

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 9 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656499

研究課題名(和文)電気化学的グルコースセンサーとアプタマーのナノ構造変化を利用した検出法の開発

研究課題名(英文)Detection system using electrochemical glucose sensor system and the change of nano-structure of aptamers

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)・教授

研究者番号：70251494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：GDHとVEGFに結合するアプタマーを連結し、その連結アプタマーとGDHを結合させたGDH-アプタマー複合体を作製し、AFMによりこれが直径数十nmの構造を形成していることを確認した。次にVEGFの結合によってナノ構造の変化が引き起こされることを同じくAFMにより確認した。そして、GDH-アプタマー複合体を金電極上に固定化し、VEGFとアプタマーの結合に伴う、GDH-アプタマー複合体のナノ構造の変化によって、電極に近づいたGDHの電極への直接電子移動によって生じるグルコース応答電流値を測定し、VEGFを電気化学的に検出できることを確認した。

研究成果の概要(英文)：We developed the Gq-switch by connecting the glucose dehydrogenase (GDH)-binding aptamer and the vascular endothelial growth factor (VEGF)-binding aptamer. Gq-switch forms huge 3D network's structure since it has a lot of G-quadruplex (Gq) structure forming parts and it can be the junction of the multiple aptamers. We observed its structural change upon its binding to VEGF and checked it can also bind to GDH. The GDH used in this study can directly transfer electron to the electrode, therefore if the distance between the GDH bound to Gq-switch and the electrode changes, we can expect the change of electric current generated by the glucose oxidation catalyzed by the GDH.

We immobilized the GDH-Gq-switch complex onto the gold electrode and observed the change of electric current generated from the glucose addition upon the addition of VEGF. That current change was dependent on the concentration of VEGF and therefore we were able to detect VEGF with this electrochemical detection system.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学、生物機能・バイオプロセス

キーワード：アプタマー 血管内皮成長因子 電気化学検出 疾病マーカー ナノ構造 グルコースデヒドロゲナーゼ 血糖値センサー

### 1. 研究開始当初の背景

アプタマーは、標的分子と結合するとその構造が大きく変化するので、その変化を検出できれば、分離が不要な迅速検出法が開発できる。従ってアプタマービーコン等の様々な検出法が考案され報告されているが、ほとんどが蛍光修飾アプタマーの蛍光特性の変化を検出するものであり、色のついた血液の計測には適しない。血液中の特定物質の迅速検出で現在汎用されている血糖値センサーの電気化学測定システムを用いて様々な疾病マーカーを検出できれば、革命的な診断法となるが、その様な報告はまだ無い。

申請者らは、分離を必要としない検出法の開発を目指して、独自に酵素活性を阻害するアプタマーと標的分子に結合するアプタマーを連結した Aptameric enzyme subunit (AES)を開発し、多数の学術論文を発表している。血糖値センサーに用いられる GDH を阻害するアプタマーを探索し、強く結合するアプタマーは得られたが、基質が小さく十分な阻害能を持つものを得るのが困難だった。そこでナノ構造体を形成する GDH-アプタマー複合体を作製し、その構造体と電極との距離を標的分子の結合により変化させることにより、標的分子を検出するシステムを発想した。

### 2. 研究の目的

本研究は、核酸リガンドであるアプタマーに着目し、標的分子である疾病マーカーに結合するアプタマーと市販の電気化学的血糖値センサーに用いられているグルコース脱水素酵素(GDH)に結合するアプタマーを組み合わせ、標的分子が結合すると GDH-アプタマー複合体のナノ構造が変化し、酵素活性を電気化学検出できるシステムを開発する事を目的とする。このようなナノ構造を有する GDH-アプタマー複合体を開発できれば、様々な標的分子を、GDH によるシグナル増幅を利用して、市販の電気化学的血糖値センサーで高感度に検出することができるようになる。

### 3. 研究の方法

申請者は、既に GDH と VEGF に結合するアプタマーをそれぞれ獲得している。まず、これらのアプタマーを連結し、その連結アプタマーと GDH を結合させた GDH-アプタマー複合体を作製し、そのナノ構造を評価した。次に VEGF の結合によって引き起こされる GDH-アプタマー複合体のナノ構造変化を評価し、その構造変化を電極に流れる電流値として検出しやすいように設計した。そして、GDH-アプタマー複合体を金電極上に固定化し、VEGF とアプタマーの結合に伴

う、GDH-アプタマー複合体のナノ構造の変化によって、GDH と電極との距離を制御できるかを評価した。この際、電極と直接電子移動できる GDH を使用した。そして、電極に近づいた GDH の電極への直接電子移動によって生じるグルコース応答電流値を測定することにより VEGF を電気化学的に検出するバイオセンサーを構築した (図 1)。

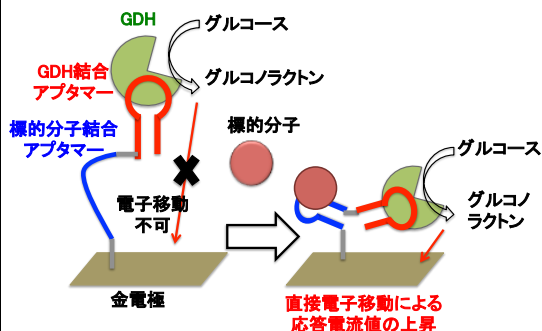


図1 本検出法の原理

### 4. 研究成果

以下の項目について研究を遂行した。

1) GDH 結合アプタマーと VEGF 結合アプタマーの連結と、その連結アプタマー (Gq-switch) のナノ構造の評価。更にこの連結アプタマーと GDH を結合させた GDH-アプタマー複合体の作製と、そのナノ構造の評価。

2) 上述の GDH- Gq-switch 複合体のナノ構造の、VEGF の結合による変化の検討。

3) GDH- Gq-switch 複合体の金電極上への固定化と VEGF の添加による、グルコースに対する応答電流変化の検討。

1) については、Gq-switch を用いた VEGF165 検出系の構築のため、まず Gq-switch の設計及び設計した Gq-switch の VEGF の主要なアイソフォームの一つである VEGF165 及び FADGDH に対する結合能を評価した。その結果作製した Gq-switch は VEGF165、FADGDH の双方に結合することが示された (図 2)。

さらに western blotting、活性染色の結果より Gq-switch は VEGF165 と FADGDH に同時に結合できることも示された。また AFM 観察により、GDH-アプタマー複合体は直径数十 nm 程度のナノ構造体を形成することが確認できた。

2) については、AFM により、VEGF が存在すると GDH- Gq-switch 複合体の構造が変化することが確認できた。しかし、毎回その構造が異なり、確定した画像を得ることがまだできていない。

3) については、作製した Gq-switch を用いて電極実験を行い、VEGF165 の検出を試みた。アプタマーを固定化した金線で VEGF165 濃度依存的にグルコースを添加した際の応答電流値が減少した (図 3)。ネガティブコントロールであるトロンビン、BSA を用いた場合には、トロンビン、BSA の濃度が上昇しても応答電流値に変化は見られなかった。


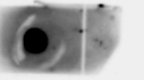
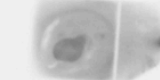
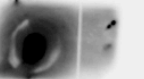
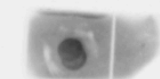
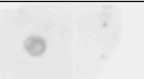

protein aptamer	VEGF 5 pmol	FADGDH 0.5 μg
	FGQ29del19 (FADGDH aptamer)	Not tested
2#19		Not tested
G63R#02G6		
G6VEap121G6		
PolyT		

図 2 VEGF 及び GDH に結合した Gq-switch が発する化学発光イメージ

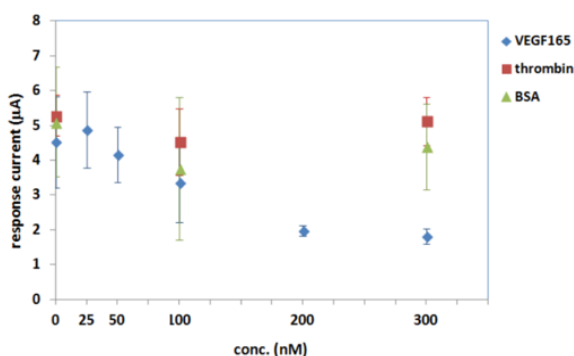


図 3 GDH- Gq-switch 複合体を固定化した金電極を、各種タンパク質を溶解した溶液中に挿入した場合のグルコース応答電流値

このことから作製した Gq-switch は VEGF165 を特異的に検出できたことが示された。VEGF165 を用いた際に応答電流値が低下した原因としては VEGF165 と GDH と競合し VEGF165 が G6VEap#3G6 に結合することで GDH が G6VEap#3G6 から解離した、または VEGF165 が G6VEap#3G6 に結合することで G6VEap#3G6 が金線から遠

退く様に構造変化したためであると考えられる。

以上のように、当初計画した通り、標的分子の結合により、アプタマーが形成するナノ構造が変化し、その構造変化により電子異動の状態が変化して電極に流れる電流が変わる検出システムを構築することができた。既このシステムでアデノシンが検出できることは確認しており、標的分子に結合するアプタマーを取り換えることで、このシステムで種々の標的分子を検出できると期待できる。用いている電気化学的検出システムは市販の血糖値測定システムと同等の物であり、簡便に標的分子を検出できるシステムが開発できたといえる。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1. 八木田直紀、三田千福、吉田亘、阿部公一、池袋一典、「ナノ構造体を形成するアプタマーの構造変化を利用した VEGF の電気化学的検出」、日本化学会第 94 春季年会、2014 年 3 月 27 日、名古屋大学

[図書] (計 2 件)

1. 吉田亘、阿部公一、池袋一典、「リボザイムとアプタマー」、化学便覧 応用化学編第 7 版 (2014)、pp.515-519、総ページ数 1766 ページ、丸善出版株式会社
2. Koichi Abe, Wataru Yoshida and Kazunori Ikebukuro (2014) “Electrochemical Biosensors Using Aptamers for Theranostics” in “Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology”, 2014, 140, 183-202, in total 331 pages, Edited by Man Bock Gu, Springer-Verlag

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ  
<http://www.tuat.ac.jp/~kakusan/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池袋 一典 (IKEBUKURO KAZUNORI)  
東京農工大学・大学院工学研究院・教授  
研究者番号：70251494

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし