

ノ ー ト

新規フェロセン化ナフタレンジイミドを用いる均一溶液中での シグナルオン型電気化学的 DNase I 検出

佐藤しのぶ^{1,2}, 福瀧 修司¹, 竹中 繁織^{*1,2}

1 緒 言

DNA や RNA を消化するヌクレアーゼは DNA の組み換え、修復、免疫システムの監視やゲノム編集に重要な役割を果たしている。このことから、ヌクレアーゼは薬剤のターゲットとして期待されている¹⁾²⁾。また、特に最近注目されているゲノム上の DNA を切断し、他の DNA を挿入するゲノム編集に利用される転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) や clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins (CRISPER-Cas 9) においてもヌクレアーゼが重要な役割を果たしている³⁾。さらに急性心筋梗塞ではデオキシリボヌクレアーゼ (Deoxyribonuclease, DNase) I の活性が著しく変化するため、DNase I は急性心筋梗塞のマーカーとして期待されているほか⁴⁾、全身性エリテマトーデスでもその活性が変化することが知られている⁵⁾。これらの診断や創薬目的のために、ヌクレアーゼの酵素活性を簡便に評価する方法が求められている。

これまで様々なヌクレアーゼの検出法が開発されている^{6)~13)}。例えば、核酸にインターカレーションする PicoGreen によってヌクレアーゼの活性を蛍光検出する方法が報告された⁷⁾。この手法では、均一溶液中で様々な酵素の基質特異性を調査するため、フルマッチ 2 本鎖 DNA や ミスマッチ 2 本鎖 DNA、DNA:RNA 2 本鎖をターゲットとしたときの酵素活性が簡便に調べられた。また、Au/Ag ナノ粒子のラマン分光を利用した細胞内のエンドヌクレアーゼの活性のイメージングも達成されている⁸⁾。細胞内イメージングが達成できれば、細胞内のヌクレアーゼ動態の解明が期待される。また、Cu ナノ粒子が DNA に集積することを利用した誘導結合プラズマ質量分析 (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, ICP-MS) によるエクソヌクレアーゼ III の検出も報告された⁹⁾。これらの分光学

的な手法だけでなく、電気化学的手法によるヌクレアーゼの活性検出法も試みられている。1 本鎖 DNA もしくは 2 本鎖固定化電極を調整し、ヌクレアーゼによる切断情報を DNA に結合する試薬等の結合量で検出する。例えば、Cu ナノ粒子は 2 本鎖 DNA に結合し、 -0.05 V (vs. SCE) において電流を示すことから、 -0.05 V の電流の大きさをヌクレアーゼの有無を検出できる¹⁰⁾。また、フェロセン¹¹⁾¹²⁾やメチレンブルー¹³⁾でプローブ DNA を修飾し、電極に固定化したセンサーでは、酵素でプローブ DNA が切断されると電流が減少する。電気化学的手法は高感度に酵素を検出することができるが、DNA 固定化電極を用いたシステムはいずれもシグナルオフ型の検出であり、さらなる感度向上を図るには制限もある。そこで新たにシグナルオン型の検出システムをここでは検討した。その概念を Fig. 1 に示す。フェロセン化ナフタレンジイミド (Ferrocenyl naphthalene diimide, FND) は 2 本鎖 DNA にインターカレートする^{14)~17)}。FND は 2 本鎖 DNA に結合すると、FND の見かけの分子量の増大に伴い、拡散速度が低下し、電流が抑制される。また、2 本鎖 DNA-FND 複合体の DNA が DNase I に切断されると、2 本鎖 DNA は 1 本鎖に解離しやすくなり、FND は 2 本鎖 DNA から解離する。これにより FND の電流が回復する。これまでに、FND のリンカー構造の違いによって、2 本鎖 DNA への結合能が異なることを明らかにしている¹⁷⁾。ヌクレアーゼ検出を目的とした場合、2 本鎖 DNA-FND 複合体がより安定であるほうが、酵素反応前の電流が抑制され、シグナルの増加はより大きくなると期待される。そこで、2 本鎖 DNA へより強く結合する新たな FND として、リンカー中にアラニンやリジンを含むペプチド型のフェロセン化ナフタレンジイミド **1**, **2** を設計した。これらはリンカー中のアラニンやリジンが 2 本鎖 DNA のリン酸と相互作用することを期待した。リンカー中のアミノ酸の効果を確認するため、すでに合成されていた FND として **3** を用いて、従来の FND と比較検討を行った。

2 実 験

2.1 試 薬

仔牛胸腺 DNA (calf thymus DNA, CT-DNA) は、過去

* 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

² 九州工業大学バイオマイクロセンシング技術研究センター: 804-8550 福岡県北九州市戸畑区仙水町 1-1

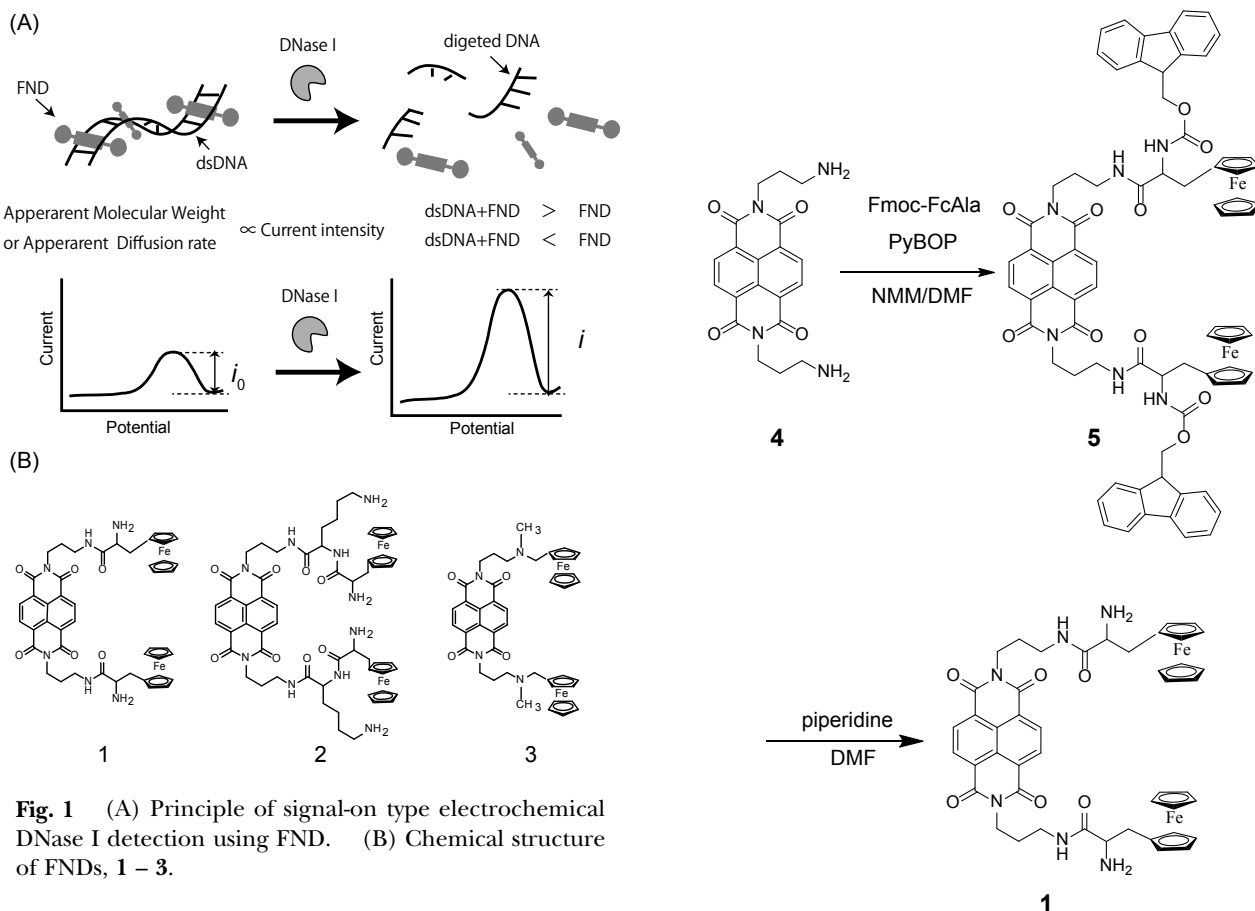
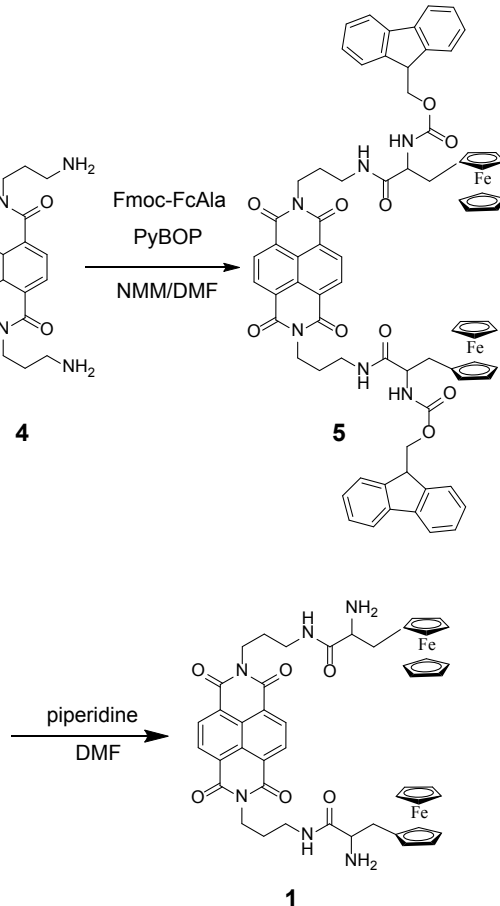


Fig. 1 (A) Principle of signal-on type electrochemical DNase I detection using FND. (B) Chemical structure of FNDs, 1 – 3.



Scheme 1

の報告に従って精製し¹⁸⁾, DNA 濃度は塩基対当りの濃度として調製した. **1**, **2**はそれぞれ Scheme 1, 2 に従って合成した. **3**, **4**は, 過去に報告された合成方法に従って合成された¹⁶⁾.

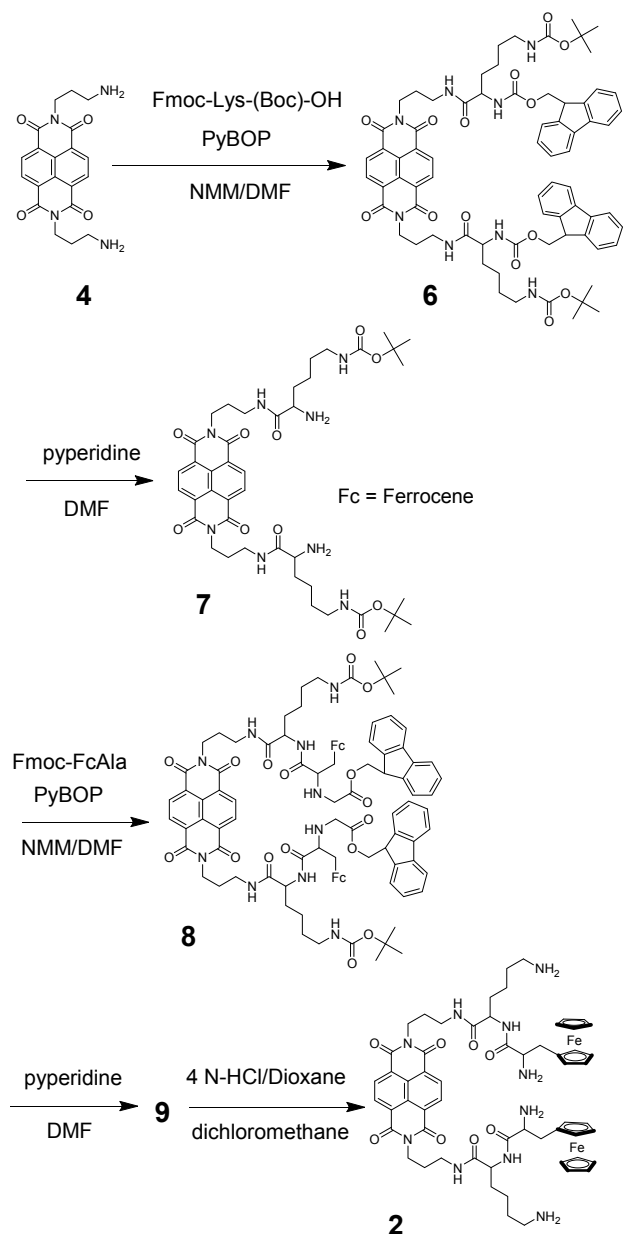
2・1・1 1 の合成 ナスフラスコに 10 mL ジメチルホルムアミド (*N,N*-dimethylformamide, DMF), 0.20 g (0.53 mmol) の **4**, 0.71 g (1.3 mmol) Fmoc フェロセニルアラニン (神戸天然物化学), 1.0 g (2.6 mmol) ヘキサフルオロリン酸 (ベンゾトリアゾール-1-イルオキシ)トリピロリジノホスホニウム (1H-Benzotriazol-1-yloxy-tri(pyrrolidino) phosphonium hexafluorophosphate, PyBOP), 0.15 mL (1.7 mmol) *N*-メチルモルホリン (*N*-methylmorpholine, NMM) を加え, 氷浴で 1 時間攪拌した. 室温に戻したのち, 減圧留去で溶媒を除去し, 少量のクロロホルムに溶解させ, ジエチルエーテルで再沈殿を行い, **5**を得た.

ナスフラスコに 50 mL の DMF/ ピペリジン溶液 (70/30, v/v), 0.22 g (0.16 mmol) **5** を加え, 室温で 1 時間攪拌した. 攪拌後, 溶媒を減圧留去し, クロロホルムを少量加え, ジエチルエーテルで再沈殿を行った. 得られた化合物は, RP-HPLC で精製され, **1**を得た (収率 16%).

2・1・2 2 の合成 ナスフラスコに DMF 10 mL, 0.20 g (0.53 mmol) の **4**, Fmoc-Lys(Boc)-OH 0.61 g (1.3 mmol), PyBOP 1.0 g (2.6 mmol), NMM 0.15 mL (1.7 mmol) を

加え, 氷浴で 1 時間攪拌した. 室温に戻したのち, 減圧留去により溶媒を除去した. その後, 少量のクロロホルムに溶かし, ジエチルエーテルで再沈殿を行い, **6**を得た. ナスフラスコに 30 mL の DMF/ ピペリジン溶液 (70/30, v/v), 0.21 g (0.16 mmol) の **6** を加え, 1 時間室温で攪拌した. 溶媒を減圧留去後, クロロホルムを少量加え, ジエチルエーテルで再沈殿を行い, 0.88 g の **7**を得た.

ナスフラスコに DMF 5 mL, 0.080 g (0.10 mmol) の **7**, Fmoc フェロセニルアラニン 0.13 g (0.25 mmol), PyBOP 0.50 g (1.3 mmol), NMM 0.10 mL (1.1 mmol) を加え, 氷浴で 1 時間攪拌した. 室温に戻したのち, 溶媒を減圧留去した. 少量のクロロホルムに溶かし, ジエチルエーテルで再沈殿を行い, **8**を得た. ナスフラスコに 30 mL の DMF/ ピペリジン溶液 (70/30, v/v), 0.31 g (0.17 mmol) の **8** を加え 1 時間, 室温で攪拌した. 溶媒留去後, クロロホルムを少量加え, ジエチルエーテルで再沈殿を行い, 脱下 moc 体の **9**を得た. ナスフラスコに, 0.074 g (0.055 mmol) の **9**, ジクロロメタン 20 mL, 4 N-塩酸/ジオキサン 40 μ L (0.15 mmol) を加え, 室温で 2 時間攪拌した. 溶媒を減圧留去後, クロロホルムを少量加え, ジエチルエーテルで再沈殿を行った (収量 0.010 g). 得られた化合物は,



RP-HPLC で精製され, **2** を得た.

2.2 円偏光二色性 (CD) スペクトル測定

85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA, 10 mmol L^{-1} 2-モルホリノエタンスルホン酸 (2-Morpholinoethanesulfonic Acid, MES, pH 6.25), 1.0 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), 100 mmol L^{-1} NaCl 溶液に **1** 及び **2** を, 最終濃度が 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ となるように添加し, JASCO J-820 (日本分光) で CD 測定を行った.

測定条件は以下に示すとおりである; 走査速度 50 nm min^{-1} , レスpons 2 sec, データ間隔 0.2 nm, 感度 100 mdeg, バンド幅 2 nm, 積算回数 4 回, 測定温度 25 $^{\circ}\text{C}$.

2.3 UV-Vis スペクトル測定

10 mmol L^{-1} MES 緩衝液 (pH 6.25) に, 1.0 mmol L^{-1} CT-DNA, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **1** もしくは **2**, 10 mmol L^{-1} MES (pH 6.25), 1.0 mmol L^{-1} EDTA, 100 mmol L^{-1} NaCl を数 μL ずつ添加したときの UV-Vis 測定を日立スペクトロメーター U-3310 で行った.

384 nm の吸光度変化から, MacGhee と von Hippel による, ν (飽和度, 加えた DNA 当たりの結合したインターカレート量) と C (DNA に結合していないインターカレート濃度) とを用いてスキャッチャードプロットを行い, 式(1)を用いて, 結合定数 (K), 座位数 (n ; 化合物が 2 本鎖 DNA に結合した時に覆う塩基対数) を算出した¹⁹⁾.

$$\nu/C = K(1-n\nu) \{ (1-n\nu)/[1-(n-1)\nu] \}^{n-1} \quad (1)$$

2.4 ストップト・フロー測定

FND-CT-DNA 溶液として 100 mmol L^{-1} NaCl 及び 1.0 mmol L^{-1} EDTA を含む 10 mmol L^{-1} MES 緩衝液 (pH 6.25), 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ の **1** もしくは **2**, 100 μM CT-DNA 4 mL を調製した. 1% ラウリル硫酸ナトリウム (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 溶液として 100 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} MES, 1.0 mmol L^{-1} EDTA (pH 6.25), 1% SDS 溶液 4 mL を調製した. この二つの溶液をストップト・フロー分光光度計にセットした. その後, 測定温度 25 $^{\circ}\text{C}$ でこの二つの溶液を混合し, 384 nm の吸収スペクトルの時間変化から式(2)に従い, k_d を算出した (A_1, A_2 はカーブフィッティングの際のそれぞれ吸光度変化に由来する係数である)²⁰⁾.

$$y = A_1 \exp(k_d \cdot t) + A_2 \quad (2)$$

FND 溶液として 100 mmol L^{-1} NaCl, 10 mmol L^{-1} MES, 1.0 mmol L^{-1} EDTA (pH 6.25), 2.0, 4.0, 6.0, 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ の **1** もしくは **2** 溶液の計 4 種類, DNA 溶液として 100 mmol L^{-1} NaCl 及び 1.0 mmol L^{-1} EDTA を含む 10 mmol L^{-1} MES 緩衝液 (pH 6.25), 20, 40, 60, 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA 溶液の計 4 種類を調製した. $[\text{FND}]:[\text{DNA}] = 1:10$ となる二つの溶液をストップト・フロー分光光度計にセットした. その後, 測定温度 25 $^{\circ}\text{C}$ でこの二つの溶液を混合し, 384 nm の吸収スペクトルの時間変化から式(3)に従い, 見かけの会合速度定数 (k_a)_{app} を算出した (A_3, A_4 はカーブフィッティングの際のそれぞれ吸光度変化に由来する係数である)²⁰⁾.

$$y = A_3 \exp\{(k_a)_{\text{app}} \cdot t\} + A_4 \quad (3)$$

各濃度において得られた結果より, DNA 濃度 (C_{DNA}) に対する (k_a)_{app} の関係をプロットし, 式(4)の傾きから会合

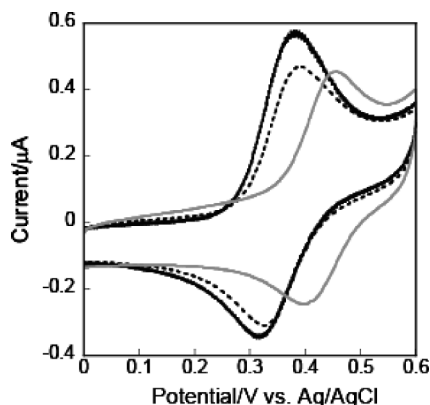


Fig. 2 Cyclic voltammogram of 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **1** (black solid line), **2** (black dotted line), or **3** (grey solid line) in 100 mmol L^{-1} AcOK-AcOH (pH 5.5) and 100 mmol L^{-1} KCl

速度定数 k_a を算出した²⁰⁾.

$$(k_a)_{\text{app}} = -k_a C_{\text{DNA}} + k_d \quad (4)$$

2.5 電気化学測定

前処理として、ダイヤモンドスラリー (6 μm に続き 1 μm), アルミナスラリー (0.05 μm) で物理研磨し、水酸化ナトリウム水溶液、硫酸水溶液で電解研磨を行った¹²⁾. CT-DNA, FND の非特異的吸着を防ぐため、金のディスク電極 (BAS, 直径 1.6 mm) を 6-メルカプト-1-ヘキサノール 100 μL に浸し、一晚 45 $^{\circ}\text{C}$ で電極表面のマスキングを行った. 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ FND (**1**, **2**, もしくは **3**), 100 mmol L^{-1} KCl, 100 mmol L^{-1} 酢酸カリウム (AcOH-AcOK) 緩衝液 (pH 5.5) を調製し、この溶液 100 μL にマスキング電極を浸し、25 $^{\circ}\text{C}$ で Electrochemical Analyzer Model 1030A (CH. Instrument) でサイクリックボルタンメトリー (cyclic voltammetry, CV) 測定を行った.

CV 測定は以下の条件で行った; 初期電位 (V) = 0, 高電位 (V) = 0.6, 低電位 (V) = 0, セグメント = 2, サンプル間隔 (V) = 0.001, 静止時間 (s) = 2, 感度 (A/V) = 1×10^{-6} .

DNase I 検出では、6-メルカプト-1-ヘキサノール固定化電極を用いて、CT-DNA, FND を含む $1 \times \text{DNase I}$ 緩衝液 (0.10 mol L^{-1} Tris-HCl, 25 mmol L^{-1} MgCl_2 , 5.0 mmol L^{-1} CaCl_2) 溶液で、37 $^{\circ}\text{C}$ で CV 測定及び矩形波ボルタンメトリー (square Wave Voltammetry, SWV) 測定を行った. 電流増加率 ($\Delta i/\%$) は DNase I 添加前後の電流をそれぞれ i_0 , i とすると、 $\Delta i/\% = (i/i_0 - 1) \times 100$ で算出した.

SWV 測定は以下の条件で行った; 初期電位 (V) = 0, 最終電位 (V) = 0.5, 電位増加分 (V) = 0.004, 振幅 (V) = 0.025, 周波数 (Hz) = 15, 静止時間 (s) = 2, 感度 (A/V) = 1×10^{-6} .

3 結果と考察

3.1 FND1-3 と 2 本鎖 DNA との相互作用解析

これまでに合成された FND は分子内に N-メチル基や、ピペラジンを有しており、これらの部位がプロトン化することで、水溶性を示していた^{14)~17)}. 今回新たに設計、合成した FND **1** はアラニンを、**2** はアラニンとリジンを持つ. **1**, **2** の複数個のプロトン化によって、化合物自身の水溶性の向上及び 2 本鎖 DNA に対する親和性の向上が期待される.

まず最初に、新たに合成した **1**, **2** の電気化学特性を調べた. Fig. 2 に **1** - **3** のそれぞれの CV 測定結果を示す. **3** では酸化ピーク電位 $E_{\text{pa}} = 0.46$ V, 還元ピーク電位 $E_{\text{pc}} = 0.40$ V, $\Delta E_p = 0.06$ V, 中点電位 $(E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}})/2 = 0.43$ V, **1** では酸化電位 $E_{\text{pa}} = 0.38$ V, 還元電位 $E_{\text{pc}} = 0.32$ V, $\Delta E_p = 0.06$ V, 中点電位 $(E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}})/2 = 0.35$ V, **2** では酸化電位 $E_{\text{pa}} = 0.39$ V, 還元電位 $E_{\text{pc}} = 0.33$ V, $\Delta E_p = 0.06$ V, 中点電位 $(E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}})/2 = 0.36$ V であった. これより、**1**, **2** では **3** より酸化還元電位が約 0.08 V 負側にシフトした. 新規インターカレタには電子供与基であるアミノ基が存在し、フェロセン部位に電子供与されるため、アミノ基を持たない **3** よりも電位が負側にシフトしたと考えられる. この結果より、より低電位で測定可能なインターカレタの合成に成功した.

次に 2 本鎖 DNA に対する結合モードを調べた. 85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 仔牛胸腺 DNA (CT-DNA, 濃度は CT-DNA 塩基対当たりの濃度として示す), 10 mmol L^{-1} MES (pH 6.25), 1.0 mmol L^{-1} EDTA, 100 mmol L^{-1} NaCl に **1** 及び **2** を添加したときの円偏光二色性スペクトル測定を測定した (Fig. 3A). その結果、ナフタレンジイミドに由来する 340~400 nm の領域で、小さな負のコットン効果が観察された. これは、FND が 2 本鎖 DNA にインターカレートしたときに特有の挙動である¹⁶⁾. また、Fig. 3B に示すように、7.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **1** もしくは **2**, 100 mmol L^{-1} NaCl, 1.0 mmol L^{-1} EDTA を含む 10 mmol L^{-1} MES (pH 6.25) 溶液に CT-DNA を添加したときの UV-Vis 吸光度測定を行ったところ、CT-DNA の添加に伴いナフタレンジイミドに由来する 340~400 nm の領域で、大きな淡色効果が観察された. これもまた、**1** や **2** がインターカレートモードで結合していることを示唆している¹⁶⁾. また、これらの UV-Vis スペクトル測定による 384 nm での吸光度変化からスキャッチャード解析を行い、2 本鎖 DNA に対する **1**, **2** の結合定数 (K) 及び座位数 (n) を算出した (Fig. 3C). その結果を Table 1 に示す. 結合定数に関して、**2** は **1** の 2 倍の大きさであった. また、ストップ・フロー分光光度計を用いて、CT-DNA に対する **1** 及び **2** の解離 (Fig. 3D, a), 会合過程 (Fig. 3D, b) を追跡し、会合速度定数 (k_a) 及び解離速度定数 (k_d) を算出し

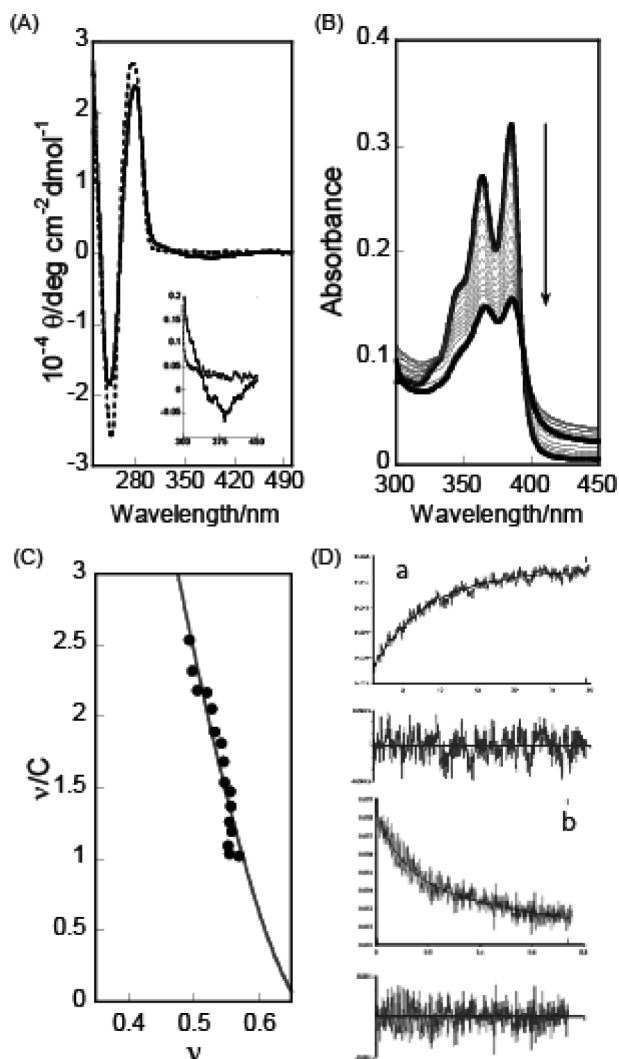


Fig. 3 (A) CD spectra of 85 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA in the absence (broken line) or presence of 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **2** (solid line) in 10 mM MES and 1.0 mM EDTA (pH 6.25) containing 100 mmol L^{-1} NaCl at 25 °C. (B) Spectrophotometric titration of 7.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **2** with 0–0.3 mmol L^{-1} CT-DNA (from top to bottom) in 10 mmol L^{-1} MES and 1.0 mmol L^{-1} EDTA (pH 6.25) containing 100 mmol L^{-1} NaCl at 25 °C. (C) Scatchard plot for **2** with CT-DNA. (D) Stopped-flow kinetics traces for the SDS-driven dissociation (a) and for association (b) of **2** with CT-DNA in 10 mmol L^{-1} MES and 1.0 mmol L^{-1} EDTA (pH 6.25) containing 100 mmol L^{-1} NaCl at 25 °C.

た (Table 1). 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA, 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **1** もしくは **2** の混合液と界面活性剤の SDS を混合すると, CT-DNA から **1** は 10 s 程度で, **2** は 30 s 程度で解離した. 結合過程については, **1** は 2–3 s で, **2** は 1 s 程度で CT-DNA と結合した. 速度論解析より, CT-DNA からの会合, 解離速度定数を算出すると, **2** は, **1** よりも 2 本鎖 DNA から解離しにくいことが明らかになった. **2** の分子内に導入されているリジンが効果的に 2 本鎖 DNA に作用していると予想される. また, 過去に合成された FND である **3** と比較する

Table 1 Binding parameters of **1–3** with CT-DNA

FND	$K \times 10^{-5} / \text{M}^{-1}$	n	$k_a \times 10^{-5} / \text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	k_d / s^{-1}
1	5.0	2	2.3	0.5
2	11	2	1.5	0.1
3 ¹⁶⁾	3.0	3	1.4	1.1

と, **1**, **2** はともに **3** よりも 2 本鎖 DNA に対する結合定数が大きかった. また, 会合速度定数は **1–3** でほぼ同程度であるが, 解離過程については 2 本鎖 DNA から解離しにくくなっていることが示された. リンカーにペプチドを導入することで, 静電的相互作用に加え DNA のリン酸部位と水素結合し, DNA から化合物が解離しにくくなったと思われる. また, 会合速度定数, 解離速度定数から結合定数 ($K = k_a / k_d$) を算出することができる. これより, 速度論的手法により算出された **1**, **2**, **3** の結合定数はそれぞれ, 4.6, 15, $1.2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり, スキャッチャード解析より算出された結合定数と CT-DNA に対する結合能の序列がおおむね同じであった.

3.2 FND-DNA 複合体への DNase I の相互作用

DNase I はエンドヌクレアーゼであり, 核酸の内部を切断する. FND が 2 本鎖 DNA へ結合することによって, DNase I が DNA に結合できず, 酵素反応が起こらない可能性がある. **1**, **2** は合成収量が十分でなかったため, まず **3** を用いて, FND-DNA 複合体に対する DNase I の酵素反応を電気化学的に解析した.

37 °C で 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA 非存在下, 存在下での 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **3**, $1 \times \text{DNase I}$ 緩衝液 (0.10 mol L^{-1} Tris-HCl, 25 mmol L^{-1} MgCl_2 , 5.0 mmol L^{-1} CaCl_2) 溶液で 6-メルカプトヘキサノール修飾電極の SWV 測定を行った. 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **3** では 0.48 μA の酸化ピーク電流を示した. 一方, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **3**, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA 溶液の酸化ピーク電流は 0.21 μA であった. **3** と CT-DNA の結合定数は, $3.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であり, $K = [\text{CT-DNA-3 複合体}] / [\text{CT-DNA}][\text{3}]$ より, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA と 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **3** を混合したときの結合率を算出すると, 99 % が結合していることから, 本条件では平衡状態ではほとんどの **3** が CT-DNA に結合しているものと考えられる. **3** の電流は CT-DNA に結合することで 56 % 抑制された. 酸化電流は, 拡散速度の 1/2 乗に比例することが知られており, **3** が CT-DNA に結合すると, **3** の分子量が増大するため, 拡散速度が低下し, 電流が減少したと考えられる.

次に, 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ **3**, 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA, $1 \times \text{DNase I}$ 緩衝液に 0.02 U μL^{-1} の DNase I を 37 °C で作用させたときの酵素反応の時間変化を 6-メルカプトヘキサノール修飾電極による CV 測定で 2 分ごとに追跡した. その結果を

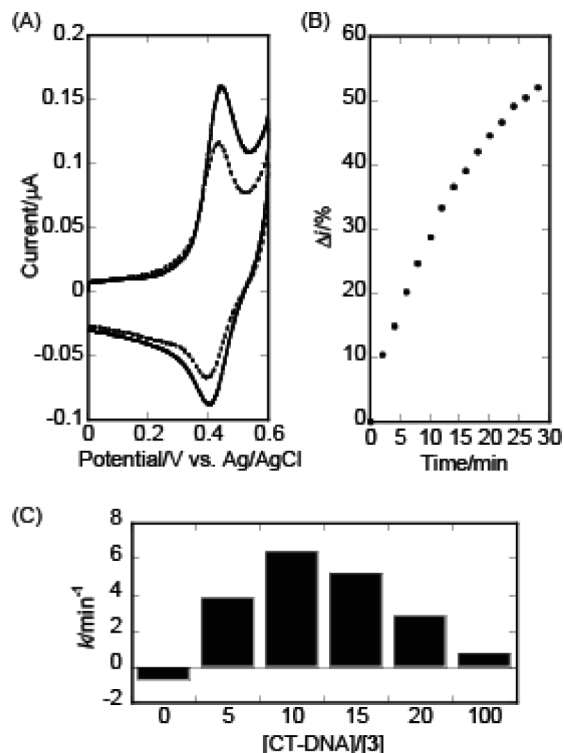


Fig. 4 (A) Cyclic voltammogram of $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ **3** with $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA in the presence (solid line) or absence (broken line) of $0.02 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ of DNase I. (B) Time course of the oxidation peak current increase under DNase I digestion. (C) Kinetics under the varied ratio of $[\text{CT-DNA}]/[\mathbf{3}]$ obtained from the time-dependence of the current after DNase I digestion.

Fig. 4 に示す。Fig. 4A には DNase I 添加前、添加 30 分後の CV を示す。Fig. 4B に示すとおり、DNase I の添加に伴い、電流増加が観察され、確かに酵素反応に伴い FND の酸化ピーク電流が増大する様子が確認された。DNase I 添加後、30 分程度で酸化ピークの電流増加率は 56 % 程度となり、30 分程度でおおよその CT-DNA が消化されていることが示された。このとき、 $\text{FND}:\text{DNA}=1:20$ であり、DNA 濃度は塩基対当りの濃度としたものを用いているため、理論上 20 塩基対当たりに 1 分子の FND が結合している条件であった。 $[\text{CT-DNA}]/[\mathbf{3}]$ を、5, 10, 20, 100 としたときの DNase I の反応時間変化を確認した。これらの酸化ピークの電流増加率の時間変化から、反応速度を算出した (Fig. 4C)。その結果、反応速度は $[\text{CT-DNA}]/[\mathbf{3}]=10$ で最大となり、また、電流増加率も 120 % まで増大した。DNA の塩基対間の距離は、10 塩基対で 34 \AA である。DNase I の大きさは、およそ 30 \AA である²¹⁾。 $[\text{CT-DNA}]/[\mathbf{3}]=10$ のとき、DNA 上で隣り合う **3** と **3** の距離は 34 \AA であり、**3** は DNase I が相互作用するための立体障害にはならない。しかし、 $[\text{CT-DNA}]/[\mathbf{3}] < 10$ のとき、**3** と **3** の距離は DNase I の大きさよりも小さく、**3** は DNase I の DNA に対する酵素反応において障害となり、反応速度が低下したと予想さ

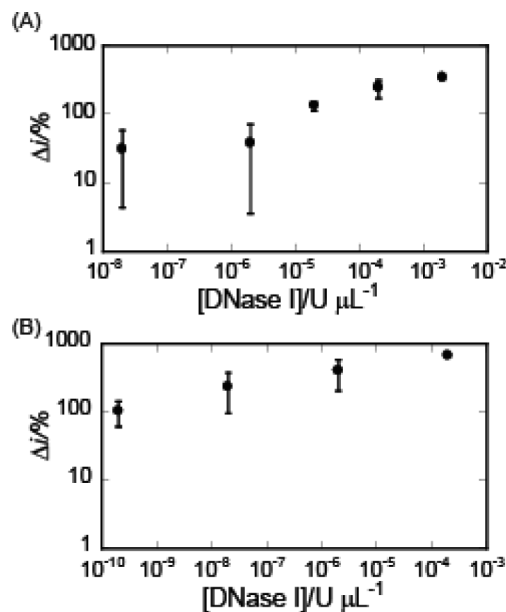


Fig. 5 Oxidation peak current increase after DNase I treatment under the mixture of $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ **1** (A) or **2** (B) with $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA

れる。また、 $[\text{CT-DNA}]/[\mathbf{3}] > 10$ のとき、DNA 上で隣り合う **3** と **3** の距離が大きくなり、切断されても DNA 断片に結合した **3** の解離が効果的に起こらず、見かけの分子量の低下が見られなかったものと考えられる。これらの結果より、 $[\text{CT-DNA}]/[\mathbf{3}]=10$ となるときが、最も DNase I の切断を効率的に観測できる条件であることが分かった。

3.3 **1** 及び **2**-DNA 複合体による DNase I の検出

$10 \mu\text{mol L}^{-1}$ **1** 及び **2** と $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA 複合体にて DNase I で処理したときの酵素反応前後の SWV 測定を行った。**1** と CT-DNA、**2** と CT-DNA のそれぞれの結合率は、それぞれ 98, 99 % である。Fig. 5 に示すとおり、 $2 \times 10^{-3} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ の DNase I で処理したとき、 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ **1**、 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA 混合溶液では酸化ピークの電流が 340 % 増加し、 $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ **2**、 $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA 混合溶液では酸化ピークの電流が 690 % 増加した。DNase I は Mg がトリガーとなって酵素活性が発現する。Mg をキレートするため、 15 mmol L^{-1} EDTA 存在下で同様の測定を行った場合、**1** では電流増加率は 49 %、**2** では 1.5 % と、ともに電流増加が抑制された。さらに、DNase I を添加しなかった場合、酸化ピーク電流は **1** では 8.9 %、**2** では 10 % 減少した。今回用いた CT-DNA は 100 - 2000 bp 当たりの分子量分布のものである。CT-DNA の融解温度は高いものの、 37°C で保持していたため、短い DNA に結合していた FND がより安定な長い DNA に結合し、FND の見かけの拡散速度が低下した可能性が考えられる。これより、**1**、**2** でも **3** と同様に DNase I の酵素反応が追跡可能であることが示さ

れた。

Fig. 5A, B に $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ **1** もしくは **2**, $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ CT-DNA, $1 \times \text{DNase I}$ 緩衝液による DNase I 濃度依存性の結果を示す。 $2 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-5} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ の DNase I では 100 ~ 340 % の電流増加率であり, DNase I の検出が可能であると考えられる。しかし, $[\text{DNase I}] < 2.0 \times 10^{-6} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ では, 酵素処理を行っていないときの電流増加率との有意差は得られなかった。よって, DNase I 検出限界は $2 \times 10^{-5} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ であると考えられる。**2** による DNase I 濃度依存性では $2 \times 10^{-3} - 2 \times 10^{-9} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ では約 100 ~ 700 % の電流増加率であり, 大幅な電流増加が確認された。この結果から検出限界は $2 \times 10^{-9} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ であると考えられ, **1**, **3** を用いたときの感度よりも大幅に感度が向上した。

2 は, **1**, **3** と比べ, 2 本鎖 DNA に対する結合能が高く, 酵素反応前後に CT-DNA に安定してインターカレートできるため, 酵素反応による複合体の分子量変化が明瞭になったためであると考えられる。

4 結 言

ペプチド型の新規 FND **1**, **2** の合成に成功した。これらは **3** と比べると, 2 本鎖 DNA に対する結合能が増大した。リンカー中にリジンを含む **2** は 2 本鎖 DNA からの解離が遅く, 2 本鎖 DNA に安定に結合可能であることが示され, 2 本鎖 DNA-**2** 複合体で $2 \times 10^{-9} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ の DNase I の検出に成功した。また, 2 本鎖 DNA への FND の結合量が DNase I の酵素活性に影響を及ぼすことを明らかにした。この結果より, 創薬ターゲットとしての DNase I の基質のスクリーニングにも本手法は適用可能である。また, 古典的インターカレータは DNA:RNA への結合は難しいが, FND は DNA-RNA ヘテロ二重らせんへも結合できるインターカレータであるため¹⁵⁾, DNA の組み換え, 修復, 免疫システムの監視等に関与する RNase や RNase H 等の様々なスクレーパーゼをターゲットにした薬剤スクリーニングへの展開も期待される。

謝 辞

本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金「若手研究 (B)」(24750071) の支援によりなされたことを付記し, ここに謝意を表します。

(平成 27 年 9 月 23 日, ISNAC2015 第 42 回国)
(際核酸化学シンポジウムにおいて, 一部発表)

文 献

- 1) Z. Bartosova, L. Krejci : *FEBS Lett.*, **588**, 2446 (2014).
- 2) E. Canestrari, Z. Paroo : *Trends Pharmacol. Sci.*, **39**, 855 (2018).
- 3) L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang : *Science*, **339**, 819 (2013).
- 4) Y. Kawai, M. Yoshida, K. Arakawa, T. Kumamoto, N. Morikawa, K. Masamura, H. Tada, S. Ito, H. Hoshizaki, S. Oshima, K. Taniguchi, H. Terasawa, I. Miyamori, K. Kishi, T. Yasuda : *Circulation*, **109**, 2398 (2004).
- 5) S. Tsukumo, K. Yasutomo : *Clin. Immunol.*, **113**, 14 (2004).
- 6) S. Sato, S. Takenaka : *Sensors (Basel)*, **11**, 12437 (2014).
- 7) E. C. Sheppard, S. Rogers, N. J. Harmer, R. Chahwan : *Sci. Rep.*, **9**, 8853 (2019).
- 8) Y. Si, Y. Bai, X. Qin, J. Li, W. Zhong, Z. Xiao, J. Li, Y. Yin : *Anal. Chem.*, **90**, 3898 (2018).
- 9) R. Liu, J. Hu, Y. Chen, M. Jiang, Y. Lv : *Anal. Chem.*, **91**, 8691 (2019).
- 10) X. Chen, D. Yang, Y. Tanga, P. Miao : *Analyst*, **143**, 1685 (2018).
- 11) S. Sato, K. Fujita, M. Kanazawa, K. Mukumoto, K. Ohtsuka, M. Waki, S. Takenaka : *Anal. Biochem.*, **381**, 233 (2008).
- 12) S. Sato, K. Fujita, M. Kanazawa, K. Mukumoto, K. Ohtsuka, S. Takenaka : *Anal. Chim. Acta*, **645**, 30 (2009).
- 13) H.-K. Lee, J. Heo, S. Myung, I.-S. Shin, T. H. Kim : *Electroanal.*, **29**, 1749 (2017).
- 14) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, H. Kondo : *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 15) S. Sato, S. Fujii, K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, S. Takenaka : *J. Organomet. Chem.*, **637**, 476 (2001).
- 16) S. Sato, T. Nojima, M. Waki, S. Takenaka : *Molecules*, **10**, 693 (2005).
- 17) S. Sato, S. Takenaka : *J. Organomet. Chem.*, **693**, 1177 (2008).
- 18) R. D. Wells, J. E. Larson, R. C. Grant, B. E. Shortle, C. R. Cantor : *J. Mol. Biol.*, **54**, 465 (1970).
- 19) J. D. McGhee, P. H. von Hippel : *J. Mol. Biol.*, **86**, 469 (1974).
- 20) F. A. Tanious, S.-F. Yen, W. D. Wilson : *Biochemistry*, **30**, 1813 (1991).
- 21) D. Suck, C. Oefner, W. Kabsch : *EMBO J.*, **3**, 2423 (1984).

Signal-on Type Electrochemical Detection of DNase I in Homogeneous Media Using New Ferrocenylnaphthalene Diimide

Shinobu SATO^{1,2}, Shuji FUKUTAKI¹ and Shigeori TAKENAKA^{*1,2}

* 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

² Research Center for Bio-microsensing Technology, Kyushu Institute of Technology, 1-1, Sensui-cho, Tobata-ku, Kitakyushu-shi, Fukuoka 804-8550

(Received July 28, 2019; Accepted September 11, 2019)

A simple DNase I detecting method was achieved under a homogenous medium containing DNA duplex and a newly synthesized ferrocenylnaphthalene diimide derivative (FND) carrying alanine (**1**) or alanine-lysine residue (**2**) as an electrochemical indicator. The binding affinity of **1** or **2** with double stranded DNA was 10^5 M^{-1} or 10^6 M^{-1} order, which was estimated from a Scatchard analysis calculated by its absorption change upon the addition of calf thymus DNA (CT-DNA). It was expected that **1** or **2** intercalated to double stranded DNA with a threading mode and electrostatic interaction of the linker ammonium cations of **1** or **2** with phosphate anions of the DNA duplex backbone. The largest current increase after a DNase I treatment was observed under the mixture in a ratio of [**3**]:[CT-DNA-bp] = 10:1 (bp: DNA concentration per base pair), where the distance between the bound ligands is expected to a 10 bp or 34 Å theoretically. When considering to be ca. 30 Å of DNase I size and decreasing of the current increase under an increased amount of **3**, DNase I required over ten base pairs to access and digest with the DNA duplex. The current increase in the case of a mixture of 10 μM **1** or **2** and 100 μM CT-DNA was obtained 340 % or 640 %, respectively, after being treated with DNase I (final concentration: $2.0 \times 10^{-3} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$), which might be derived from an apparent molecular weight or diffusion coefficient of the ligand bound DNA duplex and the detection limit of DNase I in the case of **1** or **2** was 2.0×10^{-5} or $2.0 \times 10^{-9} \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$, respectively, where the detection limit for **2** was 10^4 -times higher than that for **1**.

Keywords: amino acid residues; DNase I; electrochemical detection; ferrocenylnaphthalene diimide; homogenous medium; signal-on type detection.