

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：17104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26410155

研究課題名(和文) PCRフリーなmiRNAの電気化学的検出法の確立

研究課題名(英文) Development of PCR-free electrochemical detection of micro RNAs

研究代表者

佐藤 しのぶ (Sato, Shinobu)

九州工業大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：80510677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：miRNAに基づくネットワークは分化制御に関わっていることから、miRNAの迅速かつ定量的検出法の開発によって医療分野への貢献が期待される。特に、唾液中や血中に含まれるmiRNAを増幅することなく、直接検出することができれば、初期がんの診断や大規模スクリーニングが可能になると期待される。著者らは、ナフタレンジイミド誘導体はDNA・RNAヘテロ2本鎖にも結合することを明らかにしている。ここでは、これとDNAプローブ電極を組み合わせて、迅速かつ簡便なmiRNA検出を試みた。

研究成果の概要(英文)：It is known that micro RNAs (miRNAs) are associated with an expression of tumor suppressor genes and are expecting to be one of good cancer markers. Here, we developed ferrocenylnaphthalene diimide (FND)-based hybridization assay to analyze specific miRNA without any amplification step. Since our previous research demonstrated that FND can bind to DNA-RNA hetero duplex, we constructed miRNA detecting system using FND coupled with an electrode chip carrying DNA probe for target miRNA. Here, we chose the suitable FND derivatives (FND1-7) to detect the miRNA by using T_m measurement and try to detect of target miRNA by using electrochemical hybridization assay. FND3 has the highest stabilization ability for DNA-RNA duplex and gave an increasing current shift with target miRNA in this hybridization assay, whereas almost no current shift was observed with non-target miRNA.

研究分野：バイオ分析化学

キーワード：miRNA 電気化学遺伝子検出 フェロセン化ナフタレンジイミド DNA・RNA2本鎖

1. 研究開始当初の背景

近年、RNA が細胞や組織の幹細胞や iPS 細胞の自己複製能と分化制御に深く関わっていることが明らかになってきた。特に 20 - 25 塩基の一本鎖 RNA である miRNA によるネットワークが分化制御に関わっていることから、これらを定量的に解析するシステムが求められている。

1993 年に Lee らによって線虫の miRNA である lin-4 が報告された。ここから欧米で miRNA に関する研究は活発化してきた。一方、日本においては、miRNA に関する研究は世界にリードを許している状況である。このような背景を受け、現在 miRNA をガンマーカーとして利用する試みが始まっている。多くの研究者は、miRNA をマイクロアレイチップや Taq-Man プローブで検出を試みている。しかし、これらは miRNA の増幅過程が必須であることから、大幅に検査の時間を要しているのが現状である。しかしながら、miRNA を非増幅系で検出することが可能な高感度手法が確立されれば、検査時間の短縮化につながり、また定量的評価の信頼性も大きく増すと期待される。

最近、L. Xiang らは定量 RT-PCR 法を利用して、胸部 CT で肺結節が認められた 122 人の患者を対象に、喀痰中の 3 種類の miRNA (miR-21, miR-31 および miR-210) を定量し、それらを利用して診断方法の指標である感度、特異度を算出したところ、それぞれ 82.93%、87.85%であった。しかしながら、少なくとも特異度は 100%近くなければ、陰性のものを正しく陰性と判定することができないため、まだまだ実用化が難しい状況にあることが報告されている。

2. 研究の目的

miRNA を検出するためには、DNA プローブによって検出する方法があるが、この時プローブの DNA とターゲットである miRNA によって DNA・RNA2 本鎖が形成される。このような DNA・RNA2 本鎖はそれぞれの塩基対が平行に位置しないため、塩基対間に平衡挿入するインターカレータは結合することができない。しかしながら、過去に研究代表者はフェロセン化ナフタレンジイミドが DNA・DNA2 本鎖だけでなく、DNA・RNA2 本鎖に対しても安定に結合することを報告している。

研究代表者はまた、これまでに電気化学的 2 本鎖 DNA 検出試薬としてフェロセン化ナフタレンジイミド (FND, 図 1) と 2 本鎖 DNA との相互作用解析を行い、FND を利用した電気化学的遺伝子検出を利用して、癌の診断マーカーである CDH4 遺伝子や hTERT 遺伝子のメチル化検出システムの確立を行ってきた。これらの研究成果から、miRNA を DNA プローブ固定化電極との 2 本鎖形成によって電気化学的に検出する手法について考案した。その概念を図 2 に示す。金電極には調べたい miRNA 配列に相補的な DNA 配列を固定化したプロ

ブ DNA 固定化電極を調整する。これに、サンプル溶液を作用させる。もし、サンプル中にターゲットである miRNA が存在すれば、電極上のプローブ DNA とターゲット miRNA が 2 本鎖を形成する。この反応前後を FND 溶液で測定すれば、ターゲット miRNA が存在するときのみ、電流が増加することになる。

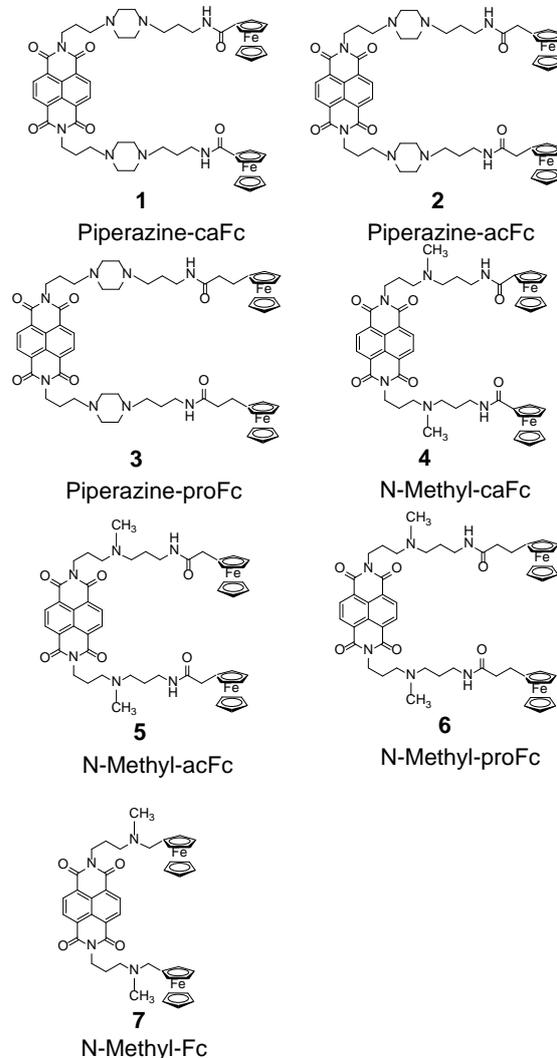


図 1. 種々のフェロセン化ナフタレンジイミド 1-7 (FND) の構造。

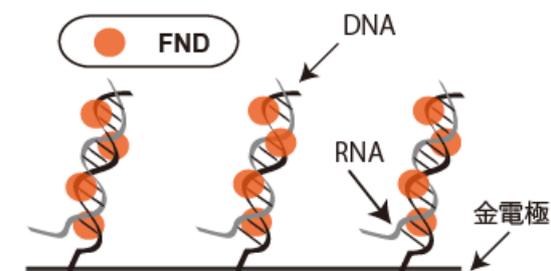
研究代表者が保有している技術は以下の通りである。

- (1) DNA・RNA2 本鎖に結合する指示薬
- (2) FND を利用した電気化学的ハイブリダイゼーションアッセイ

本研究では、上記に示す (1), (2) の研究成果を用いて、DNA プローブ固定化電極で miRNA を増幅することなく、直接検出することを目的とする。

これらが達成できれば、miRNA ネットワークの定量的解明によって、がんの新たな治療法の確立へ貢献できる可能性が高い。現在、血中の減少した miRNA を補填するため、人工的に miRNA を投与する RNA 医薬について検討が

なされている。miRNA は疾病によって増加するもの、減少するものがあるため、miRNA 量の定量的なモニタリングが必須である。miRNA のほかにも細胞内の遺伝子発現抑制(遺伝子サイレンシング)を引き起こす(RNA 干渉) siRNA の研究に対して、効果的な siRNA のスクリーニング法として本手法が利用できる可能性があるため、RNA 医薬の開発など他の分野にも波及効果があると期待される。



電極上の 2 重らせん DNA に対応した数のフェロセンが電極近傍に濃縮され、電流増加を示す。

図 2. 電気化学的 miRNA 検出概念図。

3. 研究の方法

(1) FND1-7 の DNA・RNA2 本鎖に対する熱安定化効果の確認

miRNA のターゲット配列として、前立腺がんのマーカーとして知られている miR-141 をターゲットとした(表 1 参照)。miR-141 の配列を有する RNA オリゴに対して、相補鎖 DNA を準備し、これらによる DNA・RNA2 本鎖を調整した。また、コントロールとして miR141 の配列を有する DNA オリゴと相補鎖 DNA による DNA・DNA2 本鎖も調整した。0.5 μM DNA・DNA もしくは DNA・RNA, 0.5 μM FND1-7, 25 mM AcOK-AcOH buffer (pH 5.5), 25 mM KCl 溶液を調整し、0.5 °C/min で昇温した時の 260 nm における吸光度変化を観察した。吸光度変化が半分になる点を融解温度(Tm)とした。

(2) FND1-7 の電気化学応答

前処理した金電極に 0.1 μM のプローブ DNA を添加し、所定時間インキュベートした。その後、1mM 6-メルカプトヘキサノール溶液に電極を浸した(プローブ DNA 固定化電極)。ターゲットである miR-141 の配列を有する RNA を含む 2×SSC 溶液をプローブ DNA 固定化電極に添加し、37 °C で 30 分インキュベートした。ターゲットである miR-141 を作用させた前後で矩形波ボルタンメトリー測定を行った。この時電解液として、0.1 M KCl, 0.1 M 酢酸カリウム緩衝液, 10 μM FND を用いた。FND1-7 それぞれの溶液における、ターゲット反応前、反応後の電流値を i_0 , i として電流増加率 $\Delta i = (i/i_0 - 1) \times 100$ で評価した。

(3) FND による miRNA 検出システムの選択性

の評価

0.1 M KCl, 0.1 M 酢酸カリウム緩衝液, 10 μM FND3 溶液を電解液とした。プローブ DNA 固定化電極を調整し、ターゲットである miR-141, 非ターゲット鎖である miR-21, miR-205 を作用させた前後で矩形波ボルタンメトリー測定を行った。

(4) FND による miRNA 検出システムの定量性の評価

0.1 M KCl, 0.1 M 酢酸カリウム緩衝液, 35 μM FND3 溶液を電解液として、プローブ DNA 固定化電極を調整し、ターゲットである miR-141 の濃度変化を調べた。また、システムの汎用性を調べるために、ターゲットを肺がんマーカーである miR-205 としたときの濃度変化を調べた。

表 1. 本実験で用いた DNA および RNA 配列

	配列
Probe DNA miR-141	HS-5' -CCATCTTTACCAGACAGTGTTA-3'
Probe DNA miR-205	HS-5' -CAGACTCCGGTGAATGAAGGA-3'
miR-141	3' -GGUAGAAAUGGUCUGUCACAAU-3'
miR-200a	3' -UGUAGCAAUGGUCUGUCACAAU-3'
miR-200b	3' -AGUAGUAAUGGUCUGUCAUAAU-3'
miR-21	5' -UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA -3'
miR-205	3' -GUCUGAGGCCACCUUACUCCU-3'
miR-3130	3' -AAUGGGUCAGAGGCCACGUCG-3'

4. 研究成果

(1) FND1-7 の DNA・RNA2 本鎖に対する熱安定化効果の確認

まず、FND 非存在下の条件で、DNA・DNA および、DNA・RNA2 本鎖の Tm 測定を行ったところ、それぞれ 48.8, 46.9 °C であった。これらの DNA・DNA もしくは DNA・RNA2 本鎖に対し、等量の FND を加えたときの Tm をそれぞれ観察した。DNA・DNA2 本鎖に対しては、FND の添加により、すべての FND 誘導体で Tm 上昇が観察された。一方、DNA・RNA2 本鎖に対しては、FND1, 2, 7 では Tm の上昇は認められなかったが、FND3, 4, 5, 6 で高い Tm 上昇が観察された。この中でも FND3 は最も効果的な Tm 上昇を示したことから、FND3 が強く DNA・RNA2 本鎖に結合していることが示唆された。

(2) FND1-7 の電気化学応答

ここでは、DNA プローブの調整、ターゲットのハイブリダイゼーションの操作はすべて同じとし、電気化学測定溶液中に含まれる FND の種類だけを変更した。この時の電流増加率をそれぞれの FND に対して調べたところ、FND2, 4, 5, 6, 7 ではほとんど電流増加が観

察されなかったが、FND3 の場合、図 3 に示すように最も高い電流増加率を示した。これより、FND3 が miRNA を検出するための電気化学測定指示薬として最も優れていることが示された。

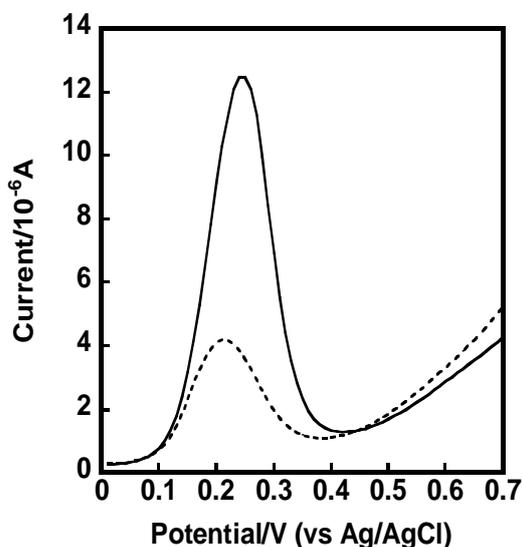


図 3. FND3 を含む溶液における DNA プローブ固定化電極(破線)とそれに miR-141 を作用させたとき(実線)の矩形波ボルタンメトリー測定結果。

(3) FND による miRNA 検出システムの選択性の評価

今回提案したシステムにおいて、生体サンプル中にターゲットはごくごくわずかにしか存在しておらず、ターゲットとは異なる様々な配列の DNA や RNA が存在する。そのため、ターゲットを選択的に検出可能かどうかが重要になってくる。ここでは、前立腺がんの検出のための miR-141 検出用の DNA プローブ固定化電極に対して、miR-21(さまざまながんが増加するがん総合マーカー)、miR-205(肺がんマーカー)を作用させたときの応答を確認した。その結果を図 4 に示す。

ここに示すように、プローブ DNA に対して、完全に相補的な miR-141 は大きな電流増加を示したが、miR-141 と異なる配列である miR-21、miR-205 ではほとんど電流増加を示さなかった。

一方、miR-141 のファミリーである miR-200a と miR-200b は miR-141 とそれぞれ 2 塩基、4 塩基のみ異なる類似配列である。これらは、すべて前立腺がんのマーカーとなりうる配列である。

2 塩基異なる miR-200a については、ほぼ miR-141 と同様に検出できることが明らかになった。また、4 塩基異なる miR-200b については、若干電流増加率は低下するものの、miR-21 や miR-205 に比べると大きな電流増加を示した(Data Not Shown)。

このことから、本システムでは全く異なる

配列であればほとんど応答しないが、ファミリー配列であれば検出可能であることが示唆された。

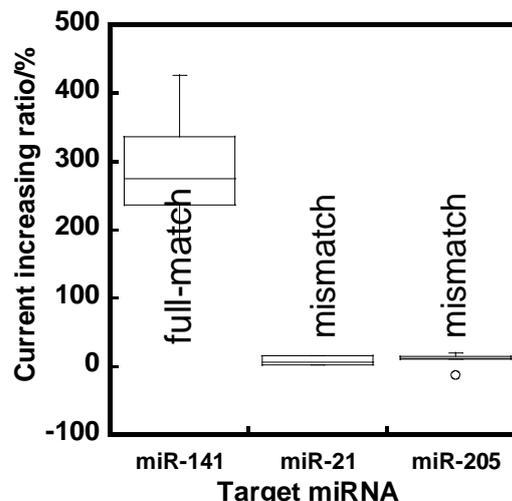


図 4. miR-141 検出プローブに対して、miR-141, miR-21, miR-205 を作用させたときの電流増加率。

(4) FND による miRNA 検出システムの定量性の評価

生体サンプル中に miRNA はそれぞれ fM から pM の濃度で存在しているため、この濃度域の検出が重要になってくる。そこで、サンプル RNA の濃度を変えたときの電流応答について調べた。

ターゲット RNA として miR-141 の濃度を 0.001~0.1 μM としたときの電流増加率を算出した(図 5)。0.03 μM 以上で電流増加は定量的に変化した。ターゲット DNA を含まないときの電流増加率から検出下限を算出したところ、0.03 μM が検出下限であった。電気化学測定ではサンプル量は 4 μL であることから検出下限は、120 pmol であった。

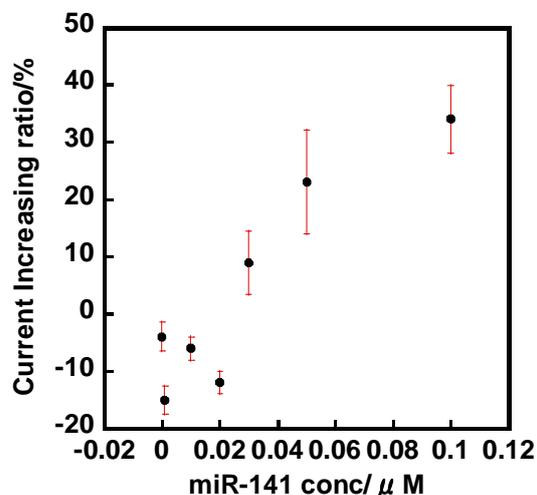


図 5. miR-141 の濃度変化。

次にシステムの汎用性を調べるために、miR-205 について、DNA プローブを調整し、miR-205 の検出を試みた。0.001~0.5 μ M の範囲で miR-205 の濃度変化を観察した。その結果、0.01~0.1 μ M の範囲で定量的な変化を観察することができた。検出下限は、8 nM, 32 pmol であり、miR-205 のほうがより高感度に検出できることが明らかになった。

miR-205 検出プローブに対して、miR-205 と 9 塩基異なる miR-3130 (最も近い配列) と miR-205 と全く異なる配列を有する miR-141 (前立腺がんのマーカー) を作用させたときの応答を観察した。その結果、miR-3130, miR-141 では全く電流増加を示さず (Data Not Shown)、高い選択性を有していることが示された。

参考文献

(1) S. Sato, S. Fujii, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka, *Journal of Organometallic Chemistry*, 637-639, 476-483 (2001).

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 6 件)

① "Oral cancer screening based on methylation frequency detection in hTERT gene using electrochemical hybridization assay via a multi-electrode chip coupled with ferrocenylnaphthalene diimide", Kazuya Haraguchi, Shinobu Sato, Manabu Habu, Naomi Yada, Mana Hayakawa, Osamu Takahashi, Izumi Yoshioka, Kou Matsuo, Kazuhiro Tominaga, and Shigeori Takenaka, *Electroanalysis*, 査読有, in press (2017). DOI: 10.1002/elan.201700028

② "Ferrocenyl naphthalene diimides as tetraplex DNA binders", Shinobu Sato and Shigeori Takenaka, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 査読有, 167, 21-26 (2017). DOI:10.1016/j.jinorgbio.2016.11.020

③ "Electrochemical telomerase assay for screening for oral cancer", Mana Hayakawa, Masaaki Kodama, Shinobu Sato, Kumiko Tomoeda-Mori, Kazuya Haraguchi, Manabu Habu, Shigeori Takenaka, Kazuhiro Tominaga, *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 査読有, 54(3), 301-305 (2016).

DOI: 10.1016/j.bjoms.2016.01.003

④ "Screening for oral cancer using electrochemical telomerase assay", Mana Hayakawa, Masaaki Kodama, Shinobu Sato, Kumiko Tomoeda-Mori, Kazuya Haraguchi, Manabu Habu, Shigeori Takenaka, Kazuhiro Tominaga, *Electroanalysis*, 査読有, 28,

503-507 (2016).

DOI: 10.1002/elan.201500426

⑤ "Cooperative Binding of Ferrocenylnaphthalene Diimide Carrying β -Cyclodextrin Converts Double-Stranded DNA to a Rod-Like Structure", Shinobu Sato, Yuta Umeda, Satoshi Fujii & Shigeori Takenaka, *Bioconjugate Chem.*, 査読有, 26 (3), 379-382 (2015).

DOI: 10.1021/bc500535n

⑥ "Ferrocenylnaphthalene Diimide-Based Electrochemical Detection of Aberrant Methylation in hTERT Gene", Shinobu Sato, Toshiro Saeki, Tomoki Tanaka, Yusuke Kanazaki, Mana Hayakawa, Kazuya Haraguchi, Masaaki Kodama, Tatsuji Nishihara, Kazuhiro Tominaga & Shigeori Takenaka, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 査読有, 174, 869-879 (2014).

DOI: 10.1007/s12010-014-1030-z

[学会発表] (計 5 件)

① 「Electrochemical miRNA detection based on naphthalene diimide coupled with DNA probe-immobilized electrode」Shinobu Sato, Akira Nakayama, Yasunobu Hayashida, Shigeori Takenaka, 第 43 回国際核酸化学シンポジウム, Kumamoto Shintoshin Plaza (熊本県、熊本市), 2016 年 9 月 27-29 日.

② 「肺癌診断マーカーとしての miRNA のフェロセン化ナフタレンジイミドを利用した電気化学的検出法への応用」中山彰・佐藤しのぶ・竹中繁織, 第 53 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場 (福岡県、北九州市), 2016 年 7 月 2 日.

③ 「フェロセン化ナフタレンジイミドを用いた miRNA の電気化学的検出における周波数依存性の検討」中山彰・佐藤しのぶ・竹中繁織, ナノ学会第 14 大会, 北九州国際会議場 (福岡県、北九州市), 2016 年 6 月 14-16 日.

④ 「フェロセン化ナフタレンジイミドを利用した電気化学的 miRNA 検出法の開発」佐藤しのぶ, 林田康伸, 中山彰, 竹中繁織, 日本核酸医薬学会第 1 回年会, 京都テルサ (京都府、京都市), 2015 年 11 月 30 日-12 月 3 日.

⑤ 「電気化学的 miRNA 検出に最適なフェロセン化ナフタレンジイミド誘導体の検索」林田康伸, 佐藤しのぶ, 竹中繁織, 日本化学会九州支部設立 100 周年記念国際シンポジウム & 第 52 回化学関連支部合同九州大会, 北九州国際会議場 (福岡県、北九州市), 2015 年 6 月 27-28 日.

[図書] (計 1 件)

① "Telomerase as a biomarker for oral cancer", Shinobu Sato & Shigeori Takenaka *Biomarkers in Cancer*, Preedy, Victor R., Patel, Vinood B Eds., Springer pp. 753-770 (2015).

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://takenaka.che.kyutech.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 しのぶ (SATO, Shinobu)

九州工業大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：80510677

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

林田 康信 (HAYASHIDA, Yasunobu)

中山 彰 (NAKAYAMA, Akira)

小野 瑞希 (ONO, Mizuki)