

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K04895

研究課題名(和文) エントロピー的秩序化によるナノ構造形成

研究課題名(英文) Entropic Self-organization of DNA-functionalized Nanoparticles

研究代表者

藤田 雅弘 (Fujita, Masahiro)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・専任研究員

研究者番号：50342845

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では分子混雑下におけるDNAナノ粒子のエントロピー的秩序化によるナノ構造体形成とその制御に関する研究を推進した。金ナノ粒子を核とするDNAナノ粒子を対象にした。DNAの鎖状分子としての立体斥力、静電反発力のみならず、枯渇引力というエントロピックな相互作用を巧みに組み合わせることで、ナノ粒子の分散と凝集を任意に制御することができた。さらに、極めて秩序性の高い結晶様の三次元ナノ構造体を構築できることを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノマテリアルの誘導自己組織化は、材料科学の分野においてボトムアップ型構造構築技術の一つとして、大いに注目されている。本課題で取り組んだ手法はエントロピー的相互作用による構造秩序化に基づく点に大きな特色がある。このような秩序化は、物質が自発的に離合集散して複雑な機能を発現し、それを制御するという生命システムにおいて見られる現象と同じといわれている。本研究で得られた知見は、スマートマテリアル創製の新たな設計指針を与えるのみならず、細胞内の分子混雑化における機能性粒子や分子の動態に関する研究への展開も見込める。

研究成果の概要(英文)：This work aimed to develop a self-organization method of DNA-nanoparticles by an entropic effect and its regulation. Here, DNA-functionalized gold nanoparticles were used. The colloidal stability of the nanoparticles was manipulated by regulating a depletion attractive interaction as well as steric and electrostatic repulsive interactions between the nanoparticles. Using this approach, we were successful in assembling the nanoparticles into a well-ordered crystal-like structure.

研究分野：ナノ材料化学

キーワード：核酸分子 ソフト界面 ナノ粒子 分子クラウディング 枯渇効果 小角X線散乱

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、核酸分子 (DNA) が持つ分子認識能 (特異性) を活用したナノ材料の自己組織化技術に関する研究報告がなされ、大きな関心を集めている。DNA は 4 種類の塩基 (アデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C)) を有する鎖状高分子であり、A-T、G-C どうしで特異的に水素結合する (ワトソンクリック型塩基対) ことで、互いに相補的な二本の鎖がらせん (ヘリックス) 構造を形成する。この特異性を利用すると、一本鎖 DNA を担持したナノ粒子どうしを相補的 DNA 鎖により化学的に架橋させることが可能となる。塩基配列などを制御することで、ナノ粒子を三次元的に規則正しく集積させることができる技術が 2008 年頃に報告された^{1,2}。当時は体心立方格子 (BCC) と面心立方格子 (FCC) 構築に関する三次元集積技術が紹介されたが、現在では種々の複雑な結晶構造体を作成できることが実証されている³。これらの研究が高いインパクトをもって報告されることからわかるように、現在でもその注目の高さは増すばかりである。ただし、高度で複雑な三次元構造体を構築するには、複雑な塩基配列の設計、補助 DNA 鎖の添加、合成ポリマーとの共重合化など、高度な化学操作が要求される。また、ナノ粒子が集積する速さに問題があると考えられる。

われわれはかねてより DNA 担持ナノ粒子の物性・構造評価に関する研究を推進してきた。粒子表面の DNA 鎖の構造・物性の変化に応じて DNA 担持ナノ粒子が極めて迅速に離合集散するのだが、この現象は上記のような DNA 鎖の塩基対形成 (すなわち化学的な強い相互作用) によるものではなく、ファンデルワールス相互作用、静電相互作用や立体斥力作用などのバランス変化に依存していると考えられる。それらの作用の個々の役割を明らかにする研究過程において、大変興味深い事象に遭遇した。粒子間に働く相互作用を計測する目的で、枯渴引力作用による粒子凝集の誘導を行うと、従来には観測されなかった極めて高い規則性をもった三次元規則構造が形成されることを偶然見出した。この現象を利用すれば、前述の化学的な作用による従来の自己組織化とは異なる概念で、ナノ粒子の三次元構造制御技術が開発できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、偶然発見された枯渴引力による三次元ナノ構造体の創成と制御に関する基礎科学を推進する。この秩序化は、水素結合という化学的 (エンタルピー的) な引力作用による誘導集積とは異なり、枯渴引力というエントロピー的な理由で生じる点に特徴があるため、複雑な塩基配列デザインなどの高度な化学操作が不要となる。DNA 鎖長構造 (完全相補鎖、ミスマッチ構造、ループ構造など)、荷電 (イオン強度など)、核となる粒子の大きさなどを制御因子とし、これらの組合せと枯渴引力の効果がナノ粒子の分散安定性にどのように寄与するのかといったメカニズムを深く理解するとともに、規則構造構築にどのように関わっているのかを調べ、その知見に基づいてエントロピー的な自己組織化技術の指針を得ていこうとするものである。

3. 研究の方法

本研究課題では構造の明確な DNA 担持ナノ粒子を用いることとした。サイズ分布のほとんどない金ナノ粒子を核とし、その表面に DNA 鎖を高密度に固定化した粒子 (図 1) を対象に研究を遂行することにした。混み合い分子として分子量が明確に規定されたポリエチレングリコール (PEG) を用いた (図 1)。粒子の離合集散に関して、紫外可視分光光度計 (UV-Vis) を中心に定量評価をおこなった。三次元集積構造の評価は大型放射光施設 (SPring-8) での小角 X 線散乱法 (SAXS) によりおこなった。核のサイズ、DNA 鎖長と構造、系中のイオン強度、混み合い分子の分子量と濃度を関数とすることで、VDW 力、立体斥力、静電反発力および枯渴力を制御し、粒子の分散・凝集メカニズムを解明するとともに、構造規則性との関係を考察することにした。

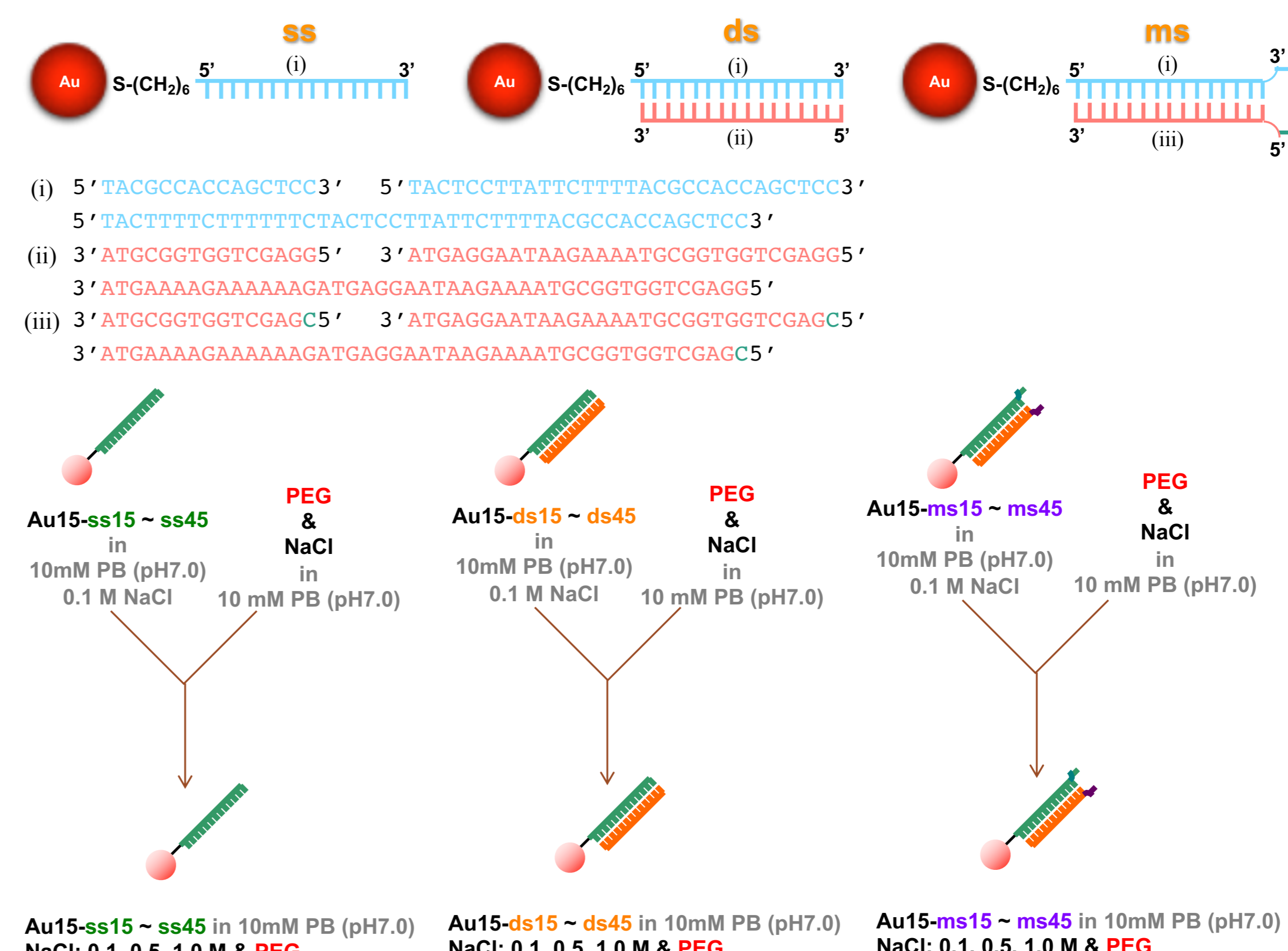


図 1 本課題で検討した DNA 担持金ナノ粒子と試料調製方法。

4. 研究成果

核として金ナノ粒子を用い、その表面を DNA 鎖で固定化した試料を対象に、PEG 存在下での粒子の分散安定性を調べた。DNA ナノ粒子が一本鎖 DNA (ssDNA) で覆われていると極めて高い分散安定性を示し、溶液は赤色を呈する (図 2)。この粒子は従来凝集しないとされていたが、ある PEG 濃度以上で溶液は青紫色に変化し、粒子凝集することがわかった (図 2)。さらに、高塩濃度下ほど粒子凝集させるのに必要な PEG 濃度は低下する様子が観測された (図 2)。粒子表

層が完全相補鎖との二重鎖 DNA (dsDNA) で覆われている場合、そもそもある塩濃度以上で非架橋凝集を起こすことが知られている。これは二重鎖形成による DNA 鎖の剛直化に起因する立体反発力の低下によるものであり、そのぶん凝集しやすいと考えている。PEG を添加するとより凝集しやすくなった。一方、たとえ二重鎖 DNA だとしても、表層側に一塩基ミスマッチ (msDNA) がある場合は高い分散安定性を示すが、この粒子が凝集するのに要する PEG 濃度は ssDNA で覆われた場合と同程度であることが明らかにされた (図 2)。粒子凝集に至る PEG 濃度が高いほど、つまり枯渇引力が大きいほどもともとの粒子は安定的で、そのあいだにはたらく斥力相互作用が大きかったことを意味する。わずかに一塩基ではあるが、ミスマッチによる運動の自由度の高さに起因したエントロピックな反発力が ssDNA の立体反発力と同程度であることを初めて明らかにした。DNA 鎖長は分散安定性を高める効果があり、長いほどより大きな枯渇引力が必要であった。DNA 鎖の立体斥力が安定性に寄与していることを意味している。

DNA ナノ粒子の凝集構造を SAXS により構造解析したところ、粒子凝集を引き起こす条件では粒子間の干渉性ピークが観測された (図 3)。ピーク位置は PEG 濃度増大とともに広角側へシフトした。粒子間距離が PEG 濃度の増大に伴い短くなったことを意味している。これはいずれの DNA 構造や鎖長の場合でも観測された。ssDNA の場合、鎖が収縮していくと考えられるが、剛直な二重鎖 DNA の場合は DNA 鎖が互いに貫入しあいながら粒子どうしが凝集し、枯渇引力の増大につれてその度合いが増していつているはずである。一方、二重鎖 DNA で架橋凝集した粒子では、粒子間距離に PEG 濃度依存性はなかった。非架橋凝集において、粒子の凝集が DNA 二重鎖の平滑末端間でのスタッキング相互作用に起因したものであることを強く支持する結果である。

枯渇剤である PEG の分子量を変化させても、DNA ナノ粒子の分散安定性に及ぼす枯渇効果の影響は同じ傾向を示した。ただし、DNA ナノ粒子が凝集に至る PEG 濃度は変化した。コロイド粒子間に作用する枯渇引力は、枯渇剤の分子量に依存することが理論上予期されるが、この結果はこれと矛盾しなかった。PEG 添加による DNA ナノ粒子の凝集は、脱水による疎水効果で誘導されるものではなく、枯渇効果で生じていることを示唆するものである。凝集した粒子間の距離は、やはり枯渇引力の増大とともに短くなることを明らかにした。

さらに、粒子サイズ効果も調査した。粒子凝集に至る PEG 濃度は、粒子サイズが大きいほど小さくてすむことがわかった。これはファンデルワールス相互作用が大きな役割を担っているためである。

従来、dsDNA で覆われたナノ粒子に対してのみ高塩濃度で非架橋凝集が起こるとされてきた。その凝集構造は乱れた構造であるが、凝集しないと考えられていた条件において適度に PEG を添加させると、秩序性の高い結晶様の構造へと誘導されることを見出した。これは dsDNA だけではなく msDNA の場合でも観測された (図 4)。立体反発力、静電反発力と枯渇引力とのバランスをうまく制御することで、極めて秩序性の高い結晶様の三次元ナノ構造体構造を生み出すことができた。枯渇引力の増大は凝集構造構造物の圧縮と不規則性をもたらした。

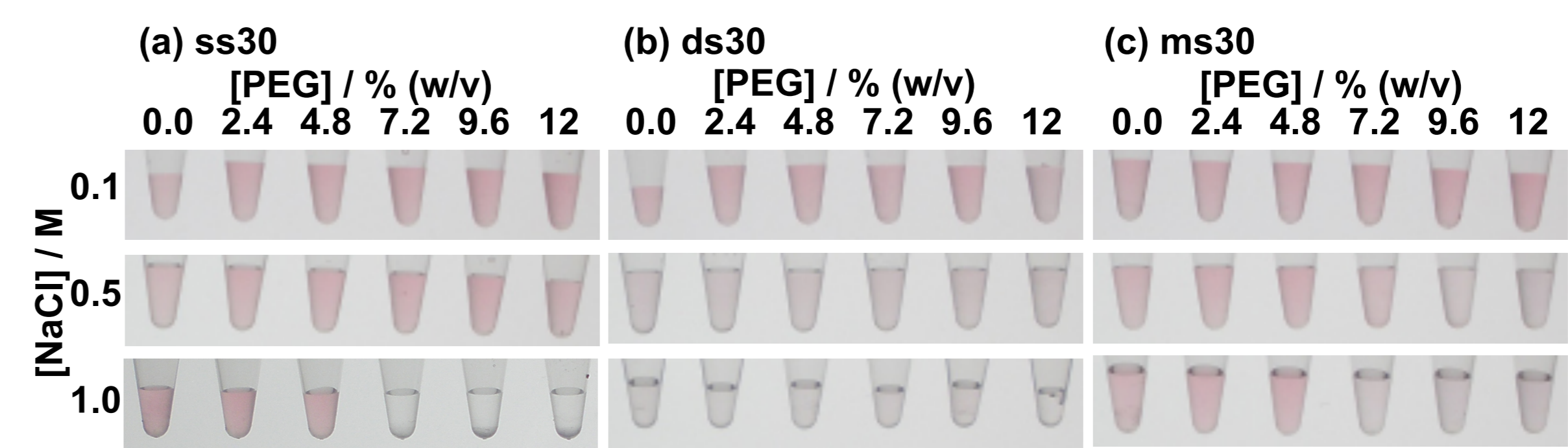


図 2 粒径 15 nm の金ナノ粒子からなる DNA (30 塩基) 担持ナノ粒子の分散安定性の塩濃度と PEG 濃度依存性. 赤色は粒子が分散、青紫色は粒子が凝集していることを意味する。

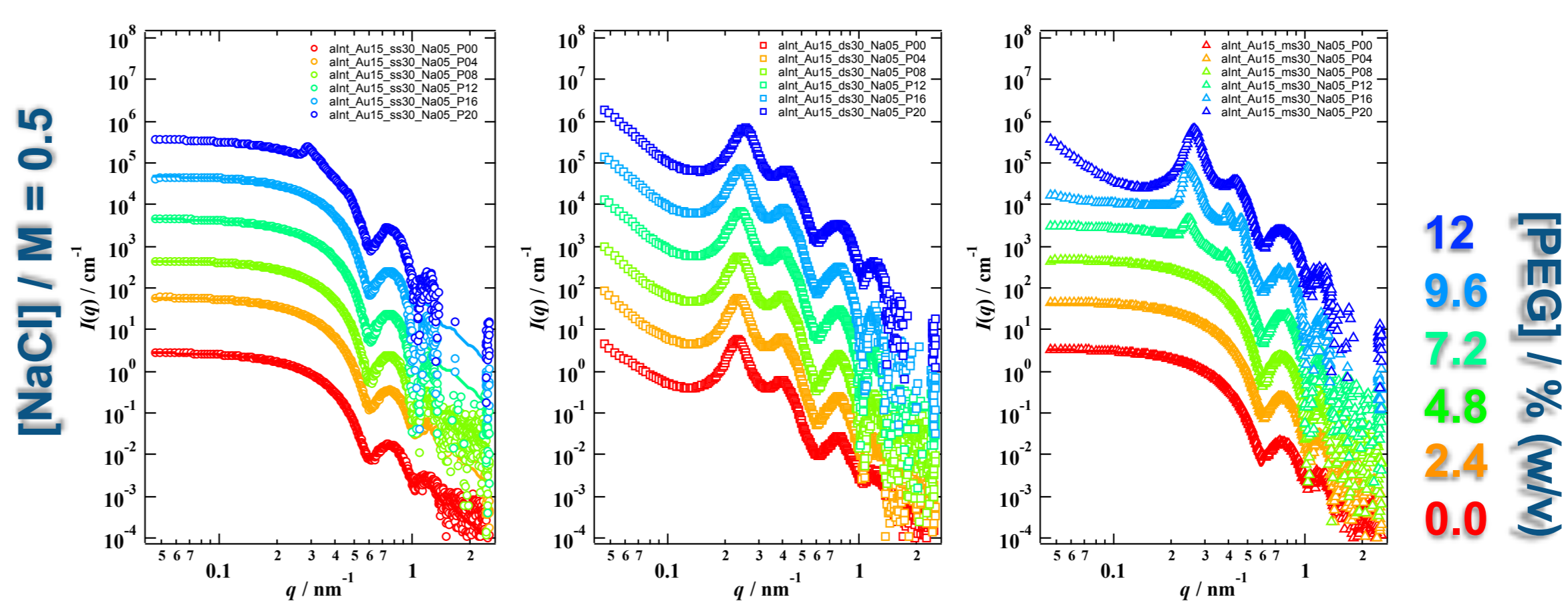


図 3 PEG 存在下での DNA 担持金ナノ粒子の SAXS プロファイルの例. 粒径 15 nm の金ナノ粒子に 30 塩基の ss-, ds-, msDNA が固定化されている. 温度 25 °C、0.5 M NaCl 存在下で、PEG の濃度を変えながら測定した。

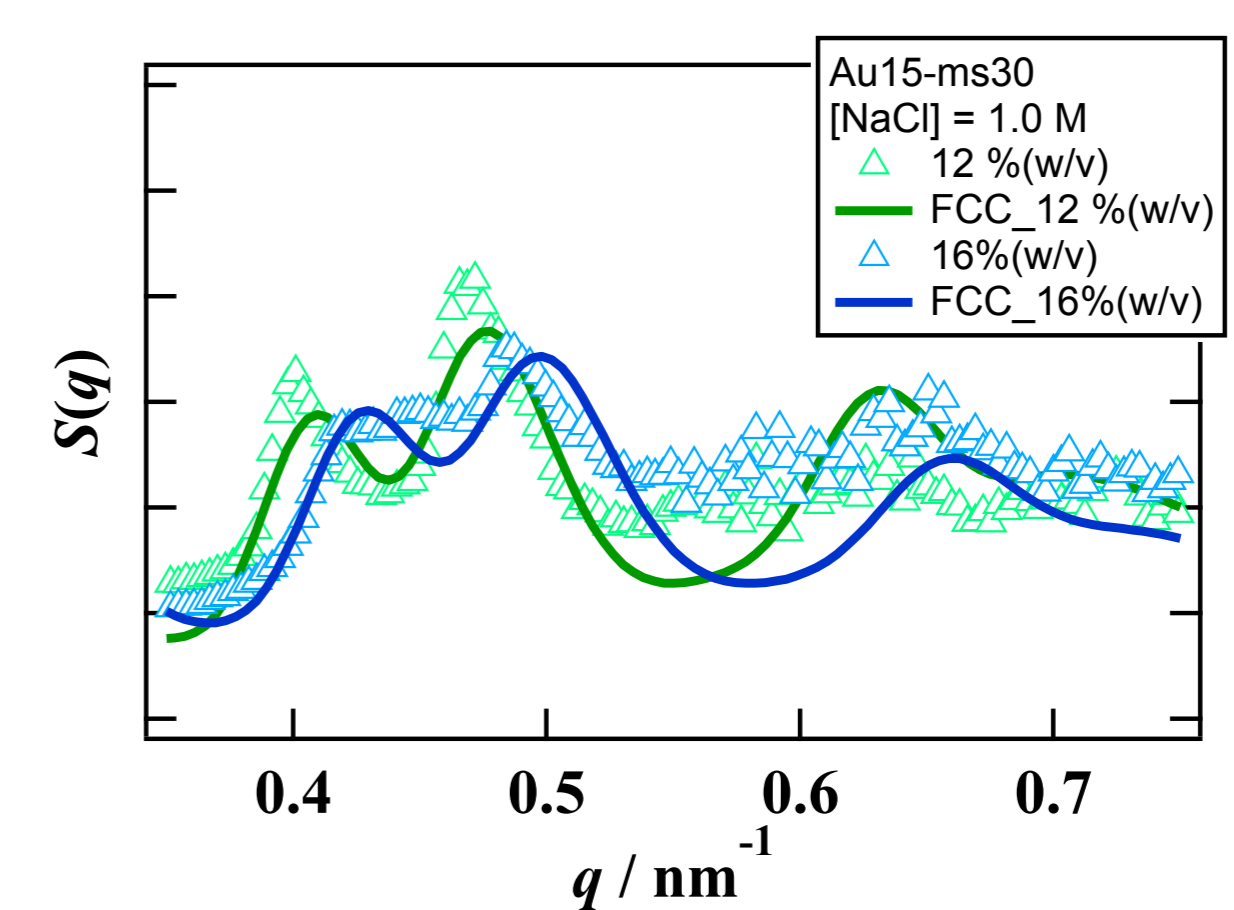


図 4 PEG 存在下での DNA 担持金ナノ粒子の構造因子 $S(q)$ の例. 粒径 15 nm の金ナノ粒子に 30 塩基の msDNA が固定化されおり、1.0 M NaCl 存在下で、ある PEG 濃度のとき結晶様の規則性を示す。

<引用文献>

- ① Nykypanchuk D., et al., *Nature* **2008**, 451, 549-552.
- ② Park, S. Y., et al., *Nature* **2008**, 451, 553-556.
- ③ 例えば、O'Brien, M. N. et al., *Nature Mater.* **2015**, 14, 833-839.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 15 件)

- ① S. Chuaychob, M. Fujita, and M. Maeda, "G-quadruplex-functionalized Gold Nanoparticles as a New Colorimetric pH Sensor", 2018, IPC2018.
- ② S. Chuaychob, M. Fujita, and M. Maeda, "pH Sensor via Tunable G-quadruplex Structure on Gold Nanoparticle Surface", 2018, 日本バイオマテリアル学会大会.
- ③ 佐孝貴文、藤田雅弘、前田瑞夫, "DNA コンジュゲートポリマーを用いた温度応答性蛍光プ

- ローブの創製”, 2018, 高分子討論会.
- ④ S. Chuaychob, M. Fujita, and M. Maeda, “A Sensitive Colorimetric pH Sensor via G-quadruplex-conjugated Gold Nanoparticles”, 2018, 高分子討論会.
 - ⑤ 佐孝貴文、藤田雅弘、前田瑞夫, “DNA コンジュゲートポリマーによる温度応答性蛍光プローブの創製”, 2018, 高分子学会年次大会.
 - ⑥ S. Chuaychob, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, C. Buranachai, C. Thammakhet-Buranachai, M. Fujita, and M. Maeda, “G-quadruplex-Functionalized Gold Nanoparticles-A New Door for Cisplatin Detection”, 2018, 高分子学会年次大会.
 - ⑦ 佐孝貴文、藤田雅弘、前田瑞夫, “Poly(*N*-isopropylacrylamide)-DNA 共重合体を利用した蛍光性金ナノクラスターの創製”, 2017, 高分子討論会.
 - ⑧ 森田雄耶、藤田雅弘、前田瑞夫, “光二量化による架橋型 DNA ナノミセルの創製と特性評価”, 2017, 高分子討論会.
 - ⑨ 藤田雅弘、前田瑞夫, “DNA ナノ粒子の分散安定性評価と凝集構造の解析”, 2017, 高分子討論会.
 - ⑩ T. Sako, M. Fujita, and M. Maeda, “Synthesis and Characterization of Gold Nanocluster-Conjugated Poly(*N*-isopropylacrylamide)”, 2017, IUMRS-ICAM 2017.
 - ⑪ M. Fujita and M. Maeda, “Non-crosslinking Aggregation of DNA-functionalized Gold Nanoparticles”, 2017, IUMRS-ICAM 2017.
 - ⑫ 藤田雅弘、前田瑞夫, “DNA 担持ナノ粒子の物性とそれを活かした検出機能”, 2017, 分析化学討論会.
 - ⑬ 藤田雅弘、前田瑞夫, “DNA 担持ナノ粒子の三次元結晶化”, 2016, 高分子討論会.
 - ⑭ 森田雄耶、藤田雅弘、前田瑞夫, “PNIPAAm-DNA 共重合体からなるナノゲルの温度応答性と物質内包特性の評価”, 2016, 高分子学会年次大会.
 - ⑮ 藤田雅弘、前田瑞夫, “エントロピー的秩序化による DNA 担持ナノ粒子の構造体形成”, 2016, 高分子学会年次大会.

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 藤田雅弘、前田瑞夫、エヌ・ティー・エス、「第 1 章第 3 節 温度応答性高分子と DNA との複合化と認識挙動」(宮田隆志監修 刺激応答性高分子ハンドブック)、2018, 349–357. (分担執筆)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。