

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25620121

研究課題名(和文) DNAによる効率的な多酵素反応場の構築と一細胞測定用電極への展開

研究課題名(英文) Development of bienzyme immobilized electrode by using interstrand cross-linked DNAs.

研究代表者

小松 康雄 (Komatsu, Yasuo)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：30271670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：DNAは複雑な構造を構築可能であるが、外的環境因子の影響を受けて不安定化され、その特性が失われる。本開発において、電気化学検出に用いる酵素の電極への固定化に、2本鎖間を架橋化したDNAを用い、最適な検出感度が得られる酵素・DNA複合体電極の開発を進めた。運動した触媒反応によってグルコースの電気化学的定量が可能となる2種類の酵素を、多様な構造の架橋化2本鎖DNA上に酵素間の距離を変えて固定化し、グルコースの酸化に伴った電流値変化と、DNAの構造活性相関を調べた。その結果、架橋化2本鎖DNAによる安定化の有効性と、DNA上の酵素の空間配置の制御が検出感度に大きく影響することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Glucose concentrations can be determined by using the coupled reaction system of glucose oxidase (GOx) and horseradish peroxidase (HRP). We integrated both GOx and HRP on an electrode surface through attachment at the termini of double-stranded oligodeoxynucleotides (ODNs). Reduction currents based on the coupled reactions were significantly increased on the electrode which tethered both enzymes by an interstrand crosslinked (ICL)-ODN. The current values were largely affected by the relative positions of enzymes on ICL-ODNs, and the detection sensitivity became the highest when GOx and HRP were distal and proximal to the electrode surface, respectively. The bienzyme/ICL-ODN complexes could also be constructed on a microelectrode surface and could also sensitively detect glucose concentrations. Here we report the construction of an electrode carrying bienzyme/ICL-ODN complex and the importance of enzyme binding positions on double stranded ODNs.

研究分野：核酸化学

キーワード：バイオセンサー DNA 電気化学 グルコース オリゴヌクレオチド 酵素

### 1. 研究開始当初の背景

再生医療の分野に見られるように、細胞工学の最近の進展は目覚しく、今後は細胞の解析が一段と重要性を増すことは間違いない。マイクロ電極をプローブに利用する走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、一細胞の動態や膜透過性を観察することが可能で細胞解析には有効な技術である。しかしながら、グルコースなどの細胞代謝産物を細胞ごとに定量する技術までには至っていない。この一つの原因は、高感度な酵素反応系をマイクロ電極上に構築することが困難な点にあると言える。一方、種々の構造体を形成する DNA は、酵素の位置選択的な固定に用いることが可能である。しかしながら、通常の 2 本鎖 DNA は解離する懸念から、酵素反応に最適な酵素の配置ならびに酵素の固定化量を制御することは不可能である。

### 2. 研究の目的

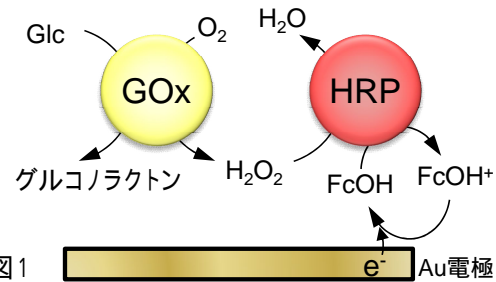
申請者は、DNA 内部のアルデヒド基に効率良く反応する化合物 (*J. Am. Chem. Soc.*, 131, 13208, 2009) と、その構造を利用して 2 本鎖 DNA 間を架橋する技術を開発した (*Chem. Commun.*, 48, 2143, 2012)。

本開発では、これらの DNA への反応を利用することで安定化した 2 本鎖 DNA 上に酵素を固定化し、最も効率的な反応が生じる DNA の構造体の構築を目指した。さらに、連続的な反応を触媒する複数種類の酵素を DNA 上に様々な距離間隔で固定化し、最も効果的な運動が生じる酵素の配置を明らかにすることも目的とした。続いて、安定化 DNA と酵素の複合体をマイクロ電極上に固定化し、マイクロ電極を用いることで細胞のグルコース消費量を定量する技術への展開も試みた。

### 3. 研究の方法

グルコース (Glc) は、グルコースオキシダーゼ (GOx) と西洋わさび由来ペルオキシダーゼ (HRP) を併用することによって、電気化学的

検出が可能になる (図 1)。この反応では、Glc を GOx が酸化し、その際に生じる過酸化水素を HRP が電極からの電子を利用して還元する。電子授受はメディエーターのフェロセンを介して行われ、Glc の酸化に連動して電流値が観察される。本開発では、最も効果的な電流値を得ることが可能な酵素・DNA 複合体を見出すため、初めにディスク金電極を用いて種々の複合体電極を作製し、各電極による



Glc の検出感度を調べた。

DNA には、通常の塩基対のみで形成される 2 本鎖 DNA (天然型 2 本鎖 DNA) と、2 本鎖間を架橋して安定化させた DNA を用いた。架橋化した DNA に関しては、複数のオリゴヌクレオチド (以下オリゴ) を架橋して高分子化することで、様々な構造の DNA を構築した。DNA 上に固定化する酵素に関しては、酵素の数、2 種類の酵素の相対的配置をそれぞれ変化させ、感度への影響を評価した。また、電極上での各 DNA ならびに酵素の固定化量もそれぞれ電気化学的手法と Quartz Crystal Microbalance (QCM) によって定量した。

続いて、最も高い電流値が得られた酵素・DNA 複合体をマイクロ電極の界面に形成させ、微小空間における局所の Glc 濃度を定量することが可能かどうかを調べた。さらに、株化細胞を用い、細胞のグルコース消費量測定も試みた。

### 4. 研究成果

#### (1) DNA 合成

GOx と HRP を、アビジン、抗フルオレセイン

抗体を介して DNA 上にそれぞれ固定化するため、まず初めに、末端にビオチンおよびフルオレセインを有するオリゴを合成した。また、それらの末端修飾オリゴとの結合によって 2 本鎖構造を形成する相補鎖オリゴ、ならびに金電極界面への DNA 分子の固定化に関わるオリゴもそれぞれ合成した。後者の電極固定化用オリゴに関しては、その 5' 末端に、チオール基を合成段階で導入した。架橋化が必要な DNA は、2 本鎖構造を形成させた後に、以前に開発した架橋試薬 (aoNao) によって 2 本鎖間を連結し、高純度に精製して作製した。続いて、合成した各 2 本鎖 DNA 分子をディスク金電極上に固定化させ、酵素を DNA 上に結合させることで、酵素・DNA 複合体電極を構築した (図 2)。

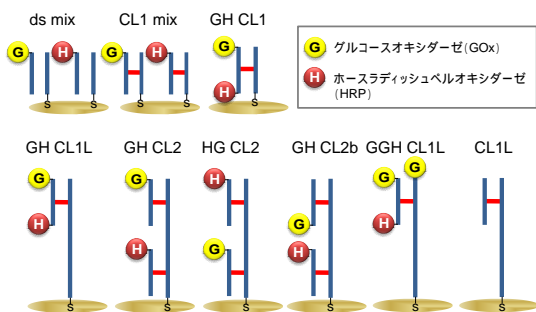


図 2

### (2) グルコース含有溶液を用いた解析

続いて、作製した酵素・DNA 複合体電極を濃度の異なる Glc 溶液に浸し、検出される電流値を計測した。実験の結果、架橋化 2 本鎖 DNA および天然型 2 本鎖 DNA のいずれを用いた場合においても、GOx と HRP を同一電極上に有する場合、Glc 濃度に依存した電流が検出され、目的の酵素反応が生じていることを確認した。しかしながら、架橋化 2 本鎖 DNA を酵素反応の足場に用いた電極の方が、天然型 2 本鎖 DNA よりも高い電流値を示した (図 3)。この結果は、通常の DNA は電極の作製から酵素反応の間において、2 本鎖 DNA が解離し、電極上の酵素量が低下したことが原因である可能性が高い。さらに、GOx と

HRP を異なる DNA 分子上に固定化した場合よりも、同一の DNA 分子上に固定化した方が高い電流値が得られることが明らかになった。これは、2 種類の酵素がより接近した距離に配置されることで酵素の連動が迅速に進んだためと考えられ、酵素の空間的配置の重要性を示す結果であると考えている。

また、電極に近い部位に HRP が存在し、電極から離れた溶液側に GOx を配置した電極では高い電流値が得られる傾向があることを見出した。一方、酵素の配置を逆にした場合には、電流値が大きく低下することも明らかとなった。この配置では、溶液側の GOx は Glc と接触し易く、電極側では HRP の反応が迅速に進み、全体として感度の向上につながったと考えている。これらの結果は、ナノサイズレベルでの酵素の配置の制御が、連動した酵素反応の感度に大きく影響し、安定化した架橋化 DNA がその固定化に役立つことを示している。この結果に基づき、Glc の酸化反応をさらに促進させるため、溶液側に 2 分子の GOx を固定化し、電極側に HRP を有する電極を作製したところ、この電極が最も高い電流値を示すことを明らかにした (図 3)。

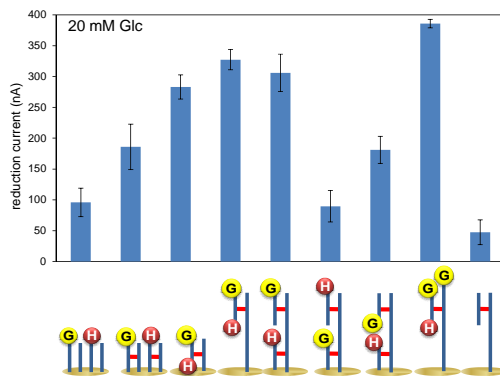


図 3

### (3) マイクロ電極を用いた解析

ディスク電極において最も高い検出感度を示した酵素・DNA 複合体を、マイクロ電極上に構築し、局所における Glc 濃度の定量が可能かどうかを調べた。初めに、濃度の異なる Glc を有する溶液に電極を浸し、得られる電

流値を測定した。その結果、マイクロ電極上においても、Glc の酸化反応に伴った電流値を検出し、極微小空間における局所の Glc 濃度の定量が可能であることを確認した(図4)。続いて、酵素・DNA 複合体を有する微小電極を HepG2 細胞を培養した細胞溶液中に配置し、細胞培養中における Glc 濃度を調べた。実験の結果、Glc 濃度は細胞数に依存して低下する傾向が観察された。しかしながら、得られた電流値の変化が、細胞による Glc の取り込みを反映した結果であるかどうかは、引き続き詳細な検討が必要であると考えている。

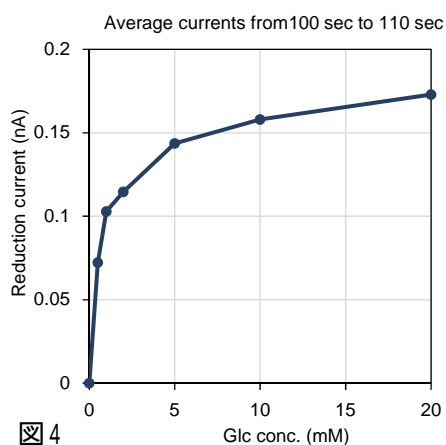


図4

## 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 7 件)

**Suzuki, Y. and Komatsu, Y.** Environmentally Responsive and Bright Fluorescent Probes Possessing Dansyl-modified Oligonucleotides under Hybridization of DNA and RNA. *RNA Technologies* (Springer series). in press.( 査読有 )

**Hirano, Y., Kodama, M., Shibuya, M., Maki, Y. and Komatsu, Y.** Analysis of beat fluctuations and oxygen consumption in cardiomyocytes by scanning electrochemical microscopy. *Anal. Biochem.*, ( 査読有 ), 447C, 39-42 (2014). DOI: 10.1016/j.ab.2013.11.008

**Mie, Y., Tateyama, E. and Komatsu, Y.** p-Aminothiophenol modification on gold surface improves stability for electrochemically driven cytochrome P450

microsome activity. *Electrochim. Acta*, ( 査読有 ), 115, 364-369 (2014). DOI: 10.1016/j.electacta.2013.10.170

**Ikegami, M., Mie, Y., Hirano, Y. and Komatsu, Y.** Direct Electrochemistry of Microsomal Human Flavin-containing Monooxygenases 1 and 3 on Naphthalenethiol Thin Films. *Ecs Electrochemistry Letters*, ( 査読有 ), 2, G5-G7 (2013). DOI: 10.1149/2.003312eel

**Suzuki, Y., Kowata, K. and Komatsu, Y.** Development of dansyl-modified oligonucleotide probes responding to structural changes in a duplex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, ( 査読有 ), 23, 6123-6126 (2013). DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.09.017

**Hirano, Y., Kowata, K., Kodama, M. and Komatsu, Y.** Development of a scanning electrochemical microscopy-based micropipette and its application to analysis of topographic change of single-cell. *Bioelectrochemistry*, ( 査読有 ), 92C, 1-5 (2013). DOI: 10.1016/j.bioelechem.2013.01.004

**小松 康雄**: 合成オリゴヌクレオチドに対する機能性分子の部位特異的導入法 「Pharm Tech Japan」(株)じほう, ( 査読無 ), 29(8), 85-90 (2013).  
<http://www.jiho.co.jp/shop/list/detail/tabid/272/attror/69/pdid/92364/Default.aspx#Description>

(学会発表)(計 6 件)

平野 悠, 小玉 実生恵, 牧 与志幸, 渋谷真広, 小松 康雄, 査型電気化学顕微鏡を利用した心筋細胞の拍動解析技術の開発; 日本分析化学会第62年会, 2013年09月12日, 近畿大学(東大阪市)

鈴木 祥夫, 小綿 恵子, 小松 康雄, Fluorescent "on-off" Switching under Hybridization of DNA and RNA with Dansyl-modified Oligonucleotides. 第40回国際核酸化学シンポジウム, 2013年11月14日, 神奈川大学(横浜市)

平野 悠, 小玉 実生恵, 小綿 恵子, 池上真志樹, 小松 康雄, 2本鎖間架橋化 DNA を活用した電極界面上での酵素反応場の構築, 日本薬学会第134年会, 2014年03月28日, 熊本大学(熊本市)

鈴木 祥夫, 小綿 恵子, 小松 康雄, Environmentally Responsive and Bright Fluorescent Probes Possessing

Dansyl-modified Oligonucleotides under Hybridization of DNA and RNA. Biosensors2014, 2014年05月28日, オーストラリア

三重 安弘、池上 真志樹、小松 康雄, P450 電気化学触媒の基盤技術, 北大-産総研合同シンポジウム, 2014年08月29日~2014年08月29日, 北海道大学(札幌市)

小松 康雄, 合成核酸からの分析化学へのアプローチ, 日本分析化学会第63年会, 2014年09月18日~2014年09月18日, 広島大学(東広島市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小松 康雄 (KOMATSU, Yasuo)

国立研究法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号: 30271670

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし