

## DNA-redoxコンジュゲートを用いる電気化学遺伝子センシング

中野, 幸二  
九州大学大学院工学研究院応用化学部門

<https://hdl.handle.net/2324/7324393>

---

出版情報 : BUNSEKI KAGAKU. 51 (12), pp.1135-1144, 2002-12-05. 公益社団法人日本分析化学会  
バージョン :  
権利関係 : © 2002 The Japan Society for Analytical Chemistry



総合論文

## DNA-redox コンジュゲートを用いる電気化学遺伝子センシング

中野 幸二\*

### DNA-redox conjugate for applications to electrochemical gene sensing

Koji NAKANO\*

\*Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kyushu University, PRESTO, Japan Science and Technology Corporation co., 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581

(Received 7 August 2002, Accepted 5 September 2002)

Two examples of an electrochemical gene-sensing system are reported. They are built based on the chemistry of a DNA probe, a DNA-modified electrode and, especially, DNA conjugate formation through a DNA-DNA and a DNA-small molecule interactions to assure electrochemical sensing. A 16-mer oligodeoxynucleotide (ODN) having five successive phosphorothioate units on its 5'-terminus (**s16**) was prepared and covalently immobilized onto gold electrode surfaces through chemisorption. A ferrocenyl ODN (**f12**) was synthesized by a coupling reaction between amino-terminated ODN with an activated ester of ferrocenecarboxylic acid. The **f12** was subsequently annealed with its complementary strand, **p19**, which contains the complementary sequence to **s16**. The resulting double-strand, **p19-f12**, was used for hybridization experiments. A treatment of the **s16**-modified electrode turned it to be electroactive due to **s16-p19-f12** sandwich-type complex formation. Cyclic voltammetric (CV) measurements in an aqueous KCl solution showed reversible redox waves due to the redox reaction of the ferrocenyl moiety. On the other hand, a **s16**-modified electrode treated with the mismatch control, **m19-f12**, also showed redox waves, but only slightly (ca. 5% to **p19-f12**). These results indicate that the present sensing system is fundamentally applicable to the electrochemical detection of specific genes. Next, a ferrocenyl derivative of psoralen (**FcPso**) is described. Psoralen is a class of intercalator which forms a photoadduct with the pyrimidine bases upon UV radiation; **FcPso** is expected to be useful for the electrochemical tagging of DNA. **FcPso** was synthesized by a reaction of 4'-chloromethylated 4,5',8-trimethylpsoralen with *N,N*-dimethylaminomethylferrocene. A 5'-terminally thiolated 12-mer ODN (**e12**) was immobilized on a gold electrode surface through chemisorption. The **e12**-electrode was annealed with the complementary strand, **t12**. Although CVs measured in an aqueous KCl solution only gave capacitive currents, a **FcPso** treatment turned the electrode system redox actively; the CV peak currents due to the Faradaic reaction of the ferrocene moiety showed a linear dependence on the sweep rate of the electrode potential, indicating a surface process. On the other hand, almost no faradaic response was associated for **FcPso** treatment of the **e12**-electrode. The potential application of the electrochemical detection of a specific gene was successfully demonstrated. As a basis of gene-sensor applications, a detailed characterization of the immobilization chemistry is also presented. The results concerning IR spectral measurements and a microgravimetric analysis using a quartz-crystal microbalance are described.

**Keywords :** DNA; gene sensor; chemically modified electrode; ferrocene; DNA conjugate.

## 1 緒 言

\*九州大学大学院工学研究院応用化学部門, 科学技術振興事業団「さきがけ21」: 812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

1990年にスタートしたゲノムプロジェクトは, 多様なモデル生物に関する全ゲノム解読を達成してきた。例えば

大腸菌, 枯草菌, シアノバクテリア (らん藻), 酵母, 線虫, シロイヌナズナ, 及びショウジョウバエ等である. 最終的な目標であったヒトゲノムについても, ドラフトシーケンスが明らかになるなど, 最終仕上げの段階に入っている. このような意味で, ゲノムプロジェクトは大規模な機能解析を指向した第二期に移行しつつあり, ゲノムに書き込まれている機能情報を読み取るための様々なアプローチが既に始まっている<sup>1)</sup>. 具体的には, ヒトゲノムの多型解析に代表されるゲノム構造と機能との関連づけ, 遺伝子の調節と発現プロファイルを収集するトランスクリプトーム解析, 全タンパク質をカタログ化しそれらの相互作用 (細胞生物学的な視点から) を網羅的に調べようとするプロテオーム計画などがある.

これら第二期の研究がねらいとする生命現象では, DNA がホスト分子となる反応がキーステップになっている. DNA-DNA 相互作用に基づく標的遺伝子の認識, プロモータータンパク質の結合によってトリガーされる遺伝情報の発現・制御などにその例を見ることができる. そこでは遺伝子を取り巻くケミカルな相互作用と, それを通じた分子認識作用を効果的に検知する方法, いわゆる分子情報の読み出しが従来にも増して重要になる. しかし, DNA そのものは測定に適したユニークな性質に欠けるので, 様々な工夫を凝らすことになる. 例えば, DNA チップ・マイクロアレイといったハイスループット法を担う蛍光標識法<sup>1)</sup>, DNA 結合性の酸化還元性分子を組み合わせた電気化学遺伝子センサー<sup>2)~5)</sup>, 酵素<sup>6)</sup>や金属<sup>7)</sup>・高分子ナノ粒子<sup>8)9)</sup>といった際立った特徴のあるラベル化剤の利用などが挙げられる. ゲノム科学の今後の広がりを見込めるとき, 分析化学の分野においてもこのような取り組みに力点が置かれるべきであろう. 同時に, 分子情報の多元的な利用は分析化学が伝統的に取り扱ってきた内容でもあるので, これまでに蓄積された研究リソースを活用しての貢献が考えられる.

以前より, 著者らは“DNA=遺伝子”というイメージではなく, DNA の構造と機能から類推して“DNA=材料”にとらえ, バイオセンサーにおけるアフィニティーリガンドとしての利用について研究してきた. そのなかで, 1) 金属-硫黄配位結合を利用した新規な DNA の固定化法の確立, 2) イオンチャンネルセンサーの原理と組み合わせた分子情報の読み出し, といったアプローチをとることで, DNA を認識成分とする電気化学センサー, 例えば DNA 結合性薬物や金属イオン, 抗 DNA 抗体などに対するバイオセンサーを世界に先駆けて実現した<sup>10)~12)</sup>. 最近では“DNA=材料”という視点を更に深め, DNA と合成系低分子とのコンジュゲート形成の利用に展開させてきた. 特に, 感度や選択性, 操作性の点でトレードオフが少なく, かつコストパフォーマンスに優れた電気分析化学的

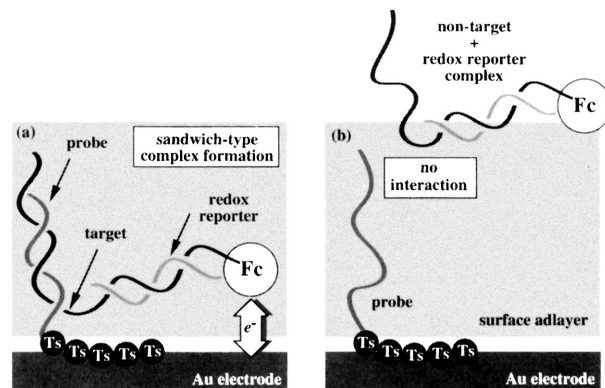


Fig. 1 Schematic illustration of electrochemical gene sensor

A redox-active ferrocene-modified oligodeoxynucleotide and an oligodeoxynucleotide anchored on a gold electrode, both of which formed a sandwich-type ternary complex with the target DNA to give a redox current (a) while ferrocenyl units are not fixed in the vicinity of the electrode surface using non-target DNA (b).

手法を中心にすえ, redox 性分子とのコンジュゲート形成に焦点をあてて研究している. 例えば, 1) フェロセン修飾オリゴヌクレオチドを用いた redox ラベル化とサンドイッチ錯体形成を利用した遺伝子の電気化学検出 (Fig. 1)<sup>13)</sup>, 2) 光橋かけ性 redox ラベル化剤としてのフェロセン修飾ソラレン (Fig. 2)<sup>14)</sup>, 3) オリゴヌクレオチドグラフト redox 性単分子膜修飾電極を用いるラベルフリーバイオセンサー (Fig. 3)<sup>15)</sup> などについて報告している.

今回, 総合論文執筆の機会を得たので, ここでは前二者の系について, これまで断片的に報告してきた内容に, 最近の成果を加味して現在までの到達点を紹介させていただく. 併せて, 関連する分野の研究の動向, 及び著者らの最近の取り組みについて紹介し今後の展望をまとめる.

## 2 実 験

### 2・1 合成オリゴデオキシヌクレオチドの調製

本研究では, 金属-硫黄配位結合による固定化を意図した化学修飾オリゴデオキシヌクレオチド (以下 ODN と略記) として, 末端チオール化 ODN, 及びホスホロチオエステル化 ODN<sup>16)</sup> の 2 種類について取り上げる. Fig. 4 に用いた ODN の構造, 塩基配列, 及び略号をまとめて示す. それぞれの用途は, まず 5' 末端をチオール化した **e12** では, プローブ DNA として金基板表面に固定化し, 相補鎖 DNA (**t12**) との相互作用を利用したターゲットの認識を意図している. 一方, ホスホロチオエステル体 **s16** を用いる系では, Fig. 1 に示すように, 電極表面に固定化した **s16** が, ターゲット DNA (**p16**), 及びフェロセン化 ODN (**f12**) を含んだ三元錯体を形成するように塩基配列

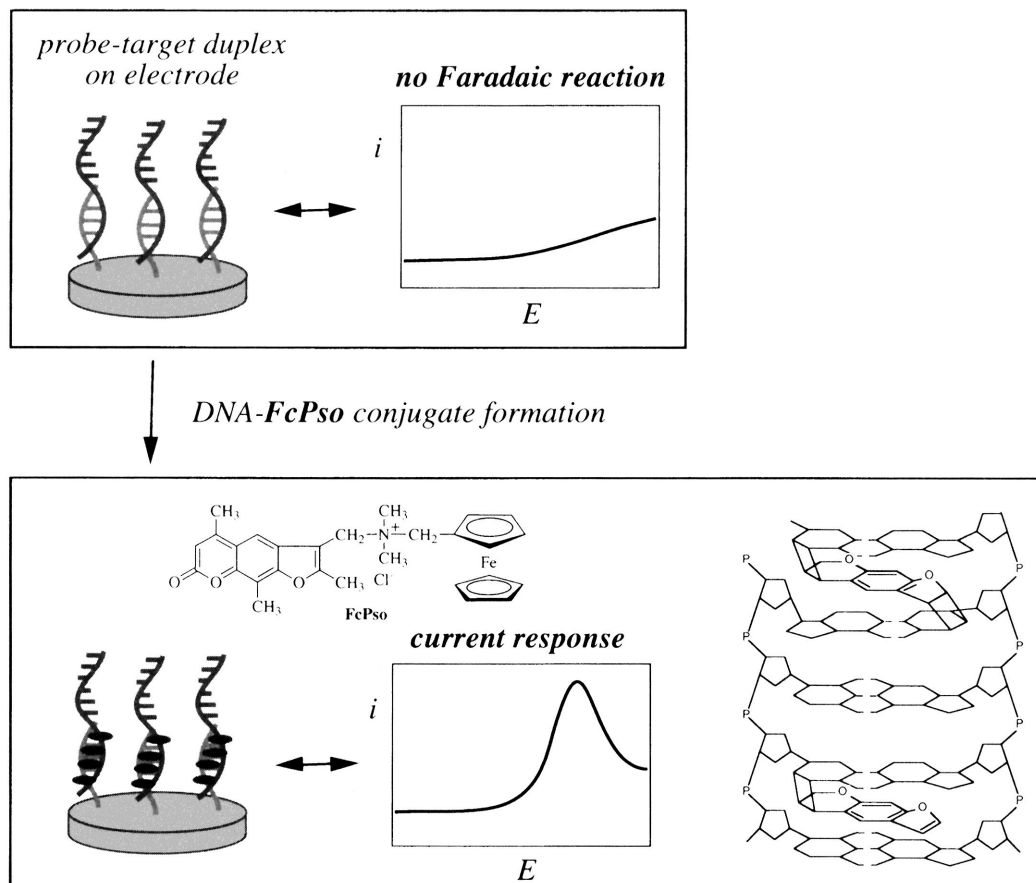


Fig. 2 DNA conjugate formation by photochemical reaction between psoralen and nucleobases and application to electrochemical gene sensing

を設計している。なお **m19** は、ターゲット DNA にミスマッチ構造を持たせたものである。

研究の初期においては、これらのオリゴヌクレオチドは、いずれもホスホロアミダイト法と組み合わせた自動合成により調製した。しかし 1990 年代半ばには、分子生物学関連の企業による合成サービスが普及し、塩基配列の指定や各種の化学修飾を含めたカスタム合成が利用できるようになった。著者らも、しだいにこれら合成品に切り替えているが、オリゴヌクレオチドの品質・純度の問題からのトラブルを経験することはごく少ない。

## 2.2 試薬の合成

上記のフェロセン修飾オリゴヌクレオチド、**f12** については、5' 末端アミノ化オリゴヌクレオチドとフェロセンカルボン酸-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルとの縮合反応により合成した<sup>13)</sup>。C<sub>18</sub> 結合シリカゲルカラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) により精製した後に使用した。一方、二重鎖 DNA に対する *redox* ラベル化剤としてフェロセニルソラレン (**FcPso**) を合成した<sup>14)</sup>。4,5',8-トリメリルソラレンの 4' 位をクロロメチル

化し、*N,N*-ジメチルアミノメチルフェロセンと反応させた。再結晶及び C<sub>18</sub> カラムを用いた RP-HPLC により精製した後に実験に使用した。

## 2.3 DNA の固定化・ハイブリダイゼーション

本研究では、1) 金蒸着ガラス基板 (甲子光学工業、膜厚 2000 Å)、2) 水晶振動子 (セイコー EG&G、基本周波数 9 MHz の振動子両面に金電極が蒸着されている)、3) 金ディスク電極 (BAS、面積 0.02 cm<sup>2</sup>) の 3 種類を用いた。これらの前処理と DNA の固定化の操作は、以下の 2 種類の方法によった。

まず金蒸着ガラス基板と水晶振動子については、自製の組立式電解セル、及び溶液測定用ホルダー (セイコー EG&G、振動子の片面だけを溶液に接合させて使用) にそれぞれセットし、0.1 M (1 M = 1 mol dm<sup>-3</sup>) 硫酸水溶液 (0.01 M KCl) 中で電解研磨した。溶液と接する電極面積は、それぞれ 0.37, 0.20 cm<sup>2</sup> である。DNA の固定化は、合成オリゴヌクレオチド水溶液 (濃度 10 ~ 50 μM, 10 mM Tris-1 mM EDTA 緩衝溶液 pH 8) 50 μl を電極に接する溶液部分に満たし、5℃ にて 12 ~ 24 時間程度放置する

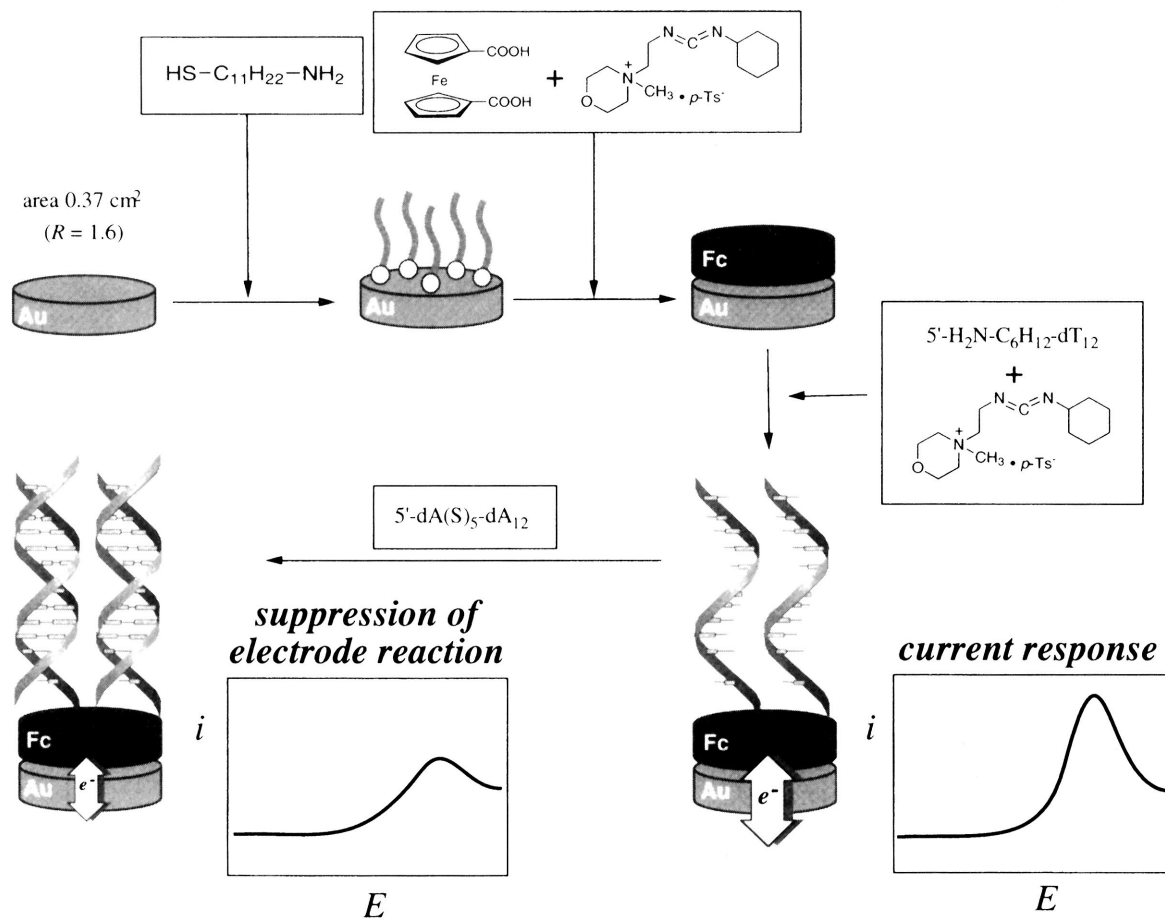


Fig. 3 Preparation of DNA-modified electrode having DNA/ferrocene/Au interfacial structure and application to label-free, electrochemical gene sensing

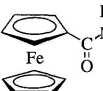
|                                    |                                                                                                                                                           |
|------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| thiol-modified DNA<br>(e12)        | HS-C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> -GCC ACC AGC TCC <sup>3'</sup>                                                                                          |
| target DNA (1)<br>(t12)            | 5'GCA GCT GGT GGC <sup>3'</sup>                                                                                                                           |
| phosphorothiolated DNA<br>(s16)    | 5'TsTsTsTsTsTCTC ATACATG <sup>3'</sup>                                                                                                                    |
| target DNA (2)<br>(p19)            | 5'CATGTAT AAAAAAAAAAAAA <sup>3'</sup>                                                                                                                     |
| non-target (mismatch) DNA<br>(m19) | 5'CATCTAT AAAAAAAAAAAAA <sup>3'</sup>                                                                                                                     |
| ferrocenyl DNA<br>(f12)            |  <chem>NC(=O)CCCCCCCCCCCCCCCCCCC</chem> TTT TTT TTT TTTT <sup>3'</sup> |

Fig. 4 Structures of DNAs.

ことで行った。上記の緩衝溶液及び超純水で十分洗浄し測定に用いた。固定化したオリゴヌクレオチドと相補鎖とのハイブリダイゼーションアッセイも同様に、電極に接する溶液部分にオリゴヌクレオチド溶液（濃度 10 μM）を満たし、60℃ で 1 時間放置の後、室温まで徐冷することでアニール化処理した。

金蒸着ガラス基板は **FcPso** による redox ラベル化実験にも使用した。DNA と **FcPso** との光橋かけ反応の際にも、セルの溶液部分を **FcPso** 水溶液（濃度 0.2 mM）で満たし、セルごと UV クロスリンカー（フナコシ）にセットし、室温下 5 分間、電極面に UV 光（365 nm）を照射した。

通常、金ディスク電極の場合には、アルミナスラリーによる研磨に、超純水中での超音波洗浄を組み合わせた前処理を行った。金ディスク電極は、ホスホロチオエステル化オリゴヌクレオチド系についてのみ使用したが、DNA の固定化はキャスト法による。前処理した電極表面に **s16** 水溶液（濃度 50 μM, 0.1 M KCl）10 μl を滴下し、室温下にて風乾させた。電極は、0.1 M KCl 水溶液に 10 分間程度浸漬することで、過剰のオリゴヌクレオチドを洗い出した。相補鎖とのハイブリダイゼーションアッセイでは、あらかじめアニール処理した濃度 50 mM **p19-f12**、又は **m19-f12** 水溶液（いずれも 5 mM Tris-0.5 mM EDTA 緩衝溶液 pH 8-100 mM KCl）に **s12** 修飾電極を浸漬することで行った（5℃, 24 h）。

## 2.4 赤外吸収スペクトル測定

高感度反射吸収法を用いて金基板上に固定化した DNA の赤外吸収 (IR) スペクトルを測定した。試料の IR 強度がごく小さく、測定雰囲気バックグラウンド吸収の影響が著しいので、試料室を含んだ分光器全体を真空中に保って測定した。使用した機器は日本分光 IR-620V 型であり、反射吸収測定用セルを組み合わせ使用した。ホルダーに試料を設置後、30 分から 1 時間程度真空中に排気した。測定は  $p$  偏光について行い、試料の法線に対し  $80^\circ$  の角度で入射させ、256 回の走査を積算して IR スペクトルを得た。

## 2.5 水晶振動子重みセンサーを用いた DNA 固定化量の測定

測定にはセイコー EG&G QCA917 型水晶振動子化学計測システムを用いた。プローブとなる一本鎖オリゴヌクレオチドの固定化、及び相補鎖とのハイブリダイゼーションに伴う重量増加は、いずれもごく小さいので、測定雰囲気の影響を可能な限り低減するために、測定はいずれも真空中で行った。同一の振動子について以下の一連の測定を行うことで結果を得た。

プローブ DNA の固定化に先立ち、前処理した振動子について共振周波数を測定した。続いて上記の手順で金電極表面にプローブ DNA を固定化した後、十分に洗浄し共振周波数の低下を測定した。ハイブリダイゼーションアッセイについても同様に、相補鎖 DNA 溶液により処理を行った後に、共振周波数の低下を測定した。Sauerbrey の式<sup>17)</sup>を用いて、測定した周波数減少を重量増加に換算した。

## 2.6 電気化学測定

測定セルは対極に白金線、参照極に銀/塩化銀 (飽和 KCl) を用いる 3 電極構成とした。BAS CV-50W 型、又はセイコー EG&G 263a 型ポテンシostat を用いて、各種の電気化学測定を行った。

それぞれの作用極の面積 (幾何学的) は既に記載したとおりであるが、測定結果をより詳細に検討するうえで電極の実効面積が必要になる。この目的に、金電極表面へのヨウ素の吸着<sup>18)</sup>を利用して、ラフネスファクター ( $R$ ) を決定した。その結果、金蒸着ガラス基板では  $R=1.6$ 、水晶振動子については  $R=1.7$  と決定できた。金ディスク電極については、やや再現性に欠ける結果であったので、類似の前処理法で報告されている値 ( $R=1.44$ )<sup>19)</sup> を用いた。

## 3 結果と考察

### 3.1 金属-硫黄配位結合を利用した DNA 固定化の特徴-IR スペクトル

以降で述べるバイオセンサーの基礎として、本研究で取り上げた 2 種類の固定化法について、IR スペクトル測定、

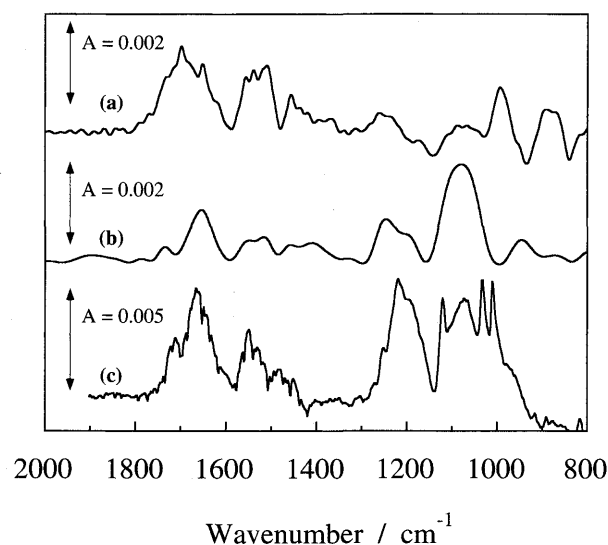


Fig. 5 IR spectra of gold substrates treated with phosphorothioester-containing oligodeoxynucleotide (**s16**) (a), thiol-terminated oligodeoxynucleotide duplex (**e12-t12**) (b), and thiol-derivatized, calf-thymus DNA (ref. 11) (c)

水晶振動子重みセンサーを用いた重量測定の結果について述べる。

Fig. 5(a) は反射吸収法により得られた **s16** 修飾基板の IR スペクトルである。吸収強度の小ささから、ややアーティファクトを含んだスペクトルとなっている。比較のために、Fig. 5(c) に、以前に報告したチオール化した仔ウシ胸せん (腺) DNA についての結果を併せて示しているが<sup>11)</sup>、特徴的な吸収は共通していることが分かる。したがって Fig. 5(a) の吸収は、オリゴヌクレオチド由来であると結論づけられる。なお Fig. 5 には示していないが、コントロールとして、ホスホロチオエステル誘導体としていない native なオリゴヌクレオチドを用いて同様の処理をした場合には、このような吸収は認められなかった。以上の結果から、オリゴヌクレオチドの固定化は、ホスホロチオエステル部位と金との相互作用によることが確認できた。含硫黄化合物からの自己組織化単分子膜形成では、チオールに限らずチオエーテル等でも化学吸着が起こることが報告されているが<sup>20)</sup>、本研究の結果もこれに準ずるものといえる。

一方、Fig. 5(b) は、**e12-t12** 修飾電極に **FcPso** を結合させたときのスペクトルである。この場合、上記の実験手順とは一部異なり、試料 DNA は二重鎖として結合させている。すなわち、溶液中にて **e12** と **t12** とを等量混合し、 $60^\circ\text{C}$ 、1 時間加熱の後に室温まで除冷し、アニール処理することで **e12-t12** 二重鎖を調製した。この溶液を用いて基板の修飾、及び固定化した **e12-t12** 二重鎖と **FcPso** との光橋かけ反応までの一連の処理を行った。

Table 1 Summary of the determination of the surface concentration using quartz-crystal microbalance (QCM) and cyclic voltammetry (CV)

| ODNs (substrate)                   | Surface concentration/ $\text{pmol cm}^{-2}$ |     |
|------------------------------------|----------------------------------------------|-----|
|                                    | QCM                                          | CV  |
| <b>s16</b> (Au)                    | 484                                          | —   |
| <b>p19-f12</b> ( <b>s16</b> /Au)   | 45                                           | 16  |
| <b>e12/t12</b> (Au)                | 24                                           | —   |
| <b>FcPso</b> ( <b>e12-t12</b> /Au) | —                                            | 115 |

得られた吸収スペクトルは、Fig. 5(c) に準ずるものであり、ホスホロチオエステル体と同様に、DNA を特徴づける吸収ピークが確認できた。しかし、IR の強度そのものが小さく、またオリゴヌクレオチドの吸収ベクトル自体が複雑なこともあり、**FcPso** 由来のピークを確認することはできなかった。構造的にも両者に明確な差異がないので、IR スペクトルから両者を区別することは困難と考えられた。なお本系でターゲットとした **t12** は肺、又は結腸しゅよう細胞の遺伝子 (K-ras12) のコドン 11 から 14 に対応するフラグメントである。電極に固定化した **e12** は、**t12** を検出するための相補鎖としている。

**FcPso** の光橋かけ反応の確認については不十分な結果にとどまったが、Fig. 5 に示した結果は、金表面にホスホロチオエステル誘導体化 DNA、及び末端チオール化 DNA が安定に吸着することを示すものである。特に前者については報告例がごく少なく、興味ある結果と考えている。なおそれぞれの吸収ピークの同定に関しては文献<sup>21)</sup>を参照にされたい。

### 3・2 金属-硫黄配位結合を利用した DNA 固定化の特徴-水晶振動子重みセンサーを用いる重量測定

前項に引き続き、水晶振動子を用いたオリゴヌクレオチドの重量測定の結果についてまとめる。なお、以降のデータはすべて、基板の *R* を補正した値である。

Table 1 に測定結果をまとめて示す。まずホスホロチオエステル誘導体 **s16** の場合、固定化状態での表面密度は  $484 \text{ pmol cm}^{-2}$  となった。この値から、電極上における **s16** の占有面積として  $34 \text{ Å}^2$ 、つまり  $5.8 \text{ Å}$  四方という値が得られる。DNA は、二重らせんの状態では直径  $20 \text{ Å}$  の剛直な円柱様構造にある。**s16** について得られた値はかなり小さいと言えるが、一本鎖状態なので二本鎖のようなコンホメーション的制約がなく、このため凝集した状態、又は鎖どうしが寄り集まった多重層として吸着しているものと考えられる。

これに対して、ハイブリダイゼーションアッセイに伴う質量増加はごく小さなものとどまった。電極上の **s16** と

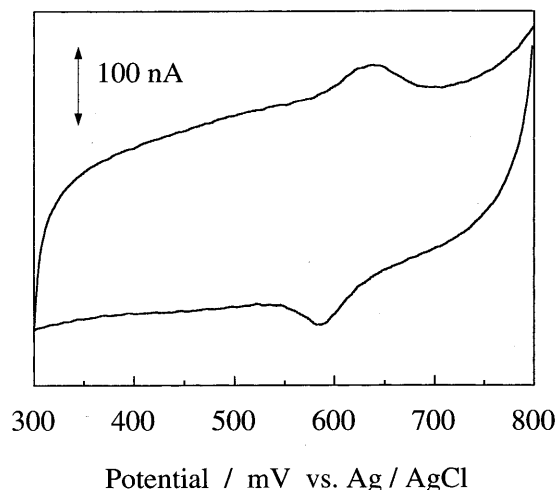
結合することが予測される **p19-f12** 二重鎖換算で、 $45 \text{ pmol cm}^{-2}$  の表面密度となった。この場合の占有面積は  $369 \text{ Å}^2$ 、つまり  $19 \text{ Å}$  四方と二重鎖についての理論値に近いものである。基板表面でランダムなコンホメーションで吸着していた **s16** が、ターゲットである **p19-f12** とハイブリダイゼーションすることで、二重らせんへのコンホメーション変化を起こした結果と言える。同時に、電極上の **s16** の一部だけが、換言すれば占有面積から規定される量の **s16** だけが **p19-f12** とハイブリダイゼーションし得ることを示している。

一方 **e12-t12** 二重鎖では  $24 \text{ pmol cm}^{-2}$  の表面密度となり、占有面積に換算して  $692 \text{ Å}^2$  であった。先に述べたように、DNA 二重らせんは直径  $20 \text{ Å}$  の剛直な円柱様構造を持つという特徴がある。そこで、単純な占有面積の比較から被覆率を見積もると 45% となる。後述するようなサイクリックボルタンメトリーでは、溶液中の redox 対の電極反応に由来するファラデー電流を電極面積に関連づけることができる。著者らの場合では、DNA の固定化に伴い 50% 程度の面積減少を経験することが多い。水晶振動子を用いた測定結果は、それに矛盾しないものであった。

以上のように、本論文で取り上げた二つの DNA 固定化法について、IR スペクトルからの定性的な確認、及び水晶振動子重みセンサーによる定量的な評価を述べた。これらの結果は、いずれも、1) 電極表面へのプローブ DNA の固定化、2) ターゲット DNA とのハイブリダイゼーション反応、及び 3) 電極表面に固定化した DNA 二重らせんと **FcPso** との光橋かけ反応といったバイオセンサーの基礎過程に関して、所定の現象が起こると考えて差し支えないことを示している。

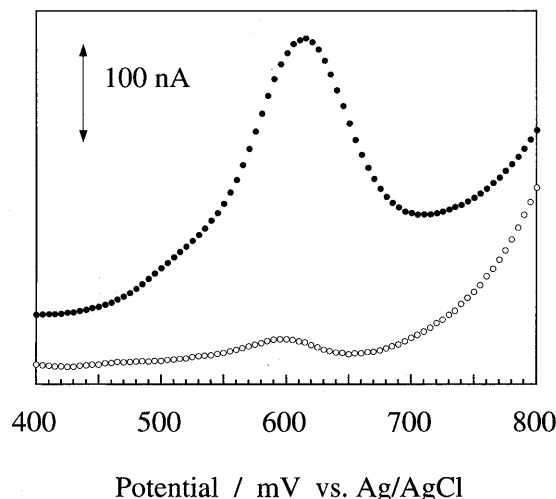
### 3・3 フェロンセン修飾オリゴヌクレオチドとのサンドイッチ錯体形成を利用した遺伝子の電気化学検出

特定遺伝子の計測を目的に、DNA 結合性を持った redox 活性な低分子と組み合わせた遺伝子センサーが、活発に研究されている。これは、電極表面での二重鎖形成を redox 性分子に対するボルタモグラムから検出するもので、DNA に対するインターカレーション作用を示すビビリジンやフェナントロリンの金属錯体を用いる例が多い<sup>2)~4)</sup>。しかしこれらのインターカレーターと DNA との反応は、可逆な平衡系であるので、測定はフリーの化学種の共存下に行わなければならない。また、非特異的に吸着した分子を洗い出すこともできず、これらのインターカレーターは、いずれも測定バックグラウンド電流の点で望ましいものではない。最近では、ビスインターカレーターや縫込型インターカレーターやなど、二重らせんからの解離反応を抑制した試薬も報告されている<sup>5)</sup>。著者らのアプローチはやや異なり、Fig. 1 に示すように、DNA-DNA 相互作用



**Fig. 6** Cyclic voltammogram for **s16**-modified electrode after formation of **s16-p19-f12**, sandwich-type complex on electrode surface

Scan rate:  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ; Temperature:  $5^\circ\text{C}$ ; Electrolyte:  $100 \text{ mM KCl}$



**Fig. 7** Differential pulse voltammogram for **s16**-modified electrode after treatment with **p19-f12** duplex (filled circle) and **m19-f12** duplex (open circle)

Pulse amplitude:  $50 \text{ mV}$ ; Pulse width:  $50 \text{ ms}$ ; Pulse period:  $200 \text{ ms}$ ; Scan rate:  $25 \text{ mV s}^{-1}$ ; Temperature:  $5^\circ\text{C}$ ; Electrolyte:  $100 \text{ mM KCl}$

用を利用したラベル化を考案した。現状ではモデル系の検討ではあるが、ハイブリダイゼーションに際して、フェロセニル化オリゴヌクレオチドを含んだサンドイッチ錯体を形成するようなデザインとしている。ターゲット DNA の認識と *redox* ラベル化が分離されているので、バックグラウンドフリーな計測が可能である。加えて、プローブ DNA ないしはターゲット DNA を直接ラベル化する方法<sup>1)</sup>と比較して、はん用性に富むメリットがある。

Fig. 6 に、最終的に形成される **s16-p19-f12** サンドイッチ錯体修飾電極のサイクリックボルタモグラムの (CV) を示す。容量性電流がかなり大きいものの、修飾電極はほぼ可逆な *redox* 波を示すことが分かる。式量酸化還元電位は  $+620 \text{ mV}$  (銀/塩化銀基準) と均一系での値よりもかなり大きくなっているが、これは金表面での自己組織化単分子膜形成を利用して調製したフェロセン修飾電極系でも共通して見られる現象である。一方、Laviron の方法<sup>22)</sup>により見積もった不均一系電子移動速度は  $0.6 \text{ s}^{-1}$  であり、比較的早い電子移動が起こる系と言える。

電流ピークを積分して得られる反応の電荷量から、*redox* 種の固定化量を見積もると、電極調製にも依存するが、 $22 \sim 55 \text{ pmol cm}^{-2}$  であった。アルミナ研磨した金電極では  $R = 1.44$  (文献値<sup>19)</sup>) であることを考慮すると、水晶振動子を用いた測定結果 ( $R = 1.7$ ) よりもやや小さな値である。現時点では推量の域を出ていないが、電極表面に存在するフェロセンユニットのすべてが反応にあずからない可能性があり、より詳細な検討が必要と考えている。なお容量性電流がかなり大きくなっているが、これは、電極に吸着した DNA 由来の陰イオン荷電の効果と考えている。

過大なバックグラウンド電流は検出限界の低下につながるため望ましくないが、以降の検討では微分パルスボルタモグラムの測定結果を用いた。

Fig. 7 は測定結果の一例である。**s16-p19-f12** 修飾電極では、Fig. 6 に準ずる特徴を持った明りょうな酸化ピークを示した。一方で、ミスマッチ構造を持った試料 DNA、**m19-f12** から調製した修飾電極では、ピーク強度が **s16-p19-f12** 修飾電極系の 5.5% とごく小さな応答にとどまった。これは **m19-f12** が、電極表面の **s16** と安定な二重鎖を形成しないためと考えられる。**s16** の認識部位は 7 塩基であるので、このうち一つのみミスマッチを明確に区別できたことになる。

### 3.4 フェロセン修飾ソラレンを用いる二重鎖 DNA 選択的な *redox* ラベル化剤

ソラレン化合物 (フロクマリン) はピリミジン塩基に親和性を持ち、 $350 \text{ nm}$  付近の光の存在下で共有結合を生成する。二本鎖を形成した DNA や RNA については、塩基対間にインターカレートし、斜めに相対するピリミジンを交差結合させる。このような性質を利用し、核酸、特に RNA 内の二次構造の解明や核酸分子間での相互作用の研究に用いられてきた<sup>23)24)</sup>。著者らはこのような性質に着目し、*redox* 活性な置換基を導入することで遺伝子センサーへの応用を図った。

基本的な考え方は Fig. 2 に示すとおりである。通常の遺伝子センサーと同じ方法論であるが、不可逆的なコンジュゲート形成が起こるので、従来の系のようにフリーの

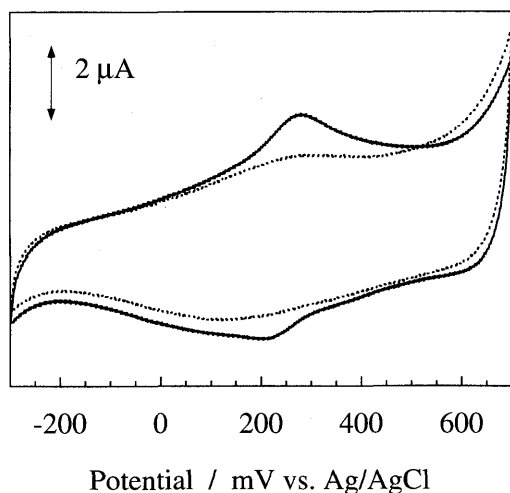


Fig. 8 Cyclic voltammogram of DNA-modified electrode prepared from **e12-t12** duplex (dotted line) and after treatment with **FcPso** (solid line)

Scan rate:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ ; Temperature: room temp.; Electrolyte: 200 mM KCl

*redox* 種を共存させる必要がない。また、非特異的に吸着した *redox* 分子を十分に洗い出すことができるので、基本的にはバックグラウンドフリーな測定が可能と考えられる。Fig. 8 は **e12-t12** 修飾電極系で得られた結果である。DNA 修飾電極単体ではほぼ容量性電流しか示さないが、**FcPso** による処理に伴い、明確な *redox* 波を示すようになることが分かる。ピーク電流値は電位掃引速度の一次に比例して増大し、酸化還元電位も +200 mV (銀/塩化銀電極) 付近と、電極表面に固定化されてフェロセニル基由来の *redox* 反応と考えて差し支えない結果であった。しかし、*redox* ピークそのものはかなりブロードであり、1) 固定化種の間での相互作用が強く酸化還元電位が一定に定まらない、又は 2) 反応種の電子移動速度に分布がある電気化学系に特徴的な結果となった。このため、ボルタモグラムの詳細な解析は困難であり、現在、測定系の最適化を図っているところである。

酸化ピークの面積から求めた *redox* 種の固定化密度は  $115 \text{ pmol cm}^{-2}$  であり、電極に固定化した **e12-t12** に対する結合比は 4.8 となった。ソラレン化合物の核酸塩基との光橋かけ反応は、チミン、ウラシルに選択的に起こり、同じピリミジン塩基でもシトシンに対する反応性は 10 分の 1 程度に低下することが知られている<sup>23)24)</sup>。**e12-t12** は二重らせんあたりチミン塩基を三つ含んでいる。定量的な議論は今後の課題であるが、今回得られた結果はソラレン化合物の反応の特徴を反映した結果と言える。なお **e12** 単体のみの修飾電極では、明確な *redox* 応答は認められなかった。このように今回、モデル系での検討ではあるが、K-ras 遺伝子の電気化学検出に成功している。

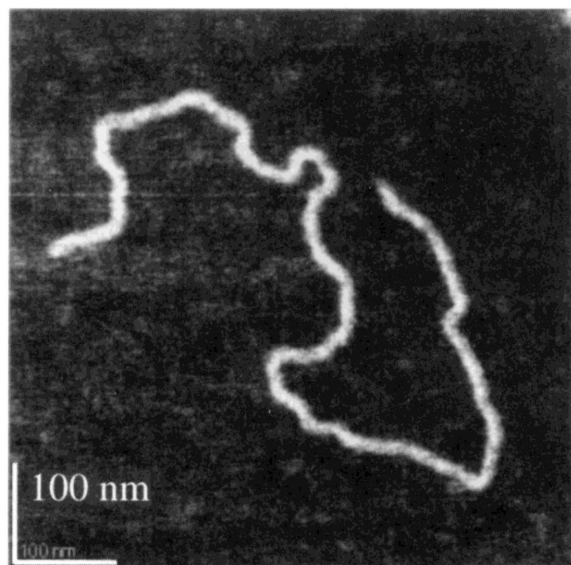
#### 4 遺伝子センシングに関する今後の展望—結論にかえて

最後に、電気分析化学の手法をベースにした遺伝子センシングについて今後の展望についてまとめてみたい。

冒頭で述べたヒトゲノム・遺伝子の機能解析にとって最も重要なのは、疾患の発症に関連する遺伝子であることは言うまでもない。研究の主流は、シアニン色素による蛍光ラベル化と組み合わせた DNA チップ・DNA マイクロアレイを利用した、網羅的な遺伝子発現解析や遺伝子多型解析であるが、その理由は、圧倒的なスループットにある。核酸の場合、塩基配列の数だけ異性体が存在することになるので、膨大な数の組み合わせについて一つ一つ実験しているのは、その解明は到底おぼつかない。電気分析化学ベースの遺伝子センサーも、マルチチャネル化、センシングアレイ化によるスループット改善が期待されるところである。表面プラズモンセンサーや水晶振動子重みセンサーでは、このような取り組みが始まっている<sup>25)26)</sup>。

現在の DNA チップや DNA マイクロアレイでは、チップ上に結合した状態での蛍光測定なので、定量性が十分とは言えない。例えばシグナルの弱いスポットは二重鎖を形成していないことになるが、二重鎖の安定性が低いためのものか、又は非塩基対部位を含んでいるためなのか区別がつかない。測定が dry な試料を対象としており、またリアルタイムにデータを得ることができないこともこの欠点を増長する。電気分析化学ベースの遺伝子センシングでこれらが克服できれば、将来のプロテオーム解析をはじめとする多様な分野において、強力な方法論を提供するものと期待される。

一方、電気化学顕微鏡は微小な電極アレイと対じ (峙) する方法論と位置づけられよう。アレイ上の DNA スポットをそれぞれ独立した作用極とするのではなく、空間分解能を持った微小な作用極を走査して、アレイ上の電気化学情報を読み取るアプローチも考えられる。著者らも、微小プローブ法の利用に着手したところである。特に AFM を中心にすえ取り組んでいる。Fig. 9 は、プラスミド DNA と **FcPso** とのコンジュゲートについて観察された AFM 像である。単一二重鎖のレベルであれば、日常的な観察が可能になっており、コンジュゲート形成と二重鎖の形態的特徴との関連で、幾つか興味深い情報が集まりつつある。生体成分、特に核酸は、複製が可能という合成系分子にはない特質がある。現時点では形態としての情報に止まるが、Fig. 9 に示すように、単一プラスミド単位での観察と反応の追跡が可能となっており、分析化学者の夢であった「単一分子ベースの分離分析法」が現実味を帯びてくる。これを見すえ、著者らは DNA のメカニカルなマニピュレーションに着手したところである。機会を改めて成果の報告を



**Fig. 9** AFM image of linearized pBR 322 DNA adsorbed on mica

AFM image was captured using JSMP 4210 scanning probe microscope (JEOL, Co.) operated under AC mode.

させていただきたい。

本研究は九州大学大学院工学研究院応用化学部門において、同部門の高木 誠教授、前田瑞夫教授（現 理化学研究所）、及び井原敏博助手（現 熊本大学工学部講師）との共同により行われたものである。また本研究の遂行にあたっては、多数の大学院学生、学部学生諸氏の協力を得た。それぞれの記載は控えるが、ここに記して衷心より感謝する次第である。本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金（No.12206008）によって行われた。また財団法人昭和シェル石油環境研究助成財団よりご援助いただいたことも付記し、併せて謝意を表する。

## 文 献

- 1) 野島 博: “ゲノム工学の基礎”, (2002), (東京化学同人).
- 2) K. Hashimoto, K. Miwa, M. Goto, Y. Ishimori: *Supramol. Chem.*, **2**, 265 (1993).
- 3) K. M. Millan, S. R. Mikkelsen: *Anal. Chem.*, **65**, 2317 (1993).
- 4) S. O. Kelley, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill: *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4830 (1999).
- 5) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo: *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 6) F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner: *Nature Biotech.*, **19**, 253 (2001).
- 7) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998).
- 8) M. Hatakeyama, K. Nakamura, S. Iwato, H. Handa, K. Fujimoto, H. Kawaguchi: *Colloids. Surf. B: Biointerfaces*, **10**, 171 (1998).
- 9) T. Mori, D. Umeno, M. Maeda: *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 261 (2001).
- 10) M. Maeda, Y. Mitsuhashi, K. Nakano, M. Takagi: *Anal. Sci.*, **8**, 83 (1992).
- 11) K. Nakano: “*Liquid Interfaces in Chemical, Biological and Pharmaceutical Applications*”, Edited by A. G. Volkov, p. 515 (2001), (Marcel Dekker, New York).
- 12) 中野幸二: ふんせき (*Bunseki*), **2001**, 125.
- 13) T. Ihara, M. Nakayama, M. Murata, K. Nakano, M. Maeda: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1997**, 1609.
- 14) K. Nakano, S. Shirakawa, S. Taguchi, M. Maeda: *Anal. Sci.*, **17** (Supplement), i291 (2002).
- 15) K. Nakano, T. Anshita, M. Nakayama, H. Irie, Y. Katayama, M. Maeda: “*ACS Symposium Series 815, Microfabricated Sensors*”, Edited by R. Kordal, A. Usmani, W. T. Law, p. 71 (2002), (American Chemical Society, Washington, D.C.).
- 16) R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan, S. L. Beaucage: *J. Am. Chem. Soc.*, **112**, 1253 (1990).
- 17) G. Sauerbrey: *Z. Phys.*, **155**, 206 (1959).
- 18) J. F. Rodriguez, T. Mebrahtu, M. P. Soriaga: *J. Electroanal. Chem.*, **233**, 283 (1987).
- 19) J. B. Schlenoff, M. Li, H. Ly: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12528 (1995).
- 20) A. Ulman: *Chem. Rev.*, **96**, 1533 (1996).
- 21) S. B. Dev, L. Walters: *Biopolymers*, **29**, 289 (1990).
- 22) E. Laviron: *J. Electroanal. Chem.*, **97**, 135 (1979).
- 23) S. T. Isaac, Che-Kun. J. Shen, J. E. Hearst, H. Rapoport: *Biochemistry*, **16**, 1058 (1977).
- 24) 中島邦夫: 蛋白質 核酸 酵素, **25**, 967 (1980).
- 25) J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn: *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 8044 (1999).
- 26) T. Tatsuma, Y. Watanabe, N. Oyama, K. Kitakizaki, M. Haba: *Anal. Chem.*, **71**, 3632 (1999).

## 要 旨

DNA 修飾電極をベースにした 2 種類の遺伝子センシングシステムについて報告する。いずれも、プローブとなる DNA を電極に固定化し、DNA 結合性を持った酸化還元活性分子 (*redox* レポーター) を併用してターゲット DNA との二重らせん形成を検出する。*redox* レポーターの化学として、ここでは DNA コンジュゲート形成に焦点をあてて検討した。まず DNA-DNA 相互作用を利用したコンジュゲート形成として、フェロセン修飾オリゴヌクレオチド (レポーター DNA) を合成した。このときのオリゴヌクレオチド部位は、ターゲット DNA の一部と相補的な塩基配列とした。これにより、ターゲット DNA が電極上のプローブ DNA、及びレポーター DNA を含んでサンドイッチ錯体を形成するようなデザインとなっている。なお、ターゲット DNA の認識には七つの塩基対形成が関与するように設計した。サンドイッチ錯体を形成させた DNA 修飾電極は、フェロセニル基由来の可逆な酸化還元波を示す一方で、認識サイトに一か所のミスマッチを持たせた場合には、応答量が著しく低下し、ターゲット DNA の検出が可能であることが分かった。次に DNA-低分子相互作用として、ソラレン化合物と核酸塩基との光橋かけ反応に着目した。ここでは、フェロセン修飾ソラレンを新規に合成し用いた。プローブ DNA を固定化した電極上でのハイブリダイゼーション反応と、ソラレン化合物とのコンジュゲート形成を組み合わせで検討した。その結果、二重鎖 DNA についてのみ明瞭な電気化学応答が見られ、プローブ DNA 単独の一本鎖では有意の応答を示さず、二重らせん形成を電気化学的に検出できることが分かった。以上の結果に加え、本研究で用いた DNA 固定化法 (金表面に対するホスホロチオエステル化 DNA、及び末端チオール化 DNA の化学吸着) について、赤外吸収スペクトル測定からの定性的な確認、及び水晶振動子重みセンサーによる定量的な評価について述べた。