

所属・資格 化学科・教授

申請者氏名 栗原 正靖

研究課題		核酸バイオマーカー検出法の開発
報告の概要	研究目的 および 研究概要	本研究では、遺伝子変異や mRNA など疾患に関わる核酸バイオマーカーを簡便且つ迅速に検出する方法論の開発を目的とする。これまでに、アナライトに関連試薬を混ぜて、等温下（例えば 37°C）で放置するだけで、標的とするアナライトを蛍光発色等により検出可能な測定系を構築した。本法は、洗浄操作や試薬の逐次添加が不要で、等温下、1 段階で 1 つのテストチューブ内で、DNA や mRNA、さらには miRNA 等の核酸バイオマーカーを目視で簡便に検出することが可能である。本研究では、アナライト対象分子のさらなる拡張や検出限界の向上、シグナル増幅強度の増大、計測時間の迅速化等について検討を行う。
	研究の結果	SATIC システムを使用した FET バイオセンサーは、高い特異性と感度をもつ標的 RNA の検出が可能であることが示された。このバイオセンサーは、 $\phi 29$ ポリメラーゼによる核酸増幅反応で生成された負電荷を利用し、6 コピー/ μL という極めて低い検出限界を達成した。また、増幅時間を調整することで、RNA 濃度の広範囲にわたる正確な定量検出が可能であることが確認された。さらに、LSV、DPV、NPV、および SWV を用いて核酸増幅後の電流密度変化を測定し、各電気化学測定法の性能を比較した。その結果、FMA 濃度依存性では電流値変化の傾きが $\text{LSV} < \text{SWV} \leq \text{DPV} \leq \text{NPV}$ の順であることが判明した。特に DPV および SWV は、ノイズを排除し、精密な測定を可能にする点で優れていることが確認された。一方、NPV は再現性に若干の課題があるものの、DPV や SWV に次ぐ感度を示した。SATIC 反応による電流密度変化量は $\text{LSV} : 1.98 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $\text{DPV} : 12.2 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $\text{NPV} : 3.41 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、 $\text{SWV} : 9.04 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ であった。なお、本研究における電気化学測定は、早稲田大学の門間教授らと共同して実施した。
	研究の考察・反省	SATIC システムを用いた FET バイオセンサーとアンペロメトリックセンサーの組み合わせは、高感度で特異的な核酸検出法として有望であると示された。パルス測定法（DPV および SWV）はノイズを除去し、安定した測定を可能にする優位性が確認された。一方、NPV は再現性にばらつきがあるものの、DPV や SWV に次ぐ感度を示した。改良の方向性として、DPV および SWV 測定で得られた良好な結果は、RNA 濃度依存性のさらなる検討を通じて、精密な核酸検出への応用が期待される。単一濃度ポイントでの比較ではなく、濃度範囲全体を考慮した解析が重要であると考えられる。このように、SATIC システムを基盤とした新たなバイオセンサー技術は、シンプルで高感度な RNA 検出を実現する可能性を大きく広げると結論づけられる。
研究発表 学会名 発表テーマ 年月日/場所 研究成果物 テーマ 誌名 巻・号 発行年月日 発行所・者	<p>※この欄は、本報告書提出時点で判明している事項についてご記入ください。</p> <p><研究発表> Sato Y, Hayashi H, Kataoka Y, <u>Kuwahara M</u>, Momma T, Pacific Rim Meeting on Electrochemical & Solid - State Science (PRiME 2024) “Comparison of Electrochemical Measurement Methods by Amperometric Sensor for RNA Detection with Isothermal Nucleic Acid Amplification”, Oct. 7, 2024, poster, Honolulu, Hawaii. 他, 国際シンポジウム招待講演計 3 件, 研究発表計 5 件</p> <p><研究成果物> 査読付き学術論文 : Wariishi T, Kataoka Y, Nakamura T, Kasahara Y, Kuroda M, Obika S, Kuwahara M. Lantern-type G-quadruplex fluorescent sensors for detecting divalent metal ions. <i>Anal Biochem.</i> 2024, 690, 15525.</p>	