

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 種類の遺伝子型 (野生型ホモ接合体 [赤]・変異型ホモ接合体

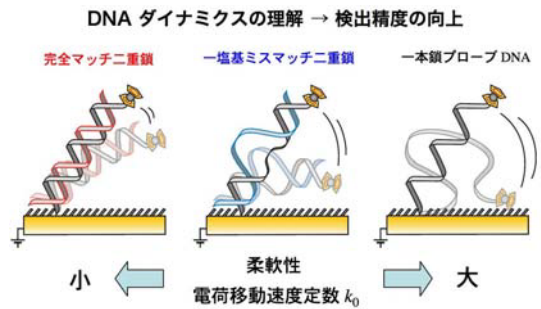


図5 電荷輸送機構の解明に伴う検出精度の向上。電極上の3タイプの DNA はそれぞれ柔軟性が異なり、電荷輸送の速度が大きく異なる。この差を電気化学的に識別し、SNPs を検出している。この DNA ダイナミクスを詳細に調べ、電気化学測定時のパルス電位周波数を同期させると、検出精度が格段に向上した。

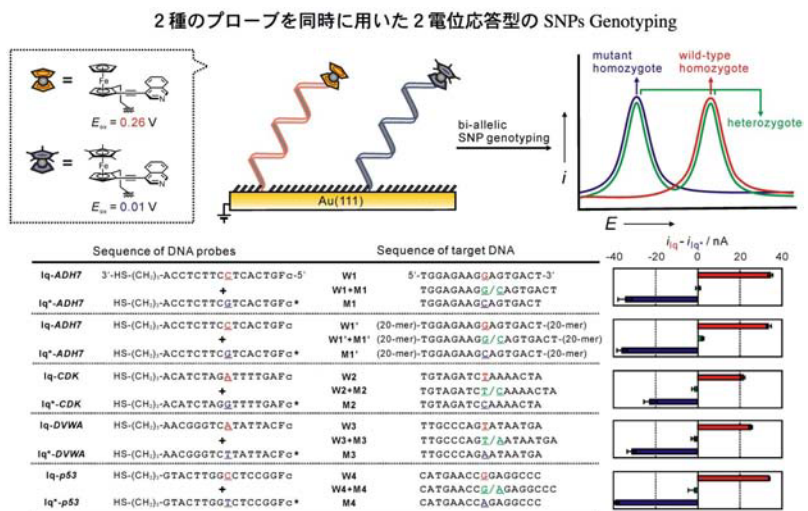


図6 新規な電気化学的 SNPs 遺伝子型判定法 (SNPs タイピング) の開発。フェロセンを用いたイソキノリンプローブ (応答電位 0.26 V) に加えて、応答電位の異なるペンタメチルフェロセンを導入したプローブ (応答電位 0.01 V) を新規に作成した。両プローブを同一金電極上に固定化した DNA チップを用いることで、SNP に関する 3 種の遺伝子型 (野生型ホモ [赤]・変異型ホモ [紫]・ヘテロ [緑]) を明確に判別できた (遺伝子の略記: 扁平上皮癌 [ADH], 2 型糖尿病 [CDK], 骨関節炎 [DVWA], 肺癌 [p53])。

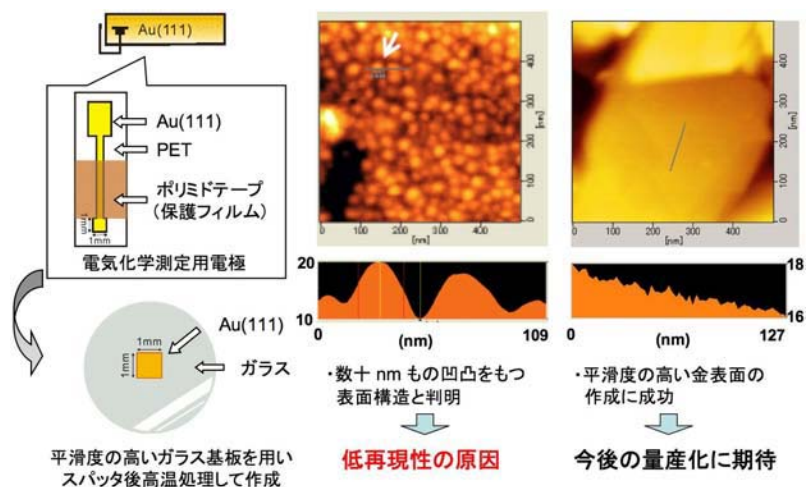


図7 これまでに用いていたプラスチック基板の金電極 (左上) と、今回開発したガラス基板の金電極 (左下) の模式図。中央: プラスチック基板電極の AFM 画像とその断面図。電極表面に粒子状の大きな起伏が観測された。右: 高温処理後のガラス基板金電極の AFM 画像とその断面図。今回、粒子状の起伏が全くなく、数百 nm 四方のオーダーで非常に平滑な金電極が作成できた。