

糖尿病発症の危険性を電気化学的手法で効率的に診断するための 新規デバイスの開発

Development of a novel device to efficiently detect the probability of the
diabetes by electrochemical methods

1091017



研究代表者

東京理科大学 理学部 応用化学科 准教授

鳥 越 秀 峰

[研究の目的]

メタボリックシンドロームの言葉に代表されるように、生活習慣病である糖尿病の発症が社会問題となっている。また、ヒトゲノムの解析が進行し、個人ごとに遺伝子の塩基配列が異なる1塩基多型(SNP)が、糖尿病など生活習慣病の発症と密接に関連することが明らかである。II型糖尿病の発症には、インシュリン遺伝子とアディポネクチン遺伝子のSNPが密接に関連する。具体的には、インシュリン遺伝子の開始コドンの23塩基上流のSNPが相同染色体でT/Tの場合には、インシュリンの分泌量が正常であるが、T/A及びA/Aの場合には、インシュリンの分泌量が低く、II型糖尿病の発症の危険率が高い。また、アディポネクチン遺伝子の開始コドンの11377塩基上流のSNPが相同染色体でG/Gの場合には、アディポネクチンの分泌量が正常であるが、C/C及びC/Gの場合には、アディポネクチンの分泌量が低く、II型糖尿病の発症の危険率が高い。この糖尿病発症の危険因子であるインシュリン遺伝子とアディポネクチン遺伝子のSNPを効率的に検出する新規の診断方法を開発できれば、遺伝子由来の糖尿病発症の危険性を被験者が容易に知ることができ、自らの食生活・食習慣を改善し、糖尿病発症の予防に役立てることができると考えられる。

SNP検出方法としてヘテロデュプレックス法が知られている(図1)。SNPに該当する塩基対がタイプI(ex. T:A)である2本鎖DNAとタイプII(ex. A:T)である2本鎖DNAを混合・加熱して、1本鎖にほどいた後、徐冷して2本鎖を再形成すると、元の2本鎖以外に、互いの鎖を交換したミスマッチ塩基対(ex. T:T, A:A)を含む2本鎖を生成する(図1)。この新たに生成したミスマッチ塩基対の種類を同定できれば、元の2本鎖のSNPを検出できる。T:Tミスマッチ塩基対に Hg^{2+} が1:1のモル比で高い親和性で特異的に結合すること(図2)、C:Cミスマッチ塩基対に Ag^+ が1:1のモル比で高い親和性で特異的に結合すること(図2)を、申請者は世界で初めて見つけている。本研究では、このミスマッチ塩基対と金属イオンの特異的結合を利用して、糖尿病発症の危険因子である上記のインシュリン遺伝子とアディポネクチン遺伝子のSNPを効率的に検

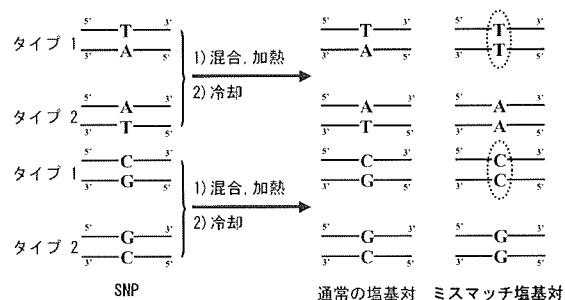


図1 ヘテロデュプレックス法の原理

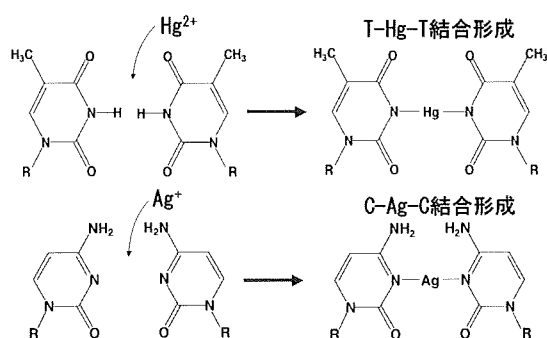


図2 ミスマッチ塩基対と金属イオンの結合形成

出できる，新規の診断方法を開発することを目
的とした。

〔研究の内容，成果〕

糖尿病発症の危険因子である上記のインシュ
リン遺伝子とアディポネクチン遺伝子の SNP
を含む 2 本鎖 DNA を金基板上に固定化し，電
気化学的検出を行う（図 3，図 4）。Watson
Crick 塩基対のみを含む 2 本鎖 DNA の片鎖の
5' 末端を電子授受可能なアントラキノン誘導体
で標識し，3' 末端をチオール化して金基板に固
定化する（図 3 (a)，図 4 (a)）。この軸方向に
電圧を加えると，アントラキノン誘導体から放
出された電子が DNA 塩基の π 共役を介して 2
本鎖内を伝達し，電流値を観測できる。 Hg^{2+}
及び Ag^{+} を添加しても 2 本鎖に結合せず，2
本鎖構造は不変であるので電流値は変化しない。

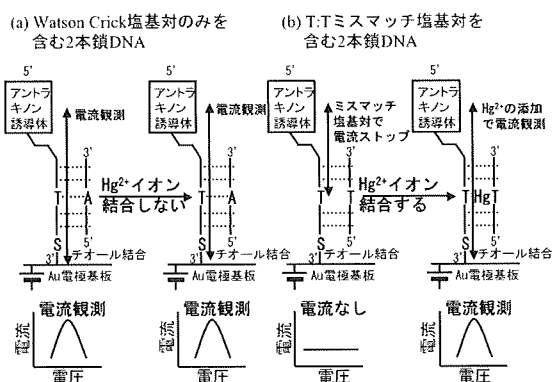


図3 電気化学的検出の原理

- (a) T:A Watson Crick 塩基対の場合
(b) T:T ミスマッチ塩基対の場合

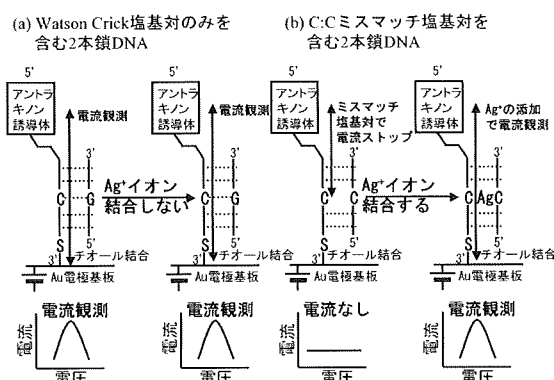


図4 電気化学的検出の原理

- (a) C:G Watson Crick 塩基対の場合
(b) C:C ミスマッチ塩基対の場合

一方，T:T 及び C:C ミスマッチ塩基対を含
む 2 本鎖 DNA も同様に，金基板上に固定化する
（図 3 (b)，図 4 (b)）。この軸方向に電圧を加
えても，ミスマッチ塩基対の部位で電子伝達が
断絶されるため，電流値を観測できない。しか
し， Hg^{2+} 及び Ag^{+} を添加すると，申請者が
世界で初めて発見した T-Hg-T と C-Ag-C 結
合形成によりミスマッチ塩基対の部位での電子
伝達が可能になり，電流値を観測できる。以上
のように， Hg^{2+} 及び Ag^{+} 添加前後の電流値
の変化の有無より，T:T 及び C:C ミスマッ
チ塩基対を簡便・正確・迅速に同定でき，
SNP を効率的に検出できる，新規の診断方法
を開発することを目指した。

(1) インシュリン遺伝子の SNP の電気化学 検出

5' 末端をアミノ基で標識し，3' 末端をチオール
基で標識した，インシュリン遺伝子の SNP
を含む領域のオリゴヌクレオチド DNA，5'-
GCCCTGCCTGTCTCCCAGATCACTG-3' に
アントラキノン誘導体（AQ）を反応させ，5'
末端を電子授受可能な AQ で標識した AQ-
Am-INS-F 25 T-Thio を調製した。また，相
補鎖である通常の DNA，INS-R 25 T: 5'-
CAGTGATCTGGGTGACAGGCAGGGC-3'，
INS-R 25 A: 5'-CAGTGATCTGGGAGACA-
GGCAGGGC-3' を調製した。AQ-Am-INS-F

25 T-Thio: INS-R 25 A または AQ-Am-INS-F 25 T-Thio: INS-R 25 T を固定化した金電極に Hg^{2+} を添加する前と添加した後の矩形波ボルタンメトリーを、 $-0.8 \text{ V} \sim -0.1 \text{ V}$ の範囲で測定した。T: T ミスマッチ塩基対で電子伝達が断絶されるため電流を観測できないが、 Hg^{2+} を添加すると、申請者が見つけた T-Hg-T 結合形成により T: T ミスマッチ塩基対で電子伝達が可能になり、電流を観測できると期待された。これに合うように、AQ-Am-INS-F 25 T-Thio: INS-R 25 T に Hg^{2+} を添加する前は電流を観測できなかったが (-0.7 V 付近のピークはアーティファクト)、 Hg^{2+} を添加すると -0.67 V 付近に電流を観測できた (図 5)。一方、Watson Crick 塩基対では電子伝達により電流を観測でき、 Hg^{2+} を添加しても 2 本鎖に結合せず、2 本鎖構造は不変であるので電流値は変化しないと期待された。AQ-Am-INS-F 25 T-Thio: INS-R 25 A に Hg^{2+} を添加する前は、理由は不明だが、電流を観測できず (-0.7 V 付近のピークはアーティファクト)、 Hg^{2+} を添加すると -0.66 V 付近でわずかながら、電流を観測できた (図 6)。 Hg^{2+} 添加に伴う電流変化が、AQ-Am-INS-F 25 T-Thio: INS-R 25 A と AQ-Am-INS-F 25 T-Thio: INS-R 25 T の間で、あまり差が

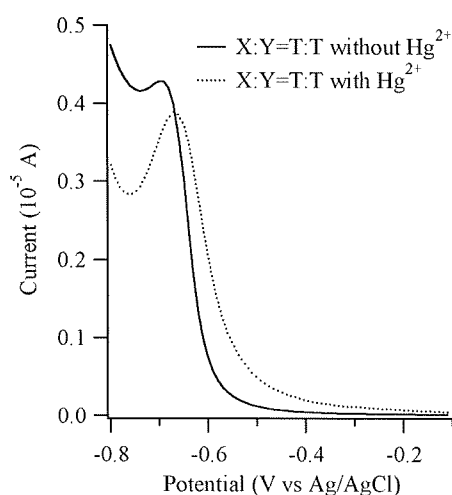


図 5 Hg^{2+} 非存在下, 存在下の AQ-Am-INS-F 25 T-Thio: INS-R 25 T の矩形波ボルタンメトリー

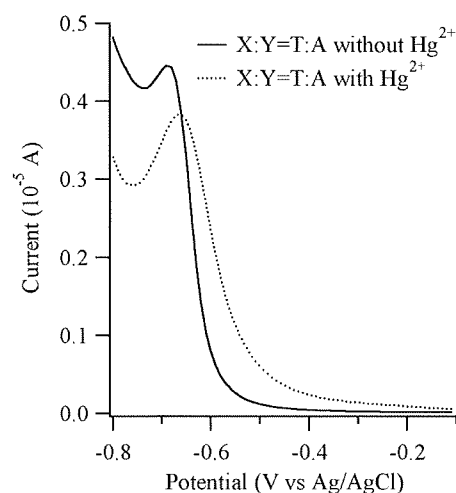


図 6 Hg^{2+} 非存在下, 存在下の AQ-Am-INS-F 25 T-Thio: INS-R 25 A の矩形波ボルタンメトリー

なかった。

(2) アディポネクチン遺伝子の SNP の電気化学検出

5' 末端をアミノ基で標識し、3' 末端をチオール基で標識した、アディポネクチン遺伝子の SNP を含む領域のオリゴヌクレオチド DNA、5'-CTCAGATCCTGCCCTTCAAAAACAA-3' にアントラキノン誘導体 (AQ) を反応させ、5' 末端を電子授受可能な AQ で標識した AQ-Am-APM-F 25 C-Thio を調製した。また、相補鎖である通常の DNA、APM-R 25 C: 5'-TTGTTTTTTGAAGCGCAGGATCTGAG-3', APM-R 25 G: 5'-TTGTTTTTTGAAGGGCAGGATCTGAG-3' を調製した。AQ-Am-APM-F 25 C-Thio: APM-R 25 C または AQ-Am-APM-F 25 C-Thio: APM-R 25 G を固定化した金電極に Ag^+ を添加する前と添加した後の矩形波ボルタンメトリーを、 $-0.8 \text{ V} \sim -0.1 \text{ V}$ の範囲で測定した。C: C ミスマッチ塩基対で電子伝達が断絶されるため電流を観測できないが、 Ag^+ を添加すると、申請者が見つけた C-Ag-C 結合形成により C: C ミスマッチ塩基対で電子伝達が可能になり、電流を観測できると期待された。これに合うように、AQ-Am-APM-F 25 C-Thio: APM-R 25 C に Ag^+

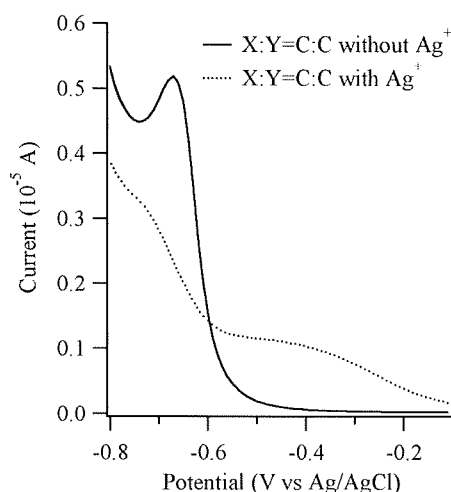


図7 Ag^+ 非存在下, 存在下の AQ-Am-APM-F25C-Thio: APM-R25C の矩形波ボルタンメトリー

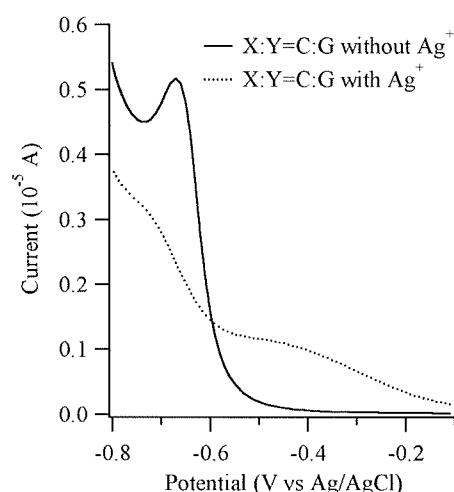


図8 Ag^+ 非存在下, 存在下の AQ-Am-APM-F25C-Thio: APM-R25G の矩形波ボルタンメトリー

を添加する前は電流を観測できなかったが（ -0.7 V 付近のピークはアーティファクト）, Ag^+ を添加すると -0.4 V 付近でわずかなではあるが、電流を観測できた（図7）。一方、Watson Crick 塩基対では電子伝達により電流を観測でき、 Ag^+ を添加しても2本鎖に結合せず、2本鎖構造は不変であるので電流値は変化しないと期待された。AQ-Am-APM-F25C-Thio: APM-R25G に Ag^+ を添加する前は、理由は不明だが、電流を観測できず（ -0.7 V 付近のピークはアーティファクト）, Ag^+ を添加すると -0.4 V 付近でわずかなではあるが、電流を観測できた（図8）。 Ag^+ 添加に伴う電流変化が、AQ-Am-APM-F25C-Thio: APM-R25C と AQ-Am-APM-F25C-Thio: APM-R25G の間で、あまり差がなかった。

[今後の研究の方向, 課題]

II 型糖尿病の発症に関連する、インシュリン遺伝子とアディポネクチン遺伝子の SNP の電気化学的検出方法に関する基礎的知見を得ることができた。今後は、 Hg^{2+} または Ag^+ を添加する前の電流挙動を中心に解析を進め、実用化の基礎となる検出系を確立する必要がある。

[成果の発表, 論文等]

1. Torigoe, H., Miyakawa, Y., Fukushi, M., Ono, A., and Kozasa, T.: "Development of a novel device to trap heavy metal cations: Application of the specific interaction between heavy metal cation and mismatch DNA base pair" *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 53, 23-24 (2009)