

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20350042

研究課題名(和文) ナノカーボン薄膜電極を用いたメチル化DNA定量デバイスの開発

研究課題名(英文) Development of DNA methylation measurement device using nano-carbon film electrode

研究代表者

丹羽 修 (NIWA OSAMU)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長

研究者番号：70392644

研究成果の概要(和文)：電子サイクロトロン共鳴(EVR)スパッタ法を用いて作製したナノカーボン薄膜を用いた直接電気化学測定によるDNAメチル化測定法を開発した。本法は、シトシンとメチルシトシンの酸化電位の差を利用して非標識で定量を行う。電気化学的な前処理を最適化し、24merの網膜芽細胞腫遺伝子(RB1)中の1塩基のメチルシトシン検出に成功した。また、メチル化率の異なるCpG配列(60mer)のメチル化率を定量することができた。感度向上の為、CpG配列を有するオリゴヌクレオチドを酵素(Exonuclease P1)で分解した後、電気化学検出を行った。また、DNAメチル化検出デバイスの検出器として、生体分子吸着を抑制し、高い感度を有するナノカーボン薄膜をベースとしたマイクロディスク電極を開発した。

研究成果の概要(英文)：We developed direct electrochemical detection of DNA methylation using nanocarbon film formed by electron cyclotron resonance(ECR) sputtering. The developed method is based on oxidation potential difference between cytosine and methylated cytosine without any labeling. By optimizing electrode surface using electrochemical pretreatment, we used this film to quantitatively detect single cytosine methylation regardless of the methylation position in the sequence including retinoblastoma gene fragment (24 mer). The nanocarbon film electrode also allowed us to realize the detection of DNA methylation ratios by measuring methylated 5'-cytosine-phosphoguanosine (CpG) repetition oligonucleotides (60 mer) with different methylation ratio. To improve the sensitivity for detecting the bases in the CpG oligonucleotides, we successfully used an exonuclease P1 to digest the target CpG oligonucleotide to an identical mononucleotide 5'-NMP. To develop the DNA methylation detection device, the microdisk array electrode which further improves sensitivity was fabricated using nanocarbon film which suppress biomolecules adsorption.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：メチル化DNA、チップ分析、電気化学検出、センサ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、DNA などへの後天的な化学修飾が遺伝子発現の制御に著しい影響を及ぼすことが明らかとなってきた。エピジェネティクス機構と呼ばれるこれらの現象は、主に DNA のメチル化修飾、ヒストンのアセチル化やメチル化などが知られており、塩基配列を変えることなく、タンパク質合成に必要な RNA への転写を調節することで、遺伝子発現を制御している。

(2) DNA 中のメチル化計測法は、(1)制限酵素を用いて非メチル化認識配列を切断して調べる方法、(2)亜硫酸水素塩(bisulfite)を用いて非メチル化シトシンを加水分解する方法に分けられる。

(3) 前者は、メチル化感受性もしくは非感受性の制限酵素を用いる方法で、認識配列中のシトシンがメチル化されていると、制限酵素による切断活性が変化することを利用して、生じた DNA 断片を電気泳動後、サザンブロッティング等により目的のフラグメント鎖長を測定することで、メチル化部位を検出する (PNAS, 1997, 94, 2284-89)。反応時間は、一般的に数時間程度であるが、微量な試料 DNA を用いた検出は困難で、PCR 増幅が必要である。

(4) 一方、後者は、現在最も一般的に用いられており、試料 DNA に bisulfite 処理を行なうとメチルシトシンは変換されず、シトシンのみがウラシルに変換されることを利用している。しかしながら、シーケンス操作が煩雑で、混合系での検出が困難で、時間がかかる課題があった。

(5) 代表者らは、電子サイクロトロン共鳴 (ECR) スパッタ法で作製したナノカーボン薄膜が、DNA の全ての塩基を酸化定量でき、メチル化シトシンとシトシンも酸化できることを見出した。

(6) この電極を用いて、DNA を構成する 4 つの塩基と RNA の構成塩基であるウラシルの電気化学測定を行うと、メチル基が一つ付加しているか否かで酸化電位が大きく異なることを見出し、それをシトシンに応用するとシトシンとメチルシトシンの識別が、電位の差で非標識で識別できると考えて本提案に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、従来測定が煩雑な DNA 中のメチル化量 (メチルシトシン) を、メチル化していないシトシン塩基との酸化電位の差を

利用して、電気化学的に (酸化電流の大きさにより) 測定する簡便な方法を実現する為、電位窓が広く DNA に対して電子移動速度の大きいナノカーボン薄膜電極、及び、それを利用したデバイスを開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) CG 繰り返しユニットを有し、一部がメチル化されたオリゴヌクレオチド中のメチル化、及び非メチル化シトシンの電気化学的な定量可能なことを実証し、既存の方法と比較する。また、その方法での検出限界を把握する。更に検出原価向上の為に最適なナノカーボン膜の作製条件を把握する。また、最適化したナノカーボン薄膜電極を用いて、測定可能な DNA 鎖長を把握する。

(2) シトシンは、高い酸化電位を有するが、メチル化により、酸化電位は低下し、アデニンなど他の塩基の酸化ピークと重なる可能性がある。そこで、他の塩基との信号の分離法を検討する。具体的には、メチル化シトシンを含まない標準 DNA との差分測定により、メチル化率を算出する。濃度の異なる場合は、グアニンのピークで規格化し、算出する。

(3) DNA の鎖長が増加すると、電気化学反応の際に、電極上での吸着が無視できず、定量性が損なわれる。そこで、酵素で、適当な長さに DNA を切断後、アンペロメトリーを行い、断片化されたオリゴヌクレオチド中のメチル化、及び非メチル化シトシンを定量する。また、集積したマイクロ電極アレイデバイスを開発し、微量な試料での測定を実証する。

## 4. 研究成果

### (1)メチル化シトシンとシトシンの電気化学的な識別の可否検討

科研費申請後、モノヌクレオチドを用いて、シトシンとメチル化シトシンの電気化学反応を調べた。シトシンの酸化電位は、極めて高く、通常電気化学測定に用いる金や白金などの金属電極、或いはグラッシーカーボン電極では、電極が先に参加される為に測定は困難であった。そこで、申請者らが開発したナノカーボン薄膜を電極に利用した。この膜は、ECR スパッタ法で形成し、電位窓がホウ素ドープダイヤモンド (BDD) 電極並みに広く、生体分子など比較的分子量の大きな測定対象が電極に吸着し、感度が低下するのを抑制することが可能である。図 1 にメチルシトシンを含む DNA の構成塩基を含むモノヌクレオチドを電気化学的に測定した結果を示す。図の様に、シトシンがメチル化されると、酸化電位は、約 150 mV も低下し、シトシンと明確

に識別できることが分かった。また、G, A, T などの他の塩基を含むモノヌクレオチドと比較しても酸化電位が異なること、T と最も酸化電位に近いことなどが分かった。

一方、比較例として市販の GC 電極を用いて測定を行ったところ、G, A までは定量が可能で酸化電位も大きいことが分かったが、電位窓が足りないために、mC や T より酸化電位の大きい塩基の定量は極めて困難であった。

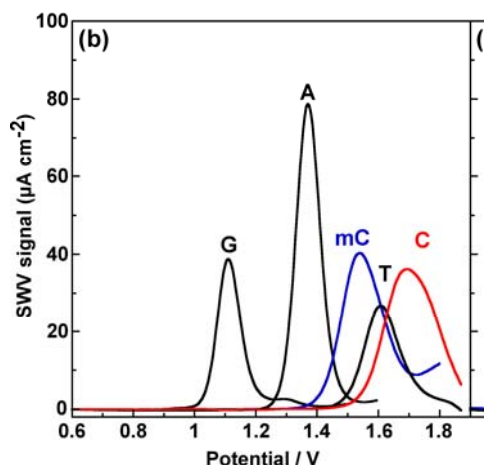


図 1. 矩形波ボルタンメトリ (SWV) 法による DNA を構成する各ヌクレオチドの測定結果

一方、電位窓の広い BDD 電極では、DNA を構成する全ての塩基を直接酸化により測定できるが、電子移動が遅いため、ピークがブロードになり感度やピークの分離が悪く、ナノカーボン薄膜に比べて定量性が大きく劣っていることが分かった。

## (2) 電極表面構造と DNA の電気化学応答

以上の結果により、ナノカーボン膜を用いると、① DNA を構成する各塩基を定量可能であること、② シトシンよメチル化シトシンを電気化学的に識別可能となったため、次に数 mer 中のメチルシトシンとシトシンの識別を試みたところ、一塩基のメチルシトシンを識別可能であることが分かった。また、T や A など、メチル化シトシンと酸化電位に近い塩基を配列中に含むオリゴヌクレオチドにおいてもメチル化シトシンを含まない配列の電気化学応答との差を測定すると容易に 1 塩基の違いを識別できた。

実際に意味のある配列を有するオリゴヌクレオチドでは、より長い配列での測定を行う必要がある。しかしながら、分子量が増大すると①オリゴヌクレオチドと電極間での電子移動速度の低下や電極表面への吸着による感度低下が無視できない可能性がある。

そこで、表面を窒素、酸素、フッ素などで末端化したナノカーボン膜を作製し、その電気化学特性を調べた。表面の酸素化は、高い

電位を溶液中で印加し電気化学的に行った。窒素化は、スパッタ時に少量の窒素ガスをスパッタガスであるアルゴンガス中に混在させてスパッタを行い、カーボン膜中に窒素を含有させた。また、フッ素化は、ナノカーボン膜を形成後、4 フッ化メタンのプラズマ中で極短時間処理して表面をフッ素化した。それぞれを比較したところ、

- ① 表面のフッ素化は、電位窓を拡大するメリットがあるが、電気化学応答（界面での電子移動）を大きく低下させ、本目的に適さない。
- ② 窒素化膜では、電子移動速度が優位に向上し、ピークがシャープになることが、確認された。しかしながら、窒素化により電位窓が若干低下し、酸化電位の高いシトシンなどの測定が難しくなった。
- ③ 電気化学的な活性化による酸素の表面への導入では、窒素化と同様、DNA の各塩基との電子移動は増加した。また、活性化による電位窓の低下は、あまり見られなかった。よって、メチル化 DNA の測定は、電気化学活性化したナノカーボン膜により行った。

## (3) 比較的長い鎖長を有するオリゴヌクレオチド中のメチル化シトシンの検出

前節で、電気化学活性化した ECR スパッタナノカーボン膜を用いて、オリゴヌクレオチドの電気化学酸化を行った時の電極の安定性を評価した。

図 2 に、13mer の配列 (5' -CGAACCCAGGC-3') を測定した際の結果を示す。電

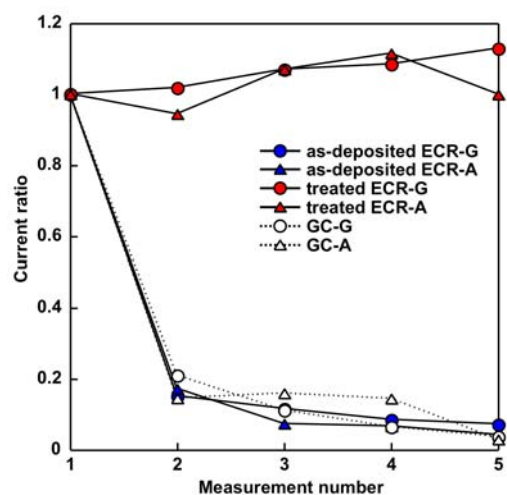


図 2. 13mer のオリゴヌクレオチドを矩形波ボルタンメトリ (SWV) で測定した際の G, A の感度変化、濃度: 5 µM, pH3.3, 50mM 酢酸緩衝溶液中、各測定間で、電極を純水でリンス

極は、①スパッタ後、未処理のナノカーボン電極、②電気化学処理したナノカーボン電極、③GC電極を用い、GとAの酸化ピークをプロットした。その結果、GC電極と未処理のナノカーボン薄膜電極では、測定回数2回で電流値は大幅に低下するのに対して、電気化学処理したナノカーボン電極では、僅かに変化するものの、G、Aの応答共に測定回数にあまり依存しないことが分かった。これは、オリゴヌクレオチドが酸化された後、電極上に強く吸着しにくいことを示唆している。

次に、実在する配列である、RBI (retinoblastoma) オリゴヌクレオチドの配列と、メチル化頻度の高い中央部分をメチルシトシンに置き換えた(1塩基)配列の2種類のオリゴヌクレオチドを合成し、電気化学的な識別の可否を行った。RBI遺伝子は、神経芽細胞腫の抑制に関わる遺伝子として知られ、メチル化され易いホットスポットを有する。合成した配列は、

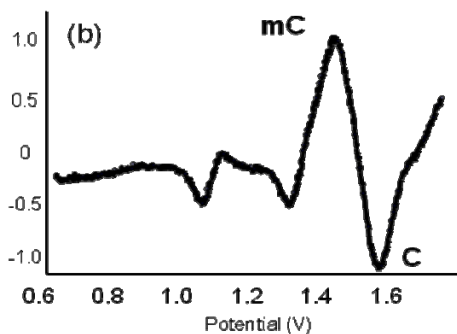
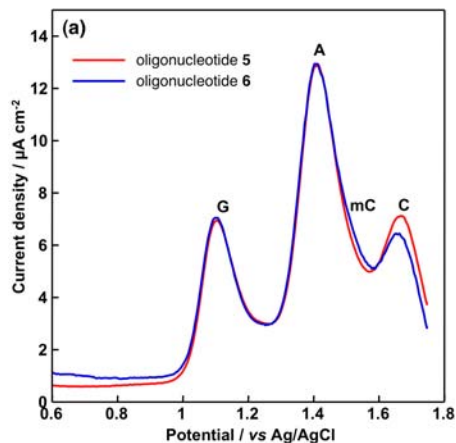


図3. 1塩基がメチル化されたRBI配列のオリゴヌクレオチド(24mer)のSWV測定結果の非メチル化配列との応答比較、(a):バックグラウンドを差し引いたSWV応答(3 μM)、(b)差分応答

で3'末端から12番目がメチル化されている。そのSWV測定結果と差分を図3のA、Bに示す。図3(a)でもメチルシトシンに相当する1.45V付近のピークが6では、やや高く、シトシンに相当する1.7V弱のピークでは、5がやや高く、24merの実在する配列でも1塩基のメチル化が非標識で電気化学直接酸化により測定できることが分かった。図3(a)では、ややピークが見にくいですが、図3(b)に示す様に両者のピークの差分をとると1塩基の違いがより明確化することも確認した。

次に、より長い配列として、60merのCpG配列を有するオリゴヌクレオチドで、そのシトシンのメチル化率を変化させたものを合成し、メチル化率とメチルシトシンの応答に基づく電流値の変化を調べた。その結果を図4に示す。その結果、メチル化率と電流値の

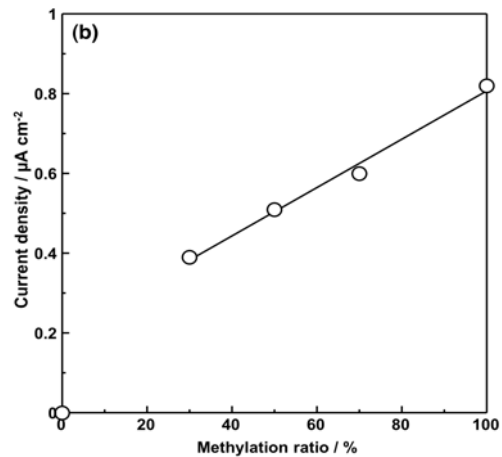


図4. CpG配列(60mer)のメチル化率とメチルシトシンの酸化による電流値の関係、試料2 μM, pH4.4酢酸緩衝溶液

関係には、明確な比例関係が得られ、電気化学直接酸化によって、DNA中のシトシンのメチル化率が定量できる可能性を得た。また、通常、ボルタンメトリやアンペロメトリ等の電流を計測する方式の電気化学測定を利用した生体分子検出では、分子量が数百程度の小分子を計測するのが一般的である。60merのオリゴヌクレオチドは、分子量1万を遥かに超えており、この様に分子量が比較的に大きな生体分子を定量性良く、電気化学的に直接定量することはこれまで報告例が無く、簡便で安価な電気化学計測の応用範囲を大きく広げる可能性を得たことは、本研究の大きな成果と考えている。

しかしながら、分子量が大きくなると、含まれる全ての塩基が酸化されている訳ではなく、平均的にある割合が電気化学的に酸化されて、メチル化率が測定できることが分かった。その割合は、モノヌクレオチドから20mer, 60merと分子量が増加するにつれて、

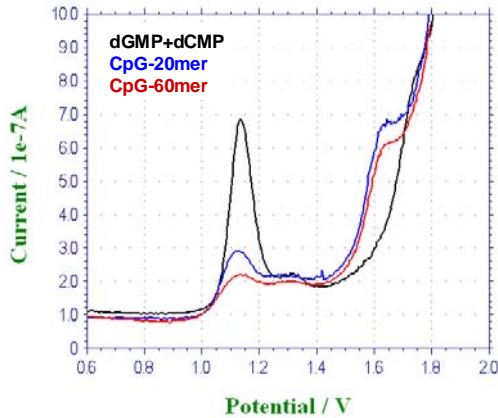


図5. 等量の塩基(G, C)を含むモノヌクレオチド、オリゴヌクレオチド (各 CpG 配列、20 mer と 60 mer) の電流応答(SWV)の比較

大きく低下することを確認した (図5)。そこで、配列を一度酵素 (Exonuclease) で、モノヌクレアーゼに分解した後、定量を行ったところ、感度は、4.4 倍に増加し、60 mer の CpG 配列でも 1 塩基のメチル化の差を観測できることが分かった。

#### (4) 電気化学デバイス化の検討

以上の結果を基に、DNA メチル化検出デバイスの要素技術の検討を行った。将来の応用に向けて、まず課題となるのは感度である。従来より、一般的な電気化学測定において、



図6. 作製した MDA 電極の AFM 像 (左)。アレイの SEM 写真 (右)、ディスク直径 10 μm 間隔:100 μm, 個数:335 個

電極を微小化すると検出限界が向上することが知られている。その一方、絶対的な電流値は低下する。そこで、本目的の検出用の電極として、マイクロディスクアレイ (MDA) 化して、検出限界の向上と絶対電流値の低下を防ぐこととした。MDA 電極の作製は、多くのグループにより確立しており、本研究の代表者も過去に論文報告を行っている。しかしながらマイクロ電極では、電流密度が大きいので、低濃度の測定対象でも電極上への吸着による感度低下性がある。そこで、まず従来良く用いられている金属薄膜 (金) をベースにした MDA 電極と、ナノカーボン薄膜をベー

スにした MDA 電極を 2 種類形成した (図6)。この MDA 電極では、微小化前の薄膜電極と比較し、電流密度は、13 倍も向上し、検出限界向上に微小アレイ化が有効であることが分かった。また、モノヌクレオチドの代わりに、より吸着しやすく電気化学活性な生体分子であるセロトニンを計測した。その結果、1 μM のセロトニン計測では、測定回数の範囲で、微小化前の電極では、金薄膜、ナノカーボン薄膜共に、感度の低下は見られなかった。一方、MDA 化すると、金薄膜ベースの MDA 電極は生体分子濃度が 1 μM と比較的濃度であるにも関わらず、感度は急激に低下した。一方、ナノカーボン薄膜から作製した MDA 電極では、感度の低下は殆ど見られず、微小化しても本薄膜電極への生体分子の吸着が起こりにくく、本計画のメチル化 DNA デバイスの検出器としての開発指針を得た (図7)。

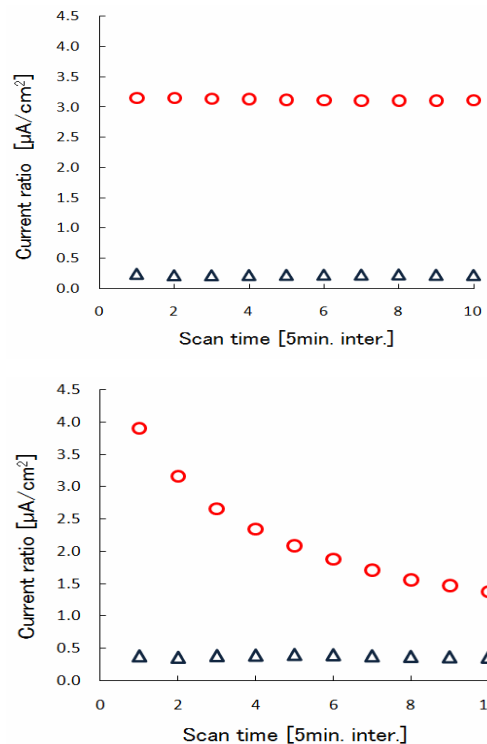


図7. MDA 電極による連続測定による測定回数と電流値の関係、上: ナノカーボンベースの MDA 電極、下: 金薄膜ベースの MDA 電極、△: 加工前の薄膜電極、○: MDA 電極、セロトニン濃度:1 μM,

#### 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 5 件)

- ① 井ノ口裕朗、加藤大、上田晃生、丹羽修, Development of a sputtered nanocarbon film based microdisk array electrode for the highly stable detection of

serotonin, *Electroanalysis*, 23, 827-831 (2011). 査読有

- ② 後藤圭祐、加藤大、関岡直行、上田晃生、廣野滋、丹羽修, Direct electrochemical detection of DNA methylation for retinoblastoma and CpG fragments using a nanocarbon film, *Analytical Biochemistry*, 405, 59-66 (2010). 査読有
- ③ 上田晃生、加藤大、関岡直行、鎌田智之、栗田僚二、上塚弘志、服部義之、梅村茂、廣野滋、丹羽修, Fabrication of electro-chemically stable fluorinated nano-carbon film compared with other fluorinated carbon materials, *Carbon*, 47, 1943-1952 (2009). 査読有
- ④ 丹羽修、加藤大、関岡直行、上田晃生、廣野滋、生体分子センシングを目指したスパッタナノカーボン薄膜電極の開発, *New Diamond*, 25, 30-37 (2009). 査読なし
- ⑤ 丹羽修、加藤大、関岡直行、廣野滋、ナノカーボン薄膜電極による生体分子の検出, *Electrochemistry*, 77, 73-78 (2009). 査読なし

[学会発表] (計 30 件)

- ① 丹羽修、加藤大、小森谷真百合、後藤圭祐、廣野滋、Electrochemical determination of urinary damaged DNA molecules by using sputtered nanocarbon film electrode (Plenary talk), 2010 CJK Symposium on Analytical Chemistry, 2010 年 11 月 1 日, 武漢
- ② 丹羽修、加藤大、後藤圭祐、小森谷真百合、栗田僚二、廣野滋、Direct electrochemical detection of DNA and damaged DNA using sputter deposited nanocarbon film, 61th International Meeting of ISE, 2010 年 9 月 30 日, ニース (フランス)
- ③ 丹羽修、スパッタナノカーボン膜の表面構造制御と生体分子検出への展開 (招待講演), 電気化学会第 77 大会, 2010 年 3 月 29 日, 富山大学
- ④ 井ノ口裕朗, 上田晃生, 加藤大, 栗田僚二, 廣野滋, 丹羽修, 生体分子の高感度検出実現に向けた微小アレイ化ナノカーボン電極の開発, 第 20 回化学とマイ

クロ・ナノシステム研究会, 2009 年 11 月 25 日, 金沢

- ⑤ 後藤圭祐, 加藤大, 関岡直行, 上田晃生, 栗田僚二, 廣野滋, 丹羽修, DNAメチル化の電気化学検出、日本分析化学会第 58 年会, 2009 年 9 月 25 日、北大
- ⑥ 丹羽修, 加藤大, 関岡直行, 栗田僚二, 上田晃生, 廣野滋, Nano-hybrid carbon film for electroanalytical applications (Invited talk), The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, 2009 年 8 月 20 日, 北京
- ⑦ 丹羽修, 生体分子センシングを目的としたナノカーボン薄膜電極の開発 (招待講演), 分析化学関東支部懇話会, 2009 年 3 月 18 日、ゆうぼうと (五反田)
- ⑧ 加藤大, 関岡直行, 上田晃生, 栗田僚二, 廣野滋, 鈴木孝治, 丹羽修, Nano-hybrid carbon film for simple DNA electroanalysis, PRiME 2008, 2008 年 10 月 15 日, ホノルル
- ⑨ 加藤大, 上田晃生, 関岡直行, 後藤圭祐, 栗田僚二, 鈴木孝治, 廣野滋, 丹羽修, 導電性ナノカーボン薄膜電極による全核酸塩基の直接計測, 日本分析化学会第 57 年会, 2008 年 9 月 10 日, 福岡大学

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/biomed-ri/ci/rg/nbd-niwa/nbd-introduction.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹羽 修 (NIWA OSAMU)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・副研究部門長

研究者番号: 70392644

### (2) 研究分担者

梅村 茂 (UMEMURA SHIGERU)

千葉工業大学・工学部・教授

研究者番号: 70316800

鈴木 孝治 (SUZUKI KOJI)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 80154540

### (3) 連携研究者

なし