

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K05992

研究課題名(和文) DNAブラシ界面間力の表層構造依存性に基づく「水和スイッチ」の創出

研究課題名(英文) Hydration switch system based on the surface structure dependence of DNA brush interactions

研究代表者

金山 直樹 (Kanayama, Naoki)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・材料・化学領域・主任研究員

研究者番号：80377811

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)：本研究は、DNAブラシ表層の局所的な水和状態の変化に基づき、DNAブラシ間に働く相互作用を制御する「水和スイッチ」の創出を目的としている。一定温度・イオン強度下でDNAブラシ表層の水和状態を局所的に変化させる手段として、DNA二重鎖に導入した核酸塩基類縁体の光異性化に伴う構造変化を利用し、DNAブラシ間に働く相互作用を光刺激で可逆的に引力・斥力制御が可能な水和スイッチを構築することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題で提案した水和スイッチの特徴は、DNA鎖の塩基配列や高次構造の変化などの大規模な構造変化を伴わず、DNA二重鎖の末端構造(末端塩基対の有無)に対応した局所的な水和状態の違いに基づいてDNA鎖間相互作用を制御する点にあり、これは応用上の利点にも繋がる。実際に、DNA鎖間の相互作用を利用したDNAナノ構造体の集積化においては、構成ユニットの構造に干渉しない一定温度・イオン強度条件下で、迅速かつ可逆的な構造変換機能を集積体に付与できることを実証した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to construct a "hydration switch" that controls interaction between DNA brushes based on changes in the local hydration state of their surfaces. Photoisomerization of azobenzene derivatives incorporated into the DNA duplexes was used as a trigger to locally change the hydration state of the DNA brush surface under both isothermal and isoionic-strength conditions. The photoisomerization of azobenzene moiety incorporated into the vicinity of the DNA brush surface could change the hydration states of nucleobases on the outermost surface as well as their base pairing status, and reversibly switch the attractive/repulsive interactions between DNA brushes.

研究分野：高分子・繊維材料

キーワード：DNA 水和 ホフマイスター系列 光異性化

1. 研究開始当初の背景

高分子電解質（ポリアニオン）である DNA 鎖が、その片末端を固体表面に固定されてブラシ状に集積した所謂「DNA ブラシ」では、相補鎖認識能や二重鎖構造の熱安定性が一般的な溶液状態の DNA 鎖と比べて向上し、核酸分解酵素に対する選択的な感受性が発現するなど、ユニークな性質が見出されている。これまでに研究代表者は、DNA 二重鎖がブラシ状に集積した DNA 二重鎖ブラシにおいて、表層の僅かな構造の違いが界面特性に明敏に反映される事例を報告してきた。また最近、高塩濃度環境下で向かい合った 2 つの DNA 二重鎖ブラシの間に生じる相互作用（界面間力）が、DNA 二重鎖ブラシ表層の僅か 1 組の塩基対合の有無に対応して、引力的（塩基対合あり）あるいは斥力的（塩基対合なし）と明瞭に異なることを報告した (N. Kanayama ら、*Langmuir* 2016)。DNA 二重鎖ブラシ表層における塩基対合の有無は、DNA 二重鎖ブラシの表面電荷に殆ど影響を与えないにも関わらず、何故、DNA 二重鎖ブラシ表層における塩基対合の有無に対応した界面間力の相違が生じるのか？その分子メカニズムは明らかではない。

2. 研究の目的

研究代表者は、前述した DNA 二重鎖ブラシにおける表層構造依存的な界面間力の相違が、高塩濃度下で顕在化することに着目した。DNA 水溶液の塩濃度の上昇は、DNA 鎖間の静電反発を低減するのみならず、DNA 鎖の水和状態を変化させる（脱水和を促進する）ことが考えられる。以上を踏まえ、研究代表者は、DNA 二重鎖ブラシ表層の局所的な水和状態の変化に基づき、DNA 二重鎖ブラシ間相互作用を制御する「水和スイッチ」システムを着想するに至った。そこで、(1) 「水和スイッチ」コンセプトの妥当性を検証し、(2) 外部刺激に応答する水和スイッチ・システムの構築および実証、を行うことを目的とした本研究課題を立案した。

3. 研究の方法

(1) 「水和スイッチ」コンセプトの妥当性検証

DNA 二重鎖ブラシ間相互作用を評価する手法として、DNA 二重鎖ブラシで表面が覆われたコロイド粒子 (DNA コロイド: dsDNA-CPs) の種々のアルカリ金属塩 (LiCl, NaCl, KCl, RbCl, CsCl) を含む水溶液中における分散状態の評価を実施した。また、光ピンセット法を用い、種々のアルカリ金属塩水溶液中における dsDNA-CPs の粒子間力計測を実施した。

(2) 外部刺激に応答する水和スイッチ・システムの構築および実証

外部刺激により DNA 二重鎖ブラシ表層の局所的な水和状態を制御するためには、一定温度・イオン強度下で DNA ブラシ表層の塩基対合を変化させる必要がある。そこで具体的な手段として、光異性化挙動が知られる核酸類縁体を DNA 二重鎖ブラシの表層近傍に導入し、その光異性化によって誘起される局所的な二重鎖構造の変化を利用することを考案した。当該ブラシで覆われた金ナノ粒子を調製し、光刺激に対する分散状態の変化を追跡し水和スイッチ・システムの動作を検証した。

4. 研究成果

(1) 「水和スイッチ」コンセプトの妥当性検証

カルボン酸ラテックス粒子 ($d = 2 \mu\text{m}$) に DNA 鎖を化学固定し、表層に塩基対合した核酸塩基を有する DNA コロイド粒子を調製した (dsDNA-CPs)。種々のアルカリ金属塩を含む緩衝液 (pH 7.4) に dsDNA-CPs が分散した状態を光学顕微鏡で観察した。観察画像内の dsDNA-CPs 粒子のうち、単一粒子として分散している粒子の比率 (Single particle fraction: S.F. 値) を算出した (図 1)。アルカリ金属塩の濃度が 150 mM では、いずれの水溶液においても dsDNA-CPs は分散状態を保持し、S.F. 値は 0.9 以上であった。一方、アルカリ金属塩の濃度が 300 mM 以上の水溶液では、アルカリ金属塩の種類によって dsDNA-CPs の凝集に伴う S.F. 値の低下に違いが見られた。同一塩濃度で比較すると、LiCl 水溶液

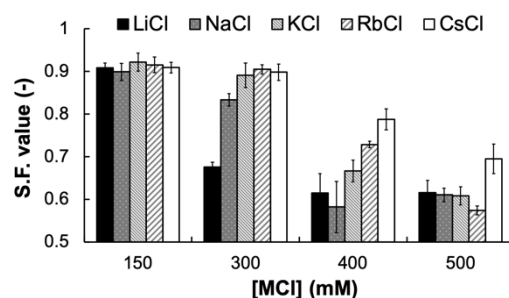


図 1 各種アルカリ金属塩水溶液中に分散した dsDNA-CPs の S.F. 値

中で S.F. 値が最も低く、CsCl 水溶液中で S.F. 値が最も高くなる傾向にあった。ここで、各アルカリ金属塩の水溶液中における dsDNA-CPs のゼータ電位を測定したところ、アルカリ金属塩の種類に依らず同等の値が確認され、アルカリ金属塩の種類による dsDNA-CPs の電荷中和の程度に違いはみられなかった。

続いて、光ピンセット法による dsDNA-CPs 粒子間力計測を行った。図 2(a) に 500 mM LiCl 水溶液中で測定した dsDNA-CPs の $F-D$ 曲線を示す。粒子同士の接近過程における引力的な相互作用を意味する下向きのピークが確認された。一方、500 mM CsCl 水溶液中で測定した $F-D$ 曲線では、明瞭なピークは確認されなかった (図 2(b))。NaCl, KCl 水溶液中においても同様に粒子間力計測を行い、 $F-D$ 曲線を比較した結果、 $\text{LiCl} > \text{NaCl} > \text{KCl} > \text{CsCl}$ の順で粒子間引力の差異が認められた (図 2(c))。アルカリ金属イオンに着目すると、ここで観測された粒子間引力の強さの順序は、水溶性高分子に対する塩析効果の序列であるホフマイスター系列とよく一致している。

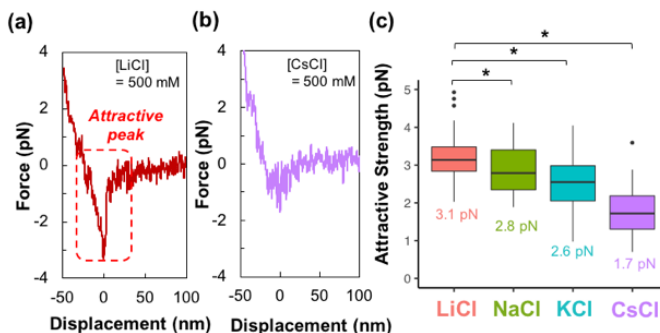


図 2 (a) 500 mM LiCl 水溶液中で測定した dsDNA-CPs の $F-D$ 曲線. (b) 500 mM CsCl 水溶液中で測定した dsDNA-CPs の $F-D$ 曲線. (c) 各種アルカリ金属塩水溶液中における dsDNA-CPs の粒子間引力 (DNA 二重鎖ブラシ間引力に相当).

以上の結果は、塩濃度の上昇に伴う DNA 二重鎖ブラシ間相互作用の変化には、表層の水和状態が影響していることを示しており、本研究で提案した「水和スイッチ」システムの基本コンセプトの妥当性が支持された。

(2) 外部刺激に応答する水和スイッチ・システムの構築および実証

外部刺激により DNA 二重鎖ブラシ表層の局所的な水和状態を一定温度・イオン強度下で制御する手段として、可逆的な光異性化挙動が知られるアゾベンゼン誘導体 (Azo-TN, 図 3(a)) を DNA 二重鎖ブラシ表層近傍に導入した光駆動型水和スイッチ (図 3(b)) を考案した。水和スイッチを導入した DNA 金ナノ粒子 (DNA-AuNPs, 図 3(c)) は、塩基対合した核酸塩基 (A-T ペア) をブラシ表層に有している。Azo-TN 部位が *trans* 体の状態で、1 M NaCl を含む緩衝液 (pH 7.4) 中に DNA-AuNPs を添加すると、自発的に凝集し薄紫色の溶液となった。この凝集挙動は、DNA ブラシ末端間に働く引力的な相互作用の発生を示唆している。この溶液に、Azo-TN 部位の *trans-cis* 異性化を誘起する紫外光 ($\lambda = 350 \text{ nm}$) を照射したところ、凝集状態の DNA-AuNPs が徐々に分散し、照射開始 600 s 後には 520 nm 付近に分散した AuNPs 特有のシャープな表面プラズモン吸収帯をもつ赤色の溶液に変化した (図 4(a))。続いて、Azo-TN の *cis-trans* 異性化を誘起する可視光 ($\lambda = 450 \text{ nm}$) を照射すると DNA-AuNPs が再凝集し、580 nm 付近にブロードな表面プラズモン吸収帯がシフトした薄紫色の溶液に変化した (図 4(b))。これらの光照射による DNA-AuNPs の分散凝集挙動の変化は、水和スイッチの動作に対応した DNA ブラシ間相互作用の変化が、DNA-AuNPs の分散凝集挙動に反映されたものと考えられる。実際、同様の光照射実験を水和スイッチとなる Azo-TN を導入していない DNA-AuNPs に行ったところ、その分散状態に全く変化がみられなかった。

以上の結果より、光駆動型水和スイッチによる DNA 二重鎖ブラシ間相互作用の制御を実証することができた。

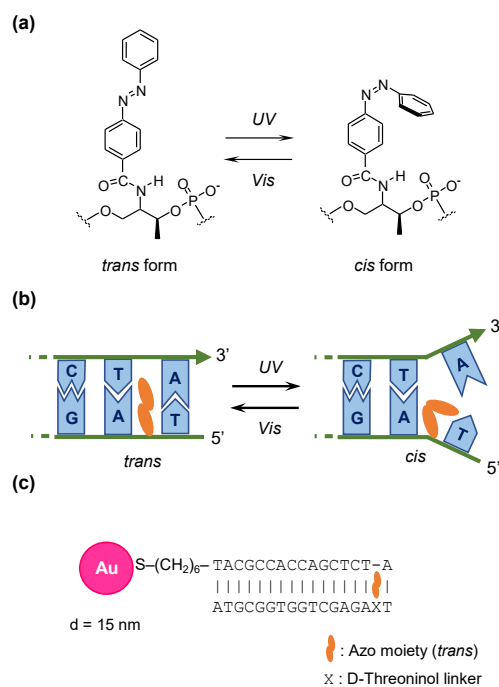


図 3 (a) Azo-TN の光異性化挙動. (b) 光駆動型水和スイッチの概略. (c) 光駆動型水和スイッチを導入した DNA 金ナノ粒子の模式図.

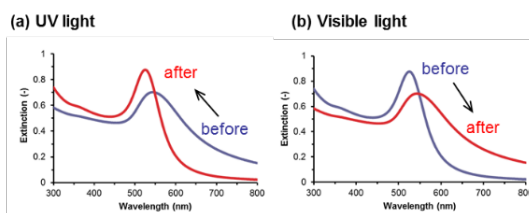


図 4 光駆動型水和スイッチによる DNA-AuNPs の分散凝集変化. (a) UV 光照射 (凝集→分散). (b) 可視光照射 (分散→凝集).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Naoki Kanayama, Satomi Kishi, Tohru Takarada, Mizuo Maeda	4. 巻 56
2. 論文標題 Photo-Switching of Blunt-End Stacking between DNA Strands Immobilized on Gold Nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 14589-14592
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0CC05085G	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiroya Nakauchi, Mizuo Maeda, Naoki Kanayama	4. 巻 37
2. 論文標題 DNA Terminal-Specific Dispersion Behavior of Polystyrene Latex Microparticles Densely Covered with Oligo-DNA Strands Under High-Salt Conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 461-468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCP04	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taito Sekine, Naoki Kanayama, Kazunari Ozasa, Takashi Nyu, Tomohiro Hayashi, Mizuo Maeda	4. 巻 34
2. 論文標題 Stochastic Binding Process of Blunt-End Stacking of DNA Molecules Observed by Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 15078-15083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.8b02224	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 金山直樹・前田瑞夫	4. 巻 66
2. 論文標題 ナノ粒子上のDNAブラシ層が示す特異な性質	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 高分子	6. 最初と最後の頁 110-112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金山直樹	4. 巻 65
2. 論文標題 医療応用を指向したナノ粒子型DNAハイブリット材料	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 工業材料	6. 最初と最後の頁 43-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 金山直樹	4. 巻 54
2. 論文標題 「見て・診る」ための金ナノ粒子	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 31-35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計31件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 金山直樹、中内宙弥、前田瑞夫
2. 発表標題 光ピンセットを用いたDNA末端間スタッキングのピコ力学解析
3. 学会等名 第80回分析化学討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山直樹、宝田徹、前田瑞夫
2. 発表標題 光刺激によるDNA二重鎖末端間スタッキングの可逆的制御
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金山直樹
2. 発表標題 部位特異的なDNA鎖間のチカラをはかる ~ ナノ・ピコ力学計測への挑戦
3. 学会等名 第50回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山直樹
2. 発表標題 “スマートな色材”を指向したDNA修飾プラズモンナノ粒子
3. 学会等名 第50回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中内宙弥、前田瑞夫、金山直樹
2. 発表標題 種々の塩水溶液におけるDNA修飾コロイド粒子間力の計測
3. 学会等名 第68回高分子年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中内宙弥、前田瑞夫、金山直樹
2. 発表標題 DNA二重鎖間スタッキングの光ピンセット法による力学計測
3. 学会等名 第29回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山直樹、中内宙弥、前田瑞夫
2. 発表標題 光ピンセットを用いる二本鎖DNA末端間スタッキング現象の力学計測
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中内宙弥、前田瑞夫、金山直樹
2. 発表標題 DNA修飾コロイド粒子の非架橋凝集挙動におけるアルカリ金属塩の影響
3. 学会等名 コロイド&界面科学研究センター 第5回研究討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中内宙弥、前田瑞夫、金山直樹
2. 発表標題 Terminal Sequence-specific Dispersion Behavior of DNA-functionalized Microspheres
3. 学会等名 第29回 日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山直樹, 今村星香, 前田瑞夫
2. 発表標題 表面修飾ガラス基板におけるDNA修飾金ナノ粒子の吸着挙動
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中内宙弥, 前田瑞夫, 金山直樹
2. 発表標題 光ピンセット法によるDNA修飾マイクロ粒子間相互作用の評価
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金山直樹, 中内宙弥, 前田瑞夫
2. 発表標題 光ピンセットによるDNA末端間相互作用の計測
3. 学会等名 第28回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金山直樹, 中内宙弥, 前田瑞夫
2. 発表標題 光ピンセット技術を利用したDNA間相互作用のピコ力学計測
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中内宙弥, 前田瑞夫, 金山直樹
2. 発表標題 光ピンセットを用いるDNA修飾コロイド粒子間力の直接計測
3. 学会等名 第69回コロイドおよび界面化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中内宙弥, 前田瑞夫, 金山直樹
2. 発表標題 光ピンセットを利用した末端部位特異的なDNA間相互作用の直接計測
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中内宙弥, 前田瑞夫, 金山直樹
2. 発表標題 金属イオン選択的に誘起されるDNAコロイド粒子間力
3. 学会等名 信州コロイド&界面科学研究センター 第4回研究討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中内宙弥, 前田瑞夫, 金山直樹
2. 発表標題 金属イオン選択的に再構築されたDNA鎖間スタッキングの力学計測
3. 学会等名 第49回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroya Nakauchi, Mizuo Maeda, Naoki Kanayama
2. 発表標題 Optical Tweezers Study of Terminal-Specific DNA/DNA Interactions Induced by Salts
3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroya Nakauchi, Mizuo Maeda, Naoki Kanayama
2. 発表標題 Direct Measurement of Double-Stranded DNA-Mediated Interparticle Force by Optical Tweezers
3. 学会等名 The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroya Nakauchi, Mizuo Maeda, Naoki Kanyama
2. 発表標題 Application of Optical Tweezers Technique to Measure Terminal-Specific DNA/DNA Interactions
3. 学会等名 3rd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山直樹、中内宙弥、前田瑞夫
2. 発表標題 光ピンセット法による粒子間力計測に基づいたDNA二重鎖間相互作用の評価
3. 学会等名 平成30年度 日本生物物理学会 中部支部講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山直樹
2. 発表標題 機能性高分子としての化学合成DNA
3. 学会等名 機能性高分子材料研究会 平成29年度第1回研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金山直樹
2. 発表標題 ブラシ状のDNA鎖が関わるコロイド・界面現象
3. 学会等名 第68回 コロイドおよび界面化学討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金山直樹
2. 発表標題 DNAブラシが関わるコロイド・界面現象の研究
3. 学会等名 信州コロイド&界面科学研究会 第3回研究討論会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金山直樹
2. 発表標題 オリゴDNA鎖が関わるコロイド・界面現象
3. 学会等名 平成29年度 富山大学生命融合科学教育部シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金山直樹
2. 発表標題 DNAブラシ界面の設計と機能発現
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金山直樹, 宝田徹, 前田瑞夫
2. 発表標題 DNA二重鎖ブラシ間相互作用の可逆的光スイッチング
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金山直樹, 宝田徹, 前田瑞夫
2. 発表標題 光によるDNAブラシ界面間力のスイッチング
3. 学会等名 第27回バイオ・高分子シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金山直樹, 関根泰斗, 尾笹一成, 丹生隆, 林智広, 前田瑞夫
2. 発表標題 コロイドブロープAFM法によるDNAブラシ界面間相互作用の直接計測
3. 学会等名 第66回高分子討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中内宙弥, 前田瑞夫, 金山直樹
2. 発表標題 ステム・ループ型DNAで覆われたマイクロ粒子の調製と分散挙動評価
3. 学会等名 信州コロイド&界面科学研究会 第3回研究討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中内宙弥, 前田瑞夫, 金山直樹
2. 発表標題 ステム・ループ型DNAで覆われたDNAマイクロ粒子が示す末端塩基配列選択的な分散・凝集挙動
3. 学会等名 日本化学会 第98春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 金山直樹・前田瑞夫	4. 発行年 2020年
2. 出版社 講談社サイエンティフィック	5. 総ページ数 5
3. 書名 核酸科学ハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------