

# 環状フェロセン化ナフタレンジイミドを用いた SARS-CoV-2 の四本鎖 RNA の 電気化学的検出

## Electrochemical detection of G-quartet RNA in SARS-CoV-2 using cyclic ferrocenylnaphthalene diimide

竹中繁織\*, 金好秀馬\*, 佐藤しのぶ\*

\*九州工業大学大学院工学研究院物質工学研究系

Shigeori Takenaka\*, Shuma Kaneyoshi\*, Shinobu Sato\*

\*Department of Applied Chemistry, Kyushu Institute of Technology

E-mail address: shige@che.kyutech.ac.jp

### 1. はじめに

重症急性呼吸器症候群である COVID-19 は SARS-CoV-2 の感染によって発症数日前や無症状なままでも他者へ感染させる。このため安価で簡易的な検出法の開発が求められている。最近 SARS-CoV-2 ゲノム内の N 領域に位置する RG-1 (5'-GGC UGG CAA UGG CGG-3') は安定した 4 本鎖構造 (G4) 形成が確認されている。この G4 に結合する分子は、増殖を抑制することが報告されている[1]。そこで、我々はこの RG-1 によって形成される RNA パラレル 4 本鎖構造に着目し、これの検出による COVID-19 の検出を試みた。これまでに環状フェロセン化ナフタレンジイミド (cFND) が 4 本鎖 DNA に結合することを明らかにしている[2]。環状フェロセン化ナフタレンジイミドはフェロセンとナフタレンジイミドとの相互作用により、それ単独ではフェロセンの応答が抑制されるが、図 1 に示したように G4 との結合によりフェロセンとナフタレンジイミドの相互作用が解消し、フェロセンの電流が回復することで、G4 の検出ができると期待される。本研究では環状フェロセン化ナフタレンジイミド **1** について RG-1 との相互作用解析を行った。

### 2. 解析法

SARS-CoV-2 のゲノム配列中に存在する RG-1 は、受託合成によって得た。**1** は著者らの手法によって合成した[2]。RG-1 との結合解析は、RG-1 添加に伴う cFND の水溶液の uv/vis 吸収スペクトル変化をモニターし、得られた RG-1 濃度変化に伴う **1** の吸光度変化を用いた Scatchard 解析によって行った。電気化学測定は、グラブシーカーボン電極を用いた電解液中で行った。

### 3. 実験と結果

環状フェロセン化ナフタレンジイミド **1** と RG-1 と RG-2 との相互作用を検討した。**1** は、ナフタレンジイミド部位を有するので 382 nm 付近に吸収極大を有する。この部位が G4 RNA の G-カルテットとスタッキング相互作用によって結合すると期待される。これによってナフタレンジイミド部位の吸収極大が大きく減少する (淡色効果)。従って、**1** の水溶液への RNA 添加による吸収極大の変化をモニタリングすることにより結合挙動を解析することができた。

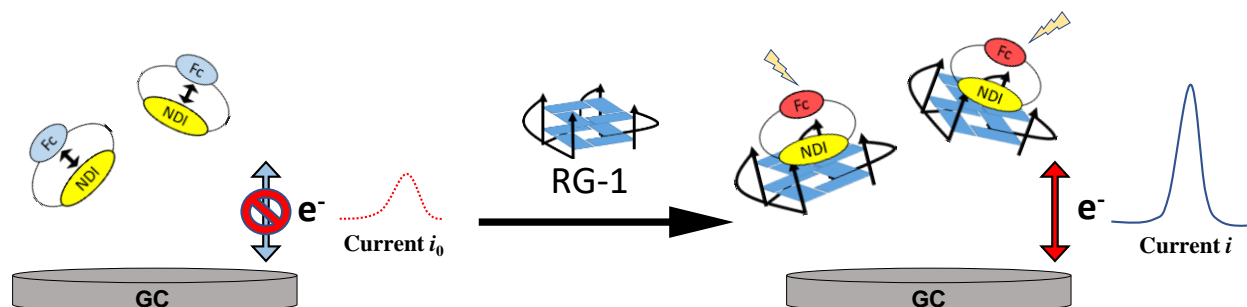


図 1. cFND によるコロナウイルス RNA G4 検出概念.

図2に**1**へのRG-1またはRG-2(5'-GGU AUG UGG AAA GGU UAU GG-3')添加に伴う吸収スペクトル変化を示した**1**は、RG-1またはRG-2添加によって70%と大きな淡色効果を示した。スペクトル変化を用いたScatchard解析によっていずれも $10^6 \text{ M}^{-1}$ 以上の結合定数を持ってSARS-CoV-2のG4 RNAに強く結合することが明らかとなった。

この結果は、**1**がRG-1に結合していることを示していた。

等温滴定型カロリメトリー(ITC)測定では、RG-1に対する**1**の結合定数は $1.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ であった。結合個数はRG-1に対して、1分子が結合していることが明らかになった。

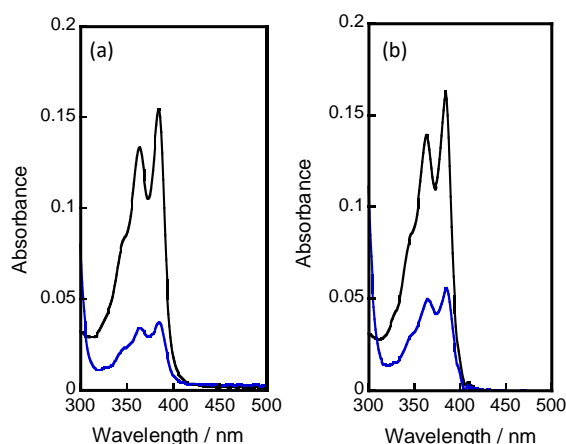


図2. SARS-CoV-2に特徴的な平行G4構造を有するRG-1(a)またはRG-2(b) (8  $\mu\text{M}$ )の非存在下、存在下での5.6  $\mu\text{M}$  **1**の吸収スペクトル。条件：10 mM Tris-HCl (pH7.2)、100 mM KCl。

そこで、GR-1の均一溶液中での電気化学測定を行った。まず、グラッシーカーボン電極を用いて、10  $\mu\text{M}$  **1**, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 100 mM KCl溶液中で1, 5, 10 nM RG-1存在下でDPV測定を行ったところ、380, 410, 460%の電流増加がみられたが、polyAの添加では電流増加は起こらなかった。図3に10 nM RG-1存在下での**1**のDPV測定結果を示した。これより、**1**によるRG-1検出の可能性が示された。

#### 4. おわりに

図4に今回設計合成したcFND2と平行G4構造との複合体のコンピューターモデル図を示した[3]。期待したようにGカルテット平面とナフタレンジイミド環とが効果的にスタッキング相互作用されている。また、フェロセン部位もG4スパーサーに対して立体障害もなく結合すると期待される。本研究では、SARS-CoV-2のRG-1とRG-2にcFND2が強く結合することができて電気化学的応用を示すことを明らかにした[3]。また、サブピコモル以下の検出感度を持つ可能性を示すことができた。

さらなる検討によって以下の手順による最終的な検査システムを確立できると考えている。

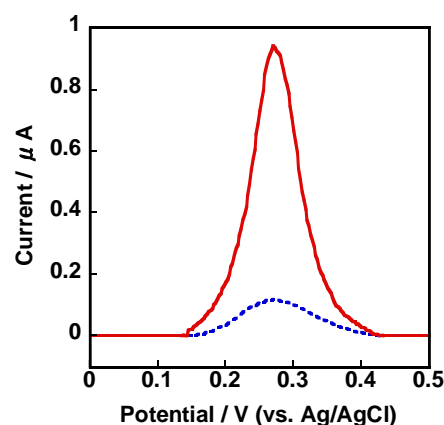


図3. RG-1非共存下(破線)と共存下(10 nM, 実線)でのグラッシーカーボン電極を用いた**1**の電気化学的測定。条件：10  $\mu\text{M}$  **1**, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 100 mM KCl。

- 1) 検体（鼻咽頭ぬぐい液・唾液など）からRNA成分を抽出する（すでにRT-qPCR用に精製キットが市販されている）
- 2) 検出試薬を加えて溶液に電極を入れて電位をかけて流

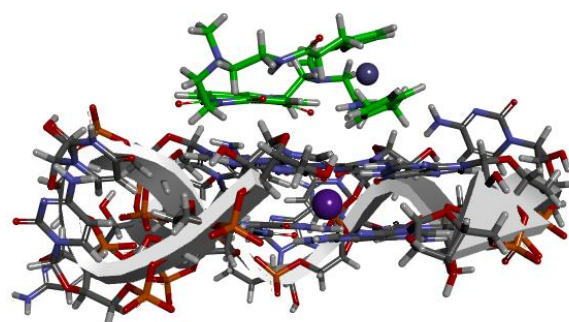


図4. cFND2とG4平行構造との複合体のコンピューターモデリング。

れる電流を検知する。

- 3) 電位によって特異性、電流によって量を定量化する。

#### 謝辞

本研究を行うにあたり、中谷財団からの助成に感謝いたします。

#### 参考文献

- [1] C. Zhao, G. Qin, J. Niu, Z. Wang, C. Wang, J. Ren, X. Qu, *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 60, 432 (2021).
- [2] S. Kaneyoshi, N. Eguchi, K. Fujimoto, S. Fujii, S. Sato, S. Takenaka, *J. Inorg. Biochem.*, 236, 111746 (2022).
- [3] S. Kaneyoshi, S. Sato, S. Takenaka, unpublished data.