

医療分野における光電気化学の応用 光電気化学手法を用いたDNAの検出法の開発

A DNA detection method based on photoelectrochemical interface

池上和志・宮坂 力

桐蔭横浜大学大学院工学研究科

(2014年9月20日 受理)

はじめに

医療分野で広く行われている心電図、筋電図、脳波の計測には、電気化学が深く関わっている。また、生体の外部からの電気刺激により、筋肉が収縮する現象は、医療現場でも治療法の一つとして確立している。生理学者であったガルバニが、解剖したカエルの足の筋肉が電気刺激により収縮することを発見し、さらに、ガルバニ電池としてその名前が、電気化学の教科書にも残っていることも、生物学と電気化学の密接な関係を示している。

生体の細胞は、英語では、セル (Cell) であるが、これは、小部屋を意味するラテン語に由来する。細胞は、塩化ナトリウムや塩化カリウムのような電解質が溶解した電解液 (水溶液) が、イオンや水分子を通過させることができる細胞膜によって外部の電解液から隔てられた構造をしている。日常的に我々が使っている電池も、英語では、セル Cell と訳されることがある。電池の構造をみると、やはり、電解質が溶解した電解液が機能性膜で仕切られた小部屋の構造であり、生体における細胞と電池の間には構造の類似性が

ある。異なる電解液が、半透膜のようなイオンや水を透過する界面においては電位差 (電圧) が生じるが、これが、生体においては、心電図などに現れる生体電位であり、電池では、電池の起電力である。それらの原理は、電気化学の理論で説明することができる。

これらの電解液と機能性界面が関わる電気化学現象は、生体反応のみならず、様々な分析手法にも広く活用されている。身近なところでは、血糖値を測定する携帯型の血糖値センサーや、酸素センサー、また、化学の実験などで用いる pHメーターも、電気化学の原理に基づくものである。このような計測器は、電解液を隔てる機能性界面の内外での電位差を測定しているものであり、これらの現象は、生体における神経系などの情報伝達の現象などの理解を深めるためにも、極めて重要である。

医療・生物化学と、電気化学に関しては、様々な接点があるが、本稿では、その一例として、筆者らが研究を進めている、新しい光電気化学手法を用いたDNAの検出方法のモデル実験の結果と、今後の展開について述べる。

光電気化学界面を活用したDNA検出法

DNAの塩基配列の検出は、生物学、遺伝学、創薬の分野においても極めて重要である。これらの研究の進展のためには、迅速かつ簡便な塩基配列の検出が必要であり、様々な方法が提案されている。DNAは、相補的な塩基対を形成することが知られている。特定の塩基配列の検出のためには、PCR法によって目的遺伝子を増幅することで、ハイブリダイゼーションをさせた場合の検出感度を向上させている。PCR法では、遺伝子を増幅のための時間が必要であり、迅速測定のためには、検出感度をあげることが必要となる。検出感度をあげるために、目的の遺伝子配列に蛍光色素を導入し、二量体を形成したときに観測される特有のエキシマー（励起二量体）蛍光を画像で観測する方法などが提案されている¹⁾。しかしながら、このような光検出を用いる方法では、検出感度は高いものの、DNAへの蛍光色素の導入が必要になることや、蛍光を測定するための画像検出装置が必要になり、さらに、簡便な検出方法が必要になると考えられる²⁾。

そこで、我々は、DNAの簡便な検出法として、電気化学界面における色素増感光電流を、色素に固有の作用スペクトルとして検出

する方法について研究を進めた。その原理は、酸化チタン多孔膜に吸着した二本鎖DNA (ds-DNA) にインターカレートした増感色素を光励起することで、発生する増感光電流を検出するというものである。本手法によるDNA検出法の確立と適用範囲を検討する目的で、一塩基多型の識別が可能であるか、検討を行った。

酸化チタン半導体電極は、光電気化学セルの光電極³⁾としての利用や、光触媒による環境浄化などにも広く用いられている⁴⁾。酸化チタンは、電解液中において、その表面には水酸基などが露出していると考えられ、カルボキシル基、ヒドロキシル基、リン酸基などを持つ分子を、エステル結合によってその表面に固定化することができる。この現象は、実用化を目指して研究が進められている色素増感太陽電池の色素吸着にも活用されている。一方、DNAは、塩基と糖、リン酸からなるヌクレオチドが、リン酸エステル結合で連なった生体高分子である。DNAの骨格を成すリン酸は、酸化チタン表面に吸着することができる。つまり、酸化チタン電極には、DNAを固定化することができる(図1)。酸化チタン電極上の二本鎖DNAに酸化チタンの伝導体に電子注入が可能な色素をインターカレートさせることができれば、光増感電流を検出することも可能となる(図2)。

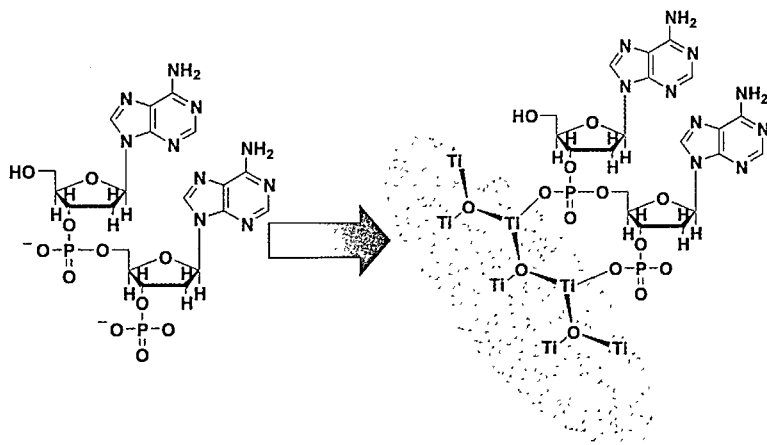


図1 酸化チタン表面へのDNAの吸着の模式図

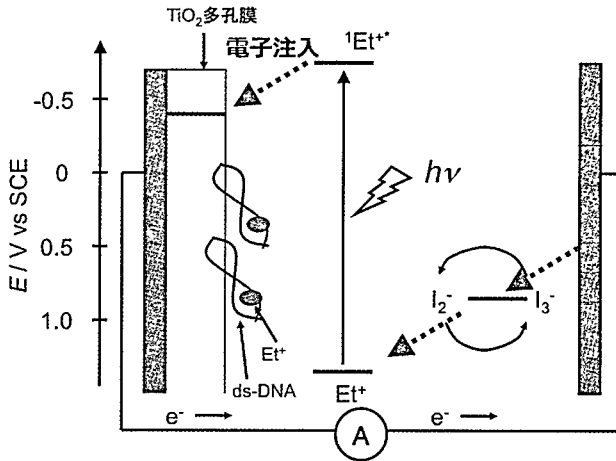


図2 DNAにインターカレートした色素 (ここでは、エチジウムブロマイド Et^+) による増感光電流の検出のエネルギー図

FTO ガラスに酸化チタンナノ粒子ペーストをコーティングし、 550°C で焼成することで、酸化チタンナノ多孔膜電極を作製した (図3)。

この電極を DNA の溶液 ($0\text{ M}-10\ \mu\text{M}$, $33\ \mu\text{L}$) に一定時間浸漬することで、DNA を酸化チタンナノ多孔膜に吸着させた。

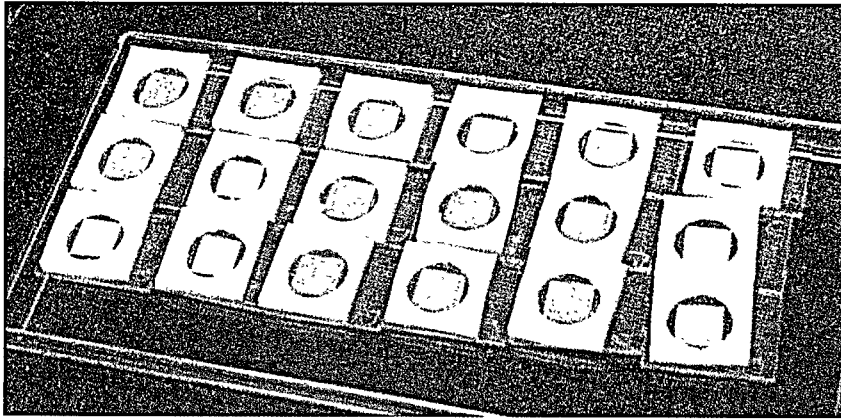


図3 DNAを吸着させる酸化チタン光電極。モデル実験では、 $7\text{ mm} \times 7\text{ mm}$ の酸化チタン光電極を用いた。

DNA を吸着させた多孔膜電極に、二本鎖 DNA にインターカレートすることが知られているエチジウムブロマイド (EtBr) の溶液を滴下した。電極を洗浄後、対極とはさんで、ヨウ素系有機溶媒電解液を注入し、光照射下の光電流スペクトルを IPCE (対入射光量子効率) として測定した。

本手法で用いることができる増感色素の条件は、図4にあげたように、色素自身は酸化

チタン多孔膜には吸着しないが、二本鎖 DNA に特異的にインターカレートすることである。このような条件を満たす色素の一つに、エチジウムブロマイド (EtBr) があげられる (図5)。 EtBr は、ds-DNA にインターカレートすることによって蛍光量子収率が增大するので、蛍光法による DNA 検出に広く用いられている。 EtBr の酸化電位は、 $+1.4\ \text{V}$ vs SCE と報告されている⁵⁾。

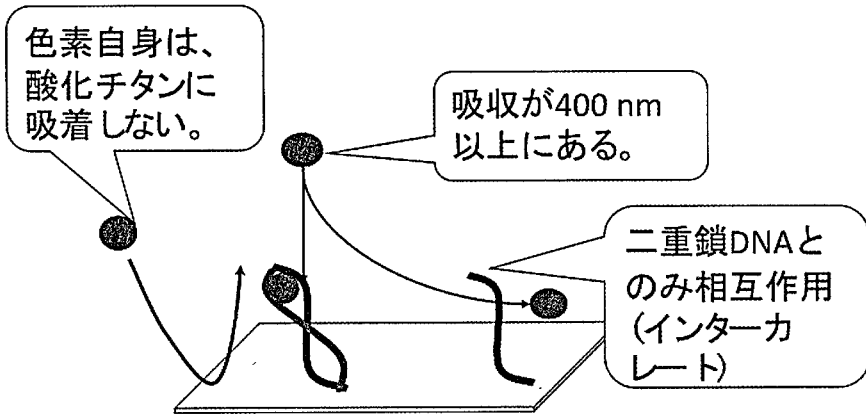


図4 本検出手法に用いることができる増感色素の条件

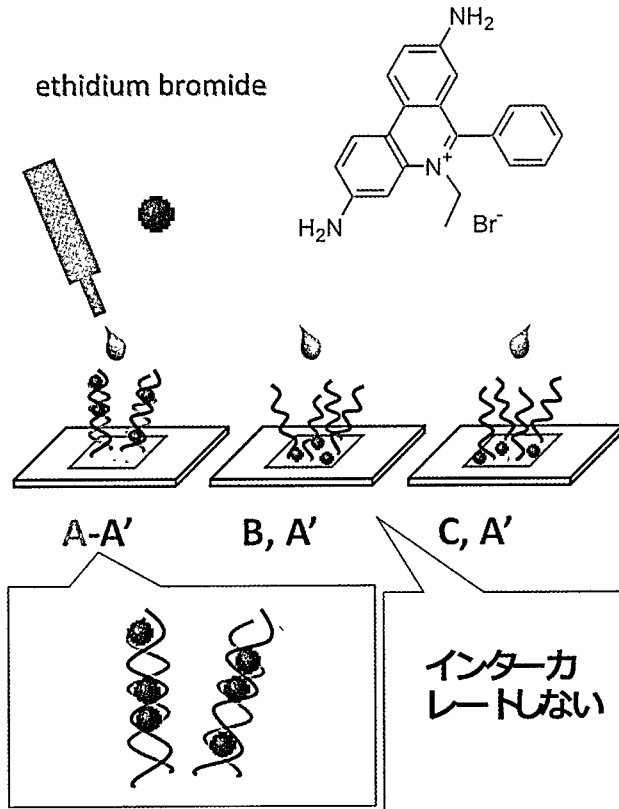


図5 エチジウムブロマイド (EtBr) の分子構造と、二本鎖DNAの検出の模式図

EtBr の励起エネルギー (2.2 eV) を考慮すると、EtBr の励起一重項状態は、酸化チタン多孔膜電極へ増感光電流を与えるのに、十分な電位をもっていることがわかる (図 2)。

モデル実験においては、単純な塩基配列である、アデニンおよびチミンの 12 量体の配列を用いて実験を行った。実際に、酸化チタン電極をアデニンの 12 量体 (12A) とチミンの 12 量体 (12T) を混合して調整した溶液に浸漬させ、EtBr によって処理したのち光電気化学セルを作製して光照射を行い、光電応答

の作用スペクトルが得られるかどうか確認をした。その結果を図 6 に示した。図 6 における IPCE スペクトルで、500 nm 付近に観測されているピークが、EtBr に基づく増感光電流である。一方で、アデニン 12 量体の 1 つの塩基をチミンに置き換えたもの (11A1T) とチミン 12 量体 (12T) の組み合わせでは、検出される IPCE 値が低かった。このことは、12 量体における一つの塩基配列の違いを、光電気化学的な手法により検出できたことを示している。

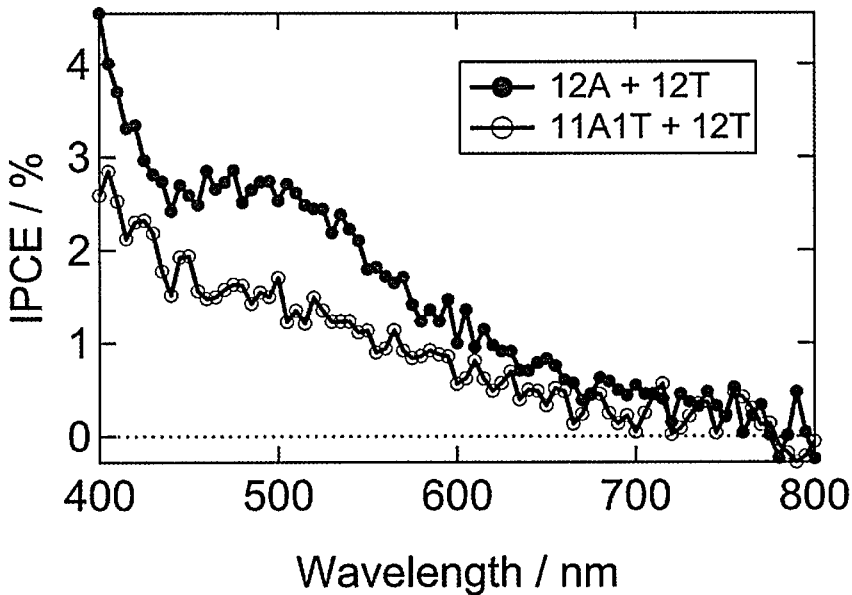


図 6 エチジウムブロマイド (EtBr) をインターカレートした二重鎖 DNA に基づく光電流応答の作用スペクトル

今後の展開

酸化チタン光電極に DNA を固定化することで、二重鎖 DNA にインターカレートした色素の光吸収による増感光電流を検出できることが原理的に可能であることを明らかにした。今後は、検出感度を上げるための、増感色素の選定、または、その他周辺部材の改良

研究を進める計画である。また、酸化チタン光電極のアレイ化を進め、DNA 検出チップとする方法についても、研究を進める計画である。電流・電圧測定に関しては、測定装置の検出限界も向上しており、計測の迅速化と測定装置の小型軽量化についても設計と製作を進める。

謝辞

本研究をはじめるにあたり、本学医用工学部教授・西村裕之先生には大変お世話になりました。この場をかりてお礼申し上げます。

【参考文献】

1. M. Watanabe, S. Kumamoto, M. Nakamura, K. Yamana, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17, 1494-1497 (2009)
2. Y. Ohshita, Y. Fukunaga, M. Nakamura, K. Yamana, *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16, 78-83 (2008)
3. B. O'Regan and M. Grätzel, *Nature* 353, 737 (1991)
4. 藤嶋昭、瀬川浩司、光機能化学—光触媒を中心にして、昭晃堂 (2005)
5. Fukuzumi, M. Nishimine, K. Ohkubo, N.V. Tkachenko, H. Lemmetyinen, *J. Phys. Chem. B*, 107, 12511 (2003).