

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750085

研究課題名（和文） シグナル・オン型電気化学センシング法による高感度遺伝子センサ

研究課題名（英文） Gene sensors based on “signal-on”-typed electrochemical sensing methods

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・環境管理技術研究部門・主任研究員

研究者番号：00392580

研究成果の概要（和文）：簡便・迅速な高感度遺伝子検出法を提案するため、DNA 認識に連動した酸化還元錯体の解離反応に基づくシグナル・オン型の新規遺伝子プローブを開発した。非標識 DNA を認識してプローブ酸化還元電流が5倍増加したことから、簡便な DNA 検出を可能とした。また、遺伝子センサのデバイス化を行い、複数遺伝子の簡便・迅速な配列選択的な同時検出を可能とした。

研究成果の概要（英文）：To promote high-sensitive gene detection methods with simplicity and rapidity, a novel “signal-on”-typed gene probe was developed based on dissociation of a redox complex triggered by DNA recognition. The probe enabled simple DNA detection for non-labeled DNAs with 5-fold increase in observed redox current. Moreover, gene sensing devices were developed to simultaneously detect multiple DNAs with simplicity, rapidity, and sequence-specificity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：化学センサー、電気化学、バイオセンサ

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の機能を核酸レベルで解析する一般的な手法として、蛍光標識に基づく DNA チップ法が現在最も普及している。これは、ガラス板などの基板表面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)ターゲットの蛍光標識やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法等による拡散増幅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ること、(3)システムや測定装置が高価で大型である、などである。特に、(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コンパクトな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。本研究ではこの点を解決するため、安価で省スペース化が容易な電気化学的手法に基づき、ターゲット核酸の標識化およびマーカの添加といった煩雑なサンプル処理が不要な（ラベル化フリー、マーカフリー）網羅的遺伝子解析法の基盤技術を開発する。

本研究に関連する国内外の従来技術を表1にまとめた。複数の核酸を網羅的に解析する手法としては質量分析的手法は本目的には適さず、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。この表にあるように、従来の電気化学的手法では、ターゲットに電気化学活性を持たせるための標識化を行う必要のある手法が多く提案されてきた。しかし、ターゲットの標識化は煩雑であるため、電気化学的手法の簡便性が生かされていなかった。これは二分割したプローブの一方を電極に固定し他方を標識化して用いるサンドイッチ型プローブに基づく手法でも同様である。ターゲットの標識化を不要とし煩雑さを改善した手法に、電気化学活性なインターカレタを用いる手法がある。これは、二重らせんに選択的に吸着する電気化学活性団を使用する手法だが、未反応の電気化学活性団による信号を除去する必要があり、洗浄が必要な場合も多い。標識化や洗浄の不要な手法として、導電性ポリマーや電界効果トランジスタ（FET）に基づく手法などの少数が提案されているが、感度が低いなどの課題を抱えていた。

申請者は以前より、電気化学的手法の上記特徴に注目して核酸の配列選択的な検出に取り組んでおり、ペプチド核酸（PNA）を核酸認識部位とするプローブ PNA が高感度で高選択的な核酸検出を実現することを確認している [特許第 3,956,214 号、Electroanalysis 2000, 12, 1272 他、全特許 3 報、論文 4 報]。このセンサは、目的の配列を持つ核酸が電極表面上のプローブ PNA とハイブリッド形成することで電極表面の電荷が変化（正→負）し、その結果測定溶液中の電気化学活性マーカの電極表面での電子

移動反応が促進されることで、目的の核酸の存在を知らせるセンサである（図1）。このセンサの特徴は分析対象が電気化学活性でなくとも電荷を有すれば、標識化を行うことなく、マーカの電子移動反応の変化から間接的に電気化学測定が可能な点である（イオンチャンネルセンサ）[Anal. Chem. 2004, 76, 320A 他、論文 11 報]。本センサでは PCR 法等の核酸増幅を行わずに、電気化学的手法で世界最高レベルである 10-15 mol/L での選択的な核酸検出に成功している [Analyst 2003, 128, 681]。また、様々な鎖長・配列を持つプローブ PNA を用いてセンサを作製し、網羅的な遺伝子解析を行ううえで大変重要な、異なる鎖長のプローブでの検出下限の揃ったセンサを作製するためのノウハウを得ることができた [Analyst 2005, 130, 1478]。プローブ PNA/ターゲット DNA 間の結合定数とセンサの検出下限とは正の相関を示し、その結合定数は鎖長のみならず核酸塩基配列にも依存することが分かった。さらに、マーカを別途検出系に加える必要があった上記センサを改良し、マーカやインターカレタなど第三の化学種を加える必要のない簡便性のより高い検出系を目指して、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（図2）。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 [Analyst 2007, 132, 784、Anal. Sci. 2008, 24, 929]。こ

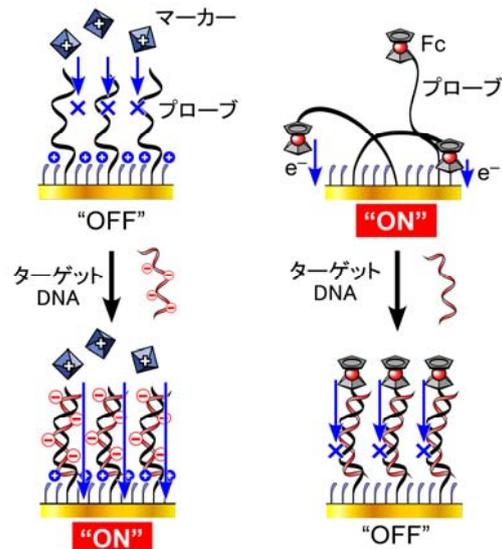


図1: イオンチャンネルセンサ型 DNA 検出システムの原理図。ハイブリッド形成の前後で電極表面の電荷が変化し、その結果測定溶液中の電気化学活性マーカの電極表面での電子

図2: コンフォメーション変化型 DNA 検出システムの原理図。ハイブリッド形成の前後でプローブのコンフォメーションが変化することで、電気化学活性団の電極からの距離が遠ざかる。

のセンサでは、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、より簡便な核酸検出が可能となった。

## 2. 研究の目的

このように申請者は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きた。特にプローブ PNA を用いたコンフォメーション変化に基づく遺伝子センサは、ターゲットの標識化を必要とせず、センサ本体単独でターゲット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。しかし図 2 に示すように、末端に電気化学活性種を有するプローブを用いた検出法では、その原理を電極表面からの距離に依存した電子移動反応の制御に依らざるを得ず、したがって、ターゲット認識イベントを電子移動反応の減少によって知らせるような仕組みとせざるを得ない。一般に、分子認識に伴い信号が減少する原理に基づく検出系（シグナル・オフ型）では、検出感度が小さいことが知られている。そこで本研究では、分子認識に伴い信号が増加する原理に基づく検出系（シグナル・オン型）を採用し、ハイブリッド形成により電気化学信号を発生させる新規遺伝子プローブを設計・合成し、ラベル化およびマーカーが不要という簡便性を満たしつつより高感度な遺伝子検出法へと発展させることを提案する。具体的には、遺伝子認識部位として PNA もしくは DNA を用い、その両端に信号発生団である電気化学活性団とその信号を抑制する信号抑制団とを取り付けた新規プローブの開発を行う。遺伝子認識前は両団が弱い内包錯体を形成することで信号発生が抑制され、認識後は二重らせんが形成されることで両団が解離して信号が回復する仕組みである（図 3）。このプローブによりシグナル・オン型の高性能遺伝子センサの開発を目指した。

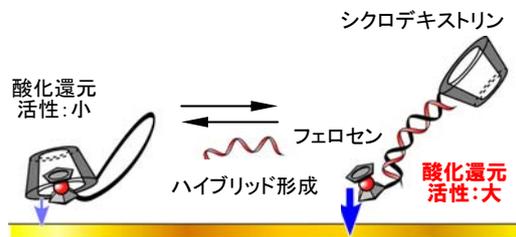


図3: ターゲットDNA 検出の原理図。ハイブリッド形成によりターゲット認識部位が剛直化し、信号抑制団(Q)が解離して信号発生団(E)の活性が回復する。

## 3. 研究の方法

### (1) 新規シグナル・オン型遺伝子プローブの開発

信号発生団と信号抑制団と共に有する、ラベル化・マーカー不要なシグナル・オン型プローブとして、信号発生団としてフェロセン、信号抑制団としてβ-シクロデキストリンをターゲット認識部位であるDNAの両端に取り付けた新規プローブを開発した。ハイブリッド形成前は両団が弱い内包錯体を形成しフェロセンの電子移動反応が抑制されているが、ターゲットDNAとハイブリッド形成することでターゲット認識部位 PNA・DNAの立体構造が変化して剛直な構造となり両団が解離するため、フェロセンの電子移動反応が回復する仕組みである。さらに、このプローブをターゲットDNAを含む測定溶液中に添加して電極を導入し、フェロセンの電子移動反応が回復した度合いを電気化学的に検出することで、ターゲットDNAの濃度を知る手法を開発した。このプローブは、ターゲット認識部位の配列で決定される唯一のDNAであるターゲットDNAを、ターゲット自身の標識を行うことなく、本プローブのみで検出することを可能とすると期待される。なお、本研究では、微小な電流値を観測するため、くし形電極（幅 10 μm、ギャップ 5 μm、長さ 2mm、本数 65）を用いて電気化学測定を行った。

### (2) 遺伝子センサアレイのデバイス化

最終的な遺伝子センサアレイの形態として、遺伝子センサアレイチップの開発を行った。鏡面研磨したガラス基板表面上に金薄膜をスパッタ成膜し、光リソグラフィーに基づく微細加工により、384chの微小電極アレイチップ（電極径 250 μm）を作製した。電極表面積は光レジスト薄膜により規定した。また、耐熱・耐薬品性を向上させるため、セラミックス基板に基づく遺伝子センサアレイチップも開発した。電極配線をチップ内部に収めるため、低温同時焼成セラミックスにより作製した。電極は金めっき電極（電極径 250 μm）とし、ガラス基板での電極径と同サイズとした。電気化学測定は8極同時に計測が可能な8ch電気化学測定装置を使用し、12回に切り替えつつ4回に分けて、遺伝子センサアレイチップ上の全384chを測定した。

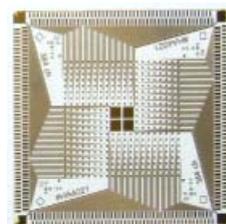


図4: 開発した遺伝子センサアレイチップ。

#### 4. 研究成果

##### (1) 新規シグナル・オン型遺伝子プローブの開発

本研究で開発したプローブは、一本鎖時に柔軟な構造を有するプローブ両末端に電気化学信号発生団と信号抑制団とを取り付けた分子構造を有しており、ターゲット認識前・後において両団が内包錯体を形成・解離することで、信号が抑制・回復する仕組みを基盤とする。信号発生団としてフェロセン、信号抑制団として $\beta$ -シクロデキストリンを有する 22 塩基 DNA をプローブとして合成した (図 5)。そして、バルク溶液中でのターゲット DNA 認識前後によるフェロセン酸化還元信号の変化を電気化学的に観測した。プローブ DNA の電気化学測定にはくし形電極を用い、微量溶液をくし形電極上に滴下した後、サイクリックボルタメトリを測定した。観測されたボルタモグラムは緩衝溶液のみの場合との差分を取り解析した。

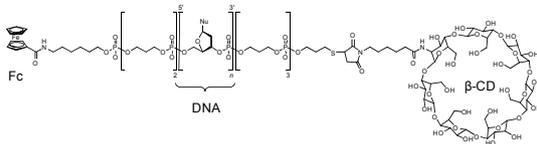


図5: 開発した新規プローブの構造。

プローブ DNA を 6.25  $\mu\text{M}$  含む測定溶液では、0.3 V 付近から電流値の上昇が見られ 0.4 V 付近で定常電流値に達する電流-電位曲線が得られた (図 6)。一方で、プローブ DNA とターゲット DNA とを混合し (6.25  $\mu\text{M}$  + 25  $\mu\text{M}$ ) インキュベーションを行った溶液では、0.25 V 付近から電流値の上昇が見られた。これは、バルク溶液中での内包錯体を形成していたフェロセンの酸化還元電位が、信号抑制団により酸化還元反応が起こりにくくなり正にシフトしていたところ、この内包錯体が解離したためにシフト前の電位に戻った

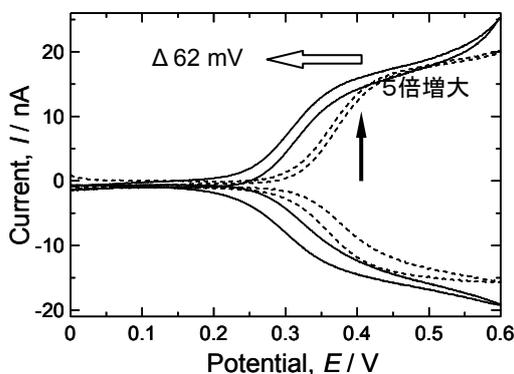


図6: ハイブリッド形成前(点線)および形成後(実線)の再クックボルタモグラムの比較。電位は 62 mV 負側にシフトし、電流値が5倍に増大した。

めと考えられる。この電位シフトは 62 mV であった。なお、遊離フェロセン誘導体の酸化還元電位は遊離 $\beta$ -シクロデキストリン誘導体との錯形成により 80 mV ほど正側に移動することを確認した。ここで観測された電流-電位曲線の変化から、決まった電位での電流値の増加に注目することで、ターゲット認識を検出することも可能である。0.3 V での電流値変化は 1.3 nA $\rightarrow$ 6.9 nA の約 5 倍であった。

本法は蛍光団および消光団 (クエンチャー) を両端に持つ蛍光遺伝子プローブであるいわゆる分子ビーコン法と似ているが、本法のような電気化学的手法に基づく手法はこれまで報告されておらず、従来法とは全く異なる小型で簡便な遺伝子検出法となると期待される。

以上、今回開発したプローブ DNA によりシグナル・オン型の電気化学的遺伝子センシングが可能となったと言え、その学問的意義は非常に重要である。

##### (2) 遺伝子センサアレイのデバイス化

さらにデバイス化を進めるため、耐熱・耐薬品性に優れたセラミックス基板に基づく遺伝子デバイスを開発した。このため、微小金電極アレイを有するセラミックス基板を用い、電極表面上に遺伝子プローブ溶液を塗布して遺伝子センサアレイを作製した。プローブ塗布では、本研究を通じて開発したピッチ可変型アレイスポットを用いて行った。セラミックス基板は電極表面のセンサ用電極としての最適化に技術的課題があったが、本研究を通じてこれを克服し、複数の異なる微小遺伝子センサを高集積アレイ状に有する遺伝子センサアレイの構築に成功した。また、特定の遺伝子に対する電気化学的応答の観測にも成功した。

このようにして、ターゲットのラベル化およびマーカー添加が不要なシグナル・オン型の遺伝子検出システムを構築し、併せて簡便・迅速な一次スクリーニング技術としての遺伝子検出デバイスの開発を推進した。これらの成果は、学問的のみならず実用的にも意義深いと考えられる。

## 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 H. Aoki, A. Kitajima, and H. Tao  
“Electrochemical Sensor Array Chips for Multiple Gene Detection” *Sensors & Materials*, 22, 327-336 (2010). [査読有]
- ② H. Aoki, A. Kitajima, and H. Tao  
“Label-free and “signal-on” DNA detection using a probe DNA terminated with ferrocene and  $\beta$ -cyclodextrin” *Supramolecular Chemistry*, 22, 455-460 (2010). [査読有]
- ③ H. Aoki, A. Kitajima, and H. Tao  
“Electrochemical Gene Sensor Arrays Prepared Using Non-contact Nanoliter Array Spotting of Gene Probes” *Analytical Sciences*, 26 367-370 (2010). [査読有]

[学会発表] (計15件)

- ① H. Aoki: Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, ICBS2010, Tsukuba (2011/03/16). [国際学会、口頭発表]
- ② 青木 寛、北島明子、鳥村政基: 簡便・迅速な遺伝子検出法の開発とデバイス化、産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、つくば (2011/02/01). [受賞、国内学会、口頭発表]
- ③ 青木 寛: 電気化学的手法によるDNA検出とDNAエレクトロニクスへの展望、第8回バイオナノエレクトロニクス学術講演会、秦野 (2011/01/21). [招待講演、国内学会、口頭発表]
- ④ H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao: Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, Pacificchem2010, Honolulu, HI, USA (2010/12/18). [受賞、国際学会、口頭発表]
- ⑤ H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao: Label-free and reagent-free DNA detection based on supramolecular electrochemistry, Nanojasp2010, Barcelona, Spain (2010/11/30). [招待講演、国際学会、口頭発表]
- ⑥ 青木 寛、鳥村政基: 高速スクリーニング用二次元ピッチ可変型アレイスポット、第8回環境エネルギー分野交流会 (E&Eフォーラム)、つくば (2010/10/04). [招待講演、国内学会、口頭発表]
- ⑦ H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao: Label-free and reagent-free DNA detection based on

supramolecular electrochemistry, The 61st Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry, Nice, France (2010/09/27). [国際学会、口頭発表]

- ⑧ 青木 寛、北島明子、鳥村政基、田尾博明: フェロセンおよびシクロデキストリン末端修飾プローブによる非標識DNAの超分子電気化学検出、日本分析化学会第59年会、仙台 (2010/09/15). [国内学会、口頭発表]
- ⑨ 青木 寛: 固液界面での分子ダイナミクスに基づく電気化学的な自己報告型遺伝子検出デバイス、科研費・新学術領域 第五回領域会議、国立循環器病研究センター、吹田 (2010/07/02). [国内学会、口頭発表]
- ⑩ H. Aoki, A. Kitajima, and H. Tao: Label-Free and Reagent-Free DNA Detection Based on Supramolecular Electrochemistry, Biosensors 2010, Glasgow, UK (2010/05/26). [国際学会、ポスター発表]
- ⑪ 青木 寛、北島明子、田尾博明: ハイブリッド形成により構造変化するフェロセン標識プローブによる遺伝子検出とシグナル増幅、第19回日本MRS学術シンポジウム、波止場会館、横浜 (2009/12/07). [国内学会、口頭発表]
- ⑫ H. Aoki, and H. Tao: signal Enhancement for Gene Detection Using Ferrocene Terminated Probes Based on Hybridization-Amenable Conformation Flexibility, Bio-Sensing Technology Conference 2009, Bristol, UK (2009/11/11). [国際学会、ポスター発表]
- ⑬ 青木 寛: 電気化学的遺伝子検出法の開発と迅速遺伝子診断技術の開発、日本分析化学会第58年会、北海道大学、北海道 (2009/09/24). [国内発表、口頭発表 (招待講演)]
- ⑭ 青木 寛、北島明子、田尾博明: 電気化学的遺伝子検出法の開発と迅速診断技術への展開、2009年電気化学秋季大会、東京農工大学小金井キャンパス、東京 (2009/09/10). [国内学会、口頭発表 (招待講演)]
- ⑮ 青木 寛、北島明子、田尾博明: 超分子電気化学に基づく遺伝子検出法、東京コンファレンス 2009、幕張メッセ、東京 (2009/09/04). [国内学会、ポスター発表]

[産業財産権]

○出願状況 (計6件)

名称: 分注装置

発明者: 青木 寛、鳥村政基、田尾博明

権利者: 産業技術総合研究所

種類：特許  
番号：特願 2010-292724  
出願年月日：2010 年 12 月 28 日  
国内外の別：国内

名称：可変ピッチアレイスポット  
発明者：青木 寛、鳥村政基、田尾博明、池田隆至  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特願 2010-267350  
出願年月日：2010 年 11 月 30 日  
国内外の別：国内

名称：Electrochemical molecular recognition probes  
発明者：H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：US Patent Application 12/872735  
出願年月日：2010 年 8 月 31 日  
国内外の別：国外（米国）

名称：電気化学分子認識プローブ及びそれを用いた分子認識センサ並びにそれらを用いた電気化学的検出方法  
発明者：青木 寛、北島明子、田尾博明  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特願 2010-193207  
出願年月日：2010 年 8 月 31 日  
国内外の別：国内

名称：電気化学分子認識プローブ  
発明者：青木 寛、北島明子、田尾博明  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特願 2009-242921  
出願年月日：2009 年 10 月 22 日  
国内外の別：国内

名称：電気化学分子認識プローブ  
発明者：青木 寛、北島明子、田尾博明  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特願 2009-208400  
出願年月日：2009 年 9 月 9 日  
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：可変ピッチアレイスポット  
発明者：青木 寛、鳥村政基、田尾博明、池田隆至  
権利者：産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特許第 4,686,769 号

取得年月日：2011 年 2 月 25 日  
国内外の別：国内

〔その他〕

○受賞（計 4 件）

- ①優秀ポスター賞、青木 寛、北島明子、鳥村政基：簡便・迅速な遺伝子検出法の開発とデバイス化、産総研・産技連LS-BT合同研究発表会、2010 年。
- ②ハイライト講演、H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao, Label-free, reagent-free, and “signal-on” DNA detection based on supramolecular electrochemistry, Pacificchem2010、2010 年。
- ③奨励賞、青木 寛、電気化学的遺伝子検出法の開発と迅速遺伝子診断技術の開発、日本分析化学会、2009 年。
- ④優秀ポスター賞、青木 寛、北島明子、田尾博明、超分子電気化学に基づく遺伝子検出法、東京コンファレンス 2009 年。

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・環境管理技術研究部門・主任研究員  
研究者番号：00392580