

電気化学的ヌクレアーゼ検出法の開発

平成 20 年 11 月

金沢 旬宣

目次

第 1 章	序論	1
1-1	背景	1
1-2	DNase I と RNase A	3
1-3	ヌクレアーゼの検出法	4
1-4	本論文の目的と概要	7
	参考文献	8
第 2 章	天然 RNA 電極による電気化学的 RNase センサ	9
2-1	緒言	9
2-2	天然 RNA 修飾グラシーカーボン電極の調整と RNase 検出への応用	10
2-2-1	グラシーカーボン電極への天然 RNA の固定化	10
2-2-2	電気化学的測定	10
2-2-3	RNase センサとしての性能評価	11
2-3	金電極上での SAM 形成と天然 RNA 修飾と RNase 検出への応用	14
2-3-1	金電極上での SAM 形成と天然 RNA の固定化	14
2-3-2	電気化学的測定	15
2-3-3	RNase センサとしての性能評価	15
2-4	結言	22
	参考文献	24
第 3 章	フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾センサ	25
3-1	緒言	25
3-2	実験	26
3-2-1	ケミカル	26
3-2-2	フェロセン化オリゴヌクレオチドの調整	26
3-2-3	均一系中の反応	26
3-2-4	フェロセン化 DNA 修飾電極の調製	27
3-2-5	電気化学測定と電極上の酵素反応	27
3-2-6	QCM 測定	27
3-3	フェロセン化オリゴヌクレオチドの合成	28
3-4	均一系中の反応性評価	29
3-5	金電極上への固定化(吸着)、固定化量の算出	31
3-6	QCM 測定	32
3-7	DNase I 活性の電気化学的検出	32
3-8	結言	35
	参考文献	36

第 4 章	自己組織化膜 (SAM) を利用したセンサ	38
4-1	緒言	38
4-2	実験	40
4-2-1	ケミカル	40
4-2-2	フェロセン化オリゴヌクレオチド (FCODN) の合成	40
4-2-3	FcODN - 修飾電極の調整	40
4-2-4	HPLC	40
4-2-5	電気化学測定	41
4-3	結果と考察	41
4-3-1	金電極上の FcODN の固定化条件の検討	41
4-3-2	シトシンを利用した固定化法で調製した電極の固定化評価	42
4-3-3	フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極の安定性評価	43
4-3-4	シトシン固定化法を利用した DNase I 活性の電気化学的検出	44
4-4	結言	46
	参考文献	48
第 5 章	結論	49

第1章 序論

1-1. 背景

生体高分子の代表である核酸は、塩基と糖、リン酸からなるヌクレオチドがリン酸エステル結合で連なった直鎖状の高分子である¹⁾。図1-1に核酸の構造を示すが、糖の違い(2'位が、水素(DNA)か水酸基(RNA)であるか)によって、2-デオキシリボースを持つデオキシリボ核酸(DNA)と、リボースを持つリボ核酸(RNA)とがある。DNAの場合、アデニン(A)とチミン(T)、グアニン(G)とシトシン(C)は水素結合を形成する。AT対が2つの水素結合を形成するのに対し、GC対は3つの水素結合を形成する。そのため、GC含有量が高い領域では安定性が高まる。一方、RNAは、アデニン(A)とウラシル(U)、グアニン(G)とシトシン(C)で塩基対を形成する。塩基としてチミンではなくウラシルで構成されるが、ウラシルもチミン同様ピリミジン骨格であり、アデニンと塩基対を形成する。ウラシルは、チミンのメチル基が水素に置換された塩基である。

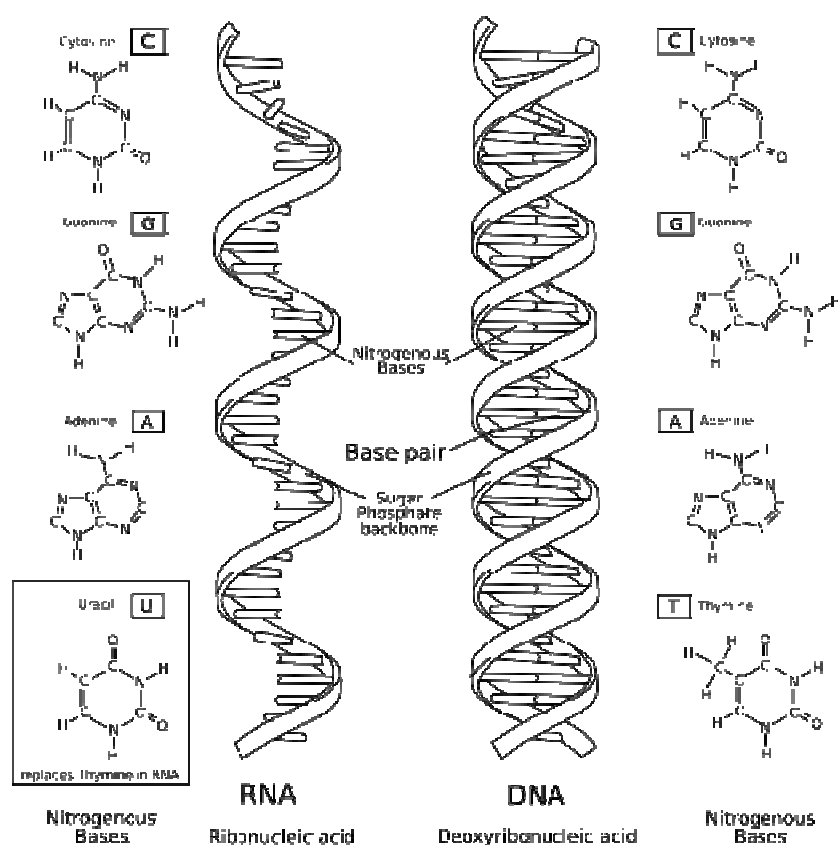


Figure 1-1. Structure of DNA and RNA

核酸の生物学的および化学的な構造と機能解明により、目覚ましい遺伝子工学の発展があり、すでに数年前にヒトゲノムプロジェクトによるヒトの全ゲノムである30億塩基対のDNA配列が解明された^{2,3)}。現在では、大腸菌等に有用なたんぱく質を大量に作らせること

が可能となっており、すでに一部は商品化されている⁴⁾。また最近では、核酸の創薬への応用が試みられている^{5,6)}。

ヌクレアーゼ(nuclease)は核酸を分解する酵素の総称であり、デオキシリボ核酸(DNA)ないしリボ核酸(RNA)の糖とリン酸間のホスホジエステル結合を加水分解してヌクレオチドとする^{7,8)}。表 1-1⁸⁾に代表的なヌクレアーゼをまとめたが、RNA を分解するリボヌクレアーゼ(ribonuclease, RNase)と DNA を分解するデオキシリボヌクレアーゼ(deoxyribonuclease, DNase)に分類できる他、両方を分解することができるヌクレアーゼも知られており、その役割は様々である。ウイルスが有するヌクレアーゼには、宿主の核酸を分解して自らの核酸の原料とする役割を持つものも知られている⁷⁾。また、制限酵素もヌクレアーゼの一種であり、これは外来の核酸を分解してウイルスの感染、増殖を防ぐ役割がある。核酸がメチル化されているとヌクレアーゼは働かないため、自分の核酸を無闇に分解しないようにこの酵素を有する細菌も多く、多細胞生物においては死滅した細胞の核酸を分解するためのヌクレアーゼが生産されることがあるが、特殊な例としては紫外線の影響で二量化したチミジンを取り外すためのヌクレアーゼも知られている。分解の形式によってエンドヌクレアーゼ(endonuclease)とエキソヌクレアーゼ(exonuclease)に分類される。エンドヌクレアーゼは核酸配列の内部で核酸を切断するもので、制限酵素がその代表例である。エキソヌクレアーゼは核酸配列の外部から、すなわち 5'端または 3'端から削るように分解する。DNA ポリメラーゼもエキソヌクレアーゼ活性を有しており、これは DNA 複製中のミスを校正するためである。

Table 1-1. Properties of Some Useful Nucleases

Enzyme	Specificity	Phosphates	Reference
RNase T1	G-specific RNA endonuclease	2', 3'	Ehresmann et al. (1987)
RNase CL 3	C-specific RNA endonuclease	2', 3'	Ehresmann et al. (1987)
RNase U2	A > G-specific RNA endonuclease	2', 3'	Ehresmann et al. (1987)
RNase A	C,U-specific RNA endonuclease	2', 3'	Silberklang et al. (1997)
RNase T2	Single-stranded-specific RNA endonuclease	2', 3'	Ehresmann et al. (1987)
RNase H	RNA endonuclease of RNA-DNA hybrid duplexes	5'	Berkower et al. (1973)
Mung bean nuclease	Single-stranded-specific DNA or RNA endonuclease	5'	Laskowski et al. (1969)
Micrococcal nuclease	Single-stranded-specific DNA or RNA endonuclease	3'	Sulkowski et al. (1969)
DNase I	Nonspecific DNA endonuclease	5'	Sambrook et al. (1989)
DNA Exonuclease III	3' DNA exonuclease	5'	Sambrook et al. (1989)

1-2 . DNase I と RNase A

Deoxyribonuclease I (DNase I, EC3.1.21.1)は一本鎖または二本鎖のホスホジエステル結合を加水分解する配列特異性のないエンドヌクレアーゼとして知られている¹²⁾。加水分解する際には二価の金属イオン(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+})が必要であり、5'リン酸と3'水酸基を有したヌクレオチドを生成する¹²⁾。 Mg^{2+} は水分子のホスホジエステル結合への求電子反応に関与し、 Ca^{2+} は酵素反応において最適な構造を維持する役割がある⁹⁾。また、二価の金属イオンの種類によって切断様式が異なる。 Mg^{2+} 存在下では二本鎖 DNA にランダムにニックを入れるが、 Mn^{2+} 存在下では二本鎖を同時に切断する。さらに DNase I の特徴としてオリゴマーよりも一本鎖 DNA、さらに二本鎖 DNA に対して作用しやすく、平均にテトラヌクレオチドを生成することが知られている¹⁰⁾。また、プリン・ピリミジン配列では5'方向のピリミジンを優先的に認識し分解する特徴を有する¹¹⁾。

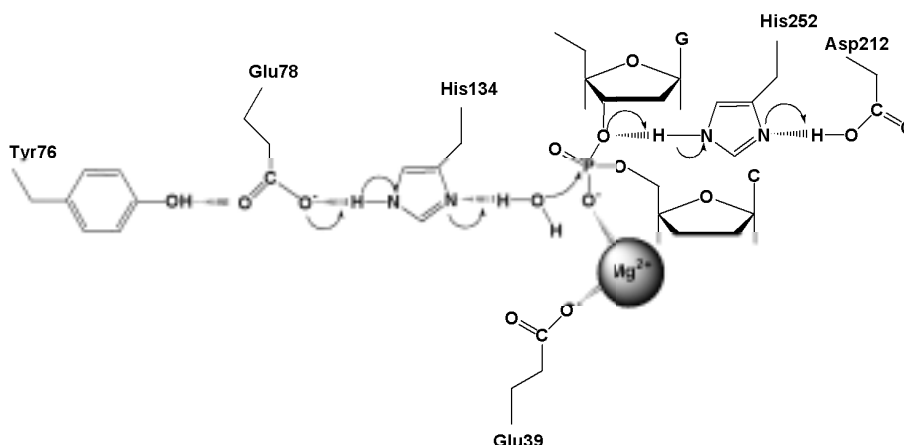


Figure 1-2. Hydrolysis mechanism of DNA with DNase I²⁾.

DNase I は器官や体液内の DNA を加水分解することから、膵臓、腎臓、小腸や胃などの消化器官や尿、血液そして精液などの体液内に存在することが知られている。また、細胞代謝での DNA の排除に関与しており、DNase I は生体内で重要な役割を果たしている。

さらに DNase I は様々な疾病に関与している。血液中の DNA 濃度が増加した場合、DNA や DNA-タンパク質複合体が血管中に蓄積される。この蓄積によって様々な自己免疫疾患を引き起こされる¹³⁻¹⁹⁾。例えば、血管壁や糸球体、関節に DNA や DNA-タンパク質複合体が蓄積され、糸球体腎炎や関節炎そして発疹を引き起こす。この場合、疾病患者の DNase I 活性は正常者に比べて低いことが報告されている^{20,21)}。さらに血清 DNase I 活性は乳がんと口腔がんの患者で高く、悪性リンパ腫や胃がんをもつ患者では DNase I 活性が低いことも報告されている²²⁾。

一方、DNase I を用いた病気の治療も行われている。実際に遺伝病の一つである嚢胞性

線維腫(CF)の治療に用いられている。肺機能不全を引き起こし、細菌感染が起きると白血球がこの細菌を破壊する。破壊された細菌から大量の DNA が放出される。その放出された DNA と肺の細胞外基質が相互作用することによって、気管内で非常に高い粘性を持つ粘液を生じる。よって CF 患者では DNA 濃縮が起きる。そこで DNase によって放出された DNA を分解させ、代謝させるような治療法が行われている²³⁾。

一方、Ribonuclease A (RNase A, EC 3.1.27.5) は、一本鎖 RNA を切断するエンドヌクレアーゼの一つであり、食物中に含まれる RNA を消化する酵素として知られている。小さく安定で結晶化しやすいため、生化学研究において重要な酵素とされてきた²⁴⁻²⁹⁾。この酵素を使って、C. Anfinsen はアミノ酸配列が折りたたまれた蛋白質の構造を決めていることを示し^{24,25)}、S. Moore と W. Stein は特有のアミノ酸配置が酵素の触媒中心に使われていることを示した²⁶⁾。リボヌクレアーゼ A は R. B. Merrifield によって初めて合成された酵素でもあり、これによって生物学的分子は人工的に作ることもできる単なる化学物質であることが示された²⁷⁾。これらの中心的な考えは全て、RNase の助けによって発見されたもので、これら発見に対してノーベル賞が授与されている。RNase A は驚くほど安定であることが知られている^{28,29)}。例えば、ウシの膵臓から RNase A を精製する手順で、抽出物は硫酸で処理し沸騰しかけの温度まで加熱するが、リボヌクレアーゼ A だけが唯一生き残る。この安定性は、鎖の異なる部分をくっつける 4 つのジスルフィド結合によると考えられている²⁴⁾。RNase A やそのオリゴマー、ホモログは、特にガン細胞に対しての細胞毒性、細胞増殖抑制の作用を持っている。この効果を使って、RNase のホモログであるオンコナーゼからリボヌクレアーゼ薬剤が作られ、特に皮膚がんの外用薬として用いられている^{29,30)}。

このようなヌクレアーゼはヒトの皮膚、汗や唾液など様々なところに存在し、上記のように生体内で重要な働きをしている。しかし、バイオ実験では、滅菌水、RNase・DNase フリー水など実験用途に応じて様々な水が使い分けられている。例えば RNAi、RT-PCR、*in situ* ハイブリダイゼーションなどの RNA 実験では、RNA 分解酵素である RNase の混入を防止することが重要であり、実験用水として RNase フリー水を使用することが求められる。RNase は 100 の煮沸あるいはオートクレーブでは不活化されないため、DEPC (Diethyl pyrocarbonate) ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OCOOCCOOCH}_2\text{CH}_3$) によって不活化処理されることが多い³⁰⁾。しかし、DEPC はトリスバッファー中では不安定であり、トリスを含む溶液には用いることができない³¹⁾。また、細胞毒性や強い発癌性を有するため³²⁾、DEPC は RNase の不活化をしたのち、オートクレーブにより分解する必要がある。しかし、オートクレーブによる DEPC の分解は必ずしも完全ではない。これは DEPC 処理水に匂いが残ることからも確認できる。残存した DEPC が実験に障害を与えることは容易に想像できる。また、DEPC は分解されるとエタノールと二酸化炭素になり、DEPC 処理水は RNase を含まないものの有機物およびイオンは高濃度 (一例として TOC 26,000 ppb、比抵抗 0.15 MΩ-cm) に含まれ、後段の実験操作において影響を及ぼす可能性も示唆される。

従来から、超純水装置においても限外ろ過膜と紫外線ランプを組み込むことにより、RNaseフリー水を精製することができていたが、それらを有さない超純水装置ではRNaseを除去することができず、あとから追加することも不可能であった。また、ほとんどの超純水装置の最終フィルターは0.22 μm のメンブレンフィルターであり、微生物と微粒子を除去する目的で使用されている。しかし、メンブレンフィルターではRNaseを除去することはできない。このような状況から一部のヌクレアーゼがバイオ実験で必要不可欠な水や実験で使用する試薬中への混入がしばしば観測され、実験で用いている核酸が実験途中で分解され、その実験結果に悪影響を及ぼすことがしばしば見られている。このことからヌクレアーゼフリー環境下での実験が求められている。特にRNaseは安定でオートクレーブにも耐えるためにその混入を防ぐことがRNAを使用するバイオ実験に重要と言っても過言でない。このことからヌクレアーゼフリーの超純水とともにヌクレアーゼの混入を簡便かつ迅速に検出できる手法の開発が期待されている。また、ヌクレアーゼの検出はバイオ実験における環境の汚染の検査だけではなく、上記に述べた疾病の診断にも応用できると期待される。

1-3. ヌクレアーゼの検出法

ヌクレアーゼについての研究は生体機能や生体メカニズムの解明、そしてヌクレアーゼフリーな研究環境を検査するうえで重要なことである。現在、様々なヌクレアーゼ活性のアッセイ法の開発や解析が報告されてきている^{22,33-37}。主に蛍光を利用した検出法が行われている(図 1-2 参照)。例えば、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)は最も一般的な手法である³⁸⁻⁴²。FRETを用いたヌクレアーゼ活性の検出は蛍光と消光剤を導入した基質が用いられている。基質が切断される前は蛍光と消光剤が近接しているため、FRETにより蛍光は発光しない。しかし、ヌクレアーゼが存在すると基質が切断され、蛍光と消光剤の間の距離が変化し、FRETが起きなくなり蛍光が観測される。このときの蛍光強度をモニタリングすることでヌクレアーゼ活性が検出できる。このような蛍光を利用した検出法は可視化が可能であり、さらに高感度である。よって、ヌクレアーゼを検出する手法としてはよりよい手法の一つである。

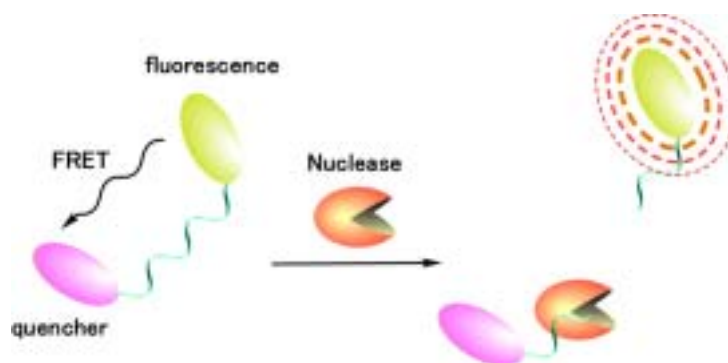


Figure 1-2. DNA Alert as nuclease activity detection based on FRET.

最近では電気化学的検出法も報告されてきている。図 1-3 に示すように Hillier らはヌクレアーゼによって切断された基質の拡散電流を利用したヌクレアーゼ検出法を提案している⁴³⁾。ヌクレアーゼ処理前後のフェロセン化した基質の分子量の違いを利用し、切断された基質が拡散することによってフェロセン由来の電気応答がヌクレアーゼ処理前よりも増加するというものである。

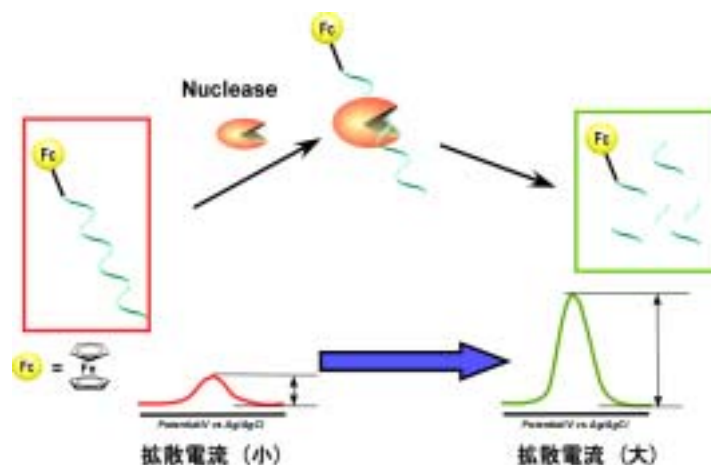


Figure 1-3. Nuclease activity detection based on a difference in the diffusion current.

DNase I 活性の検出においてもいくつかの検出法が報告されている。その中でも蛍光を利用した手法が最も多く報告されている⁴⁴⁻⁴⁷⁾。例えば、single radial enzyme diffusion (SRED) method と呼ばれる検出法がある⁴⁵⁻⁴⁷⁾。SRED の検出法の原理図を図 1-5 に示す。この手法は蛍光色素の臭化エチジウムと DNA を混合したアガロースゲルを用いて行っている。調製したアガロースゲルに DNase I を添加し、DNase I 活性によって分解された DNA 断片がゲル内を拡散する。臭化エチジウムによって染色された DNA 断片が拡散することによって蛍光を示す範囲が拡大する。このときの蛍光を示す範囲によって DNase I 活性を検出している。SRED は著者が知っている DNase I 活性の検出法では最も高感度な検出法である。さらに SRED はヒトの体液内の DNase I 活性を検出することもでき、優れた検出法の一つである。

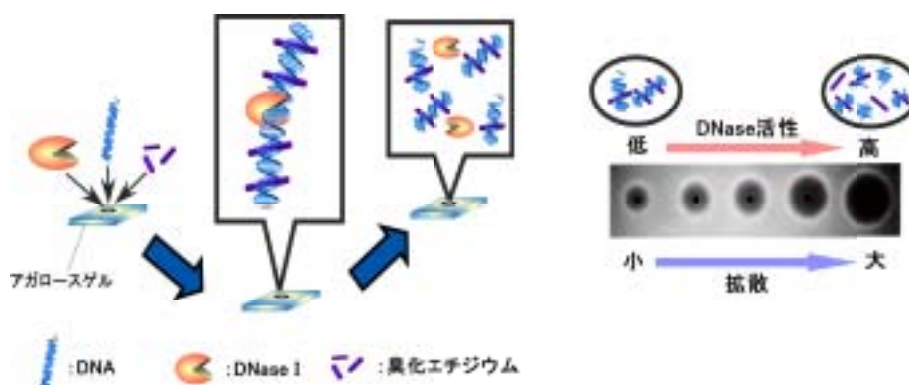


Figure 1-4. Single radial enzyme diffusion (SRED) method.

1-4 . 本論文の目的と概要

現在、DNase I 活性の検出において主に蛍光を利用した検出が行われている。特に蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を使用した検出法は最も一般的な手法であり、実際に DNase Alert や RNase Alert として実用化されている例もある²⁸⁾。また、single radial enzyme diffusion (SRED)による DNase I 活性検出は検出感度がとても高く、微量な DNase I 活性も検出可能である⁴⁷⁾。しかし、これらの蛍光を利用した検出法では検出時間が長く、高コストであるという問題点がある。そのため簡便かつ迅速な DNase I 検出法の開発が期待されている。

そこで本研究ではヌクレアーゼ活性の電気化学的検出法の開発を目的とした。電気化学的検出はバイオアッセイにおいても低コストで検出時間を短縮することができる⁴⁸⁻⁵⁰⁾と期待されている。さらに、蛍光を利用する装置に比べて光源などを必要としないため、装置のコンパクト化ができ、持ち運び可能といった優位性が期待された。

本論文は以上の研究結果をまとめたものである。第 1 章では研究背景、ヌクレアーゼとその検出法の現状を述べた。第 2 章では、RNA 修飾電極の作製とフェロセン化ナフタレンジイミド(FND)⁵¹⁾を利用した RNase A の電気化学的検出法を確立した。第 3 章ではフェロセン化ナフタレンジイミドを必要としない検出システムとしてフェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極の作製法の検討とこれを利用した DNase I の電気化学的検出法を達成した。第 4 章では、フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極の作製法にさらに改良を加え、金基板上の自己組織化単分子膜 (SAM) を作成し、これ下地にフェロセン化オリゴヌクレオチドを固定化することにより安定かつ再現性の良いセンサ電極の作成に成功した。第 5 章では総括として本研究で得られた結果をまとめ、今後の展開について述べた。

参考文献

1. W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag (1984).
2. *Nature the human genome*, 409, 813-958 (2001).
3. M. Olivier et al., *Science*, 291 (5507), 1298-1351 (2001).
4. 日経バイオテク編集部、最先端レポート遺伝子ビジネスの世紀 -医療が変わる、産業が変わる-, 日経 BP 出版 (2000).
5. 野島博編、ゲノム創薬の最前線、羊土社 (2002).
6. 斉藤烈、杉山弘、中谷和彦、ゲノム化学、化学同人 (2007).
7. 関口睦夫、生命の科学 4、核酸と遺伝、培風館 (1980).
8. C. H. Schein, *Nuclease Methods and Protocol (Methods in Molecular Biology)*, Humana Pr Inc (2001).
9. A. G. Baranovskii, V. M. Buneva, G. A. Nevinsky, *Biochemistry (Moscow)*, **69**, 587-601 (2004).
10. 今堀和友, 山川民夫, 生化学辞典 (第3版), 東京化学同人(1998).
11. A. Bernardi, C. Gaillard, G. Bernardi, *Eur. J. Biochem.*, **52**, 451-457 (1975).
12. K. Kishi, T. Yasuda, H. Takshita, *Legal Medicine*, **3**, 69083 (2001).
13. E. K. Wakeland, K. Liu, R. R. Graham, T. W. Behrens, *Immunity*, **15**, 397-408 (2001).
14. D. L. Vaux, R. A. Flavell, *Current Opinion in Immunology*, **12**, 719-724 (2000).
15. J. Zhang, M. Xu, *Trends in Cell Biology*, **1**, 84-89 (2002).
16. K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami, H. Tsukamoto, C. Hashimura, M. Urushihara, Y. Kuroda, *Nature Genetics*, **28**, 313-314 (2001).
17. M. J. Walport, *Nature Genetics*, **25**, 135-136 (2000).
18. P. J. Lachmann, *Lupus*, **12**, 202-206 (2003).
19. G. A. Nevinsky, T. G. Kanyshkova, V. N. Buneva, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 1245-1255 (2000).
20. J. Fujihara, H. Takatsuka, K. Kataoka, Y. Xue, H. Takeshita, *Legal. Med.* **9**, 233-236 (2007).
21. M. Napirei, H. Karsunky, B. Zevnik, H. Stephan, H. G. Mannherz, T. Moroy, *Nature. Genet.*, **25**, 117-181(2000).
22. A. Cherepanova, S. Tamkovich, D. Pyshnyi, M. Kharkova, V. Vlassov, P. Laktionov, *J. Immunol. Methods*, **325**, 96-103 (2007).
23. S. Shak, D. J. Capon, R. Hellmiss, S. A. Marsters, C. L. Baker, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 9188-9192 (1990).
24. H. W. Wyckoff, K. D. Hardman, N. M. Allewell, T. Inagami, L. N. Johnson, F. M. Richards, *J. Biol. Chem.*, **242**, 3984-3988 (1967).
25. G. D'Alessio, J. F. Riordan, Eds. *Ribonucleases: Structures and Functions*, Academic Press (1997).
26. H. A. Scheraga, W. J. Wedemeyer, E. Welker, *Methods Enzymol.*, **341**, 189-221 (2001).
27. G. R. Marshall, J. A. Feng, D. J. Kuster, *Peptide Science*, **90**, 259-277 (2007).

28. R. T. Raines, *Chem. Rev.*, **98**, 1045-1065 (1998).
29. K. A. Dickson, M. C. Haigis, R. T. Raines, *Nucleic Acid Res.*, **80**, 349-374 (2005).
30. 遺伝子工学キーワードブック, p405, 羊土社 (1996).
31. 遺伝子工学キーワードブック, p254, 羊土社 (1996).
32. 中山広樹, 西方敬人, バイオ実験イラストレイテッド 分子生物学実験の基礎, p. 38 (1995).
33. G. L. Liu, Y. Yin, S. Kunchakarra, B. Mukherjee, D. Gerion, S. D. Jett, D. G. Bear, L. W. Gray, A. P. Alivisatos, L. P. Lee, F. F. Chen, *Nature nanotechnology*, **1**, 47-52(2006).
34. T. T. Goodrich, H. J. Lee, R. M. Corn, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 4086-4087 (2004).
35. L. R. Skewis, B. M. Reinhard, *Nano Lett.*, **8**, 214-220(2008).
36. K. Niikura, H. Matsuno, Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8537-8538 (1998).
37. J. H. Kim, R. A. Estabrook, G. Braun, B. R. Lee, N. O. Reich, *Chem. Comm.*, 4342-4344(2007).
38. www.ambion.com/jp
39. B. R. Kelemen, T. A. Kilink, M. A. Behlke, S. R. Eubanks, P. A. Lelamd, R. T. Raines, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 3696-3701 (1999).
40. N. Potenza, V. Salvatore, A. Migliozzi, V. Martone, V. Nobile, A. Ruao, *Nucleic Acids Res.*, **34**, 2906-2913(2006).
41. J. Rizzo, L. K. Gifford, X. Zhang, A. M. Gewirtz, P. Lu, *Mol. Cell. Probes*, **16**, 277-283 (2002).
42. P. C. Ray, A. Fortner, G. K. Darbha, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 20745-20748 (2006).
43. S. C. Hillier, C. G. Forost, A. T. A. Jenkins, H. T. Braven, R. W. Keay, S. E. Flower, J. M. Claekson, *Bioelectrochemistry*, **63**, 307-310 (2004).
44. S. J. Choi, F. C. Szoka, *Anal. Biochem.*, **281**, 95-97 (2000).
45. D. Nadano, T. Yasuda, K. Kishi, *Clin. Chem.*, **39**, 448-452 (1993).
46. H. Takeshita, T. Nakajima, K. Mogi, Y. Kaneko, T. Yasuda, R. Iida, K. Kishi, *Clin. Chem.*, **50**, 446-448 (2004).
47. M. Macanovic, P. J. Lachmann, *Clin. Exp. Immunol*, **108**, 200-226 (1997).
48. K. J. Odenthal, J. J. Gooding, *Analyst*, **132**, 603-610 (2007).
49. 棕本晃介, 竹中繁織, *有機合成化学協会誌*, **64**(3), 208-221 (2006).
50. E. Palecek, F. Scheller, J. Wang, Eds. *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics*, Elsevier (2005).
51. S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo, *Anal. Chem.*, **72**, 1334-1341 (2000).

第2章 天然 RNA 修飾電極による電気化学的 RNase センサ

2-1 緒言

RNA 研究の最近の発展によって RNase フリー水と簡便かつ迅速な RNase 検出法が要求されている。しかしながら、第1章で述べたように現在まで良い手法は知られていない。一方、竹中らは DNA プローブ修飾電極とフェロセン化ナフタレンジイミド(FND, 図 2-1) に基づいた電気化学的遺伝子検出法を発展させている。¹⁻⁶⁾ これは、ターゲット DNA がサンプル中に存在した時に DNA 二重らせんが電極上に形成され、この二本鎖 DNA 領域に FND が濃縮することに基づいている。すなわち、電極上の二本鎖形成量に依存して濃縮された FND からの電気化学的シグナルが得られたのである。FND が有している二本鎖 DNA 選択性に基づいていた。しかしながら、カチオン性の FND はポリアニオンである一本鎖 DNA にも結合できる(塩濃度に強く依存した結合)。この FND の性質を利用した電気化学的 RNase アッセイ法を考案した。原理を図 2-1 に示す。

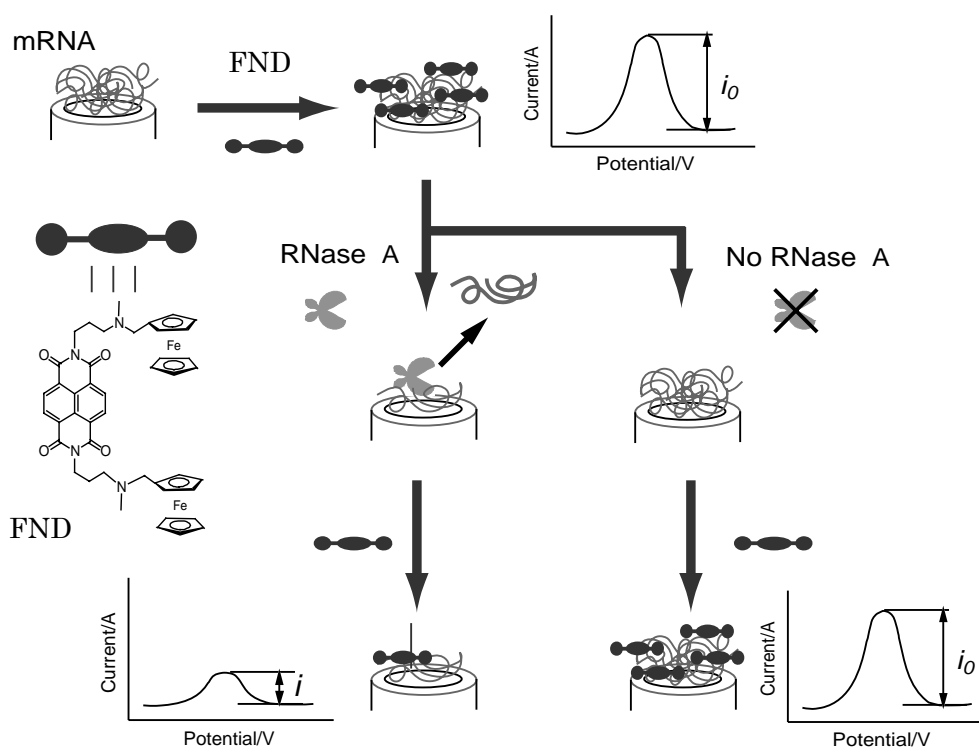


Figure 2-1. Principle of ferrocenylnaphthalene diimide (FND)-based electrochemical RNase A assay and the chemical structure of FND.

まず、RNA を固定化した電極を調整する。FND を含む電解液でこの電極の電気化学的応答(例えばデファレンシャルパルスボルタモグラフィー、DPV、の i_0)を測定する。FND は RNA に依存して電極上に濃縮されるのでこれに依存した電流値が得られる。次にこの電極を洗浄後、RNase (図 2-1 では RNase A の例を示した) を作用させるとこの酵素活性に依存して切断が起こる。所定時間の処理後、再度 FND を含む電解液でこの電極の電気化学的応答 i を測定する。 i_0 と i とを比較することにより、RNase 活性がモニタリングできると考えた。本章ではこれを確証するためにグラシーカーボン電極を利用した系で検討を行った。更に金電極上で形成させた官能基を導入した自己組織化膜 (SAM) を利用したシステムについて検討した。

2-2. 天然 RNA 修飾グラシーカーボン電極の調整と RNase 検出への応用

2-2-1. グラシーカーボン電極への天然 RNA の固定化

電極に固定化する RNA としてマウス腎臓から抽出した Poly(A)+RNA(和光純薬、大阪) から購入したものを BioPak 水(以後、Millipore 製限外濾過膜 BioPak により精製された水を BioPak 水と呼ぶ。RNase フリー水と考えられる。)に溶解して 10 ng/ μ L に調整した後、使用直前まで冷凍保存した。市販の RNA としてウイルス由来のものは多く知られているが、これらは比較的安定で RNase 耐性を有するものが多い。これに対し、mRNA は分解されやすいことが知られているのでこれを利用することにした。

RNA の固定化法は、DNA を用いて行われている報告例^{7,8)}に従って行った。グラシーカーボン電極を酸性条件下で酸化することにより電極上にカルボン酸残基を導入し、この部位を活性化エステルとすることにより、天然 RNA 中のグアニン(G)またはシトシン(C)塩基のアミノ基と反応させることにより固定化させる手法として知られている。

まず、表面積 0.79 mm² のグラシーカーボン電極をダイヤモンドスラリーの 6 μ m と 1 μ m で順次研磨し、一分間水中で超音波洗浄を行った。これを二回繰り返した。この電極を 2.5% K₂CrO₄ と 10% HNO₃ を含む水溶液中 15 秒 1.5V で酸化を行った。BioPak 水で洗浄後、電極を逆さにして 5 mM 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)と 8 mM N-hydroxysuccinimide (NHS)を含む 0.02 M リン酸緩衝液 2.5 μ l で 1 時間処理することにより活性化した。BioPak 水で洗浄後、10 ng/ μ l Poly(A)+RNA を 0.5 μ l をのせて 20 分間クレーンベンチ内で乾燥した。この電極を 5 mM Tris-HCl (pH7.4)と 20 mM NaCl を含む溶液中で 4 回、1 時間リンスした。

2-2-2. 電気化学的測定

調整した RNA 修飾電極の酵素反応前後の DPV 測定を行った。酵素反応は種々の RNase A 量を含む BioPak 水 10 μ l で所定時間処理を行った。DPV 測定は、ALS モデル 650 電気化学的アナライザ(CH Instrument Inc., USA)を用いて Ag/AgCl 参照電極、白金対極、作用

極を RNA 修飾電極とした三電極式で室温にて行った。また、測定の際の電解液は 0.1 M KCl と 50 μ M FND を含む 0.1 M AcOH-AcOK 緩衝液 (pH5.6) で測定を行った。FND は酸性側の pH で溶解度が良いので RNA が分解しない程度の pH まで下げて測定を行うこととした。

2-2-3. RNase センサとしての性能評価

BioPak 水に所定量の RNase A (Ambion より購入) 溶解することにより RNase A ストック溶液としこれを BioPak 水で希釈して使用した。RNA 修飾電極の RNase A 処理前後のデファレンシャルパルスボルタモグラムを図 2-2 に示した。0.4 V 付近にピークが見られた。この条件下 RNA 未修飾電極ではほとんどピークを示さなかったことからここで得られたピークシグナルは電極上の RNA に濃縮された FND に基づくものであると考えられる。そこで RNase A 処理前後の電流値 i_0 と i を用いて $\Delta i = (i_0 - i)/i_0$ によって整理した。これによって別々に作成した異なった電極の均一化が可能であると考えたが、別々に調整した全ての電極においても RNase A 存在下で電流減少が観察されたが、同じ RNase A 濃度にも拘わらず Δi 値がばらついた。

そこでこのばらつきを標準化するために同じ RNase A 濃度で処理した異なった電極で $i_0 - i$ プロットを行った。この場合、同じ RNase A 濃度で処理した電極においてはロットが異なるものにおいてもこのプロットで直線上にのることが分かった。図 2-2 に BioPak 水で処理した電極の $i_0 - i$ プロットの例を示した。BioPak 水では、処理前後で電流値は変化しないと考えられるのでその傾きは 1.0 となると考えられるが、図 2-3 に示すようにその傾きは 0.8 であった。また、RNase A 濃度が増加するに従ってその傾きは減少した。図 2-2 に 6 nM RNase A を含む BioPak 水で処理した電極の $i_0 - i$ プロットの例も示したが、その傾きは、0.2 となった。

図 2-3 に異なった RNase A 濃度で処理した電極での $i_0 - i$ プロットの傾きとその濃度とをプロットした。図 2-3 に示したように 10^{-10} - 10^{-8} M の範囲で良い相関を示した。検出下限は 0.3 nM RNase A であった。以上の結果から RNA 修飾電極と FND とを組み合わせることにより RNase の高感度検出が可能であることが明らかとなった。

九州工大 8 号棟の井戸水の RNase 検出を本電極によって行った。その結果 $i_0 - i$ プロットの傾きが 0.7 となった。これは、図 2-3 の RNase A 濃度に換算すると 1 nM と予想された。

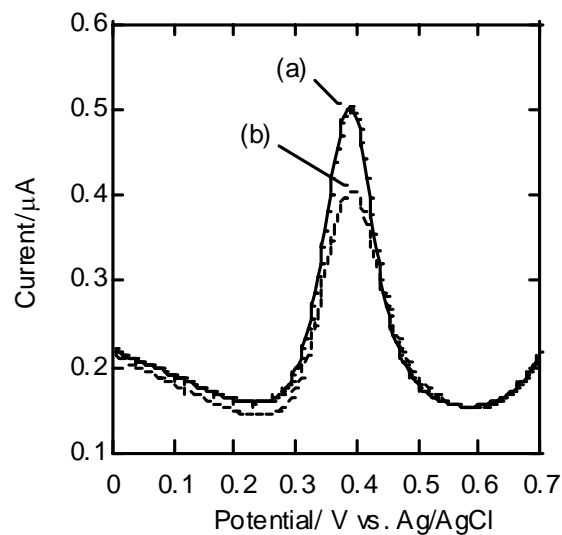


Figure 2-2. Differential pulse voltammogram (DPV) of an RNA-immobilized electrode before (a) and after treatment with RNase A (b) in 0.1 M AcOH-AcOK buffer (pH 5.6) containing 0.1 M KCl and 50 μM FND.

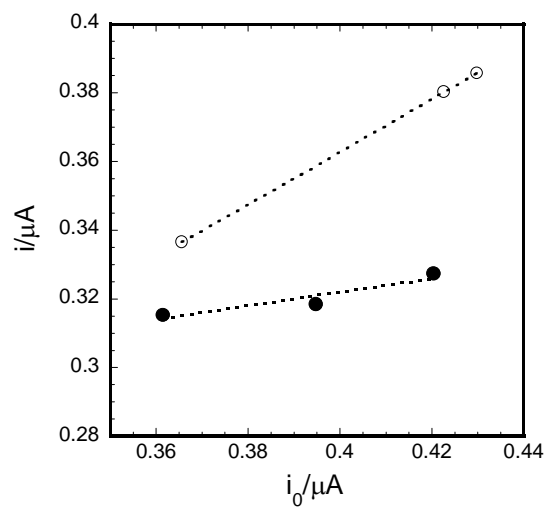


Figure 2-3. Plots of the peak current i against i_0 in BioPak water in the absence (○) or presence of 6 nM RNase A (●)

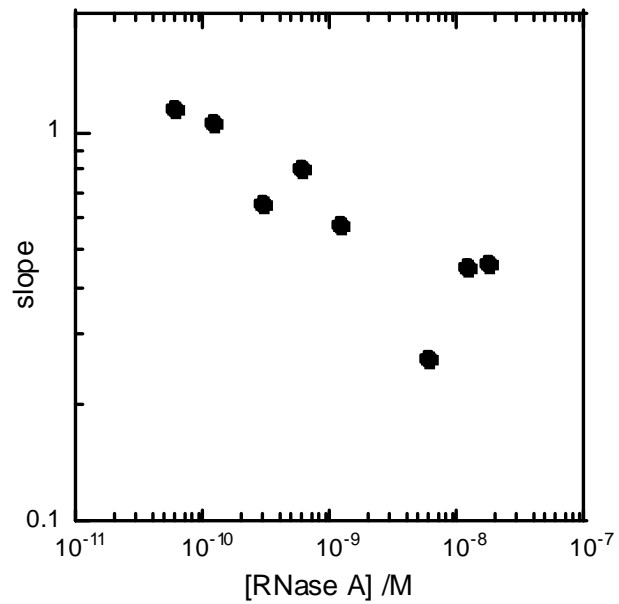


Figure 2-4. Plots of the slope obtained from the i_0 - i plot against RNase A concentration in the solution.

2-3. 金電極上での SAM 形成と天然 RNA 修飾と RNase 検出への応用

2-3-1. 金電極上での SAM 形成と天然 RNA の固定化

先のグラシーカーボン電極においてロットごとのばらつきは表面に導入した活性化エステル量が制御できないため、天然 RNA との反応効率が異なり、そのため固定化量が異なったものと考えられた。そこで金電極表面に自己組織化膜 (SAM) を作成し、その表面に活性化エステルを作成し、天然 RNA の固定化を試みた。図 2-5 にその原理を示した。

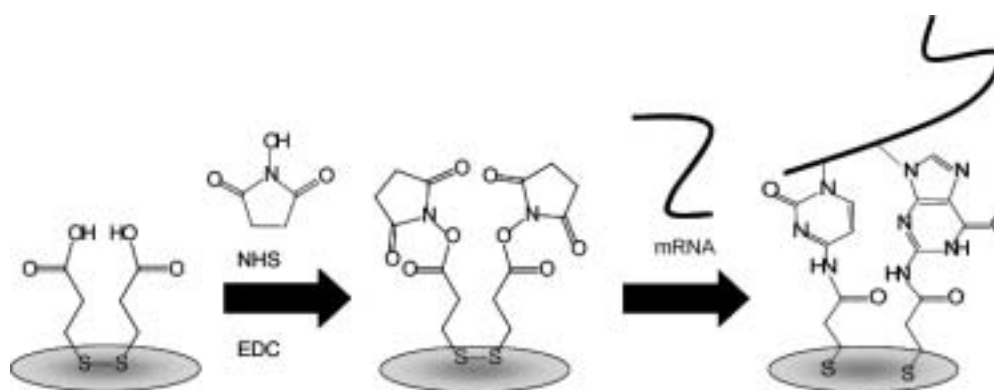


Figure 2-5. Preparation of NHS-activated carboxylic acid on the electrode and the immobilization procedure of mRNA on this electrode.

ここで使用した EDC、NHS、ジチオプロピオン酸(東京化成)は SAM 作製試薬である。ジチオプロピオン酸は、100 mM エタノール溶液として作成し、BioPak 水で 100 倍希釈し 1 mM 水溶液を作成した。そのほかの溶液は、BioPak 水に溶解することにより水溶液を作成した。

まず、金電極(直径 1 mm)の前処理を以下のように行った。Au 電極を 6 μm ダイヤモンドスラリー、1 μm ダイヤモンドスラリー、0.05 μm アルミナスラリーの順で研磨し、BioPak 水中で超音波照射 1 分を 2 回行うことにより洗浄した。その後、2 M NaOH 水溶液で加熱攪拌を 30 分間行い、水洗後、濃硝酸溶液に 20 分浸した。電極を MilliQ 水に浸し、超音波照射を 1 分三回行った。電極表面を N_2 ガスにて乾燥後、1 mM ジチオプロピオン酸水溶液に電極を浸し、室温で 2 時間インキュベートした。BioPak 水により洗浄後、5 mM EDC, 8 mM NHS in 0.02 M リン酸 buffer (pH 7.0) を 2.5 μL 添加し、1 時間かけて乾燥させた。電極を水洗し、2.5-10 ng/ μL の天然 RNA を 1.0 μL をのせて、1 時間室温でインキュベートした。電極を 5 mM Tris-HCl, pH7.4, 20 mM NaCl(もしくは BioPak 水)で洗浄することで、固定化電極を作成し、 i_0 測定を行った。

2-3-2. 電気化学的測定

DPV 測定は、対極 Pt、参照電極 Ag/AgCl の三極系で行われた。電解液は、0.1 M AcOK-AcOH, pH 5.5, 0.1 M KCl, 50 μ M FND 溶液とした。DPV 測定のパラメータは、以下に示すとおりである；初期電位, 0 V, 最終電位, 0.6 V, 電位増加分, 0.02 V, 振幅, 0.05 V, パルス幅, 0.15 sec, パルス期間, 0.05 sec, サンプリング幅, 0.02 sec, 静止時間, 2sec.

RNA 固定化電極は、 i_0 測定終了後、RNaseA 水もしくは BioPak 水 10mL に室温で 1 時間インキュベートしたのち、 i 測定を行った。

2-3-3. RNase センサとしての性能評価

前処理を行った金電極に、ジチオプロピオン酸を固定化し、EDC と NHS により表面のカルボン酸を活性化した。そこに、天然 RNA を添加し、グアニンの 2 位のアミノ基もしくは、シトシンの 4 位のアミノ基と縮合させることで固定化を行った（図 2-5）。今回プローブ RNA として使用した天然 RNA は、Agilent バイオアナライザで確認したところ、1000-2000 塩基長(b)の分布であった。電極表面上に修飾されたカルボン酸は、G や C 塩基のアミノ基と反応し、アミド結合を形成するため、1000-2000 b の mRNA の多点で固定化されているものと考えられる。

5 ng/ μ l の mRNA を固定化した電極を用いて、RNaseA による消化前後における種々の掃引速度において CV 測定を行った結果を図 2-6 に示す。電解液には、あらかじめ RNase Inhibitor を 0.04 units/ μ l の濃度で添加しておき、RNaseA による処理は、電解液に RNaseA を添加し(60 nM)、2h 電極を浸した状態で、室温でインキュベートすることにより行った。RNaseA による消化確認された mRNA 固定化電極での FND 溶液におけるピーク電流値は、RNaseA による消化処理後、すべての掃引速度において電流値の減少が確認された。RNaseA は、RNA の C および U の後ろ側(3'末端側)を切断することが知られているため⁹⁾、電極上に固定化されている mRNA は、その C および U で切断され、切断された mRNA のフラグメントが電極表面から遊離したのと考えられる。

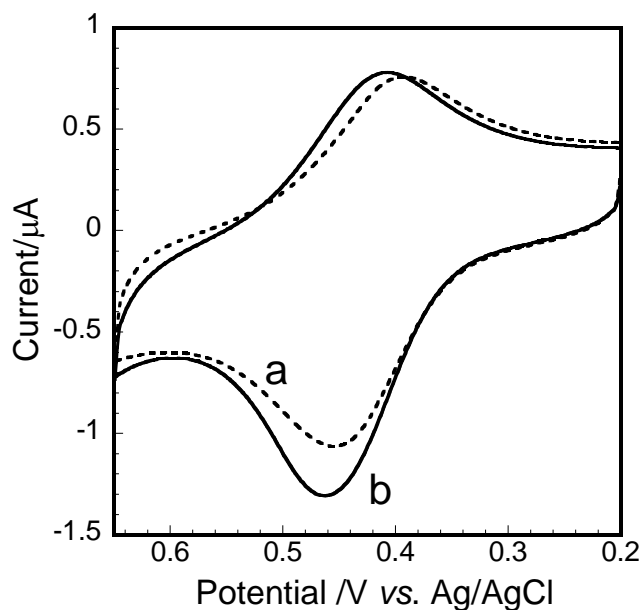


Figure 2-5. Cyclic voltammograms of the Tris-immobilized electrode (a) and mRNA-immobilized electrode (b) in 0.1 M AcOK-AcOH buffer (pH 5.6) containing 0.1 M KCl, 0.05 mM **FND** and 0.04 units/μl RNase inhibitor.

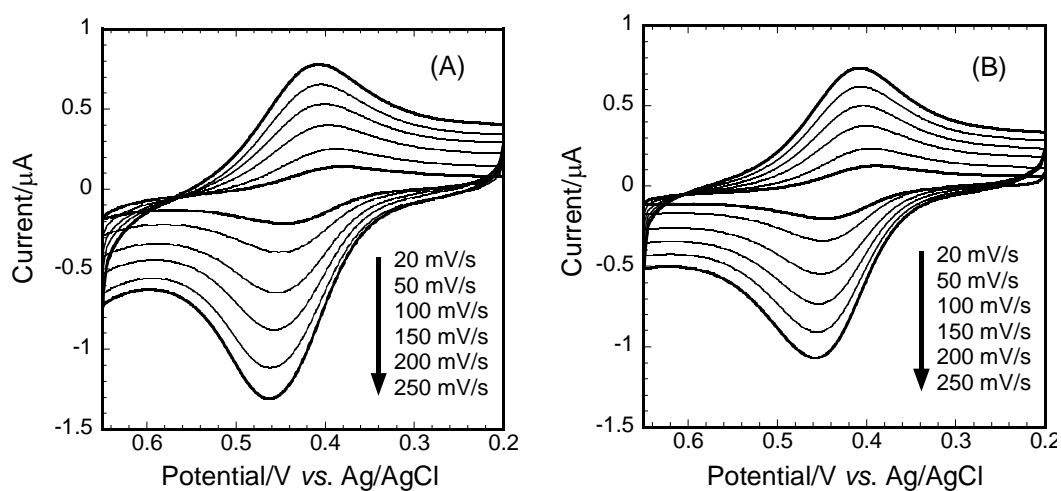


Figure 2-6. Cyclic voltammograms of the mRNA-immobilized electrode with varied scan rates before (A) and after treatment with 1 μg/ml RNase A (B) in 0.1 M AcOK-AcOH buffer (pH 5.6) and 0.1 M KCl containing 0.05 mM **FND** and 0.04 units/μl RNase inhibitor.

RNaseA による消化前後の掃引速度依存性は、10mV/sec から 250mV/sec の領域で行った。得られた酸化ピーク電流を掃引速度の平方根に対してプロットしたものを図 2-6 に示した。掃引速度を変化させたときの酸化還元種の拡散電流は、以下に示す式によって変化する¹⁰⁾。

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} \nu^{1/2} C$$

ここで、 n は電子の数、 A は電極表面積、 D は拡散速度、 ν は掃引速度、 C は酸化還元種のバルク濃度である。酸化還元種が、拡散挙動を示すとき、ピーク電流値は掃引速度の平方根に対して、よい直線性をしめす。Fig. 4 に示すように酵素消化後の電極 (図 2-6(b)) における酸化電流の変化は掃引速度の平方根に対して非常によい直線性を示し、電解液中の酸化還元種が拡散挙動を示していることが示された。しかしながら、酵素消化前の電極 (図 2-7(a)) では、このような相関はみられず、酸化還元種が電極表面に吸着していることを示唆する結果となった。電極上に DNA が固定化されているとき、酸化還元物質がインターカレータであれば、その酸化還元物質は吸着挙動を示すことがこれまでに報告されており¹¹⁾、本実験系でもこれと同等の結果を示した。

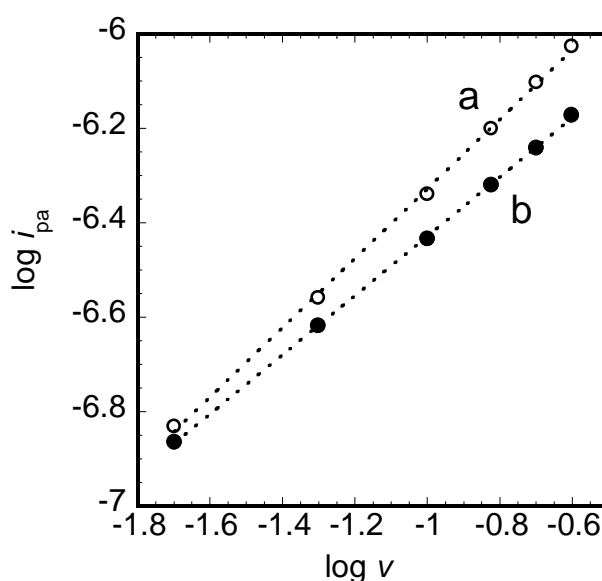


Figure 2-7. Log-log plots of the peak current versus the scan rate for the oxidation of 0.05 mM FND before (a) and after (b) treatment with 1 μ g/ml RNase A. Data were collected from those in Fig. 2-6.

それぞれの電極における拡散定数を算出したところ、酵素消化前は、 4.7×10^{-6} 、酵素消化後は $3.2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ であった。Millian らにより、poly(dG)poly(dC)を固定化した GC 電極における $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ 、およびフェロセンカルボン酸による掃引速度依存性と拡散定数が確認されているが、それぞれ 3.7×10^{-6} 、 $3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ であった⁷⁾。 $\text{Co}(\text{phen})_3^{3+}$ は、インターカレータであり、電極上の二本鎖 DNA と相互作用していると考えられるが、フェロセンカルボン酸は二本鎖 DNA との相互作用はない。これらの結果と、今回得られた mRNA 固定化電極における RNase A 消化前後における拡散定数がほぼ同等であったことから、RNase A 酵素消化前では、電極上の RNA と相互作用している FND の応答が得られ、酵素消化後は拡散している FND の応答が得られたのだと考えられる。

図 2-7 には、RNase A 非存在下(A)、存在下(B)の電解液における FND の CV 時間変化を確認した。図 2-7 (A) および図 2-8(a)に示すように、電解液に RNase inhibitor が存在するとき、FND の酸化電流はほとんど変化していない。しかし、図 2-8(b)に示すように RNase inhibitor が存在しないとき、もしくは、RNase inhibitor 溶液に 60 nM RNase A が存在するとき(図 2-8(c))は、時間が経つにつれ応答電流は小さくなった。電極上の mRNA の消化に伴い、電極近傍に濃縮される FND の量が減少していったのだと考えられる。電流減少が 15%程度であったのは、RNase inhibitor により RNase A の活性が阻害されたためであると考えられる。また、RNase inhibitor が、入っていないときには、消化が緩やかであるが電極上のかなりの mRNA が消化された図 2-7(B)。電解液など使用試薬は、RNase フリーの試薬を用い、使用する器具は、RNase リムーバーにより洗浄を行っている。そのため、測定が始まるとともに、試薬、器具が微量の RNase A に汚染されている様子がモニタリングできているのだと考えられる。

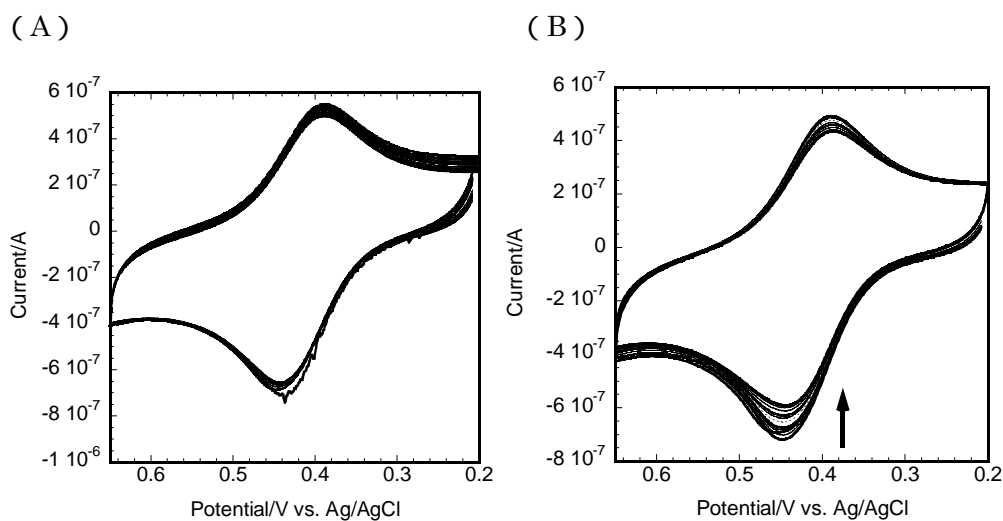


Figure 2-8. Time-dependent cyclic voltammograms of the mRNA-immobilized electrode before (A) and after treatment with 1 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (B) in 0.1 M AcOK-AcOH buffer (pH 5.6) and 0.1 M KCl containing 0.05 mM **FND** and 0.04 units/ μl RNase inhibitor.

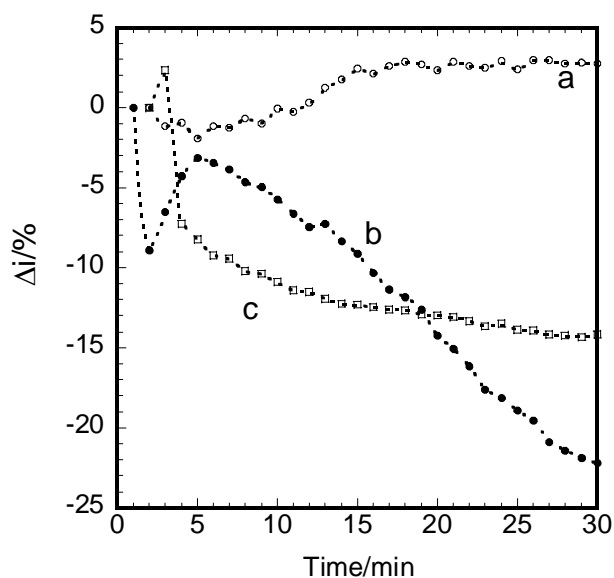


Figure 2-9. Time-dependence of the oxidative peak current of a mRNA-immobilized electrode in the absence (a) or presence of 0.04 units/ μl RNase inhibitor alone (b) or 1 $\mu\text{g/ml}$ RNase A (c) in 3 ml of electrolyte containing 0.05 mM **FND**.

5ng の mRNA が固定化された電極(直径 1mm)に 300 pM の RNaseA 水溶液をディップし、1h 処理することにより酵素反応を行った。酵素反応前後における 50 μ M FND 溶液中で DPV 測定の結果を図 2-9 に示す。RNaseA による処理のあと、電流応答は大きく減少した。ここで得られた電流変化をノーマライズするために、切断前の測定における電流値を i_0 、切断後の測定における電流値を i として $i_0 - i$ プロットを行い、その傾きにより評価を行った。RNase A により電極上の RNA が切断されたときには、電極上の RNA の減少に伴い FND による応答も減少する。そのため、 $i_0 - i$ プロットの傾きは、減少するが、電極上の RNA の切断が起これなければ、電流応答は反応前後で変わらないため、傾きは 1 になると考えられる。図 2-10 には、300 pM の RNaseA で処理したときの $i_0 - i$ プロットを示したが、BioPak 水で 1h 処理した電極の傾きは 0.99、300 pM の RNaseA 水で処理した電極の傾きは 0.62 となり、傾きで識別することができた。

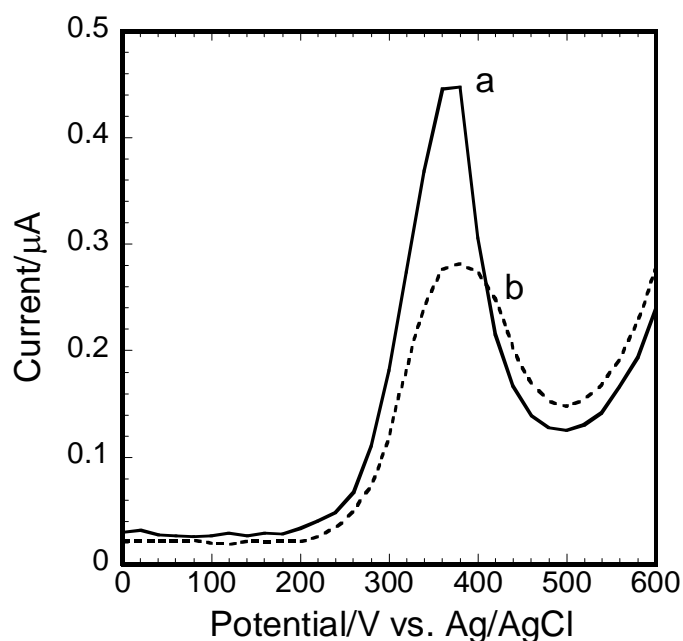


Figure 2-10. DPV Differential pulse voltammograms of the mRNA-immobilized electrode before (a) and after treatment with 5 ng/ml RNase A (b) in 0.1 M AcOK-AcOH buffer (pH 5.6) and 0.1 M KCl containing 0.05 mM FND.

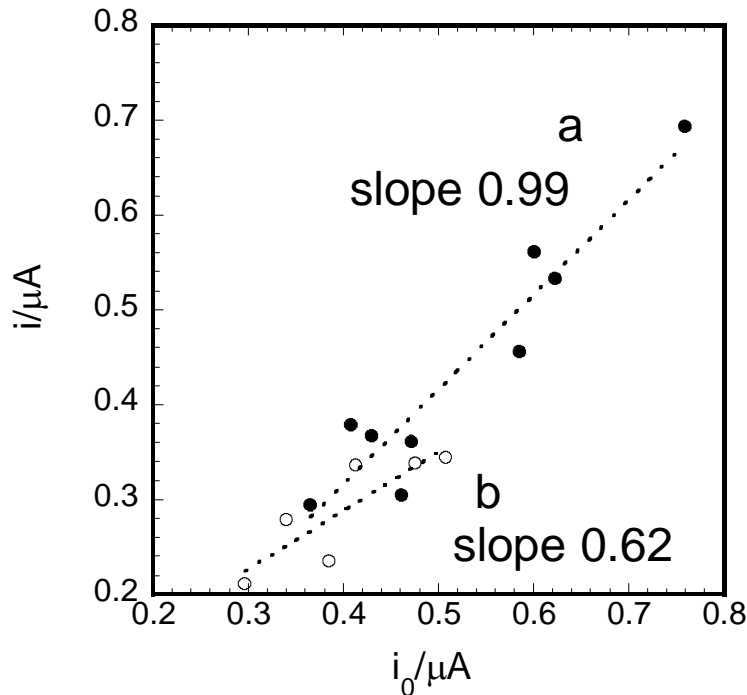


Figure 2-11. Plots of the peak current, i , against i_0 in BioPak water (a) and 5 ng/ml RNase A (b) in 0.1 M AcOK-AcOH containing 0.1 M KCl and 0.05 mM FND.

反応サンプルの RNase A 濃度を变化させたところ、 $i - i_0$ プロットの傾きは、RNase A 濃度が高くなると減少した。図 2-11 に示すように、その傾きは 600 pM - 12 pM の濃度範囲で定量的に変化した。6 pM の RNase A で処理したところ、BioPak 水による処理とほとんど変わらない結果が得られた (BioPak 水の slope 0.81, 6 pM RNase A の slope 1.10)。これより、本手法の RNase A の検出限界は 12 pM (0.2 pg) であると思われる。現在用いられている RNase A 検出法 (RNase Alert) の検出限界は、0.5 pg の RNase A であり、ほぼ同等の検出感度を得ることができた。

測定レンジが狭いのは、過剰な FND 溶液中で測定を行うため、FND の拡散電流の影響により、RNase A 量が微量なときは切断される mRNA の量が少ないため、微妙な判別が難しくなるためであると思われる。また、RNase A 量が多いときは、すべての mRNA が切断されてしまい、FND 拡散電流と変わらない応答になってしまうのだと思われる。

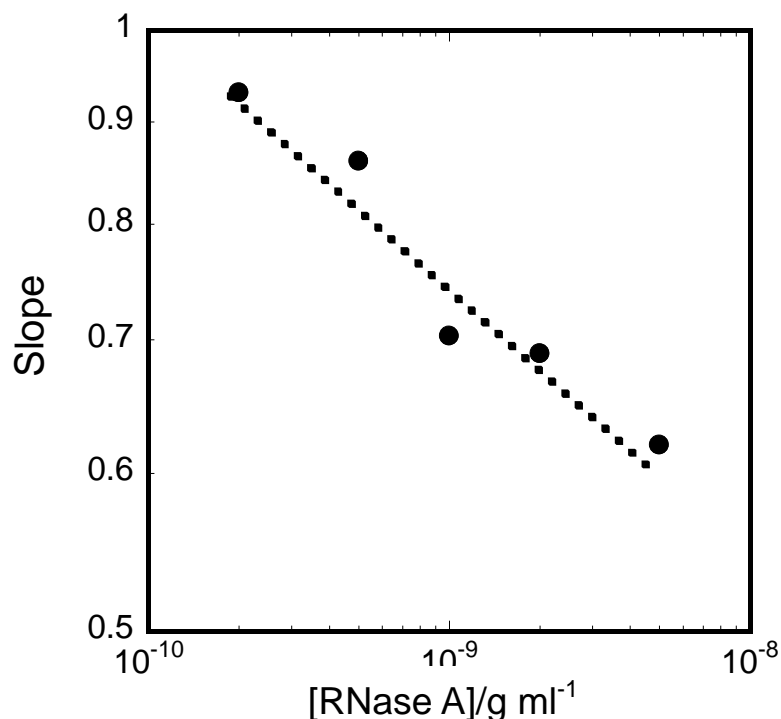


Figure 2-12. Plots of the slope obtained from the $i - i_0$ plot against the logarithm scale of the RNase A concentration in test water. The experiments were conducted in 0.1 M AcOK-AcOH buffer (pH 5.6) containing 0.1 M KCl and 0.05 mM FND.

2-4. 要求される検出感度の見積もり

現在のところBioPak水がRNaseフリー水と考えられている。この中にどれぐらいのRNaseが含まれているか見積もることとした。まず、BioPakのRNase除去性能を確認するため、BioPakを超純水装置Milli-Q Gradientの採水口に取り付け、保存液である過酸化水素を排出するため1Lの排水を実施した後の試水を採取してRNase分析に供した。また、比較のためBioPak透過前のMilli-Q Gradient水と市販されているRNaseフリー水のRNase濃度も測定した。RNase分析にはRNase Alert (Ambion)を使用し、高感度化のために反応時間を通常の1時間から3時間に延長することで検出限界0.003 ng/mLを達成した。他の方法はAmbion社のプロトコルに従った。検量線は0.1 ng/mL RNase Aで作成し、定量に使用した。

結果をTable 2 に示した。BioPak透過前のMilli-Q Gradient水はRNaseを含み、その濃

度は一定ではないことが分かった。また、Milli-Q Gradientの採水口にBioPakを装着することにより、得られた超純水のRNase濃度は検出限界0.003ng/mL以下まで低減することが確認され、BioPakはRNase除去性能を有することが分かった。また、その濃度は市販されているRNaseフリー水と同等であった。

Table 2. Estimation of the RNase content in the water prepared by several ways

Preparation method	RNase concentration/ ng mL ⁻¹
MilliQ Gradient + BioPak	<0.003
MilliQ Gradient	0.012 – 0.440
Commercially-available RNase free water	<0.003

RNase A の分子量が約 14KDa¹²⁾であるので、0.003 ngmL⁻¹は 0.7 pM と予想される。本システムでの検出下限は 12.0 pM であるのでさらに十倍の感度の向上が必要と考えられる。

2-5. 結言

簡便な RNase 検出系を発展させるために本章ではまず RNA 修飾電極をグラシーカーボン電極にマウス腎臓からの poly(A)+RNA を固定化することにより作成した。フェロセン化ナフタレンジイミド (FND) を含む電解液中で RNA 電極の電気化学測定を行うことにより固定化された RNA 量に依存した電気化学的シグナルを得た。この電極をサンプル水で処理した後、FND を含む電解液で DPV 測定を再度測定した。サンプル水中に RNase A が存在するときその電流値が減少した。これは、RNase A により電極上の RNA が消化されたためと考えられた。条件を最適化することにより RNase A 濃度が 10⁻¹⁰ - 10⁻⁸ M の範囲で定量的検出が可能となった。これにより水道水中の RNase 量を見積もることができた。しかし、グラシーカーボン電極への固定化量が電極ごとにばらつくため *i*₀ vs. *i* プロットによる複数の電極での評価を行う必要があった。

そこで金電極上にカルボン酸を有する自己組織化膜 (SAM) を形成させ、このカルボン酸を活性エステルへと変換し、RNA 固定を試みた。このようにして調整した RNA 修飾電極においても電極ごとのばらつきを軽減できなかったが、600 pM -12.0 pM の濃度域で RNase 量を定量できることが明らかとなった。これは、従来法として知られている RNA Alert よりも 10 倍ほど感度が低いものであった。しかし、電気化学的手法を利用する本手法は、従来法よりも簡便で自動化が期待されるので優位性は高いものと期待される。

参考文献

1. S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo, *Anal. Chem.*, **72**, 1334-1341 (2000).
2. S. Sato, T. Nojima, M. Waki, S. Takenaka, *Molecules*, **10**, 624-638 (2005).
3. 竹中繁織, "簡易診断を目指した次世代チップの開発," *ケミカル エンジニアリング*, **51**, 13-17 (2006).
4. S. Sato, H. Kondo, T. Nojima, S. Takenaka, *Anal. Chem.*, **77**, 7304-7309 (2005).
5. Shigeori Takenaka, Threading intercalators as redox indicators in *Electrochemistry of nucleic acids and proteins. Towards electrochemical sensors for genomics and proteomics* (E. Palecek, F. Scheller, J. Wang, Eds.), Elsevier, pp. 345-367 (2005).
6. Shigeori Takenaka, Biosensors based on metal complex in *Bioorganometallics* (G. JAOUEN, Ed.), WILEY-VCH (Weinheim Germany), pp.303-319 (2006).
7. Millan, K. M., Mikkerlsen, S. R., *Anal. Chem.*, **65**, 2317-2323 (1993).
8. Millan, K. M., Saraullo, A., Mikkelsen, S. R., *Anal. Chem.*, **66**, 2943-2948 (1994).
9. B. M. Fisher, J. E. Grilley, and R. T. Raines, *J. Biol. Chem.* **273**, 34134 (1998).
10. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical method*, Wiley and Sons, New York
11. S. O. Kelly, J. K. Barton, N. M. Jackson, and M. G. Hill, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 31 (1997).
12. G. D'Alessio, J. F. Riordan, Eds. *Ribonucleases: Structures and Functions*, Academic Press (1997).

第3章 フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾センサ

3-1 緒言

前章において天然 RNA の固定化法の検討と RNase A の電気化学的検出法を確立できた。本章では電気化学的 DNase I 検出の確立を目指した。ここでは天然の DNA ではなく合成 DNA であるオリゴヌクレオチドを基質として利用することとした。DNase I 検出は先に述べたように RNase A と同様にバイオ実験でのコンタミネーションのモニタリングの必要性に加え、DNAase I に関連する疾病の診断への応用から重要である¹⁻⁷⁾。特に全身性エリトマトース (SLE) の診断に DNase I 検出が行われているが¹⁻⁵⁾、より簡便な DNase I 検査法が期待されている。また、これまでの FND を利用する手法では、酵素反応前後で FND を含む電解液での測定が必要であった。ここではこのようなインディケーターフリーのシステムの検討を行った。原理は、Figure 3-1 に示した。DNase I の基質となる DNA に電気シグナルを示す試薬の修飾が必要である。そこで、竹中が既に報告している DNA へのラベル化試薬であるフェロセン化カルボジイミド (FCDI)⁸⁾ を利用することで簡単に DNA へ電気シグナルを示すフェロセンを DNA へ導入できると考えた。FCDI は DNA と混ぜるだけでチミンのイミノ基に対して特異的に反応し、フェロセン化 DNA を得ることができる。

電極へのフェロセン化オリゴヌクレオチドの固定化法として、チオール-金相互作用を利用した固定化法を適用した⁹⁻¹²⁾。すなわち、はじめに合成したフェロセン化カルボジイミド (FCDI) を用いて 5' 側をチオール化した DNA の 3' 側の末端付近にフェロセンを複数個導入し、これを金電極上で処理することによって行った。このフェロセン化 DNA 修飾電極上で DNase I を反応させると、その活性に応じて固定化した DNA は分解され、フェロセン

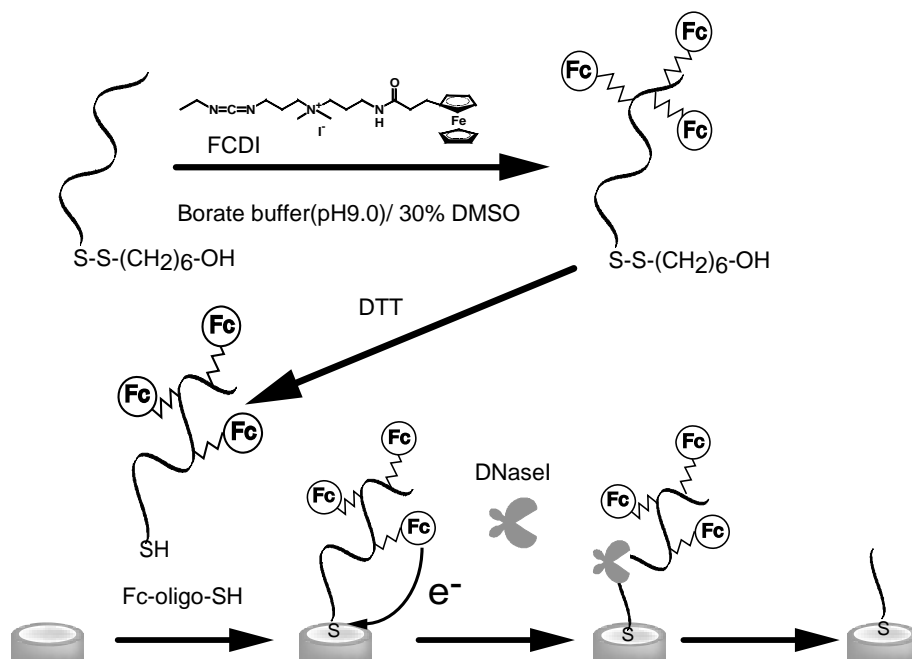


Figure 3-1. Principle of electrochemical DNase I assay based on **Fc-oligo-SH**-immobilized electrode and chemical structure of **FCDI**.

部分は電極からはずれると期待される。電気応答を示すフェロセンが電極上からなくなることによってフェロセン由来の電気応答は減少するはずである。これによって DNase I 反応前後の電気応答の変化を測定することにより DNase I 活性の評価が可能になると期待した。

3-2 実験

3-2-1 ケミカル

フェロセン化剤試薬であるフェロセン化カルボジイミド(FCDI)は以前報告された合成法によって合成した¹⁾。本実験ではジーンネット製のチオール化 DNA, 5'-HO(CH₂)₆-S-S-(CH₂)₆-dA₁₀ACAAATAACAAATAT-3'を用いた。この DNA と FCDI の反応で使用する緩衝液は 50 mM NaHBO₃/NaOH (pH 9.0)を使用した。100 mM NaHPO₄/NaH₂PO₄ buffer (pH 7.0) と 1 M NaClO₄ はそれぞれ電気化学測定を行う際に希釈し、電解溶液として使用した。また、0.1 M triethylammonium acetate(TEAA) buffer (pH 7.0)は high performance liquid chromatography(HPLC)の溶離液として使用した。酵素反応ではタカラバイオ製 DNase I(RNase-free)、10 × DNase I buffer(400 mM Tris-HCl (pH7.5) 80 mM MgCl₂、50 mM DTT)を利用した。

3-2-2 フェロセン化オリゴヌクレオチドの調整

15 nmol DNA(5'-HO(CH₂)₆-S-S-(CH₂)₆-dA₁₀ACAAATAACAAATAT-3')を含む 50 mM ホウ酸緩衝溶液 (pH 9.0)30 μl に 100 mM FCDI を溶かした 60 % DMSO を含む 50 mM ホウ酸緩衝溶液 (pH 9.0)30 μl を加えて、37 °C で一晩振とうした。振とう後、NAP-10 カラムを用いて FCDI を取り除いた。得られた溶液を凍結乾燥し、滅菌水 60 μl を加えた。その後、high performance liquid chromatography(HPLC)を行い、現れたピークを分取した。逆相 HPLC は Mightysil RP-18 カラムを用いて、グラジエント条件、アセトニトリルを含む 0.1 M TEAA buffer(pH7.0)を 10 から 95 %まで 40 分かけて上げ、流速 1.0 ml/min で行った。分取した溶液を凍結乾燥し、滅菌水 50 μl を加え、マトリックス：3-hydroxypicolinic acid(3-HPA)を用いて Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry(MALDI TOF MS)によって目的物を確認した。その後、0.04 M Dithiothreitol で脱保護を行い、チオール基を有するフェロセン化 DNA を調製した。

3-2-3 均一系中の反応

10 μM フェロセン化オリゴヌクレオチド溶液(1 × DNase I buffer を含む：40 mM Tris-HCl (pH7.5) 8 mM MgCl₂、5 mM DTT)に DNase I を加え、溶液を調製した。調製した溶液を室温で 30 分間ゆっくり振とうさせた。その後、DNase I 活性を失わずのために 80 °C で 10 分間インキュベートさせた。DNase I 活性を失わせた後、HPLC と MALDI TOF MS によりフェロセン化オリゴヌクレオチドと DNase I の反応性評価を行った。逆相 HPLC は

Mightysil RP-18 カラムを用いて、グラジエント条件アセトニトリルを含む 0.1 M TEAA buffer(pH7.0)を 10 から 40 %まで 30分かけて上げ、流速 1.0 ml/min で行った。また、MALDI TOF MS はマトリックス：3-HPA を用いて行った。

3-2-4. フェロセン化 DNA 修飾電極の調製

6 μm 、1 μm ダイヤモンドスラリー(各 5 分 \times 2)、0.05 μm アルミナ(10 分 \times 2)を用いて、金電極表面を研磨し、Milli-Q 水中で超音波洗浄(5 分間)を 3 回行った。その電極は 1 M H_2SO_4 中で走査速度 100 mV/s で -0.2 V から 1.6 V の範囲を 40 回走査させ、電気化学的に磨いた。その後、再び Milli-Q 水中で超音波洗浄(5 分間)を 3 回行った。この電極表面に 0.5 μM フェロセン化オリゴヌクレオチド(1 M NaCl を含む)を 1 μl 滴下し、室温で一晩固定化した。金電極表面を Milli-Q 水で洗浄後、1 mM 6-メルカプト-1-ヘキサノールを用いて、45 で 1.5 時間マスキングを行い、フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極を調製した。

3-2-5. 電気化学測定と電極上の酵素反応

Square wave voltammetry(SWV)は作用電極：フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極、対極：Pt 電極、参照電極：Ag/AgCl の三電極を用いて、電解溶液 10 mM $\text{NaHPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (pH 7.0)、0.1 M NaClO_4 、室温下で行った。SWV 測定は振幅 50 mV、加電圧 10 mV、振動数 10 Hz で行った。この SWV 測定によって電流値 i_0 を得た。その後、各濃度の DNase I 水溶液をフェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極上に 1 μl 滴下し、所定温度で 30 分間反応させた。反応後、フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極を Milli-Q 水で水洗いし、再び SWV 測定により電流値 i を測定した。

3-2-6. QCM 測定

ピランハ溶液(H_2SO_4 と H_2O_2 を 3:1 で混合した)で前処理を行った水晶発振子の金電極部分(4.9 mm^2)に脱保護した 0.5 μM チオール化 DNA(1 M NaCl を含む)を 100 μl 滴下し、室温で一晩固定化した。固定化後、金電極表面を MilliQ 水で洗浄し、1 mM 6-メルカプト-1-ヘキサノールを用いて、45 で 1.5 時間マスキングを行った。その後、MilliQ 水で洗浄し QCM 装置に設置した。測定溶液：1 \times DNase I buffer (40 mM Tris-HCl (pH7.5)、8 mM MgCl_2 、5 mM DTT)、測定温度：37、攪拌速度：600 rpm の条件下で発振子の振動数が一定なるまで放置した。その後セル内に DNase I 濃度を有する水溶液を加え、最終濃度が 5×10^{-6} unit/ μl になるようにし、時間経過による振動数変化を観測した。

3-3. フェロセン化オリゴヌクレオチドの合成

未修飾のチオール DNA を FCDI と反応させ、その後、逆相 HPLC によって精製を行った。未修飾 DNA と FCDI 反応後の HPLC 結果を Figure 3-2 に示す。HPLC 測定 of Retention Time (R.T.). 15 分の未修飾 DNA のピークが FCDI 反応後にはなくなり、新たに R.T. 20 min に大きなピークを得た。この R.T. 20 min のピークを分取し、MALDI TOF MS によってフェロセン化 DNA の同定を行った。その結果、目的物である 3 つのチミン (T) に FCDI を結合させたフェロセン化オリゴヌクレオチド (理論値 $[M-H]=9380$) であることが同定できた。

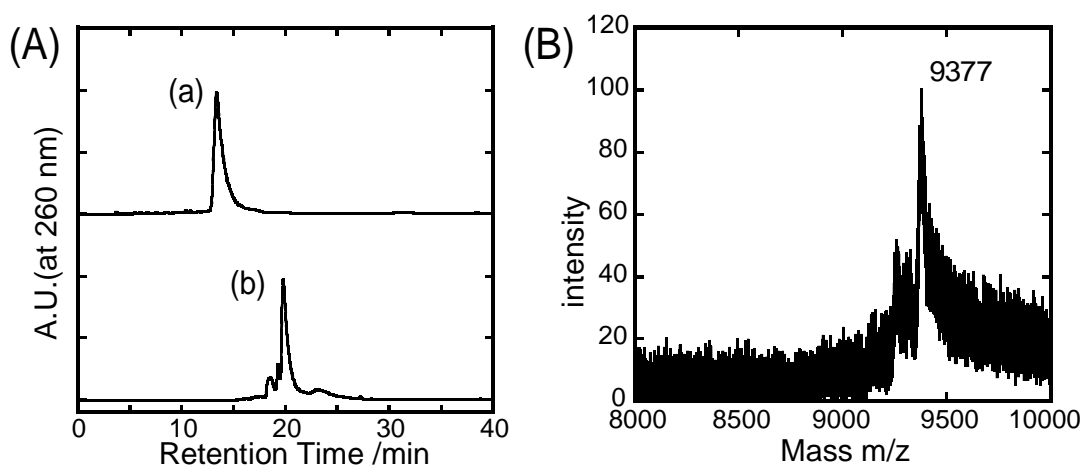


Figure 3-2. (A) Reversed phase HPLC before (a) and after (b) reaction of 30 nmol HO(CH₂)₆-SS-(CH₂)₆-dA₁₀ ACA AAT AAC AAA TAT-3' with 50 mM FCDI in 50 mM borate buffer (pH 9.0) containing 30 % DMSO at 37°C for overnight. (B) MALDI-TOF MS of the HPLC fraction at 20 min in (A) (b). Matrix, 3-HPA; mode, negative. m/z $[M-H] = 9377$ (theory for C₃₃₂H₄₄₇Fe₃N₁₂₄O₁₃₈P₂₅S₂, 9380).

3-4. 均一系中の反応性評価

10 μM フェロセン化オリゴヌクレオチドと 2.5 unit/ μl DNase I (1 \times DNase I buffer を含む)を室温下で 30 分間、ゆっくりと振とうさせて反応させた。反応後の溶液を逆相 HPLC 測定行くと、無数のピークが現れた(Figure 3-3)。そのピークを分取し、MALDI TOF MS を利用し、フェロセン化オリゴヌクレオチドのフラグメントの同定を行った。その結果、DNase I はフェロセン化オリゴヌクレオチドのフェロセン修飾部位から二塩基以上離れた

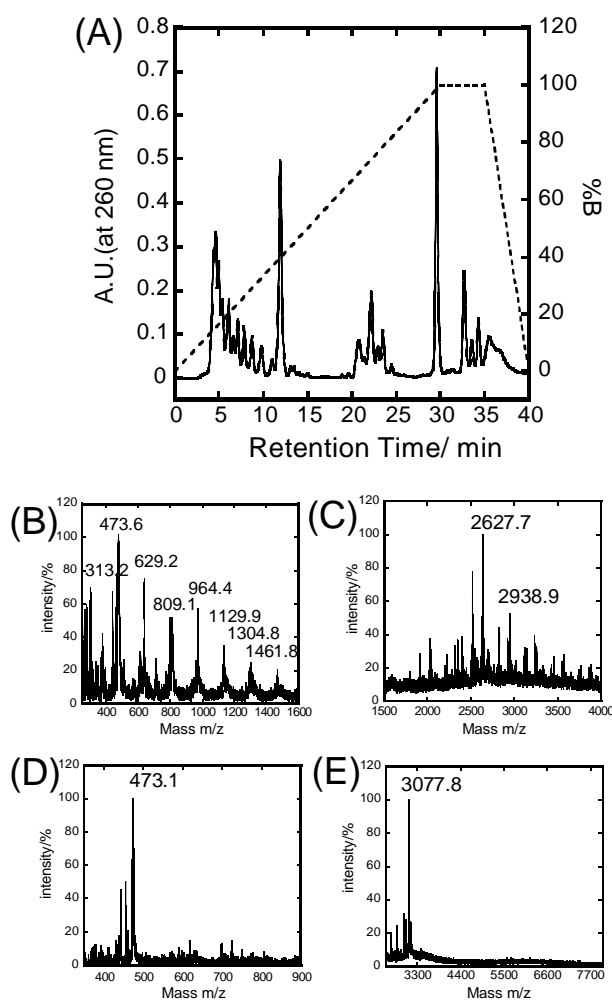


Figure 3-3. (A) Reversed phase HPLC of 10 μM **Fc-oligo-SH** after treatment with 2.5 units/ μl DNase I in 1 \times DNase I buffer at room temperature for 30 min. MALDI-TOF MS of the HPLC fractions of the retention time of 5-10 min (B), 20-25 min (C), 33-35 min (D), and 30 min (E). The peak product at the retention time of 11.5 min was always derived from the DNase I buffer and did not change during the DNase I digestion reaction.

部位を認識し、分解していることが示唆された。これはフェロセン修飾部位が立体的に高くなり、DNase I の認識を妨げており、そのためにフェロセン修飾部位からある程度離れた部位を加水分解すると考えられる。また、アデニンとシトシンのプリン-ピリミジン間を優先的に加水分解していることが明らかとなった。このことは DNase I の特徴である 5' 方向のピリミジンを優先的に認識し分解するといったことに一致する。¹³⁾

以上の結果から、フェロセン化オリゴヌクレオチドを基質とした場合、DNase I は DNA を認識し反応するが、フェロセン修飾部位からある程度離れた DNA を認識し、分解することが示めされた。

10 μ M フェロセン化オリゴヌクレオチド溶液に各濃度の DNase I を加えた溶液を 30 分間反応させた。反応後、DNase I 活性を失活させた溶液を HPLC 測定した。Figure 3-2 (A) から R.T. 37min のピークを原料であるフェロセン化 DNA のピークとした。フェロセン化 DNA のピークは DNase I 濃度の増加に伴って減少していき、5 unit / μ l DNase I ではピークが見えなくなった。一方、フラグメントのピークは DNase I 濃度増加に伴い増加して行った。

HPLC 測定で現れたピーク面積から各 DNase I 濃度の分解率を算出した。Figure 3-4 に示すような定量的なより良い相関図を得ることができた。従って、DNase I の基質としてフェロセン化オリゴヌクレオチドを用いた場合でも DNase I 活性を定量化できることが示めされた。

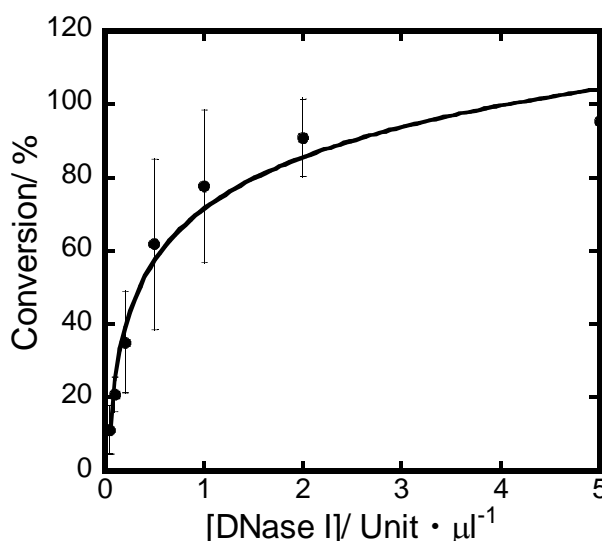


Figure 3-4. Plot of the digestion percentage of **Fc-oligo-SH** by DNase I. The digestion percentage was determined from the area of the fragment peaks based on the total peak one after multiplied by 100 in HPLC measurement. n=3. 分解率=フラグメントピーク面積/全ピーク面積 × 100(%)

3-5. 金電極上への固定化(吸着)、固定化量の算出

0.5 μM Fc-oligo-SH を 1.0 μl 処理して調整したフェロセン化オリゴヌクレオチド Fc-oligo-SH 修飾電極の Cyclic voltammetry (CV) を 0.1 M NaClO_4 を含む 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (pH 7.0) 中で測定した。Figure 3-5(A) に示したように酸化と還元ピークが 186 mV と 180 mV にそれぞれ観察された。ピーク電位差 ΔE_p は 6 mV であった。均一溶液中でのフェロセンの酸化還元は一電子移動であるので理論的に ΔE_p は 57 mV であるが、得られた値はこれに比べ小さなものであった。これは、拡散よりもむしろ固定化されたフェロセンの酸化還元反応に近いものであった^{14,15}。Figure 3-5(B) に酸化ピーク電流と走査速度との関係をプロットしたが、これらには良い相関が見られた。このことからフェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極上のフェロセンが電極上の吸着種と類似の電気化学的挙動を示していることが示された。Figure 3-5(A) の酸化ピーク面積より $\Gamma = |Q|/nFA$ (ここで Γ は固定化密度、 Q は酸化ピークの電気量、 n は電子数、 F はファラデー定数、 A は電極表面積を表す。) を用いてフェロセン化オリゴヌクレオチド Fc-oligo-SH の固定化量が $1.02 \pm 0.09 \text{ pmol/cm}^2$ ($0.6 \times 10^{12} \text{ molecules/cm}^2$) と見積もられた。Fc-oligo-SH 間がどれだけ離れているかを $1/(N_A\Gamma)^{1/3}$ により見積もると 127 となった。ここで N_A はアボガドロ数で Γ は固定化密度 ($0.6 \times 10^{12} \text{ molecules/cm}^2$) を示す。DNase I の分子サイズが $45 \times 40 \times 35$ と見積もることができ¹⁷、127 よりも小さいので本電極上の Fc-oligo-SH に DNase I がアクセス可能であることを示唆している。1 μl の 2 μM 、1 μM 、または 0.5 μM Fc-oligo-SH で調整した電極に対する DNase I の反応効率、それぞれ 48、72、73% となり修飾密度が高くなりすぎると DNase I が Fc-oligo-SH にアクセスし難くなっていることが示唆された。

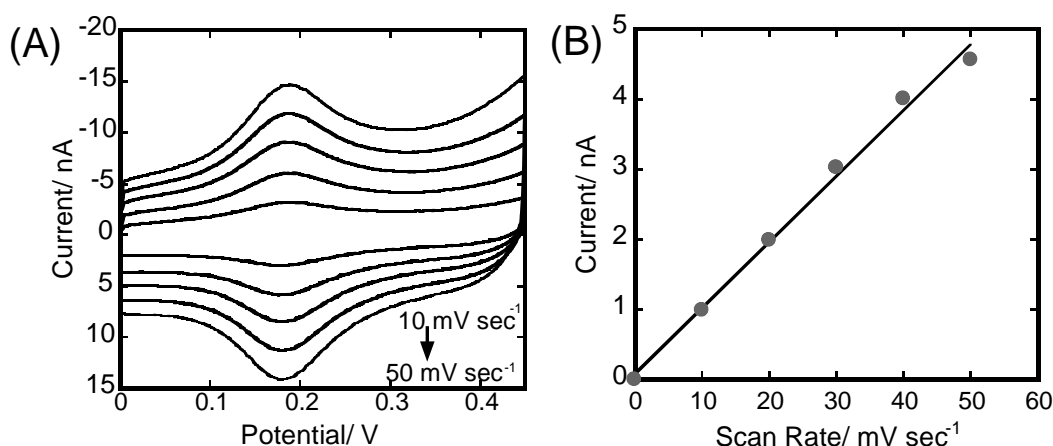


Figure 3-5. (A) CVs of the Fc-oligo-SH-modified electrode in 10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (pH 7.0) and 0.1 M NaClO_4 at the varied scan rates of 10, 20, 30, 40, and 50 mV/s from center to outside. (B) Correlation between the oxidative current response at its peak and the scan rate.

3-6. QCM 測定

QCM 測定は金基板上に固定化された DNA のハイブリダイゼーション等のモニタリングに有効であることが報告されている¹⁸⁾。そこで QCM 測定によって金基板上への DNA の固定化と DNase I による基板上の DNA 切断を質量変化としてモニタリングした。DNase I を反応溶液の 1 × DNase I buffer に添加すると振動数が増加し始め、DNase I 添加後から約 20 分で振動数は安定化し始めた。(Figure 3-6 (a)) そのときの質量変化は 16 ng/cm² (2.1 pmol/cm²) となり、密度に換算すると 1.5 × 10¹² molecules/cm² となった。CV 測定より算出した固定化密度 0.6 × 10¹² molecules/cm² よりも 2.5 倍大きな値となった。これは発振子に滴下した DNA を含む溶液の量が 100 μl であり、電気化学測定で滴下していた 1 μl よりもはるかに多いいために固定化量が多くなり、DNase I 活性による質量変化量も多くなったと考えられる。また、6-メルカプト-1-ヘキサノールだけ固定化した発振子を用いて DNase I 処理した場合には振動数変化は起きなかった。(Figure 3-6. (b))

以上の結果より、電極上に固定化した DNA に対しても DNase I 活性を示すことが確認できた。さらに DNase I の電極への非特異的な吸着はないことが明らかとなった。

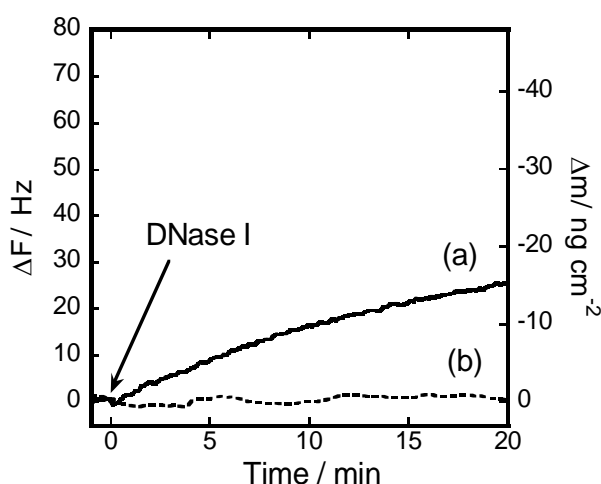


Figure 3-6. Frequency change of QCM chip immobilized with the **Fc-oligo-SH** (a) or 6-mercapto-1-hexanol (b) after the addition of 5×10^{-6} units/ μ l DNase I.

3-7. DNase I 活性の電気化学的検出

次に、フェロセン化オリゴヌクレオチドを修飾した金電極を用いて、DNase I 活性の検出を行った。Figure 3-1 示した概念に従って DNase I 活性の電気化学的検出が達成されると期待される。初めにプローブであるフェロセン化オリゴヌクレオチドを修飾した電極を、

Square wave voltammetry (SWV)測定をリン酸緩衝液(pH7.0)、0.1 M NaClO₄の電解質中で電流値 i_0 を測定した。その後、1 μ l DNase I(1 \times DNase I buffer を含む)を電極上に乗せ、37 $^{\circ}$ C で 30 分間インキュベートさせた後、再び SWV 測定を行うことによって電流値 i を測定した。その電気化学測定の結果は Figure 3-7 のボルタモグラムである。ボルタモグラムより DNase I 反応前後で大きくピーク電流値が減少していることがわかる。よって DNase I が電極上に固定化したフェロセン化オリゴヌクレオチドと反応し、DNA を分解してフェロセン部位が電極から取り除かれたと考えられる。このことは本システムにより電気化学的 DNase I 活性検出が可能であることを示している。また、電極ごとの電流値のバラツキをキャンセルするためにピーク電流値 i_0 、 i プロットの傾きにより DNase I 活性の評価を行った(Figure 3-7(B))。反応溶液中に DNase I 阻害剤である 5.4 mM EDTA を含む場合、 i_0 、 i プロットの傾きは 0.91 であり、single-strand RNA を特異的に加水分解する RNase A を反応させた場合でも傾きは 0.89 と高い値となった(Figure 3-8)。この結果は DNase I が特異的に基質であるフェロセン化オリゴヌクレオチドを分解していることを示している。一方、DNase I を含む溶液を反応させると i_0 、 i プロットの傾きは低い値を得た。得られた i_0 、 i プロットの傾きよって DNase I 活性を評価できると考えられる。

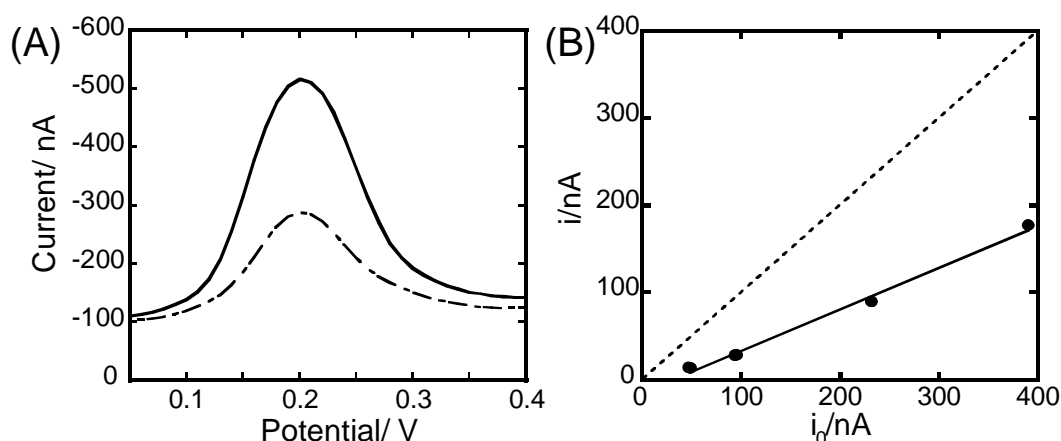


Figure 3-7. (A) SWV curves of Fc-oligo-SH-immobilized electrode before (solid line) and after (dotted line) treatment with 2×10^{-3} units/ μ l DNase. (B) Plots of the peak current i_0 against i for the same experiments in (A).

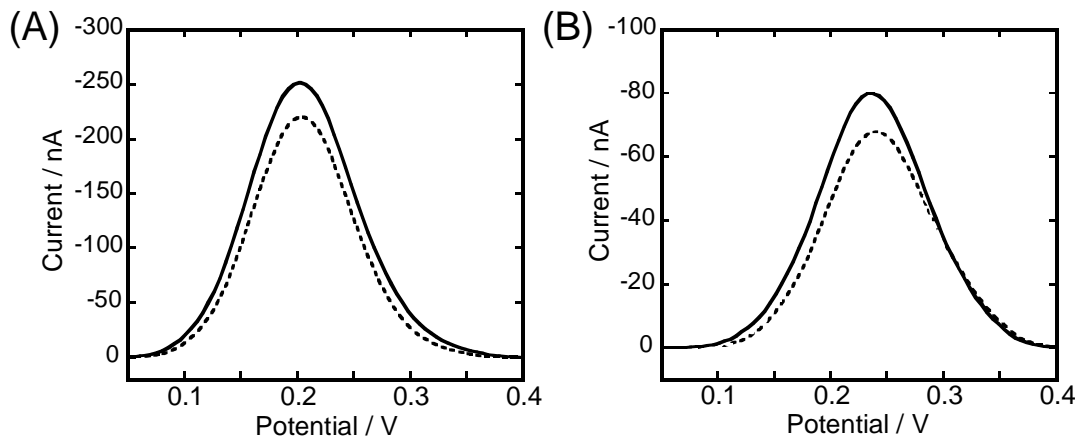


Figure 3-8. SWV curves of **Fc-oligo-SH**-immobilized electrode before (solid line) and after (dotted line) of 1 unit/ μ l DNase I in the presence of 5.4 mM EDTA (A) and 1 unit/ μ l RNase (B).

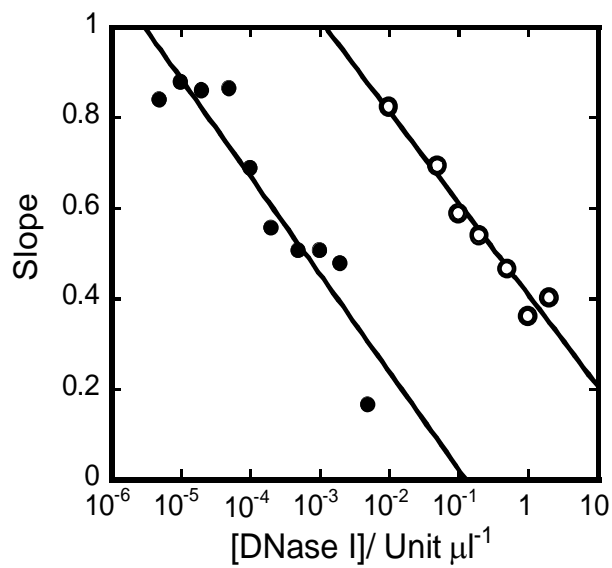


Figure 3-9. Relationship between DNase I activity against the slope in the i_0 - i plot at 25°C (○) or 37°C (●).

次に DNase I 反応温度を 25 と 37 で DNase I を反応させ、そのときの DNase I 濃度と i_0 - i プロットの傾きをプロットした。DNase I 濃度の減少に伴って傾きは増加していき、よりよい相関関係を得ることができた(Figure 3-9)。Figure 3-9 に示したように DNase I の

至適温度である 37 °C の場合、 10^{-5} unit/ μ l オーダー以下では i_0 、 i プロットの傾きが頭打ちとなっている。このことによって DNase I 反応温度が 37 °C の場合、検出可能な DNase I 濃度は 10^{-4} unit/ μ l であることが示唆された。酵素反応温度を 37 °C の DNase I 活性の検出は 25 °C に比べて約 100 倍、低濃度の DNase I を検出することができた。これは反応温度を上げたことによって DNase I 活性が上がったために電気応答の減少が大きくなり、 i_0 、 i プロットの傾きも大きく変化したと思われる。

以上の結果より 37 °C 下での本検出システムによる検出限界は 10^{-4} unit/ μ l DNase I であることが示唆された。さらに固定化量などを制御することによってより感度 DNase I 活性を検出することができると考えられる。

3-8. 結言

チオール基を有するフェロセン化オリゴヌクレオチド Fe-oligo-SH を FCDI とチオール化オリゴヌクレオチドと FCDI との反応により合成し、金基板上に固定化した。この電極を用いて電気化学的 DNase I 検出に成功した。DNase I 処理前後の DPV の電流値 i_0 、 i を測定し、 $i_0 - i$ プロットの傾きからその活性を評価した。これによって 37 °C 下 $10^{-5} - 10^{-2}$ unit/ μ l DNase I の濃度域での検出が可能となった。検出下限は 10^{-4} unit/ μ l DNase I であった。

参考文献

1. E. K. Wakeland, K. Liu, R. R. Graham, T. W. Behrens, *Immunity*, **15**, 397-408 (2001).
2. D. L. Vaux, R. A. Flavell, *Current Opinion in Immunology*, **12**, 719-724 (2000).
3. J. Zhang, M. Xu, *Trends in Cell Biology*, **1**, 84-89 (2002).
4. K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami, H. Tsukamoto, C. Hashimura, M. Urushihara, Y. Kuroda, *Nature Genetics*, **28**, 313-314 (2001).
5. M. J. Walport, *Nature Genetics*, **25**, 135-136 (2000).
6. P. J. Lachmann, *Lupus*, **12**, 202-206 (2003).
7. G. A. Nevinsky, T. G. Kanyshkova, V. N. Buneva, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 1245-1255 (2000).
8. K. Mukumoto, T. Nojima, S. Takenaka, Synthesis of ferrocenylcarbodiimide as a convenient electrochemically active labeling reagent for nucleic acids, *Tetrahedron* **61** (2005) 11705-11715.
9. M. J. Tarlov, A. B. Steel, in *Biomolecular Films. Design, Function, and Applications* (J.F. Rusling Ed.), Marcel Dekker, New York, 545-608 (2003).
10. R. Levicky, T.M. Herne, M.J. Tarlov, S.K. Satija, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9787-9792 (1998).
11. A.B. Steel, T.M. Herne, M.J. Tarlov, *Anal. Chem.*, **70**, 4670-4677 (1998).
12. K.A. Peterlinz, R.M. Georgiadis, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 3401-3402 (1997).
13. A. Bernardi, C. Gaillard, G. Bernardi, *Eur. J. Biochem.*, **52**, 451-457 (1975).
14. J. Liu, R. Castro, K. A. Abboud, A. E. Kaifer, *J. Org. Chem.*, **65**, 6973-6977 (2000).
15. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical methods, 2nd ed.*, Wiley, New York, 2001.
16. A. Anne, A. Bouchardon, J. Moiroux, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1112-1113 (2003).
17. D. Suck, C. Oefner, W. Kabsch, *EMBO J.*, **3**, 2423-2430 (1984).
18. Y. Okahata, K. Niikura, Y. Sugiura, M. Sawada, T. Morii, *Biochemistry*, **37**, 5666-5672 (1998).

第4章 自己組織化膜 (SAM) を利用したセンサ

4-1 緒言

前章で述べたように DNase I は実験室でのコンタミネーションの確認のみならず SLE 等の疾病の診断などに重要である¹⁻⁷⁾。そこで、フェロセンを導入したチオール化オリゴヌクレオチドを金電極に固定化することによる電気化学的 DNase I センサの開発に成功した (Figure 4-1)。しかし、金-イオウ結合を利用した手法においても電極ごとのばらつきを完全に制御することができなかった。そこで第1章で検討した金基板上へカルボン酸表面を持つ自己組織化膜 (SAM) を形成させ、カルボン酸を活性化エステル化した後、フェロセン化オリゴヌクレオチドを固定化することにより再現性の良い電気化学的 DNase I センサの構築を試みた。先に述べたようにグラシーカーボン電極上に活性化エステルを形成させ、天然の DNA を固定化した例はすでに報告されている⁸⁾。また、金基板上の活性化エステルを有する SAM 形成はすでに報告されている⁹⁾。しかし、金基板上の SAM 形成とオリゴヌクレオチドを利用した報告例はこれまでに知られていない。

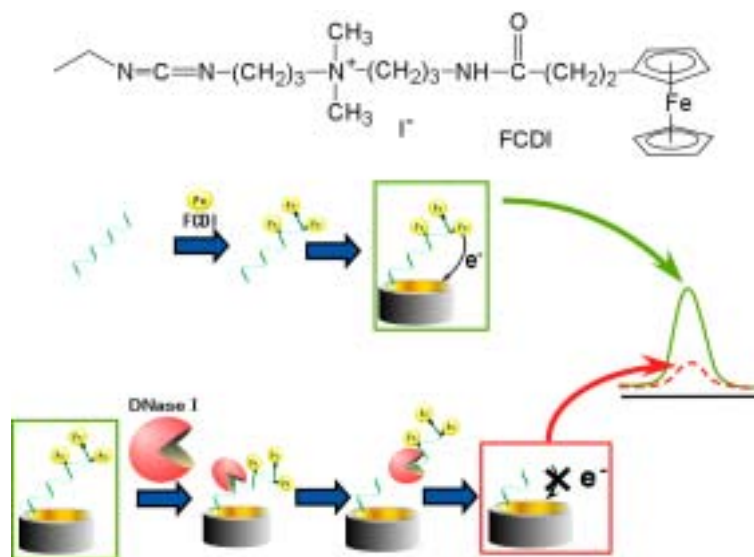


Figure 4-1. Chemical structure of FCDI and the principle of electrochemical DNase I assay based on the ferrocenyloligonucleotide-immobilized electrode.

まず本章では Figure 4-2 (a)に示した固定化法によって合成したフェロセン化オリゴヌクレオチドを固定化した。Figure 4-2 (a)に示した固定化法は一般的な DNA 固定化法である。このような自己単分子膜(SAM)形成は電気化学的な遺伝子センサを作製するのに重要であり、酵素や DNA などの生体分子を固定化するのに有用な手法である。本実験でも Figure 4-2 (a)の固定化方法によって調製したフェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極を用いて DNase I 活性の電気化学的検出システムの開発を試みた。次に本実験では高感度化を目指すため、Figure 4-2 (b)に示した固定化法を行った。まず、ジチオプロピオン酸を金電極上に固定化させ SAM を形成させた。その後、

1-Ethyl-3(3-dimethyl aminopropyl)carbodiimide (EDC)と N-Hydroxysuccinimide (NHS)を用いて電極表面を活性化させた。その活性化させた電極上の単分子膜にシトシンのアミノ基を利用して DNA を固定化した。この固定化法により各電極のオリゴヌクレオチドの固定化量を一定にし、電極ごとの酵素反応による電気応答変化のばらつきを抑えることを目的とした。さらにチオール基の修飾の手間が省けるため、DNA 合成のコストも抑えることができるといった利点もある。

本章では二つの固定化方法を利用して DNase I 活性の電気化学検出を行い、DNase I 活性検出可能な最適なヌクレアーゼセンサーの構築を目指した。

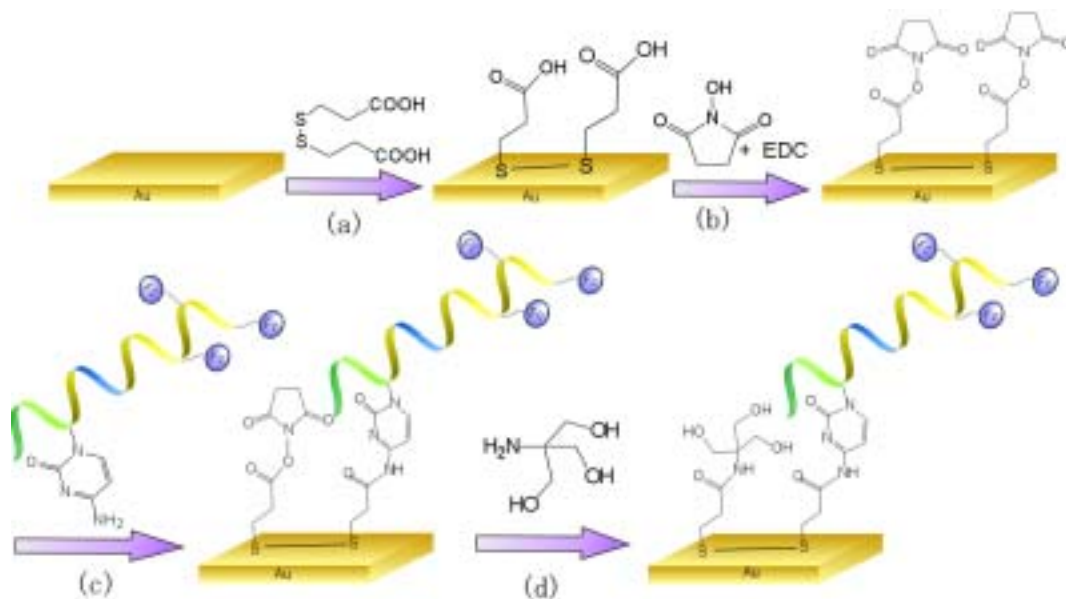


Figure 4-2. Preparation of an NHS-activated carboxylic acid on the electrode and immobilization of the ferrocenyloligonucleotide on it. (a) Three hundred μL of 1 mM 3,3'-dithiodipropionic acid, 25 $^{\circ}\text{C}$, overnight, (b) 7 mL of 5 mM EDC and 8 mM NHS in water, 25 $^{\circ}\text{C}$, 20 min, (c) 50 μL of 0.5 μM ferrocenyloligonucleotide, 0.5 M NaCl, 25 $^{\circ}\text{C}$, 24 h, (d) 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 20 mM NaCl, 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 s.

4-2. 実験

4-2-1. ケミカル

一本鎖 DNA のフェロセン化試薬としてのフェロセン化カルボジイミド (FCDI) は、文献に従って合成した¹⁰⁾。使用したオリゴヌクレオチドは、5'-CCC CCC CCC CCC AAA ACA AAT AAC AAA TAT-3' (ODN) は Genenet (福岡) にカスタム合成を依頼した。Biopak 水は Elixs 3 kit (Millipore, Billerica, MA) に Milli-Q Gradient A10 を通すことによって得た。DNase I (RNase フリー) は Takara (滋賀) から購入した。10×DNase I buffer (400 mM tris(hydroxymethylamino)methane (Tris)-HCl (pH7.5), 80 mM MgCl₂, 50 mM DDT) を TaKaRa から購入して希釈して使用した。1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS), 3,3'-dithiodipropionic acid は東京化成 (東京) から購入した。

4-2-2. フェロセン化オリゴヌクレオチド (FCODN) の合成

ODN と 100 mM FCDI とを 30% DMSO を含む 50 mM ホウ酸緩衝液 (pH9.0) 中 37 °C で一晩反応させ、反応の進行は逆相 HPLC によってモニタリングした。4 分に見られる ODN のピークは反応に進行とともに 5 分のピークとなった。MALDI-TOF MS で観察された分子量は 10339.16 で ODN に FCDI が三つ反応した 10329.90 と一致した (ODN には三箇所の T を FCDI の反応部位として導入している)。FcODN は逆相 HPLC で精製した。

4-2-3. FcODN - 修飾電極の調整

市販の金電極 (面積 2 mm², Bioanalytical Systems, BAS, 東京) を 6 μm、1 μm ダイヤモンドスラリー (5 分×2)、0.05 μm アルミナ (10 分×2) を用いて、金電極表面 (単電極: 面積 2 cm²) を研磨し、超音波洗浄 (5 分) を 3 回行った。その後、0.5 M H₂SO₄ 水溶液中で -0.2 V ~ 1.5 V 範囲、掃引速度 100 mV/sec で 40 回電位掃引し、電解研磨を行った。再び超音波洗浄 (5 分) を 3 回行った。前処理をした電極表面を窒素ガスで乾燥した。この電極を 1 mM 3,3'-dithiodipropionic acid を含む 300 mL のエタノールにつけて 25 °C で一晩放置した。電極を Biopak 水で洗浄後、5 mM EDC と 8 mM NHS を含む水溶液 7 ml に浸けて 25 °C で 20 分放置した。その後電極を逆さにして所定濃度の FcODN 溶液 50 ml をのせて 25 °C で一晩放置した。Milli-Q 水で洗浄後、未反応の活性エステルをつぶすために 20 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 300 mL に 10 秒間浸けた。

4-2-4. HPLC

HPLC は X Terra MS C18 カラム (4.6 × 100 mm, 5 mm) (Nihon Waters, 東京) を用いてグラジエント条件で行った。流速 1.0 ml/min で 0.1 M triethylammonium acetate 緩衝液 (pH7.0) 中にアセトニトリル濃度 19% から 76% までを 40 分かけて変化させた。

4-2-5. 電気化学測定

電気化学測定は ALS Electrochemical Analyzer Model 650A を用いて square wave voltammetry (SWV) または cyclic voltammetry (CV) 測定を行った。SWV 測定条件は、Amplitude 50 mV, Increasing Potential 10 mV, Frequency 10 Hz である。掃引速度は 100 mV/sec である。参照電極 Ag/AgCl、対極 Pt 電極、金電極を作用極とした三極系で測定した。また CV 測定条件は、掃引速度 10~50 mV/sec、電位掃引範囲 0 V~0.45 V である。測定電解溶液には、それぞれの測定で 100 mM NaClO₄ 溶液を含む 10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 緩衝液 (pH7.0) を用いた。

4-3. 結果と考察

4-3-1. 金電極上の FcODN の固定化条件の検討

フェロセン化オリゴヌクレオチド FcODN を Figure 4-2 に示した手順によって金電極上に固定化した。FcODN の固定化時間を 24 時間した場合も最適な DNA 固定化濃度の検討を行った。活性化させた電極を所定濃度の 0.5、2、4、6、8 μ M FcODN (0.5 M NaCl を含む) 50 μ l に 25 で 24 時間浸し固定化した。

フェロセン化オリゴヌクレオチド FcODN の固定時間を 24 時間にした場合の DNA 固定化濃度と DNase I 活性に伴う電流減少率と固定化密度の関係を Figure 4-3 に示す。本実験によって最適な DNA 固定化濃度の検討を行った。0.5 μ M のフェロセン化オリゴヌクレオチドを固定化した場合が DNase I 活性による電流減少率が最も大きく、エラーバーも小さな結果となった。よって、0.5 μ M のフェロセン化オリゴヌクレオチドを用いて DNase I 活性の検出を行うことが適当であると思われる。また、固定化する DNA 濃度が増加するの

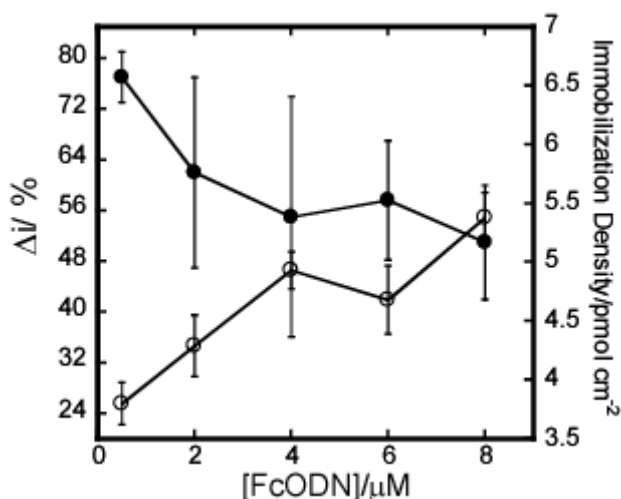


Figure 4-3. Changes in the immobilization density (open circles) and Δi (normalized current decrease, filled circles) with the concentration of FcODN used for immobilization. SWV conditions were the following: Amplitude 30 mV, applied potential 5 mV, frequency 150 Hz, scan rate 750 mV s⁻¹.

に伴い固定化密度が増加した。さらに固定化密度が増加すると DNase I 活性による電流減少率は減少していった。これより電極上の DNA 固定化量が多くなると DNase I が DNA と反応するためのスペースが電極上になくなり、DNA の切断が起こりにくくなっていると思われる。

4-3-2. シトシンを利用した固定化法で調製した電極の固定化評価

24 時間、シトシン固定化させた電極を調製した。その電極を用いてフェロセン化オリゴヌクレオチドの修飾を確認するため、cyclic voltammetry (CV) 測定を行った。

フェロセン化オリゴヌクレオチド(FcODN)を修飾した電極を用いて 100 mM NaClO₄ を含む 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 緩衝液(pH7.0)の測定溶液中で CV 測定を行った。掃引速度は 150、250、350、450、550、650、750 mV/sec で行った。酸化と還元ピーク電位幅 $\Delta E_p=5$ mV であった。また、Figure 4-4 より redox 分子が吸着している場合に得られる掃引速度とピーク電流値の関係に直線関係を示していることより、シトシンを利用した固定化法でもチオール基を持つフェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極の時と同様に電極上に固定化されていることが示唆された。このときの固定化密度は 3.8 pmol/cm² であり、 $\Delta E_p=5$ mV であった。ここで示された固定化密度はチオール化 DNA を用いたときよりも約 4 倍大きな値であった。

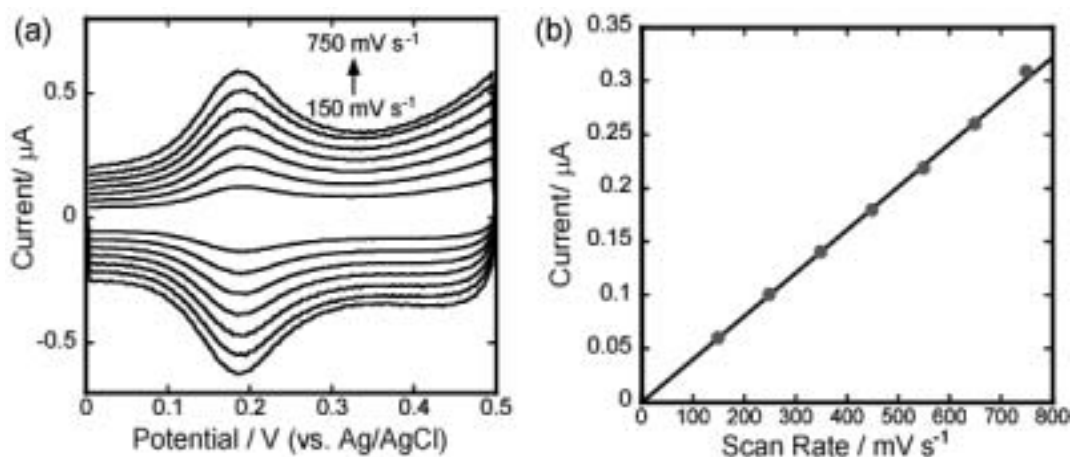


Figure 4-4. (a) Cyclic voltammograms of a FcODN-immobilized electrode in 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ buffer (pH 7.0) and 0.10 M NaClO₄ at various scan rates of 150, 250, 350, 450, and 750 mV s⁻¹ from center to outside. (b) Correlation between the oxidation current response at its peak and the scan rate.

4-3-3. フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極の安定性評価

フェロセン化オリゴヌクレオチドの固定化後に Biopak 水によって 2 時間洗浄し、電気化学測定を行っても大きな電気応答を示した。よって、Biopak 水に浸漬させていれば保存可能であると考えられる。また、フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極がバイオセンサーとして実用化される際、自己単分子膜(SAM)の安定性は修飾電極の寿命を決定する重要な要素になってくる。このような背景をもとにフェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極の安定性を Biopak 水と Tris-HCl buffer 中に浸して保存することによって評価した。

フェロセン化オリゴヌクレオチド(FcODN)を用いて、フェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極を調製した。その後、調製した電極を用いて CV 測定を行った。測定後、Biopak 水または 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 20 mM NaCl 溶液中に浸し、25 °C で保存した。保存した電極を用いて再び CV 測定を行った。その後、保存と CV 測定を繰り返して行った。CV 測定によって得られたボルタモグラムを図 4-27 に示す。最初の CV 測定の電流値を 100 % と考えたときの電気シグナルと保存期間の関係を Figure 4-5 に示した。Tris-HCl (pH7.4) で保存した場合は保存期間 1 日で最初の CV 測定の電流値よりも約 40 % 電流値が減少した。一方、Biopak 水で保存した場合、7 日程度でも電流値の減少も小さく、高い電流値を維持することが示唆された Figure 4-5(B)。しかし、Biopak 水で保存した場合も 7 日以上保存すると徐々に電流値が減少してきた。よって、シトシンで固定化したフェロセン化オリゴヌクレオチド修飾電極は Biopak 水中で一週間程度保存が可能であると思われる。

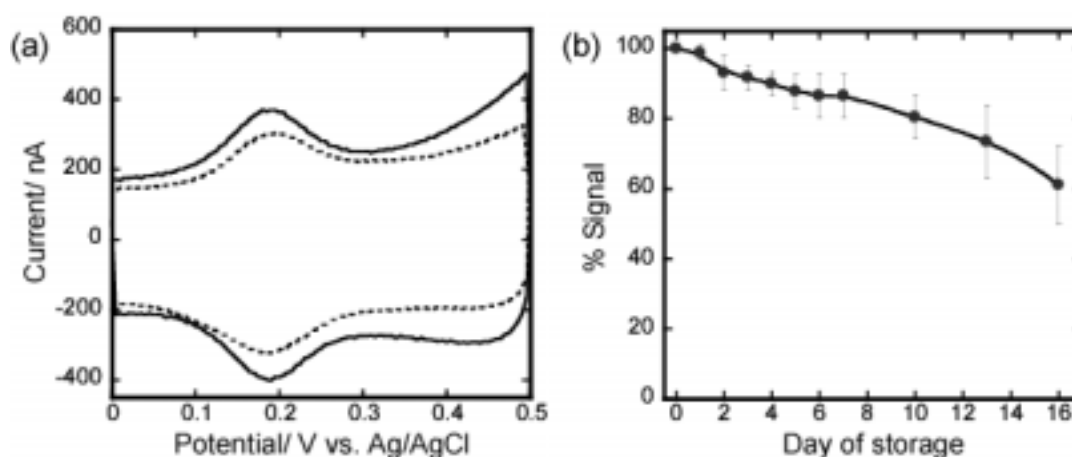


Figure 4-5. CVs of an FcODN-immobilized electrode immediately after preparation (solid) or storage for 16 days (broken line) in Biopak water (a). (b) Time-dependence of the oxidative peak current of an FcODN-immobilized electrode in Biopak water. All CVs were measured in 10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ buffer (pH 7.0) and 0.10 M NaClO_4 . The bar represents a standard error for three determinations each.

4-3-4. シトシン固定化法を利用した DNase I 活性の電気化学的検出

0.5 μM フェロセン化オリゴヌクレオチド(FcODN)を 24 時間処理して電極に固定化した。その電極を用いて SWV 測定を行い、電流値 i_0 を測定した。測定後、所定濃度の DNase I 水溶液 100 μl 中に電極を浸漬し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートさせた。その後再び SWV 測定を行い、電流値 i を測定した。DNase I 処理前後の電流値 i_0 と i の電流値変化によって DNase I 活性の電気化学的検出を行った。DNase I を処理した場合のボルタモグラムを Figure 4-6 に示す。DNase I 処理前後で電流値の減少が観測できた。よって、DNase I 濃度に伴う電流減少率を調べ、Figure 4-7 に DNase I 濃度と電流減少率の関係を示した。Figure 4-7 より DNase I 濃度の減少に伴い電流減少率も減少していった。シトシンを利用した固定化方法に関しても DNase I 濃度と電流減少率の関係により良い相関があることが示され、DNase I 活性の検出が可能であると思われる。さらにフェロセン化オリゴヌクレオチドをチオール基によって固定化した系に比べて、ピーク電流値 i_0 と電流減少率のばらつきも小さく安定的に DNase I 活性を検出できた。

また、シトシンを利用した固定化法での DNase I 活性の電気化学検出が DNase I 特異的であること評価した。ここでは Biopak 水と阻害剤の 20 mM EDTA を含む 1×10^{-4} unit/ μl DNase I 水溶液をそれぞれ 100 μl 処理した。ボルタモグラムよりピーク電流値の減少は反応溶液処理前後で小さかった。このときの電流減少率は Biopak 水と EDTA を含む DNase I 水溶液を処理した場合でそれぞれ 6 %と 15 %であった。それぞれの電流減少率は小さく、電極への DNase I の非特異的な吸着もないと考えられる。よって、DNase I が特異的にフェロセン化オリゴヌクレオチドを分解していることが示された。

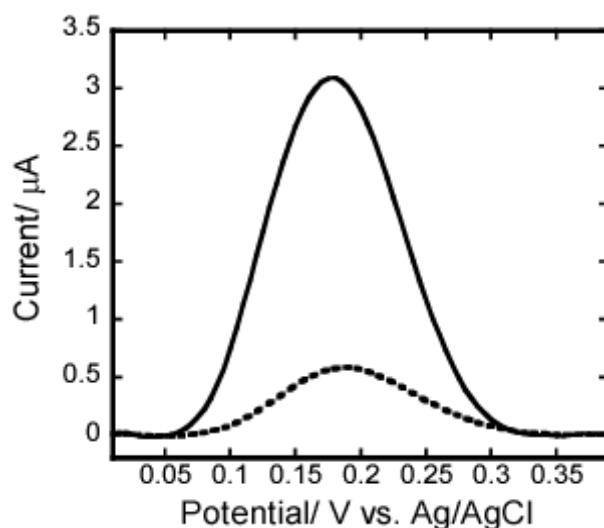


Figure 4-6. SWV curves of a FcODN-immobilized electrode before (solid) and after (broken) treatment with 1×10^{-3} units mL^{-1} DNase I (30 min, 37 $^{\circ}\text{C}$). Scan rate: 750 mV s^{-1} .

Figure 4-7の結果より、 10^{-5} unit/ μL と 5×10^{-6} unit/ μL DNase I で電流減少率が近い値となった。従って 10^{-5} unit/ μL 以下の DNase I 濃度で電流減少率は飽和すると思われる。また、Biopak 水処理した場合、電流減少率が 6 % であることから、シトシン固定化法での DNase I 活性の検出限界は 5×10^{-6} unit/ μL DNase I であり、 5×10^{-4} unit と考えられる。この検出限界はチオール基を有したフェロセン化オリゴヌクレオチドを用いた固定化法の検出限界 10^{-4} unit であり、本システムは 50 倍の感度の向上が達成された。このシトシン固定化法は安定的に電気応答を示し、従来法の DNase Alert (4 pg/ μL)¹¹⁾ よりも高感度な DNase I 検出法であると考えられる。

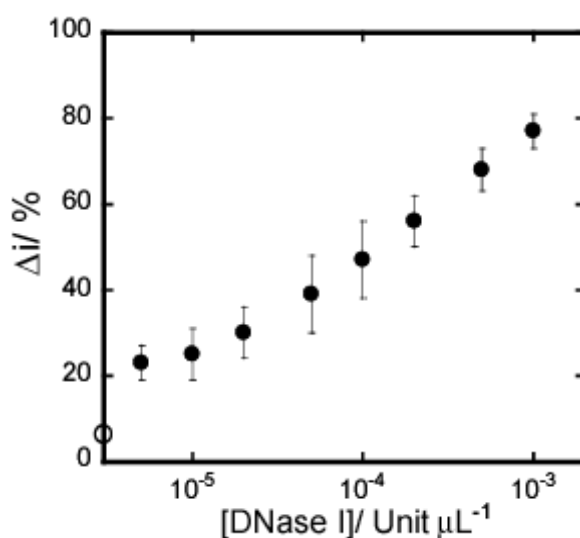


Figure 4-7. Relationship between 100 μL of DNase I activity (37 °C, 30 min) against the Δi value. The open circle on the ordinate represents the Δi value in the absence of DNase I.

本電極を Biopak 水のみで処理した場合 (Figure 4-8(A)) も反応溶液中に DNase I 阻害剤である 20 mM EDTA が存在する場合 (Figure 4-8(B)) も SWV のピーク電流減少はほとんど見られなかった。この結果は DNase I が特異的に基質であるフェロセン化オリゴヌクレオチドを分解していることと電極に対する非特異的なタンパク質吸着は見られないことを示している。

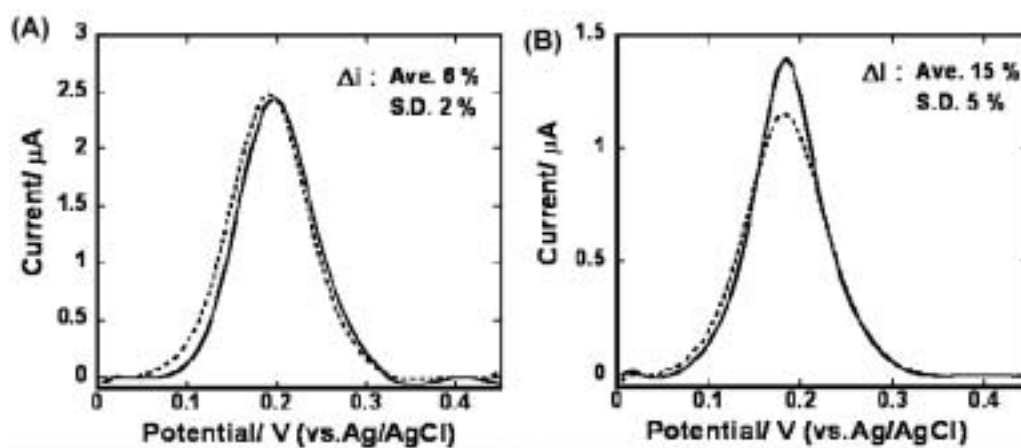


Figure 4-8. SWV curves of Fc-oligo-SH-immobilized electrode before (solid line) and after (dotted line) of treatment with Biopak water (A) or 1×10^{-4} unit/ μ l DNase I at 30°C for 30 min in the presence of 20 mM EDTA (B).

4-4. 結言

本章ではフェロセン化カルボジイミド(FCDI)を用いて合成したフェロセン化オリゴヌクレオチドを金電極へ固定化した。その固定化した電極を用いて DNase I 活性の電気化学的検出を行った。まず始めにチオールと金の結合を利用した固定化法によってフェロセン化オリゴヌクレオチドを固定化した。フェロセン化オリゴヌクレオチドが固定化されていることを CV 測定によって評価を行った。その結果、CV 測定では電極に吸着を示すボルタモグラムを得ることができた。さらに電極表面に redox 分子が吸着している場合に成り立つ酸化ピーク電流値 i_{pa} と掃引速度の平方根の関数に比例した。よって、フェロセン化オリゴヌクレオチドが金電極上に固定化されていることが示された。次に QCM 測定によって固相上の酵素反応を評価した。QCM 測定では DNase I を溶液内に添加すると電極上に固定化されている DNA 量の減少に伴う振動の増加が観測された。よって、固相上でも酵素反応が行えることが明らかとなった。そこで実際に DNase I 活性の電気化学的検出を行った。その結果、DNase I 処理前後でフェロセン由来の電流値が大きく変化した。従って、DNase I 活性の電気化学的検出が可能であることが示唆された。また、DNase I 処理温度を 25 から 37 に上げて DNase I 処理を行うと検出感度が約 100 倍向上し、37 での検出限界は 10^{-4} unit DNase I であった。さらに高感度な DNase I 検出を行うため、二本鎖のフェロセン化 DNA を用いた検出を試みた。しかし、DNase I によってニックを形成されるため電極上からフェロセンが取り除かれず、電気応答の変化が起きなかった。従って、二本鎖 DNA を用いた検出ではさらなる実験条件の検討が必要である。

次に著者はピーク電流値 i_0 のばらつきを抑えるため、シトシンを利用した固定化法を行

い DNase I 活性の検出を行った。固定化操作として固定化時間を 24 時間行い、固定化後の電極の洗浄を 2 時間行った。このような固定化操作によって活性化エステルと未反応なフェロセン化オリゴヌクレオチドを電極上から完全に取り除くことができた。そのため、酵素反応とは関係ない電気応答の減少を抑えることができた。シトシンによる固定化法を利用した DNase I 活性の検出した場合、各 DNase I 濃度での電流減少率のばらつきも小さく、定量的に DNase I を検出できることが示唆された。この場合の検出限界は 5×10^{-6} unit/ μ l DNase I (5×10^{-4} unit) であった。

以上の結果から、FCDI を導入したフェロセン化オリゴヌクレオチドを用いた DNase I 活性の電気化学的検出が可能であることが示された。

参考文献

1. E. K. Wakeland, K. Liu, R. R. Graham, T. W. Behrens, *Immunity*, **15**, 397-408 (2001).
2. D. L. Vaux, R. A. Flavell, *Current Opinion in Immunology*, **12**, 719-724 (2000).
3. J. Zhang, M. Xu, *Trends in Cell Biology*, **1**, 84-89 (2002).
4. K. Yasutomo, T. Horiuchi, S. Kagami, H. Tsukamoto, C. Hashimura, M. Urushihara, Y. Kuroda, *Nature Genetics*, **28**, 313-314 (2001).
5. M. J. Walport, *Nature Genetics*, **25**, 135-136 (2000).
6. P. J. Lachmann, *Lupus*, **12**, 202-206 (2003).
7. G. A. Nevinsky, T. G. Kanyshkova, V. N. Buneva, *Biochemistry (Moscow)*, **65**, 1245-1255 (2000).
8. K. M. Millan S. R. Mikkelsen *Anal. Chem.* **65** (1993) 2317.
9. H. Raether, *Surface Plasmons*, New York, Springer Tracts Modern Physics, 111 (1988).
10. K. Mukumoto, T. Nojima, S. Takenaka *Tetrahedron* **61** (2005) 11705.
11. www.ambion.com/jp

第5章 結論

本論文では、簡便かつ迅速に検出可能なヌクレアーゼ活性検出法の構築を目的とし、ターゲットヌクレアーゼとして DNase I または RNase A を用いて、それら活性の電気化学的検出法の開発を試みた結果をまとめたものである。

本論文では、得られた成果を 5 章としてまとめた。まず、第 1 章では、ヌクレアーゼとはどのようなものでその迅速で簡便な検出法の要求性を述べた。また、従来のヌクレアーゼ検出法と最近の報告例について概説した。さらに本論文で提案した電気化学的ヌクレアーゼ検出法の原理について述べた。

第 2 章では、これを実現するための例として RNase A をターゲットとしてグラシーカーボン電極表面を酸化することにより、カルボン酸を導入し、これを活性エステルと変換し天然 RNA を固定化した。この電極と竹中が開発したフェロセン化ナフタレンジイミド (FND) とを組み合わせることによって RNase A の電気化学的検出に成功した。 10^{-10} - 10^{-8} M で定量でき、検出下限は、0.3 nM であった。しかし、電極間のばらつきを制御できなかったため RNase A 処理前後の電流値 i_0 と i をプロットし、その傾きから評価した。そこで金電極上に SAM によりカルボン酸を形成され、これを活性エステルとして天然 RNA を固定化した。電極間のバラツキを軽減できたもののその定量化には電流値 i_0 と i をプロットとその傾きを用いた評価が必要であった。しかし、本改良法では 600 pM - 12 pM の濃度域で RNase A 量を定量できることが明らかとなった。

第 3 章では、竹中らが開発したフェロセン化試薬である FCDI を用いてフェロセン化オリゴヌクレオチドを合成し、金 - イオウ結合を利用して金電極表面に固定化することにより DNase I センサの構築を行った。これにより、FND を必要としないセンサの構築に成功した。これによって 37 下 10^{-5} - 10^{-2} unit/ μ l DNase I の濃度域での検出が可能となった。しかしながら、チオール化オリゴヌクレオチドへの FCDI の反応が必要であった。

第 4 章では、未修飾合成オリゴヌクレオチドを利用した系を確立するためにカルボン酸 SAM を形成させた金電極への適用を考えた。合成オリゴヌクレオチドでもシトシン (C) の連続配列を導入すればその部位が活性エステルと反応することによる効果的な固定化が可能になるものと期待された。検討の結果、チオール系よりも密な修飾が可能となり、また電極ごとのバラツキも大幅に軽減され、 i_0 - i プロットを必要としない検出が達成された。これによって 5×10^{-6} - 10^{-3} unit/ μ l の濃度域での検出が可能となった。本システムでは合成オリゴヌクレオチドの特別な修飾を合成段階から施すことが必要ないので合成 RNA への応用も期待される。

本研究では電気化学的な DNase I 活性の検出に成功した。今後の展望を図 5-1 に示す。まず始めにフロー系への応用が期待される。フロー系での DNase I 活性のモニタリングが可能となれば、実験で用いる水へのヌクレアーゼのコンタミネーションの防止が期待される。また、基質部分の DNA 配列を変えることによって他のヌクレアーゼについても同様に検出が可能であり、複数のヌクレアーゼを検出できるハイスループットな検出が可能で

あると思われる。これによって疾病などに関連したヌクレアーゼを検出でき、様々な疾病を診断できるハイスループットな診断法の一つと成りえると期待される。

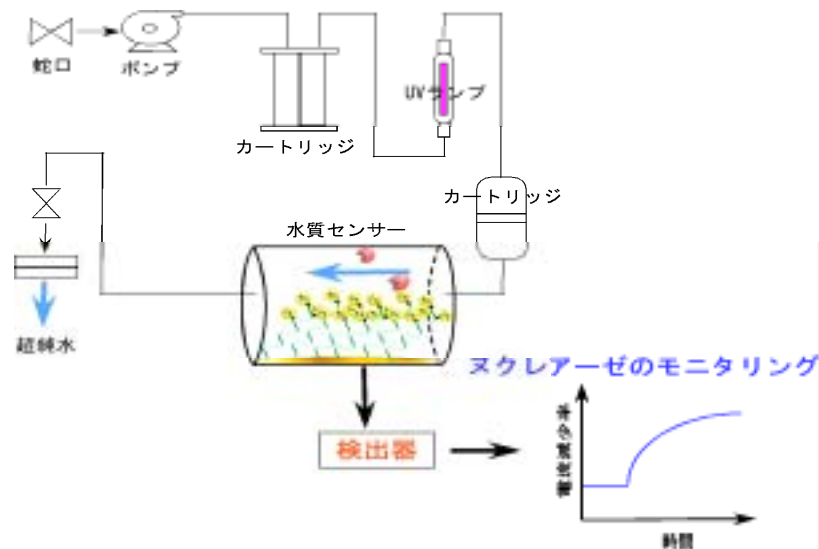


Figure 5-1. Represent RNase monitoring flow system furnished with MilliQ system

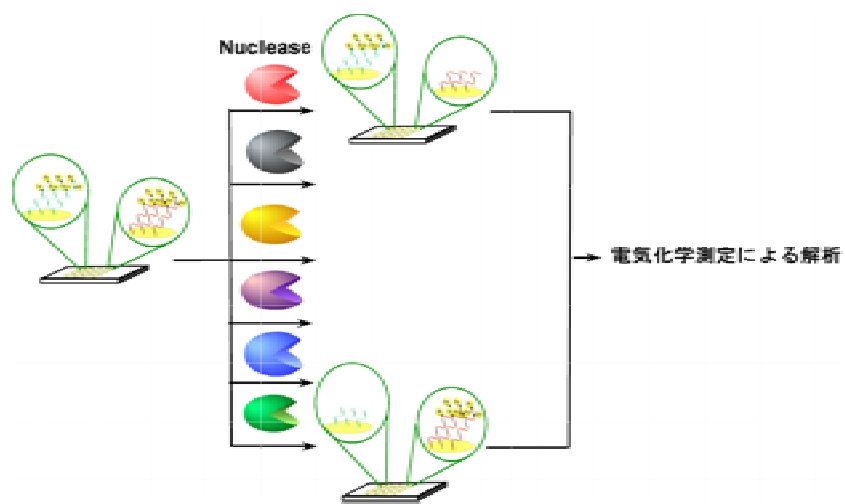


Figure 5-2. Multi nuclease detecting system.

本研究を行うにあたり、ご指導いただきました九州工業大学工学研究院 竹中 繁織 教授に深く感謝いたします。

また本論文の作成にあたり、適切なお助言を賜りました、九州工業大学工学研究院 吉永 耕二 教授、横野 照尚 教授、清水 陽一 教授、西野 憲和 教授に熱く御礼申し上げます。

東京大学 生産研究所 野島 高彦 助教には本研究に適切な示唆をいただきました。九州工業大学 佐藤しのぶ氏には、本実験における適切なお指導・ご助言をいただきました。

片倉 直子 氏、柴田 美香 氏は、私が大学に通えない時間に、アシスタントとして、本実験における有用な実験データを出していただきました。

九州工業大学在籍時に、棕本 晃介 氏が道筋をつけたフェロセン化カルボジイミドがなければ、本研究は成り立ちませんでした。また九州工業大学在籍時の藤田 克也 氏にはフェロセン化オリゴヌクレオチドの実験において多くの示唆をいただきました。これら、竹中研究室の皆様に心から感謝したいと思います。

最後に、亡き父 金沢 璣泰、この 3 年間励まし続けてくれた 母 桂子、快く博士課程への挑戦を承諾し、家庭を支えてくれた 妻 たまみ、千智、莉子、滯の 3 人の娘達に心から感謝いたします。ありがとうございました。

平成 21 年 3 月

金沢 旬宣