

微量生体分子の迅速分析法の提案とそのマイクロデバイス化

国立研究開発法人産業技術総合研究所 栗田僚二

私は微細加工技術や自己組織化材料を利用して固液界面の分子濃度を制御することで、従来測定困難な極微量の生体分子を高い時空間分解能で定量可能なバイオセンサの研究開発を行ってきた。マイクロ分析の特徴である高い比表面積を活用するには表面反応・分析が適していると考え、微小流路内への電極の集積化により電極上に広がる目的分子の拡散層を薄層化することで、高 S/N 比を有する電気化学(発光)式、および、表面プラズモン共鳴 (SPR) 式のバイオセンサを実現してきた。その例として、金-チオール結合による表面濃縮に伴う高輝度電気化学発光現象を見だし、さらに酵素免疫測定法を組み合わせた高感度免疫測定法を考案することで、極微量タンパクやメチル化 DNA の計測に成功した。また、標識酵素の生成物を自己組織化材料とする、或いは、レドックスポリマーの酸化還元に伴う収縮・膨潤を SPR 角度変化として読み取ることで、小分子に対する SPR センサの感度を向上させることに成功し、手のひらサイズの SPR 装置を用いたヒト血液中に含まれる疾病マーカーや DNA メチル化のオンサイト検出を実現した。本稿ではこれらの研究成果の一部をご紹介します。

DNA やイムノアッセイの検出手法として、電気化学発光 (ECL) 法の利用が報告されている。ECL を利用した免疫測定法では、励起光を用いないため簡便な装置でバックグラウンドの極めて低い測定が可能である。一方、酵素標識免疫測定法 (ELISA) では、標識酵素の触媒作用により適切な酵素反応時間を設けることでシグナルを大幅に増幅可能である。そこで、これらの2つの長所を融合させ、酵素標識抗体からの生成物を ECL 法により検出する新規免疫測定法 ECL-ELISA の開発を行った。標識酵素であるコリンエステラーゼは、アセチルチオコリンを基質としてチオコリンを生成する。このチオコリンは末端にチオール基を有しており金電極表面に濃縮可能である。さらに、この金電極をルテニウムトリスビピリジン錯体溶液で電気化学的に励起 (酸化) した際にラジカルを生成し発光する。本法により極微量のメチルシトシンを検出可能であった。

高感度なメチルシトシン検出法として ECL 法による検出を試み、微量 DNA 中に含まれるメチルシトシンを検出可能になってきた。しかしながら、もう一つ重要なシーケンス選択性の問題がある。そこで、DNA バルジを利用したシーケンス選択的なメチルシトシンの免疫測定法を考案した。グアニンと塩基対を形成したメチルシトシンは2本鎖の内側を向いているため嵩高い抗体には全く認識されない。一方、バルジ内に配置されたメチルシトシンは運動性が高く、2本鎖 DNA の外を向いている時間を有していることを見出した。上記 DNA バルジ構造を利用することで、イムノアッセイにおいてもシーケンス選択的に DNA のメチル化解析が可能になった。従来のバイサルファイト反応や PCR、電気泳動等による分離操作を用いずに検出することが可能になるため、迅速・簡便に特定遺伝子領域のメチル化解析に有用であると考えている。

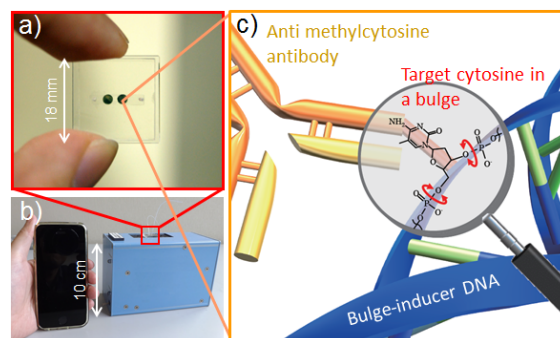


図 a) マイクロセンシングチップ、および、b) 携帯型表面プラズモン共鳴角測定器の写真、c) DNA バルジ内メチルシトシンへの選択的な抗体結合を示す模式

(参考文献) [1] Kurita et al., *Analytical Chemistry*, 87 (2015) 11581-11586. [2] Kurita et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 70 (2015) 366-371. [3] Kurita et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 48 (2013) 43-48. [4] Kurita et al., *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 1799-1803. [5] Nakamoto and Kurita et al., *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 3187-3191. [6] Kurita et al., *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 7533-7538. [7] Futahashi and Kurita et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 109 (2012) 12626-12631. [8] Nakamoto and Kurita et al., *Nanoscale*, 3 (2011) 5067-5075. [9] Kurita et al., *Analytical Chemistry*, 82 (2010) 1692-1697. [10] Nakamoto and Kurita et al., *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2010) 1536-1542. [11] Kurita et al., *Analytical Chemistry*, 79 (2007) 9572-9576. [12] Kurita et al., *Analytical Chemistry*, 78 (2006) 5525-5531.