

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550085

研究課題名（和文） DNA自己組織化膜の *in-situ* 電気回路化を利用するチップ型  
遺伝子センサー研究課題名（英文） DNA-chip-based gene sensor based on *in-situ* electrochemical  
functionalization of double-helical DNA self-assemblies.

研究代表者

中野 幸二 (NAKANO KOJI)

九州大学・工学研究院・准教授

研究者番号：10180324

研究成果の概要（和文）：DNA自己組織化膜に電気伝導性の修飾を施し、遺伝子センシングのためのDNA分子デバイスの研究を行った。ここでは、共有結合性のコンジュゲート形成を利用したDNA修飾剤の合成、DNAマイクロドットの電気化学顕微鏡イメージング、および電位応答型の遺伝子センシングなどに成功した。また、ディップペンナノリソグラフィーによるDNA自己組織化膜の *in-situ* 修飾も検討したが、チップによるDNAの破壊、あるいは膜と電極との接合が十分でないことなどにより、再現性のある電流—電圧特性は得られていない。これらを克服できるDNAナノ材料の開発に成功し、研究を継続していることを付記しておく。

研究成果の概要（英文）：DNA-based molecular device was tackled for futuristic gene sensor developments based on *in-situ* electroconductive modification of DNA self-assembly. Some direct or indirect assistance necessary to the goal were successfully developed; novel small-molecule, reactive compounds that enable versatile functionalization of DNA duplexes, scanning electrochemical microscopy imaging of DNA microdots, a new potentiometric platform for gene sensing, and etc. Unfortunately, the planned strategy, dip-pen nanolithography, has not yet achieved mostly due to the mechanical instability of the DNA self-assemblies. However, we are committed to taking on the challenges by using some DNA nanomaterials to provide the particular gene-sensing device.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：ナノバイオ・DNA・自己組織化・分子認識・バイオセンサー・遺伝子センサー・分子エレクトロニクス・走査プローブ顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの終了から僅か5年、DNA二重らせんの発見者J. D. Watson博士の全ゲノム配列が報告された (*Nature* (London), **452**, 872, 2008)。これでC. Venter博

士と併せて、個人が特定されているゲノム配列の事例は2件となった。特にWatson博士のケースはわずか2ヶ月で終了し、従来の1/100の低コスト（約100万ドル）で達成された。DNAシーケンスで得られる情報は、ほ

かの研究方法で得られる情報と比較すると圧倒的に質が高く量も多いので、高速化、低コスト化は新たな需要を生み出すであろう。そこで、個人のゲノムを低コストで解析することを目標に「1000ドルゲノム」が提唱された。

このような状況にあつて、従来の遺伝子センサーや1塩基多型 (SNPs) タイピングは終焉を迎えたといつてよいであろう。しかし遺伝子の全体像が明らかになったいまこそ、限られた遺伝子を対象に低コストで、簡単迅速に解析できる技術や装置が求められている。またそれによって初めて、ヒトゲノム解析の成果が本当に有効利用できるであろう。周知のように、血糖値や肝機能検査と比較して、DNA 検査のコストは著しく高いことに加え、現状の遺伝子センサーは実用の医療診断レベルに達してはいない。

## 2. 研究の目的

申請者は、金表面での DNA の自己組織化を利用した固定化法を開発することで、DNA 結合性薬物に対するバイオセンサーを世界先駆けて実現した。その後、科学技術振興機構「さきがけ」において、DNA 二重らせんをベースにした1分子ナノワイヤーの研究に従事した。図1に示すように、原子間力顕微鏡 (AFM) と組み合わせた小数分子レベルでの電気伝導度測定により、10量体オリゴヌクレオチドの抵抗率が、酸化還元活性な低分子と結合することで  $100 \Omega \text{ cm}$  程度と劇的に低下することを発見した (化学, **59**, 34, 2004)。

本研究では、DNA 自己組織化膜を対象に、*in-situ* にて、dip-pen ナノリソグラフィーと組み合わせた導電性処理を施すことでナノメートルサイズの電気回路を生成させ、回路の

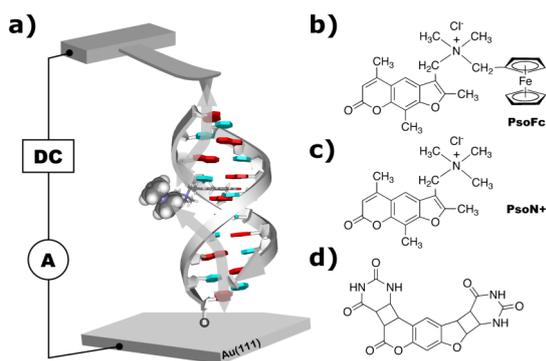


図1. 電気伝導度測定 (AFM) の模式図 (a) とソラレン誘導体の構造 (b, c). DNA に取り付けられたフェロセニル基が電子移動を媒介することで AFM チップ (Pt 蒸着) と金基板との間に電流が流れる。なお (d) は、ソラレンが核酸塩基と光架橋反応した際に形成する構造を示している。

交流特性値の変化からハイブリダイゼーションを検出する新しいチップ型遺伝子センサーの研究を行う。従来型のセンサーは、小型化や集積化、多重化に問題を抱えていたが、これらを高いレベルで解決し、かつ直流よりも多様な等価パラメータを活用してセンサー応答の信頼性を向上させる。来る「1000ドルゲノム」時代の要請に応える、新しいナノバイオセンサーシステムの確立に挑戦する

## 3. 研究の方法

本研究では、絶縁性のガラス基板に電極取り付けたものを支持体とする (図2)。電極間のギャップは  $100 \text{ nm}$  程度とする。まずガラス表面に、化学気相吸着法を用いてチオール修飾アルキルシラン単分子膜を生成させる。次に DNA 二重らせんを、自己組織的に結合させる。このとき、DNA は末端チオール誘導體とし、ジスルフィド結合生成を利用して共有結合的に固定化する。

ここで、ディップペンナノリソグラフィーを用いてソラレン化合物とのコンジュゲート形成を行わせる。すなわち、修飾剤を担持したカンチレバーを使って表面をなぞり、修飾剤を単分子膜内に拡散させる。次に、UV 光を照射してソラレンを光結合させる。このようにして作製した DNA チップについて、電流—電圧特性を調べることを通じて、遺伝子センシングに応用してゆく。

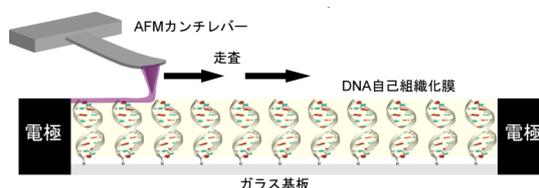


図2. ディップペンナノリソグラフィーによる DNA 自己組織化膜の *in-situ* 電気伝導性修飾。実験雰囲気中の水分 (湿度) によりチップと試料表面にメニスカスができ、カンチレバーに担持した修飾剤が試料内部に拡散してゆく。

## 4. 研究成果

### (1) 低分子 DNA 修飾剤、DNA コンジュゲートの合成

酸化還元反応を利用して DNA に分子情報応答性を持たせるために、低分子修飾剤および DNA コンジュゲートを合成した。前者には、図1に示したフェロセンや各種フェナントロリン錯体を導入したソラレン誘導體を合成した。一方後者としては、同じようにフェロセンやフェナントロリン錯体をタグに

選び、化学合成オリゴヌクレオチドに化学結合させた DNA コンジュゲートを合成した(図 3)。

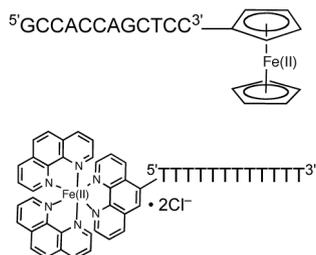


図 3. 酸化還元活性な金属錯体を結合させた DNA コンジュゲートの構造。

(2) DNA マイクロドットの走査電気化学顕微鏡イメージング・ハイブリダイゼーション検出

電気化学 DNA マイクロアレイセンサーのモデル系として研究を実施した。以前に報告した DNA・キノンポリマー複合体をカーボンファイバー電極に適用し、直径  $33\ \mu\text{m}$  の微小 DNA ドットを作製した。走査電気化学顕微鏡 (SECM) を用いた電気化学イメージングにより、DNA ドットの電気化学活性の可視化、およびハイブリダイゼーションの可視化検出に成功した。

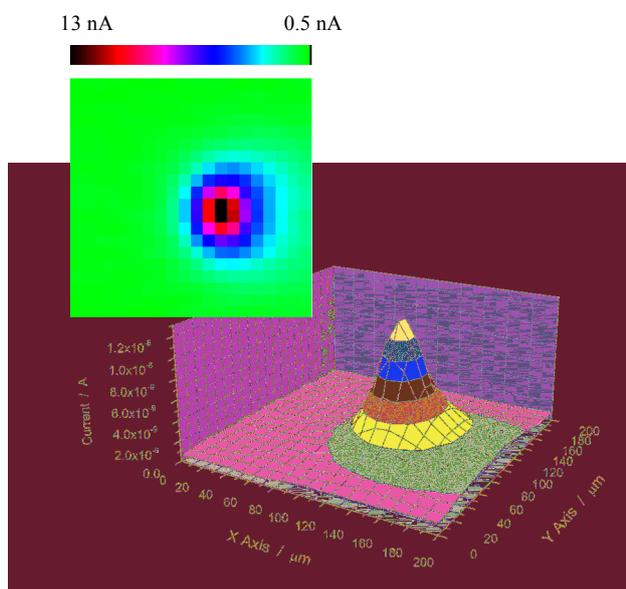


図 4. DNA—キノンポリマー複合体の SECM イメージ。上図は電極表面の  $200\ \mu\text{m}$  四方の 2D イメージであり、マイクロドット (直径  $33\ \mu\text{m}$ ) の酸化還元活性が、 $60\ \mu\text{m}$  程度の円状イメージとして示されている。下図はその 3D イメージ。

(3) 電位測定型遺伝子センサー

図 3 に示した二種類の鉄錯体—DNA コン

ジュゲートに、モデルターゲット DNA を組み合わせて実験した。モデルターゲット DNA は、それぞれの相補鎖を含み、それらをホスホロチオエート化 DNA (s-オリゴ) で連結した塩基配列になっており、DNA コンジュゲートを含んだサンドイッチ錯体を形成するだけでなく、金電極等に化学吸着して自己組織化膜を形成する (図 5)。また、二種類の鉄錯体が酸化還元対となるように、鉄—フェナントロリン錯体 (フェロイン) は酸化して 3 価の錯体として用いた。

はじめにモデルターゲット DNA をフェロセン化オリゴとハイブリダイズさせ、これを電極表面に固定化してフェロイン化 DNA に対する応答を観察したところ、ほぼ Nernst 式に準じた電位応答を示すことがわかった。このときの応答機構を種々検討し、新しい遺伝子センシングとして電位測定型センサーを提案することができた。

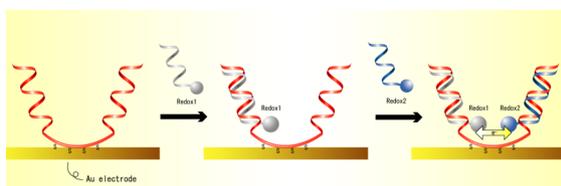


図 5. モデルターゲット DNA と DNA コンジュゲートからのサンドイッチ錯体形成。

(4) 微小くし形電極と組み合わせた DNA—フェロセンコンジュゲートの電圧—電流特性

DNA 二重らせんにフェロセン化ソラレンを結合させた DNA コンジュゲート試料を調製し、くし形電極と組み合わせて電流—電圧特性を評価した。具体的には、くし型電極 (電極ライン幅、間隔ともに  $2\ \mu\text{m}$ ) の電極ギャップ間に DNA コンジュゲートからの自己組織化膜を形成させ、真空条件下で電流—電圧特性を調べた。その結果、観察される電流は数十 pA と十分な大きさであるものの、 $\pm 5\ \text{V}$  程度のしきい値電圧を示しセンシング応用に支障があった。これは、他の有機系ナノ材料にも共通した欠点であり、DNA コンジュゲートと電極との物理的な接合が十分でないためと考えられた。

また研究の当初に予定していた *in-situ* 電気伝導性修飾についても併せて検討した。原子間力顕微鏡を用いたディップペン法を中心に各種検討したが、カンチレバーで DNA を損傷してしまうことが多く、残念ながら良好な結果を得るには至っていない。

以上の結果から、電極との接合が良好で (大きな接触面を持つ)、かつ機械的強度に優れた (複数の DNA 二重らせんからナノ構

造が出来上がっている) 新たな DNA 材料を探索した。別途 DNA デンドリマーの研究から、当該の研究目的にも合致すると考えられるナノ材料の開発に成功しており、くし型電極と組み合わせた電圧—電流特性の測定に着手していることを付記しておく。

#### 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 2 1 件)

- ① J. Shimada, T. Maruyama, M. Kitaoka, H. Yoshinaga, K. Nakano, N. Kamiya, M. Goto, Programmable protein-protein conjugation via DNA-based self-assembly, *Chemical Communications*, 査読有, 2012, in press.
- ② T. Yamasaki, F. Mito, Y. Ito, S. Pandian, Y. Konoshita, K. Nakano, R. Murugesan, K. Sakai, H. Utsumi, K. Yamada, Structure-Reactivity Relationship of Piperidine Nitroxide: Electrochemical, ESR and Computational Studies, *J. Organic Chemistry*, 査読有, Vol. 76, No. 2, pp. 435~440 (2011 年 1 月).
- ③ 中野幸二, 原子間力顕微鏡 (AFM) で生体分子を見る, 化学と工業, 査読無, 64 巻 6 号, 460-461 (2011).
- ④ K. Nakano, H. Yamanouchi, H. Yoshinaga, N. Soh, T. Imato, Label-free DNA detection platform based on atomic force microscopy visualisation: characterising the molecular-recognition-triggered conformational changes of an immobilised receptor oligonucleotide probe, *Chemical Communications*, 査読有, Vol. 46, No. 31, pp. 5683-5685 (2010).
- ⑤ K. Nakano, Y. Katsumi, N. Soh, T. Imato, An atomic force microscopy assay of intercalation binding, unwinding and elongation of DNA, using a water-soluble psoralen derivative as a covalent binding probe molecule, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有, Vol. 83, No. 3, pp. 273-275 (2010).
- ⑥ N. Kamiya, Y. Shiotari, M. Tokunaga, H. Matsunaga, H. Yamanouchi, K. Nakano, M. Goto, Stimuli-responsive nanoparticles composed of naturally occurring amphiphilic proteins, *Chemical Communications*, 査読有, No. 35, pp. 5287-5289 (2009).
- ⑦ K. Nakano, H. Matsunaga, M. Murata, N. Soh, T. Imato, Synthesis of Circular Double-Stranded DNA Having Single-Stranded Recognition Sequence As

Molecular-Physical Probe For Nucleic Acid Hybridization Detection Based On Atomic Force Microscopy Imaging, *Analytical Sciences*, 査読有, Vol. 25, No. 8, pp. 993-998, (2009).

[学会発表] (計 1 2 件)

- ① K. Nakano, DNA Dendrimer Self-Assembly for Nano-Biosensing Applications, The 2011 Global COE International Symposium on Future Molecular Systems, 2011, Fukuoka, Japan
- ② K. Nakano, K. Nakamura, T. Kimura, H. Yoshinaga, N. Soh, T. Imato, Positive-feedback-mode scanning electrochemical microscopy imaging of DNA-grafted benzoquinone polymer cast film for micrometer-sized hybridization biosensor applications, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010, Honolulu, USA.
- ③ K. Nakano, T. Kimura, H. Yoshinaga, N. Soh, T. Imato, Potentiometric Gene Sensor based on EMF Generation from Redox-Labelled Oligonucleotide Probe Pair, *Faraday Discussion 149: Analysis for Healthcare Diagnostics and Theranostics*, Edinburgh, UK, 2010.

[図書] (計 2 件)

- ① K. Nakano, "Scanning Electrochemical Microscopy Imaging of DNA Arrays for High Throughput Analysis Applications", N. Eliaz Ed. "*Modern Aspects of Electrochemistry. Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine II*", Springer, New York, pp. 105-142, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: "Potentiometric Gene Sensor Based on EMF Generation from a Redox-Labeled Oligonucleotide Probe Pair"

発明者: K. Nakano, T. Kimura, T. Imato

権利者: K. Nakano, T. Kimura, T. Imato

種類: US Patent Provisional Application

番号: 61/375946

出願年月日: 2010 年 8 月 23 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.cstf.kyushu-u.ac.jp/~imatolab/index-j.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中野 幸二 (NAKANO KOJI)

九州大学大学院・工学研究院・准教授

研究者番号：10180324