

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21750084

研究課題名（和文） 標識や分子マーカーの不要な電気化学SNP検出法の開発

研究課題名（英文） Development of Label-free Electrochemical SNPs detection using a nanocarbon film

研究代表者

加藤 大（KATOU DAI）

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・研究員

研究者番号：80533190

研究成果の概要（和文）：従来、標識や分子マーカーを必要とするDNA中の塩基多型（SNPs）の計測を、DNA中の各々の核塩基を同時に、識別、定量可能なナノカーボン薄膜電極を利用して、電気化学的に（酸化電流の大きさにより）高感度で直接検出する簡便な方法を開発した。またこのような新規計測法の定量性向上を図るために、DNA中の各々の核塩基の酸化反応を促進するナノカーボン薄膜表面構造、並びに、本測定法におけるDNA鎖長の影響を明らかにした。核塩基類を安定かつ高感度で測定するためにナノカーボン表面に酸素を導入したところ、C.V. < 1% (n=12)の安定性を得た。また、本測定における最適なDNA鎖長は、安定な直接計測（～24mer）と、ハイブリダイゼーション（回収）の両面の安定性の観点から、12～20merであることを確認した。また、本測定法が可能となる電気化学セルの試作を行った。

研究成果の概要（英文）：We used the electron cyclotron resonance (ECR) nanocarbon film electrode to develop the label-free electrochemical detection of SNPs of oligonucleotides, based on the direct oxidation of all the bases in both a wild-type oligonucleotide and its mismatch-type oligonucleotide. When treated the nanocarbon film surface, the treated film electrode provided the high electrode activity and stability needed to quantitatively detect the DNA molecule by direct electrochemical oxidation. The coefficient of variation (C.V.) value of 1 μ M guanine derivative at our film electrode was 0.75 % (n=12), which constitutes superior reproducibility to that of a conventional glassy carbon (GC) electrode (9.28 %, n=12). We also used the nanocarbon film electrode to detect SNPs from oligonucleotide. We found that the appropriate length of oligonucleotides was 12-20mer because such length was suitable with respect to stability for direct electrochemical detection and collection of the target obtained from an enzyme reaction and hybridization processes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：電気化学検出、DNA、SNP、ナノカーボン

1. 研究開始当初の背景

(1) ポストシーケンス研究としての主要な課題として、ゲノム中の一つの核酸塩基の変異 (Single Nucleotide Polymorphisms: SNP) を調べるプロジェクトが国内外でスタートしている。生物・医学的に意味のある遺伝子より得られた SNP 情報は、例えば、疾患遺伝子の原因や機構における分子レベルの解明をもたらすだけでなく、さらにはそれらの知見を基に、各個人に対する創薬や薬剤耐性の解明などが期待されるため、非常に重要である。

(2) SNP の計測法としては、未知の変異を調べる場合と、既知配列中の変異の有無を調べる二種類に大別される。前者に対しては、ダイデオキシ法による DNA の再シーケンシングが最も一般的である。一方、後者に対しては、ハイブリダイゼーション法が主流となっている。本法は、ガラスなどの固体基板上に調べたい DNA に相補的な DNA 断片を固定化し、そこへ被験 DNA を作用させ、両者間においてハイブリダイゼーションを行う。被験 DNA 中に塩基配列の変異、つまり SNP が存在する場合、ハイブリダイゼーションの熱力学的安定性は SNP が無い場合に比べて弱いことを利用して、対象の遺伝子配列の SNP を検出する。このハイブリダイゼーション法の検出技術としては、蛍光法が一般的であるが、蛍光検出ではバックグラウンド蛍光と蛍光の退色性による感度の低下、高価な標識蛍光分子等の観点で改善の余地がある。

(3) このような SNP 検出法において、近年、電気化学的手法が新たに注目されている。電気化学法は、蛍光法で必要なレーザー光源を必要としないため、簡便で極めて安価な部品から検出・測定システムを構成できる。このため、上述の蛍光分子の変わりに、被験 DNA を固定化プローブとハイブリダイゼーション後、電気化学活性を有し、なおかつ二本鎖を特異的に認識する分子 (インターカレータ) を作用させ、その電気化学信号の増減から間接的に塩基配列の違いを識別する方

法 (Anal. Chem. 1994, 66, 3830) などが考案されている。

(4) 一方、全く標識を必要としない検出技術として、DNA の核酸塩基の電気化学的な直接酸化が挙げられる。DNA を構成する全ての核酸塩基は電気化学活性であり、各塩基の酸化電位が異なることから、原理的には全ての塩基を検出可能である。実際に、全塩基の中で最も酸化の容易なグアニン (G) に着目して、DNA 中の G を酸化させてその濃度を測定する方法が知られている (J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 8933)。電気化学検出用電極としては、グラッシーカーボン (GC) などのグラファイト系材料が多用されてきた。しかし核酸塩基の直接的な酸化による検出では電極に高電位をかける必要があり、GC 電極の電位窓では、G およびアデニン (A) に基づく電流しか安定に検出できず、高電位側のチミン (T) やシトシン (C) 塩基の電気信号は検出できない。更に、GC 電極においては、DNA の電極表面への吸着が激しく、安定性の低下を招くといった問題があった。

(5) 申請代表者のグループでは、電子サイクロトロン共鳴 (ECR) スパッタ法で作製したカーボン薄膜を電極として使用すると、ボロンドープダイヤモンドに準じる電位窓を有し、本ナノカーボン膜を用いると、DNA、RNA を構成する全ての核酸塩基 (G, A, T, C, U) を電気化学的に直接識別、各々の酸化電流値により極めて再現性良く定量できること、並びにこれらの全核酸塩基に対する定量性から、p53 遺伝子配列由来の短いオリゴヌクレオチド (9 mer) 中の一塩基の変異を非標識に検出することに成功した (Angew. Chem. Int. Ed., 2008, 47, 6681; J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 3716)。さらには、オリゴヌクレオチドを電気化学的に酸化しても、DNA が酸化後、全く電極表面に吸着せず、極めて再現性の良い測定結果が得られることを示した。

2. 研究の目的

従来、標識や分子マーカーを必要とする DNA 中の SNPs 計測を、DNA 中の各々の核酸塩基を同時に、識別、定量可能なナノカーボン薄膜電極を利用して、電気化学的に高感度に直接検出することを目的とする。

3. 研究の方法

このような新規計測法の定量性向上を図るために、以下の点を明らかにする。

(1) ナノカーボン薄膜による DNA 断片の直接計測において、各々の核酸塩基や DNA 鎖長がナノカーボン電極での電気化学応答性に及ぼす影響を明らかにし、検出感度・検出限界をより向上させるためのナノカーボン膜表面の最適化を図る。

(2) 実在の遺伝子に基づく塩基配列中の任意の SNP 部位の検出を達成するため、ハイブリダイゼーション法と DNA 分解酵素反応を駆使して、対象領域の DNA 断片を抽出し、電気化学計測を行う。また、より微量な実試料での測定を実証する。

4. 研究成果

(1) ナノカーボン薄膜-核酸塩基間の電気化学特性の把握と膜表面の最適化

ナノカーボン薄膜の全核酸塩基に対する電極活性を向上させるため、薄膜表面物性と核酸塩基の電子移動速度定数の関係性に着目し、膜表面の最適化を検討した。これまでにカーボン膜表面の酸素濃度が電極活性に影響を及ぼすことがわかっていたため、まずはナノカーボン薄膜表面への酸素導入の効果を検討した。電極への酸素導入は、サイクリックボルタンメトリー法により電極表面に高電位を印加することで本薄膜電極の活性化を行った。

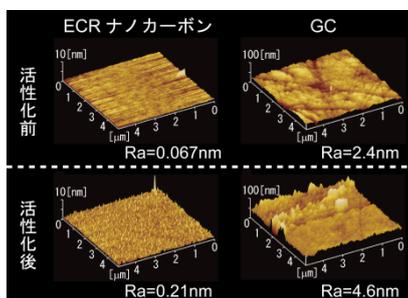


図 1. カーボン電極に高電位印加した場合の表面形状変化。GC に比べナノカーボンは高電位の印加に強く、原子レベルの平坦性を保持できる。

一般的に、カーボン膜に高い酸化電位を印加すると膜表面にカルボニル基などの酸素含

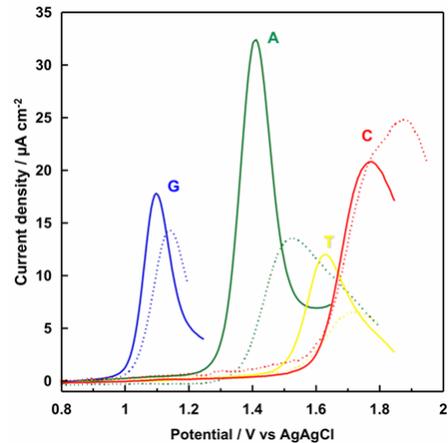


図 3. 電気化学処理によるナノカーボン薄膜電極の活性化。活性化ナノカーボン電極では全塩基に対する電極活性が向上し、より明瞭な酸化ピークが得られた。点線：活性化前、実線：活性化後

有基が導入される。GC などのグラファイト系の電極では、この活性化により膜表面も粗くなるため、膜に様々な分子が吸着し易くなり膜の安定性は低下する。図 1 に示した通り、実際に GC 電極は活性化によりその表面が大きく粗くなった。一方で、ナノカーボン薄膜に高電位を印加すると、膜の平坦性（平均粗さ=0.2 nm）を保持したまま表面に酸素含有基が導入されたことを確認した。その際の表面酸素 O/C 比は、XPS 測定により、0.066 から 0.098 へ増加していることが示された。この表面に酸素を導入したナノカーボン薄膜でオリゴヌクレオチドの電気化学測定を行ったところ、 ~ 24 mer 程度までの DNA 鎖長で

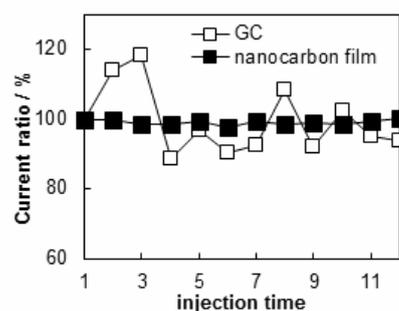


図 2. グアニン酸化体(8OHdG)の連続測定。GC に比べナノカーボンでは表面での吸着による応答値の減少は見られず、極めて安定な応答電流値を得ることができる。

あれば、安定に定量可能であり、酸素の導入によって、ナノカーボン電極表面への吸着を抑制できることを確認した。

さらに、活性化ナノカーボン電極を用いて DNA 酸化体の定量性を評価したところ、優れた検出限界 (3nM) と測定再現性 (C.V.値

=0.75% (n=12)) を得た。これらの値は従来のカーボン材料 (GC 電極) に比べて、非常に優れた結果であった (検出下限 7.2nM、C.V. 値=9.8% (n=12))。これは本ナノカーボンがその表面平坦性を損なうことなく活性化可能であり、その結果、表面への DNA 塩基の吸着を抑制でき、かつバックグラウンドノイズ電流の増加を防ぐことができたためである。上記の CV 値 1%以下という値は、臨床検査などの場で要求される高い測定精度に十分に応え得るものである。

また、ナノカーボン膜表面への酸素導入は、核酸塩基類の電気化学反応性を向上させることを見出した。図3に全塩基におけるナノカーボンは薄膜電極の矩形波ボルタモグラム (SWV) を示したように、ナノカーボン膜を活性化することで、核酸塩基分子が吸着することなくより高い電子移動速度が得られることが分かった。

一般的に、BDD 電極を電気化学的に活性化すると、ダイヤモンド微結晶の粒界に存在する sp^2 結合が選択的に分解するため、核酸に対する電子移動速度は低下する。本薄膜では、核酸塩基の電子移動に重要な sp^2 結合を約 60% 有しながらも、 sp^3 結合とのナノ微結晶ハイブリッド構造のため、 sp^2 結合の選択的分解が起こりにくいことに起因すると考えられる。

その際、膜活性化前後の核酸塩基の電子移動速度定数 k を回転ディスク電極法を用い、Koutecky-Levich 式より算出した。ナノカーボン薄膜の活性化前後での GMP,AMP の定数 k を表 1 に示す。定数 k は表面状態に依存し、活性化によって、大きく向上することが定量的に議論できた。

表 1. ナノカーボン薄膜電極における GMP,AMP の定数 k

活性化	O/C	K (cm/s)	
		GMP	AMP
-	0.06	3.1×10^{-3}	7.5×10^{-3}
+	0.12	2.0×10^{-2}	2.5×10^{-1}

(2) 実在遺伝子に基づく塩基配列中の SNP 部位の直接電気化学検出

得られたナノカーボン薄膜表面の全核酸塩基に対する電極活性、ならびに DNA の直接計測に最適な DNA 鎖長に関する知見に基づき、実在の DNA 配列中からの非標識 SNP 計測へと展開した。試料としては、実在遺伝

子で SNP に対する研究データベース化が進んでおり、比較解析のしやすい p53 癌抑制遺伝子(コドン 248,249 の SNPs)を対象とした。上記 1 で把握した安定な直接計測 (~24mer) と、ハイブリダイゼーション(回収)の安定性の観点から、直接検出と回収に共に適当な DNA 断片長として 12~20mer 程度とした。

上述の安定に測定可能な DNA 断片試料(12~20mer) を回収するため、ハイブリダイゼーション法と DNA 分解酵素反応により対象領域の DNA 断片を抽出・回収する予備検討を行った。具体的には、目的の配列を含むプローブ DNA を固定化した磁性ビーズ上で、目的試料である p53 癌抑制遺伝子のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせた後、一本鎖特異的 DNA 分解酵素(S1)を用いて、非二本鎖領域と未反応の一本鎖 DNA 試料を消化し、目的の配列 (p53 癌抑制遺伝子のコドン 248-249) 部分 DNA 断片を抽出・回収した。また前述の酵素反応試料は微量であるため、微量での電気化学計測を可能とする電気化学セルを設計し、最少 5 μ L の反応溶液量で計測可能であることを確認した。

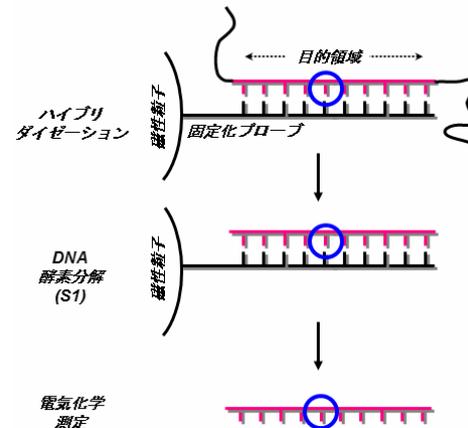


図 4. 測定対象とする DNA 領域の抽出。目的領域を含む DNA 試料と固定化プローブをハイブリダイゼーションさせた後、一本鎖特異的 DNA 分解酵素によって断片を消化、デネーチャリングによって目的領域を抽出。(○) が SNP 部位。

酵素反応後の回収した溶液を、微小体積測定用セルに導入し、SNPs 部位の直接計測を検証した。得られた計測法において、SNPs のバリエーションを検討した (図 5)。

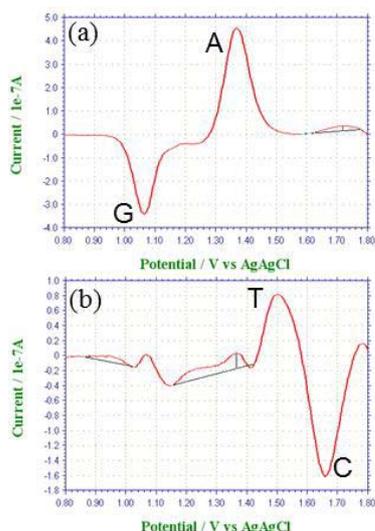


図 5. オリゴヌクレオチド中の SNPs 計測。野生型の配列と SNP を含む配列の差分を計測すると、下記のような上下一對のピークが得られる。(a)G->A 変異、(b)C->T 変異。

コドン 248 の G->A、C->T 変異、ならびに、コドン 249 の G->C、G->T 変異の簡易検出が可能であった。高電位側の塩基、特に T の関与する計測では、A と C の応答電流値にも影響を受けるため、その感度は G や A の関与する SNPs 計測よりも大きくなる傾向が見られた。さらなる表面の改良による感度の向上により、より高感度な計測が達成されると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① 加藤大、小森谷真百合、中元浩平、栗田僚二、廣野滋、丹羽修、Electrochemical determination of Urinary Oxidative Damaged DNA with High Sensitivity and Stability by Using a Nanocarbon Film Analytical Sciences, 2011, in press. 査読有り

[学会発表] (計 13 件)

- ① 加藤大、Direct electrochemical detection of DNA molecules using a sputtered nanocarbon film、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 28 日、神奈川大学 (横浜)
- ② 加藤大、上田晃生、小森谷真百合、後藤圭祐、廣野滋、丹羽修、DNA electroanalysis by using a nanocarbon film、Pacifichem2010、2010 年 12 月 17 日、ホノルル (米国)

- ③ 加藤大、後藤圭祐、小森谷真百合、廣野滋、丹羽修、Sputtered nano-hybrid carbon film for DNA electroanalysis、NANOJASP'2010、2010 年 11 月 30 日、バルセロナ (スペイン)

- ④ 加藤大、小森谷真百合、上田晃生、廣野滋、丹羽修、Development of a Nanocarbon Film for Simple DNA electroanalysis、The Asian Conference on Electrochemistry (ACEC2010)、2010 年 5 月 19 日、KKR ホテル (熊本)

- ⑤ 加藤大、小森谷真百合、上田晃生、栗田僚二、廣野滋、丹羽修、スパッタナノカーボン薄膜の全核酸塩基に対する電極特性の評価、電気化学会第 77 回大会、2010 年 3 月 31 日、富山大学

- ⑥ 加藤大、小森谷真百合、後藤圭祐、上田晃生、関岡直行、栗田僚二、廣野滋、丹羽修、“非標識 DNA 分析のためのナノカーボン電極” 第 19 回 MRS 学術シンポジウム、2009 年 12 月 9 日、横浜波止場会館

- ⑦ 小森谷真百合、加藤大、関岡直行、栗田僚二、廣野滋、丹羽修、スパッタナノカーボン薄膜電極による酸化損傷 DNA の電気化学計測、日本分析化学会第 58 年会、2009 年 9 月 24 日、北海道大学

- ⑧ 加藤大、小森谷真百合、後藤圭祐、上田晃生、関岡直行、栗田僚二、廣野滋、丹羽修、DNA の非標識分析に向けたスパッタナノカーボン薄膜の電極特性評価、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム・第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム、2009 年 9 月 14 日、九州大学

- ⑨ 加藤大、小森谷真百合、後藤圭祐、上田晃生、関岡直行、栗田僚二、廣野滋、丹羽修、全核酸塩基の簡易識別法-ナノカーボン薄膜電極による DNA の非標識分析-、東京コンファレンス 2009、2009 年 9 月 4 日、幕張メッセ

- ⑩ 小森谷真百合、加藤大、関岡直行、上田晃生、後藤圭祐、栗田僚二、廣野滋、丹羽修、全 DNA 塩基に対するスパッタナノカーボン薄膜電極の電気化学特性、東日本分析若手交流会、2009 年 7 月 4 日、秋保クレセント (仙台)

〔その他〕

受賞

第 19 回日本 MRS 学術シンポジウム奨励賞
(http://www.mrs-j.org/award/award2009_j.htm)

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 大 (KATOU DAI)

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・研究員

研究者番号：80533190