2012 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：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：SNP / SWV / フェロセン / DNA プローブ / ペプチドプローブ / 挿入多型 / 欠損多型 / 電気化学検出 / 全電極 / 電荷移動

## 1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム・ポストシーケンス時代が到来し、得られたゲノム情報を実際の医薬分野に活用するテーラー・メイド医療の実現に期待が寄せられている。SNPs（一塩基多型）関連

研究をはじめ、プロテオーム、トランスクリプトーム、メタボローム研究が世界中で展開され、我が国においても国家戦略として取り組まれている。これら網羅的解析研究では、核酸・ペプチド（タンパク質）・糖質などの

蛍光検出が主流となっている。しかしながら実際の医療現場、特に「診断」を想定した場合、短時間・高感度・低コスト・手軽さなどの理由により電気化学検出が好ましい。近年この要望に応えるべく、さまざまな生体分子に対して電気化学検出法が精力的に開発されている。本申請者らは、申請者オリジナルの DNA プローブを用いて電気化学的 SNPs 検出法を開発してきた。フェロセンで修飾されたプローブ DNA 二重鎖のダイナミクスに同調させて、方形波ボルタンメトリー測定におけるパルス電位周波数を巧みに設定することで、どのような塩基配列の SNPs でも明確に識別することが可能になった。

## 2. 研究の目的

本課題では、電極上に固定化したプローブ分子が示すダイナミクスを利用した電氣的検出系を、さまざまなターゲットに対して拡張した。これにより、本手法の一般性を樹立することを、本課題における第一の目標とした。

## 3. 研究の方法

研究初年度は、本手法の DNA に対する一般性を検証した。本 DNA プローブを用いて SNPs とは異なる挿入・欠損多型の検出へと展開した。また、特定の DNA 配列に結合する分子の簡便なスクリーニング系の構築を検討した。翌年度以降は、ターゲットを生体重要分子一般に拡張した。プローブの主骨格をペプチドに展開したタンパク質検出系を確立し、本原理を用いた電気化学検出の更なる一般化を検討した。

## 4. 研究成果

本研究では、電極に固定化したプローブ分子のダイナミクスを指標として、様々な生体重要分子を検出できる電気化学的手法を開発した。その例として、(1) DNA 挿入・欠損多型の検出、(2) ペプチドアレイによるタンパク質の検出、の研究成果を以下に記した。

### (1) DNA 挿入・欠損多型の検出

#### (1) ①

SNPs 検出に用いたオリジナルの DNA プローブを利用して、SNPs とは異なる挿入・欠損多型の検出へと展開し、それが可能である事を立証した。野生型の片側の鎖にフェロセンを連結して DNA プローブを作成した(図 1)。この DNA プローブは野生型のターゲット DNA と完全マッチ二重鎖を形成した。一方、欠損型のターゲット DNA と二重鎖を形成すると、プローブ鎖側に一塩基のバルジ構造を生じる。同様に挿入型の場合は、ターゲット鎖側に一塩基バルジを形成した(図 2)。このバルジ構造を有する二重鎖は、野生型との完全マッチ二重鎖と比較して柔軟であり、そのダイナミクスの差を SNPs のときと同じ原理で矩形波ボルタンメトリー (Square-Wave Voltammetry: SWV) から電気化学的に検出することに成功した(図 3)。同一プローブと同一検出原理に、より多様な DNA 多型の検出が可能になったことにより、多型検出の簡便性・汎用性などの側面から非常に大きな進展となった。

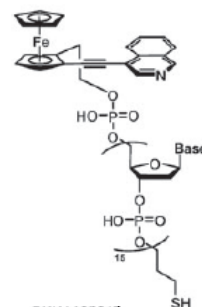


図 1 DNA プローブ

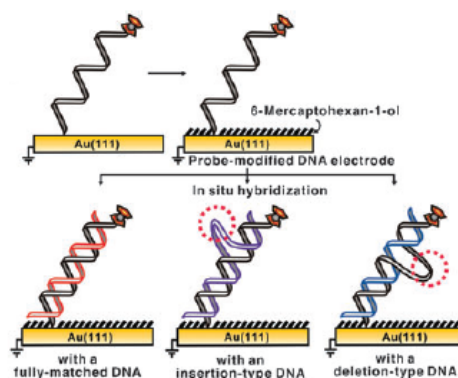


図 2 DNA プローブを修飾した金電極を用いた挿入/欠損多型の電気化学的検出の概略図。点線部位は、一塩基バルジ構造。

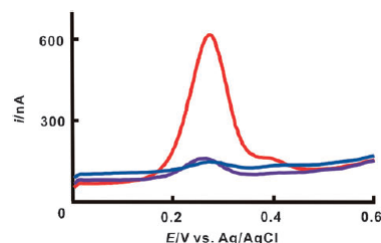


図 3 ターゲット DNA と DNA プローブが形成する二重鎖の SWV による電気化学的検出のグラフ。  
赤線：野生型・DNA プローブ、紫線：挿入型・DNA プローブ、青線：欠損型・DNA プローブ。

(1) — ②

(1) — ① の手法を基盤とし、DNA フラグメントの配列特異的かつ半定量的な検出手法を構築した。この手法を用いて、APOBEC3G が触媒する HIV-1 ゲノム中におけるシトシンの脱アミン化反応の追跡に成功した。本研究の成果をもとに、DNA に対して特異的に結合する新規薬剤候補のスクリーニング系を構築中である。

(2) ペプチドアレイによるタンパク質の検出

(2) — ①

これまで本研究室では、ペプチドのランダム構造を  $\alpha$  ヘリックス構造に効率よく遷移させるクロスリンク分子を開発した。また、フェロセンを主骨格とした非天然アミノ酸 (Faa) の合成を達成し、ペプチド鎖中の任意の位置に導入することに成功した。本研究では、ペプチド鎖の片方の末端をシステインにすることで、金-チオール結合で金電極上に SAM 形成 (ペプチドアレイ) を可能にした。さらに、もう一方の末端に Faa を導入することで、前述のフェロセン連結 DNA プロブと同様な、電気化学活性ペプチドプロブを開発した (図 4)。

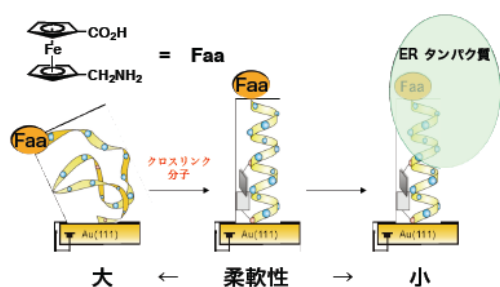


図 4 電極上に固定したフェロセン修飾ペプチドプロブを用いたタンパク質検出手法の概略図

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 17 件)

- 1 Abe, H., Makida, H., and Inouye, M., Improvement of Helix-Forming Ability of Mannoside-Linked Ethynylpyridine Oligomers Constructed by Convergent Synthesis. *Heterocycles*, 86, 955-963, 2012. 査読有り  
DOI: 10.3987/COM-12-S(N)97
- 2 Chiba, J., Shirato, W., Yamade, Y., Kim, B.-S., Matsumoto, S., and Inouye,

M., Furanose Ring Conformations in a 1'-Alkynyl C-Nucleoside and the Dinucleotide. *Tetrahedron*, 68, 9045-9049, 2012. 査読有り  
DOI: 10.1016/j.tet.2012.08.057

- 3 Chiba, J., Kouno, T., Aoki, S., Sato, H., Zhang, J.-Y., Matsuo, H., and Inouye, M., Electrochemical Direct Detection of DNA Deamination Catalyzed by APOBEC3G. *Chem. Commun.*, 48, 12115-12117, 2012. 査読有り  
DOI: 10.1039/C2CC36779C
- 4 Fujimoto, K., Kajino, M., Sakaguchi, I., and Inouye, M., Photoswitchable, DNA-Binding Helical Peptides Assembled with Two Independently Designed Sequences for Photoregulation and DNA Recognition. *Chem. Eur. J.*, 18, 9834-9840, 2012. 査読有り  
DOI: 10.1002/chem.201201431
- 5 Abe, H., Makida, H., and Inouye, M., Development of Convergent Synthetic Method for Saccharide-Linked Ethynylpyridine Foldamers by Huisgen Reaction. *Tetrahedron*, 68: 4353-4361, 2012. 査読有り  
DOI: 10.1016/j.tet.2012.02.069
- 6 Abe, H., Ohishi, Y., and Inouye, M., Concentration- and Time-Dependent Eccentric Changes in Circular Dichroism of Saccharide-Linked Ethynylpyridine Oligomer with Copper(II) Ions. *J. Org. Chem.*, 77: 5209-5214, 2012. 査読有り  
DOI: 10.1021/jo300735j
- 7 Abe, H., Okada, K., Makida, H., and Inouye, M., Formation of Higher-Order Structures of Chiral Poly(ethynylpyridine)s Depending on Size, Temperature, and Saccharide Recognition. *Org. Biomol. Chem.*, 10, 6930-6936, 2012. 査読有り  
DOI: 10.1039/C2OB25816A
- 8 Takashima, S., Abe, H., and Inouye, M., Copper(II)/Phenanthroline-Mediated CD-Enhancement and Chiral Memory Effect on *meta*-Ethynylpyridine Oligomer. *Chem. Commun.*, 48, 3330-3332, 2012. 査読有り

- DOI: 10.1039/C2CC00063F
- 9 Takashima, S., Yamamoto, T., Abe, H., and Inouye, M., Palladium-Catalyzed Selective and Sequential Functionalization of 2,4,6-Trihalopyridine Rings: Synthesis of Ethynylpyridine Polymers Directly Joined with Aza-Crown Ethers. *Heterocycles*, 84, 355-360, 2012. 査読有り  
DOI: 10.3987/COM-11-S(P)62
- 10 Abe, H., Kurokawa, H., Chida, Y., and Inouye, M., Preparation of Ethynylpyridine Macrocycles by Oxidative Coupling of an Ethynylpyridine Trimer with Terminal Acetylenes. *J. Org. Chem.*, 76, 309-311, 2011. 査読有り  
DOI: 10.1021/jo101921e
- 11 Kajino M., Fujimoto K., and Inouye M., Side-Chain Cross-Linked Short  $\square$ -Helices That Behave like Original Proteins in Biomacromolecular Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 656-659, 2011. 査読有り  
DOI: 10.1021/ja106821x
- 12 Inouye, M., Doi, Y., Azuchi, J., Shirato, W., Chiba, J., and Abe, H., Hexamethyldisilazane-Promoted Sonogashira Reaction of Polyfunctionalized N-Containing Heterocycles. *Heterocycles*, 82, 1137-1141, 2011. 査読有り  
DOI: 10.3987/COM-10-S(E)89
- 13 Abe H., Chida Y., Kurokawa H., and Inouye M., Selective Binding of  $D_{2h}$ -Symmetrical, Acetylene-Linked Pyridine/Pyridone Macrocycles to Maltoside. *J. Org. Chem.*, 76, 3366-3371, 2011. 査読有り  
DOI: 10.1021/jo2003055
- 14 Takashima S., Abe H., and Inouye M., Copper(II)-Mediated Chiral Helicity Amplification and Inversion of *meta*-Ethynylpyridine Polymers with Metal Coordination Sites. *Chem. Commun.*, 47, 7455-7457, 2011. 査読有り  
DOI: 10.1039/C1CC12358K
- 15 Abe, H., and Inouye, M., Ethynylpyridine Polymers: Development of Polymeric Hosts for Saccharide Recognition. *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, 68: 112-123, 2010. 査読有り  
dx.doi.org/10.5059/yukigoseikyokaishi.68.112
- 16 Fujimoto. K., Highly Emissive Pyrene-based Fluorophores and Highly Sensitive Fluorescent Sensors Using Pyrene Emission Switching. *Yakugaku Zasshi*, 130, 1283-1287, 2010. 査読有り  
dx.doi.org/10.1248/yakushi.130.1283
- 17 Chiba, J., Akaiishi, A., Ikeda, R., and Inouye, M., Electrochemical Detection of Insertion/Deletion Mutations Based on Enhanced Flexibility of Bulge-Containing Duplexes on Electrodes. *Chem. Commun.*, 46, 7563-7565, 2010. 査読有り  
DOI: 10.1039/C0CC02371J
- [学会発表] (計 30 件)
- 1 Shirato, W., Chiba, J., and Inouye, M., Synthesis and Evaluation of a New Class of Artificial DNA Based on Alkynyl C-Nucleosides with Newly Designed D\*-T\* and G\*-C\* Artificial Base Pairs. The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2012, 11, 15-17, Nagoya (Japan).
- 2 新川貴久, 藤原匡志, 藤本和久, 井上将彦, フェロセンを電気化学的レポーターとする金基板上でのペプチドの挙動解析. 平成24年度有機合成化学北陸セミナー, 2012年10月5-6日, 富山.
- 3 山出雄介, 白土 渉, 千葉順哉, 井上将彦, 天然 DNA とキメラ DNA の二重鎖解析と酵素適用. 日本化学会生体機能関連化学部会 若手の会 第24回サマースクール, 2012年7月27-28日, 福岡.
- 4 足土順一, 千葉順哉, 井上将彦, “パラ”連結型アルキニル人工 DNA の二重鎖形成の評価. 日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会, 2012年6月7-9日, 京都.
- 5 山出雄介, 白土 渉, 千葉順哉, 井上将彦, 部分的にアルキニル人工 DNA を組み込んだキメラ DNA の熱力学安定性と酵素反応の評価. 日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会, 2012年6月7-9

- 日, 京都.
- 6 白土 渉, 千葉順哉, 井上将彦, 三点水素結合様式を持つアルキニルC-ヌクレオシドをモノマーユニットとする人工 DNA のオリゴマー化と相互作用評価. 日本化学会第 9 2 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 横浜.
  - 7 足土順一, 千葉順哉, 井上将彦, 糖連結位置を変えたアルキニルC-ヌクレオチドオリゴマーの合成と物性. 日本化学会第 9 2 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 横浜.
  - 8 青木 駿, 佐藤仁志, 千葉順哉, 河野隆英, 松尾浩, 井上将彦, 電極固定 DNA プローブによる APOBEC3G の活性評価. 日本化学会第 9 2 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 横浜.
  - 9 梶野雅起, 藤本和久, 井上将彦, アミノ末端に構造制御領域を導入したヘリカルペプチドと DNA との相互作用解析. 日本化学会第 9 2 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 横浜.
  - 10 大石雄基, 阿部 肇, 井上将彦, 糖連結エチニルピリジンオリゴマーの銅 (II) イオン添加による円二色性変化. 日本化学会第 9 2 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 横浜.
  - 11 阿部 肇, 河津悠生, 井上将彦, 芳香環-アセチレン骨格を連ねた水素結合性大環状ホスト分子の合成と糖認識機能. 日本化学会第 9 2 春季年会, 2012 年 3 月 25-28 日, 横浜.
  - 12 Shirato, W., Chiba, J., and Inouye, M., Hetero Duplex and Triplex Formation of Artificial DNA Based on Alkynyl C-Nucleosides with Natural DNA. The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2011, 11, 9-11, Sapporo (Japan).
  - 13 佐藤仁志, 千葉順哉, 河野隆英, 松尾浩, 井上将彦, 電気化学応答 DNA プローブによる APOBEC3G 酵素反応の検出. 第 23 回生体機能関連化学部会若手の会サマースクール, 2011 年 7 月 22-23 日, 廿日市.
  - 14 白土 渉, 千葉順哉, 井上将彦, 人工 DNA オリゴマーと天然 DNA オリゴマーの相互作用評価とその高次構造. 平成 23 年度有機合成化学北陸セミナー, 2011 年 10 月 7-8 日, 坂井.
  - 15 阿部 肇, 千田祐資, 井上将彦, 大環状エチニルピリジン分子による二糖の選択的分子認識. シンポジウム モレキュラー・キラリティー 2011 年, 5 月, 20-21 日, 東京.
  - 16 阿部 肇, 高嶋俊輔, 大石雄基, 井上将彦, 銅 (II) イオン添加によるエチニルピリジン分子の高次構造変化. 第 7 回ホスト・ゲスト化学シンポジウム, 2011 年, 5 月, 28-29 日, 東広島.
  - 17 白土 渉, 千葉順哉, 井上将彦, アルキニル C-ヌクレオシドをモノマーユニットとする人工 DNA と天然 DNA から成るヘテロ 2 重鎖の熱力学的評価. 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会, 2011 年 5 月 23-25 日, 東京.
  - 18 足土順一, 千葉順哉, 井上将彦, 三種類の人工核酸塩基を導入したアルキニルC-ヌクレオシドの合成とそのオリゴマー化. 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会, 2011 年 5 月, 23-25 日, 東京.
  - 19 佐藤仁志, 千葉順哉, 河野隆英, 松尾浩, 井上将彦, フェロセン連結 DNA プローブによる APOBEC3G 酵素反応の電気化学的評価. 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会, 2011 年 5 月 23-25 日, 東京.
  - 20 梶野雅起, 藤本和久, 井上将彦, 様々なタンパクをミニチュア化したヘリカルペプチドと DNA との相互作用解析. 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26-29 日, 横浜.
  - 21 藤原匡志, 藤本和久, 井上将彦, 金基板上に固定化したフェロセンラベル化ペプチドの電子移動. 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26-29 日, 横浜.
  - 22 白土 渉, 千葉順哉, 井上将彦, アルキニル C-ヌクレオシドをモノマーユニットとする人工 DNA と天然 DNA の相互作用の検討. 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26-29 日, 横浜.
  - 23 足土順一, 千葉順哉, 井上将彦, 異なる糖連結位置を持つアルキニル C-ヌクレオシドの合成とそのオリゴマー化. 日本化学会第 91 春季年会, 2011 年 3 月 26-29 日, 横浜.

- 24 Fujimoto, K., Kajino, M., Kawai, H., and Inouye, M., Photoregulation of Peptide-DNA Interactions Based on Diarylethene Photochromism. 6th International Symposium on Organic Photochromism, 2010年10月17-21日, Yokohama (Japan).
- 25 藤原匡志, 藤本和久, 井上将彦, 金電極上におけるフェロセンラベル化ペプチドのダイナミクスと電気化学応答. 平成22年度有機合成化学北陸セミナー, 2010年10月8-9日 金沢.
- 26 足土順一, 千葉順哉, 井上将彦, 三種類の人工核酸塩基からなる人工 DNA 二重鎖の構築を目指した新規アルキニル C-スクレオシドの合成. 平成22年度有機合成化学北陸セミナー, 2010年10月8-9日, 金沢.
- 27 井上将彦, 電極上に固定化された DNA のダイナミクスとパルス電位周波数の同調に基づく遺伝子多型の検出 (特別講演). 甲南大学講演会, 2010年9月8日, 神戸.
- 28 梶野雅起, 藤本和久, 井上将彦, “ミニチュア化タンパク”としての架橋ヘリカルペプチドと DNA の相互作用. 第4回バイオ関連化学シンポジウム, 2010年9月24-26日, 豊中.
- 29 藤原匡志, 藤本和久, 井上将彦, 金基板上に固定化したフェロセンラベル化ペプチドとその電気化学応答との関係. 第4回バイオ関連化学シンポジウム, 2010年9月24-26日, 豊中.
- 30 阿部 肇, 千田祐資, 井上将彦, ピリジン環の分極を利用した大環状化合物の選択的合成. 第21回基礎有機化学討論会, 2010年9月9-11日, 名古屋.

[図書] (計2件)

- 1 Chiba, J., and Inouye, M., Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids, Egli, M., and Herdewijn, P. Eds.: WILEY-VCH, pp 135-158, 2012.
- 2 藤本和久, 井上将彦, フォトクロミックペプチドによる生体動的機能の光制御. 「フォトクロミズムの新展開と光メカニカル機能材料」入江正浩, 関隆広監修, 330-337, シーエムシー, 東京, 2011.

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

名称: 高蛍光量子収率型疎水性プローブ、それを用いる生体高分子検出法ならびに生体高分子間相互作用検出法

発明者: 井上将彦, 藤本和久, 清水久夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4929461 号

取得年月日: 24年2月24日

国内外の別: 国内

名称: 蛍光性分子のモノマー発光とエキシマー発光のスイッチングを利用した分子ビコンを用いる DNA 検出法

発明者: 井上将彦, 藤本和久, 清水久夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4397659 号

取得年月日: 22年4月14日

国内外の別: 国内、国外 (フランス、ドイツ、イギリス)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 将彦 (INOUE MASAHIKO)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・教授

研究者番号: 60211752

(2) 研究分担者

阿部 肇 (ABE HAJIME)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・准教授

研究者番号: 10324055

藤本 和久 (FUJIMOTO KAZUHISA)

九州産業大学・工学部・准教授

研究者番号: 40334718