DNA ハイブリダイゼーションにともなう アントラキノン修飾 DNA の電気化学応答

熊本 諭, 中野 英彦, 松尾 吉晃, 杉江他曾宏, 山名 一成*

姫路工業大学工学部応用化学科 (〒671-2201 姫路市書写 2167)

Hybridization-dependent Electrochemical Responses of Anthraquinone-modified Oligonucleotides

Satoshi KUMAMOTO, Hidehiko NAKANO, Yoshiaki MATSUO,
Yoshihiro SUGIE, and Kazushige YAMANA*

Department of Applied Chemistry, Himeji Institute of Technology (2167 Shosha, Hyogo 671-2201, Japan)

Received April 26, 2002 ; Accepted July 15, 2002

We have already shown that introduction of anthraquinone via a one-carbon linker into the sugar 2'-position of oligonucleotide provides a probe with high affinity and specificity in hybridization to DNA. In this paper, electrochemical properties of the anthraquinone-modified oligonucleotides (AQ-ODN) in an aqueous solution have been investigated to clarify the potential of AQ-ODN as an electrochemical probe of DNA. Positive shift of $E_{1/2}$ and decrease in the peak current intensity of AQ-ODN were observed upon hybridization. Intercalation of the anthraquinone moiety and increase of the molecular size due to the hybridization are most likely responsible elements for these electrochemical changes.

Key Words : Redox-active Intercalator, Electrochemical DNA Probe, Anthraquinone-modified Oligonucleotide, Cyclic Voltammetry

1 緒 言

ヒトゲノム全塩基配列の解読終了とともに、ゲノム研究の中心は遺伝子の発現機構の解明を目的とした機能ゲノミクスに移行し、塩基配列情報にもとづいた遺伝子診断、遺伝子治療、およびゲノム創薬、さらには、ゲノム塩基配列の個人差 (SNPs: 一塩基多型) に応じたテーラーメイド医療、への応用が期待されている。したがって、特定の塩基配列を検出、識別する方法は、これらの目的を達成するうえで基本技術として重要である。特に、固相表面にあらかじめ塩基配列の分かっているオリゴヌクレオチドを高密度に固定化した DNA チップは、多数の遺伝子を同時並行的に分析することが可能であり、DNA 塩基配列を調べるツールとして非常に注目されている。しかしながら、現在の蛍光を基盤とした DNA チップは、その作製と DNA ハイブリダイゼーションの検出に特殊な装置を必要とすることから、より簡便で効率の良い検出法の開発が期待されている。

近年、DNA の特定の塩基配列を検出する新しい手法として電気化学応答を基盤とした方法が注目され、様々なアプローチが試みられてきた。DNA 2 本鎖に対して親和性を有するレドックス活性な化学種を利用して、DNA との相互作用に起因する電気化学応答をモニターして検出を行う方法が報告されている。竹中らは、DNA インターカレーターであるフェロセン化ナフタレンジイミドは金電極上に固定化された DNA 1 本鎖と比較して DNA 2 本鎖に対して高い親和性を

有することを示し、これを利用した電気化学的な DNA ハイブリダイゼーションの検出法を報告している¹⁻³⁾。Barton らは、DNA を経由する電子移動を利用したミスマッチ検出のためのプローブとして、ダウノマイシンやメチレンブルーを利用する方法を報告している⁴⁻⁶⁾。また、別のアプローチとして、レドックス活性分子をオリゴヌクレオチドの特定の部位に共有結合で導入し電気化学プローブとして用いる方法が報告されている⁷⁻¹⁰⁾。

われわれは、アントラキノン短鎖のリンカーを介してオリゴヌクレオチドの糖部位に導入する簡便で一般的な方法を開発し、アントラキノン修飾オリゴヌクレオチド誘導体が相補鎖 DNA とアントラキノン基のインターカレーションに由来する高い親和性を有することを明らかにしている¹¹⁻¹²⁾。また、アントラキノン修飾オリゴヌクレオチド誘導体における完全に相補的な 2 本鎖とミスマッチ塩基を含む 2 本鎖について、半解離温度 (T_m) の有意な差が観察されたことから、アントラキノン基をオリゴヌクレオチドに修飾したのちに、DNA とのハイブリダイゼーションにおける塩基配列特異性が、未修飾オリゴヌクレオチドと同様に保たれていることを示した¹²⁾。したがって DNA 糖部 2' への標識法は、DNA 2 本鎖の所定の塩基対間へアントラキノン代表とするレドックス活性分子をインターカレートするための有用な方法であると考えられる。

本論文では、電気化学応答を利用した新しい DNA チップ

の開発のための基礎的な知見を得ることを目的として、水溶液中におけるアントラキノン修飾オリゴヌクレオチド誘導体の DNA ハイブリダイゼーションに関連した電気化学的諸特性を検討した結果の詳細を報告する¹³⁾。

2 実験

2.1 試薬

アントラキノン-2-カルボン酸 [AQCOOH] およびデオキシリボ核酸 (from Herring Sperm) はそれぞれ東京化成工業株式会社およびナカライテスク株式会社から購入した。アミダイト試薬および CPG サポートを含むすべての DNA 合成用試薬は、Cruachem 社のものを使用した。5'-O-Dimethoxytrityl 2'-O-(2-anthraquinonylmethyl) uridine phosphoramidite の合成は、既報に従って行った¹²⁾。DNA 合成用のアセトニトリルは水素化カルシウム存在下窒素雰囲気中で蒸留を行い、3 Å モレキュラーシーブ上で保存したものをを用いた。塩化メチレンは上記と同様の方法で蒸留し、水素化カルシウム上で保存したものをを使用した。精製水 ($\rho = 17.5 \text{ M } \Omega \text{ cm}$) は、Barnstead Easy Pure によって作製した。その他の試薬は、すべて特級のものを使用した。

2.2 測定

^1H NMR 測定は、Bruker DRX-500 を用いて行った。紫外—可視スペクトル測定は、HITACHI UV-3000 分光光度計を使用した。測定試料は、試薬混合後 10 h 以上室温で静置し平衡化を行ったのち紫外—可視スペクトル測定に使用した。サイクリックボルタンメトリー測定は、BAS Model CV-50W を用い、リン酸緩衝液 (10 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH=7.0) または Britton-Robinson 緩衝液 (pH=3~10) を支持電解質溶液として測定を行った。作用電極に Glassy Carbon ($\phi = 5 \text{ mm}$)、対電極に Pt、参照電極に Ag/AgCl 電極を使用し、測定前に 20 分間窒素ガスを通気し溶存酸素を除いて通常の 3 電極方式で行った。すべての電気化学測定は、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ で行った。

2.3 オリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドの合成は、DNA 自動合成機 (ABI 394 DNA/RNA Synthesizer) を用いて行った。得られたオリゴヌクレオチドはアンモニア処理による固相担体からの切り出しののち 20% 変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製した。合成したオリゴヌクレオチドは、酵素分解法により塩基組成の分析を行い、目的のオリゴヌクレオチドであることを確認した¹²⁾。

2.4 N -[[2-(N,N -Diethylamino)ethyl]amino]-2-anthraquinonecarboxamide Hydrochloride [AQC2N⁺] の合成¹⁴⁾

Anthraquinone-2-carbonyl chloride 0.25 g を塩化メチレン 20 mL に懸濁させたのち、 N,N -(diethylamino)-ethylamine 0.11 g を塩化メチレン 10 mL に溶解した溶液を加え、2 h 室温で攪拌し反応を行った。反応溶液は濃縮後シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製した (dichloromethane/methanol, 9:1, v/v)。得られたフラクションの溶媒を除いたのち少量の塩化メチレンに溶解させ、ジエチルエーテル 200 mL 中に滴下し淡黄色の沈澱として目的物を得た (0.14 g, 39.3%) [AQC2N⁺: TLC (dichloromethane/methanol, 9:1, v/v) $R_f = 0.42$; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.46 (t, 6H, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 3.24 (q, 4H, $J = 7.2 \text{ Hz}$), 3.34 (t, 2H, J

$= 5.1 \text{ Hz}$), 3.98 (q, 2H, $J = 5.3 \text{ Hz}$), 7.81-8.95 (m, 7H), 9.37 (t, 1H)]

2.5 インターカレーションの Scatchard 解析

AQC2N⁺ と DNA 2 本鎖の相互作用の解析は、紫外—可視スペクトルにより異なる濃度の DNA 2 本鎖存在下で AQC2N⁺ の吸光度を測定し Scatchard の式 eq. (1) に適用することにより行った。

$$\nu/C = K(\nu_m - \nu) \quad (1)$$

ここで用いられる記号は、それぞれ、 C : 未結合試薬の濃度 (M), ν : DNA 塩基対あたりの結合試薬のモル数, ν_m : 飽和結合数, K : 結合定数 (M^{-1}) である。

3 結果

3.1 アントラキノンモノマーおよびアントラキノン修飾 DNA

アントラキノン-2-カルボン酸 [AQCOOH], アントラキノン誘導体 [AQC2N⁺], アントラキノン修飾オリゴヌクレオチド誘導体 [AQ-ODN, AQ-ODNsc] について一連の測定を行い、その電気化学的挙動を比較検討した。AQCOOH, AQC2N⁺ の化学構造をそれぞれ I, II に示し、アントラキノン修飾オリゴヌクレオチド誘導体 [AQ-ODN, AQ-ODNsc] および相補鎖 [Target] のシーケンスを Table 1 に示した。またアントラキノン修飾オリゴヌクレオチド誘導体におけるアントラキノン導入部位の化学構造を III に示した。

Table 1 Abbreviations and sequences of anthraquinone-modified and unmodified oligonucleotides.

Abbreviation	Sequence
AQ-ODN (15-mer)	5'-dACAU(2'AQ)GCAGTGTGAT
Target (15-mer)	5'-dATCAACACTGCATGT
AQ-ODNsc (10-mer)	5'-dCCU(2'AQ)AGCTAGG

Fig. 1 Half-wave potential ($E_{1/2}$) of AQ-ODN plotted against pH. The pH ranged from 3.0 to 10.0. Scan rate was 100 mV/s.

Fig. 2 a) Cyclic voltammogram of AQCOOH, b) Cyclic voltammogram of AQ-ODN, c) Logarithm of cathodic peak current plotted against logarithm of scan rate. ○ = AQCOOH, ● = AQ-ODN. The measurements were carried out at the same concentration (67 μ M) in a buffered solution containing 10 mM phosphate, 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.0.

AQCOOH は、水溶性を示すアントラキノン誘導体のなかでも比較的単純な構造であることから、アントラキノン修飾 DNA のレドックス特性を検討するうえで参照物質として選択した。アントラキノン誘導体 [AQCN⁺] は、カチオン性を示すことから、静電的相互作用により DNA に対して親和性を有し、良好なインターカレーターであることが Breslin と Schuster によって報告されている¹⁴⁾。AQ-ODN はオリゴヌクレオチド中のウリジン糖部 2' 位にアントラキノン基を共有結合で導入したオリゴヌクレオチド誘導体であり、アントラキノン基が核酸塩基間にインターカレーションすることにより相補鎖と安定な 2 本鎖 ($T_m = 60^\circ\text{C}$) を形成することが明らかにされている¹²⁾。また AQ-ODNsc は、自己相補的シーケンスを有する AQ-ODN 類似体である ($T_m = 64^\circ\text{C}$)¹¹⁾。

3.2 1 本鎖アントラキノン修飾 DNA のレドックス応答

AQ-ODN の酸化ピーク電位と還元ピーク電位の中間電位 $E_{1/2}$ を、広い pH 範囲においてサイクリックボルタンメトリーにより測定した。溶液の pH 値に対して 1 本鎖 AQ-ODN の $E_{1/2}$ をプロットした図を Fig. 1 に示した。 $E_{1/2}$ は溶液中の水素イオン濃度に依存して直線的に変化し、その傾きは -57.3 mV/pH であった。

また、同濃度 (67 μ M) の AQCOOH と AQ-ODN についてサイクリックボルタンメトリー測定を行った。 Fig. 2a), b) にそれぞれ AQCOOH および AQ-ODN のサイクリックボルタモグラムを示した。両方のボルタモグラムにおいてアントラキノン基に由来する酸化還元ピークが観察されたが、同走査速度におけるピーク電流値は、AQCOOH について AQ-ODN よりも約 10 倍大きい値が観察された。また、 Fig. 2c) に AQCOOH および AQ-ODN のサイクリックボルタモグラムにおける還元ピーク電流値の対数を走査速度の対数に対してプロットした図を示した。得られたプロットは直線となり、その傾きは AQCOOH および AQ-ODN についてそれぞれ 0.63, 0.77 であった。また、電子移動の速い (可逆な) 酸化還元系におけるピーク電位差 ΔE の理論値が約 30 mV であるのに対し、得られた ΔE の値は AQCOOH について 50~86 mV, AQ-ODN 1 本鎖について 77~92 mV であった。

Fig. 3 Cyclic voltammograms of 67 μ M of AQ-ODN (solid line) and its duplex (dashed line). The measurements were carried out in a buffered solution containing 10 mM phosphate, 100 mM NaCl, adjusted to pH = 7.0. Scan rate was 200 mV/s.

Fig. 4 $E_{1/2}$ dependence on the concentration of target DNA. Conditions for the measurements were the same as Fig. 3.

3.3 アントラキノン修飾 DNA のハイブリダイゼーションに伴うレドックス応答変化

AQ-ODN 1本鎖に対して共存する相補鎖 DNA の濃度を变化させた一連の試料についてサイクリックボルタメトリー測定を行った。まず、1本鎖および2本鎖 AQ-ODN のボルタモグラムを Fig. 3 に示した。ピーク電位差 ΔE は、両方のボルタモグラムにおいて2電子反応の可逆な酸化還元系における理論値 30 mV より大きい値を示した (ΔE : 1本鎖, 2本鎖についてそれぞれ 92 mV, 107 mV)。また AQ-ODN 2本鎖のピーク電流値は1本鎖に比べて小さな値となった。さらに、 $E_{1/2}$ は2本鎖において1本鎖よりも 20 mV 正電位方向にシフトした ($E_{1/2}$: 1本鎖, 2本鎖についてそれぞれ -502 mV, -482 mV)。つぎに、AQ-ODN の $E_{1/2}$ を試料中の相補鎖の濃度に対してプロットした図を Fig. 4 に示した。図のように、相補鎖の濃度の増加に伴って $E_{1/2}$ は正電位方向にシフトし、当量に到達してすべての AQ-ODN が2本鎖を形成すると一定の電位 (-482 mV) を示した。

3.4 アントラキノンモノマーの2本鎖 DNA へのインターカレーションに伴うレドックス応答変化

AQC2N⁺ に対して共存する2本鎖 DNA の濃度を变化させた一連の試料について紫外-可視スペクトルを測定した。測定の結果、DNA 濃度の増加に伴ってアントラキノン基に由来する 332 nm 付近の吸収の淡色効果が観察された (Fig. 5)。また得られた結果を Scatchard の式 eq. (1) に適用することにより結合定数 K および飽和結合数 ν_m を求めた

Fig. 5 UV-vis titration of AQC2N⁺ with DNA. The concentration of AQC2N⁺ was 0.25 mM. The measurements were carried out in a buffered solution containing 10 mM phosphate, 100 mM NaCl, adjusted to pH=7.0.

Fig. 6 Changes in $E_{1/2}$ of AQC2N⁺ in the presence of DNA. $E_{1/2}$ was obtained by the CV measurement at a scan rate of 100 mV/s.

($K = 95800$ ($1/\text{mol} = \text{M}^{-1}$), $\nu_m = 1.64$). Fig. 6 に、AQC2N⁺ 溶液の $E_{1/2}$ を共存する2本鎖 DNA の濃度に対してプロットした結果を示した。図からわかるように、AQC2N⁺ の $E_{1/2}$ は試料中の DNA 濃度の増加に伴って正方向にシフトした。

3.5 アントラキノンモノマーおよびアントラキノン修飾 DNA の拡散定数

レドックス活性種の拡散係数は、Randles-Sevcik の式 eq. (2) を用いて、サイクリックボルタモグラムにおけるピーク電流値を走査速度の平方根に対してプロットした直線の傾きから算出することができる。

$$I_p = 269 A n^{3/2} D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2)$$

ここで用いられる記号はそれぞれ、 I_p : ピーク電流値 (A), A : 電極面積 (cm^2), n : 反応電子数, D : 拡散係数 (cm^2/s), C : 反応種のバルク濃度 (mol/dm^3), v : 電位の走査速度 (V/s) を表している。本研究で用いたアントラキノン誘導体の還元ピーク電流値を走査速度の平方根に対してプロットした結果を Fig. 7(a) および b) に示した。すべてのプロットはほぼ原点を通る直線となり、溶液中のレドックス活性種による可逆な電気化学反応系の特徴を示した。拡散係数をこれらのプロットの傾きから算出し、その値を Table 2 にまとめた。得られた拡散係数は、分子量の大きいものほ

Fig. 7 Cathodic peak current plotted against square root of scan rate. The concentration of redox species was 67 μM . Symbol represent $\bullet$ = AQC2N⁺, $\circ$ = AQ-ODN, $\triangle$ = AQ-ODN duplex, $\times$ = AQ-ODNsc, respectively.

Table 2 Diffusion coefficients of anthraquinone derivatives and anthraquinone-modified oligonucleotides.

Abbreviation	$D \times 10^7 / \text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$	Molecular weight
AQCOOH	157	252
AQC2N ⁺ only	60.5	387
AQ-ODN	1.53	4815
AQ-ODN duplex	1.25	9410
AQ-ODNsc duplex	1.25	6482

ど小さい値を示した。また、拡散係数の対数をレドックス活性種の分子量の対数および還元ピーク電流値の対数に対してプロットした図を Fig. 8 に示した。低分子量範囲では分子量の増加に反比例して拡散係数が顕著に減少し、オリゴヌクレオチドのレベルの分子量範囲では緩やかに減少することが確認された。還元ピーク電流値と分子量の関連においても同様の結果が得られた。

4 考 察

4.1 アントラキノンモノマーとアントラキノン修飾 DNA のレドックス応答

アントラキノン修飾 DNA (AQ-ODN) の $E_{1/2}$ の値を溶液の pH 値に対してプロットした直線の傾き (57.3 mV/pH) は、アントラキノンの 2 電子反応の可逆な酸化還元系における理論値 59.2 mV/pH と良好な一致を示した。このことから、アントラキノン基がオリゴヌクレオチドに導入されたのちにも、ネルンスト式に従う理想的なレドックス反応を保持していることが確認された。

同濃度におけるアントラキノンモノマー (AQCOOH) およびアントラキノン修飾 DNA (AQ-ODN) のサイクリックボルタモグラム (Fig. 1a, b) のピーク電流値は、同走査速度において約 10 倍の差を示した。これは、AQCOOH と AQ-ODN の分子量の違いによって拡散係数に差が生じ、eq. (2) の関係によりピーク電流値に反映しているものと考えられる。これについては、後に、セクション 4.3 でさらに議論する。

本研究では、グラッシーカーボンを作用電極に用いたサイクリックボルタノメトリーを行った。アントラキノンモノマー (AQCOOH) およびアントラキノン修飾 DNA (AQ-ODN) の走査速度に対する還元ピーク電流値の両対数プロットの傾きは、両者とも、溶液中のレドックス活性種の可逆

なレドックス応答に対応する理論値 (0.5) と完全に電極表面に固定化されたレドックス活性種荷対応するプロットの傾き (1) の中間の値となった。また、本研究で用いたアントラキノン誘導体の還元ピーク電流値を走査速度の平方根に対してプロットした結果、すべてのプロットは原点を通る直線となり、溶液中のレドックス活性種による可逆な電気化学反応系の特徴を示した。アントラキノンモノマー (AQCOOH) およびアントラキノン修飾 DNA (AQ-ODN) のサイクリックボルタノグラムのピーク電位差 ΔE は、可逆な酸化還元系における理論値 30 mV よりも大きい値を示したことから、これらの化学種において観察されたレドックス応答が遅い電子移動プロセスを経ていることを示唆している。これらと対照的に、滴下水銀電極を用いたアントラキノン修飾 DNA の電気化学応答はほぼ表面吸着種のもを反映し、われわれの測定結果とは異なることが報告されている⁸⁾。

4.2 アントラキノン修飾 DNA の 2 本鎖形成にともなうレドックス電位シフトとインターカレーションの関連性

アントラキノン修飾 DNA (AQ-ODN) において、相補鎖 DNA との 2 本鎖形成に伴う $E_{1/2}$ の正電位方向へのシフトが観察された。アントラキノンモノマー (AQC2N⁺) の DNA 2 本鎖へのインターカレーションにおいても同様の結果が得られた。DNA の糖部 2' 位にメチレンリンカーを介して共有結合でアントラキノン基を導入したオリゴヌクレオチド誘導体が DNA と 2 本鎖を形成した時、アントラキノン基が塩基対間にインターカレーションすることはすでに Broom らによって ¹H NMR 解析により証明されている¹⁵⁾。以上のことから、本研究で観察された AQ-DNA と相補鎖との 2 本鎖形成に伴う $E_{1/2}$ の正電位方向へのシフトが、アントラキノン基の核酸塩基間へのインターカレーションに起因することが確認された。これに対して、メチレンリンカーに比べて長鎖のヘキシルアミノリンカーによってアントラキノン基を糖部に導入したオリゴヌクレオチド誘導体では、2 本鎖形成時にアントラキノン基のインターカレーションが起こらないことが報告されている⁸⁾。アントラキノンの DNA 糖部への導入に短鎖のメチレンリンカーを用いることは、ハイブリダイゼーションにともなうインターカレーションによってレドックス変化を誘起するうえで立体化学的に適切な条件であると結論できる。

アントラキノンに有する化学種のレドックス特性は極性等の環境因子に大きく影響を受けることが知られており、DNA 2 本鎖内部の疎水的環境はインターカレーションしたアントラキノン基のレドックス特性に変化をもたらすと考えられる。オリゴヌクレオチドに修飾したアントラキノンの電極における酸化還元反応は eq. (3) に示した電気化学反応式によって示され、アントラキノンの酸化還元電位は、ネルンストの式 eq. (4) に従う。

$$E = E_0 - (RT/nF) \ln K \quad (4)$$

したがって、アントラキノンのインターカレーションに伴う電位変化は、レドックス反応に関与する H⁺ の活量に対して、DNA 2 本鎖中とバルク溶液中とは異なることが一つの要因として考えられる。本研究において観察された AQ-ODN の 2 本鎖形成に伴う $E_{1/2}$ の正電位方向へのシフトは、

Fig. 8 Logarithm of diffusion coefficient and cathodic peak current plotted against logarithm of molecular weight. ● = diffusion coefficient, ○ = cathodic peak current.

オリゴヌクレオチドに導入したレドックス活性種の核酸塩基間へのインターカレーションを利用する電気化学的 DNA プローブの開発において、基礎的かつ重要な知見である。これと類似した結果は、 $\text{Co(phen)}_3^{3+/2+}$ のサイクリックボルタモグラムにおけるピーク電位が DNA 2 本鎖の存在下において非存在下よりも正電位方向にシフトすることが Bard らによって報告されている¹⁶⁾。レドックス活性種の DNA へのインターカレーションがレドックス電位の変化に影響を与えることを支持している。

4.3 アントラキノン修飾 DNA のハイブリダーゼーションに伴うレドックスピークの減少

Table 2 に示したように、電気化学的に見積もったアントラキノンモノマーおよびアントラキノン修飾 DNA の拡散係数は分子量の大きいものほど小さいことは明らかである。溶液中のレドックス活性種のサイクリックボルタメトリーにおけるピーク電流値は拡散係数の平方根に比例するため、AQ-ODN の 2 本鎖形成に伴うピーク電流値の減少は、分子量の増加と対応した拡散係数の減少に起因するものと結論できる。以上のことから、アントラキノン修飾 DNA と相補鎖 DNA とのハイブリダーゼーションは、レドックス電位のシフトに加えて、拡散係数の変化に起因するピーク電流値の減少によって検出できる可能性が示された。

以上の結果から、アントラキノン修飾オリゴヌクレオチドの均一溶液中での電気化学的遺伝子検出への応用における特徴は、未反応プローブの分離 (B/F 分離)¹⁷⁾ を必要としないことが挙げられる。これは、オリゴヌクレオチドの糖部 2' 位に共有結合でレドックス活性分子を導入することで、ハイブリダーゼーションと協同的なインターカレーションで誘起するレドックス応答変化により初めて可能となった。

本研究で得られたアントラキノン修飾オリゴヌクレオチドのハイブリダーゼーションにともなうレドックス応答変化から DNA の検出限界は 10^{-9} mol と概算できる。すでに報告したピレン修飾オリゴヌクレオチドを用いた蛍光を利用する均一溶液中での検出法¹⁸⁾と比較すると、相補鎖 DNA とのハイブリダーゼーションにおいて観察される相対的な電気化学シグナル変化は大きくないが、これらの問題はアントラキノン修飾オリゴヌクレオチドを電極上に固定化した DNA チップにより DNA を介した電子移動をモニターすることで改善できるものと期待される¹⁹⁾。

5 結 論

溶液中におけるアントラキノン修飾 DNA の電気化学的挙動を検討した結果次の知見を得た。(1) アントラキノン修飾 DNA の $E_{1/2}$ は、相補鎖 DNA との 2 本鎖形成に伴うアントラキノン基の核酸塩基間へのインターカレーションにより、1 本鎖状態よりも正電位方向へシフトすること、(2) アントラキノン修飾 DNA のピーク電流値は、2 本鎖形成に伴う分子量の増加によって、1 本鎖状態よりも減少することが明らかになった。これらのシグナル応答を利用したアントラキノン修飾 DNA プローブによる均一溶液中で B/F 分離¹⁷⁾ を必

要としない電気化学的遺伝子検出が期待される。

最近われわれは、金表面に固定化したアントラキノン修飾オリゴヌクレオチドにおいて、DNA ハイブリダーゼーションに伴う $E_{1/2}$ の正電位方向へのシフトと電子移動速度の増大を確認した¹⁹⁾。現在、この新しい電気化学的 DNA チップによる遺伝子変異の解析や DNA を介した電子移動の定量的解析に関する研究を進めている。

6 謝 辞

本研究を遂行にあたって温かい御配慮を頂いた姫路工業大学名誉教授白子忠男先生に深く感謝いたします。本研究は、医化学応用研究財団、および中谷電子計測技術振興財団の研究助成により行った。

文 献

- 1) S. Takenaka, K. Yamashita, M. Takagi, Y. Uto, and H. Kondo, *Anal. Chem.*, **72**, 1334 (2000).
- 2) K. Yamashita, M. Takagi, H. Kondo, and S. Takenaka, *Chem. Lett.*, **2000**, 1038.
- 3) S. Takenaka, Y. Uto, M. Takagi, and H. Kondo, *Chem. Lett.*, **1998**, 989.
- 4) E. M. Boon, D. M. Ceres, T. G. Drummond, M. G. Hill, and J. K. Barton, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1096 (2000).
- 5) S. O. Kelly, E. M. Boon, J. K. Barton, N. M. Jackson, and M. G. Hill, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4830 (1999).
- 6) S. O. Kelly, N. M. Jackson, M. G. Hill, and J. K. Barton, *Angew. Chem.*, **38**, 941, (1999).
- 7) C. J. Yu, H. Yowanto, Y. Wan, T. J. Meade, Y. Chong, M. Strong, L. H. Donilon, J. F. Kayyem, M. Gozin, and G. F. Blackburn, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 6767 (2000).
- 8) N. A. Whittemore, A. N. Mullenix, G. B. Inamati, M. Manoharan, P. D. Cook, A. A. Tuinman, D. C. Baker, and J. Q. Chambers, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 261 (1999).
- 9) T. Ihara, Y. Matuo, S. Takenaka, and M. Takagi, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 4273 (1996).
- 10) T. Ihara, M. Nakayama, M. Murata, K. Nakano, and M. Maeda, *Chem. Commun.*, **1997**, 1609.
- 11) K. Yamana, Y. Nishijima, T. Ikeda, T. Gokota, H. Nakano, O. Sangen, and T. Shimidzu, *Bioconjugate Chem.*, **1**, 319 (1990).
- 12) K. Yamana, T. Mitsui, J. Yoshioka, T. Isuno, and H. Nakano, *Bioconjugate Chem.*, **7**, 715 (1996).
- 13) K. Yamana, S. Kumamoto, H. Nakano, Y. Matsuo, and Y. Sugie, *Chem. Lett.*, **2001**, 1132.
- 14) D. T. Breslin and G. B. Schuster, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2311 (1996).
- 15) H. M. Deshmukh, S. P. Joglekar, and A. D. Broom, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 578 (1995).
- 16) M. T. Carter, M. Rodriguez, and A. J. Bard, *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 8901 (1989).
- 17) 村上 章, 牧野圭祐, 有機合成化学協会誌, **48**, 180 (1990).
- 18) K. Yamana, H. Zako, K. Asazuma, R. Iwase, H. Nakano, and A. Murakami, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 1104 (2001).
- 19) K. Yamana, S. Kumamoto, T. Hasegawa, H. Nakano, and Y. Sugie, *Chem. Lett.*, **2002**, 506.