様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　１１　日現在

機関番号：２４５０６
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１４０３９

研究課題名（和文）単一分子核酸検出を実現するプラズモニック光応答バイオセンサーの開発

研究課題名（英文）Development of plasmonic biosensor for the detection of nucleic acid

研究代表者
山名　一成（Yamana, Kazushige）

兵庫県立大学・工学研究科・教授

研究者番号：７０１９２４０８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：DNAの二本鎖形成を利用することで、表面に金ナノ粒子を修飾した電極を作製した。ペリレンジイミド(PDI)を光増感剤として、静電相互作用によってDNAにランダムに結合させた後、金ナノ粒子のプラズモン吸収に対応する光を照射することによって生じる電気化学応答の観測を行った。その結果、金ナノ粒子が表面上にあるときに強い光電流が観測された。金ナノ粒子によるアンテナ効果と近接場光によって光電流強度が大幅に増加することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A monolayer of gold nanoparticles (AuNP) on an electrode was constructed by using DNA hybridization between oligonucleotides on the AuNP and on the electrode. The electrochemical response of the AuNP-modified electrode was observed by electrochemical measurements after the modification of the surface with perylenediimide dyes used as photoactive molecules. Light irradiation on the surface without the AuNP showed weak photocurrent, while strong photocurrent generation was observed when the electrode was covered with the AuNP. This enhancement was explained by an increase in the excitation efficiency of the PDI molecules bound to the DNA connecting the electrode and the AuNP.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNA　プラズモン　核酸　バイオセンサー　電気化学　光電流

１．研究開始当初の背景

光合成系では、機能有機色素がタンパク質によって適切な位置に配置・固定化されることで光捕集と方向性を持った電子伝達を実現しており、これによって極めて高効率な光・化学エネルギー変換が可能となっている。光合成機能を人工的に達成するには、その条件を満足するように有機色素が精密に配列・固定化された分子集合体の構築が必要とされる。すなわち、色素分子配置をナノスケールで精密に制御することで、高効率な光捕集と光伝達、電荷分離とその後の電子・ホール輸送の制御が可能となり、量子効率が極めて高い光エネルギー変換機能を有する分子デバイスの開発に繋がると期待できる。

DNA は π スタック構造を介した電子・ホール輸送特性、DNA 配列情報に基づく自己組織化と高次構造体形成機能を有し、DNA 化学合成および化学修飾による自在な分子導入と機能界面への DNA の固定化技術が確立されていることから、機能有機色素を配列・集積化して作製する光デバイスや分子デバイス開発において有望な生体分子材料であると言える（図 1)。

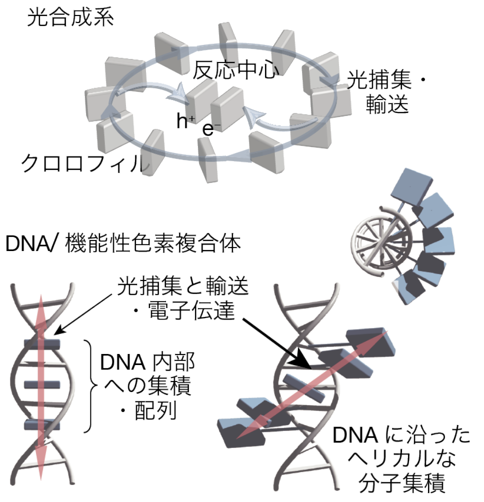

図 1. DNA 構造を利用した分子集積体構造の構築

２．研究の目的

ビルディングブロックとしての DNA の特徴に着目し、DNA 化学合成法および DNA 構造を基にした自己組織化を利用した機能色素集積体の作製とその機能評価、デバイス作製に関する研究を進め、機能分子を適切に配列・集積化することで、効率的な光吸収と電荷分離制御、光エネルギー変換が可能となることを見出してきた。本研究では、DNA 構造を基に機能色素分子の空間配置と配列を制御して集積化したナノ構造体を構築し、その物性評価と分子デバイスの開発を行った。

光捕集・電子伝達機能を有する電子ドナー・アクセプター分子の交互積層体、ヘテロ集積体を構築し、これら DNA 色素集積体の諸性質を種々の分光測定や時間分解分光測定、電気化学測定を通じて明らかにするとともに、機能色素集積 DNA 構造体を利用した光機能デバイスの作製を行った。

３．研究の方法

DNA 自動合成機を用いて、機能性色素分子としてポルフィリン、ペリレンジイミド、チアゾールオレンジを導入した修飾 DNA を合成した。また、クリック反応や酵素反応を利用して同様に機能性色素分子を有する DNA を作製した。これらの機能性色素分子導入 DNA の構造特性、光物性、光電変換特性を各種分光測定、電気化学測定を用いて調べた。

４．研究成果

アジド基を持つ Zn ポルフィリンとアセチレンを修飾した DNA を、Cu(I)存在下、固相クリック反応を行うことで目的とする DNA の合成を行った（図 2、表 1)。クリック反応後の HPLC 解析から、420 nm に強い吸収を持つ反応生成物が観測され、各種分光測定および MALDI-MS 測定から目的とする Zn ポルフィリンが導入された DNA であることを確認した。DNA の熱安定性解析から、ポルフィリンを導入しても安定な二本鎖が形成されること、またポルフィリン 2 分子を導入した DNA ではポルフィリン間の励起子相互作用に起因する吸収の短波長シフト、CD スペクトルのコットン効果が観測され、DNA の二本鎖形成を利用する

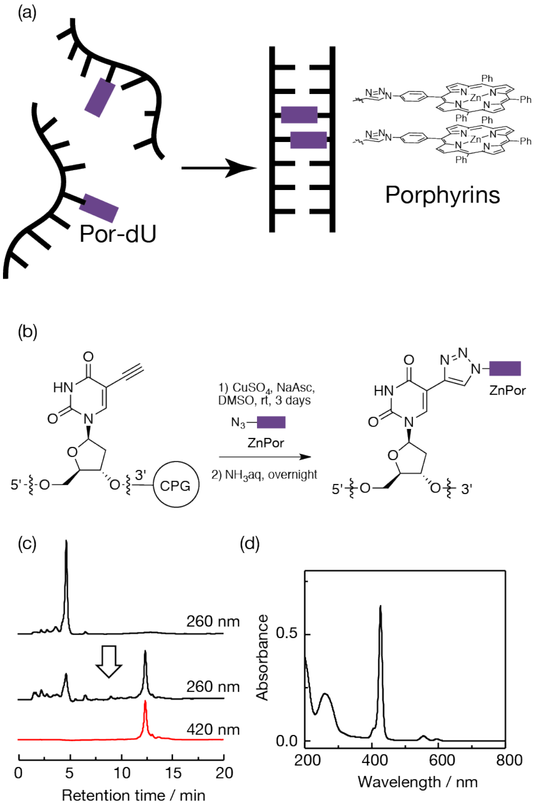

図 2. DNA 構造を利用したポルフィリンダイマーの構築

ことでポルフィリン分子を近接させたダイマー形成が可能であることが示された。

表 1 ポルフィリン修飾 DNA の配列

DNA	配列 (X:Por)
eP1	5′-ACGTGGCT**X**AACGACGCT-3′ 3′-TGCACCGAATTGCTGCGA-5′
eP2a	5′-ACGTGGCT**X**AACGACGCT-3′ 3′-TGCACCGAA**X**TGCTGCGA-5′
eP2b	5′-ACGTGGC**XX**AACGACGCT-3′ 3′-TGCACCGAATTGCTGCGA-5′

次に、ポルフィリンを修飾した DNA を電極表面に固定し、光電変換特性について調べた（図 3）電子アクセプターとして働く MV^{2+}存在下、ポルフィリンの Soret 体吸収に対応する 420 nm の光を照射すると強い電流応答が観測された。光電流アクションスペクトルは、ポルフィリンの吸収スペクトルと良い一致を示したことから、ポルフィリンを励起することで光電流が発生していることが確かめられた。ポルフィリンの数、配列の影響を調べた結果、モノマーに比べてダイマーがより強い光電流応答を示すことが分かった。これは、見かけの光吸収効率の増大に加えて、ダイマー形成に由来する励起状態の長寿命化、電荷分離反応の促進、再結合の抑制等の複合的な要因によって光電流効率が向上したと考えられる。

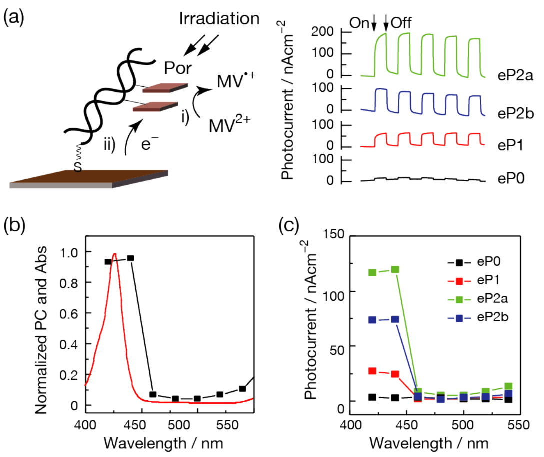

図 3. ポルフィリン修飾 DNA の単分子膜電極の光電応答。(a) 光電流発生機構。(b) 光電流応答。(c) アクションスペクトル。(d) アクションスペクトルの配列依存性

次に、酵素反応を利用して、光機能性色素分子として広く利用されているペリレンジイミド(PDI)を導入した DNA の作製を行った（図 4）。dU を除去して abasic site を生成させる酵素 uracil DNA glycosylase を用いて、反応活性部位となるアルデヒドを DNA 中に発生させ、アミノ基を持つ PDI と還元的アミノ化反応させることで目的とする DNA の作製を試みた。HPLC, MALDI-MS の分析から目的 DNA の合成を確認し、CD スペクトルから、PDI は DNA 内部にスタックした状態で存在し、ダイマー、トリマーも同様にスタック構造を形成することが分かった（図 5）。また、チアゾールオレンジ等、別の平面性の色素分子も同様に効率よく導入できることが分かった。

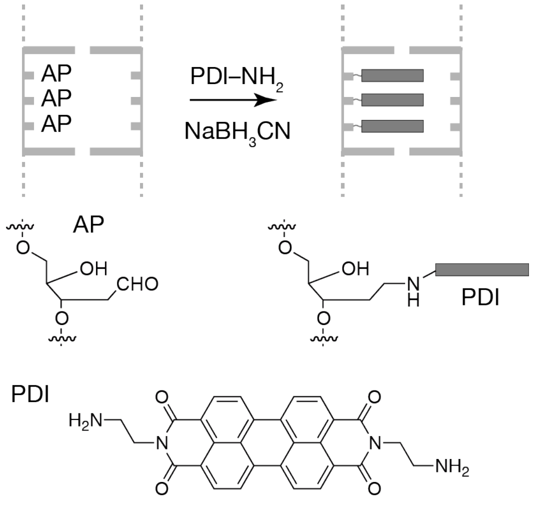

図 4. Abasic sites を利用した PDI の修飾法

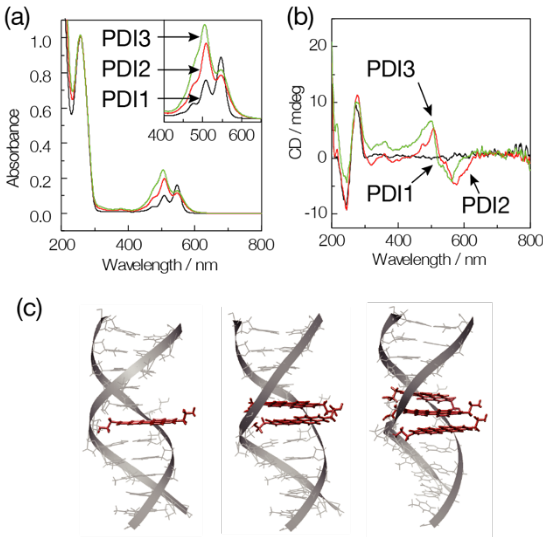

図 5. PDI スタック構造。DNA に導入した PDI の(a)吸収スペクトル、(b) CD スペクトル。(c) 分子構造モデル。

次に、PDI/DNA を修飾した電極の光応答性について調べた（図 6）。Au-S 結合を介して DNA の単分子膜を金電極上に構築し、光を照射した時の電流強度を計測し、光電流アクションスペクトルを得た。PDI 単量体, 二量体の吸収スペクトル形状に一致すること示され、PDI の光励起によって電流が発生することが分かった。また、PDI 単量体に比べて二量体では光電流が増強されることが示され、スタ

ックした PDI が光電流発生収率を向上させることが明らかになった。また、PDI の対面の塩基対に強度が依存していることから、塩基識別のためのバイオセンサーとしての応用が可能であることが示唆された。

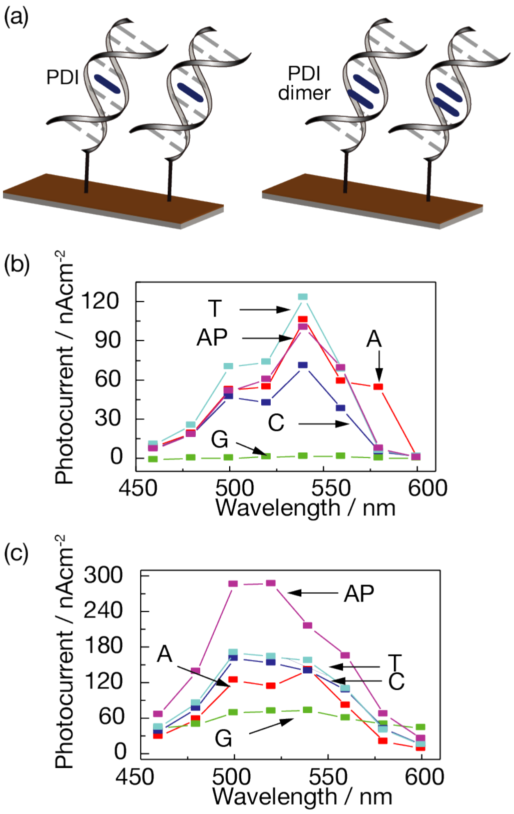

図 6. PDI を持つ DNA の単分子膜電極。(b, c) 光電流応答の配列依存性。

以上、DNA の構造を利用して、様々な機能性色素分子を組織化した機能性 DNA を作製した。DNA 内外で分子は組織的に集積し、その構造状態に応じた光電変換応答を示すことが明らかになった。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 8 件）

① T. Takada, S. Ishino, A. Takata, M. Nakamura, M. Fujitsuka, T. Majima and K. Yamana, "Rapid electron transfer of stacked heterodimers of perylene diimide derivatives in a DNA duplex" *Chem. Eur. J.*, ***24***, 8228-8232 (2018).（査読有）
10.1002/chem.201800947

② T. Takada, Y. Umakoshi, M. Nakamura and K. Yamana, "A luminescent perylenediimide as a binding ligand for pyrimidine/pyrimidine mismatches within a DNA duplex" *Chemistryselect*, ***2***, 6047-6051 (2017).（査読有）
10.1002/slct.201701310

③ T. Takada, T. Iwaki, M. Nakamura and K. Yamana, "Photoresponsive electrodes modified with DNA duplexes possessing a porphyrin dimer" *Chem. Eur. J.*, ***23***, 18258-18263 (2017).（査読有）
10.1002/chem.201704281

④ Y. Hasegawa, T. Takada, M. Nakamura and K. Yamana, "Ferrocene conjugated oligonucleotide for electrochemical detection of DNA base mismatch" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, ***27***, 3555-3557 (2017).（査読有）
10.1016/j.bmcl.2017.05.049

⑤ T. Takada, M. Ido, A. Ashida, M. Nakamura and K. Yamana, "DNA-templated synthesis of perylenediimide stacks utilizing abasic sites as binding pockets and reactive sites" *ChemBioChem*, ***17***, 2230-2233 (2016).（査読有）
10.1002/cbic.201600454

⑥ T. Takada, M. Takemura, Y. Kawano, M. Nakamura and K. Yamana, "Photoresponsive DNA monolayer prepared by primer extension reaction on the electrode" *Langmuir*, ***31***, 3993-3998 (2015).（査読有）
10.1021/la505013u

⑦ T. Takada, M. Ido, A. Ashida, M. Nakamura, M. Fujitsuka, K. Kawai, T. Majima and K. Yamana, "Photocurrent generation through charge-transfer processes in noncovalent perylenediimide/DNA complexes." *Chem. Eur. J.*, ***21***, 6846-6851 (2015).（査読有）
10.1002/chem.201406592

⑧ M. Nakamura, K. Tsuto, A. Jomura, T. Takada and K. Yamana, "Donor-acceptor heterojunction configurations based on DNA-multichromophore arrays" *Chem. Eur. J.*, ***21***, 11788-11792 (2015).（査読有）
10.1002/chem.201501955

〔学会発表〕（計 7 件）

① Tadao, Takada, Aoi Nakano, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana, Artificial Nucleic Acid Probes Possessing Stacked Fluorescent Chromophores , ISNAC

2017, 東京理科大学, 2017 年 11 月

② 本多 由理佳・高田 忠雄・石野 竣也・中村 光伸・山名 一成, DNA 構造を利用したチアゾール会合体の構築と発光特性制御, 日本化学会 第 97 春季年会(2017), 慶應義塾大学 日吉キャンパス, 2017 年 3 月

③ 高田 忠雄･本多 由理佳･中村 光伸･山名 一成, 発光色素クラスターを有するDNA を用いた発光分子センサーの開発, 第 10 回バイオ関連化学シンポジウム, 石川県立音楽堂, 2016 年 9 月

④ Tadao Takada, Kazushige Yamana, Fluorescent nucleic acids possessing perylenediimide stacks, 第 22 回ヌクレオシド･ヌクレオチド･核酸に関する国際ラウンドテーブル(XXII IRT), パリ（フランス）, 2016 年 7 月

⑤ 高田 忠雄･石野 竣也･中村 光伸･山名 一成, ペリレンジイミドヘテロダイマーを有する核酸コンジュゲートの作製と核酸検出蛍光センサーへの応用, 第 9 回バイオ関連化学シンポジウム, 熊本大学（熊本県）, 2015 年 9 月

⑥ Misa Ido, Tadao Takada, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana, DNA-templated synthesis of functional dye clusters, ISNAC 2015, イーグレ姫路（兵庫県）, 2015 年 9 月

⑦ Tadao Takada, Syunya Ishino, Misa Ido, Mitsunobu Nakamura, Kazushige Yamana, Photochemical characterization of homo- and heterocomplexes of perylenediimide derivatives constructed within DNA duplex, ISNAC 2015, イーグレ姫路（兵庫県）, 2015 年 9 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/msc1/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
山名　一成（YAMANA, Kazushige）
兵庫県立大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：70192408

(2)研究分担者
高田　忠雄（TAKADA, Tadao）
兵庫県立大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号： 60511699