

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34506

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24350089

研究課題名(和文) グラフェンナノ表面における核酸の定量解析と核酸結合リガンド選択システムの構築

研究課題名(英文) Quantitative analysis of DNA on GO nanosurface and development of DNA binding ligand screening system

研究代表者

三好 大輔 (Miyoshi, Daisuke)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：50388758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：単層の炭素からなるグラフェン酸化物(GO)は、高感度でかつ小型のセンサー構築に適したナノマテリアルである。しかし、生体分子とGOの結合特性やGO表面における生体分子の分子物性は明らかにされておらず、GOを用いたバイオセンサーを合理設計する指針が存在しない。そこで本研究では、(1)GO表面にみられる非理想状態におけるDNAの分子物性を解析し、(2)DNAのGO表面に対する吸着機構を熱力学的・速度論的に提唱した。さらに、得られた知見を用いて、(3)DNA四重らせん構造を対象にしたセンシングリガンドを開発し、それを用いたスクリーニングシステムを構築した。

研究成果の概要(英文)：Graphene oxide (GO) is widely used in biosensors, because GO can absorb a fluorophore-labeled DNA and efficiently quench the fluorescence. However, the adsorption process remains unclear yet.

In this study, we have studied the following topics. (1) Properties of various DNA structures in non-ideal conditions, as observed in the GO nanosurface: It was found that hydration state of DNA strands was critically important for structure and thermodynamic stability of DNAs under non-ideal conditions. (2) The adsorption mechanism of DNA onto GO nanosurface: We studied thermodynamically and kinetically the mechanism, and found that the binding affinity of DNA was independent of the DNA structure but kinetics was largely depending on the structure. (3) Development of sensing ligands and screening systems for DNA G-quadruplexes: We found ThT, a typical fluorescence probe for protein fibril, was able to bind specifically to DNA G-quadruplex with bright fluorescence signals.

研究分野：分子設計化学

キーワード：グラフェン DNA 熱力学的解析 速度論的解析 テロメア 四重らせん構造 リガンド バイオセンサ

1. 研究開始当初の背景

グラフェンは作製可能なシート状の材料の中で最も薄く、バルク部分がないため、グラフェンの表面への分子吸着がグラフェンの物性に与える影響が他のナノ材料よりも格段に大きい。そのためグラフェンは、高感度でかつ小型のセンサー構築に適した材料である。グラフェンを用いたバイオセンサーは、グラフェン酸化物(以下 GO と記す)を用いる場合が多い。GO は、グラファイト単結晶粉末を化学的に酸化させ、グラファイトにカルボニル基やヒドロキシル基等を付加することで作製する(図1)。

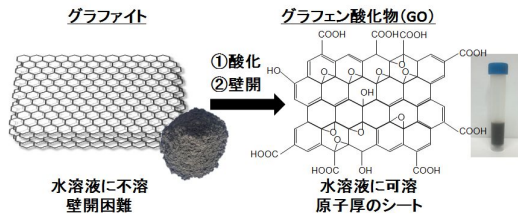


図1. グラファイトとグラフェン酸化物の化学構造と作製したGO

その結果、GO ナノ表面は広い平面と負電荷を有することとなり、水溶液中で様々な分子を吸着する。蛍光分子がGO表面に吸着すると、蛍光が消光する。GOへの吸着に伴って、蛍光色素化合物、蛍光タンパク質、さらには量子ドットの蛍光が消光されることが報告されている。この特性を用いると、GOを広範な標的分子に対するセンシングシステムとして活用できる(図2)。まず、蛍光ラベルした標識分子をGOに吸着させることで、高効率な蛍光消光が導かれる。ここに標識分子と結合する分子(標的分子)を添加すると、蛍光標識分子と標的分子が複合体を形成し、GOからの解離が誘起される。これにより、蛍光消光が解消する。

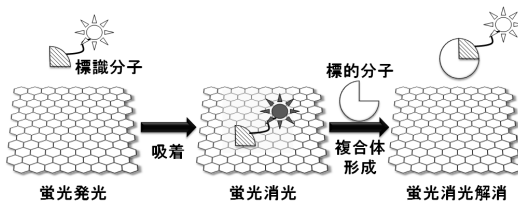


図2. GOを用いたセンシングシステム

GOを用いてバイオ分子をより高感度に検出するためには、GOナノ表面における生体分子の挙動に関する定量的な知見が必要である。しかし、標識分子 GO、標的分子 GO、複合体 GO、標識分子 標的分子の結合特性の定量的解析は全く行われておらず、そのGOを用いたバイオセンサーを合理設計する指針が存在しない。そのため、GOナノ表面における生体分子の吸着と脱着に関する熱力学的・速度論的解析が必要とされている。さら

に、GO表面は、通常の実験で用いられる希薄溶液環境(≒理想溶液)とは全く異なる分子環境にある。そのため、GO表面での生体分子の物性解明のためには、非理想状態を模倣し、その実験系で生体分子の物性を定量解析する必要がある。

2. 研究の目的

そこで本研究では、以下の三点を目的として検討を進めた。

(1) GOナノ表面にみられる非理想溶液中でのDNA物性解析: 固体表面は希薄溶液のような理想状態とは全く異なった分子環境にある。例えば、吸着した分子は、表面上で非常に高密度に存在することになる。また、吸着した分子の活量も溶液内に存在する場合に比べ低下する。そこで、非理想状態を惹起する化学的因子がDNAの物性に及ぼす効果を検討する。このような定量解析は、GOナノ表面でのDNAの構造や熱力学的安定性の解明に有用である。

(2) GOナノ表面とDNAの吸着挙動の熱力学的・速度論的解明: 固体表面における生体分子の定量解析方法は極めて限定されている。そこで熱力学的・速度論的諸量を算出する方法論を確立し、吸着挙動の分子機構を検討することを試みる。

(3) DNA四重らせん構造を対象にしたセンシングシステムとスクリーニングシステムの構築: テロメアDNAは四重らせん構造とよばれる非標準的な高次構造を形成し、細胞の加齢やがん化に関与している。そこで、本申請課題の展開研究として、上記の目的達成の中で得られた知見を活用することで、DNA四重らせん構造に特異的に結合できる分子の探索やDNA四重らせん構造の検出システムを構築する。

3. 研究の方法

GOは粉体のグラフェンを酸化するHammer法により作製した。作製したグラフェンは、超音波処理と遠心分離後の上清を用いることで、不溶成分や凝集体を除去した。GOの水溶性を担保するために、一辺が数十ナノメートル程度の比較的小さなものを調整し、原子間力顕微鏡により確認した。

用いたDNAは、定法に従い固相合成したものを精製した。DNAは目的に従って様々な二次構造を形成するように設計した。

非理想状態を化学的に模倣するために、様々な合成高分子を用いた。様々な分子量や官能基を有する合成高分子を用いることで、DNAの構造や熱力学的安定性に及ぼす非理想性を誘起する化学因子の効果を定量した。

測定に関しては、主に分光学的な方法を用いた。熱力学的諸量は、温度変化に伴うDNAや複合体の解離挙動を測定し、カーブフィッ

ト法により算出した。速度論的解析には、迅速混合装置 (Stopped flow) を用いた。

4. 研究成果

上記の研究目的別に得られた成果を記す。

(1) GO ナノ表面にみられる非理想溶液中での DNA 物性解析：これまでに申請者らは、DNA が分子環境に依存して多様な高次構造を形成し、遺伝子発現の制御などに関与していることを報告してきた。特に、グアニンに富んだ DNA 鎖が形成する四重らせん構造は、GO 表面で見られるような分子濃度が高い溶液環境で安定化することを見出している。そこで、実際に細胞内に存在し、細胞のがん化や加齢に関与しているグアニンに富んだ長鎖 DNA であるテロメアの構造安定性を非理想条件下で検討した。その結果、長鎖テロメア DNA が四重らせん構造を一つのユニットとする数珠の様な高次構造を形成することを見出した (J. Am. Chem. Soc. 2012)。本成果は、発表雑誌の表紙として掲載され (図 3)、注目の論文として米国化学会誌で解説されるなど注目を集めた。

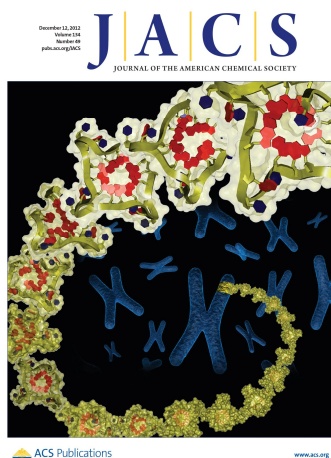


図 3. 長鎖テロメアの数珠構造



図 4. ループ部分の重要性

この詳細を検討したところ、四重らせん構造のループ領域が水和状態に影響することで、非理想状態における DNA 構造の熱力学的安定性に決定的な役割を果たすことを示された (図 4)。このような水和に関する知見は、非理想環境にある GO 表面における生体分子の基礎的知見としても重要である。さらに、様々な物性をもつ合成高分子を用いて非理想状態を誘起したところ、DNA の非標準構造である三重らせん構造が特異的に安定化されることも分かった。これを用いることで、センシングシステムの高感度化もが可能となった (J. Phys. Chem. B 2013)。

(2) GO ナノ表面と DNA の吸着挙動の熱力学的・速度論的解明：DNA と GO を用いたバイオセンサーでは、DNA の構造に依存した GO との親和性を利用するものが多い。われわれも、このような構造変化を利用した GO バイオセンサーを構築している (Small 2014, Analyst 2012)。このように、GO との親和性に及ぼす DNA の構造の効果を定量することは、バイオセンサーの合目的設計に必要である。様々な構造を形成する DNA を設計し、GO との親和性を定量したところ、DNA と GO の親和性は DNA の二次構造にほとんど依存しないことが示された。一方で、速度論的解析の結果からは、DNA の二次構造が GO への吸着速度に大きく影響することが示された。さらに、GO 表面で DNA の構造は変性し解離している可能性が示された (図 5)。その結果、見かけの親和性が二次構造に依存しないことが考えられる。本成果は、平成 25 年度化学・生物素材研究開発奨励賞に選ばれ、BioJapan 2013 World Business Forum で紹介されるなど、社会的希求性の高いものであるといえる。

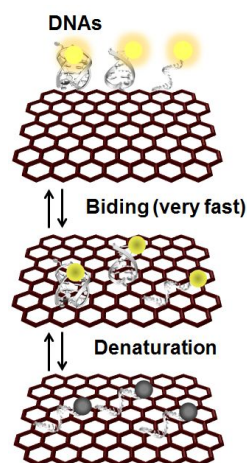


図 5. DNA の吸着機構

(3) DNA 四重らせん構造を対象にしたセンシングシステムとスクリーニングシステムの構築：上述のように DNA 四重らせん構造を特異的に識別できる分子の開発や、それを用いたセンシングシステムは、様々な医用展開

が可能である。我々は、タンパク質フィブリルの蛍光フロー部であるチオフラビン T (ThT) が DNA 四重らせん構造と結合し、蛍光量子収率を 700 倍も高めることを見出した。興味深いことに、ThT は DNA の他の構造に対しては全く蛍光を発しないことも示された (Biochemistry 2012)。さらにセンシングシステムの細胞内展開を検討し、細胞内環境でも機能するリガンドの設計指針を得た (J. Phys. Chem. B)。本成果は、GO 表面や細胞内部など非理想状態における分子設計指針を世界に先駆けて提唱するものとして注目され、当該雑誌の表紙に採用された (図 6)。また、テロメア DNA や、テロメア DNA を伸長する酵素であるテロメラゼの活性を検出できるセンサーも開発した (Sensors 2015 等)。



図 6 . 非理想状態における分子設計指針

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 26 件)

1 . Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Daisuke Miyoshi, and Naoki Sugimoto, A mRNA-Responsive G-Quadruplex-Based Drug Release System, *Sensors*, 15, 9388-9403 (2015). doi: 10.3390/s150409388 査読有

2 . Haiwei Ji, Yijia Guan, L Wu, Jinsong Ren, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto Xiaogang Qu, A fluorescent probe for detection of an intracellular prognostic indicator in early-stage cancer, *Chem. Commun.*, 51, 1479-1482 (2015) doi: 10.1039/c4cc08789e 査読有

3 . Daisuke Miyoshi, Yu-mi Ueda, Naohiko Shimada, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Atsushi Maruyama, Drastic stabilization of parallel DNA hybridizations by a polylysine comb-type copolymer with hydrophilic graft chain, *ChemMedChem*, 9, 2156-2163 (2014) doi: 10.1002/cmdc.201402157 査読有

4 . 三好大輔, 上田侑美, グラフェンと生体分子を用いたバイオセンサー バイオサイエンスとインダストリー, 72, 117-120 (2014) http://www.jba.or.jp/pc/archive/2014/vol72_no2.html. 査読無

5 . Li Wu, Jiasi Wang, Meili Yin, Jinsong Ren, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto, Xiaogang Qu, Reduced Graphene Oxide Upconversion Nanoparticle Hybrid for Electrochemiluminescent Sensing of a Prognostic Indicator in Early-Stage Cancer, *Small*, 10, 330-336 (2014) doi: 10.1002/smll.201301273 査読有

6 . Shu-ichi Nakano, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto, Effects of Molecular Crowding on the Structures, Interactions, and Functions of Nucleic Acids, *Chem. Rev.*, 114, 2733-2758 (2014) (Highlighted as a part of the cover) doi: 10.1021/cr400113m 査読有

7 . Valerie Gabelica, Ryuichi Maeda, Takeshi Fujimoto, Hidenobu Yaku, Takashi Murashima, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi, Multiple and cooperative binding of fluorescence light-up probe Thioflavin T with human telomere DNA G-quadruplex, *Biochemistry*, 52, 5620-5628 (2013) doi: 10.1021/bi4006072 査読有

8 . Takeshi Fujimoto, Shu-ichi Nakano, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi, Thermodynamics - Hydration Relationships within Loops that Affect G-Quadruplexes under Molecular Crowding Conditions, *J. Phys. Chem. B* (Highlighted as the cover), 117, 963-972 (2013) doi: 10.1021/jp308402v 査読有

9 . Bailu Xu, Chuanqi Zhao, Weili Wei, Jinsong Ren, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto, Xiaogang Qu, Aptamer carbon nanodot sandwich used for fluorescent detection of protein, *Analyst*, 137, 5483-5486 (2012) doi: 10.1039/c2an36174d 査読有

10 . Haiqing Yu, Gu Xiaobo Gu, Shu-ichi Nakano, Daisuke Miyoshi, Naoki Sugimoto, The beads-on-a-string structure of long telomeric DNAs under molecular crowding conditions, *J. Am. Chem. Soc.* (Highlighted as the cover and introduced in the Spotlights on Recent JACS Publications), 134, 20060-20069 (2012) doi: 10.1021/ja305384c 査読有

〔学会発表〕(計63件)

1. 三好大輔、細胞内分子クラウディング環境で安定化する DNA の非標準構造、医学研セミナー、東京都医学総合研究所(東京) 2015年5月8日(招待講演)

2. 上田侑美、造住有輝、杉本直己、三好大輔、脱ワトソン-クリックの核酸化学(13): 様々な二次構造を形成した DNA とグラフェン酸化物の吸着挙動の速度論的解析、日本化学会第95春季年会(2015)、日本大学(千葉) 2015年3月28日

3. Daisuke Miyoshi、Structural polymorphism of DNA induced and regulated by molecular crowding National Univ. of Kaohsiung Seminar、National University of Kaohsiung (Kaohsiung, Taiwan) 2015年1月6日(招待講演)

4. 三好大輔、細胞内分子環境でも機能する分子の合理設計指針、第3回 エキゾチック自己組織化材料シンポジウム、鳥取大学工学部(鳥取) 2014年12月18日(招待講演)

5. Daisuke Miyoshi、Non-canonical DNA structures under molecular crowding conditions、School of Physics & Mathematical Science Seminar, Nanyang Technological University (Singapore) 2014年12月14日(招待講演)

6. 上田侑美、岩木研太、杉本直己、三好大輔、様々な二次構造をもつ DNA とグラフェン酸化物の吸着機構の解明、第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学(岡山) 2014年9月12日

7. 前田龍一、中林孝和、村嶋貴之、杉本直己、三好大輔、核酸四重らせん構造リガンドの新規スクリーニングシステムの開発 日本ケミカルバイオロジー学会 第9回年会、大阪大学(大阪) 2014年6月12日

8. 上田侑美、杉本直己、三好大輔、生命分子の挙動に及ぼす分子環境の効果(58) 様々な二次構造をもつ DNA とグラフェン酸化物の吸着挙動に関する速度論的解析、第94回日本化学会春季年会、名古屋大学(名古屋) 2014年3月28日

9. 三好大輔、細胞内外で機能する核酸分子の設計開発、日本生物工学会 第104回醗酵学懇話会、辰馬本家酒造株式会社(兵庫) 2014年2月13日(招待講演)

10. 三好大輔、上田侑美、藤本健史、杉本直己、グラフェン酸化ナノ界面における DNA の挙動を解明する、第16回生命化学研究会、KKR ホテル熱海(熱海) 2014年1月9

日

11. 三好大輔、DNA-グラフェン相互作用の定量解析による新規バイオセンシングプラットフォームの開発、BioJapan 2013 World Business Forum、パシフィコ横浜(横浜) 2013年10月9日(招待講演)

12. Daisuke Miyoshi、Takeshi Fujimoto、Shu-ichi Nakano、Naoki Sugimoto、Stability-hydration relationship of nucleic acid structures regulated by non-base paired regions、The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry、名古屋大学(名古屋) 2012年11月16日

13. 藤本健史、中野修一、杉本直己、三好大輔、DNA のグラフェン酸化物からの脱着機構の検討、第6回バイオ関連化学シンポジウム、北海道大学(北海道) 2012年9月7日

14. Takeshi Fujimoto、Shu-ichi Nakano、Naoki Sugimoto、Daisuke Miyoshi、Roles of DNA structure on DNA adsorption and desorption、XX Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, Montreal (Canada) 2012年8月7日

15. 三好大輔、テロメア DNA の構造安定性とテロメラーゼ酵素の機能、ナノとバイオの最先端研究セミナー、九州大学(福岡) 2012年5月7日(招待講演)

〔図書〕(計1件)

1. Daisuke Miyoshi、Takeshi Fujimoto、Naoki Sugimoto、Chapter 5, Molecular Crowding and Hydration Regulating of G-Quadruplex Quadruplex Nucleic Acids (Springer), 330, 87-110 (2013).

〔産業財産権〕

出願状況(計6件)

1. 名称: テロメラーゼ活性測定方法
発明者: 夜久英信、三好大輔
権利者: パナソニック株式会社
種類: 特許
番号: PCT/JP2014/004080
出願年月日: 2014年8月5日
国内外の別: 国内

2. 名称: 核酸鎖の四重螺旋構造の検出方法
発明者: 三好大輔、前田龍一
権利者: 学校法人甲南学園
種類: 特許
番号: 2013-199029
出願年月日: 2013年9月25日
国内外の別: 国内

3. 名称: Method for detecting formation

of G-quadruplex
発明者： Daisuke Miyoshi
権利者： Panasonic Corporation
種類：特許
番号： US8691589 B2
出願年月日： 2013 年 5 月 22 日
国内外の別： 国外

取得状況（計 3 件）

1. 名称： G-q u a d r u p l e x 形成を
検出する方法
発明者： 三好 大輔
権利者： パナソニック株式会社
種類：特許
番号： 5216943
出願年月日： 2012 年 6 月 15 日
取得年月日： 2013 年 3 月 8 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

報道関連情報

1. 神戸新聞 2015 年 6 月 6 日 「がん細胞内
だけで薬放出」

2. 日刊工業新聞 2015 年 5 月 22 日 「四重
らせん構造 DDS がん治療の副作用軽減」

3. 日刊工業新聞 2014 年 7 月 14 日 「DNA
の特殊構造形成 甲南大・東工大が解明」

4. 米国化学会誌 2012 年 12 月 12 日
Spotlights on Recent JACS Publications
“Telomeres: Like beads on a string”

アウトリーチ活動

1. 新聞各社等に研究成果をリリースし掲載
されるなど社会的反響を得た（計 4 件、上記
の通り）。

2. 高校生対象の模擬実験や模擬講義の際に
科研費とその成果を説明した。

3. 一般社会向け展示会（2012 年イノベーシ
ョン関西、2013 年 BioJapan 2013 World
Business Forum）で研究成果を説明した。

ホームページ

<http://www.pi.konan-u.ac.jp/miyoshi/>

研究成果データベース

http://www.konan-first.jp/database/admin/search.php?keyword=&author=14&from_year=0&to_year=0&searchEssay=%E6%A4%9C%E7%B4%A2&hideInfo=essay#resultList

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 大輔 (Daisuke Miyoshi)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・
教授

研究者番号： 50388758

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし