

平成21年6月22日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19750068
 研究課題名 (和文) 電気化学活性団修飾核酸プローブに基づくラベル化フリー遺伝子検出法
 研究課題名 (英文) Label-free Gene Detection Method Based on Electroactive Group-Modified Nucleotide Probes
 研究代表者
 青木 寛 (AOKI HIROSHI)
 独立行政法人産業技術総合研究所・研究員
 研究者番号：00392580

研究成果の概要：現在最も利用されている DNA マイクロアレイ法は、目的の遺伝子（ターゲット）に蛍光物質を取り付け（ラベル化）、これを捕捉するプローブがアレイ状に配置された基板上に展開し、蛍光物質由来の光を頼りにターゲットの存在を知る遺伝子検出法である。しかし、ターゲットのラベル化は煩雑であり、また未反応のターゲットを徹底洗浄する必要があることから、今日ニーズの高まっている環境・臨床検査への応用には程遠く、研究所レベルの活用には留まっている。この課題を克服するため、ターゲットの認識後に電気化学信号を自ら発生するプローブを設計・合成し、ターゲットをラベル化することなく検出可能な遺伝子センサを開発した。また、複数種類のターゲットを網羅的に検出するため、遺伝子センサのアレイチップ化を行った。本研究により、迅速で簡便な遺伝子検出法の基盤技術が確立されたと考えられ、その重要性は大変大きい。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：電気化学測定、センサ、遺伝子、DNA、ラベル化フリー

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の機能を DNA レベルで解析する一般的手法として、蛍光標識に基づく DNA マイクロアレイ法が現在最も普及している。これは、ガラス板などの基板上に遺伝子配列を持つ DNA の溶液をプローブとして多数スポットしたもので、蛍光団で標識化された DNA をターゲットとして配列選択的に捕捉し、どの位置

のスポットがどれだけ蛍光を発するかを共焦点レーザー顕微鏡で観測することにより、遺伝子の発現量を網羅的に検出するものである。この手法は現在まで多くの遺伝子解析に貢献してきたが、いくつかの本質的な欠点がある。すなわち、(1) ターゲット核酸の蛍光標識を行う必要があること、(2) ハイブリッド形成しなかったターゲット核酸の

徹底洗浄が必要であり、不十分な場合にはバックグラウンドが上昇してしまうこと、(3) 上記の理由により全自動測定が困難であること、などである。特に、上記(1)(2)のような煩雑なサンプル処理を行う必要があることから、DNAチップの使用は研究施設内に留まっており、臨床検査等の現場では使われてはいない。一方、網羅的な遺伝子解析の必要性は、研究施設内に留まらず臨床や環境計測の現場でも高まりつつある。例えば、テーラーメイド医療をはじめとして患者の体質に合わせた治療の選択を可能にするファーマコゲノミクスにおいても、研究段階から実用化へと向かいつつある。しかし、数千や数万種もの遺伝子を対象とする網羅的解析にとって上記欠点は足かせであり、実用化は大いに妨げられている。現在このような煩雑なサンプル処理を大幅に省いた安価で全自動化の見込まれる新たな分析法の開発が望まれているが、開発例はごくわずかである。

本研究に関連する国内外の従来技術では、複数のDNAを網羅的に解析するための手法として、蛍光検出や表面プラズモン共鳴(SPR)などを用いる分光学的手法と電気化学活性種を用いる電気化学的手法が多く開発されている。しかしそれらの多くは、ターゲットであるDNAに分光学的性質を付加するため、標識化のプロセスを必要とする。このような手法では、標識化の工程で1種類のターゲットDNAに対して多種の化学種を複雑に組み合わせたり、未反応の標識化学種を洗浄してバックグラウンドを低く抑えたりする必要があり、複数のDNAの網羅的解析に至っては莫大な労力と費用を必要としていた。

2. 研究の目的

本研究ではこの点を解決するため、安価で省エネルギー、装置の小型化や全自動化が容易な電気化学的手法に基づき、煩雑なサンプル処理が不要で標識化が不要な(ラベル化フリー)簡便な網羅的遺伝子解析法の基盤技術を開発した。申請者は今まで、分析対象の標識化を必要としない核酸の電気化学的検出法の開発に取り組んでおり、電荷を持たないペプチド核酸(PNA)を核酸認識部位とするプローブPNAにより、高感度で高選択的な核酸センシングを実現してきた。中でも、プローブPNAとフェロセンとが繋がれたコンジュゲートを設計・合成し、ハイブリッド形成に伴うコンフォメーション変化に基づくセンサを作製した。そして、フェロセンの電子移動反応に基づく酸化還元電流値の変化から、ターゲットDNAとのハイブリッド形成が起きていることを検出することに成功した。すなわち、核酸が二重らせんを形成すると剛直な三次元構造を取ることを利用して、電気化学

活性団の電極表面での電子移動反応の起こりやすさ/にくさを指標に、ハイブリッド形成の有無を評価できた。

このフェロセン修飾プローブPNAを用いたコンフォメーション変化に基づく核酸検出センサは、ターゲットDNAの標識化を必要とせず、センサ本体単独でターゲット核酸の検出が可能のため、従来法の煩雑なサンプル処理を大幅に省く究極の核酸検出系として期待される。しかし、この系では現在、検出の際に得られるシグナルの変化が小さいという問題があることが分かっている。これは、ハイブリッド形成前後におけるフェロセンの電極からの距離の変化が小さく電子移動反応性の変化が小さいためと考えられる。そこで本研究では、電気化学活性団の電子移動反応性の変化が最も大きくなるような遺伝子検出原理を新規に開発し、ハイブリッド形成に伴うコンフォメーション変化に基づく高感度・高選択的な遺伝子検出法としてさらに発展させることを提案した。また、網羅的な遺伝子検出法への展開を目指し、遺伝子センサのアレイチップ化を行った。

本研究で開発する手法の特色は、標識化や洗浄が不要であるのみならず、プローブを固定して作製したセンサのみでターゲットDNAの検出が可能であるうえに、電気化学的手法に基づくため小型で簡便な点である。このように、ハイブリッド形成に伴うコンフォメーション変化に基づき、高選択的で高感度にターゲットDNAを検出する電気化学活性団-プローブPNAコンジュゲートを新規に開発することで、ターゲットDNAの標識化を行わずに効率的で網羅的な遺伝子解析を行おうとする本研究の試みは、蛍光標識に基づく現行法の欠点を根本的に解消しようとする点で独創的であり、学術的にも意義深い。

3. 研究の方法

本研究は、(1)遺伝子検出法の開発(平成19年度)および(2)遺伝子センサのアレイチップ化(平成20年度)に分けられる。以下、それぞれについて述べる。

(1)平成19年度:フェロセンを修飾したプローブPNA(Fc-PNA、配列:Fc-O-GCA ACC TTC CCT ATT ACT CCA C-O-Cys-NH₂、Fc、Cys、Oはそれぞれフェロセン、システイン、エチレンジリコールリンカーを表す)を遺伝子プローブとして合成した。フェロセン修飾プローブPNAの構造は図1の通りである。また、Fc-PNAと相補的な配列を有するDNAをターゲットDNA(5'-GTG GAG TAA TAG GGA AGG TTG C-3')、非相補な配列を有するDNAをミスマッチDNA(5'-AGA CAG CAA TAA CCA CAG TA-3')として用いた。さらに、電気化学信号を増幅す

る電子供与体として、1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ を用いた。遺伝子センサは、金ディスク電極に Fc-PNA および短鎖チオール (11-HUT、11-hydroxy-1-undecanethiol) を修飾して作製した。電気化学測定は 0.1 M NaClO_4 + 2.5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を電解質溶液として用い、サイクリックボルタンメトリにより評価した。

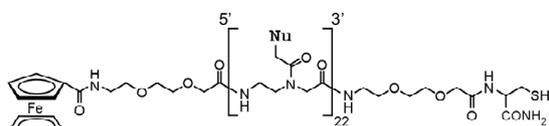


図 1 : 遺伝子プローブ (Fc-PNA) の構造

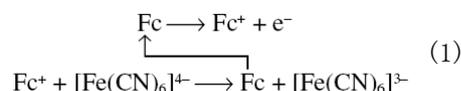
(2)平成 20 年度:マイクロ電極アレイ (96 (= 8×12) ch、電極直径: 280 μm、電極間隔: 1 mm) はスパッタ成膜法、光リソグラフィおよびエッチングにより作製した。マイクロ電極上への遺伝子プローブの固定は、8 連キャピラリー式ピッチ可変型アレイスポット (図 2) を開発し、これを用いて、遺伝子プローブおよび短鎖チオール (6-HHT、6-hydroxy-1-hexanol) の微量溶液を非接触滴下し、自己集合膜を作製することで行った。遺伝子プローブはプローブ 1 (Cys-0-TAC TGT GGT TAT TGC TGT CT -NH₂) およびプローブ 2 (Cys-0-GCA ACC TTC CCT ATT ACT CCA C-NH₂) を用いた。また、プローブ 1 と相補的な配列を有する DNA をターゲット DNA (5' -GTG GAG TAA TAG GGA AGG TTG C-3') として用いた。電気化学測定は 8 連ポテンショスタットにより 12 回に切り替えつつ行い (8×12=全 96 電極分の測定)、1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ を電気化学活性マーカーとして含む 0.1 M NaClO_4 + 2.5 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) を電解質溶液として用いて、サイクリックボルタンメトリにより評価した。



図 2 : 開発した 8 連キャピラリー式ピッチ可変型アレイスポット

4. 研究成果

(1)平成 19 年度:フェロセン修飾核酸プローブに基づく遺伝子検出法の開発を行った。遺伝子検出法の開発では、ペプチド核酸 (PNA) をターゲット DNA 認識部位とし、一端にフェロセン他端にシステインを有するプローブ (Fc-PNA) を合成した。鏡面研磨した金電極表面上に Fc-PNA を固定し緩衝液中で電気化学測定した結果、0.45 V 付近にフェロセンに由来する酸化還元波が観測された (図 3 実線)。一方、ターゲット DNA とハイブリッド形成すると、観測される波は減少した。これは詳細な検討から、ハイブリッド形成により Fc-PNA の柔軟性が減少し剛直化 (コンフォメーション変化) したことで、フェロセンの電極表面への接近が阻害されたためであると結論付けられた。そこで、フェロセンへの電子供与体である $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ を溶液に加え、電気化学信号の増幅が図れるかどうか検討した。その結果、ハイブリッド形成の有無での信号変化が約 2 倍増幅することに成功した (図 3 実線および破線)。これは、フェロセンが電極表面に接近している時には、電子移動後のフェロセンが $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ により再生されるため (式 1)、フェロセンが $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ の電子移動反応のメディエータとして働き、観測される電流値は増幅されるが、フェロセンが表面から離れると、もはやフェロセン- $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 間の電子授受が行われなくなるためであると考えられる (図 4)。



この信号増幅には、DNA との結合により表面が負電荷を得た結果、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ の表面近傍濃度が実質減少した効果も含まれると考えられる。また、ミスマッチ DNA に対してはほとんど応答が観測されなかったことから、配列特異性を有することも確認された。この手法は、ラベル化することなく (ラベル化フリー) 配列特異的にターゲット DNA を検出することができるため、簡便な遺伝子検出法の基盤技術として重要な成果である。

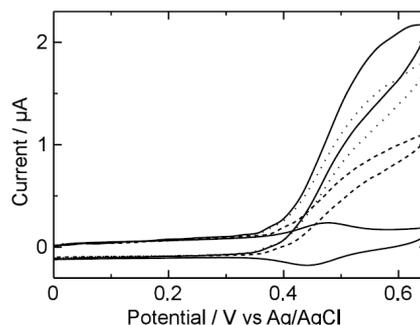


図 3 : Fc-PNA のみの場合および $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$

を加えた場合（実線）、酸化還元電流値はターゲット DNA を加えると減少し（破線）、ミスマッチ DNA では回復する（点線）。

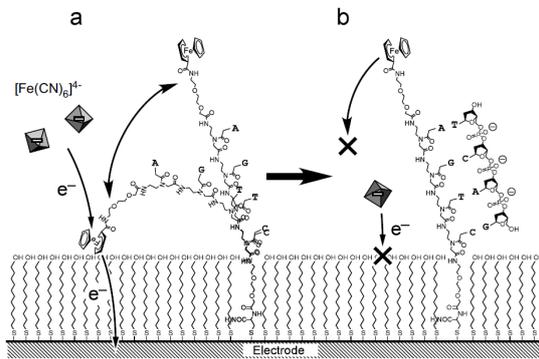


図4：検出原理。一本鎖時には Fc-PNA が柔軟な構造を取るためフェロセンを介しての $[Fe(CN)_6]^{4-}$ の酸化還元電流値が観測されるが (a)、二本鎖時には剛直な構造となり観測される電流値は減少する (b)。

(2)平成 20 年度：複数のターゲット遺伝子を対象としたセンサアレイの作製を目指し、開発した遺伝子プローブをマルチ電極上に固定し、遺伝子センサアレイチップの研究開発を行った。再現性の高いデータを効率的に収集するため、スパッタ成膜法によりガラス基板上に金薄膜を作製し光リソグラフィーの手法を用いることにより、マイクロ電極アレイを作製した。このマイクロ電極表面上に複数種類の遺伝子プローブを固定するため、キャピラリーに基づくピッチ可変型の高集積アレイスポット技術を別途開発し、1 mm 間隔に配列した 96 ch 遺伝子センサアレイチップを作製することができた (図 5 a)。従来スポット技術にはピペットチップが使用されるため、微小領域に微量液滴をスポットすることは困難であったが、今回キャピラリーを吐出口とするアレイスポットを開発したことで、このような機能性合成プローブの高集積度スポットが初めて可能となった (図 5 b)。この手法に基づき、異なるターゲット DNA を対象とする遺伝子プローブに基づくセンサを作製した。ここでは、フェロセンを持たないプローブ PNA (プローブ 1、2) を用い、ターゲット DNA と二本鎖を形成することで、DNA が有する負電荷により電極表面電荷が負に変化することを利用して検出を行った。(1)・(3)列にプローブ 1、(2)・(4)列にプローブ 2 を修飾し、ターゲット DNA と反応させたところ、電極表面が負電荷を帯びた (2)・(4)列の遺伝子センサにおいて、静電的斥力により $[Fe(CN)_6]^{4-}$ マーカーの酸化還元電流値が大きく減少し、配列選択的に電気化学検出することに成功した (図 6)。本研究の遺伝子プローブのように機能性合成プローブに

基づく電気化学遺伝子センサは、従来適切なプローブ固定化技術が未熟であるため高集積に作製することがボトルネックとなり、従ってセンサアレイチップ化が困難であった。今回、高集積アレイスポット技術を開発することで、従来の蛍光を利用した DNA マイクロアレイ法に対抗しうる電気化学遺伝子センサアレイの作製への道が開けたものと考えられ、本研究成果の意義は大変大きい。

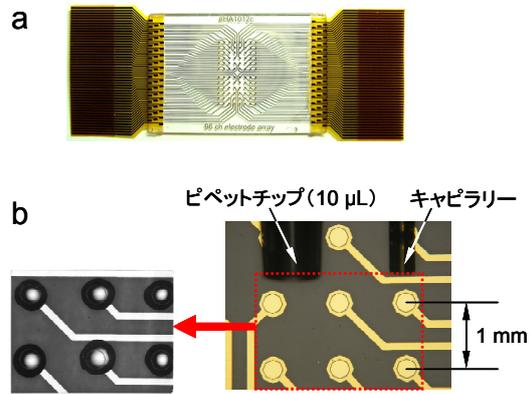


図5：(a)開発した遺伝子センサアレイチップ。中央に 8×12 のマイクロ電極アレイを作製。(b)マイクロ電極上に遺伝子プローブ溶液 (50 nL) をスポット。本法で用いたキャピラリーやピペットチップとサイズを比較。

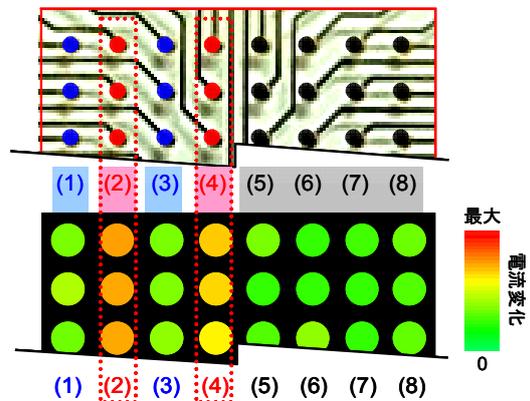


図6：遺伝子センサアレイによる遺伝子検出の結果。ターゲット DNA に応答する (2)・(4) のセンサのみ、大きな電流変化が観測された。

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 3 件)

- ① Hiroshi AOKI, Hiroaki SATO, Atsushi NEMOTO, Takashi IKEDA, and Hiroaki TAO, "Application of High-density Sample Spotting to Laser Desorption/Ionization Mass

Spectrometry”, Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan, 56, 2008, 223-228, 査読有

- ② Hiroshi AOKI, Takashi IKEDA, Masaki TORIMURA, and Hiroaki TAO, “Variable-pitch Dispensing Workstation and its Application to the Preparation of Microsensor Arrays”, Analytical Sciences, 24, 2008, 817-821, 査読有
- ③ Hiroshi AOKI and Hiroaki TAO, “Signal Enhancement for Gene Detection Based on a Redox Reaction of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ Mediated by Ferrocene at the Terminal of a Peptide Nucleic Acid as a Probe with Hybridization-amenable Conformational Flexibility”, Analytical Sciences, 24, 2008, 929-933, 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① 青木 寛、佐藤浩昭、鳥村政基、田尾博明「微量高精度アレイスポット技術とバイオ分析の新たな可能性」、第 3 回ナノバイオデバイス・ワークショップ、2008 年 12 月 12 日、つくば
- ② 青木 寛、佐藤浩昭、根本淳史、鳥村政基、池田隆至、田尾博明「ハイスループット分析用ピッチ可変型アレイスポットの開発とバイオ分析への応用」、日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 11 日、福岡
- ③ 青木 寛、鳥村政基、田尾博明「微量試料の高集積スポット技術による遺伝子センサアレイチップの開発」第 2 回化学センサー・バイオセンサーおよび計測技術合同ワークショップ、2008 年 9 月 5 日、東京
- ④ 青木 寛、佐藤浩昭、池田隆至、根本淳史、西尾香織、田尾博明「キャピラリー式ピッチ可変型アレイスポットの開発と質量分析法への応用」第 56 回質量分析学会、2008 年 5 月 14 日、つくば
- ⑤ 青木 寛、田尾博明「遺伝子検出に向けた“self-report”型核酸プローブの開発」、日本分析化学会第 56 年会、2007 年 9 月 19 日、徳島
- ⑥ Hiroshi AOKI and Hiroaki TAO, “Label- and Marker-Free DNA Detection: Development of a Self-Reporting PNA Probe”, The 58th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2007 年 9 月 10 日、カ

ナダ・バンフ

- ⑦ 青木 寛、田尾博明「“Self-report”型プローブ PNA に基づくオリゴ DNA 検出技術—ラベル化不要・マーカー不要の核酸検出技術」、第 2 回ナノバイオデバイス・ワークショップ、2007 年 8 月 1 日、東京
- ⑧ 青木 寛、田尾博明「“Self-report”型プローブ PNA に基づく DNA 検出法」、第 1 回化学センサー・バイオセンサーおよび計測技術合同ワークショップ、2007 年 7 月 13 日、横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

①

名称: A Dispensing Apparatus and a Dispensing Method

発明者: 青木 寛、田尾博明、鳥村政基、池田隆至

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 12/201522

出願年月日: 2008 年 8 月 29 日

国内外の別: 国外 (米国)

②

名称: 電気化学分子認識プローブ

発明者: 青木 寛、田尾博明

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2008-168546

出願年月日: 2008 年 6 月 27 日

国内外の別: 国内

[その他]

- ① 優秀ポスター、化学センサー・バイオセンサー研究会、青木 寛、田尾博明、2007 年 7 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 寛 (AOKI HIROSHI)

産業技術総合研究所・研究員

研究者番号: 00392580

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし