

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：54601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05068

研究課題名(和文) 光イオン化マラカイトグリーン誘導体によるDNA固定化の構築とメカニズムの解明

研究課題名(英文) DNA immobilized by photoionization of malachite green derivative and mechanism of its immobilization

研究代表者

宇田 亮子 (Uda, Ryoko)

奈良工業高等専門学校・物質化学工学科・教授

研究者番号：90321463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、光でカチオンとなるユニークな性質を持つマラカイトグリーン誘導体を用い、シンプルで柔軟性の高いDNA固定化法を構築するとともに、そのDNA結合メカニズムを明らかにすることである。本研究では、マラカイトグリーン誘導体とポリ塩化ビニルの複合膜を作製した。薄膜への1本鎖DNAの光固定化にマイクロメートルオーダーで成功した。DNA固定化の程度は、DNA長さや塩基配列に依存することを明らかとした。またこれら依存性を、分光光度計を用いて評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAの微小領域への固定化は、マイクロレイや電界効果トランジスタ、ラボオンチップなどに展開可能な技術である。本研究は、シンプルで柔軟性の高いDNA固定化法の構築を目指して、光でカチオンとなるユニークな性質を持つマラカイトグリーン誘導体を用いポリ塩化ビニルとの複合膜を作製した。照射部分のみDNAを複合膜に結合させることに成功し、その結合のメカニズムを明らかにした。本研究のDNA光固定化法を用いることで、バイオチップなどの迅速な作製・研究室レベルでの自由度の高い展開が可能と考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this work is DNA adsorption in a simple and cost-effective manner by using a malachite green derivative, which can be photoionized to afford a cationic moiety for interaction with DNA. We have prepared a polyvinyl chloride film containing a malachite green derivative and carried out photoinduced oligonucleotide adsorption on a film at the micrometer scale. We have investigated the mechanism of the DNA adsorption by using spectroscopic analysis and found that the DNA adsorption depended on the length and sequence of DNA.

研究分野：機能性有機化合物

キーワード：DNA 吸着 光 マラカイトグリーン 複合膜

1. 研究開始当初の背景

DNA を基板やナノ粒子に固定させ、マイクロアレイや電界効果トランジスタ、さらにはラボオンチップに展開しようという動きが盛んである。いずれも DNA を微小な領域に固定化しなければならず、これが重要かつ難しいステップだとされており、それらを解決すべく複雑な材料や多段階プロセスに加え専用装置が提案されている。ところで光は非接触で遠隔操作ができる外部刺激であり、集光によってターゲット領域への照射が可能であり、微小領域に選択的に DNA を結合させるには最適な手段である。フォトリソグラフィ法による DNA のオンチップ合成が有名であるが、固定化する DNA 長さに限界があるといった課題を含んでいる。そこで異なるアプローチからの DNA 光固定化の研究が盛んに行われてきた。例えば、シリコンウエハ上の hydrogen silsesquioxane または SiO₂ に EUV 照射をし、DNA 担持の Au ナノ粒子を固定化させる研究が挙げられる (*ACS Nano*, 2011, 5, 7899)。ナノメートルオーダーでの固定化が可能であるが、光源が特殊である、DNA 担持 Au ナノ粒子を調整しなければならない、基板はシリコンに限られる、など作製方法が特殊複雑化してしまう。また、光照射で 2,2,2-trifluoroethyl undec-10-enoate をガラス表面に固定化し、末端にアミンを修飾した 1 本鎖 DNA を反応させて照射部に DNA を結合させる方法もあるが (*Langmuir*, 2009, 25, 13952)、光応答分子の基板への固定化に加え DNA を修飾しなければならないという課題を含んでいた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、光でカチオンとなるユニークな性質を持つマラカイトグリーン誘導体 (MGL) を使い、シンプルで柔軟性の高い DNA 固定化法を構築することを目的とした。DNA は負に帯電しており光未照射時の基板上マラカイトグリーンとは結合しないが、光照射後はマラカイトグリーンがカチオンとなるため DNA と結合し固定化することが期待できる (図 1)。マラカイトグリーン誘導体を汎用ポリマーとともに有機溶媒に溶解させ基板にキャストする。このため基板が限定されず固定化の自由度が上がる。固定化に必要なのは「光照射 → DNA 滴下 → 洗浄」の工程だけである (図 1)。異なる場所に光照射をしてこの工程を繰り返せば、複数種類の DNA を固定化することも可能であると考えた。また固定化が可能となれば、そのメカニズムについて明らかとすることも目的とした。

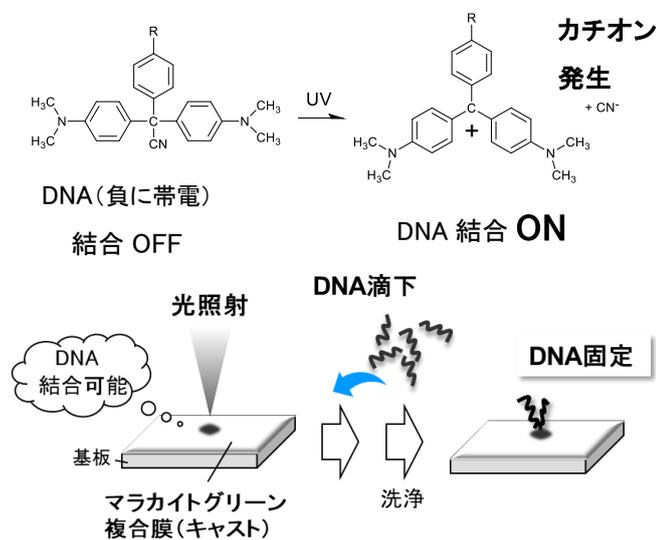


図1 マラカイトグリーン誘導体(MGL)の光イオン化反応と本研究の DNA 光固定化工程.

3. 研究の方法

(1) マラカイトグリーン誘導体含有膜の作製

ポリ塩化ビニル(50 mg)、マラカイトグリーン誘導体(10 mg)、可塑剤としてセバシン酸ジオクチル (DOS, 100 mg) を 2 mL の THF 溶液に溶解させ、その溶液を 0.15 mL をガラスプレート上の直径 9.3 mm のシリコンリング内にキャストし、その後溶媒を除去して作製した。膜厚は 2.2 ± 0.3 μm となった。作製した膜はガラスプレートから外さずにそれ以降の実験に用いた。

(2) DNA の吸着

銅メッシュ TEM グリッド (No. 09-1017, 応研商事) をフォトマスクとして用いた。10 μL の TE 緩衝液 (pH 7.4) をグリッドの上から (1) で作製した膜に滴下し、紫外光を 1 分間照射した。光源にはキセノンランプを用い、色ガラスフィルターを通した 330 nm 以下の光とした。254 nm における照射強度は 0.22 mW cm⁻² であった。光照射後にグリッドを膜から取り外し、膜の上に残った TE 緩衝液をキムワイプに吸わせて除去した。Fluo-dT₂₄ を含む TE 緩衝液 (6 μL, 537 μM) を照射領域に滴下した。10 分後に Fluo-dT₂₄ を除去し、新しい TE 緩衝液を添加してキムワイプで吸い取る操作を 4 回繰り返す、吸着しなかった Fluo-

dT₂₄ を完全に除去した。

膜に吸着した DNA 量を見積もるために、銅メッシュ TEM グリッド (No. 09-1034, 応研商事) を膜に乗せ、その上から DNA を含む TE 緩衝液を 1 μL 添加して紫外光照射を 10 分間行った。同一膜上には、検量線作成用に 5 つのグリッドを配置し TE 緩衝液をそれぞれ 1 μL 添加して同様に紫外光照射を行った。光照射後は、新しい TE 緩衝液で未吸着の DNA を除去する操作を行い、検量線用の箇所には様々な濃度の DNA 溶液を添加した。その後、希釈した Qubits ssDNA 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を照射した箇所にそれぞれ 1 μL 加えた。

(3) 顕微鏡観察

(2) で作製した DNA 吸着膜は、すぐに Nikon 80i 蛍光顕微鏡で観察を行った。吸着した Fluo-dT₂₄ の観察には 450-490 nm バンドパスフィルター (B-2A filter cube, Nikon) を用い、吸着した DNA の定量には 380-420 nm バンドパスフィルター (G-2A filter cube, Nikon) を用いた。蛍光イメージの解析は NIS-Elements D ver. 3.2 (Nikon) software を用い、赤、緑、青のシグナルにて蛍光を検出した。DNA の定量には Qubits ssDNA 試薬に対応する青のシグナルを用いた。

4. 研究成果

図 2 に、Fluo-dT₂₄ を吸着させた膜の蛍光顕微鏡像と微分干渉顕微鏡像を示す。微分干渉顕微鏡像に見られる薄い緑の像はフォトマスクのパターンに対応している。蛍光像も照射部分に対応しており、DNA を加えていない膜においては赤色蛍光が見られた。これはイオン化した MGL によるものと考えられる。一方で、Fluo-dT₂₄ で処理した膜については黄色の蛍光が得られた。DNA をラベル化した蛍光分子の影響を調べるために、図 2 の点線で示した箇所に対応する蛍光強度を調べた (図 3)。図 2a の赤色蛍光は図 2b のものとはほとんど等しいが、蛍光ラベル化剤に対応する緑色蛍光の強度は紫外光照射領域で増加していることが分かった。この結果より、紫外光照射による膜への DNA 吸着に成功したことが示された。

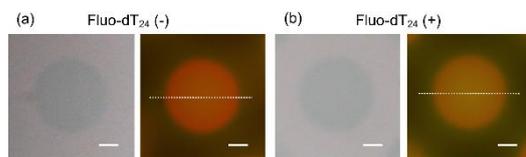


図 2 紫外光照射した膜の顕微鏡像。左: 微分干渉像、右: 蛍光像。a) Fluo-dT₂₄ 無し、b) Fluo-dT₂₄ あり。

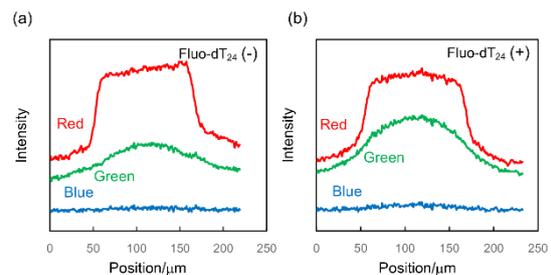


図 3 膜の断面 (図 2 の点線に対応) における蛍光強度。a) Fluo-dT₂₄ 無し、b) Fluo-dT₂₄ あり。

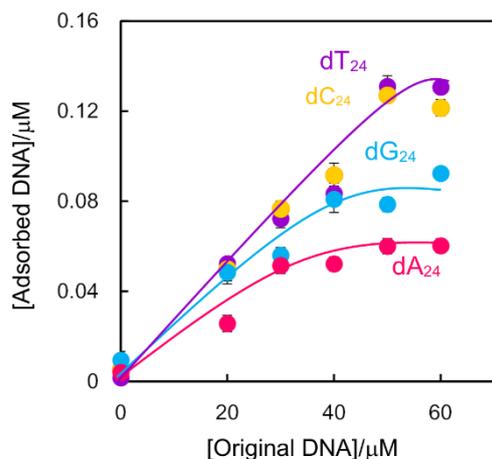


図 4 膜への光照射によって吸着した DNA 濃度の滴下 DNA 濃度依存性。

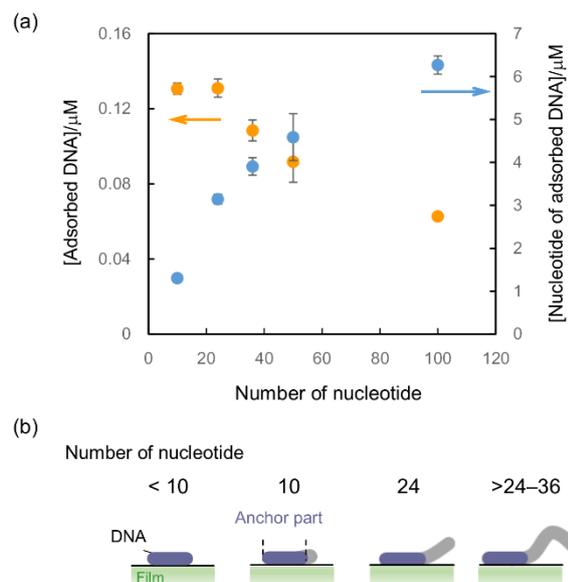


図 5 DNA 鎖の吸着への影響。a) 吸着した DNA 濃度とチミン塩基濃度、b) 吸着のメカニズム。

次に、膜に吸着した DNA 量を評価した (図 4)。滴下した DNA の 0.1–0.3% が照射部分に吸着することが分かる。滴下 DNA 濃度増加と共に吸着 DNA 量は増加するが、滴下 DNA の濃度が $50 \mu\text{M}$ を超えると、吸着量は飽和することが分かった。そこで $50 \mu\text{M}$ の DNA を滴下した時の濃度を飽和吸着濃度として、DNA の塩基配列や長さの影響を評価することにした。長さが異なるチミンホモポリマーについて、飽和吸着量をプロットした結果を図 5a に示す。DNA 濃度はオリゴマー濃度と、チミン塩基の濃度の両方で示している。10–24 塩基の短い DNA は吸着しやすく、それ以上の塩基数では長さとともに吸着 DNA 濃度は減少した。一方で吸着 DNA 中のチミン塩基は、DNA が長くなるほど増加することが分かった。DNA の塩基数が 10 から 24 に増加すると吸着 DNA 濃度には変化がないが、吸着チミン塩基濃度は増加する。これらの結果から、DNA は全ての部分が膜と吸着しているわけではなく、図 5b に示すような 10 塩基以下のアンカー部分が MGL と相互作用を持ち膜に吸着していると考えられる。DNA の構成塩基が 10 を超えると、アンカー部以外の DNA は膜に吸着していない。一方で、DNA 塩基数が 24 や 36 まで増加すると、かさ高くなり膜への吸着が阻害されてしまい、吸着 DNA 濃度は増加しなかったと考えられる。

MGL の代わりに塩化セチルトリメチルアンモニウムを含有させた膜への DNA 吸着実験を行った。この比較実験から、静電的相互作用が吸着に影響していることが明らかとなった。次に MGL 含有膜への吸着 DNA の塩基配列依存性を調べた。様々な配列を持つ 24 塩基の DNA の吸着結果を図 6 に示す。塩基配列は吸着に大きく影響しており、光イオン化した MGL はリン酸エステル部との静電的相互作用に加えて、塩基部分とも相互作用して DNA と結合しているといえる。チミンやシトシンはグアニンに比べて吸着しやすい塩基であり、アデニンは最も吸着しにくかった。4 つの塩基をランダムにもつ DNA では (random24)、その吸着量は dA_{24} と dT_{24} , dC_{24} の中間の吸着量となった。 $d(T_2AG_3)_4$ のような繰り返し配列においても最大のと dT_{24} , dC_{24} と最少の dA_{24} の中間値であったことから、特有の配列が吸着を決定するのではなく、塩基が吸着に支配的であることが示された。

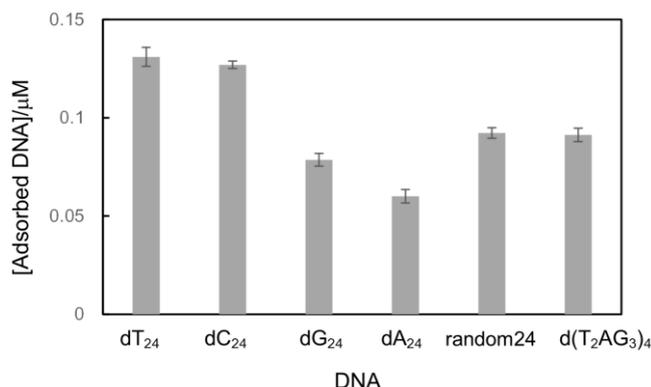


図 6 様々な配列を持つ 24 塩基のオリゴヌクレオチドの吸着量。

random24: 5' -TAGCGCTAGCGTAGCCTATGACTT-3'.

膜のカチオン化 MGL と相互しやすいのはチミン、シトシン>グアニン>アデニンの順になることについて、マラカイトグリーンシュウ酸塩を用いた分光学的実験により考察を行った。MGL のカチオン部位に対応するマラカイトグリーンシュウ酸塩との水溶液中での相互作用は、 $dG_{24} > dT_{24}$, dC_{24} , dA_{24} の順となった。グアニンが強い親和性をもつのは、大きなグアニン塩基の π 平面がマラカイトグリーンシュウ酸塩のフェニル基とスタッキングするのに有利であるためと考えられる。しかしながら、この水溶液中での結果は図 6 のチミン、シトシン>グアニン>アデニンの結果を説明していない。この理由として、水溶液中での環境が膜中と異なるためと考えられる。

そこで、1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) を用いた実験を行った。ANS の蛍光は極性環境によって変化することが知られている (*J. Mol. Biol.*, 1965, 13, 482)。図 7 に膜中と TE 緩衝液中の ANS 蛍光スペクトルを示す。膜中では蛍光ピークが著しく短波長シフトしており、膜中の環境が疎水的であることが示された。さらに膜中は水溶液中より粘性の高い環境にあると予想される。このような周囲環境の変化が MGL の親和性を変え相互作用しやすい DNA 塩基に影響したと考えられる。

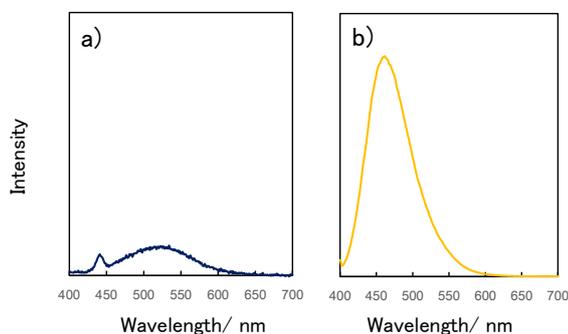


図 7 ANS の蛍光スペクトル. a) TE 緩衝液中、b) PVC-DOS 膜中。 $\lambda_{\text{ex}} = 380 \text{ nm}$ 。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① Ryoko M. Uda, Noriko Nishimoto, Photoinduced adsorption of oligonucleotides on polyvinyl chloride films containing malachite green derivative, *Soft Matter*, 2023,

査読あり, 19, 2058-2063.

[学会発表] (計 2 件)

① 谷本 陸、宇田亮子、光応答性マラカイトグリーン含有膜への DNA 吸着、第 68 回高分子学会年次大会、2019 年 5 月 29 日～31 日、大阪府立国際会議場

② 辰己 朱、西本徳子、宇田亮子、マラカイトグリーン誘導体の光イオン化反応を用いた薄膜への DNA 吸着、日本化学会 第 100 春季年会、2020 年 3 月 5 日、紙上開催

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ryoko M. Uda, Noriko Nishimoto	4. 巻 19
2. 論文標題 Photoinduced adsorption of oligonucleotides on polyvinyl chloride films containing malachite green derivative	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 2058-2063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d2sm01163h	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷本 陸、宇田亮子
2. 発表標題 光応答性マラカイトグリーン含有膜へのDNA吸着
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辰巳 朱、西本 徳子、宇田 亮子
2. 発表標題 マラカイトグリーン誘導体の光イオン化反応を用いた薄膜へのDNA吸着
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------