

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289314

研究課題名(和文) ホモジニアスアッセイを自在に実現する核酸構造体センシング分子作製法の確立

研究課題名(英文) Development of a nucleic acid-based biosensing molecule for the detection of a desired target in a homogeneous assay format

研究代表者

舟橋 久景 (Funabashi, Hisakage)

広島大学・先端物質科学研究科・准教授

研究者番号：60552429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者がこれまでに開発したDNAナノピンセット構造体(DNA-NT)作製技術を基盤にした、洗浄操作が必要ない標的検出(ホモジニアスアッセイ)を自在に実現するためのバイオセンシング分子作製法の開発を行った。

その結果、DNA-NT蛍光バイオセンシング分子を用いた生細胞内の特異的なmRNAの連続ホモジニアスアッセイ、任意の標的を検出するDNA-NTバイオセンシング分子作製法の基本原理検証、標的核酸を認識すると酵素活性を示す分割核酸酵素再構成誘導型DNA-NTバイオセンシング分子の開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we have attempted to develop a DNA nano-tweezers structured (DNA-NT) biosensing molecule for the detection of a desired target in a homogeneous assay format that does not require washing steps.

As a results, we have continuously detected a specific mRNA in living cells with a fluorescence-based DNA-NT biosensing molecule in a homogeneous assay format, we have proved a basic concept to create a new DNA-NT biosensing molecule that detects a desired target, and we have created a split-DNAzyme-based DNA-NT biosensing molecule that exhibits an enzymatic activity in response to target recognition.

研究分野：生物工学

キーワード：ホモジニアスアッセイ バイオセンサー DNAナノピンセット構造 分割核酸酵素 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET) パイオイメーjing

1. 研究開始当初の背景

ホモジニアスアッセイは、二つの状態のセンシング分子（標的を認識したセンシング分子と認識していないセンシング分子）を分離する（多くは標的を認識していないセンシング分子の洗浄による除去）必要がない標的分子の検出方法である。したがって、洗浄操作が困難・不可能な場所における標的物質の検出や、洗浄の手間がかけられない迅速・簡便な測定の基本原則として有用である。すなわち、バイオテクノロジーや再生医療研究における生細胞内の標的分子検出や、医療現場や家庭における被験者の傍らで即時に疾患マーカーを検出する Point Of Care Testing (POCT) を実現するための基本原則として大いに活用が期待される。しかしながら、研究開始当初、ホモジニアスアッセイを自在に実現するための汎用的なセンシング分子デザイン・作製法は存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者がそれまでに開発した、特異核酸を認識すると分子構造変化を起こし、その構造変化に起因する蛍光共鳴エネルギー移動 (Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)) 効率の変化をシグナルとして産生する、DNA ナノピンセット構造体 (DNA-NT) 蛍光バイオセンシング分子 (図1) 作製技術を基盤にした、ホモジニアスアッセイを自在に実現するためのセンシング分子作製法開発を目的とした。

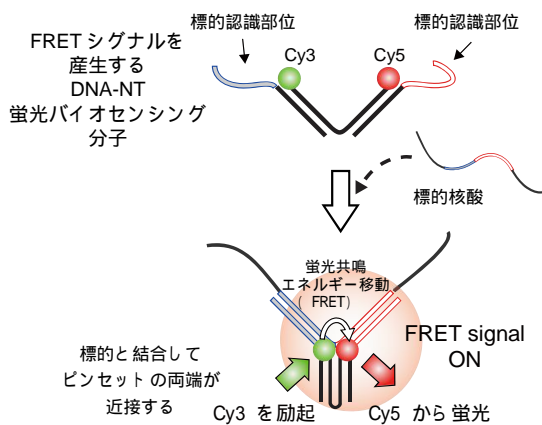


図1 特異核酸を検出すると FRET シグナルを産生する、DNA ナノピンセット構造体 (DNA-NT) 蛍光バイオセンシング分子

3. 研究の方法

上記のような目的を達成するために本研究では以下の3つの重点課題を中心に研究を推進した。

(重点課題1)

生細胞内の局在化を指標に DNA-NT への機能ドメインを付加する技術を開発し、任意 mRNA の生細胞内ホモジニアスアッセイを実現する。

(重点課題2)

進化分子工学を利用した標的認識 DNA-NT バイオセンシング分子のスクリーニング方法を開発し、標的検出能を任意のタンパク質へと拡張する。

(重点課題3)

DNA-NT の構造変化を利用して分割酵素の再構成を誘導し、シグナルを酵素活性として出力とするバイオセンシング分子を開発する。

以上の課題遂行により、細胞内ホモジニアスアッセイや POCT 開発に資する、任意の核酸やタンパク質を標的とする DNA-NT バイオセンシング分子作製法とその利用法の開発を行った。

4. 研究成果

(重点課題1)

肝臓細胞は、インスリンに応答して血中グルコースを取り込むグルコーストランスポーター (GLUT) の遺伝子発現を調節していることが知られている。したがって細胞近傍のインスリン濃度測定を行いながら、インスリン刺激に対して生細胞が示す遺伝子発現応答を評価することは重要な課題であると考えられる。そこで本研究では、インスリンに応答して発現が増加する *Glut1* mRNA を検出するための DNA-NT 蛍光バイオセンシング分子と、インスリンに応答して発現が減少する *Glut4* mRNA を検出するための DNA-NT 蛍光バイオセンシング分子を開発した。それぞれを株化した生肝臓細胞内へ導入し、インスリン刺激に対する遺伝子発現応答の FRET イメージング解析を行った (図2)。

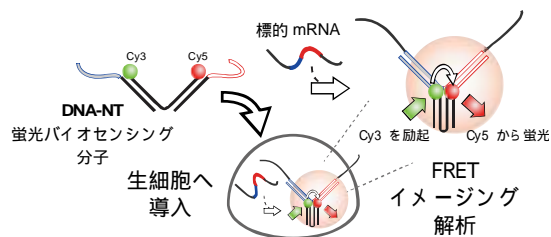


図2 DNA-NT 蛍光バイオセンシング分子を用いた標的 mRNA の FRET イメージング解析

共焦点レーザー顕微鏡で局在を観察したところ、DNA-NT 蛍光バイオセンシング分子は細胞質へ導入されていることが明らかとなった。次に FRET イメージング解析を行ったところ、単一細胞単位における FRET シグナル挙動変化に、インスリン刺激に対する遺伝子発現挙動としての一貫性を見出すことは困難であった。そこで、インスリン刺激後の遺伝子発現挙動変化を、従来法である半定量 RT-PCR 法で測定し、FRET シグナル挙動変化と比較した。その結果、1画面に含まれる複数細胞が示す FRET シグナルの総和の挙

動変化と、RT-PCR で測定した細胞集団が示す遺伝子発現挙動変化は、どちらの mRNA の場合もその傾向が一致した。

以上のように、FRET シグナルは生細胞内の標的 mRNA の発現状態を反映していることから、標的 mRNA の生細胞内ホモジニアスアッセイに成功したと結論した。またこのことから、DNA-NT 蛍光バイオセンシング分子を核内へ局在化させなくても、インスリン刺激に対して増加する遺伝子発現応答 (*Glut1*) も、減少する遺伝子発現応答 (*Glut4*) も、FRET イメージングによってその発現挙動の連続観察が可能であることが示唆された。今後はインスリン局所濃度のイメージング解析と同時に遺伝子発現挙動のイメージング解析を行うなど、さらなる細胞応答解析への応用が期待される。

(重点課題2)

重点課題3で先行開発した、分割 G-quadruplex 再構成誘導型 DNA-NT バイオセンシング分子を利用し、標的認識部位にランダム配列を持つランダム DNA-NT の中から、標的タンパク質を認識する DNA-NT バイオセンシング分子をスクリーニングにより獲得する原理の検証を行った。標的分子としてモデル ssDNA を利用した。その結果、モデル ssDNA 添加時において、複数種の DNA-NT の中からでも標的 ssDNA 検出用 DNA-NT バイオセンシング分子が、ヘミンカラムにより優先的に回収されることが示された。

以上の事から、進化分子工学的手法により標的検出用 DNA-NT バイオセンシング分子が優先的に回収可能であるという基本原理の検証に成功したと結論した。すなわち、ランダム DNA-NT の中からでも、進化分子工学的手法によって標的タンパク質を認識する DNA-NT バイオセンシング分子の取得が可能であることが示唆された。今後は具体的なタンパク質を標的とした DNA-NT バイオセンシング分子の開発が期待される。

(重点課題3)

酵素活性としてシグナルを出力させる技術開発にあたり、本研究では、ヘミン存在下でペルオキシダーゼ活性を示す DNA 核酸酵素、G-quadruplex 配列に着目した。DNA-NT 蛍光バイオセンシング分子の蛍光色素修飾箇所、2分割した G-quadruplex 配列を導入した新しい DNA-NT バイオセンシング分子を作製した。この DNA-NT バイオセンシング分子に、ペルオキシダーゼの発色基質である ABTS と過酸化水素、また補酵素ヘミンと標的 mRNA を添加したところ、420 nm の吸光度が大きく上昇した。このことは、標的 mRNA を認識した DNA-NT が構造変化を起こして分割 G-quadruplex 配列が近接し、ヘミンとの結合能を回復した分割 G-quadruplex が再構成した結果、ペルオキシダーゼ活性を示したと考察した(図3)。

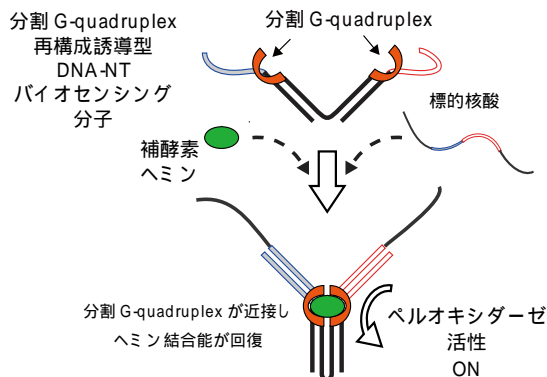


図3 分割 G-quadruplex 再構成誘導型 DNA-NT バイオセンシング分子

以上のことから、標的 mRNA を検出するとペルオキシダーゼ活性を生じる分割 G-quadruplex 再構成誘導型 DNA-NT バイオセンシング分子の開発に成功し、これを用いた洗浄操作の必要ないホモジニアスアッセイが可能であると結論した。

以上のように本研究では、細胞内ホモジニアスアッセイや POCT 開発に資する、任意の核酸やタンパク質を標的とする DNA-NT バイオセンシング分子作製法の開発を行った。

その結果、

- DNA-NT 蛍光バイオセンシング分子を用いた生細胞内特異 mRNA の連続ホモジニアスアッセイ
- 進化分子工学的手法により、任意の標的を検出する分割 G-quadruplex 再構成誘導型 DNA-NT バイオセンシング分子作製法の基本原理の検証
- 標的核酸を認識するとペルオキシダーゼ活性を示す分割 G-quadruplex 再構成誘導型 DNA-NT バイオセンシング分子の開発と、これを用いた試薬を混ぜるだけのホモジニアスアッセイ型標的核酸検出法開発に成功した。

今後は進化分子工学的手法を用いた、具体的なタンパク質検出用 DNA-NT バイオセンシング分子の作製と、それらを利用した細胞内標的の挙動観察や、様々なバイオマーカーを検出する POCT 開発などが期待される。

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 5 件)

Hajime Shigeto, Keisuke Nakatsuka, Takeshi Ikeda, Ryuichi Hirota, Akio Kuroda, Hisakage Funabashi, “Continuous monitoring of specific mRNA expression responses with a FRET-based DNA nano-tweezer technique that does not require gene recombination”, *Anal. Chem.*,

88(16), 7894-7898 (2016), 査読有, DOI: 10.1021/acs.analchem.6b02710

Hisakage Funabashi, “Hemin/G-quadruplex Complex as a Signal Generator for Electrochemical Assays of Bioanalytes”, *Electrochemistry*, 84(5), 290-295 (2016), 査読有, DOI: 10.5796/electrochemistry.84.290

Keisuke Nakatsuka, Hajime Shigeto, Akio Kuroda, and Hisakage Funabashi, “A split G-quadruplex-based DNA nano-tweezers structure as a signal-transducing molecule for the homogeneous detection of specific nucleic acids”, *Biosens. Bioelectron.*, 74, 222-226 (2015), 査読有, DOI: 10.1016/j.bios.2015.06.055

Hajime Shigeto, Takeshi Ikeda, Akio Kuroda, and Hisakage Funabashi, “A BRET-Based Homogeneous Insulin Assay Using Interacting Domains in the Primary Binding Site of the Insulin Receptor”, *Anal. Chem.*, 87(5), 2764-2770 (2015), 査読有, DOI: 10.1021/ac504063x

Hisakage Funabashi, Hajime Shigeto, Keisuke Nakatsuka, and Akio Kuroda, “A FRET-based DNA nano-tweezer technique for the imaging analysis of specific mRNA”, *Analyst*, 140(4), 999-1003 (2015), 査読有, DOI: 10.1039/C4AN02064B

〔学会発表〕(計 17 件)

舟橋久景, 重藤元, 池田丈, 廣田隆一, 黒田章夫, インスリンセンサー細胞を用いたインスリン分泌応答のイメージング解析, 電気化学会 第 84 回大会, 2017 年 3 月 25 日~27 日, 首都大学東京 南大沢キャンパス

Hajime Shigeto, Takuto Ono, Takeshi Ikeda, Ryuichi Hirota, Takenori Ishida, Akio Kuroda, Hisakage Funabashi, Continuous monitoring of insulin secretion response induced by insulin secretagogues in the presence of exogenous insulin (インスリン存在下における薬剤誘導型インスリン分泌応答の連続測定), 日本化学会第 97 春季年会, 2017 年 3 月 16 日~19 日, 慶應義塾大学 日吉キャンパス

Hisakage Funabashi, Keisuke Yoshinaga, Hajime Shigeto, Keisuke Nakatsuka, Akio Kuroda, “Detection of Specific Nucleic Acids Utilizing DNA Nano-Tweezers Structures”, Pacific Rim Meeting on Electrochemical and Solid-state Science (PRiME 2016) Joint international meeting: 230th Meeting of The Electrochemical Society (ECS), 2016 Fall Meeting of The Electrochemical Society of Japan (ECSJ), and 2016 Fall Meeting of The Korean Electrochemical Society (KECS), Oct. 2-7 (2016), Honolulu, Hawaii, USA

重藤元, 小野拓人, 黒田章夫, 舟橋久景, インスリン存在下における膵細胞インスリン分泌応答の連続測定, 第 68 回日本生物工学会, 2016 年 9 月 28 日~30 日, 富山国際会議場 ANA クラウンプラザホテル富山, 富山市

舟橋久景, 重藤元, 小野拓人, 吉永圭佑, 黒田章夫, インスリンのイメージング解析に向けた生物発光プローブ開発, 電気化学会 第 83 回大会, 2016 年 3 月 29 日~31 日, 大阪大学 吹田キャンパス

重藤元, 黒田章夫, 舟橋久景, インスリンを感知すると BRET 応答を示すインスリンセンサー細胞の開発, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 24 日~27 日, 同志社大学 京田辺キャンパス

Hisakage Funabashi, Hajime Shigeto, Keisuke Nakatsuka, and Akio Kuroda, “Imaging analysis of specific mRNA expression based on the FRET-based DNA nano-tweezers technique”, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015), Dec. 15-20, 2015, Honolulu, Hawaii, USA

小野拓人, 重藤元, 黒田章夫, 舟橋久景, 分子内生物発光共鳴エネルギー移動を利用したインスリン検出プローブの開発, 第 67 回日本生物工学会, 2015 年 10 月 26 日~28 日, 城山観光ホテル, 鹿児島市

舟橋久景, 重藤元, 中司圭亮, 黒田章夫, DNA ナノ構造体蛍光バイオセンサを用いたグルコーストランスポーター遺伝子発現のライブセルイメージング, 2015 年電気化学秋季大会, 2015 年 9 月 11 日~12 日, 埼玉工業大学, 深谷市

舟橋久景, 生体機能を利用したバイオセンシング分子の開発, 第 61 回中国四国産学連携化学フォーラム, 2015 年 4 月 10 日, 広島大学東広島キャンパス (招待講演)

重藤元, 池田丈, 黒田章夫, 舟橋久景, インスリン受容体の標的認識部位を利用した洗浄操作不要のインスリン検出法開発, 日本化学会第 95 春季年会, 2015 年 3 月 26 日~29 日, 日本大学 船橋キャンパス

舟橋久景, 中司圭亮, 黒田章夫, DNA-架橋化核酸キメラナノ構造体を用いたマイクロ RNA 検出, 電気化学会 第 82 回大会, 2015 年 3 月 15 日~17 日, 横浜国立大学

Hisakage Funabashi, “Detection of Inter/intra Cellular Response by Biofunctional Material-based Sensors”, 2nd Hiroshima International Symposium on Sustainable Sciences, Nov. 6 (2014), Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan

Hajime Shigeto, Keisuke Nakatsuka, Akio Kuroda, Hisakage Funabashi, “Development of FRET-based DNA Nano-tweezers for

Glucose Transporter Gene Expression Analysis”, 2nd Hiroshima International Symposium on Sustainable Sciences, Nov. 6 (2014), Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan

Keisuke Nakatsuka, Akio Kuroda, Hisakage Funabashi, “Development of the split G-quadruplex based DNA nano-tweezers for target microRNA detection”, 2nd Hiroshima International Symposium on Sustainable Sciences, Nov. 6 (2014), Hiroshima University, Higashihiroshima, Japan

舟橋久景, DNA ナノピンセット構造体を利用したバイオセンシング, 2014年電気化学秋季大会, 2014年9月27日, 28日, 北海道大学高等教育推進機構, 札幌(招待講演)

中司圭亮, 黒田章夫, 舟橋久景, 分割 G-quadruplex 再構成誘導型マイクロ RNA 検出用核酸構造体の開発, 日本生物工学会 2014年大会, 2014年9月9日~11日, 札幌コンベンションセンター, 札幌

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: インスリンの検出方法、および、インスリンの検出キット

発明者: 舟橋久景, 重藤元, 黒田章夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-239348, 国内優先権主張出

願番号: 特願 2015-158455

出願年月日: 出願日 2014年11月26日, 国内

優先権主張出願日: 2015年8月10日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/hisafuna/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

舟橋 久景 (FUNABASHI HISAKAGE)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・

准教授

研究者番号: 60552429