

総合論文

超分子形成を利用した電気化学的遺伝子検出

佐藤しのぶ¹, 竹中 繁織^{®1}

電気化学を利用した遺伝子検出法は、簡便かつ迅速な測定法を提供できるとともに装置のコンパクト化が容易であるという理由から注目されている。電気化学的デオキシリボ核酸 (DNA) 検出試薬として開発したフェロセン化ナフタレンジイミド (FND) は2本鎖 DNA と縫い込み型で結合し、シュードカテナン構造を形成することによって、2本鎖 DNA と安定な複合体を形成する。この性質をプローブ DNA 固定化電極と組み合わせることによって目的遺伝子の電気化学的検出に成功した。FND またはその誘導体を用いた電気化学的遺伝子検出のさらなる高性能化を図るために、超分子形成可能な FND 誘導体を新たに構築した。ここでは、これまで報告してきた超分子形成を利用した DNA または DNA 関連酵素の電気化学的検出技術について報告する。

1 緒 言

遺伝子検出は、特に医療分野、たとえばインフルエンザ¹⁾や肝炎ウイルス²⁾の感染の有無、薬剤への感受性 (副作用の有無)³⁾等において利用されている。このような遺伝子検出には蛍光検出システムが利用されてきた^{1)~3)}。これまでに蛍光色素を修飾したデオキシリボ核酸 (DNA) が開発されてきており、目的遺伝子の存在によって蛍光変化を示す分子設計が行われている。これに対し、2本鎖 DNA に結合し蛍光特性の変化する色素は、2本鎖 DNA のより一般的な検出法として古くから発展している。現在、多用されているリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) においては、増幅された PCR 産物の検出に2本鎖 DNA 結合すると蛍光増大が観察される蛍光色素が利用されている⁴⁾。この目的のためにこれまでエチジウムプロマイド⁵⁾やピコグリーン⁶⁾、サイバークリーン⁷⁾など色調の異なる蛍光色素の例が報告されている。また、2本鎖 DNA の高感度検出ができると、より早期での DNA 診断が可能になると期待されることからさらなる高感度化を目指し、様々な特性をもつ蛍光色素が多く報告されている。蛍光色素の場合、2本鎖 DNA に対する強い結合能を有することに加え、DNA 非存在下や1本鎖 DNA 存在下における蛍光 (back ground 蛍光) を抑制するアプローチによって高感度化が図られている⁷⁾。

一方、電気化学的手法は迅速かつ簡便な測定手法であること、装置の小型化が容易であること、サンプルに沈殿物が含まれていても測定に影響を受けないことなどから発展

してきている⁸⁾⁹⁾。これまで電気化学的遺伝子検出法では DNA プローブ修飾電極と電気化学活性 DNA リガンドを利用した不均一な環境での測定が数多く報告されている。すなわち電気化学活性 DNA リガンドは電極近傍に存在する2本鎖 DNA 上に濃縮されることから、2本鎖 DNA 形成情報を電気化学的シグナルとして読み出すことができ、これによって高感度検出が達成されてきている。

電気化学活性 DNA リガンドとしてはフェロセン化ナフタレンジイミド (FND)^{10)~16)}、メチレンブルー¹⁷⁾、ルテニウム錯体¹⁸⁾、オスニウム錯体¹⁹⁾²⁰⁾等多くのものが知られている。

著者らは電気化学的遺伝子検出試薬として FND 誘導体を開発してきた^{10)~16)}。FND7 の例を Fig. 1 A に示した。ナフタレンジイミド部位は2本鎖 DNA への結合部位であり、フェロセン部位は電気化学シグナル部位である。FND7 と2本鎖 DNA との複合体は疑似カテナンのような超分子構造を形成する。(Fig. 1 B, C) これによって、FND7 は2本鎖 DNA に対して高い結合能を示す。

FND 誘導体を利用した遺伝子検出のさらなる高精度化を図るために、著者らはフェロセンと β -シクロデキストリンによる超分子複合体形成を利用した遺伝子検出を開発してきた¹²⁾。本論文では超分子複合体形成というキーワードにおいて遺伝子検出と遺伝子検出を利用した応用に関連する成果について概説する。

2 縫い込み型インターカレータとは

インターカレータは DNA の塩基対間に並行挿入する分子であり、抗がん剤 (ノガラマイシン、アドリアマイシン) や DNA 検出試薬 (エチジウムプロマイド、メチレンブルー、ナフタレンジイミド) として利用されている²¹⁾。イ

[®] E-mail: shige@che.kyutech.ac.jp

¹ 九州工業大学大学院工学研究院物質工学研究系: 804-8550 福岡県北九州市戸畑区仙水町 1-1

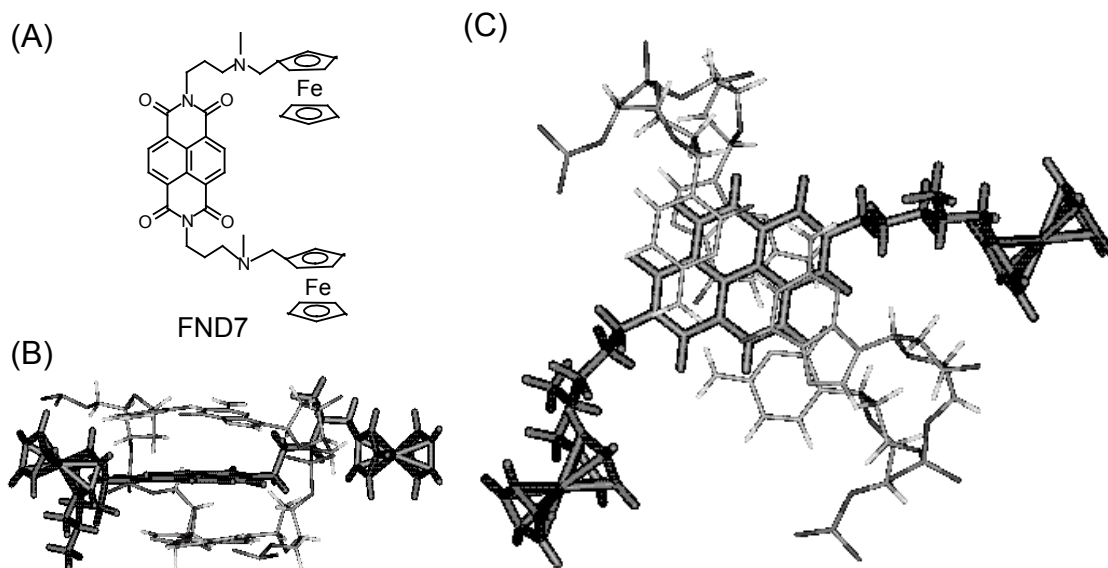


Fig. 1 (A) Chemical structure of one naphthalene diimide derivative, FND7, and (B) top and (C) side views of the computer modelling of the threading intercalation complex of the naphthalene diimide with dimeric dinucleotide

インターカレータのうち、エチジウムブロマイドやメチレンブルーは、古典的インターカレータと呼ばれており、これに対しノガラマイシンやナフタレンジイミドは2本鎖DNAに結合した際に置換基が主溝と副溝に位置することから縫い込み型インターカレータと呼ばれている。縫い込み型インターカレータであるナフタレンジイミド²¹⁾と2本鎖DNAとの複合体をFig. 1 B, Cに示す。この複合体は、疑似カテナン構造を形成することによって古典的インターカレータに比べると、2本鎖DNAからの解離が非常に遅い。実際に、エチジウムブロマイドに比べ、縫い込み型であるナフタレンジイミドはおよそ135倍遅い解離速度定数を有する²¹⁾。しかし、このような効果は1本鎖DNAに対しては見られない。つまり、縫い込み型インターカレータは2本鎖DNA選択的に、2本鎖DNAと安定な複合体を形成する。

著者らは縫い込み型インターカレータとして、FNDを利用した電気化学的遺伝子検出法を開発してきた^{10)~16)}。これは、2本鎖DNA選択的に縫い込み型インターカレータとする。著者らは、プローブDNA固定化電極を利用したFND based hybridization assay (FHA) について検討を行ってきた。フェロセン化ナフタレンジイミド誘導体の一つであるFND7 (Fig. 2 A) を利用した遺伝子検出法の概念をFig. 2 Bに示す。ターゲットDNAが電極上のプローブDNAとハイブリダイゼーションすると、FND7が電極近傍の2本鎖DNA領域に結合するため、大きな電流値が観察される。これによって目的遺伝子を検出することができる。これまでに同様の検出原理によって様々なFND誘導体を利用して、

動脈硬化に関連するリボタンパクリパーゼ遺伝子の一塩基多型 (SNPs) 検出¹⁶⁾、抗がん剤塩酸イリノテカンの副作用に関連するSNPs検出¹²⁾、がん抑制遺伝子であるp53遺伝子のSNPs検出¹³⁾、癌のマーカーとしての異常メチル化遺伝子p16遺伝子¹⁴⁾、及びカドヘリン4 (CDH4) 遺伝子¹⁵⁾の検出を試み、これらの遺伝子検出に成功している。遺伝子検出法を確立する過程で、著者らはハイブリダイゼーション挙動の電気化学的解析を行った¹⁵⁾。プローブDNA固定化電極に対して、ターゲットDNAのハイブリダイゼーション前後で50 μM ヘキサアンミンルテニウム錯体、10 mM Tris-HCl (pH 7.4) 溶液でクロノクーロメトリー測定を行い、Tarlovら手法を利用した電極上のDNA量を定量した¹⁸⁾。まず、 $0.5 \sim 6.0 \times 10^{12} \text{ molecules cm}^{-2}$ の密度を有する24 merのプローブDNA固定化電極を調整した。これに対して、フルマッチ2本鎖を形成しうる24 merのオリゴヌクレオチドターゲットを作用させた。ハイブリダイゼーション効率は $1.0 \times 10^{12} \text{ molecules cm}^{-2}$ 以下 (理論的なプローブ間距離は10 nm以上) の固定化密度で100%となった¹⁵⁾。しかし、固定化密度の増加に伴いハイブリダイゼーション効率は低下し、 $2.0 \times 10^{12} \text{ molecules cm}^{-2}$ 以上では60%まで低下した。このとき理論的プローブ間距離は7 nm以下であり、電極上の固定化プローブが混み合っているために、ハイブリダイゼーション効率が低下したと思われる。これに対して121 merのPCR産物を作用させたところ、 $1.0 \sim 6.0 \times 10^{12} \text{ molecules cm}^{-2}$ の領域で、ハイブリダイゼーション効率はわずかに20%以下であった。用いたPCR産物のターゲット領域は121 merの中間

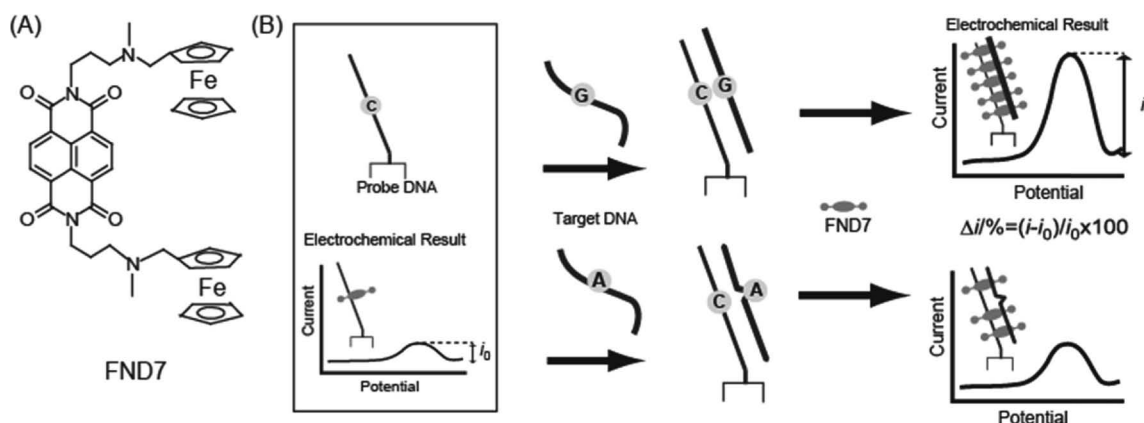


Fig. 2 (A) Chemical structures of Ferrocenylnaphthalene diimide (FND) and (B) the principle of the FND7-based electrochemical hybridization assay (FHA)

に位置するため、立体障害のために、ハイブリ効率低下したと思われる。

同様に調製した電極に対して、20 μM FND7, 0.1 M 酢酸カリウム緩衝液 (AcOK-AcOH), 0.1 M KCl (pH 5.5) による検出を試みた。FND 誘導体は弱酸性条件下でなければ溶解しないため、pH 5.5 の AcOK-AcOH 緩衝液を用いた。オリゴヌクレオチド、PCR 産物ともに 60~100 % 程度の高い電流増加率を示した。このとき、プローブ DNA 固定化電極はターゲット DNA と電極上で 2 本鎖 DNA を形成しており、ここに FND7 が濃縮されるため、電流増加が観察されたと思われる。これに対し、非相補鎖である 124 mer の DNA を作用させたところ、クロノクロメトリーによるハイブリダイゼーション効率は見かけ上 20 % 程度であると示された。しかし、FND7 を用いた場合は、電流増加は観察されなかった。この結果より、非相補鎖は非特異的に電極表面に吸着しており、電極上でミスマッチ 2 本鎖を形成していないと推定される。このような場合、FND7 は電極近傍には濃縮されないため、電流増加が見られなかったと思われる。

遺伝子上の異常メチル化が大腸癌と関連している CDH4 遺伝子の検出では亜硫酸処理されたゲノム由来の PCR 産物の検出を試みた（この操作によってメチル化されていないシトシンはチミンに変換される）。その結果、PCR 産物のハイブリダイゼーション効率は低いにもかかわらず、FHA において、0.5 ng μL^{-1} の PCR 産物の検出に成功した。さらに、電気化学応答はサンプルのシーケンスをほぼ正確に反映していることを明らかにした¹⁵⁾。

3 電極上の複合体のさらなる安定化の試み

Fig. 2 に示す様に、FHA はプローブ DNA 固定化電極に対して、ターゲット DNA のハイブリダイゼーション前後で測定を行う。ハイブリダイゼーション前は 1 本鎖 DNA、

ハイブリダイゼーション後は 2 本鎖 DNA となっている。そのため 1 本鎖 DNA/2 本鎖 DNA 識別能の向上を FND-2 本鎖 DNA 複合体のさらなる安定化によって実現することを試みた。この戦略としてフェロセンと β -シクロデキストリン (CD) による超分子複合体形成を利用した。フェロセンは、 α -, β -, γ -CD と包接錯体を形成する²²⁾。特にフェロセンと β -CD は 1:1 の錯体を形成し、その結合定数は 2200 M^{-1} である²²⁾。そこで、Fig. 3 に示すような β -CD-FND7-DNA 複合体形成による遺伝子検出を試みた¹²⁾。 β -CD 存在下での FND7 の DNA に対する結合定数を算出したところ、 $6.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。これは、 β -CD 非存在下のときの 2 倍であった。速度論パラメーターの算出より、解離速度定数が β -CD 非存在下のときの 2 分の 1 になっていたことから、 β -CD は解離過程で効果的に働いていることが示され、 β -CD によって FND-2 本鎖 DNA 複合体が安定化されていることが示された。次に、50 μM FND7, 0.1 M AcOK-AcOH, 0.1 M KCl 溶液中で、2 本鎖 DNA 修飾電極に対して、 β -CD を添加したところ、酸化電流の低下及び電位の正側シフトを観察した。FND7 の酸化還元電位の差、 ΔE_p は、 $\Delta E_p = 21 \text{ mV}$ であり、この結果は FND が電極表面に吸着したことを示している。すなわち、電極上の 2 本鎖 DNA に FND7 がインターカレートし、 β -CD との三元錯体を電極上で形成していることが示された。そこで、本系による電気化学遺伝子検出を試みた。24 mer のプローブ DNA 固定化電極に対して、24 mer の相補的なターゲット DNA を作用させた。電解液として、800 μM β -CD, 50 μM FND7, 0.1 M AcOK-AcOH, 0.1 M KCl 溶液を用いた。その結果を Fig. 4 に示す。ハイブリダイゼーション前後での応答は、0.5 μA , 1.2 μA となり、電流増加率は 140 % となった。 β -CD 非存在下で同様の実験を行ったところ、2.2 μA , 3.9 μA であり、電流増加率は 80 % であった。

これより本システムによりターゲット DNA の検出識別

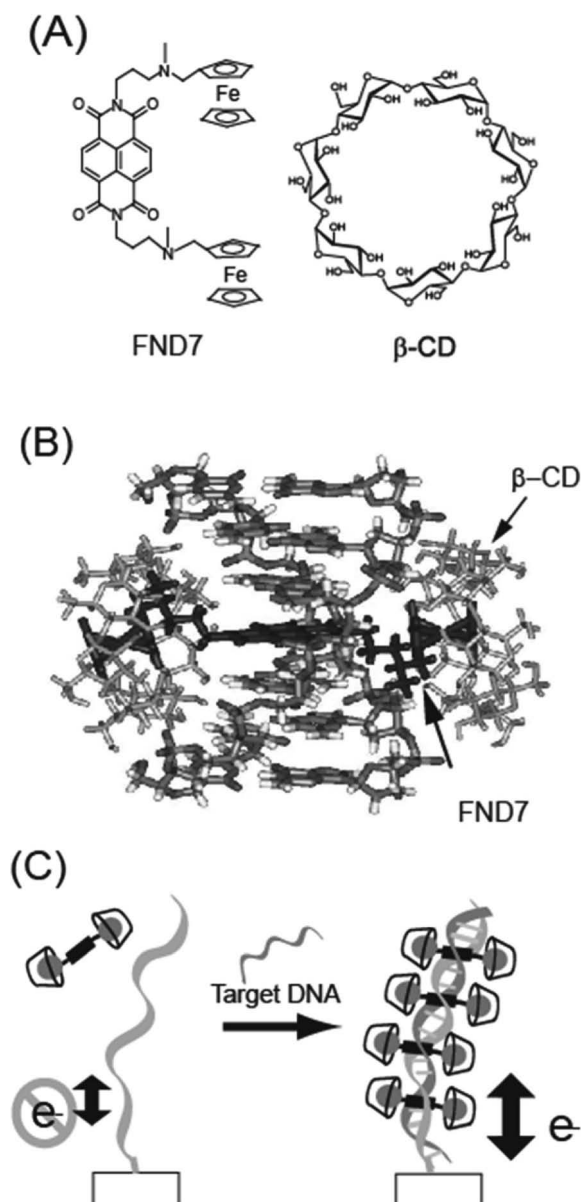


Fig. 3 (A) Chemical structures of FND7 and β -CD, (B) computer modelling of a complex of FND7, dsDNA and β -CD, and (C) the principle of DNA detection by using FND7 and β -CD

能を向上させることができた。しかし、これはハイブリダイゼーション前の、1本鎖応答の抑制によるところが大きかった。ハイブリダイゼーション後、2本鎖DNA固定化電極での応答は、FND7のフェロセンが β -CDに包接されるため、フェロセン部の応答電流が減少された。そこで、錯体形成後、電流増加型のシステムを構築するために、フェロセン化 β -CDとアダマンチル化ナフタレンジイミドを利用した。

4 フェロセン化 β -CDとアダマンチル化ナフタレンジイミドの利用

アダマンタンは β -CDのよいゲストとして知られており、

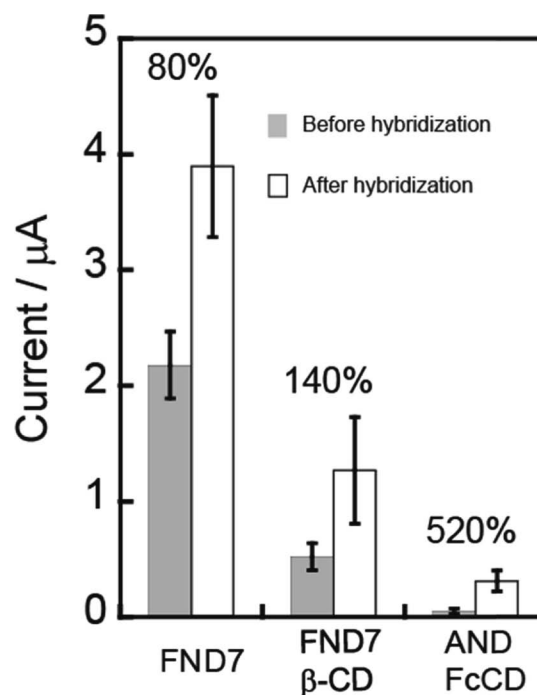


Fig. 4 Obtained peak currents before and after hybridization of 24-meric DNA probe-modified electrodes with its complementary DNA in the case of FND7, FND7- β -CD, and AND-FcCD systems

アダマンタンと β -CDの結合定数は、 10^5 M^{-1} であることを利用する²³⁾。フェロセン修飾シクロデキストリン (FcCD) は、それ単独で存在するときはフェロセンがシクロデキストリンに包接されているため、電流を抑制する²⁴⁾。しかしアダマンタンを添加すると、アダマンタンがCDに包接されるため、フェロセンはCDから飛び出す。そこで、2本鎖DNAに縫込み型で結合するアダマンチル化ナフタレンジイミド (AND)、FcCDによる遺伝子検出を構築した²⁵⁾。Fig. 5に示す様に、上述の原理によって、プローブDNA固定化電極がハイブリダイゼーションによってターゲットと2本鎖DNAを形成したとき、電極上でAND-FcCD-2本鎖DNAによる超分子複合体が形成され、電流増加によって目的遺伝子を検出することができる。ANDの2本鎖DNAに対する結合定数は $2.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であった。これは、FNDのときと同じく、 β -CD非存在下のときの2倍であった。また、CDスペクトル測定においてFcCDが単独で存在するとき、450 nmに正の誘起CDが観察されたことより、分子内で包接体を形成していることが示唆された。ここに、ANDを添加したところ、450 nmの正の誘起CDが消失したことから、ANDとFcCDが複合体を形成することが分かった。そこで、電気化学測定によって遺伝子検出を試みた。電解液として、50 μM AND、100 μM FcCD、0.1 M AcOK-AcOH、0.1 M KCl溶液を用いて、24 merのプローブDNA固定化電極に対して、24 merのターゲット

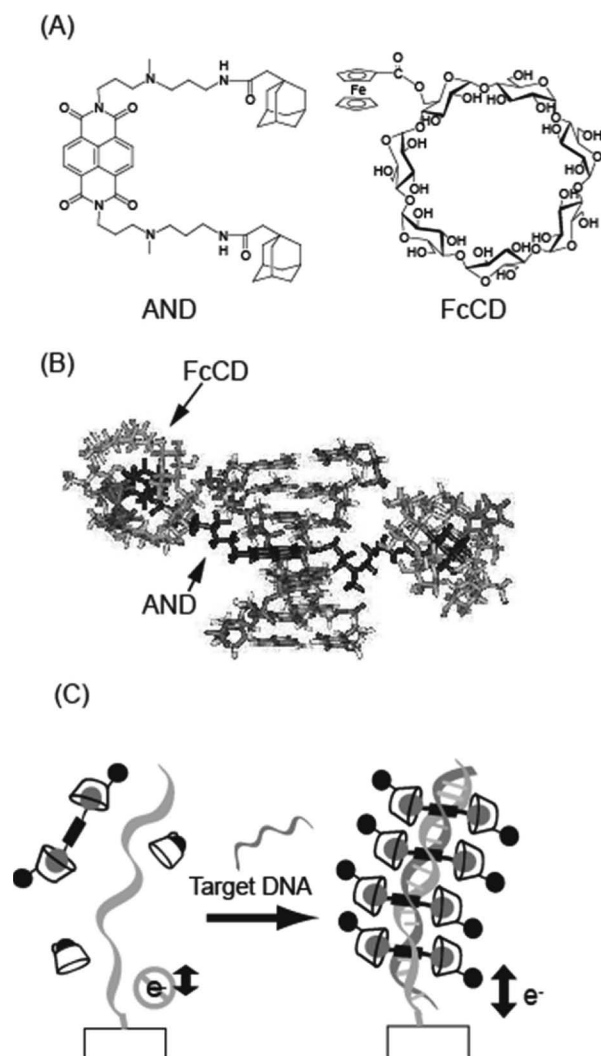


Fig. 5 (A) Chemical structures of AND and FcCD, (B) computer modelling of a complex of AND, dsDNA and FcCD, and (C) the principle of DNA detection by using AND-FcCD

DNAをハイブリさせた前後での応答を観察したところ、それぞれ 50 nA, 310 nA となり、電流増加率は 520 % となった (Fig. 4)。

5 チオクト酸を有するナフタレンジイミドによる DNA ホッチキス

著者らは電気化学的遺伝子検出のため、DNAをより簡便に基板に固定化する技術として、チオクト酸を有するナフタレンジイミド、*N,N'*-Bis[[4-(3-[1,2]dithiolan-3-ylbutyl)-aminopropyl]piperazinyl]propyl]-naphthalene-1,4,5,8-tetracarboxylic acid diimide (NDIss) の分子ホッチキスの可能性について検討した²⁶⁾。本システムは 2 本鎖 DNA に縫い込み型インターカレートされた NDIss と金表面とで形成された超分子複合体と見なせる。これによって NDIss により 2 本鎖 DNA を選択的に金表面に固定化することができ

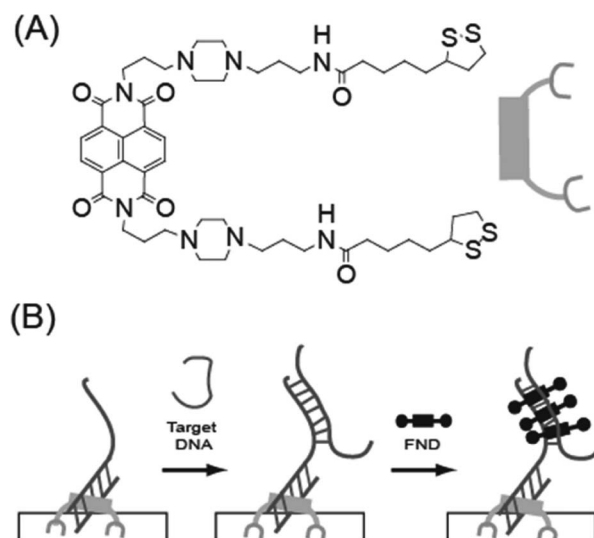


Fig. 6 (A) Chemical structure of NDIss and (B) the principle of DNA detection using probe DNA immobilized by NDIss on the electrode and FND

る。NDIss によって固定化したプローブ DNA による FHA の概念を Fig. 6 に示す。1 本鎖領域と 2 本鎖領域を有するプローブ 2 本鎖 DNA は、2 本鎖 DNA にインターカレート結合した NDIss によってトポロジ的に固定化される。NDIss は 2 本鎖 DNA に選択的に結合するため、1 本鎖 DNA 領域をプローブ領域として利用する。そこで、NDIss-プローブ 2 本鎖 DNA 固定化電極による DNA 検出について検討した。NDIss-プローブ 2 本鎖 DNA 固定化電極のプローブ DNA の固定化密度が 8×10^{12} molecules cm^{-2} のとき、ターゲット DNA のハイブリ効率、92 % であった。チオール化 DNA 固定化電極で同様の固定化密度のとき、ハイブリダイゼーション効率は 10 ~ 50 % 程度であるため¹⁸⁾、ハイブリダイゼーション効率の向上に成功した。この理由として、さらに、電極上に固定化された 2 本鎖 DNA 部分が電極表面とのスペーサーとして働いている可能性や DNA の固定化の配向が関係しているのではないかと考えている。NDIss によって固定化された DNA は金表面に対して、平行に固定化されているが、チオール化 DNA は垂直に固定化されている。後者の場合、固定化密度が高くなるほどに、静電的反発や立体障害によりハイブリダイゼーション効率は低下することが知られている。NDIss-プローブ 2 本鎖 DNA 固定化電極では、あらかじめ DNA が横たわっているために、このような障害を受けずにハイブリダイゼーション効率が低下しなかったと思われる。NDIss-プローブ 2 本鎖 DNA 固定化電極による FHA を行った結果を Fig. 7 に示す。プローブ 2 本鎖 DNA は 24 mer の 1 本鎖 DNA 領域 (プローブ領域) を有する。これに対して、124 mer のターゲット DNA を作用させた。同じ 24 mer のプローブ領域を有するチオール化 DNA も同様に検討し

た。電解液として、50 μ M FND, 0.1 M AcOK-AcOH, 0.1 M KCl 溶液を用いた。その結果, NDIss を利用した場合, 電流増加率は 370 % であり, 従来のチオール化 DNA 固定化電極では 300 % であった²⁶⁾。この違いはハイブリダイゼーション効率を反映した結果であると思われる。

6 DNA 固定化電極を利用したタンパク質の検出

現在, 核酸 [DNA またはリボ核酸 (RNA)] を基質とするタンパク質の異常は疾病に関連することが知られており, 疾病の早期診断という目的でタンパク質の検出も重要視されている。これら核酸関連タンパク質については, DNA または RNA 固定化電極を利用することで, タンパク質を検出することができると考え, これらの電気化学的検

出法を発展させた。これまでに核酸切断酵素であるヌクレアーゼ^{27)~29)}, DNA 伸長酵素であるテロメラーゼ^{30)~33)}をターゲットとした検出システムの構築を実現している。

ヌクレアーゼの一つであるリボヌクレアーゼ (RNase) A は膀胱癌の患者では血清中の RNase A 濃度が増大すること, デオキシリボヌクレアーゼ (DNase) I は急性心筋梗塞で血清中の濃度が大きく変化することが知られている。そこで, DNA または RNA 固定化電極 FND を用いた DNase I²⁷⁾²⁸⁾, RNase A²⁹⁾の電気化学的検出システムの構築に成功した。

また, テロメラーゼはがん細胞で特異的に発現しているタンパク質であり, 癌の早期診断の観点から注目されている³⁴⁾。そこで電気化学的手法によってその活性を検出する手法である electrochemical telomerase assay (ECTA) 法を構築した^{30)~32)}。検出原理を Fig. 8 に示す。著者らは 4 本鎖 DNA に対して結合能が高い FND 誘導体である FND3 を見だし, これを利用してテロメラーゼによって伸長された DNA の検出を試みた。伸長された DNA は 4 本鎖構造を形成し, これに FND3 が結合することで, 電流増加としてテロメラーゼ活性を検出することができる。

これまでに口腔がん患者 (九州歯科大学) から提供されたサンプルのテロメラーゼ活性の検出を達成した³¹⁾³²⁾。健康者と癌患者由来のサンプルについて ECTA 法によって検討した結果, がん患者由来の臨床サンプルのテロメラーゼ活性を検出することに成功した。がん組織由来のサンプルだけでなく, 口腔内全体からスポンジで採取した細胞サンプルと口腔がん部位をブラシで擦って採取した細胞サンプルにおいて, ECTA 法を利用することで 80 % 以上という高い正診断率でテロメラーゼを検出することができた。さらに 56 サンプルについてブラインドテストを行ったところ, 80 % 以上の正診断率を得ることができた³²⁾。この口腔内全体から採取された細胞の採取方法は侵襲性が低いため, 本手法を用いることで, 口腔がんの早期発見が期待できる。

ECTA 法の発展として, 抗がん剤のスクリーニングへの適用を試みた。テロメラーゼにより伸長された DNA は, アルカリ金属, 及びアルカリ土類金属存在下では, 4 本鎖

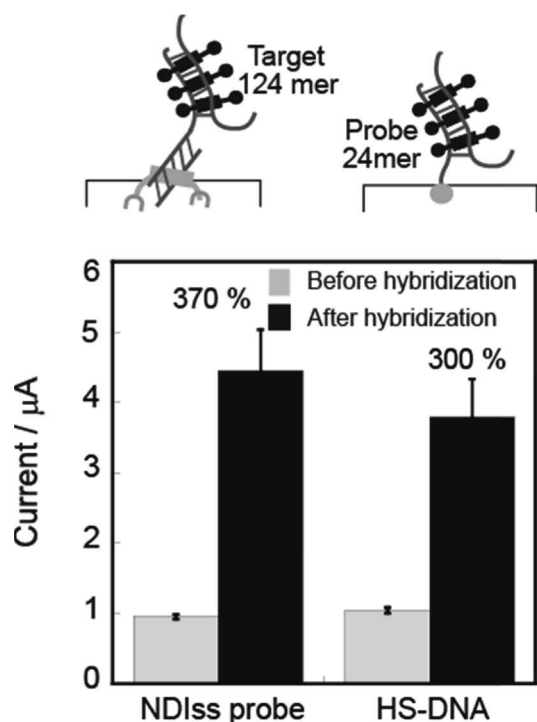


Fig. 7 Obtained peak currents before and after hybridization with complementary DNA in the case of the DNA probe-modified electrode by NDIss or the thiolated DNA probe (HS-DNA)-modified electrode

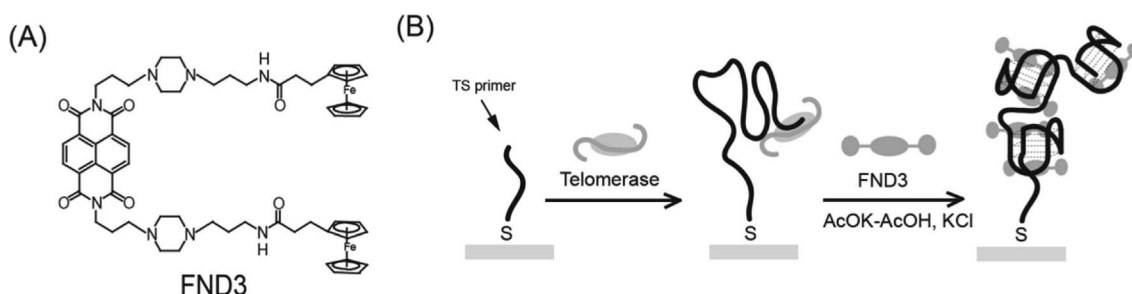


Fig. 8 (A) Principle of an electrochemical telomerase assay (ECTA) using FND3 and (B) chemical structure of the FND derivative in ECTA

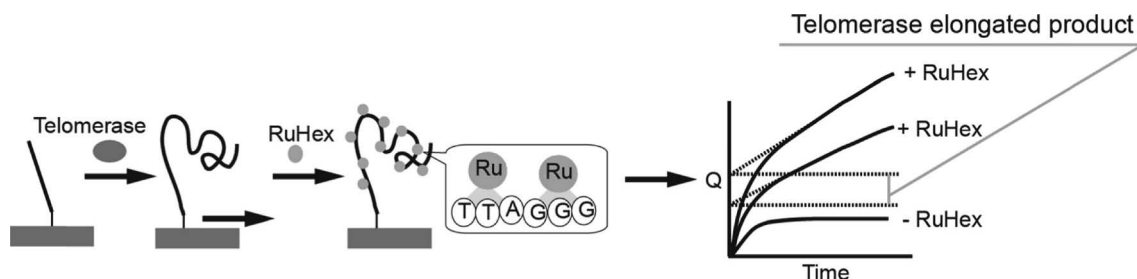


Fig. 9 Electrochemical telomerase assay based on chronocoulometry with RuHex

DNA 構造を形成する。4 本鎖 DNA と相互作用し、4 本鎖 DNA 構造を安定化する化合物は、テロメラーゼの働きを阻害するため、抗がん剤として期待されている。抗がん剤は、2 本鎖 DNA に結合するものが多く、PCR が必須である従来のテロメラーゼ活性測定法である telomerase repeat amplification protocol (TRAP) 法ではテロメラーゼ阻害能を評価することができない。電気化学的手法は TRAP 法と比べ、PCR を行うことなくテロメラーゼを検出することができる。これらの事実を踏まえ、新規な抗がん剤スクリーニング法を考案した³³⁾。Fig. 9 に検出原理を示す。電気化学活性 DNA リガンドとしてヘキサアンミンルテニウム錯体を用い、クロノクーロメトリー測定を利用することで、電極上の DNA 量を定量化することができる。テロメラーゼによる伸長量を数値化できるため、阻害剤の影響を伸長量で判断することができる。10 種類の化合物について本システムを適用した結果を Fig. 10 に示す。トリスナフタレンジイミド (TND)、FND3、ポルフィリン (TMPyP4)、Inhibitor III は、伸長が (TTAGGG)₅ で停止していることから、4 本鎖 DNA 構造形成後にテロメラーゼの働きが阻害されていると推察される。ペリレンジイミド (PIPER)、Inhibitor V については、(TTAGGG)₄ 以下でテロメラーゼ阻害が観察されていることから、これらはテロメラーゼ自身に作用していると推察される。これによって、従来法では困難であったテロメラーゼによる阻害メカニズムの解明を実現した。

7 分子内にフェロセンと β -CD を持つナフタレンジイミド

これまで DNA 修飾電極を利用する不均一系での電気化学的 DNA または DNA 関連酵素の検出を述べてきたが、ここでは著者らが開発した均一系でのシグナルオン型 2 本鎖 DNA 検出法について述べる。これまでに、均一溶液中での電気化学的リアルタイム DNA 検出がいくつか報告されている^{35)~37)}。これらは電気化学活性なインターカレータが DNA に結合したときに、拡散速度が低下すること、すなわち電流が減少することを利用したシグナルオフ型の DNA 検出であった。著者らは、フェロセンと β -CD による相互

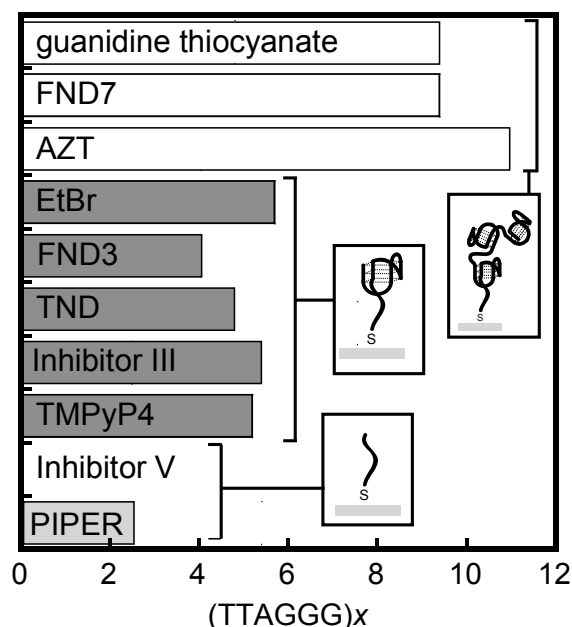


Fig. 10 Telomerase inhibition assay by a RuHex based chronocoulometry technique performed with 2.5 μ M of each Inhibitor III, V, TMPyP4, PIPER, AZT, guanidine thiocyanate, EtBr, FND3, FND6 or TND in the presence of 25-cell extracts at 37 $^{\circ}$ C for 30 min

作用を利用することによる均一溶液中におけるシグナルオン型電気化学的遺伝子検出を試みた。Fig. 11 にその概念を示す³⁸⁾。フェロセンと β -CD を有するナフタレンジイミド (FNC) は、単独で存在するときは、フェロセンが β -CD に包接されることによって、その電気化学応答が抑制されている。しかし、2 本鎖 DNA が存在すると、FNC は 2 本鎖 DNA に結合し、フェロセンは β -CD から飛び出す。これによって DNA が存在するときのみ、電流増加が観察されると期待される。UV-Vis スペクトル測定によって、FNC が 2 本鎖 DNA に $8.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ で結合することが確認された。また、CD スペクトル測定によって、FNC は 2 本鎖 DNA に対してインターカレートモードで結合することが明らかになった。電気化学測定では、FNC は DNA 非存在下、存在化において、それぞれ 420 mV、320 mV に還元ピークを示した。DNA の添加に伴い、420 mV の電流は減少し、320 mV の電流は増加した。420 mV の電流は、フェロセン-

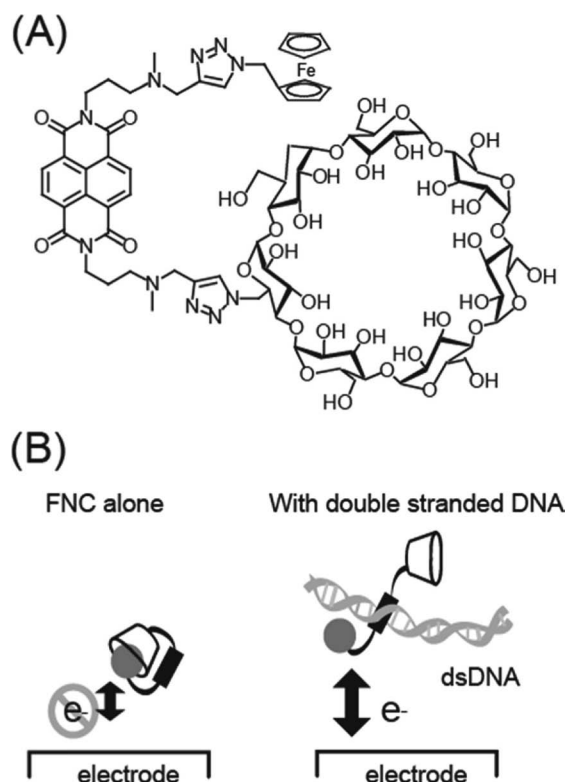


Fig. 11 (A) Chemical structure of ferrocenylnaphthalene diimide carrying β -CD, and FNC, and (B) the principle of "signal on"-type DNA detection using FNC in a homogenous solution

β -CD 複合体由来, 320 mV の電流はフェロセン単独の電流に由来する。これより, 320 mV の電流を観察することで, シグナルオン型で遺伝子検出を達成することができた。PCR 産物の検出を試みたところ, 検出下限 26 nM を達成した。

また, 原子間力顕微鏡 (AFM) 測定によって, DNA に対して, FNC が過剰に存在するとき, DNA の凝集体が観察され, 分子間包接体を形成していることが示された。興味深いことに, この凝集体は, アダマンタンの添加によって解消される。この結果は, まさに DNA 上で超分子集合体の形成を示唆している。

8 結 言

電気化学的遺伝子検出は DNA 検出だけでなくタンパク質の検出にも利用できる将来有望な手法であり, PCR 産物の検出や臨床サンプルからテロメラーゼの活性検出を達成しており, 実用化は近いと思われる。ここでは, 電気化学的遺伝子検出の中でも特に超分子複合体形成を利用した検出を中心に述べた。フェロセンと β -CD による超分子複合体は, 包接に伴い電気化学的挙動が変化するため, 非常に興味深い材料である。これまで, 超分子を利用した遺伝子検出例は, 本稿で紹介したもの他に, いくつか報告さ

れている。熊本大学の井原らは, 2 種類のプローブを用意し, それぞれの末端にフェロセンと, β -CD を修飾している³⁹⁾。これら 2 種類のプローブは, ターゲット DNA とハイブリダイズしたときに, フェロセンと β -CD が近づくように設計されている。このシステムでは, ターゲットが目的のものであるときのみ, 電流現象が観察される。また, 産業技術総合研究所の青木らは, プローブの両末端にそれぞれフェロセンと β -CD を修飾したものをプローブとして用いている。著者らが構築した FNC と同様に, プローブ単独ではシグナルが小さいが, ターゲットとハイブリダイゼーションすると電流増加が観察される⁴⁰⁾。これらは, 共に均一溶液中でのアッセイであり, 電気化学的遺伝子検出は, 現在, 固定化系から均一溶液中での分析に移りつつある。このなかでも均一溶液中でのリアルタイム DNA 検出についての研究が報告されている^{35)~37)}。これらはほとんどがシグナルオフ型の遺伝子検出である。これをシグナルオン型に変えることができれば, さらなる感度上昇が達成できると期待される。シグナルオン型の遺伝子検出のために, フェロセンと β -CD を利用した FNC を設計・合成したところ, 概念どおりに DNA を検出可能なことを確認することができた。FNC 過剰な条件下では FNC 自身による分子間相互作用等が観察され, まだまだ検討課題が多いものの, 超分子複合体形成の利用は今後新たな遺伝子検出法を確立するための有益な方針を与えるものと期待される。

文 献

- 1) T. J. Falla, D. W. M. Crook, L. N. Brophy, D. Maskell, J. S. Kroll, E. R. Moxon : *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2382 (1994).
- 2) H. Okamoto, H. Tokita, M. Sakamoto, M. Horikita, M. Kojima, H. Iizuka, S. Mishiro : *J. Gen. Virol.*, **74**, 2385 (1993).
- 3) F. Innocenti, L. Iyer, M. J. Ratain : *Am. Soc. Drug Metabol. Dispos.*, **29**, 596 (2001).
- 4) M. W. Pfaff : *Nucleic Acids Res.*, **29**, e45 (2001).
- 5) M. G. Murray, E. F. Thompson : *Nucleic Acid Res.*, **8**, 4321 (1980).
- 6) V. L. Singer, L. J. Jones, S. T. Yue, R. P. Haugland : *Anal. Biochem.*, **249**, 228 (1997).
- 7) K. Mizuki, Y. Sakakibara, H. Ueyama, T. Nojima, M. Waki, S. Takenaka : *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 578 (2005).
- 8) X. Luo, I.-M. Hsing : *Analyst*, **134**, 1941 (2009).
- 9) N. J. Ronkainen, H. B. Halsall, W. R. Heineman : *Chem. Soc. Rev.*, **39**, 1747 (2010).
- 10) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo : *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 11) S. Sato, S. Takenaka : *J. Organomet. Chem.*, **693**, 1177 (2008).
- 12) S. Sato, T. Nojima, M. Waki, S. Takenaka : *Molecules*, **10**, 693 (2005).
- 13) H. Miyahara, K. Yamashita, M. Kanai, K. Uchida, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka : *Talanta*, **56**, 829 (2002).

- 14) S. Sato, H. Kondo, K. Hokazono, T. Irie, T. Ueki, M. Waki, T. Nojima, S. Takenaka : *Anal. Chim. Acta*, **82**, 587 (2006).
- 15) S. Sato, M. Tsueda, Y. Kanazaki, S. Takenaka : *Anal. Chim. Acta*, **715**, 42 (2012).
- 16) K. Yamashita, A. Takagi, M. Takagi, H. Kondo, Y. Ikeda, S. Takenaka : *Bioconjugate Chem.*, **13**, 1193 (2002).
- 17) S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, M. G. Hill : *Bioconjugate Chem.*, **8**, 31 (1997).
- 18) A. B. Steel, T. M. Heme, M. J. Tarlov : *Anal. Chem.*, **70**, 4670 (1998).
- 19) T. W. Welch, H. H. Thorp : *J. Phys. Chem.*, **100**, 13829 (1996).
- 20) M. Fojta, P. Kostecká, M. Trefulka, L. Havran, E. Paleček : *Anal. Chem.*, **79**, 1022 (2007).
- 21) S. Takenaka, M. Takagi : *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **72**, 327 (1999).
- 22) T. Matsue, D. H. Evans, T. Osa, N. Kobayashi : *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 3411 (1985).
- 23) A. Ueno, O. Chen, I. Suzuki, T. Osa : *Anal. Chem.*, **64**, 1650 (1982).
- 24) I. Suzuki, Q. Chen, Y. Kashiwagi, T. Osa, A. Ueno : *Chem. Lett.*, **10**, 1719 (1993).
- 25) S. Sato, T. Nojima, S. Takenaka : *J. Organomet. Chem.*, **689**, 4722 (2004).
- 26) S. Sato, A. Hirano, S. Takenaka : *Anal. Chim. Acta*, **65**, 91 (2010).
- 27) S. Sato, K. Fujita, M. Kanazawa, K. Mukumoto, K. Ohtsuka, M. Waki, S. Takenaka : *Anal. Biochem.*, **381**, 233 (2008).
- 28) S. Sato, K. Fujita, M. Kanazawa, K. Mukumoto, K. Ohtsuka, S. Takenaka : *Anal. Chim. Acta*, **645**, 30 (2009).
- 29) M. Kanazawa, S. Sato, K. Ohtsuka, S. Takenaka : *Anal. Sci.*, **23**, 1415 (2007).
- 30) S. Sato, H. Kondo, T. Nojima, S. Takenaka : *Anal. Chem.*, **77**, 7304 (2005).
- 31) 佐藤しのぶ, 森久美子, 遠藤 浩, 兒玉正明, 土生学, 西原達次, 富永和宏, 竹中繁織 : 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **61**, 243 (2012).
- 32) K. Mori, S. Sato, M. Kodama, M. Habu, O. Takahashi, T. Nishihara, K. Tominaga, S. Takenaka : *Clin. Chem.*, **59**, 289 (2013).
- 33) S. Sato, S. Takenaka : *Anal. Chem.*, **84**, 1772 (2012).
- 34) X. Zhou, D. Xing : *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 4643 (2012).
- 35) T. Defever, M. Druft, D. Evrard, D. Marchal, B. Limoges : *Anal. Chem.*, **83**, 1915 (2011).
- 36) B. Y. Won, S. Shin, S. Beak, Y. L. Jung, T. Li, S. C. Shin, D.-Y. Cho, S. B. Lee, H. G. Park : *Analyst*, **136**, 1573 (2011).
- 37) K. Yamamura, M. Saito, K. Kondo, M. M. Hossain, R. Kotetsu, T. Saeki, T. Nagatani, K. Ikuta, E. Tamiya : *Analyst*, **136**, 2064 (2011).
- 38) S. Watanabe, S. Sato, K. Ohtsuka, S. Takenaka : *Anal. Chem.*, **83**, 7290 (2011).
- 39) T. Ihara, T. Wasano, R. Nakatake, P. Arslan, A. Futamura, A. Jyo : *Chem. Commun.*, **47**, 12388 (2011).
- 40) H. Aoki, A. Kitajima, H. Tao : *Supramol. Chem.*, **22**, 455 (2010).

Supramolecular Assembly for Electrochemical Gene Detection

Shinobu SATO¹ and Shigeori TAKENAKA^{®1}

[®] E-mail : shige@che.kyutech.ac.jp

¹ Department of Applied Chemistry, Kyushu Institute of Technology, 1-1, Sensui-cho, Tobata-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka 804-8550

(Received January 1, 2013; Accepted February 25, 2013)

Gene detection based on electrochemical techniques has been gaining much attention in recent years, not only because it provides simple and rapid methods for measurement and detection, but also for the easiness of downsizing the instrumentation. Ferrocenylnaphthalene diimide, which forms a pseudo-catenane complex with double-stranded DNA, has been developed to be used in an electrochemical detection system for double-stranded DNA coupled with a DNA probe-immobilized electrode. To improve the performance of electrochemical gene detection, FND or its derivatives, which can form a supramolecular complex, have been under development. Here, we review an electrochemical DNA or DNA-related enzyme detection technique based on supramolecular complex formation.

Keywords: electrochemical DNA detection; hybridization assay; threading intercalator; ferrocenylnaphthalene diimide; supramolecular chemistry.