

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19710107

研究課題名（和文）DNAナノ構造体を鋳型として用いる微粒子表面の超精密修飾技術

研究課題名（英文）Position-controlled fixation of oligonucleotides on nanoparticle surfaces using DNA nanostructures as templates

研究代表者

鈴木 健二 (SUZUKI KENJI)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学・訪問研究員

研究者番号：40415196

研究成果の概要：DNAナノ構造体を鋳型として用いることで、一つのナノ粒子表面に、①多種類のDNA分子を、②任意の数と相対的位置関係で、③効率良く修飾する技術の開発に成功した。実際、金ナノ粒子表面に、2つの異なるオリゴDNA分子を1本ずつ、一定間隔離して固定することが可能であることを実証した。この技術に関する論文発表（J. Am. Chem. Soc. 2009）、学会発表（日本化学会第89春季年会）、特許出願を終えた。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,600,000 | 0 | 2,600,000 |
| 2008年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 240,000 | 3,640,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：DNA、ナノ粒子、ハイブリダイゼーション、ナノ構造、自己組織化、表面、鋳型、テンプレート

1. 研究開始当初の背景

機能性微粒子の自己集合を、ナノメートルの精度で自在に制御できれば、生体分子の分離・分析や、フォトニックデバイス、量子デバイスの製造など、幅広い分野での応用が期待できる。しかし、任意の機能性微粒子を任意の配列で自己集合させる方法はまだない。近年、この問題を解決するための一つのアプローチとして、微粒子表面を一本鎖DNAで修飾し、DNA相補鎖間での二本鎖形成を利用して自己集合させる方法が提案されている（図1）。

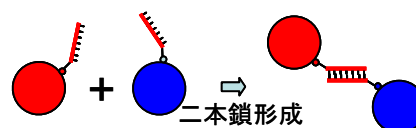


図1 二本鎖形成を利用した自己集合

しかし、既存のDNA修飾技術で実現できる修飾微粒子は、図2に示すように、(a) 微粒子表面全体を複数のDNAで均一に修飾したもの、あるいは、(b) 微粒子表面を単一のDNAで修飾したもの、(c) 微粒子表面の一

部を複数のDNAで修飾したものに限定されている。その結果、複雑なナノ構造を有する微粒子複合体を作成することは困難であった。

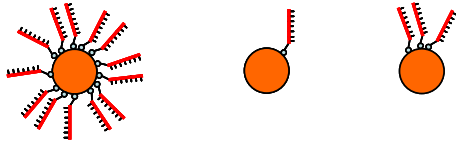


図2 これまでのDND修飾ナノ粒子

2. 研究の目的

本研究の目的は、①多種類のDNA分子を、②任意の数と相対的位置関係で、③効率良く修飾する技術の開発にある。具体的には、図3に示すように、(a) 1つの微粒子上に、2つの異なるDNAを一定間隔離して修飾したり、あるいは、(b) 3つの異なるDNAを一定間隔離して修飾したり、(c) 4つの異なるDNAを正四面体頂点位置に修飾したりするための基本原理を確立する。この様な超精密修飾が実現されれば、機能性微粒子の自己集合を自在に制御することが可能となるため、将来のナノテクノロジーを支える基盤技術と成り得る。

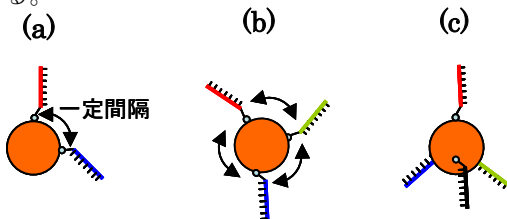


図3 目標とする超精密修飾の例

3. 研究の方法

本申請者は、上記の超精密修飾を実現するための方法として、“DNAナノ構造体を鋳型として用いる微粒子表面の超精密修飾技術”を提案する。図4に、具体例として、2つの異なるDNAを一定距離だけ離して固定する場合の模式図を示す。修飾プロセスは以下の3つの基本ステップからなる。(1) 先ず、微粒子表面と結合できる反応基を導入した一本鎖DNAと、鋳型DNAとをハイブリダイゼーションさせDNAナノ構造体を得る。(2) 次にDNAナノ構造体を微粒子と反応させる。この時、反応基を有する一本鎖DNAは、DNAナノ構造体の形を反映した相対的位置関係で微粒子表面上に結合する。(3) 最後に、加熱や、脱塩、変性剤の添加などにより鋳型DNAを脱ハイブリダイゼーションさせた後、遠心分離でDNA修飾微粒子だけを精製する。

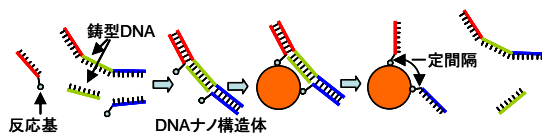


図4 二つの異なるDNAを一定間で固定

上記の基本原則を応用すれば、DNAナノ構造体の設計を変更するだけで、様々なタイプの精密修飾が実現できる。例えば、3つの異なるDNAを一定間隔離して固定する場合には、環状の鋳型DNAに、3つの異なるDNAをハイブリダイゼーションさせて、3角形のDNAナノ構造体を作ればよい(図5)。

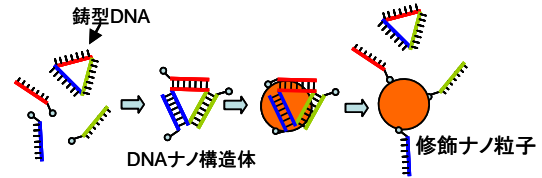


図5 三つの異なるDNAを一定間隔で固定

4. 研究成果

概要: 最も簡単なDNAナノ構造体である棒状のDNAナノ構造体4(図6参照)を用いて、2つの異なるオリゴDNA分子1,2を一つの金ナノ粒子5(直径5nm or 30nm)表面に一定間隔離して固定した。出来た金ナノ粒子/オリゴDNA複合体をアガロースゲル電気泳動を用いて分析することで、一つの金ナノ粒子に対して、二つの異なるオリゴDNA分子が一個ずつ固定されていることを確認した(データ省略)。また、図7に示すように、得られた金ナノ粒子/オリゴDNA複合体、7と、相補的なオリゴDNAで被覆された金ナノ粒子(5nm & 10nm)、8,9とをハイブリダイズさせ、ナノ粒子3量体、10を作成し、透過電子顕微鏡(TEM)観察することで、固定された二つのオリゴDNA分子間の相対的な位置関係を評価した。その結果、棒状DNAナノ構造体、4の長さを反映した距離で、二つのオリゴDNA分子が固定されていることが確認できた。

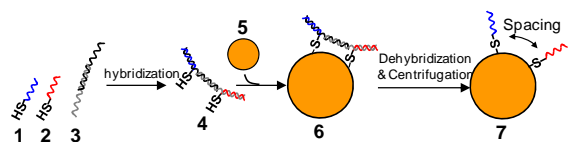


図6 金ナノ粒子表面上へのDNAの固定

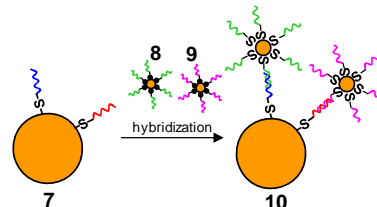


図7 微粒子/オリゴDNA複合体と相補的DNAで被覆された金ナノ粒子とのハイブリダイゼーション

実験内容: 金ナノ粒子 (直径 5nm、10nm、30nm) の分散溶液は BBInternational 社から購入した。金ナノ粒子の塩凝集に対する耐性を高めたり、金ナノ粒子表面へのオリゴ DNA 分子の非特異吸着を抑制したりするために、購入した金ナノ粒子表面を、Strem Chemical 社から購入した Bis (*p*-sulfonatophenyl) phenylphosphine dipotassium salt (BSPP) でコートした。具体的には、金ナノ粒子分散液 500 μ l を、100 μ l の BSPP の溶液 (50mg/ml) と混ぜ、50°C で 1 時間インキュベートすることで、金ナノ粒子表面を BSPP でコートした。過剰な BSPP は、金ナノ粒子分散液を遠心分離したときに得られる上清とともに除去した。最後に BSPP でコートされた金ナノ粒子の沈澱は、少量の BSPP (1mg/ml) を含む 0.5×TBE バッファーに再分散させ冷蔵庫に保管し 2 週間以内に使用した。

全てのオリゴ DNA 分子は Invitrogen 社から購入した。金ナノ粒子表面に固定されるオリゴ DNA 分子、**1**、**2** として 5' 末端にチオール基を導入した 50mer オリゴ DNA (HS-T₃-X-T₁₇、HS-T₃-Y-T₁₇) を用いた。それぞれのチオール基にはダイマー化を防ぐための保護基として、メルカプトヘキサノールがついている。ここで、チオール化オリゴ DNA の配列はそれぞれ以下の通りである。

HS-T₃-X-T₁₇: 5' -TTT CTA TTC CTA CCA ATG TAG CGA CTA CCT CAG TTT TTT TTT TTT TT-3'

HS-T₃-Y-T₁₇: 5' -TTT CGA TCT AAT ACA GTT AGT TAG TAT ACG TGC TTT TTT TTT TTT TT-3'

上記の様に、それぞれのチオール化オリゴ DNA は、5' 末端の T₃ スペース配列と、3' 末端の T₁₇ タグ配列との間に、独自の 30mer 配列 **X**、あるいは **Y** を持っている。T₃ スペース配列はチオール基を、DNA ナノ構造体本体から適度に離すことで、金ナノ粒子表面と反応しやすくしている。また、T₁₇ タグ配列は、本発明の趣旨とは直接関係無いが、金ナノ粒子を、固定されたオリゴ DNA の数に応じて電気泳動分析しやすくするという目的で付け足している。DNA ナノ構造体、**4** は、上記 2 種類のチオール化 DNA と、別の 2 種類の非チオール化オリゴ DNA (X' A'、Y' A)、**3** とを、100 mM NaCl を含む 10 mM Tris-HCl バッファー (pH8) 中でハイブリダイゼーションさせることで作成した。非チオール化オリゴ DNA の配列は以下の通りである。

X' A' : 5' -CTG AGG TAG TCG CTA CAT TGG TAG GAA TAG GAT TGC ATG GGA TAC-3'

Y' A : 5' -GCA CGT ATA CTA ACT AAC TGT ATT AGA TCG GTA TCC CAT GCA ATC-3'

この様に、それぞれの非チオール化オリゴ DNA の 5' 側の 30mer 配列 X'、あるいは Y'

は、上記チオール化オリゴ DNA のどちらか一方とだけ相補的關係にある。また、3' 側の 15mer 配列 A'、あるいは A は、互いに相補的關係にある。従って、上記 4 種類のオリゴ DNA をハイブリダイゼーションすることで、図 6 に示した棒状の DNA ナノ構造体が形成される。ハイブリダイゼーション溶液に含まれる目的 DNA ナノ構造体は、12.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離精製し、ゲルからの電気泳動溶出によって回収した。BSPP でコートされた 5nm 金ナノ粒子、**5** と、精製した DNA ナノ構造体、**4** とを、0.5×TBE バッファー (BSPP を 1mg/ml、NaCl を 166mM 含む) 中で、5:1、あるいは、5:2 のモル比となるように混合し、室温 (22°C) で 24 時間反応させて複合体、**6** を得た。反応溶液を遠心分離し、上清を捨てることで未反応の DNA ナノ構造体を金ナノ粒子分散液から取り除いた。残った金ナノ粒子を、BSPP の希薄水溶液 (0.25mg/ml) に再分散し 40°C で 15 分インキュベートすることで、非チオール化オリゴ DNA を複合体、**6** から脱ハイブリダイゼーションした。金ナノ粒子分散液を遠心分離し、上清を捨てることで脱ハイブリダイゼーションした非チオール化オリゴ DNA を金ナノ粒子分散液から取り除いた。その後、同様の脱ハイブリダイゼーションプロセスを 2 回繰り返すことで、金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体、**7** を含有する金ナノ粒子分散液を得た。

本発明の有効性を確認するための参照サンプルとして、DNA ナノ構造体を使わずにチオール化オリゴ DNA を、5nm 金ナノ粒子と直接反応させて、金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体を得た。具体的には、BSPP でコートされた 5nm 金ナノ粒子と、前記チオール化オリゴ DNA (HS-T₃-X-T₁₇) とを、0.5×TBE バッファー (BSPP を 1mg/ml、NaCl を 166mM 含む) 中で、5:2、あるいは、5:4 のモル比となる様に混合し、50°C で 1 時間反応させて、金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体を得た。未反応のチオール化オリゴ DNA を取り除くために、得られた金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体を、BSPP の希薄水溶液 (0.25mg/ml) に分散し遠心分離後に上清を取り除く操作を 3 回繰り返した。

図 8 に、金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体を含有する金ナノ粒子分散液の 3% アガロースゲル電気泳動の結果を示す。レーン 1 は、BSPP のコートされた 5nm 金ナノ粒子に対応する。また、レーン 2、レーン 3 は DNA ナノ構造体を使わずに作成した金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体に対応する。前記文献 1 で報告されているように、DNA ナノ構造体を使わずに作成した金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体には、オリゴ DNA を 1 個だけ持っている複合体、2 個、あるいは、3 個持っている複合体など様々なタイプの金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体が混在し

ていることが分かる(レーン2、レーン3参照)。ここで、金ナノ粒子/オリゴDNA複合体のうち、オリゴDNAを1つだけ持っているものを1:1複合体、2個、あるいは3個持っているものをそれぞれ1:2複合体、1:3複合体と命名する。一方、DNAナノ構造体を使って作成した金ナノ粒子/オリゴDNA複合体には、1:2複合体が優先的に生成していることが分かる(レーン4、レーン5を参照)。この結果から、本発明技術によって、金ナノ粒子表面に固定するオリゴDNAの数を精密に制御できることが確認できた。さらに、この1:2複合体の持つ2つのオリゴDNA分子が、異なる配列(HS-T₃-X-T₁₇、HS-T₃-Y-T₁₇)であるか否かをチェックするために、プローブオリゴDNA(T50-X'、T50-Y')を用いたハイブリダイゼーション試験を行った。ここで、プローブオリゴDNAの配列はそれぞれ以下の通りである。

T₅₀-X' : 5' -TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC TGA GGT AGT CGC TAC ATT GGT AGG AAT AG-3'

T₅₀-Y' : 5' -TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTG CAC GTA TAC TAA CTA ACT GTA TTA GAT CG-3'

上記ハイブリダイゼーションテストでは、レーン4と同じ金ナノ粒子分散液を、大過剰量のプローブオリゴDNAと室温で24時間インキュベートし、アガロースゲル電気泳動した。その結果が、レーン6、レーン7、レーン8に対応する。プローブオリゴDNAとハイブリダイズすることで1:2複合体の移動度は低下している。低下の程度は、T50-X'のみ、あるいは、T50-Y'のみとインキュベーションした1:2複合体よりも、T50-X'とT50-Y'との両方とインキュベーションした1:2複合体の方が大きい。この結果から、DNAナノ構造体を用いて作成した1:2複合体の多くが、異なるオリゴDNA分子(HS-T₃-X-T₁₇、HS-T₃-Y-T₁₇)を一個ずつ持っていることが確認できる。

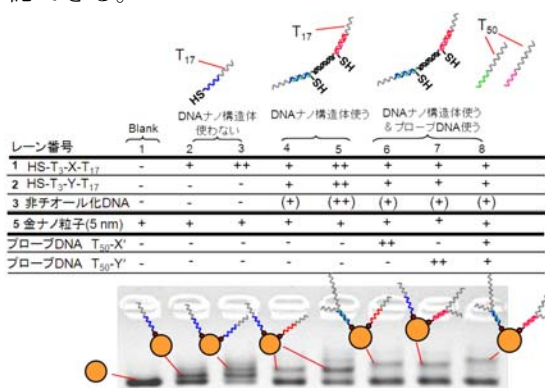


図8金ナノ粒子/オリゴDNA複合体のアガロースゲル電気泳動分析の結果
次に、図7に示すように、DNAナノ構造体

を用いて作成した金ナノ粒子/オリゴDNA複合体、7に相補的なオリゴDNAで被覆された金ナノ粒子、8、9をハイブリダイズさせ、得られた金ナノ粒子3量体、10を透過電子顕微鏡(TEM)観察することで、金ナノ粒子上に固定されたオリゴDNA分子の位置を間接的に確認した。この実験では、TEM観察を容易にするために、実施例1で用いた5nm金ナノ粒子を、30nm金ナノ粒子に置き換えた。また、これに伴って、実施例1では15mer配列A'とAとからできていたDNAナノ構造の中心にある二重鎖アームを、35mer配列B'とBから成るより長い二重鎖アームに置き換えた。具体的には、DNAナノ構造体、4は、T₁₇タグの無い2種類のチオール化オリゴDNA(HS-T₃-X、HS-T₃-Y)と、2種類の非チオール化オリゴDNA(X' B'、Y' B)とをハイブリダイズさせることで作成し、前記の様にアクリルアミド電気泳動によって精製した。ここで、非チオール化DNAの配列は以下の通りである。

X' B' : 5' -CTG AGG TAG TCG CTA CAT TGG TAG GAA TAG GAT TGC ATG GGA TAC TAT ACA CTG CAC AGG CTT AC-3'

Y' B : 5' -GCA CGT ATA CTA ACT AAC TGT ATT AGA TCG GTA AGC CTG TGC AGT GTA TAG TAT CCC ATG CAA TC-3'

次にBSPPでコートされた30nm金ナノ粒子、5と、精製したDNAナノ構造体、4とを、0.5×TBEバッファー(BSPPを1mg/ml、NaClを50mM含む)中で、1:1のモル比となるように混合し、室温(22°C)で24時間反応させて複合体、6を得た。前記の脱ハイブリダイゼーションプロセスを3回繰り返すことで、非チオール化オリゴDNAを複合体6から外し、金ナノ粒子/オリゴDNA複合体、7を含有する金ナノ粒子分散液を得た。金ナノ粒子上に固定されたオリゴDNA分子の位置を可視化するために、金ナノ粒子/オリゴDNA複合体と、1、2と相補的なチオール化オリゴDNAで被覆されたプローブ金ナノ粒子、8、9とをハイブリダイズさせ、金ナノ粒子3量体、10を含む金ナノ粒子分散液を得た。ここで、プローブ金ナノ粒子の直径は、5nmあるいは10nmである。

さらに、本発明の有効性を確認するための参照サンプルとして、DNAナノ構造体を使わずに前記チオール化オリゴDNA(HS-T₃-X、HS-T₃-Y)を、30nm金ナノ粒子表面に固定し、金ナノ粒子/DNA複合体を含む金ナノ粒子分散液を得た。ここで得られた金ナノ粒子/オリゴDNA複合体も、プローブ金ナノ粒子、8、9とハイブリダイズさせ、金ナノ粒子3量体を含む金ナノ粒子分散液を得た。最後に、上記2つの方法で得られた金ナノ粒子3量体を含む分散液を、それぞれ2%アガロースゲル上で電気泳動し、金ナノ粒子3量

体を精製した。精製された金ナノ粒子3量体を TEM 観察した結果を図 9 に示す。図 9(a) の上図は、DNA ナノ構造体を用いずに作成した金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体と、2 つの 5nm プローブ金ナノ粒子とをハイブリダイズさせて作った金ナノ粒子3量体の TEM 写真である。観察された 160 個の 3 量体に対して、30nm 金ナノ粒子からそれぞれのプローブ金ナノ粒子に向かう 2 つのベクトルを求め、それらのなす角を、下図のヒストグラムとしてまとめた。同様に、DNA ナノ構造体を用いて作成した金ナノ粒子/プローブ DNA 複合体からなる金ナノ粒子3量体の TEM 写真とヒストグラムを図 9(b)、(b) に示す。ここで、(b) は 5nm のプローブ金ナノ粒子 2 つとハイブリダイズさせて作成した金ナノ粒子3量体(136 個)、(c) は 5nm と 10nm のプローブ金ナノ粒子とハイブリダイズさせて作成した金ナノ粒子3量体(87 個)に対応するデータである。それぞれのヒストグラムを比較すると、DNA ナノ構造体を使わずに作った金ナノ粒子3量体では、ヒストグラムに明確なピークは認められない(図 9(a))。一方、DNA ナノ構造体を用いて作成した金ナノ粒子3量体には、プローブ金ナノ粒子の大きさに関わらず、 20° ~ 40° の範囲に明確なピークが存在する。このピーク位置は、用いた DNA ナノ構造体のサイズから予想される値 43° とよく一致している。以上の結果から、DNA ナノ構造体を用いる本発明によって、金ナノ粒子上でのオリゴ DNA 分子間の相対的位置関係を制御することが可能であることが示された。

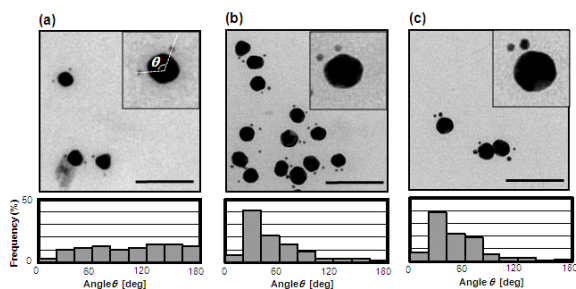


図 9 金ナノ粒子3量体の透過電子顕微鏡 (TEM) 写真&構造パラメータ θ のヒストグラム (a)DNA ナノ構造体を使わずに作成した金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体と 5 nm プローブ金ナノ粒子 2 つとから成る 3 量体、(b) DNA ナノ構造体を使って作成した金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体と 5 nm プローブ金ナノ粒子 2 つとから成る 3 量体、(c) DNA ナノ構造体を使って作成した金ナノ粒子/オリゴ DNA 複合体と 5nm プローブ金ナノ粒子、10 nm プローブ金ナノ粒子とから成る 3 量体。スケールバーは 100 nm に相当する。

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 1 件)

鈴木健二 (3 名中 1 番目)、細川和生、前田瑞夫、Controlling the Number and Positions of Oligonucleotides on Gold Nanoparticle Surfaces, J. Am. Chem. Soc. (2009) in press、査読有り

[学会発表] (計 1 件)

鈴木健二 (代表)、細川和生、前田瑞夫、DNA ナノ構造体による金ナノ粒子上でのオリゴ DNA 固定化位置の制御、日本化学会第 89 春季年会、2009 年 3 月 28 日、日大船橋

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：オリゴヌクレオチドの固定方法
 発明者：鈴木健二、細川和生、前田瑞夫
 権利者：独立行政法人科学技術振興機構
 種類：工業所有権 (特許)
 番号：特願 2009-109947
 出願年月日：2009 年 4 月 28 日
 国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 健二 (SUZUKI KENJI)
 独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工
 学・訪問研究員
 研究者番号：40415196