

第1節 材料

6. 核酸

1. 核酸の性質

デオキシリボ核酸 (DNA) またはリボ核酸 (RNA) は、遺伝情報を担う生体高分子である。核酸を検出するセンサ構築のためには、他のセンサの場合と同様に核酸特異的相互作用と特異的なシグナル発生が必要である。従ってここでは核酸特異的な相互作用とシグナル発生メカニズムについて概説する。DNA, RNAは図1に示したように、核酸塩基を1'位に有するデオキシリボースとそのデオキシリボースの5'-, 3'-位の水酸基がリン酸エステル結合で連結した直線状の高分子である。RNAではデオキシリボースの代わりにリボースが用いられている。リボース部分が非対称であるのでDNA, RNAは非対称分子となる。一般に5'-水酸基から3'-水酸基の方向に矢印で表される。核酸塩基としてDNAでは、アデニン(A), グアニン(G), シトシン(C), チミン(T)が用いられ、RNAではTの代わりにウラシル(U)が用いられている。DNAはAとT, GとCとで水素結合を形成することにより右巻き二本鎖DNA (Watson-Crick二重らせん) を形成する。ここでの水素結合形成は特異性が極めて高い。例えば、5'-ATGCTGA-3'のDNA断片とその相補的なDNA断片である5'-TCA GCA T-3'とが最も安定な二重らせん構

造を形成する。これを利用することにより特定の配列のDNA(特定遺伝子)を検出することができる。

2. DNA検出の原理

DNAの特有の相補性を利用したDNA検出法は、DNAプローブ法と呼ばれている¹⁾。図2にDNAプローブ法の原理(A)をDNAマイクロアレイ法(B), DNAセンサ(C)と併せて示した。まず、DNAプローブ法について解説する。図1の(A)のようにサンプルDNAをニトロセルロース膜やナイロン膜の基板上に固定化する。またDNAはポリアニオンなのでカチオン性膜と静電的に多点相互作用によって結合するが、紫外線をあてることにより強固に固定化される。これに探したい遺伝子配列に相補的なDNA断片(DNAプローブと呼ばれる)を作成し加える。加熱してゆっくりと冷やすことによって、サンプルDNAに目的の配列があればその部分とDNAプローブが二重らせんを形成する。この過程をアニーリングまたはハイブリダイゼーションと呼んでいる。未反応のDNAプローブを洗浄により除いて、目的DNAと二本鎖形成をしたDNAプローブを検出する。微量のDNAプローブを検出するためには、DNAプローブに目印を付けておいて、その目印を指標にし

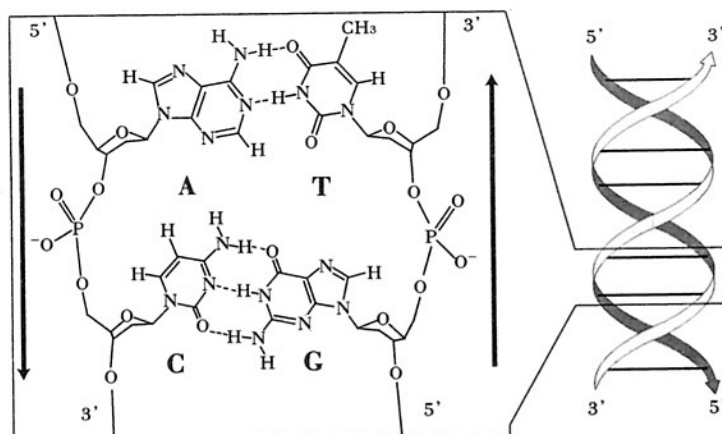


図1 DNAの構造

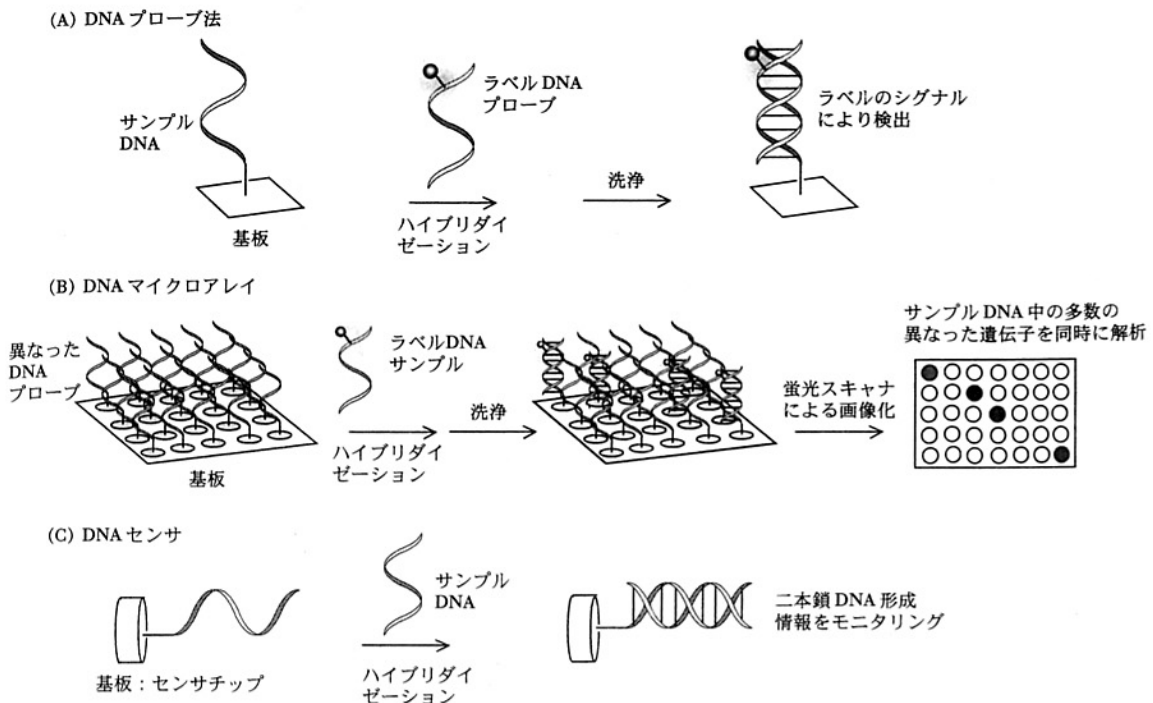


図2 DNAプローブ法によるターゲットDNA検出の原理(A)とこの手法のDNAマイクロアレイ(B)またはDNAセンサ(C)への応用

て検出が行われている。目印には、初期においては放射性同位元素が利用されていたが、現在では蛍光色素の関与するシステムが用いられている。例えば、ビオチン化 DNA プローブを用いて、アルカリホスファターゼ修飾アビジンを結合させ、脱リン酸化されることにより蛍光を発する色素を基質として加え、感度の増幅が行われている。この手法によってアトムル(10^{-18} モル；DNAでは約100万分子)レベルの検出が行われている。

最近発展が目覚ましい DNA マイクロアレイは、Stanford 大学(USA)の Brown らによって開発された技術である²⁾。これに対してリソグラフ技術を利用して基板上に DNA を高密度で合成する技術が Affymetrix 社(USA)によって開発されてきており、これは DNA チップと呼ばれている。しかし、現在ではこれら二つは明確に分けて使用されていない。DNA マイクロアレイ法においても、基本的には DNA プローブ法の原理を利用している。図2(B)に DNA マイクロアレイ法の原理を示した。ガラススライド等の表面をポリリジンやアミノプロピルシランでコートしてカチオン性の表面を作成し、数百マイクロサイズで DNA プローブをスポットする(このため

に DNA マイクロアレイヤーと呼ばれるロボットが利用されている)。DNA プローブ法と同様に紫外線をあてて固定化する。このようにして通常のガラススライドの上に数千の異なった DNA プローブを固定化することができる。このようにして作成されたものを DNA マイクロアレイと呼んでいる。この DNA マイクロアレイに蛍光色素を導入したサンプル DNA をハイブリダイゼーションさせ、洗浄後蛍光色素による検出を行う(このために共焦点レーザースキャナが利用されている)。DNA マイクロアレイ上のどの位置でどれぐらいの蛍光強度を得たかによって、どのような遺伝子がどれだけサンプル DNA 中に存在するかを知ることができる。この手法は DNA プローブ法と逆の関係と考えられるが、サンプル DNA 中の多数の遺伝子群に関して同時に解析できる点で根本的に異なっている。DNA マイクロアレイ法の場合、基板上に固定化されている DNA プローブをキャプチャープローブと呼ばれている。この手法は mRNA にも利用できる。癌細胞と正常細胞で mRNA の発現量が異なる遺伝子群を解析することによって、癌に関連する遺伝子の解析が試みられている。

DNA センサも特定の DNA プローブをセンサチップの基板に固定化したものが一般に利用される³⁾。概念を図2(C)に示す。このセンサチップにサンプル DNA を作用させる。目的の遺伝子があればセンサチップ上でハイブリダイゼーションが行われ、二本鎖 DNA が形成される。この二本鎖形成情報をセンサへ変換することにより、サンプル DNA 中の目的遺伝子に関する情報を得ることができる。DNA マイクロアレイは DNA センサを集積化したものとも考えられる。DNA センサ上での二本鎖 DNA 形成情報を取り出すために、種々の手法が開発されてきている。

3. 二本鎖 DNA 形成情報の取り出し法

センサチップ上での二本鎖 DNA 形成情報(目的遺伝子の存在情報)を蛍光変化や電気化学的シグナル等へ変換する手法が報告されてきている。ここではそれらの原理と代表例を挙げる。

3.1 蛍光変化を利用する方法

DNA マイクロアレイにおける検出法と同じと考えればよい。サンプル DNA を蛍光色素によって標識してセンサチップ上でハイブリダイゼーションを行う。目的 DNA が存在する場合はセンサチップ上に蛍光色素が濃縮されることになる。これを検出することにより目的遺伝子の量を見積もることができる。センサチップとして光ファイバを利用すれば、励起光の照射と蛍光の測定を同時に行うことができる。

蛍光色素の DNA サンプルへの直接的な修飾反応

に代わる方法として DNA リガンドの利用がある。すなわち、チップ上の二本鎖 DNA 形成情報を二本鎖に結合するリガンドによって達成しようとするものである。この目的を達成するための DNA リガンドとして、インターカレーター(DNA 二重らせんの塩基対間に平衡挿入、インターカレーションする色素)やグループバインダー(DNA 二重らせんの溝に結合する色素)が利用されている。図3にこれら DNA リガンドの DNA 二重らせんへの結合モデルを示した。しかしながら、これらの色素はいずれもカチオン性で、ポリアニオンである DNA は基本的にはそれらの間の静電的相互作用がその結合に対して寄与する。このため一本鎖 DNA(キャプチャプローブ)と二本鎖 DNA(目的 DNA とキャプチャプローブとにより形成された二本鎖)との厳密な識別は難しい。また、センサチップ表面へのこれら色素の非特異的吸着等も実際のセンサチップの応用時には問題となる。このため種々のマスキング法の開発も行われている。さらには、DNA プローブ法で述べた酵素による、増幅反応を利用したセンサシステムも報告されている。

3.2 電気化学的手法を利用する方法

電気化学的手法では、電極をセンサチップとして利用することにより二本鎖 DNA の形成情報を電気化学的シグナルに変換できるシステムを構築できる⁴⁾。電気化学的手法は、集積回路技術や電気化学的回路による増幅の可能性の他に、装置をコンパクト化できることから特に興味を持たれている。DNA マイクロアレイを電気化学的手法で達成できれば、

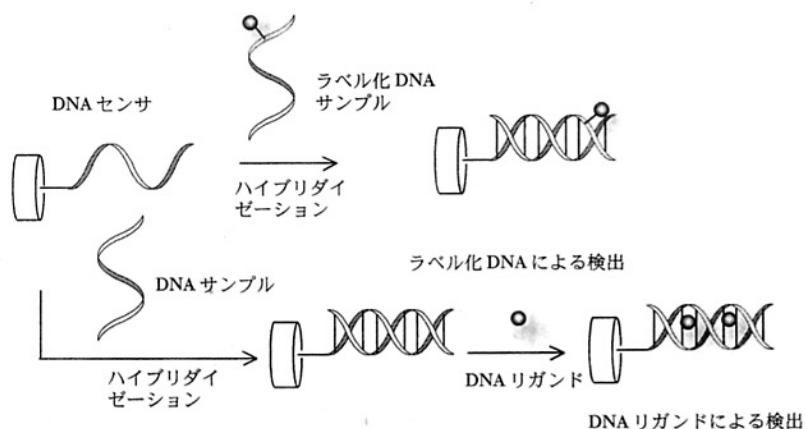


図3 ラベル化DNAまたはDNAリガンドを用いたDNAセンサの検出

実用的な次世代のDNAチップへと発展できることに疑う余地はない。このためにはDNAを電気化学的に活性なシグナルを示す分子で標識することや、電気化学的活性DNAリガンドを用いることが蛍光法の類推から考えられる。

可逆的電気化学的応答を示す分子としてフェロセンが利用できることが竹中らによって最初に報告⁵⁾されて以来、フェロセン化DNAを利用した電気化学的DNAセンサに関する数多くの報告がなされてきている。ここではこれらの研究例を中心に述べる。検出の概念を図4に示した。

サンプルDNAやRNAを直接に修飾するフェロセン化試薬が開発されていないので、DNAサンプルに電気化学的修飾試薬を作用させて電気化学活性DNAサンプルを調整する手法は、これまで報告されていない。しかし、ビオチン化DNAサンプルを電極上のキャプチャープローブとハイブリダイゼーションを行い、二本鎖形成によって電極上に固定されたビオチン化DNAをフェロセン修飾アビジンと結合させ、電気化学的に検出した例が報告されている(図4(A))⁶⁾。

フェロセン化DNAの遺伝子検出への応用は、初期にはサンドイッチ法が用いられた(図4(B))。目的DNAに相補的な二つのDNA配列を用意する。一つを電極上に固定化するキャプチャープローブとして用い、もう一つにフェロセンを修飾する(これをシグナルプローブと呼ぶ)。この二つのプローブとサンプルDNAとを混合してハイブリダイゼーションを

行う。目的DNAが存在するとシグナルプローブが電極に目的DNAを介して固定化される。従って、電極上に濃縮されたフェロセンの応答電流を測定すれば目的DNA量を見積もることができる。現在、シグナルプローブに修飾するフェロセンの量を増やしたり、シグナルプローブにビオチンを修飾し、これにフェロセン化金ナノ粒子を固定化したアビジンを作用させたりする等の改良が行われている。

また、図4(C)のようなヘアピン構造形成可能なフェロセン化DNAを電極に固定化したシステムが報告されている⁶⁾。ヘアピンのループ部分の配列をプローブ配列とすると、目的DNAが二本鎖形成を行うことによりフェロセンが図のように電極から離れる。これによってフェロセンに対応する電流値が減少する。この手法はサンプルDNAをフェロセン修飾する必要もなく、また、サンドイッチ法に必要なシグナルプローブも必要ないことから興味深い。しかしながら、現在のところ合成DNAを用いた例のみであり、PCR産物等の実サンプルに対する性能は不明である。

一方、電気化学的DNAリガンドを利用した手法も発展してきている。例えば、DNA結合性金属錯体である $\text{Co}(\text{bpy})_3^{3+}$ や種々のインターカレーター、グループバインダーであるヘキスト等を用いた例が報告されている(図5)⁷⁾。この系では金属錯体を除いて電気化学的可逆性は乏しい。竹中らはフェロセン化ナフタレンジイミドといったインターカレーターとフェロセンとを連結させた新規リガンドの合

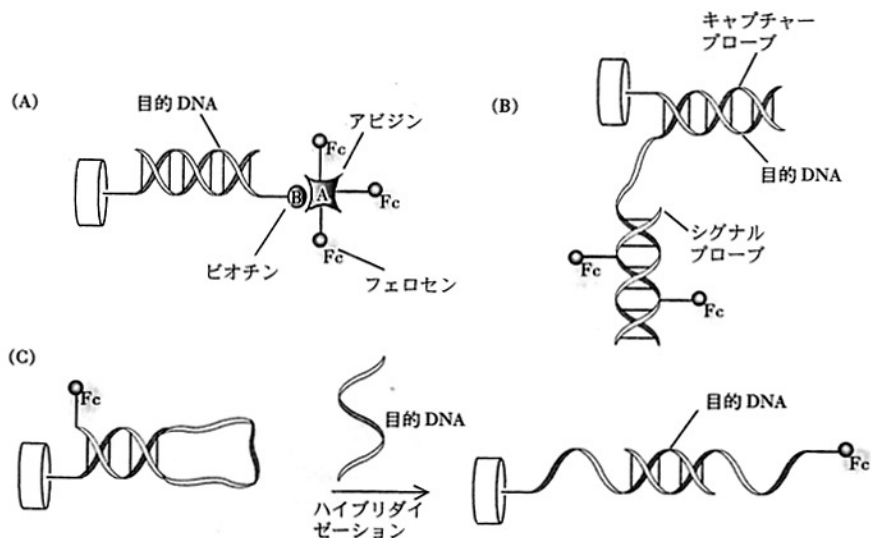


図4 電気化学的手法によるDNAセンサの検出例

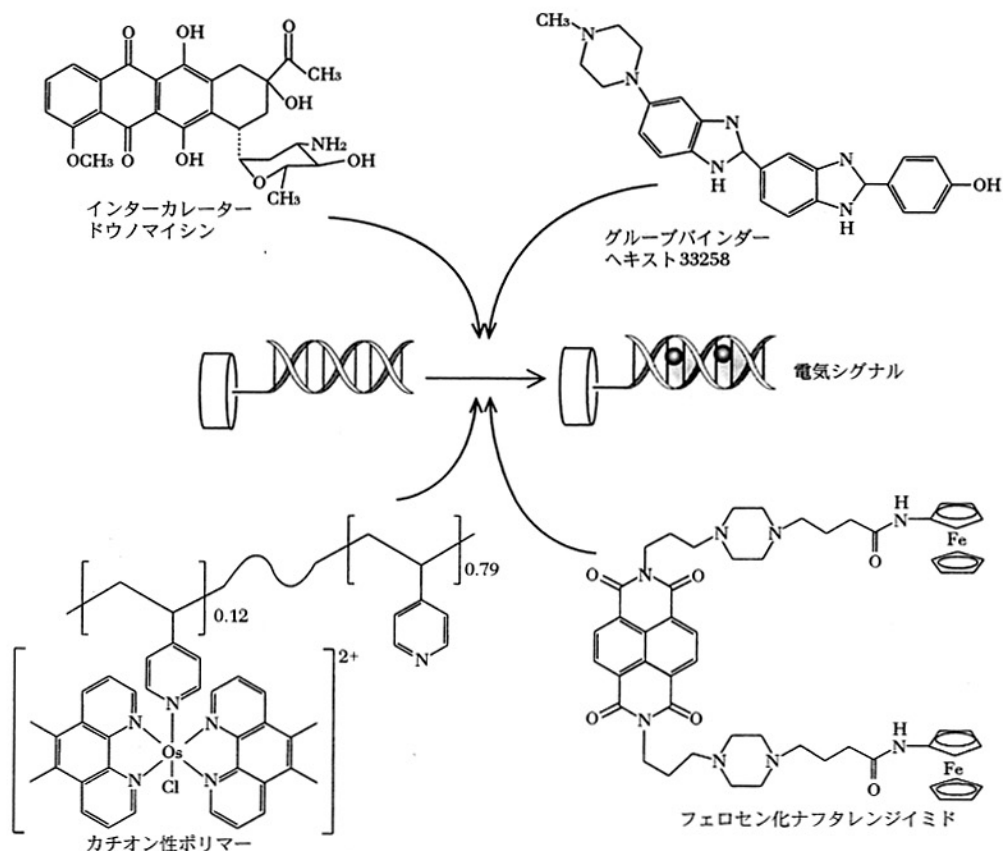


図5 電気化学的活性DNAリガンドを利用したDNAセンサの例

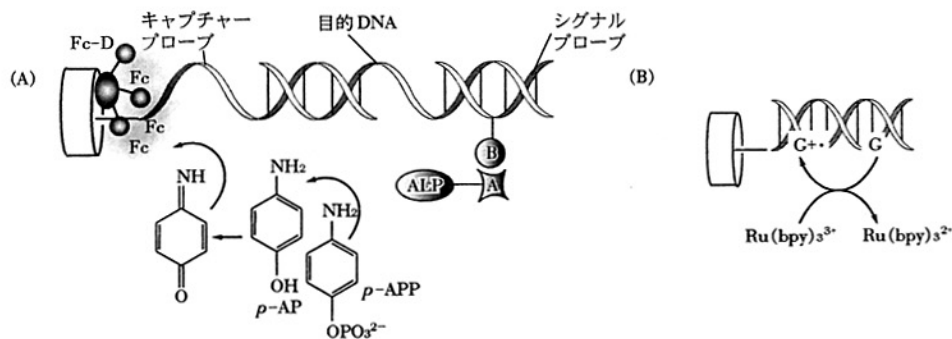


図6 触媒反応を利用したDNAセンサの例

成に成功した⁷⁾。本リガンドは可逆的な酸化還元反応を示すと同時に、二本鎖DNAに対する選択性も高いものであった。

最近では、ポリマーを利用した二本鎖DNA識別法も報告されてきている(図5)⁶⁾。また、酵素反応を利用した感度の増幅システムも報告されている⁶⁾。その例を図6に示した。図6(A)に示すように、キャプ

チャープローブとフェロセン化デンドリマー(Fc-D)を固定化したセンサチップとビオチン化シグナルプローブを利用したサンドイッチ法が報告されている。目的DNAが存在すると、ビオチン化シグナルプローブがセンサチップ上に固定化され、それにアビジン結合アルカリホスファターゼ、*p*-アミノフェニルホスフェート(*p*-APP)を基質として加える。ビ

オチン-アビジン相互作用によって固定化されたアルカリホスファターゼが、*p*-APPのリン酸エステルを加水分解されることにより生じる *p*-アミノフェノール (*p*-AP) の酸化電流によってシグナル増幅が達成されている。また、図6(B)のようにセンサチップ上でハイブリダイズされた目的DNAのグアニン (G) 塩基の酸化電流をルテニウム錯体 Ru(bpy)₃³⁺ によってメディエートさせることによる感度の増幅システムも報告されている⁴⁾。ルテニウム錯体を利用するシステムは電気化学的ルミネセンスの発生システムへの応用も可能であり、この観点からの研究も行われている⁹⁾。

金のナノ粒子へのDNAの修飾も可能となってきたので、これをDNAセンサと組み合わせたシステムも報告されてきている⁹⁾。

3.3 質量変化を利用する方法

センサチップ上に特異的な相互作用形成が起これば目的分子がチップ上に保持されることになり、そのチップ表面では質量変化が起こる。この変化をモニタできれば目的物の検出が可能である。このよう

な質量変化を高感度に検出可能な手法として、水晶発振子の振動数変化をモニタするマイクロバランス (QCM)¹⁰⁾ や表面プラズモン共鳴 (SPR)¹¹⁾ が知られている。これらの手法を用いて、DNA二重らせん形成の検出も行える。DNA二重らせん形成のQCMによるモニタリングは、岡畑らによって初めて報告された¹²⁾。これらの手法は比較的感度も高く、また、見かけの質量変化を大きくするシステムを導入することにより感度の向上が試みられている。

4. センサチップへのDNAの固定化方法

センサチップ表面へDNAを固定化する手法は種々検討がなされている¹³⁾。例えば、タンパク質の固定化方法として知られている手法をDNAへ応用した例が知られている。図7に例を示した。例えば、核酸のアミノ基やチオール基を合成の段階で導入したアミノ化オリゴヌクレオチドは、基板上に調整した活性エステルとの反応により連結反応が行われている (図7(A))。また、チオール化オリゴヌクレオチドの場合は、マレインイミドへのチオールのマイケル付加反応によって固定化が行われている (図7(B))。

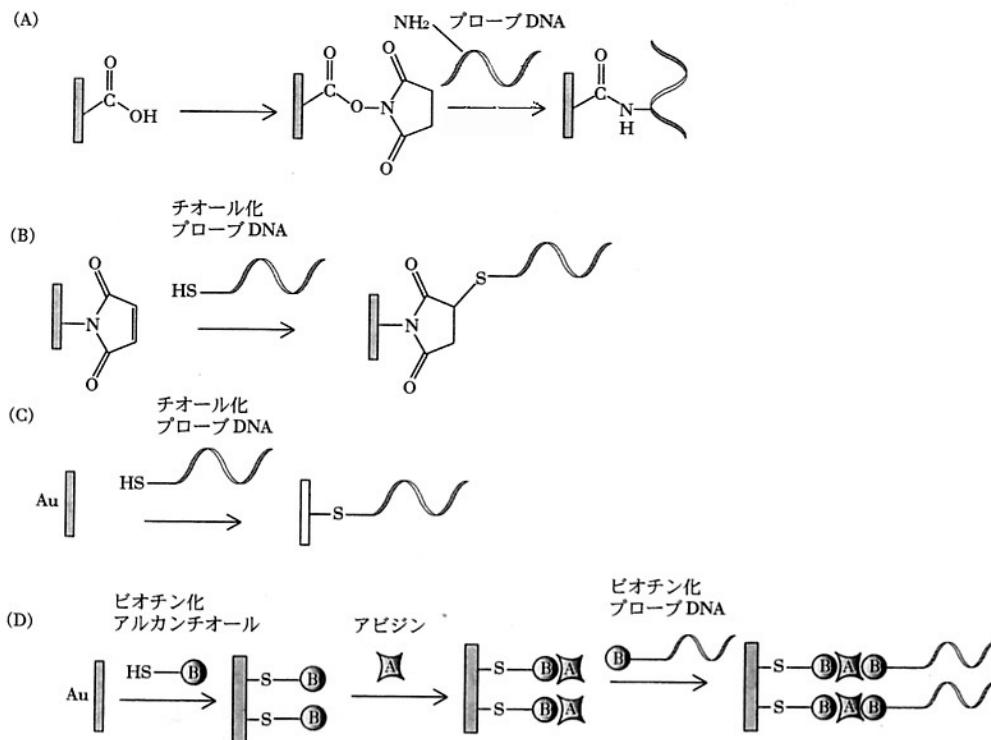


図7 基板へDNAの固定化法の例

最近多用されているのが自己組織化単分子膜(SAM)を利用した手法である。これはアルカンチオールが金表面上で金-硫黄相互作用とアルキル鎖同士の疎水相互作用によってSAMを形成し、強固に表面上に固定化されることを利用する手法である。チオール化オリゴヌクレオチドに関してもSAM形成による金基板への固定化が行われている(図7(C))。この場合は、別途ヒドロキシルアルカンチオールを混合したミックスSAMによる固定化が一般的である。ビオチン化アルカンチオールを利用してビオチンを基板へ固定化してさらにアビジンを加えアビジンコートを行い、ビオチン化オリゴヌクレオチドによってさらにDNAを固定化する手法も知られている(図7(D))。この手法は電気化学的検出よりもむしろQCMやSPRによる検出系でのDNAプローブの固定化に利用されている。また、エポキシド、アルデヒドと核酸との反応を利用した修飾法も知られている。

5. DNA修飾センサの新しい展開

センサ表面に形成されているDNAは、その設計によりタンパク質による酵素反応が可能となる。これを利用することにより、酵素反応活性を見ることができる。例えばDNAポリメラーゼやヌクレアーゼの活性評価が、質量変化に敏感なQCMを用いた系で行われている。また、二本鎖DNA修飾センサチップは、環境ホルモン(内分泌攪乱物質)や変異原性物質の検出にも利用されている。これは、これらの分子が二本鎖DNAと比較的親和性が高いことを利用したものである¹⁰⁾。

DNAやRNAにおいて、特定のタンパク質に特異的結合を起こす配列設計が可能である。これらはDNAまたはRNAアプタマーと呼ばれている。このDNAアプタマーをセンサチップ表面に固定化することによって、特異的タンパク質の検出が可能となる。すなわち、DNAアプタマーチップにより核酸以外のタンパク質や生体分子の検出が可能となる。例えばトロンピンアプタマー配列である5'-GGT TGG TGTGGT TGG-3'を基板の上に固定化することにより得られるDNAセンサチップを用いることにより、トロンピンの検出が可能となる(図8)¹⁴⁾。トロンピンは、血液凝固の過程の中心となっている生体内プロテアーゼである。

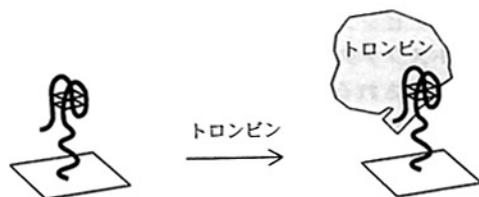


図8 DNAアプタマーを利用したトロンピンの検出

6. まとめ

ここではDNAセンサを中心に述べてきたが、すべてを網羅することはできないぐらい、最近の研究は目覚ましい。特にDNA塩基配列の一塩基の違い(SNP)を識別する方法については述べなかったが、ここで述べた手法が利用されている。また、ペプチド核酸(PNA)のDNAに対する配列識別能がDNAよりも高いこと等から最近その利用例が報告されているが、コストパフォーマンスは低いようである¹⁵⁾。さらに、タンパク質とDNAとのコンジュゲートを利用して、DNAチップをタンパクチップへ変換する手法も開発されてきており、センサへの応用も期待される¹⁶⁾。このようにDNAセンサはDNAへの検出に留まらず、種々のバイオセンサへの応用が期待される。DNAは比較的安定なことから、タンパク質を固定化したセンサよりも安定なセンサを構築できる可能性もあり興味深い。今後の発展が期待される。

参考・引用文献

- 1) Kricka, L. J., *Nonisotopic DNA probe Techniques*, (Academic Press Inc, New York) (1992)
- 2) Schena, M., *DNA Microarrays, A practical Approach*, (Oxford University Press, New York) (1999)
- 3) Piunno, P. A. E. and Krull, U. J., *Anal. Bioanal. Chem.*, **381**, 1004 (2005)
- 4) Gooding, J. J., *Electroanalysis*, **14**, 1149 (2002)
- 5) Takenaka, S.; Uto, Y.; Kondo, H.; Ihara, T. and Takagi, M., *Anal. Biochem.*, **218**, 436 (1994)
- 6) 椋本晃介, 竹中繁織, フェロセン化核酸の合成とそれらを利用した遺伝子の電気化学的検出, 有機合成化学協会誌, **64**(3), 208-221 (2006)
- 7) Takenaka, S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **74**, 217 (2001)
- 8) Mikkelsen, S. R., *Electroanalysis*, **8**, 15 (1996)
- 9) Wang, J., *Analyst*, **130**, 421 (2005)
- 10) Rogers, K. R.; Mulchandani, A. and Zhou, W., *ACS*

Symposium Series 613 Biosensor and Chemical
Sensor Technology, Washington, DC, ACS (1995)

- 11) Salamon, Z.; Brown, M. F. and Tollin, G., *TIBS*,
24, 213 (1999)
- 12) Okahata, Y.; Matsunobu, Y.; Ijio, K.; Mukai, M.;
Murakami, A. and Makino, K., *J. Am. Chem. Soc.*,
114, 8299 (1992)
- 13) Wang, Y.; Prokein, T.; Hinz, M.; Seliger, H. and
Goedel, W. A., *Anal. Biochem.*, 334, 216 (2005)
- 14) Xiao, Y.; Lubin, A. A.; Heeger, A. J. and Plaxco,
K. W., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 5456 (2005)
- 15) Brandt, O. and Hoheisel, J., *TREND in
Biotechnology*, 22, 617 (2004)
- 16) Boozer, C.; Ladd, J.; Chen, S.; Yu, Q.; Homola, J.
and Jiang, S., *Anal Chem.*, 76, 6967 (2004)

(竹中 繁織)