

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510165

研究課題名(和文) 19F-NMRタグを有する磁性ナノ粒子による多次元化遺伝子診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of 19F-NMR-Based Multiplex Focused Gene Diagnostic Systems

研究代表者

大石 基 (OISHI, Motoi)

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号：90419242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、蛍光色素に代わる新しいタグとしてフッ素(19F)官能基を有する金ナノ粒子と磁性粒子を組み合わせたシステムを構築し、アレイ化することなく数十～百種類の遺伝子を19F-NMRにより高感度に検出・定量できる多次元化フォーカスト遺伝子診断システムを開発することである。具体的には、磁性粒子と金ナノ粒子表面での酵素フリー型クリックケミカルライゲーション連鎖反応を組み合わせた超高感度(検出限界濃度：50 zM = 10<sup>-21</sup> M)な遺伝子診断法を開発した。以上のことから、この手法は19F-NMRによる多次元化フォーカスト遺伝子診断システムの開発に有用なツールである。

研究成果の概要(英文)：An ultrasensitive colorimetric assay for both DNA and RNA has been developed utilizing enzyme-free click chemical ligation chain reaction (CCLCR) on dispersed gold nanoparticles and magnetic beads. The CCLCR assay provides ultrasensitive detection (50 zM = 10<sup>-21</sup> M; several copies) of target DNA that is comparable to PCR-based approaches. Note that target RNA could also be detected with similar sensitivity without the need for reverse transcription to the corresponding cDNA. Thus, this method might be a useful tool for development of 19F-NMR-based multiplex focused gene diagnostic systems.

研究分野：ナノバイオサイエンス

キーワード：19F-NMR DNA 磁性粒子 金ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子診断やテーラーメイド医療を目指した DNA センサーに関する研究・開発が活発に行われている。これまでの DNA センサーは、基礎研究として解析結果の信頼性よりも網羅性が重視されてきたが、最近では網羅的解析によって絞り込まれた数十～百種類程度の特定の遺伝子の働きを高精度に検出するフォーカストセンサーへのニーズが高まっている。このような背景のもと、基板および粒子をベースとした様々なフォーカストセンサーが研究・開発されている。しかし、これらフォーカストセンサーは蛍光色素をタグとして用いているが故に励起光の数（波長の異なるレーザーが複数必要）および蛍光色素の数（蛍光スペクトルの重なりがないなど）が制限され、たった数十～百種類程度の遺伝子を解析するためにもアレイ化が必要不可欠となっている。さらには、検出の際にはスキャナーによる蛍光イメージングや粒子の蛍光を1粒子ずつ検出するなどの煩雑な操作を伴っているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、蛍光色素に代わる新しいタグとしてフッ素 ( $^{19}\text{F}$ ) 官能基を有する金ナノ粒子と磁性粒子を組み合わせたシステムを構築し、アレイ化することなく数十～百種類の遺伝子を  $^{19}\text{F}$ -NMR により高感度に検出・定量できる多次元化フォーカスト遺伝子診断システムを開発することである。しかし、本研究が指向する「 $^{19}\text{F}$ -NMR を利用した多次元化フォーカスト遺伝子診断システムの開発」において問題となるのは、 $^{19}\text{F}$ -NMR の感度である。一般的に蛍光色素の感度は数 pM レベルであるのに対して、NMR の測定感度は数  $\mu\text{M}$  レベルである。したがって、この問題を解決するために本研究では、金ナノ粒子表面での酵素フリー型クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) を開発し、金ナノ粒子 ( $^{19}\text{F}$  タグ) を増幅させるシステムを構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究のような  $^{19}\text{F}$ -NMR を利用した多次元化フォーカスト遺伝子診断システムを開発するうえで以下のように研究を進めた。

- (1) DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーションの構築と標的 DNA の検出 (非増幅法)
- (2) DNA 化金ナノ粒子表面での非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) の構築と標的 DNA の検出 (直線的増幅法)
- (3) DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) の構築と標的 DNA の検出 (指数関数的増幅法)

以下「4. 研究成果」の項に上記項目に関する

研究成果を記述する。

4. 研究成果

(1) システムの原理

DNA 化金ナノ粒子 ( $\text{N}_3$ -DNA-modified GNP) の調製は、diluent DNA (配列:  $\text{T}_{20}$ ) およびアジド基を有する probe DNA (probe- $\text{N}_3$ ) (標的 DNA の片半分と二本鎖を組む塩基配列を有する DNA) を SH (チオール) 基を介して金ナノ粒子表面に共固定させることを行った。また、金ナノ粒子表面における probe- $\text{N}_3$  と diluent DNA の固定化数は、それぞれ 13 本/粒子および 108 本/粒子であった。

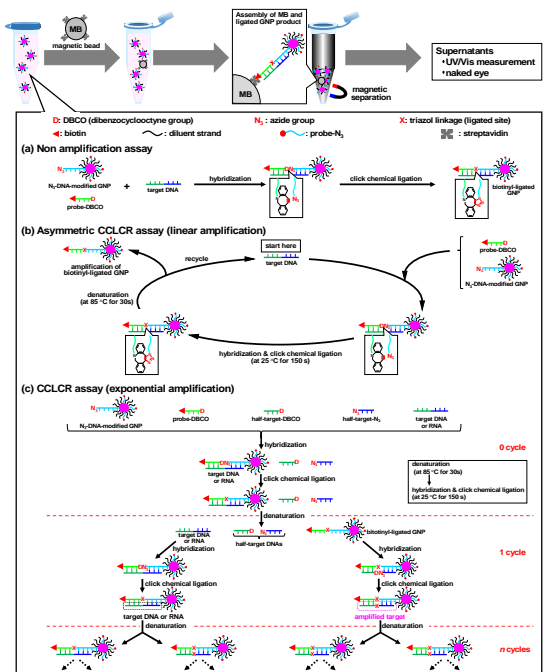


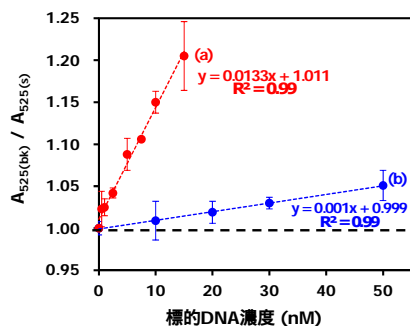
図1 検出システムの原理(a) DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーション (非増幅法) (b) 非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) (c) クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR)

図1に3つのシステムの原理を示す。図1(a)の DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーションによる標的 DNA の検出 (非増幅法) では、標的 DNA 存在下において上述の金ナノ粒子の溶液に DBCO 基および biotin 基を有する probe DNA (probe-DBCO) (標的 DNA のもう片半分と二本鎖を組む塩基配列を有する DNA) を加え、室温で 15 分インキュベーションさせた。これにより、DNA 化金ナノ粒子表面の probe- $\text{N}_3$  と probe-DBCO が標的 DNA のハイブリダイゼーションを介してライゲーション (連結) し biotin 化金ナノ粒子 (biotinylated GNP) が形成される。また、図1(b)の DNA 化金ナノ粒子表面での非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) (直線的増幅法) による標的 DNA の検出では、標的 DNA 存在下において上述の金ナノ粒子の溶液に probe-DBCO を加え、所定の回

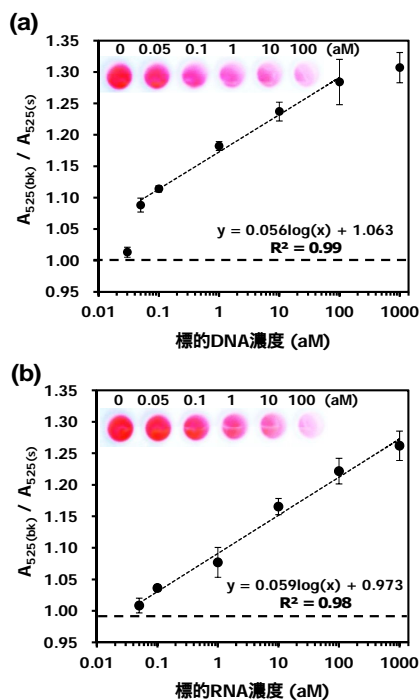
数の熱サイクル (25 :150 秒 85 :30 秒) を行った。一方、**図 1(c)**の DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) (指数関数的増幅法) による標的 DNA (RNA) の検出では、標的 DNA (RNA) 存在下において上述の金ナノ粒子の溶液に probe-DBCO および N<sub>3</sub> 基または DBCO 基を末端に有する 1 組のハーフ標的 DNA (half-target-N<sub>3</sub> and half-target-DBCO) (それぞれ標的 DNA に対して半分同じ配列) を加え、所定の回数の熱サイクル (25 :150 秒 85 :30 秒) を行った。すなわち、**図 1(b)**の非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) では、熱サイクル数に応じて biotin 化金ナノ粒子が直線的に増幅するのに対して**図 1(c)**のクリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) では、熱サイクル数に応じて標的 DNA と biotin 化金ナノ粒子の両方が指数関数的に増幅することになる。次いでこれら 3 つの溶液にストレプトアビジン化磁性粒子 (MB) を加え、増幅した biotin 化金ナノ粒子を磁気により回収する。最終的には、未反応の DNA 化金ナノ粒子を含んでいる澄み溶液の色の变化を目視および UV/Vis 吸収スペクトルで確認することで、標的 DNA (RNA) を検出した。

(2) DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーション (非増幅法) および DNA 化金ナノ粒子表面での非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) (直線的増幅法) による標的 DNA の検出

**図 1(a)**のクリックケミカルライゲーション (非増幅法) および**図 1(b)**の非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) (直線的増幅法) による標的 DNA の検出結果を**図 2**に示す。**図 2**は、標的 DNA 濃度に対する上澄み溶液の吸光度変化 ( $A_{520(bk)}/A_{520(s)}$ ) を示したものである。ここで、 $A_{520(bk)}$  および  $A_{520(s)}$  は、標的 DNA 非存在下での上澄み溶液の金ナノ粒子の吸光度および標的 DNA 存在下での上澄み溶液の金ナノ粒子の吸光度をそれぞれ表している。クリックケミカルライゲーション (非増幅



**図 2** (a) DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーション (非増幅法) による標的 DNA の検出および (b) 非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) による標的 DNA の検出



**図 3** クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) による (a) 標的 DNA の検出および (b) 標的 RNA の検出

法) および非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) (直線的増幅法) の検出限界濃度は、それぞれ 24 nM および 0.68 nM であり、非対称クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (asymmetric CCLCR) (直線的増幅法) の方が高感度であることが明らかとなった。

(3) DNA 化金ナノ粒子表面でのクリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) (指数関数的増幅法) による標的 DNA (RNA) の検出

**図 1(c)**のクリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) (指数関数的増幅法) による標的 DNA および RNA の検出結果を**図 3**に示す。**図 3(a)**および**図 3(b)**は、それぞれ標的 DNA 濃度および標的 RNA 濃度に対する上澄み溶液の吸光度変化 ( $A_{520(bk)}/A_{520(s)}$ ) を示したものである。標的 DNA および標的 RNA に対する検出限界濃度は、ともに 50 zM (=  $10^{-21}$  M: several copies) であり、超高感度化が達成された。また、上澄み溶液の色の变化は、目視で確認することが可能であった。これは、熱サイクルによりクリックケミカルライゲーションおよび熱変性が繰り返し引き起こされることで、標的 DNA (RNA) と biotin 化金ナノ粒子の両方が指数関数的に増幅したためである。また、増幅効率は 82~83% であり、非常に高効率であることが分かった。

以上のことから、クリックケミカルライゲーション連鎖反応 (CCLCR) (指数関数的増幅法) は、金ナノ粒子を増幅することが可能であるため <sup>19</sup>F-NMR による多次元化フォーカスト遺伝子診断システムの開発に有用な

ツールである。

#### 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4件)

Motoi Oishi “Enzyme-Free and Isothermal Detection of microRNA Based on Click-Chemical Ligation-Assisted Hybridization Coupled with Hybridization Chain Reaction Signal Amplification” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2015) 407, 4165-4172. 査読有り

DOI: 10.1007/s00216-015-8629-y

Daiki Kato and Motoi Oishi “Ultrasensitive Detection of DNA and RNA Based on Enzyme-Free Click Chemical Ligation Chain Reaction on Dispersed Gold Nanoparticles” *ACS Nano* (2014) 8, 9988-9997. 査読有り

DOI: 10.1021/nn503150w

Motoi Oishi, Shingo Nakao, and Daiki Kato “Enzyme-Free Fluorescent-Amplified Aptasensors Based on Target-Responsive DNA Strand Displacement via Toehold-Mediated Click Chemical Ligation” *Chemical Communications* (2014) 50, 991-993. 査読有り

DOI: 10.1039/C3CC48064J

Shingo Nakao and Motoi Oishi “Rational Design of a Fluorescence-Amplified Aptasensor Based on Enzyme-Assisted Target Recycling Strategy” *Chemistry Letters* (2013) 42, 1122-1124. 査読有り

DOI:10.1246/cl.130439

##### [学会発表](計5件)

大石 基, 高島明里 “DNA クリックケミカルライゲーションを用いた miRNA の検出” 日本分析化学会第 63 年会, 広島大学(広島県東広島市), 2014 年 9 月 17 日

加藤大喜, 大石 基 “金ナノ粒子表面での酵素フリー型クリックケミカルライゲーション連鎖反応を基盤とした DNA および RNA の超高感度検出システムの構築” 第 74 回日本分析化学討論会, 日本大学(福島県郡山市), 2014 年 5 月 24 日

大石 基, 加藤大喜 “DNA および RNA の超高感度検出を目指した金ナノ粒子表面での酵素フリー型クリックケミカルライゲーション連鎖反応の構築” 第 12 回ナノ学会, 京都大学(京都府宇治市), 2014 年 5 月 23 日

大石 基, 中尾進吾, 加藤大喜 “酵素および酵素フリーでのシグナル増幅を目指した蛍光アプタセンサーの構築” 日本分析化学会第 62 年会, 近畿大学(大阪府東大阪市), 2013 年 9 月 10 日

中尾進吾, 大石 基 “構造スイッチング DNA アプタマーを用いた酵素増強型蛍光

バイオセンサーの創製” 第 73 回日本分析化学討論会, 北海道大学(北海道函館市), 2013 年 5 月 18 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大石 基 (OISHI Motoi)

筑波大学・数理物質系・講師

研究者番号: 90419242