

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31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

研究成果の概要（和文）：自由末端が一塩基ミスマッチの二重鎖 DNA を表層に密生させたナノ粒子は、完全相補の場合と比べて塩に対する分散安定性が著しく向上する。末端ミスマッチ塩基対のマイクロブラウン運動がもたらす立体反発力が、疎水核同士のファンデルワールス引力を凌駕するためである。この機構を、SPring-8 を用いた溶液小角 X 線散乱法と AFM を用いた表面間力測定で証明した。さらに、この知見をもとにナノ粒子表面を合理的に機能化して、遺伝子精密診断システムとコロイド型論理素子モデルを開発した。

研究成果の概要（英文）：Nanoparticles densely grafted with double-stranded DNA having a terminal single-base mismatch between the DNA layer and the disperse medium exhibit significantly high colloidal stability compared to those with fully matched DNA. Measurements of small angle X-ray scattering patterns at SPring-8 and force curves by atomic force microscopy revealed that this unique property stems from the fact that steric repulsive force induced by micro-Brownian motion of the terminal bases surpasses van der Waals attractive force between the hydrophobic cores. The elucidation of the mechanism led us to rationally design the surface structure of nanoparticles for the reliable gene mutation assay and the colloidal logic circuits.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009年度	19,500,000	5,850,000	25,350,000
2010年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
2011年度	13,800,000	4,140,000	17,940,000
2012年度	10,200,000	3,060,000	13,260,000
総計	64,500,000	19,350,000	83,850,000

研究分野：化学・総合領域

科研費の分科・細目：複合化学・人間医工学・高分子化学・医用生体工学・生体材料学

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・遺伝子診断・界面科学

1. 研究開始当初の背景

粒径がナノメートルサイズのポリマー微粒や金コロイドは、表面に一本鎖DNAをブラシ状に固定すると、リン酸アニオンの静電反発とDNA鎖同士のエントロピー反発のために、水中で安定に分散することができる。ところが、これらの粒子の分散液に相補鎖を添加して粒子表面で二重鎖を形成すると、粒子はただちに凝集する。凝集を誘起する相補的DNAは、粒子表面のDNAと塩基数が厳密に一致しているので、あくまでも自発的な（粒子間を架橋していない）凝集である。この非架橋凝集は、ポリマー微粒の場合には分散液の白濁化、金コロイドでは表面プラズモン共鳴シフトによる赤色から青紫色への色調変化として目視で容易に確認できる。興味深いことに、粒子表面上で形成される二重鎖DNAの自由末端がミスマッチの場合は、この非架橋凝集は全く生じない。

この特異現象の発見は、研究代表者が九州大学工学部に在職していた2000年前後にさかのぼる。一本鎖DNA (ssDNA) をグラフトした熱応答性高分子のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm-g-DNA) を世界に先駆けて合成し (*Biotech. Bioeng.* 2001)、医療診断や分子生物学研究で重要な核酸成分を細胞破砕物から簡便に分離精製するための試薬に応用しようとしていた。このPNIPAAm-g-DNAは熱相転移すると自発的に会合してDNAを親水性成分とする高分子ミセルを形成することがわかり (*Polym. J.* 2001, *Langmuir* 2004)、その物性を調べる過程で上述の特異現象が全く偶然に見いだされたのである (*Polym. J.* 2002, *Polym. J.* 2006)。その後、2003年から研究の場を理化学研究所に移し、疎水核をポリスチレンラテックス (*Anal. Sci.* 2004) や金コロイド (*J. Am. Chem. Soc.* 2003) に置き換えても、同じ特異現象が見られることを証明した。この特異現象が疎水核の材質に依存しないこと、すなわち、粒子表面のDNA密生相が示す物理化学的性質に由来することが強く示唆されたわけである。

この新奇なコロイド界面現象は、遺伝子一塩基変異診断法 (*Chem. Lett.* 2004, *Nucleic Acids Res.* 2005) をはじめ、生体関連物質の高感度検出法 (*Chem. Commun.* 2007, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008) や環境汚染物質のオンサイト分析法 (*Chem. Commun.* 2011) などに応用されてきた。しかしながら、二重鎖DNAの末端塩基対構造に鋭敏に応答するメカニズムについてはほとんど分かっていなかった。したがって、これらの分析法について試行錯誤をすることなく合目的に測定・検出対象を拡張し、検出感度を向上させることはきわめて困難な状況がつづいていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、上述した特異的なコロイド界面現象のメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。具体的には、リビングラジカル重合法で合成した構造の明確なDNA共重合体をつかって粒径分布の狭いナノ粒子を新たに調製し、小角X線散法を用いた粒子間相互作用の精密解析と、原子間力顕微鏡を用いた表面力測定を通じて、DNAソフト界面固有の性質を明らかにすることを目標に掲げた。さらに、これらの知見をもとにしてデザインされたDNAソフト界面を分析システムに合理的に組みこんで、簡便で迅速、精確な遺伝子診断デバイスを開発することをめざした。

3. 研究の方法

(1)材料調製：DNA密生相に覆われた金コロイド (DNA-GNP) は既報にしたがって調製した (*J. Am. Chem. Soc.* 2003)。DNA担持ポリマーミセルは、構造が明確に規定されたブロックポリマーをつかって調製した。そのために、可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合法または原子移動ラジカル重合 (ATRP) 法で合成したPNIPAAmとssDNAの末端同士をマイケル付加反応またはクリック反応で連結してブロック共重合体 (PNIPAAm-b-DNA) を合成した。これを水溶液中で熱相転移させることで自己集合せ、粒径の揃ったポリマーミセルを自発的に形成させた。非架橋凝集に必要な相補的ssDNAは、固相合成法で合成した。後述する遺伝子診断に際しては、化学合成した二重鎖DNAを遺伝子モデルとし、これを鋳型にしたプライマー伸長法で得られる短鎖DNAを診断用検体として使用した。

(2)分析方法：上述したように、ナノ粒子の非架橋凝集は、ポリマーミセルの場合には分散液の白濁化、金コロイドの場合には表面プラズモン共鳴シフトによる赤色から青色への色調変化をとともなう。これらは目視でも認識できるが、定量解析する場合は紫外可視分光光度計をつかって濁度および吸光度を測定した。ナノ粒子の凝集体構造は、大型放射光施設 (SPring-8) を用いた溶液小角X線散乱法で解析した。分散および凝集状態のSAXSデータから構造因子を算出し、面心立方格子を仮定したパラクリスタル理論解析によって粒子間距離に変換した。また、動的光散乱 (DLS) 測定および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によって凝集状態を解析した。粒子間に作用する力は、二重鎖DNA (dsDNA) で表面修飾したコロイドプローブを装填した原子間力顕微鏡 (AFM) で実測した。

4. 研究成果

(1)非架橋凝集のメカニズム解明

①凝集体の精密構造解析：まず、粒子表面のDNA 密生相がお互いに入り組んで凝集することを証明した。DNA 密生相に覆われた金コロイドの非架橋凝集体構造を、大型放射光施設 (SPring-8) を用いた小角 X 線散乱 (SAXS) 法で解析した。分散および凝集状態の溶液 SAXS パターンから構造因子を算出し、面心立方格子を仮定したパラクリスタル理論解析によって粒子間距離に変換した。この距離から金コロイドの平均粒径を差し引いて得られる疎水核の表面間距離は、粒子表面の DNA 塩基数に応じて増大し、その値は B 型 dsDNA 鎖長の 2 倍よりも明確に短くなった (Fig. 1)。同様の結果は、PNIPAAm-*g*-DNA の熱相転移で自発的に生成する DNA ポリマーミセルについても得られた。さらに、RAFT 重合法または ATRP 法で合成された PNIPAAm と ssDNA のブロック共重合体 (PNIPAAm-*b*-DNA) がグラフト体の場合よりも粒度分布の狭いミセルを形成することを明らかにし、より高精度の構造解析によって同様の DNA 密生相の入り組み構造を実証した。

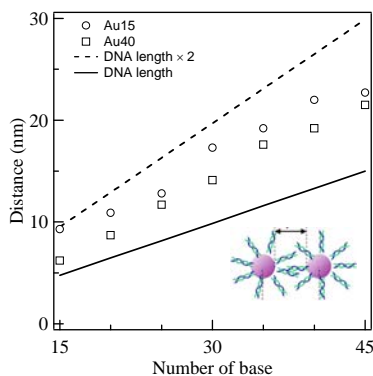


Fig. 1 Inter-surface distances plotted against the number of base for DNA-GNP ($d = 15$ nm, circles; 40 nm, squares). The solid and dashed lines indicate the length of B-form dsDNA and its twice length, respectively.

②疎水核間の相互作用：この入り組み構造は、粒子間に働く主な引力が DNA ブラシの自由末端同士の多点相互作用 (たとえば π - π スタッキング相互作用) ではないことを示唆する。以下の実験から、それが疎水核間ファンデルワールス力であることがわかった。まず、dsDNA-GNP は同じ DNA 塩基数でも GNP の粒径が小さいほど凝集しづらくなった。しかも、塩基数が同じで GNP 粒径が異なる 2 種類の DNA-GNP を混合して非架橋凝集させると、同径のナノ粒子同士が選択的に凝集することが SAXS 解析 (Fig. 2) と TEM 観察でわかった。また、分子量と分子骨格 (PNIPAAm 部位が 3 鎖分岐型または線型) が明確な PNIPAAm-*b*-DNA を使用して DNA 担持ポリマー

ミセルを調製し、その疎水核の大きさを同じに保ちつつ密度を増大させると、非架橋凝集の速度が増加した (Fig. 3)。いずれの結果も、疎水核間ファンデルワールス力が主な粒子間引力であることを強く示唆した。しかし当然のことながら、この相互作用だけでは非架橋凝集の末端構造の特異性は説明できない。

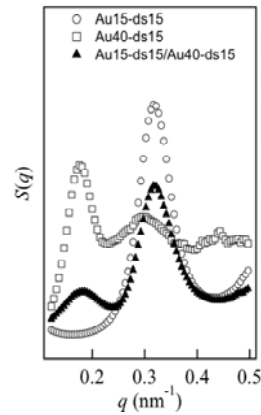


Fig. 2 Structure factors of a mixture of dsDNA (15bp)-GNP (15nm) and dsDNA (15bp)-GNP (40nm).

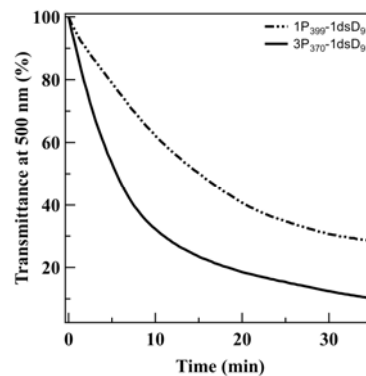


Fig. 3 Time-dependent change of transmittance for a dispersion of DNA-carrying polymer micelles prepared from a diblock copolymer made of a linear (broken line) or 3-arm PNIPAAm segment (solid line) and a DNA segment.

③DNA 密生相間の相互作用：末端塩基対がミスマッチの DNA 密生相をもつナノ粒子は、その最外層の熱的なゆらぎ (マイクロブラウン運動) がもたらす立体反発力が、疎水核同士のファンデルワールス引力を凌駕して、高イオン強度の水溶液中でも安定にコロイド分散できる。これが本研究で明らかにした、非架橋凝集の末端特異性の発現機構である。これは 2 つの実験結果から導かれた。1 つは、人工塩基対を DNA ブラシに導入した粒子を使った実験である。DNA 二重鎖に存在する T-T ミスマッチが水銀イオンをとりこんで、T-Hg-T 錯体を形成することが知られている。この T-T ミスマッチを自由末端付近にもつ dsDNA-GNP は、上述の通り高い分散安定性を

示す。ところが、この分散液に塩化水銀を添加すると、瞬時に dsDNA-GNP が凝集して色調変化を与えた。末端部位の熱的ゆらぎが錯体形成によって抑制されたためである。もう1つの根拠は、dsDNA で表面修飾したコロイドプローブを使った AFM 表面力測定で、末端ミスマッチの場合に特異的に遠距離から作用する斥力が in situ で観察されたことである。

結論として、粒子間引力は疎水核間ファンデルワールス力であり、粒子間斥力は末端ミスマッチ塩基対による立体反発力である。末端が相補だと引力が支配的になるが、ミスマッチの場合は立体反発力が引力を上回り、粒子は高イオン強度下でも安定に分散すると考えられる。この凝集機構にもとづいて、これまでに我々が報告してきた遺伝子一塩基変異診断法を高精度化した。また、分子コンピュータデバイスの基礎的モデルを設計した。これらの応用展開の概要を次に述べる。

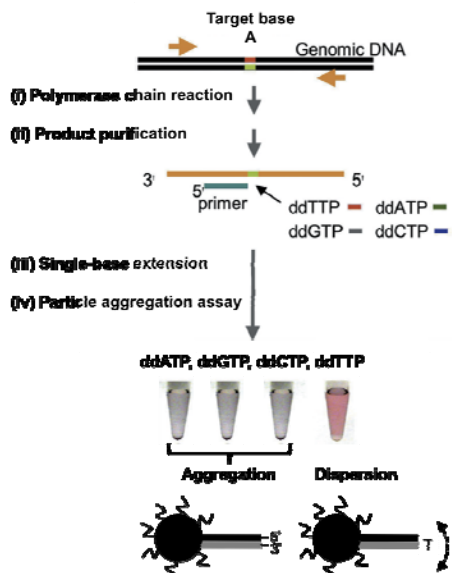


Fig. 4 Schematic diagram for the detection of single-base substitution using DNA-carrying Au nanoparticle aggregation assay.

(2) ナノバイオ素子の開発

① 遺伝子診断の高精度化：これまでの末端ミスマッチとフルマッチのコロイド安定性の差に基づいた一塩基変異診断法では、ミスマッチ部位が非ワトソン-クリック型塩基対を形成して立体反発力が弱まった場合に、フルマッチと識別しづらいケースがあることが指摘されていた。この問題を克服するため、末端一塩基「突出」とフルマッチのコロイド安定性の差に立脚する新しい遺伝子診断法を開発した。末端塩基対が相補する DNA ナノ粒子がただちに凝集する条件でも、一塩基突出した DNA 密生相をもつ粒子はきわめて安定に分散することができる。この現象も、末端ミスマッチを「2本の DNA 鎖の一塩基突出」

とみなせば、上記と同じ推定機構で理解できる。具体的には、疎水核として金コロイドを採用し、ジデオキシ鎖終結法（サンガー法）で一塩基伸長されたオリゴ核酸をサンプルに用いて、この特異現象に基づく一塩基変異識別法を開発した (Fig. 4)。診断の対象には、さまざまな薬剤の副作用に関連するシトクロム P450 2C19 の遺伝子 (CYP2C19*2) を選択した。凝集反応条件を最適化した結果、誤診の可能性がなく、しかも一塩基伸長の反応率が 30%でも目視識別が可能な診断システムをつくることに成功した。

② 論理素子モデルの開発：最後に、この非架橋型凝集現象の用途を遺伝子診断以外にも求めた。近年、核酸分子がもつ分子設計の自在性に基づいて、抗体/酵素に匹敵する分子認識能/触媒機能を分子コンピュータの開発に合目的に組み込むことに関心が集まっている。本研究では、溶液中の dsDNA に一般的にみられる局所構造の熱的ゆらぎ（ブリージング）に着目した論理素子モデルを構築した。上で述べたように、DNA ナノ粒子の末端 T-T ミスマッチが、分散媒に添加した Hg^{2+} をとりこんで 2 : 1 錯体を形成すると、ナノ粒子の分散安定性が大きく低下する。これは、ミスマッチ部位での擬似的な塩基対合が DNA 二重鎖末端のブリージングを抑制し、DNA 密生相の立体反発力を弱めることに起因する。この知見をもとに、同様に末端 C-C ミスマッチと錯体形成する Ag^+ と、上記の Hg^{2+} の二種類の化学シグナル（入力）の組み合わせに対して選択的に凝集応答し、表面プラズモン共鳴シフトに由来する可視情報（出力）を与える二項演算型（AND および OR）論理素子モデルを設計し、動作を実証することに成功した (Fig. 5)。合理的な設計が可能なメゾスコピック論理回路としての応用が期待できる。

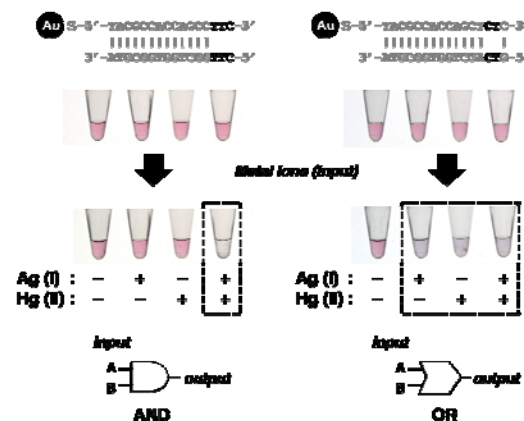


Fig. 5 DNA-functionalized colloidal logic gates: the AND gate (left) and the OR gate (right).

5. 主な発表論文等

(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 21 件)

- ① Masanobu Murou, Hiromi Kitano, Masahiro Fujita, Mizuo Maeda, and Yoshiyuki Saruwatari, "Self-association of zwitterionic polymer-lipid conjugates in water as examined by scattering measurements," *J. Colloid Interface Sci.*, 査読有, **390**, 47-53 (2012).
- ② Pengju Pan, Masahiro Fujita, Wei-Yang Ooi, Kumar Sudesh, Tohru Takarada, Atsushi Goto, and Mizuo Maeda, "Thermoresponsive micellization and micellar stability of poly(*N*-isopropylacrylamide)-*b*-DNA diblock and miktoarm star polymers," *Langmuir*, 査読有, **28**, 14347-14356 (2012).
- ③ Wei-Yang Ooi, Masahiro Fujita, Pengju Pan, Hui-Ying Tang, Kumar Sudesh, Kazuki Ito, Naoki Kanayama, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, "Structural characterization of nanoparticles from thermoresponsive poly(*N*-isopropylacrylamide)-DNA conjugate," *J. Colloid Interface Sci.*, 査読有, **374**, 315-320 (2012).
- ④ Masahiro Fujita, Yoshizumi Katafuchi, Kazuki Ito, Naoki Kanayama, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, "Structural study on gold nanoparticle functionalized with DNA and its non-cross-linking aggregation," *J. Colloid Interface Sci.*, 査読有, **368**, 629-635 (2012).
- ⑤ Naoki Kanayama, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, "Rapid naked-eye detection of mercury ion based on non-crosslinking aggregation of double-stranded DNA-carrying gold nanoparticles," *Chem. Commun.*, 査読有, **47**, 2077-2079 (2011).
- ⑥ Kyoosuke Isoda, Naoki Kanayama, Daisuke Miyamoto, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda, "RAFT-generated poly(*N*-isopropylacrylamide)-DNA block copolymers for temperature-responsive formation of polymer micelles," *React. Funct. Polym.*, 査読有, **71**, 367-370 (2011).
- ⑦ Pengju Pan, Masahiro Fujita, Wei-Yang Ooi, Kumar Sudesh, Tohru Takarada, Atsushi Goto, and Mizuo Maeda,

"DNA-functionalized thermoresponsive bioconjugates synthesized via ATRP and click chemistry," *Polymer*, 査読有, **52**, 895-900 (2011).

- ⑧ Takahito Ohshiro, Tamotsu Zako, Ryoko Watanabe-Tamaki, Takuo Tanaka, and Mizuo Maeda, "A facile method towards cyclic assembly of gold nanoparticles using DNA template alone," *Chem. Commun.*, 査読有, **46**, 6132-6134 (2010).
- ⑨ Takahito Ohshiro and Mizuo Maeda, "Single-molecule imaging of DNA duplexes immobilized on surfaces with a scanning tunneling microscope," *Chem. Commun.*, 査読有, **46**, 2581-2583 (2010).
- ⑩ Atsushi Ogawa and Mizuo Maeda, "Simple and rapid colorimetric detection of cofactors of aptazymes using noncrosslinking gold nanoparticle aggregation," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, **18**, 6517-6520 (2008).

[学会発表] (計 77 件)

以下に代表例として招待講演のみを記す。

- ① Mizuo Maeda, "DNA-carrying nanoparticles: synthesis, unique properties, characterization and applications," ICBS2013, March 21, 2013, Ibaraki, Japan.
- ② Mizuo Maeda, "PolyNIPAM-DNA conjugate: unique properties and applications," NIPAM-80, December 16, 2012, Hawaii, USA.
- ③ Mizuo Maeda, "DNA-functionalized nanoparticle biosensors," 7th Sweden-Japan BioNano Workshop, October 16, 2012, Stockholm, Sweden.
- ④ Mizuo Maeda, "DNA-carrying gold nanoparticles for bioanalytical applications," GOLD 2012, September 8, 2012, Tokyo, Japan.
- ⑤ Mizuo Maeda, "DNA-functionalized nanoparticles for biosensing," 4th International Conference: Smart Materials, Structures and Systems, June 13, 2012, Montecatini Terme, Italy.
- ⑥ Mizuo Maeda, "DNA-carrying nanoparticles with bioactive soft interface," 9th World Biomaterials Congress, June 2, 2012, Chengdu, China.
- ⑦ Mizuo Maeda, "Molecular soft-interface science for reliable biosensing," Bio Tech 2012, April 27, 2012, Tokyo, Japan.
- ⑧ Mizuo Maeda, "DNA-functionalized nanoparticles for biosensing," The 2nd RIKEN-McGill University Scientific

- Workshop, April 26, 2012, Saitama, Japan.
- ⑨ Mizuo Maeda, “Biosensor nanoparticles using DNA-based soft interface,” SIMS 2012, March 18, 2012, Ibaraki, Japan.
 - ⑩ Mizuo Maeda, “DNA-based soft interface for biosensing,” ASAM-3, September 21, 2011, Fukuoka, Japan.
 - ⑪ Mizuo Maeda, “Chemical-, ion-, and bio-sensors using DNA-modified nanoparticles,” Polymers in Medicine and Biology 2011, September 4, 2011, California, USA.
 - ⑫ Mizuo Maeda, “Nanoparticle-based sensors using DNA-modified gold colloids,” ICAS 2011, May 24, 2011, Kyoto, Japan.
 - ⑬ 藤田雅弘, “DNA 担持ナノ粒子の非架橋凝集”, つくばソフトマター研究会 2011, 2011 年 3 月 7 日, 千葉.
 - ⑭ Mizuo Maeda, “Diagnostic soft interface from DNA brush,” International Symposium on Engineering Neo-Biomimetics II, February 26, 2011, Ibaraki, Japan.
 - ⑮ Mizuo Maeda, “Ion-, chemical-, and gene-sensing DNA-modified Au nanoparticles,” 2011 IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems, February 23, 2011, Taiwan.
 - ⑯ Mizuo Maeda, “Unique colloidal behavior of DNA-carrying nanoparticles,” International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface, September 22, 2010, Chiba, Japan.
 - ⑰ 宝田徹, “DNA 担持高分子ミセルの特異なコロイド安定性”, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 26 日, 大阪.
 - ⑱ Mizuo Maeda, “DNA conjugate polymers and nanoparticles for rapid and reliable gene sensing,” APBP 2009, May 22, 2009, Jeju, Korea.
 - ⑲ Mizuo Maeda, “DNA conjugate polymers and nanoparticles,” 14th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, February 16, 2009, Utah, USA.
 - ⑳ Mizuo Maeda, “DNA nanomaterials for biosensing,” CNBI International Symposium on Nanobiomaterials, November 18, 2008, Tokyo, Japan.

[図書] (計 5 件)

- ① 金山直樹, 前田瑞夫, エヌ・ティー・エス, 「先端バイオマテリアルハンドブック」,

2012 年, pp. 418-422.

- ② 金山直樹, 前田瑞夫, 化学同人, 「CSJ カレントレビュー—09 金属および半導体ナノ粒子の科学」, 2012 年, pp. 124-132.
- ③ 宝田徹, 前田瑞夫, 化学同人, 「化学フロンティア ②新しい地平をひらく分析手法の最前線」, 2009 年, pp. 89-93.
- ④ 前田瑞夫, 丸善, 「ソフトマター—分子設計・キャラクター化から機能性材料まで—」, 2009 年, pp. 1-18 および pp. 205-211.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 重金属イオンの検出法およびそのための試薬

発明者: 金山直樹、宝田徹、前田瑞夫

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2008-257206

出願年月日: 2008 年 10 月 2 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.riken.jp/lab-www/bioengineering/>

読売新聞 (夕刊・科学欄・最前線)、「ナノ世界で『金』を活用/空気の浄化、遺伝子診断も/DNA 同士の結合、色の変化でわかる」、2012 年 11 月 22 日.

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

宝田 徹 (TAKARADA TOHRU)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号: 30336010

藤田 雅弘 (FUJITA MASAHIRO)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・専任研究員

研究者番号: 50342845

(3) 連携研究者

なし