

## 自己評価報告書

平成 23 年 4 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20106010

研究課題名（和文）DNA 密生相が示す特異な界面現象の解明と応用

研究課題名（英文）Elucidation and Application of Sequence-Specific Phenomena of DNA-grafted Nanoparticles

研究代表者

前田 瑞夫（MAEDA MIZUO）

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・主任研究員

研究者番号：10165657

研究分野：バイオ材料科学

科研費の分科・細目：

キーワード：ソフトインターフェース、核酸分子、コンジュゲート材料、ナノ粒子、ポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）、生体機能材料、界面科学、分子認識

## 1. 研究計画の概要

二重鎖 DNA を表層に密生させた高分子ミセル（DNA 担持ナノ粒子）のコロイド安定性と電気泳動移動度が、DNA 自由末端側の塩基対構造に明敏に応答することを発見した。自由末端に一塩基ミスマッチが存在すると、完全相補の場合と比べて、コロイド安定性と電気泳動移動度が著しく増大する。これは、DNA 密生相とバルクとの界面における分子構造のわずかな変化がマクロでダイナミックな現象を誘起していることを意味する。本研究は、この特異な界面現象のメカニズムを分子レベルで解明し、新しいバイオ分析デバイスへ応用することを目的とする。具体的には、(1) 新規高分子-DNA コンジュゲートの精密重合、(2) DNA 担持ナノ粒子が示す非架橋型凝集の構造科学的観点からの解明、(3) 新規バイオセンサー開発、に関する研究テーマの推進をした。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) 新規 DNA コンジュゲートの精密重合

従来からのポリ（*N*-イソプロピルアクリルアミド）（PNIPAAm）-DNA グラフト共重合体に加え、合目的な構造と機能有するナノ粒子を自在に構築することを目指した。ATRP による精密合成を試み、種々の分子鎖長と分子骨格を持ち、末端にアジド基を有する PNIPAAm を合成した。クリックケミストリーにより、オリゴ DNA を結合させることでブロック共重合体を得た。下限臨界溶解温度（LCST）以上では共重合体は自発的に数十 nm ほどのミセルを形成する。DNA が表層に密生したコアシェル型のナノ粒子である。LCST ならびに粒径は、鎖長や骨格に応じて

変化することを見いだした。また、末端塩基対構造に依存した粒子の非架橋型凝集が生じることを確認した。

## (2) DNA 担持ナノ粒子非架橋型凝集の構造解析

疎水核として金ナノ粒子を用い、大型放射光施設（SPring-8）での小角 X 線散乱（SAXS）法による解析を遂行している。完全相補鎖で二重鎖形成させたナノ粒子の粒子間距離を評価し、それに基づいた面間距離と DNA 鎖長との関係を調べると、面間距離は表層に密生している DNA 鎖長に応じて変化するが、自由末端同士の間隔を示唆するものではなかった。疎水核径が小さい DNA 担持ナノ粒子に対して粒子の分散安定性に関する評価を行うと、非架橋型凝集が温度依存性を示すことが判明した。疎水核間のファンデルワールス引力の減少により、DNA 密生相の熱的な揺らぎに起因した立体反発が相対的に増大したことによるものと思われる。つまり DNA 担持ナノ粒子の分散安定性の特異性は、密生相の熱的な揺らぎ運動の差異によってもたらされると推察できる。

## (3) 新規バイオセンサー開発

機能性核酸（アプタザイム）担持金ナノ粒子を用いて、可視検出バイオセンサーシステムを開発した。標的分子が存在すると、対応するアプタザイムの自己切断が起こり、切断 RNA が粒子表面の DNA と結合することによって金ナノ粒子凝集が誘引される。少量の切断 RNA によって凝集が生じ、他のアプタザイム基盤検出システムと比して検出感度が高い。また、水銀イオンを介した塩基対形成を促すことで非架橋型凝集を引き起こす金属イオンセンサーの開発にも成功した。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究課題の目的の一つは DNA 密生相が示す界面現象の解明であり、構造の明確なナノ粒子設計が必要であった。そこで PNIPAAm-DNA ブロック共重合体をリビングラジカル重合法により精密合成し、これを材料に用いた粒径分布の狭い DNA 担持ナノ粒子を作製することを目指した。新規合成法を開拓することに成功し、任意のサイズと物性のナノ粒子を構築することができた。

DNA 担持ナノ粒子の精密構造解析に関しては、SAXS 法による研究を遂行してきた。測定・解析の最適化などを目的として、金ナノ粒子-DNA コンジュゲートを対象にした評価が中心となっているが、今後は、本計画研究で新規にデザインされた PNIPAAm-DNA ブロック共重合体からなるナノ粒子の精密構造解析や分散安定性評価も重点的に遂行していく必要がある。

新規バイオセンサー開発に関していえば、特異な界面現象と核酸分子が持つ特殊な性質とをうまく融合した分析法の開発に成功しており、期待通りの成果が得られている。

### 4. 今後の研究の推進方策

PNIPAAm と DNA のグラフト共重合体やブロック共重合体をリビングラジカル重合法により精密合成し、これを用いて構造の明確な DNA 担持ナノ粒子を作製する。SAXS 法による構造解析ならびに構造科学的観点からのナノ粒子の分散安定性評価を行う。また、原子間力顕微鏡や各種分光学的手法を駆使するなどして、DNA 分子間に働く相互作用を力学的・速度論的観点からも網羅的かつ定量的に調べ、ナノ粒子の分散安定性のメカニズムを探る。

高分子電解質である DNA 分子あるいはその集合体である密生相は、イオン、水分子とのかかわりにより、特異な界面現象を発現しているとも思われる。これまで以上に領域内共同研究を推進し、例えば、和周波発生分光法 (SFG) を用いた解析に基づいて、非架橋凝集の末端構造鋭敏性のメカニズムとの関連性を考察する。

簡便で迅速な遺伝子診断デバイスへの応用展開としては、遺伝子診断用マイクロチップデバイスの開発を行う。また、一塩基変異遺伝子混合物の微量定量分析を指向した電気泳動法による一塩基変異定量法の開発も推進する計画である。さらに、環境汚染物質をはじめとするさまざまな化学物質の分析デバイスへとさらに幅広く応用展開することが期待できる。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, “Rapid Naked-eye Detection of Mercury Ion Based on Non-crosslinking Aggregation of Double-stranded DNA-carrying Gold Nanoparticles”, *Chem. Commun.*, 47, 2077-2079 (2011) 査読有。
- ② K. Isoda, N. Kanayama, D. Miyamoto, T. Takarada, and M. Maeda, “RAFT-generated poly(*N*-isopropylacrylamide)-DNA block copolymers for temperature-responsive formation of polymer micelles”, *Reactive & Functional Polymers*, 71, 367-371 (2011) 査読有。
- ③ P. Pan, M. Fujita, W.Y. Ooi, K. Sudesh, T. Takarada, A. Goto, and M. Maeda, “DNA-Functionalized Thermoresponsive Bioconjugates Synthesized via ATRP and Click Chemistry”, *Polymer*, 52, 895-900 (2011) 査読有。
- ④ T. Ohshiro, T. Zako, R. Wanatabe-Tamaki, T. Tanaka, and M. Maeda, “A Facile Method Towards Cyclic Assembly of Gold Nanoparticles Using DNA Template Alone”, *Chem. Commun.*, 46, 6132-6134 (2010) 査読有。
- ⑤ T. Ohshiro, and M. Maeda, “Single-molecule Imaging of DNA Duplexes Immobilized on Surfaces with a Scanning Tunneling Microscope”, *Chem. Commun.*, 46, 2581-2583 (2010) 査読有。

[学会発表] (計 5 件)

- ① M. Fujita, “Structural study on noncrosslinking aggregation of gold nanoparticles with DNA”, Pacificchem 2010, 平成 22 年 12 月 16 日, Honolulu, USA.
- ② M. Maeda, “Unique colloidal behavior of DNA-carrying nanoparticles”, International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface, 平成 22 年 9 月 22 日, Chiba, Japan.
- ③ 潘 鵬举, 藤田雅弘, 後藤 淳, 宝田 徹, 前田瑞夫, “DNA-co-poly(*N*-isopropylacrylamide) thermoresponsive bioconjugates: Preparation and self-assembly”, 第 59 回高分子討論会, 平成 22 年 9 月 16 日, 札幌市.
- ④ M. Fujita, “Structural Analysis of Non-crosslinking Aggregation of Au Nanoparticles with DNA”, 3<sup>rd</sup> International Symposium on Interdisciplinary Materials Science for Biomaterials Science, 平成 21 年 4 月 24 日, Tsukuba, Japan.
- ⑤ M. Maeda, “DNA Conjugate Polymers and Nanoparticles”, 14<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, 平成 21 年 2 月 16 日, Utah, USA.