

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 π 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。

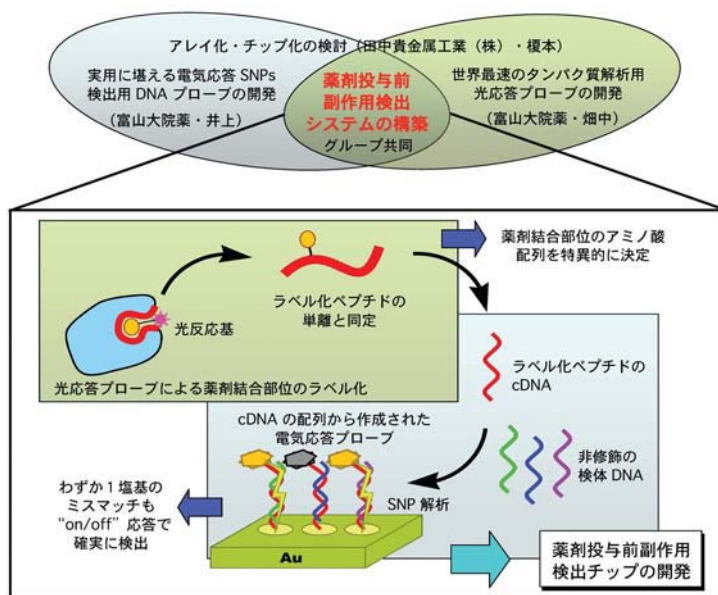


図 1 本課題の協力体制と薬剤投与前副作用検出システムを示した模式図

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。

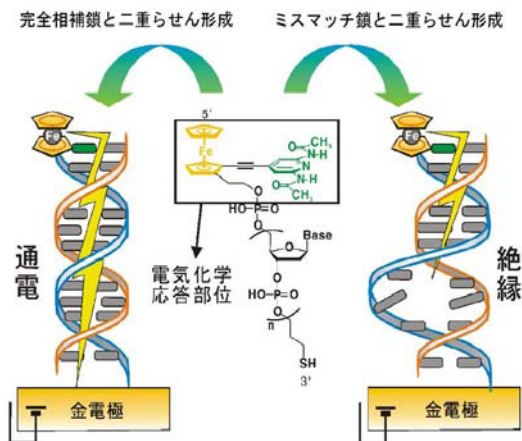
・電気応答 DNA プローブの最適化

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。



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)。

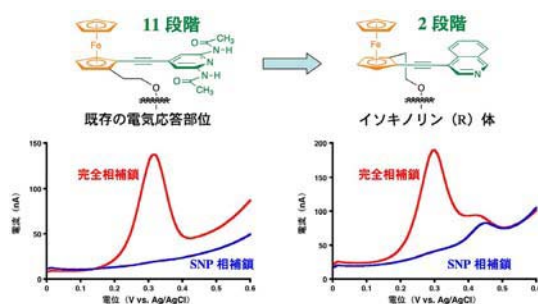


図 3 プローブ合成の簡略化。既存の電気応答部位 (左) と本課題で開発した電気応答部位 (右)、およびそれぞれの DNA プローブを用いた場合の電気化学測定結果。

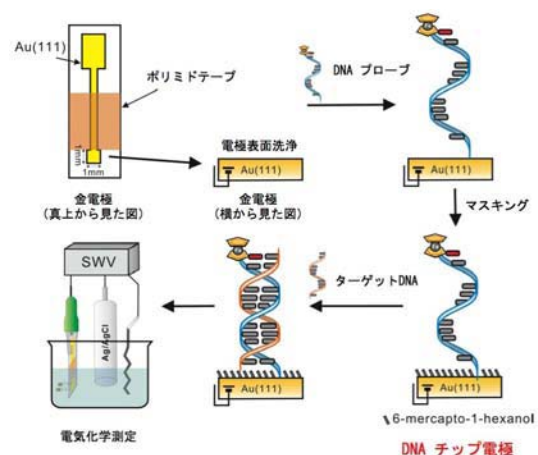


図 4 検出プロトコルの最適化。既存的手法では、DNA 二重らせん形成後に電極への固定化を行っていたが、一本鎖の DNA プローブの固定化が可能となった。これにより、DNA チップ型の検出プロトコルが可能となり、より実践的なプロトコルへと改良できた。