

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05122

研究課題名（和文）DNA密生相によるエントロピー駆動型相互作用に基づくナノバイオセンシング

研究課題名（英文）A nano-biosensor using entropic effect of high-density DNA layer

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・環境資源科学研究センター・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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：DNAで表面を高密度で覆われたナノ粒子の分散安定性はDNA構造に依存する。分子レベルの構造変化がコロイド系の色調変化をもたらす。この界面現象はDNAの柔軟性などに起因する立体斥力の効果によるものと考えられる。この仮説に基づき、本研究課題では四重鎖（G4）DNA担持ナノ粒子を作製し、リガンドとの複合化を検出する新しいナノバイオセンサーの開発を指向して、界面現象のメカニズム解明に取り組んだ。リガンドとの複合化によりG4構造がアンフォールドすることを確認し、それに起因した立体斥力の変化がG4担持ナノ粒子の分散安定性を低下させて、ナノ粒子の凝集、すなわちコロイド系の色調変化をもたらすことを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA担持ナノ粒子が示す界面現象のメカニズムについては完全には理解されていない。この界面現象は引力相互作用というよりはむしろDNAの柔軟性の差異、つまりエントロピー斥力によるものという仮説に基づく。DNA構造の変化をもたらすあらゆるイベントがセンシング原理となりうる。本研究課題は、その実証実験として遂行された。リガンドとの結合に依存して大きな構造変化が生まれることを構造科学的手法などにより明らかにし、その結果G4担持ナノ粒子の分散安定性の低下を確認した。DNA密生相の界面現象メカニズムの理解をさらに深めることができたと共に、新しいナノセンシング材料の開発に繋がるものといえる。

研究成果の概要（英文）：Colloidal stability of nanoparticles immobilized densely with DNA depends strongly on DNA structure. The structural change at the molecular level results in the color change of the colloidal system. This interfacial phenomenon is considered to be attributed to steric effect of DNA chain such as flexibility and motion. Based on the assumption, G-quadruplex DNA (G4-DNA) immobilized nanoparticles can be used as a nano-biosensor because a complex formation with a ligand might make a change in conformation of G4. It was proved that the conformational change of G4 is caused by binding to the ligand, resulting in a reduction in steric repulsion between the nanoparticles. That is to say, the color change in the colloidal system appeared.

研究分野：高分子物理化学

キーワード：DNA バイオセンサー ナノ粒子 小角X線散乱

1. 研究開始当初の背景

数十塩基程度のオリゴ DNA で高密度に表面修飾されたナノ粒子 (DNA 担持ナノ粒子) を水に分散させると、極めて高いコロイド分散安定性を示す。これは負に帯電した DNA 鎖の静電反発力によるところが大きい。したがって、高塩濃度下では静電反発力が減少し、粒子は不安定化して凝集するはずである。しかしながら、実際は DNA 構造に応じてその挙動は異なる。完全に相補的な DNA と二重らせん構造 (二重鎖 DNA; dsDNA) を形成したときに粒子は凝集する。相補鎖 DNA による分子架橋によって誘導される粒子凝集とは異なり、非架橋型凝集とよんでいる現象である。一方、二重らせん構造を形成しても、一塩基ミスマッチにより末端の塩基対が形成しないと、たとえ高塩濃度下でも粒子は安定的に分散しつづける (図1)¹。わずかに一塩基ぶんの変異といった分子レベルでの事象をコロイド粒子の分散・凝集として目視判別できるようになる。しかし、この特異な界面現象のメカニズムは未だ不明な点が多い。

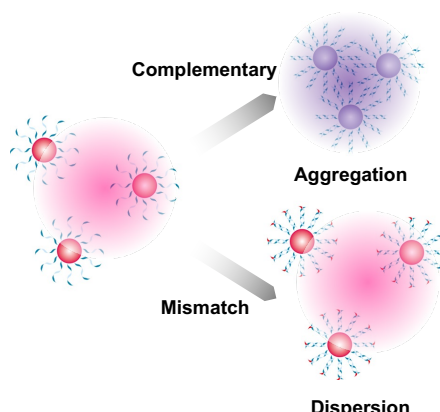


図1 DNA 担持ナノ粒子の非架橋凝集。

この特異な界面現象メカニズムの一つの説として、平滑な dsDNA 末端間の塩基間スタッキング相互作用 (引力作用) によって生じるといふものがある。その場合、凝集構造ではその作用を反映した空間配置を採ることが予想され、また、平滑末端以外の DNA 構造では凝集しえないことも考えられる。しかし、これまでこの仮説を支持する結果を得ていない^{2,3}。そこで、DNA 鎖の立体効果 (斥力作用) に注目するようになった。構造の違いは、DNA 鎖の柔軟性や運動性 (自由度) に関連するエントロピックな性質に影響をもたらす。これらが斥力作用の違いを生むと考えられる。そもそも粒子表面に密生する DNA 鎖は保護層としてナノ粒子の凝集を防ぐ役割を担っており、dsDNA 形成によってその防御力が低下するため粒子が凝集するとすれば非架橋型凝集現象も説明しうる。斥力効果によるものとすれば、二重らせん構造 (dsDNA) 以外の DNA 構造の変化でも粒子の分散安定性を変化させる要因になり得るだろう。

2. 研究の目的

DNA はさまざまな高次構造を採りうる。温度や pH などの環境変化による外部刺激やリガンドと特異的に複合体形成によって、そのコンフォメーションを変える。その変化をコロイド系の変化へとシグナル変換させることで、目視検出可能なバイオセンサーとして利用できるはずである。ここでは、四重鎖 DNA (G4) 構造に着目する。G4 構造はグアニン (G) に富んだ繰り返し配列を有する DNA 鎖で発現する特異な高次構造であり、4つの G が Hoogsteen 塩基対を形成してできた四量体平面構造 (Gカルテット) が数層重なってできている (図2)。この高次構造に配位するリガンドは数多く報告されているが⁴、リガンドと特異的に結合することで大きなコンフォメーション変化が生まれ、その変化を駆動力としてセンサーとして利用が期待できる。これまで G4 構造のコンフォメーション変化と粒子凝集との直接的な相関解明には至っていない。さらに、検出時間、検出感度や特異性などに未だ課題がある。これらの問題を解決すべく、分光学的手法や大型放射光施設 SPring-8 での X 線散乱法を駆使して、G4 構造の変化と粒子凝集との相関解明を目指すことにした。

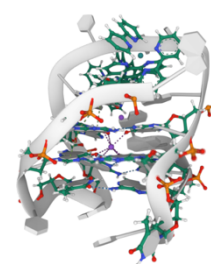


図2 G4 DNA 構造の一例 (22AG)。

3. 研究の方法

本研究では、おもに 22 塩基からなる DNA 鎖 $d[AG_3(T_2AG_3)_3]$ (22AG) 対象にして検討をおこなうことにした。まず、この G4 構造 (図2) を担持したナノ粒子の特性を評価するために、直系約 15 nm の金ナノ粒子 (AuNPs) 表面に DNA 鎖を固定化した。得られた四重鎖担持金ナノ粒子 (G4-AuNPs) は 0.1 M NaCl および 1.5 mM EDTA を含む 10 mM リン酸 (Na^+) バッファー (pH 5.0) 中に分散させた。フリーの 22AG の構造変化を検討する場合も同じバッファーに溶解させた。リガンドとしてはシスプラチンを用いた。粒子の分散安定性に関する評価は、分光学的手法のほかに、大型放射光施設 SPring-8 での溶液小角 X 線散乱 (SAXS) 法によりおこなった。測定は 25 °C にて実施した。

4. 研究成果

22AG を固定化した G4-AuNPs の溶液に対し、終濃度が 1M になるよう NaCl を添加させても

粒子は凝集せず、溶液は赤色を呈したままであった (図 3)。ここに、シスプラチンを所定濃度になるように添加させた。しかしながら、35B1(Kras)の G4-AuNPs の場合には速やかに粒子が凝集した条件⁵においても、溶液は赤色のままであった。後述するように同条件においてフリーの 22AG 鎖はコンフォメーション変化を生じているが、粒子凝集は誘発されにくいといえる。これは核剤としての AuNPs のサイズが小さいためであり、その結果、粒子は分散状態を保っていると考えられる。一方で、シスプラチンと 22AG の複合体形成は分子内で生じており、DNA 鎖間の橋架けによる粒子どうしの凝集は誘発されていないことを意味している。

ここでは、AuNPs のサイズを大きくする代わりに、系中にポリエチレングリコール (PEG) を添加することで粒子凝集を誘発させることにした。図 1 に示すように、系中にわずかに PEG が存在した状態でシスプラチンを添加すると溶液は青紫色に変化した (図 3)。上述の通り、シスプラチンに橋架け効果はないので、この色調変化は分散安定性低下による非架橋凝集に起因している。つまり、G4 構造の変化が立体斥力の低下をもたらしていることになる。対応する SAXS データにおいても粒子が凝集していることを示すピークが観測された (図 3)。粒子間距離に関してはシスプラチンや PEG 濃度の依存性はあまり認められなかった。

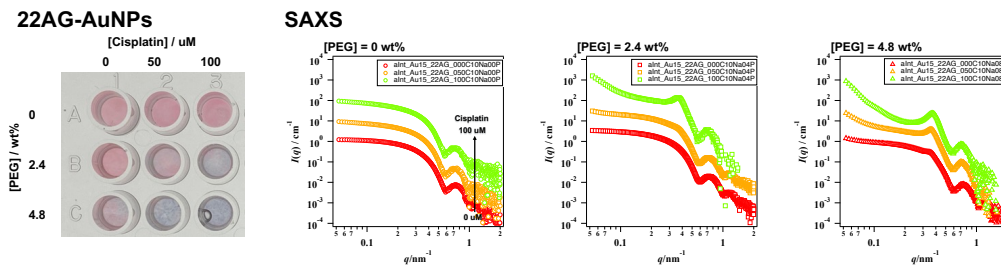


図 3 22AG を固定化した G4-AuNPs の分散安定性及びシスプラチンと PEG の効果. 色調変化に対応して SAXS プロファイル中にピークが観測される。

分散安定性の低下が G4 構造の変化によるものであることを確認するために、フリーの 22AG 鎖の SAXS 測定を実施した。種々の濃度に調製した 22AG のみの溶液とシスプラチンを添加した溶液に対する SAXS 測定の結果を図 4 に示す。シスプラチンを作用させていない場合、フォールドした構造を維持しているが、シスプラチンを添加すると複合体形成により G4 構造がほどける様子が認められた。同条件でシスプラチンを作用させた 22AG-AuNPs は安定的に分散したままなので、コンフォメーション変化を生じても DNA 相は依然として高い立体斥力を有していることになる。22AG の濃度を上げて DNA 鎖どうしが集積するような現象は認められなかった。22AG-AuNPs が凝集するような高 NaCl 濃度で測定しても同様の結果が得られることから、粒子の分散安定性がコンフォメーション変化に伴う立体斥力の低下に起因していると判断できる。

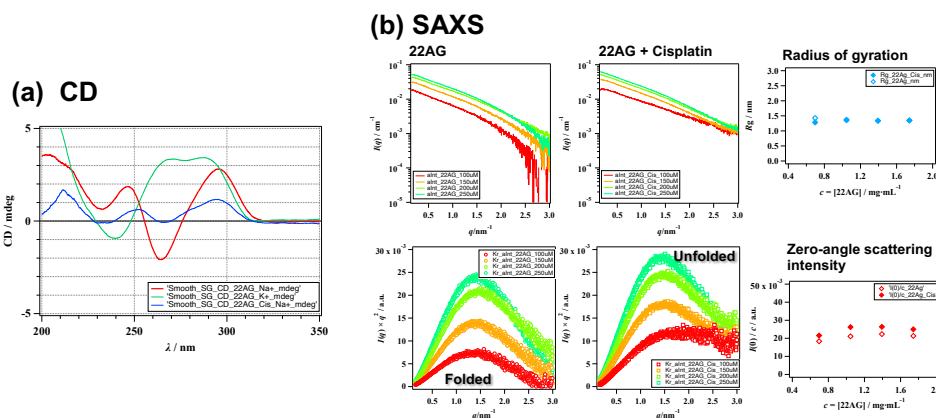


図 4 (a) 22AG の円二色性 (CD) スペクトル. 赤線が Na⁺存在下での結果であり、シスプラチン添加後に青色のスペクトルになる。因みに、緑色のスペクトルは K⁺存在下における結果。(b) SAXS プロファイル. シスプラチン添加後にコンフォメーション変化を起こしていることがわかる。

さらに、新たな G4 鎖である d[TGA(G3T)2TA(G3T)2AA] (1XAV) を対象として検討もおこなった。1XAV を担持した金ナノ粒子溶液のコロイド分散安定性及びシスプラチン作用の影響を調べたところ、応答性は極めて遅かったものの、シスプラチン添加後に凝集することを観測した。22AG 同様、シスプラチン添加後の 1XAV もアンフォールドしたことがわかった。ただし、22AG の場合と異なり、リガンドとの複合体化によって DNA 鎖間の橋架けが起きている可能性が示唆された。すなわち、DNA の配列に依存して凝集様式が異なる可能性がある。今後

は配列依存性を検討するなどメカニズム解明に向け更なる調査が必要である。

<引用文献>

- ① K. Sato, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8102.
- ② M. Fujita *et al.*, *J Colloid Int. Sci.* **2012**, 368 629.
- ③ P. Pan, *et al.*, *Langmuir* **2012**, *28*, 14347.
- ④ W. O. Tucker, *et al.*, *Curr. Pharm. Des.* **2012**, *18*, 2014.
- ⑤ S. Chuaychob, *et al.*, *Anal. Methods* **2020**, *12*, 230.

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 Surachada Chuaychob, Masahiro Fujita, and Mizuo Maeda	4. 巻 38
2. 論文標題 G-Quadruplex-Functionalized Gold Nanoparticles for a Real-Time Biomolecule Sensor with On-Demand Tunable Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 4870-4878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.langmuir.2c00043	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 藤田雅弘, 前田瑞夫
2. 発表標題 四重鎖DNAを担持したナノ粒子の特性評価と応用
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田雅弘, 前田瑞夫
2. 発表標題 四重鎖DNA担持ナノ粒子の特性とそれを利用したバイオセンシング
3. 学会等名 第72回高分子年次大会
4. 発表年 2023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
---------	---------