

遺伝子増幅反応を EIS で検出する 修飾グラッシーカーボン電極の創製

防衛医科大学校 医学教育部 武井史恵

Creation and Application of a Modified Glassy Carbon Electrode for EIS Detection of Gene Amplification Reactions

Fumie Takei

Department of Medicine, National Defense Medical College

Polymerase chain reaction (PCR 法) のモニタリングの新たな方法として、電気化学インピーダンス分光法 (electro-chemical impedance spectroscopy, EIS) を使った遺伝子検出法について検討した。

まずはすでに確立されている、DNA の特殊構造に特異的に結合する分子を使った PCR の蛍光モニタリング法を用いて、20 塩基程度の短い RNA (miRNA) の検出法を検討した。その結果、20 塩基中の 1 塩基の違いまでも認識できる検出方法が構築できた。この方法をもとに、遺伝子検出を蛍光ではなく電気化学的に検出することを考えた。PCR は溶液の中に、酵素をはじめとする様々な化合物を含むため、塩等の影響が少ない EIS を使って検討した結果、メディエーターにフェリシアン / フェロシアン ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) を使い、さらに DNA の特殊結合に特異的に結合しやすい化合物を第 2 メディエーターとして使うことで、PCR のモニタリングが可能であることがわかった。

We investigated a new method for monitoring polymerase chain reaction (PCR) using electro-chemical impedance spectroscopy (EIS).

First, we tried a method for detecting short RNA (miRNA) which about 20 bases using an already established fluorescence monitoring method for PCR, which monitoring system used specifically bind molecules to special structures of DNA and detected by fluorescence. As a result, we made a detection method recognizing a single nucleotide difference among 20 bases. Based on this method, we considered electrochemical detection of genes instead of fluorescence detection. In generally, PCR solution contains various substance such as enzymes. EIS doesn't get affected of the effect of contents in solution. The results showed that PCR can be monitored by using ferricyanide/ferrocyanide ($\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$) as a mediator and a compound that can easily bind specifically to special bonds in DNA as a second mediator.

1. はじめに

新型コロナウイルスの蔓延により、遺伝子検出法に注目が集まった。一般にウイルスの検出には抗原-抗体検査(イムノクロマトグラフィー)と遺伝子を増幅させて検出する遺伝子増幅反応(PCR 法: polymerase chain reaction)がある。この PCR 法はコロナウイルスの

蔓延時には毎日聞く言葉となり、単語も手法も非常に一般的になった。PCR法は1980年代に開発されて以来、DNAやRNAを分析、操作するための最も便利で直接的な方法となっている¹⁾。PCR法ではDNAの一部をプライマーと呼ばれる短いDNAと酵素を用いて指数関数的に増幅させ、検出を容易にさせる。増幅されたDNAは、電気泳動などでその存在を確認できるが、最も簡便かつ高感度の確認方法は、蛍光を使った検出法である。

我々は以前からDNAの特殊構造に特異的に結合して特徴的な蛍光を発する2,7-ジアミノナフチリジン誘導体(DANP)の合成を行ってきた(Figure1)²⁾。DANPはDNAのシトシンバルジ構造(C-バルジ構造：2本鎖DNAにおいて、シトシンの相手側の塩基がない構造)に結合して、UV吸収が大きく長波長側にシフトする。この波長で励起させて蛍光を測定すると、DANP-C-バルジ複合体構造に特徴的な蛍光を発する。この特徴を使って、我々はあらたなPCR法を開発してきた³⁾。

本研究では①蛍光検出のPCR法を使って、様々な核酸の検出への応用を行い、DNAのみならず、RNA、そして20塩基程度が連なったmiRNAの検出まで行うことを想定し、DNAに結合できる小分子リガンドを用いたDNAの蛍光検出方法について詳しく検討した。

一方、蛍光検出法では、様々なキットが開発され、検出方法としてはかなり簡便化されているが、ハード面では基本電気回路に加えて光学系一式が必要となり、現在以上の小型化が難しい。そこで、昨今の電気分野のハード面における様々な技術革新に伴い、装置の小型化、低価格化に対応できるような技術が開発されている電気化学的な方法を使った遺伝子検出法を考えた。電気化学的な方法は、現在、その検出感度の高さゆえに生じるシグナル強度の揺らぎや再現性の低さ、取り扱いの難しさなどから、特定の研究者のみが研究室で使える技術にとどまり、肝心の方法論の点で問題が残る。我々は電気化学インピーダンス分光法(EIS)を使った簡便、高感度、迅速な遺伝子検出法について検討した。

2. 実験方法

2.1 蛍光法を使ったmiRNAを検出する方法

我々が今まで検討してきたHpro-PCR法(Figure1参照)は⁴⁾、C-バルジ構造をもつヘアピン型DNA(Hpro)にDANPが結合した時に発する蛍光を使ってPCRの進行をモニタリングしている。そのため、PCRに使われるプライマー(tag-primer)の5'末端にヘアピン構造を形成できる一本鎖DNA(Hpro)塩基配列と相補的となっている塩基配列のDNAのタグ(tag)をつける。PCR前にはHproのヘアピン型DNAがtagと二本鎖構造を形成して開いた形になっている。PCRが進行するに

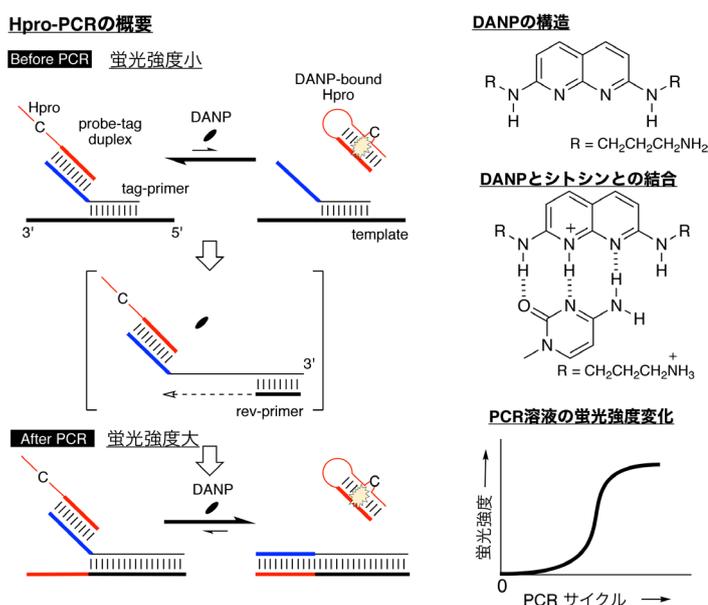


Figure 1. Hpro-PCRの概要とPCR溶液の蛍光変化

従ってヘアピン構造が遊離し、自発的に C-バルジ構造を含むヘアピン構造を形成し、そこに DANP が結合して蛍光を発する。この Hpro-PCR 法は DNA、RNA の検出は高感度で行うことが可能であるが、短い miRNA においては PCR の効率という点で問題が生じ、検出感度は劇的に落ちる。そこで Hpro-PCR 法においてプライマーの 5' 末端に付いている DNA タグを有効に使い、miRNA の検出を行った (Figure 2)。

Table 1 において miRNA (let-7a) の 2 本鎖の下線部は、reverse primer (7R) に相補的な、また太い下線部は RT-primer (7aF7S) と forward primer (7aF7) に相補的な配列である。また、7aF7, 7R の波線で表した Hpro に相補的な配列は、PCR 前にプローブが開いた形の構造を取るために必要な配列である。miRNA (let-7a) は DNA のタグがついた逆転写プライマー 7aF7S によって逆転写され、miRNA よりも 14 塩基長い cDNA を生成する。この cDNA をテンプレートにして PCR を行うと、cDNA の部分と 7aF7 の 21 塩基が相補的になる。一方、7R も cDNA と 11 塩基相補的になり十分に PCR が進行すると考えられた。これらをふまえてプライマー配列を設計し、PCR を行なった。

miRNA の検出法の概要

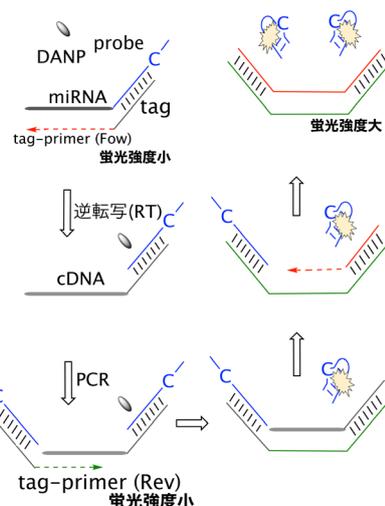


Figure 2. Hpro-PCR を使った miRNA の検出

Table 1. miRNA let-7a の配列と let-7a 用 PCR プライマーの配列

		Sequence 5'→3'
miRNA	let-7a	<u>UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU</u>
RT-primer	7aF7S	AGTAGATGATTTTT <u>AACTATA</u>
PCR forward primer	7aF7	<u>AGACAAAAGTAGTAGATGATTTTTAACTATA</u>
PCR reverse primer	7R	<u>AGACAAAAGTTGTAGATGATTTTTTGAGGTAGTAG</u>
Probe	Hpro	<u>A</u> TCACTCACAAC <u>TTTTGTC</u> IGTAATGATCTC

2.2 蛍光法を使ったmiRNAの一塩基の違いまで検出する方法

miRNA はその長さから、miRNA の一塩基のみの配列が異なるものが多数存在する。例えば Table 2 のように let-7a に対して、let-7b は 2 塩基、let-7c は 1 塩基異なる。これらの違いを Hpro-PCR 法を使って検出した。逆転写プライマー、PCR プライマーの長さ、および配列を検討し、それぞれを特異的に検出する方法を検討した。

Table 2. miRNA の let-7a, 7b, 7c の配列

	Sequence 5'→3'
let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUA <u>AU</u> AGUU
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGU <u>GUG</u> GUU
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUA <u>AUG</u> GUU

3. 蛍光法を使ったmiRNAを検出法における結果と考察

let-7a, 7b, 7c を検出するためにそれぞれに合致する RT、および PCR forward プライマ

ーを Table1 を参考にデザインした。また 7R, Hpro は let-7a, 7b, 7c に対して共通のプライマーおよびプローブとして使用した。

1~3 種類のテンプレート (let-7a, 7b, 7c) が入った溶液を、それぞれのプライマー、プローブを使って蛍光検出した結果を Figure3 に示した。三色のバーはそれぞれ let-7a, 7b, 7c 用の RT- および

forward primer を使用した時の PCR サイクル 35 回時の蛍光強度を示す。let-7a のみがテンプレートとして存在する時、let-7a 用の primer を使った時の蛍光強度のみが高く、存在していない場合では、ほぼゼロに近い。同様に let-7b, let-7c の場合も一致する primer を使った時の蛍光のみが強い。また 3 種類の miRNA が同一溶液中に同時に存在する場合、3 種類を同時に検出できた。これらのことから、miRNA の検出において、一塩基配列が異なる miRNA もこの Hpro-PCR 法で簡単に検出できることが明らかとなった。なおこの結果は、論文として既に投稿している⁵⁾

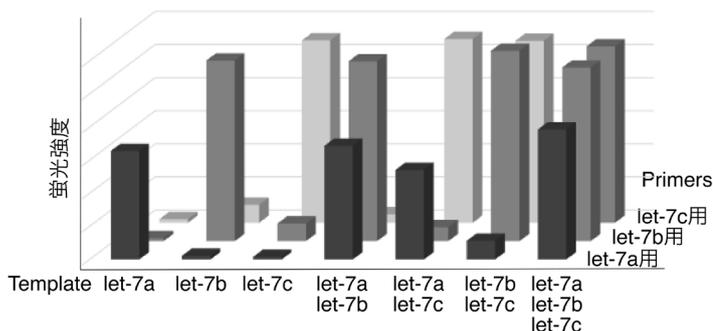


Figure3. Hpro-PCR を使った一塩基配列が異なる miRNA の検出

4. 電気化学的測定方法による遺伝子検出

4.1 炭素電極と第2メディエーターを用いた電気化学インピーダンス分光法 (electrochemical impedance spectroscopy, EIS) による遺伝子検出

PCR において増幅された DNA の検出法として、2.1 で述べた蛍光法の他にいくつかの方法がある。我々はそれらの方法の中で、特に電気化学的に検出する方法に着目した。電気化学的な検出法では、大きな機材が必要でなく、小型化が進むデバイスに載せやすいという利点がある。一般に電気化学的な測定法というとサイクリックボルタンメトリー (CV) が思い浮かぶ。しかし、CV 測定ではサンプルを多量に使うため、DNA を測定する場合、DNA の使用量と感度を考えると適当ではない。そこで我々は、電気化学インピーダンス分光法 (electrochemical impedance spectroscopy, EIS) を使い、インピーダンスの変化を測定し、DNA の増幅をモニタリングする方法を考えた。

インピーダンスを使う検出はいくつか報告があり、多くは金電極上にチオールを使って DNA を並べ、並べた DNA と検出ターゲットの DNA の相互作用によって検出している。しかしそれらの技術は決して簡単なものではなく、なかなか研究室の域を出ない。我々も電極、特に炭素電極の表面に DNA に特異的に結合する小分子を並べた電極を創生し、その電極を使った遺伝子検出を行うことを考え検討を重ねたが、定量的に結合させることが難しいこと、そして再現性がないことなどから電極の修飾については一旦中断し、EIS の特性を生かしたさらに簡単で誰でもが使える方法の構築を考えた。具体的には、DNA に水素結合する分子を用いた遺伝子検出系の構築を目指した。

インピーダンス法では水溶液中で使えるフェリシアン/フェロシアン ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{4+}$) をメディエーターとして用いている。 $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{4+}$ は特に DNA とは相互作用しない。我々は、ここにセカンドメディエーターとして DNA の 2 本鎖と相互作用する $\text{Ru}[\text{dppz}(\text{bpy})_2]^{2+}$ 錯体 (以下 Ru 錯体) を共存させることを考えた。Ru 錯体は DNA の 2 本鎖に結合する化合物であ

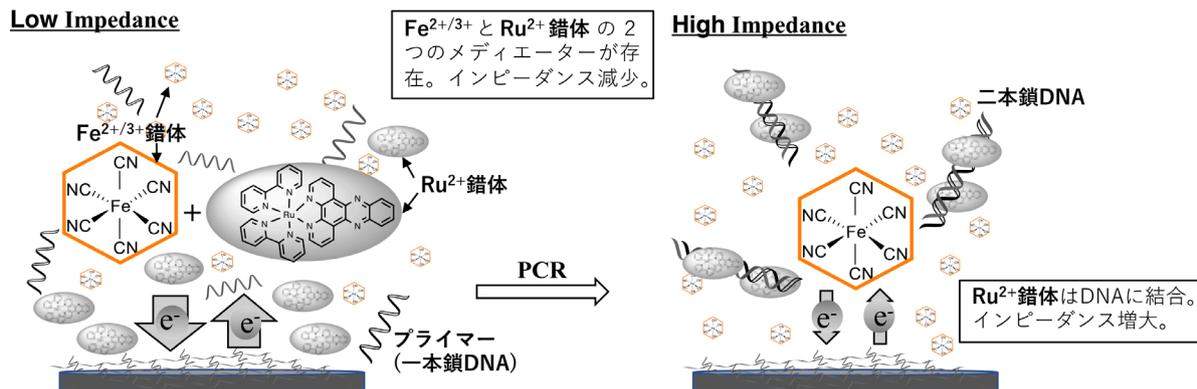


Figure4. 第2メディエーターを含む溶液を使ったDNAの増幅におけるインピーダンス測定

る⁶⁾。また溶液中に存在すると溶液のインピーダンスの値が劇的に減少するという性質を持つ⁷⁾。PCR溶液においては、PCR前には一本鎖DNAのみが存在しており、Ru錯体はDNAに結合できない。PCRが進行するにつれて2本鎖DNAの量が多くなるため、Ru錯体は2本鎖DNAに結合し、インピーダンスの値が増大すると考えられる(Figures 4, 5)。使用する Fe^{2+}/Fe^{3+} の濃度は1mMであるのに対して、Ru錯体は1uM程度と量は少なく、Ru錯体がDNAに全て結合可能な量を使い測定する。このインピーダンスの変化を連続的に測定することで、DNAの量が増加しているか否かをモニターすることが可能となる(Figure5)。

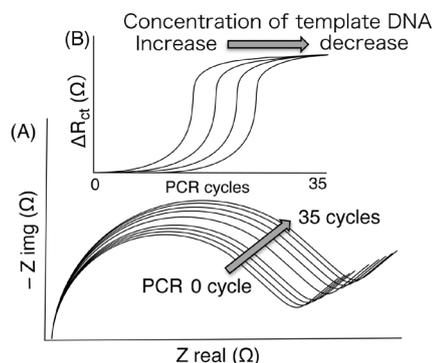


Figure5. PCRの進行に伴い変化するインピーダンスのスペクトルイメージ図 a) PCRの進行にともなうEISスペクトル変化 b) 蛍光法によるリアルタイムPCRの進行とスペクトル変化

Fe^{3+}/Fe^{4+} 1mM、Ru錯体1uMを含むKOD酵素(ROYOBO)を用いたPCR溶液に電極として炭素の塗布電極(Yoshida Co. Glassy carbon electrode)を浸してPCRを行ない、1サイクル毎にインピーダンスを測定した結果、PCRの進行によってその値は徐々に増大することが明らかとなった。このことから、DNAに特異的に結合する第2メディエーターを使ったインピーダンス法によって、PCRの進行をモニタリングできることがわかった⁷⁾。これは第2メディエーターを使ったインピーダンス法による初めての遺伝子検出系である。さらに現在、 Fe^{3+}/Fe^{4+} とRu錯体の電極に対する相互作用について詳細に検討している。

4.2 新たにインピーダンスに影響を与える分子の開発

4.1で述べたように、DNAへの結合分子、かつ第2メディエーターとしてRu錯体を使うと、PCRによってDNAが増幅しているか否かのモニタリングが可能である。第2メディエーターは、DNAに結合できること、適度な速さで Fe^{3+}/Fe^{4+} と電子のやりとりができる特徴がある。そこでDNAのC-バルジ構造に特異的に結合するDANPを使うことを考えた。Ru錯体使用時と同様に、溶液にDANPを徐々に加えていき、その時のインピーダンス変化を測定した(Figure6)。残念なことに、DANPそのものは第2メディエーター能があまり高くない(Figure6b)。そこで、DANP誘導体を新たに合成して、第2メディエ

ーターとして使うことを考えた。Figure6に示した DANP 誘導体(DANP-NO₂)は DANP 上に置換基ニトロベンジル基を持つ。EIS 用の Fe³⁺/Fe⁴⁺が入った緩衝溶液に DANP-NO₂ 溶液を加えていくと、Ru 錯体が持つ特徴の一つであるインピーダンスを減少させる特性と同じ性質が観測された(Figure6)。

この DANP-NO₂ を含む PCR 前後の溶液を用いてインピーダンスを測定し、そのスペクトル変化を測定した(Figure7)。Ru 錯体を第2メディエーターとした場合、PCR 前に比べて PCR 後は 20% 以上測定値(Rp 値)が大きくなるのに対し、DANP-NO₂ では Rp 値の変化が約 5%と割合が低い。これは DANP-NO₂ の第2メディエーター能が Ru 錯体に比べて 20%低いことだけでなく、DANP-NO₂ の DNA の C-バルジ構造に対する結合能が影響しているものと考えられる。今後さらに第2メディエーターとして相応しいものを探索し、このインピーダンスを使った DNA の PCR モニタリング法を確立する。

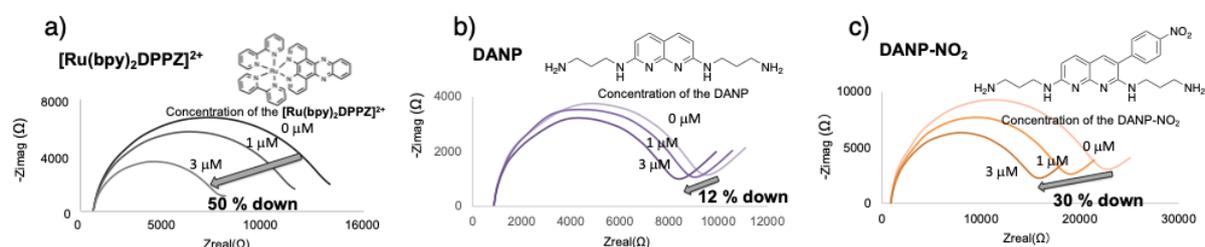


Figure6. 第2メディエーターを加えた時のインピーダンス測定におけるスペクトル変化。
a) Ru[dppz(bpy)₂]²⁺, b) DANP, C) DANP-NO₂ 溶液: KOD Fx buffer (TOYOBO)⁺3 mM Fe³⁺/Fe⁴⁺、電極: 炭素塗布電極(Yoshida Co. Glassy carbon electrode)

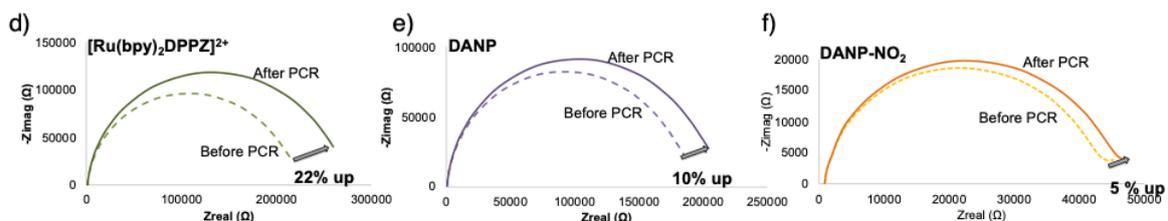


Figure7. PCR 前後におけるインピーダンスのスペクトル変化 d) Ru[dppz(bpy)₂]²⁺, e) DANP, f) DANP-NO₂。溶液: KOD Fx buffer (TOYOBO)⁺3 mM Fe³⁺/Fe⁴⁺、電極: 炭素塗布電極(Yoshida Co. Glassy carbon electrode)

5. 結論

本研究では遺伝子検出法として長い DNA から短い遺伝子である miRNA の検出法の確立を行い、さらに新たな検出法である電気化学的な PCR 検出法を検討し、様々な遺伝子検出を電気化学的に可能にする方法へと展開した。

miRNA の検出では、我々がすでに開発した Hpro-PCR 法において、PCR に使われる primer の末端に結合した DNA-tag が PCR の効率を上げるのに役立ち、短い miRNA の一塩基の違いまでも蛍光で検出できた。これはほとんど方法がない miRNA の検出に大いに役立つ。

また電気化学的な検出法では、まず電極、特に炭素電極の表面に DNA に特異的に結合

する小分子を並べた電極を創生し、その電極を使った新たな遺伝子検出法を検討した。残念なことに結合法、再現性などの点で問題が残り、現在はまだ解決されていない。そこで新たに EIS の特性を生かしたさらに簡単で誰でもが使える遺伝子検出方法の構築を考えた。DNA と特異的に結合する第 2 メディエーターを使うという新たな考えのもと、Ru[dppz(bpy)₂]²⁺ 錯体を使った DNA の検出法を確立した。メディエーターとして使われる Fe³⁺/Fe⁴⁺ と同時に第 2 メディエーターを使う方法は、電極上に DNA を固定化する方法が一般的だった今までの方法に比べて簡単かつ、誰にでもできる方法である。また、DNA の特殊構造に特異的に結合する DANP 誘導体を使った方法では、Ru 錯体と比べてインピーダンスへの影響は小さかったが、DNA の特殊構造に特異的に結合する点で、今後 DNA のマーカーとして電気化学的に検出できる可能性を秘めている。さらにどのような分子が結合可能かを調べていくことによって、電気化学的に一塩基の違いまで遺伝子を検出できる高感度の検出系の確立ができると考えている。

6. 謝辞

本研究は 2020 年度の日本板硝子材料工学助成会の研究助成を受けておこなったものである。同助成会には心より感謝いたします。

7. 参考文献

- [1] C. A. Heid, J. Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, *Genome Res.* **1996**, 6, 986.
- [2] H. Suda, A. Kobori, J. Zhang, G. Hayashi, K. Nakatani, *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, 13, 4507.
- [3] F. Takei, M. Igarashi, M. Hagihara, Y. Oka, Y. Soya, K. Nakatani, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 7822–7824
- [4] F. Takei, K. Nakatani, *Chem. Commun.* **2017**, 53, 1393-1396.
- [5] F. Takei, M. Akiyama, Y. Dateki, *Bioorg. Med. Chem.* **2021**, 46, 116363-116367.
特許：特許第 6744531 号
- [6] E. C. Long, J. K. Barton, *Accounts of Chemical Research* **1990**, 23, 271-273
- [7] K. Nobsawa, H.-W. Han, F. Takei, T. C., Chu, N. Hashida, I. Yamashita, *Anal. Chem.* **2022**, 94, 7747-7751