

平成28年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 医療分野研究成果展開事業 (先端計測分析技術・機器開発プログラム)  
(英語) Development of advanced measurement and analysis systems (AMED-SENTAN)

研究開発課題名： (日本語) 酵素阻害アプタマーを用いた高感度簡易迅速疾病診断法の開発  
(英語) Development of highly sensitive and simple method for diagnosis using the enzyme inhibiting aptamer

研究開発担当者 (日本語) 東京農工大学 大学院工学研究院 教授 池袋 一典  
所属 役職 氏名： (英語) Tokyo University of Agriculture and Technology, Graduate school for engineering, Professor Kazunori Ikebukuro

実施期間： 平成28年 4月 1日 ~ 平成29年 3月31日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

池袋教授 (東京農工大学 大学院工学研究院)、和田博所長 (栄研化学株式会社) らのグループとともに、酵素阻害アプタマーで構成される Aptameric enzyme subunit を用いた疾病迅速診断システムを開発するために、アルカリフォスファターゼ阻害アプタマーを探索し、アルカリフォスファターゼの活性を 20%程度阻害するアプタマーを得ることができた。高感度検出をするために DNA に結合しやすいように Zn フィンガータンパク質融合アルカリフォスファターゼを作製し、これに結合し活性を阻害するアプタマーも獲得した。さらに楕形電極でアルカリフォスファターゼを高感度検出できるかを確認したところ、数 pM のアルカリフォスファターゼを 5 分以内に測定できることが確認された。

秦健一郎周産期病態研究部部長グループ (国立成育医療研究センター研究所) は、患者血液中のアデノシン、VEGF、ヘモグロビンの測定を行い、本測定システムでの実試料測定の準備を行った。

その他、池袋教授らは、非天然の疎水性塩基を DNA アプタマーに導入することによりその結合能を向上させられることも確認し、開発する Aptameric enzyme subunit の結合能や信号発信能力を向上させられることを確認した。

英文

The research group of Prof. Ikebukuro and Center President Wada successfully obtained the DNA aptamer which inhibited the alkali phosphatase to 20% for the development of the rapid diagnosis system using aptameric enzyme subunit. Additionally they made the zinc finger protein fused alkali phosphatase for highly sensitive detection and successfully obtained the DNA aptamer which inhibited the zinc finger fused alkali phosphatase to more than 30%. They also succeeded in the detection of pM level alkali phosphatase within 5 min using the interdigitated array microelectrode.

Dr Hata measured the concentrations of adenosine, VEGF, hemoglobin for the real sample measurement with the developed sensing system.

Prof. Ikebukuro also succeeded in the improvement of affinity of the DNA aptamer by introducing the non-natural hydrophobic bases into it, and it might enable them to improve the affinity and the signal generation ability of the aptameric enzyme subunit.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 2 件)

1. Tsukakoshi K, Ikebukuro K, Sensitive and Homogeneous Detection System with Aptamer-Based Biosensor, *Sensor Mater.* 2016, 28(10), 1083-1089.
2. Tsukakoshi K, Ikuta Y, Abe K, Yoshida W, Iida K, Ma Y, Nagasawa K, Sode K, Ikebukuro K, Structural regulation by a G-quadruplex ligand increases binding abilities of G-quadruplex-forming aptamers, *Chem. Commun.* 2016, 52(85), 12646-12649.

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Interaction between G-quadruplex (G4)-forming aptamer and heme protein, ポスター, Yamagishi Y, Saito T, Kanazashi M, Kuno H, Savory N, Tsukakoshi K, Ikebukuro K, *Biosensors2016*, 2016/5/25-27, 国外
2. Improvement of binding affinity of G-quadruplex forming aptamers, ポスター, Ikuta Y, Tsukakoshi Y, Abe K, Saito T, Yokoyama T, Iida K, Nagasawa K, Ikebukuro K, *Biosensors2016*, 2016/5/25-27, 国外
3. Development of multivalent aptamers for high-sensitive detection of target proteins, 口頭, Tsukakoshi K, Takahashi C, Ikuta Y, Iida K, Nagasawa K, Sode K, Ikebukuro K, *Biosensors2016*, 2016/5/25-27, 国外
4. 高感度検出への応用を目指したアルカリホスファターゼ阻害アプタマーの探索, ポスター, 林 宙美, 西尾 真初, 山岸 恭子, 塚越 かおり, 池袋 一典, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016/9/7-9, 国内
5. グアニン四重鎖特異的リガンドを用いた DNA アプタマーの構造制御, 口頭, 塚越 かおり, 生田 結里, 飯田 圭介, 馬 悦, 長澤 和夫, 早出 広司, 池袋 一典, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 2016/9/7-9, 国内
6. Screening and characterization of aptamer for myoglobin, ポスター, Yamagishi Y, Saito T, Kanazashi M, Kuno H, Savory N, Tsukakoshi K, Ikebukuro K, *The 43rd International Symposium on*

Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27-29, 国内

7. Effect of G-quadruplex ligand on the topology of G-quadruplex forming aptamer and its affinity to the target molecules, ポスター, Ikuta Y, Tsukakoshi Y, Abe K, Saito T, Yokoyama T, Iida K, Ma Y, Nagasawa K, Ikebukuro K, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27-29, 国内
8. Development of the Electrochemical Detection System Using the Combination of Aptamer and Enzyme, 口頭, Tsukakoshi K, Lee J, Yamagishi Y, Hayashi H, Konda K, Sode K, Ikebukuro K, PRiME2016, 2016/10/2-7, 国外
9. Development of the electrochemical detection system of thrombin activity, ポスター, Ito M, Honda T, Wada H, Yamagishi Y, Tsukakoshi K, Ikebukuro K, PepCon2017, 2017/3/22-24, 国内
10. Development of the electrochemical detection system of thrombin activity, ポスター, Mitsuki Ito, Takuya Honda, Hiroshi Wada, Yasuko Yamagishi, Dr. Kaori Tsukakoshi, and Dr. Kazunori Ikebukuro, PepCon2017, 2017/3/22~24, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. スーパーサイエンスハイスクールの大学研修の実施、西尾真初、Lee Jin-hee、塚越かおり、池袋一典、兵庫県立豊岡高校の学生5名と教諭1名、2016/12/10-11、国内

(4) 特許出願

なし。