

科学技術振興調整費 「科学技術連携施策群の効果的・効率的な推進」
 平成 18～20 年度実施「精密構造識別型の電気・光応答バイオセンサ」成果の概要

研究代表者 富山大学 教授 井上 将彦

1) 研究目的

2004 年にヒト・ゲノムの解読が完成し、そこで得られたデータを医療などの応用分野に活用するポストゲノム研究の時代が到来した。ポストゲノム研究のなかでもっとも注目を集めているのが、個々人に合ったテーラー・メイド医薬品を開発する「ゲノム創薬」である。この実現のためには、DNA 中に含まれる膨大な個々人の変異遺伝子（特に一塩基多型：SNPs）を網羅的に解析する技術、また発現したタンパク質の機能部位ペプチドの配列情報を取得する高速な技術の双方が必要不可欠である。これらの技術の核となるのがバイオプローブであり、それを集積したセンサデバイスである。この種のバイオプローブには厳しい要件が課される。高精度、高感度、そして安価なことである。また集積したデバイスも、迅速・簡便かつ安価に検出が行えるシステム構成でなければならない。現時点では、“研究”としてのこの種のセンサデバイスは数多く提案されているが、「ゲノム創薬」を実現する確固たるセンサデバイス技術は、未だ確立されていないのが現状である。

本研究実施者らは、従来のバイオプローブとは概念的に異なる“実施者オリジナル”なバイオプローブの開発に着手し、その基礎的成果を得ている。電気化学活性なフェロセンを 共役で DNA に連結した電気応答 DNA プローブ、光反応基であるジアジリンを生理活性物質に搭載した光応答タンパク質プローブ、などである。これらの精密構造識別型のバイオプローブをデバイス上で用いるための最適化を行い、ゲノム創薬において真に実用に堪えるバイオセンサを構築することが本研究の目的である。

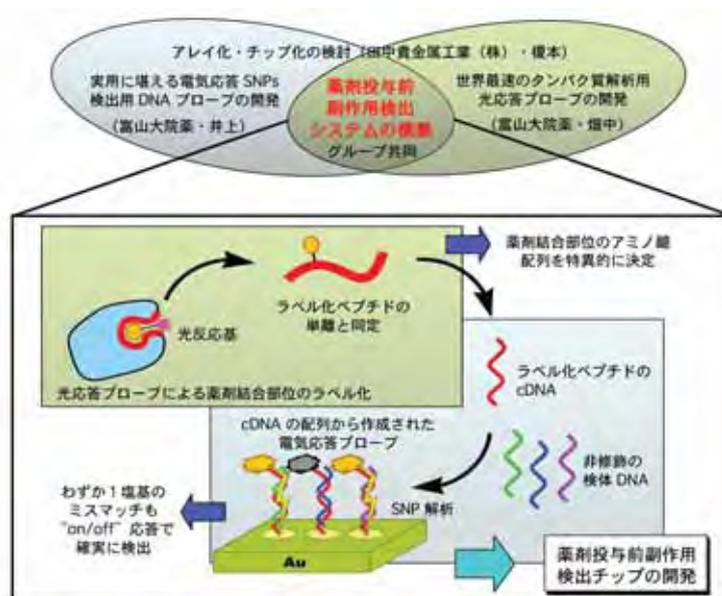


図 1 本課題の協力体制と薬剤投与前副作用検出システムを示した模式図

2) 研究成果の概要

本課題では、開発済みの電気応答 DNA プローブ、光応答タンパク質プローブそれぞれについて、実用化を見据えて最適化に取り組んだ。

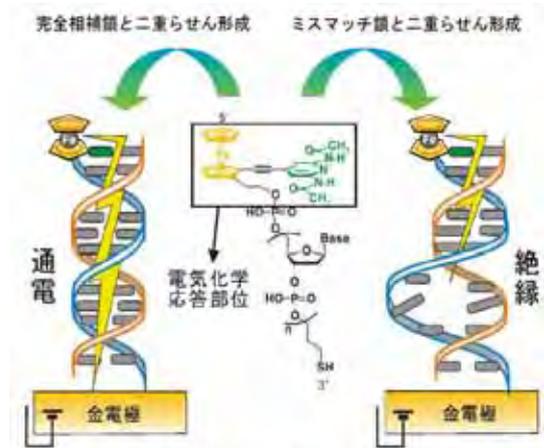
・電気応答 DNA プローブの最適化

本課題開始時点で既に開発に成功していた電気応答 DNA プローブの構造と、それを用いた SNPs 検出の概念図を図 2 に示す。電子を出し入れする金属錯体としてフェロセンを利用し、図に示した電気化学応答部位をオリジナルに開発した。この電気応答部位を一本鎖の DNA の末端に連結して、電気応答 DNA プローブを作成した。プローブに対してターゲット DNA (被検 DNA) を作用させ DNA 二重らせんを形成した後、金電極に固定化して電気化学測定を行うことで SNPs を検出した。ターゲット DNA が完全相補鎖の場合、電気応答が観測された (図 2 左および図 3 左の赤線)。一方、SNP 相補鎖では、ほとんど応答電流が観測されなかった (図 2 右および図 3 左の青線)。このように、本系を用いることで SNPs を “on-off” 応答で識別することに成功していた。

本課題では、DNA プローブを実用に堪える SNPs 検出プローブへと革新し、個々人の遺伝的特性を調べるのに適した系へと展開するために、次の 4 点を重点目標とした。

- 1) プローブ合成の簡略化
- 2) 検出プロトコルの最適化
- 3) 新規遺伝子型判定法の開発
- 4) 測定再現性が高い金電極の開発

プローブ合成の簡略化においては、様々な新規電気応答部位を開発し、それらを用いて 20 種類を超える新たな DNA プローブを作成した。開発した全てのプローブの SNPs 検出能力を徹底的に調査した結果、イソキノリン (R 体) プローブが最も優秀であった (図 3 右)。11 段階かけて作成していた電気応答部位の合成を 2 段階に短縮し、プローブ合成の大幅な簡略化が達



Inouye, M. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005, 102, 11606.

図 2 既存の電気応答 DNA プローブの構造 (中央) と電気化学的 SNPs 検出の概念図。このプローブと完全相補鎖との二重らせんでは電気応答が観測されるが (左)、SNP 鎖との二重らせんでは絶縁される (右)。

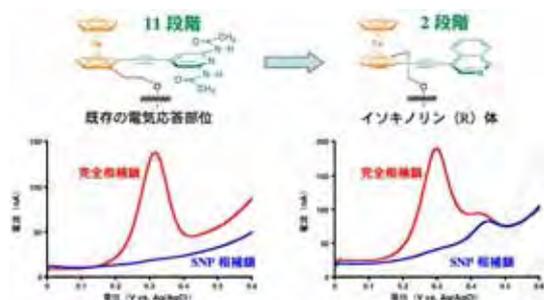


図 3 プローブ合成の簡略化。既存の電気応答部位 (左) と本課題で開発した電気応答部位 (右) およびそれぞれの DNA プローブを用いた場合の電気化学測定結果。

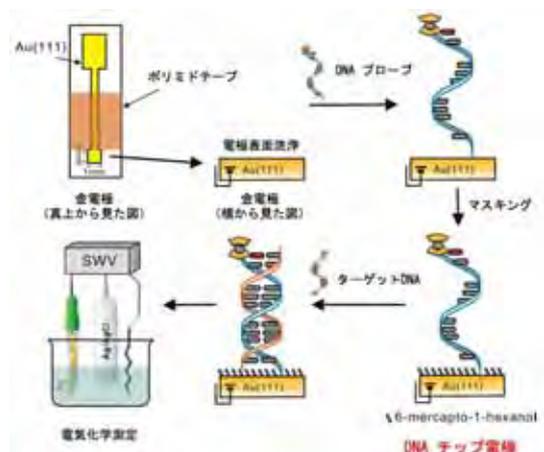


図 4 検出プロトコルの最適化。既存の手法では、DNA 二重らせん形成後に電極への固定化を行っていたが、一本鎖の DNA プローブの固定化が可能となった。これにより、DNA チップ型の検出プロトコルが可能となり、より実践的なプロトコルへと改良できた。

成できた。これにより、安価で短時間に多量のプローブが得られるようになった。

また、予め電極上にプローブを固定化して“DNA チップ”を作成し、そのチップ上に検体 DNA の溶液を載せるだけで測定が行える SNPs 検出法へと展開した(図4)。これにより、診断が必要な SNPs 毎に予め DNA チップが準備できる上に簡便な操作で検出が行えるため、より実践的な検出プロトコールへと展開出来たとと言える。

次に、本系において SNPs が電気化学的に識別できるメカニズムを検証した(図5)。電極上に固定化された DNA は、完全マッチ二重鎖、一塩基ミスマッチ二重鎖、一本鎖 DNA の順に柔軟性が大きくなり、それに伴って電荷輸送の速度も大きくなることがわかった。本系では、この電荷輸送速度の違いを電気化学的に識別し、SNPs を識別していると結論づけた。さらに、この DNA の電極上での動き(ダイナミクス)を詳細に調査し、電気化学測定時の測定条件を適切に設定することで、検出精度を格段に向上させることにも成功した。

また、医療現場で重要な“遺伝子型”を見極めるために、本電気化学的 SNPs 検出法に改良を加え、新規な遺伝子型判定法を開発した(図6)。応答電位が異なるペンタメチルフェロセンを導入した電気応答部位を開発し、新規 DNA プローブを作成した。このプローブとフェロセンタイプのプローブを併用し同一金電極上に固定化することで、2 電位応答によるタイピング法とした。臨床的に重要な 4 種類の配列でタイピングを行ったところ、全ての場合において 3 種類の遺

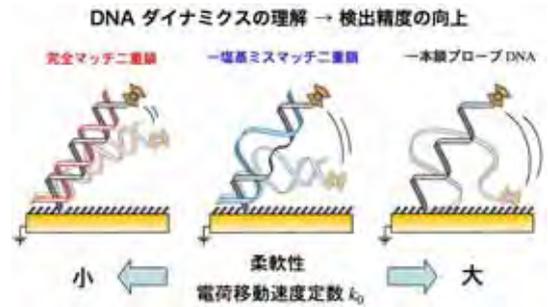


図5 電荷輸送機構の解明に伴う検出精度の向上。電極上の3タイプの DNA はそれぞれ柔軟性が異なり、電荷輸送の速度が大きく異なる。この差を電気化学的に識別し、SNPs を検出している。この DNA ダイナミクスを詳細に調べ、電気化学測定時のパルス電位周波数を同期させると、検出精度が格段に向上した。

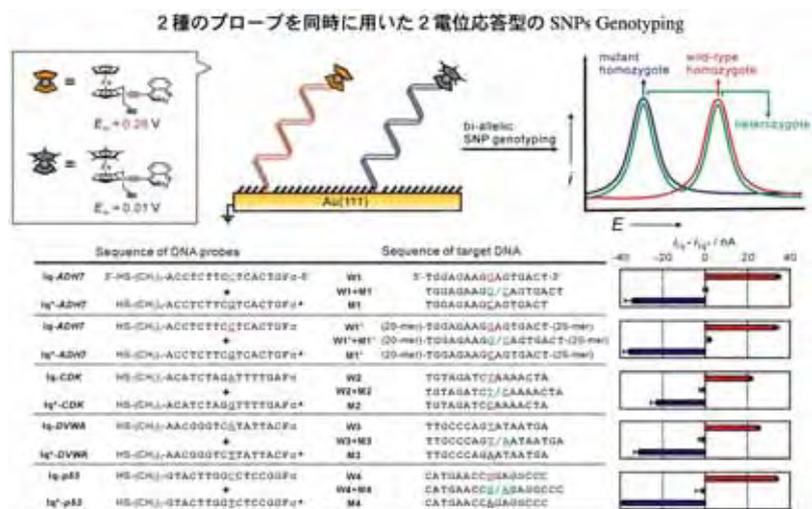


図6 新規な電気化学的 SNPs 遺伝子型判定法 (SNPs タイピング) の開発。フェロセンを用いたイソキノリンプローブ(応答電位 0.26 V)に加えて、応答電位の異なるペンタメチルフェロセンを導入したプローブ(応答電位 0.01 V)を新規に作成した。両プローブを同一金電極上に固定化した DNA チップを用いることで、SNP に関する 3 種の遺伝子型(野生型ホモ [赤]・変異型ホモ [紫]・ヘテロ [緑])を明確に判別できた(遺伝子の略記: 扁平上皮癌 [ADH]、2 型糖尿病 [CDK]、骨関節炎 [DVWA]、肺癌 [p83])

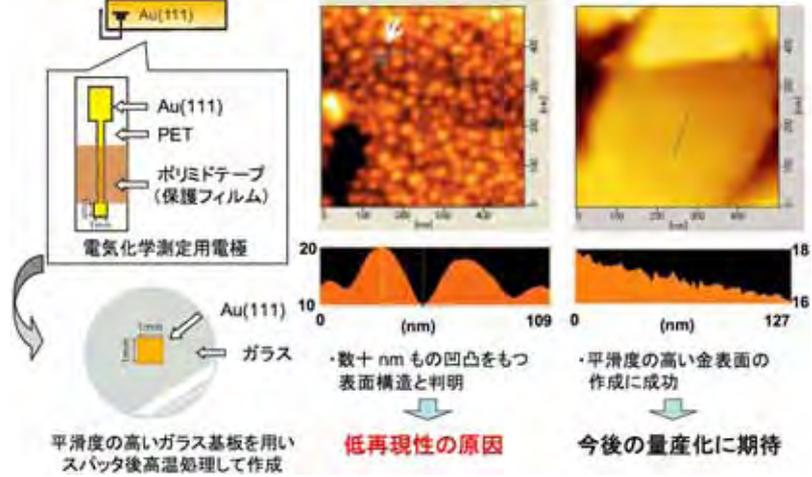


図7 これまでに用いていたプラスチック基板の金電極(左上)と、今回開発したガラス基板の金電極(左下)の模式図。中央:プラスチック基板電極の AFM 画像とその断面図。電極表面に粒子状の大きな起伏が観測された。右:高温処理後のガラス基板金電極の AFM 画像とその断面図。今回、粒子状の起伏が全くなく、数百 nm 四方のオーダーで非常に平滑な金電極が作成できた。

伝子型（野生型ホモ接合体 [赤]・変異型ホモ接合体 [紫]・ヘテロ接合体 [緑]）を明確に判別できた（図6下の表。遺伝子の略記：扁平上皮癌 [ADH]、2型糖尿病 [CDK]、骨関節炎 [DVWA]、肺癌 [p53]）。以上のように、採取した検体 DNA に修飾を施す必要なく、電気化学測定を1回行うだけで、SNPs に関する遺伝子型情報を簡便に取得できるようになった。

加えて、ナノオーダーで平らな表面をもつ電極の作製法を、富山大学、田中貴金属工業（株）共同で開発した（図7）。従来使用していたプラスチック基板電極の表面は、金ナノ粒子が緻密に並び起伏に富んだ構造をしていることが分かった（図7中央）。そこで、高温処理することで表面粒子の再結晶を促し、平滑な単結晶面を表面に露出させることにした。高温処理に耐えるよう石英ガラス基板を用い、スパッタリング後およそ 500 で処理した結果、ナノレベルで平滑な面を得ることができた（図7右）。このような原子・分子レベルで平滑な電極を用いることで、電気化学測定における高い測定再現性が約束され、より信頼性の高いSNPs 検出法へと展開することができた。

・光応答タンパク質プローブの最適化

本課題の独自技術シーズである光プローブは、解析対象のタンパク質のみを釣り上げ解析できる特徴を持つ（図8）。本プローブの最適化により、難結晶性タンパク質の構造解析に NMR とは別の化学的解析ルートを開拓することを目的とする。原型のプローブは、釣り上げ機能に微量検出機能を併せ持つ多機能型であり、タンパク質解析ツールとして研究者に広く認められていた。光照射のみでタンパク質機能部位に特殊タグを導入でき、これを釣り上げることで、原理的にはタンパク質の機能構造解析がきわめて短時間に達成できる。しかし、微量タンパク質へ実際に応用するには、これまで有効な手段を欠いていた、極微量ペプチド操作時の試料ロス軽減が必須であり、これを主眼とするプローブ最適化の研究が不可欠となる。

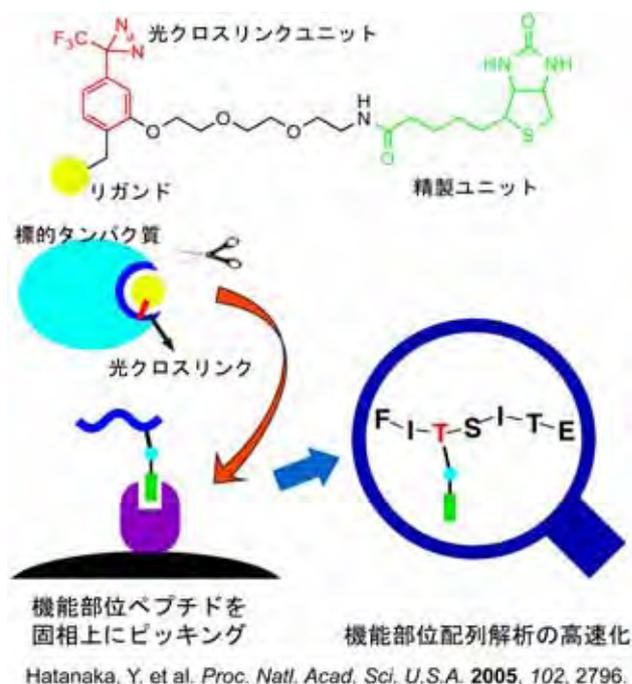


図8. 既存精製技術：精製及び検出用タグであるビオチンが付随した光クロスリンカーは、結合タンパク質や結合部位同定に至るプロセスを簡略化できるため、世界中の研究者に多機能部位解析ツールとして用いられている。

そこで、光応答タンパク質プローブの研究においては、微量なペプチドを扱う技術の開拓を目的として、プローブおよび精製システムの簡略化を主眼に検討した。本プローブを用いる光クロスリンク法は膜タンパク質に有効な数少ない技術の1つであり、多くの薬物受容体に適応できる。本プロジェクトでは、薬物副作用と変異の関連が高いタンパク質として ATP 結合性タンパク質を念頭に、その主要なリガンドの光プローブ化を進めた。光反応性の核酸やアミノ酸は一般性・汎用性が高く有用なため、まずこれらの光プローブ化を進めた。さらに、解析過程の高速化をはかるため操作性に優れた固相を導入し、ポリプロピレン固相を用いた脱着（切断）系と金固相を用いた固定系のデバイス開発を進めた。

解析過程の高速化には、光反応性に加えてプローブに複数の機能を組み込むことは必須である。しかし、多機能化に伴ってプローブサイズが大きくなり一般にはプローブの親和性は低下する。これらの点を考慮して、図9に作成した核酸(ATP)プローブを設計した。このプローブはATPとしての認識機能や光クロスリンク能の他に、分子内の三リン酸構造が金属キレートを利用して検出・脱着も可能なため、光プローブへの誘導化は最小限に抑えられる。しかもリン酸アミド結合は酸分解可能であり、質量分析のシグナルシフトにより解析が容易な利点も有する。この金属キレート脱着系の導入で、タンパク質レベルでは大幅な解析の高速化を達成した。しかし、タンパク質をペプチドに断片化し、その中からプローブが捕捉した機能部位ペプチドを選別する次段階では、わずかながら精製固相表面へ非特異的吸着が観察され、目的とする微量化には限界があった。この改良のため、図10に示すタンパク質の捕捉からペプチド断片化、捕捉ペプチドの再遊離までが一貫して固相上で行うシステムを構築し、固相に共有結合で捕捉できる優位性を生かして徹底洗浄で問題の非特異的吸着除去を図った。プリプロピレン表面に新しい切断機能構造を導入し、そこに光反応性核酸プローブを導入して精製用切断性固相を作製した。ヘキソキナーゼの光捕捉から断片化、捕捉ペプチドの取得までを1日程度で行える、画期的デバイスの開発に成功した。この結果、最も困難な過程である解析対象のペプチド捕捉・精製において、飛躍的な簡便・効率化をもたらした。さらに、切断機構が全く異なる新しい光反応性アミノ酸の開発にも成功し、種々の生理活性ペプチドに応用できる効率系への道も拓いた。

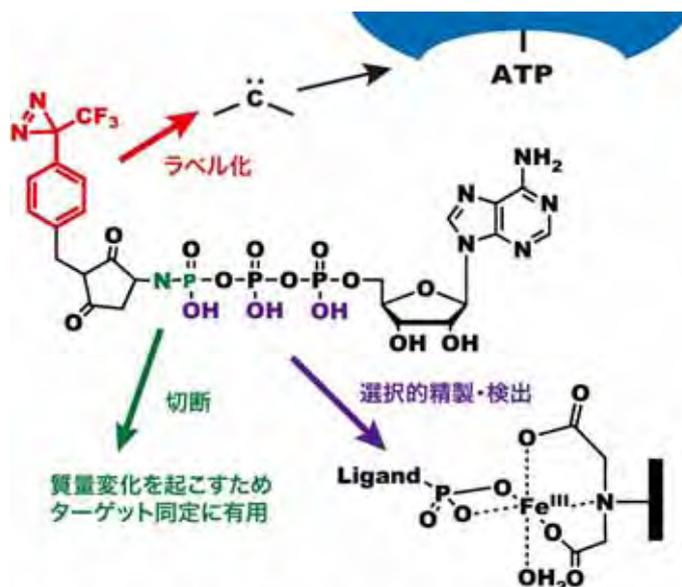


図9. 多機能性ATP光プローブの構造と機能: ATP γ 位に光反応基を導入したシンプルな構造ながらも、タンパク質認識、検出、精製部位を有し、さらに質量分析に有利な切断機能も有する。

以上の結果を踏まえ、さらに微量化が実現可能な金固相デバイス上での技術開発を検討した。金固相へのプローブ構築はナノテクノロジー関連で多くの応用例があり、チオール基を介して簡便に行う方法が確立している。この固定チオール化合物はレーザーにより脱離することが最近の研究で明らかになった。すなわち、先のポリプロピレン固相のように解析ペプチドを質量分析基板に移し換ええる操作(サンプル消失頻度が最も高い)を必要とせず、捕捉基板で直接解析できる点で技術的ブレークスルーが見込める。この方法実現

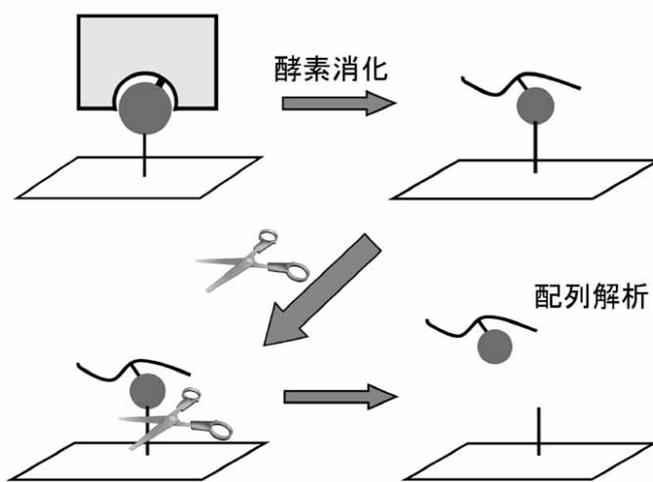


図10. 切断型固相デバイスのアウトライン

により、プローブ固定から質量分析までの全ての操作を質量分析用基板の上で行うことが可能になり、著しく高い操作性を備える前例のない高速解析系の開発へと発展できる。金固相については田中貴金属工業（株）と共同しガラス基板およびステンレス基板（一般的な MALDI ターゲット）を用いた。ガラス基板は MALDI 測定のために導電性の ITO コーティングを施し、その上に金を成膜して質量分析用デバイスを作製した。ガラス基板は安価であり操作性も高い。また、ステンレス基板は市販の MALDI 質量分析用ターゲット上にそのまま金のコートが可能であり、汎用性が高いので必要に応じて使い分け可能である。

このシステムでは、当面は既存の MALDI 質量分析計の規格に合わせるため、捕捉面積がポリプロピレン固相からさらに狭くなるため、結合力が高い光プローブを用いる必要が有る。このため、先に有効であった ATP 光プローブより結合定数が高いリガンドとして、抗がん剤として有望なゲルダナマイシンを用いて、新たに光プローブを作成し一連の操作を検証した。

プローブ導入にあたっては、金表面への非特異的吸着を抑えるため、末端にエチレングリコールを持つアルカンチオールで SAM（自己組織化単分子膜）加工し、その中にプローブを混在させる形で膜表面に結合させた（図 1 1）。その結果、金固相上へのプローブの立ち上げ、



図 1 1. ガラス基板を用いた解析デバイス：ガラス基板上に ITO コーティングし、金薄膜を蒸着。PEG 型アルカンチオールによる SAM と共にプローブを構築し、光クロスリンクで結合タンパク質をトラップする。

照射によるペプチドの捕捉・精製、MALDI 質量分析機による直接脱離・検出に成功し（図 1 2）、解析デバイスとして実用可能であることが判明した。以上、プローブ構築から捕捉、断片化、精製、解析に至る一連の操作を同一固相上で行うことで、実験操作に伴うリスクを最小限に抑えつつ短時間に解析できるシステムを構築した。

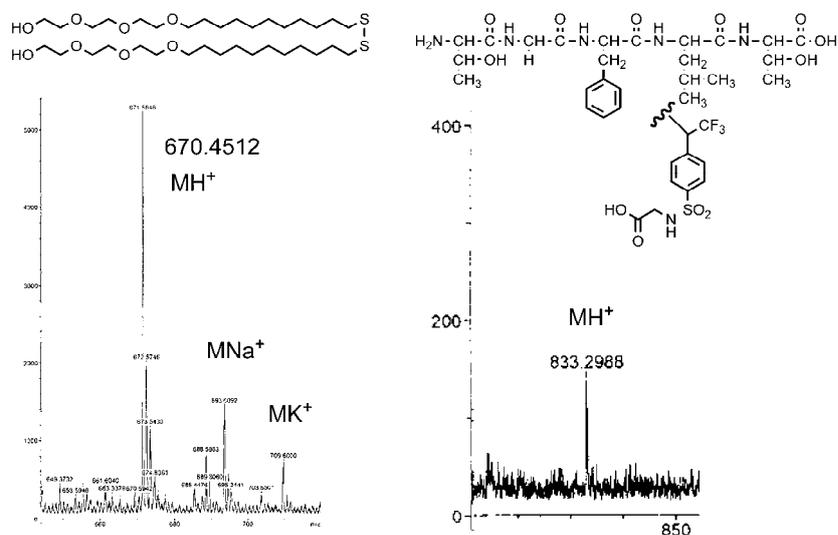


図 1 2. 金基板を用いた MALDI 試料分析結果：左は金上に SAM 化したアルカンチオールのレーザー脱離産物、右は光固定したペプチドの MALDI-MS シグナル

最後に、最適化したそれぞれのプローブを併用して、「薬剤投与前副作用検出システム」のプロトタイプを実践した。抗がん薬として現在臨床試験中のゲルダナマイシンに光反応基を搭載した光応答タンパク質プローブを作成し、図 1 に示した模式図に沿って、薬剤作用部位の SNPs 検出システムを稼働させた。SNPs と副作用との関連付けは現時点において不明瞭ではあるものの、今後臨床試験で得られる情報と双方向で照合することで、我が国発の DNA—タンパク質相関機能部位解析システムが誕生する。今後は、このシステムを

様々な薬剤に対して展開することで、本方法の有用性と一般性の範囲が確立していく。