

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401
 研究種目：若手研究B
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23750090
 研究課題名（和文）発光性希土類金属錯体の鋳型特異的形成を利用した酵素フリー高感度遺伝子解析法の開発
 研究課題名（英文）Development of enzyme free sensitive gene detection system based on template-directed formation of luminescent lanthanide complexes
 研究代表者
 北村 裕介 (KITAMURA YUSUKE)
 熊本大学・大学院自然科学研究科・助教
 研究者番号：80433019

研究成果の概要（和文）：

代表的な発光性希土類金属錯体のリガンドは、コンプレキサン型の金属捕捉部位、並びに光増感部位から構成されている。本研究では、この両部位を別々のオリゴヌクレオチド (ODN) 末端に修飾し、それぞれ金属補足プローブ、光増感プローブとする。これらプローブが標的 DNA へハイブリダイゼーションした際、それぞれの修飾部位が近接するように配列を設計すると、標的 DNA 存在下のみ Tb(III) や Eu(III) が効果的に発光することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

We present the facile technique of colorimetric SNP (single nucleotide polymorphism) analysis through DNA-templated cooperative complexation between a luminescent lanthanide ion (Ln(III): Tb(III) or Eu(III)) and two ODN (oligodeoxyribonucleotide) conjugates carrying a metal chelator. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) and 1,10-phenanthroline (phen) were covalently attached to ODNs to form conjugates for application as capture and sensitizer probes. The sequences of the conjugates were designed so as to form a ternary tandem duplex with the target, where their auxiliary units face each other, providing a microenvironment to accommodate Ln(III). The characteristic emissions of the Tb(III) and Eu(III) ions were clearly observed in the presence of the full-matched target DNA. On the other hand, the emissions from the mixed solutions with the mutant containing one base displacement were marginal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：生体分析、核酸プローブ、遺伝子解析、希土類金属錯体、SNPs

1. 研究開始当初の背景

高い確率（人口の 1%以上）で見られる遺伝子内での一塩基の個体差を一塩基多型 (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) という。SNPs は個人の体質、疾病易罹患性、薬剤感受性等を識別する重要な遺伝子マーカーとして考えられている。現在、溶液ハイブリダイゼーション法をベースにした様々な SNPs のスクリーニング戦略が試みられて

いるが、代表的な手法では、酵素反応（増幅、伸張、連結、切断）を利用しているため操作が煩雑である。また、マイクロアレイ、プレートリーダー、質量分析装置、PCR、シーケンサー等の分析装置は高価な上、熟練技術者がその操作およびデータ解析を行う必要があり、特定の医療機関でしか診断が行えない。

2. 研究の目的

遺伝情報を簡便かつ迅速に解析するために「ハイスループットで酵素フリーな高感度 SNPs 解析システムの構築」を目的とする。ラベル化剤として発光性希土類金属に着目し、プローブを設計した。

3. 研究の方法

代表的な発光性希土類金属錯体のリガンドは、コンプレキサン型の金属捕捉部位、並びに光増感部位から構成されている。本研究では、この両部位を別々のオリゴヌクレオチド (ODN) 末端に修飾し、それぞれ金属補足プローブ、光増感プローブとする。Fig. 1 に示すようにこれらプローブは標的 DNA にハイブリダイゼーションした際、それぞれの修飾部位が近接するように配列を設計した。ここで、自発的に修飾部位同士が連結、脱離するような反応を取り入れれば、標的 DNA 上のみ特異的に完全な錯体を合成することができる。用いた連結反応としては、プロテインスプライシング反応に着目した。設計した 2 種の ODN プローブの修飾部位と ODN を結ぶリンカーには、同反応に必須なオリゴペプチドユニットを用いた。

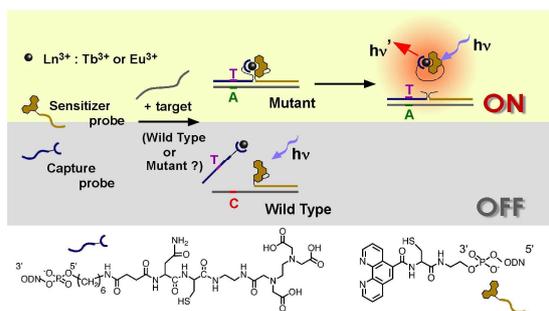


Fig. 1. Schematic illustration of DNA-templated formation of lanthanide complex.

また、それとは別に、ステムループ型の ODN の両末端にそれぞれ光増感剤と金属捕捉剤を修飾したデバイスを合成した。Fig. 2 に示すようにステムループ構造を形成している

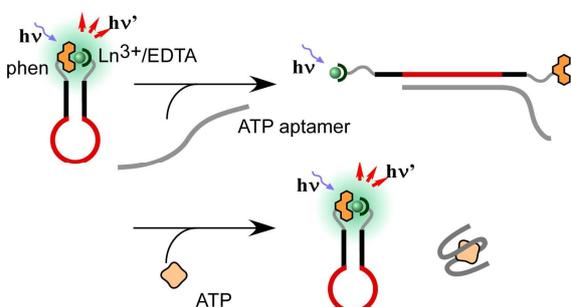


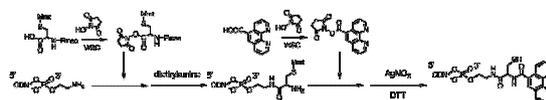
Fig. 2. Schematic illustration of the ATP sensor based on a lanthanide complex molecular beacon (LCMB).

際には、両部位が近接するため、希土類金属錯体からの発光が得られると考えられる。と

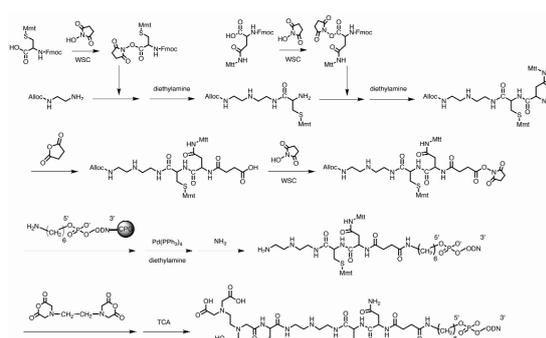
ころが、相補的な DNA との二本鎖形成によってステムループ構造が開環するように設計しておけば、それにともない両部位が離れるため、発光がオフになると考えられる。つまり、モレキュラービーコンプローブと逆の発光・消光挙動を示すデバイスとなることが期待される。

4. 研究成果

光増感剤としてはフェナントロリン (phen) を、金属捕捉部位としては EDTA を用いた。リンカー部位にシステインを導入した phen 修飾プローブを合成した (Scheme 1)。また、リンカー部位にシステインとアスパラギンを導入した EDTA 修飾プローブを合成した (Scheme 2)。これらのプローブに対して、標的 DNA を添加すると、Fig. 2 に示すようにキレート部位同士が近接することによって、Tb (III) や Eu (III) が効果的に発光することがわかった。



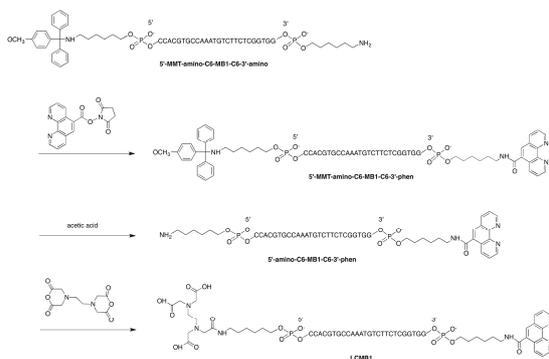
Scheme 1. Synthesis of phen-modified probe



Scheme 2. Synthesis of EDTA-modified probe

ステムループ型デバイスは Schem 3 に従って合成した。Fig. 3 に示すようにこのデバイスも希土類金属と錯形成し、典型的な、Tb (III) や Eu (III) の発光を示すことがわかった。ここに相補鎖を加えると、発光強度が 5 分の 1 程度まで減少することがわかった。つまり、同デバイスは開環構造、閉環構造に応じて、可逆的に希土類金属錯体の発光を制御できるツールとなることがわかった。

デバイスのループ部分に相補的な配列とある種のアプタマー配列を有するインターフェースを用いてデバイスを開環した。ここで、デバイスとインターフェースとの二本鎖形成とインターフェースと標的分子の複合体形成が排他的な関係となるように系を設



Scheme 3. Synthesis of LCMB.

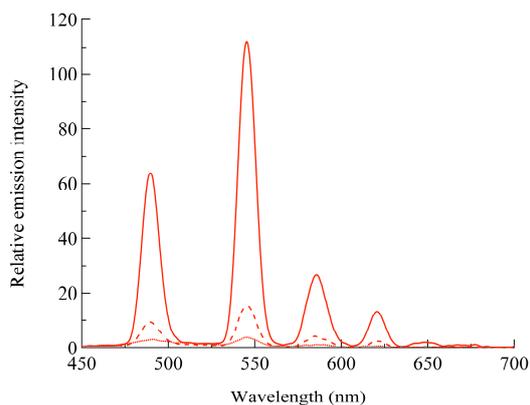


Fig. 3. Time-resolved emission spectra of the solutions containing two ODN probes with (full match: solid line, mismatch: dashed line) or without (dotted line) targets in presence of Tb^{3+} at 30 °C. The excitation wavelength was 280 nm. Concentrations of the probes, targets and Tb^{3+} added in the buffered solution (10 mM HEPES containing 1.0 M NaCl, pH 7.0) were all 1.0 μ M. Delay: 50 μ s; window time: 2 ms; emission and excitation slit: 10 nm.

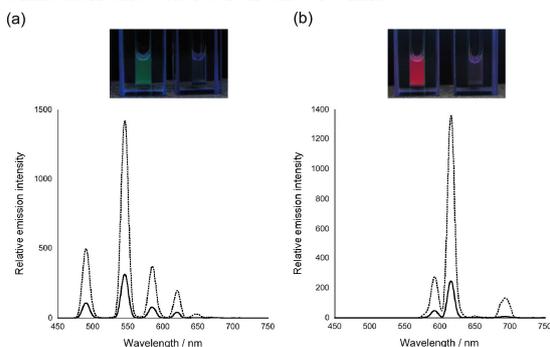


Fig. 4. Time-gated emission spectra ($\lambda_{ex} = 280$ nm) of solutions containing LCMB with (solid curve) and without (dashed curve) complementary DNA in the presence of (a) $Tb(III)$ or (b) $Eu(III)$. Measurements were carried out in buffered solution (10 mM HEPES containing 50 mM NaCl, pH 7.0) at 0 °C. Concentrations of LCMB and Ln(III) were 1.0 μ M, and that of complementary DNA was 5.0 μ M. Delay time: 50 μ s; gate time: 2.0 ms. Inset: Luminescence images of solutions of Ln(III)-LCMB (left) and Ln(III)-LCMB1 + complementary DNA (right) at 5 °C. Excitation source: low-pressure mercury lamp (6 W).

計しておく。よって、標的となる分子を加え

ると、標的とアプタマーの複合体形成にともない、アプタマーとデバイスが形成する二本鎖が解離し、デバイスが再び閉環構造となることが予想される。実際 ATP アプタマー配列を有するインターフェース (iATP) を用いて同様の実験を行ってみると、Fig. 5 に示すように ATP 特異的なシグナルを得ることができた。標的分子に応じたアプタマーを準備することで同デバイスはユニバーサルな分子センサーとなることが期待される。

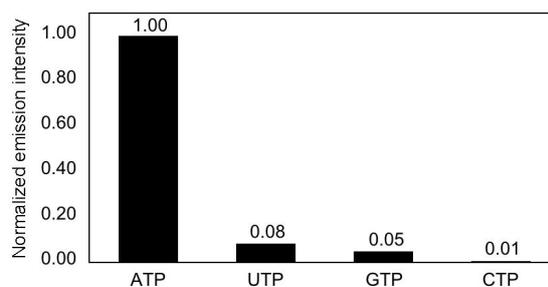


Fig. 5. Normalized emission intensities at 611 nm of solution containing $Eu(III)$ -LCMB/iATP in the presence of 20 μ M NTPs. Concentrations of LCMB/iATP and $Eu(III)$ were 1.0 and 5.0 μ M, respectively. The measurements were carried out in a 10 mM HEPES buffer containing 100 mM NaCl and 5 mM $MgCl_2$ (pH 7.0). Excitation wavelength was 280 nm. Delay time and gate time were 50 μ s and 2.0 ms, respectively.

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 3 件)

- ① Y. Kitamura, S. Yamamoto, Y. Osawa, H. Matsuura and T. Ihara, (Versatile allosteric molecular devices based on reversible formation of luminous lanthanide complexes), *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 285-287. フルペーパー・査読有. DOI: 10.1039/C2CC36979F
- ② T. Ihara, and Y. Kitamura, (スプリット型プローブの協同的金属錯体形成を利用する DNA の認識及び検出), *BUNSEKI KAGAKU*, **61**, 193-206 (2012). フルペーパー・査読有. DOI: 10.2116/bunsekikagaku.61.193
- ③ T. Ihara, and Y. Kitamura, (Photochemically relevant DNA-based

molecular systems enabling chemical and signal transductions and their analytical applications), *J. Photoch. Photobio. C*, **13**, 148-167 (2012). 総説・査読有. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.03.031.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 北村裕介、戸田健太郎、富森 岳、千喜良誠、井原 敏博、(ルテニウム-白金混合錯体の鑄型特異的形成離脱を利用した遺伝子解析法の開発)、日本化学会第93春季年会、2013年03月22日~ 25日、立命館大学 (滋賀県)
- ② Yusuke Kitamura, Shikinari Yamamoto, Yuka Osawa, Toshihiro Ihara, (Versatile molecular devices based on the reversible formation of luminous lanthanide complexes)、第39回国際核酸化学シンポジウム、2012年11月15日~ 17日、名古屋大学 (愛知県)
- ③ 北村裕介、(金属錯体の特異的な形成および相互作用を利用した新規核酸プローブの開発)、日本分析化学会第61年会、2012年9月19日~ 21日、金沢大学 (石川県)
- ④ 北村裕介、山元識生、大澤由佳、井原敏博、(可逆的に形成する希土類金属錯体を基体としたアロステリック分子センサーの開発)、日本分析化学会第61年会、2012年9月19日~ 21日、金沢大学 (石川県)
- ⑤ Yusuke Kitamura, Shikinari Yamamoto, Mayumi Yamamoto, Yusuke Tsujimura, and Toshihiro Ihara, (Cooperative formation of luminescent lanthanide complexes by metal chelator-DNA conjugates and their application to biosensors)、11th European Biological Inorganic Chemistry Conference, 2012年9月12日~ 16日、グラナダ (スペイン)

- ⑥ 北村裕介、戸田健太郎、富森岳、波多江智弘、三田聡司、千喜良誠、井原敏博、(DNA上での脱離型二核錯体形成反応を利用した遺伝子解析法の開発)、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月6日~8日、北海道大学 (北海道)
- ⑦ Yusuke Kitamura, Shikinari Yamamoto, Yuka Osawa, Toshihiro Ihara, (Versatile molecular beacons based on the reversible formation of luminous lanthanide complexes), The Second Asian Chemical Biology Conference)、2012年7月4日~6日、サザンビーチホテル & リゾート (沖縄県)
- ⑧ 北村裕介、山元識生、辻村祐輔、山本真優美、大澤由佳、井原敏博、(金属配位基を有するDNAプローブの協同的複合体形成を利用した遺伝子解析、第72回分析化学討論会、2012年5月19~ 20日、鹿児島大学 (鹿児島県))
- ⑨ 北村裕介、山本飛鳥、田中毅志、上野正義、千喜良誠、(金属配位子存在下における8-17デオキシリボザイムの切断活性)、第61回錯体化学討論会、2011年9月17~ 19日、岡山理科大学 (岡山県)
- ⑩ 北村裕介、山本飛鳥、田中毅志、上野正義、千喜良誠、(金属配位子共存下における8-17DNAzymeの切断活性)、第5回バイオ関連化学シンポジウム、2011年9月12~ 14日、エポカルつくば (茨城県)
- ⑪ Yusuke Kitamura, Takeshi Tomiori, Kentaro Toda, Satoshi Mita, and Makoto Chikira, (Development of gene probes based on DNA-templated formation of platinum-ruthenium dinuclear complexes), 15th International Conference on Biological Inorganic

Chemistry, 2011年8月7日～ 12日、バン
クーバー (カナダ)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北村 裕介 (KITAMURA YUSUKE)
熊本大学・大学院自然科学研究科・助教
研究者番号 : 80433019