

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月5日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22651046

研究課題名（和文） 磁気誘導加熱によるナノ固相界面の温度制御に基づいた遺伝子増幅技術の開発

研究課題名（英文） Development of a gene amplification technique with localized heating of magnetic nanoparticles via application of alternating magnetic field.

研究代表者

新垣 篤史 (ARAKAKI ATSUSHI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：10367154

研究成果の概要（和文）：

本研究では、磁気誘導加熱によるナノ固相界面の温度制御に基づいた遺伝子増幅技術の開発を目的とした。同技術開発の基盤となる磁気誘導加熱に基づいた磁気微粒子からの核酸解離反応の制御や、アミノ基修飾磁気微粒子の局所加熱を利用した細胞膜の破損に伴う微生物の不活化を達成した。同技術の実現によって、デバイスの反応槽などの微小空間内での核酸増幅など、関連分析分野における新しいアプリケーション開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this research is development of a technique for gene amplification by localized heating of magnetic nanoparticles. We have applied the localized heating phenomena of magnetic nanoparticles to control the nucleic acid dissociation. In addition, the amine-modified magnetic particles have been demonstrated to inactivate the microbe via the damage of the microbial membrane. Therefore, we propose to develop a nano-scale high throughput nucleic acid amplification technique further application in micro devices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：磁気微粒子、遺伝子増幅、誘導加熱、核酸回収、細胞破碎

1. 研究開始当初の背景

磁気微粒子は交番磁場を印加すると、磁区の向きが交番磁場の向きに合わせて反転を繰り返すため発熱する。これはブラウン緩和と呼ばれる現象で、交番磁場の周波数を高くするほど磁区が反転する速度が加速し、次第にその運動エネルギーが熱エネルギーへと変換されるため磁気微粒子表面が加熱されるという原理である。つまり磁気微粒子に交番

磁場を印加することで、局所的な加熱が可能である。交番磁場印加に伴う磁気微粒子の局所加熱は、主として癌の温熱療法(磁気ハイパーサーミア)を中心とした医療分野での応用が進められており、mL～ μ Lオーダーの溶液等での加熱効果は、多様な側面から知見が得られている。

一方で、磁気微粒子は磁気分離が可能であり、粒子上の様々な表面修飾を用いることで DNA

や抗体、酵素といった生体分子を固定化することが可能なため、種々の計測に応用されている。我々は、核酸抽出に用いるための核酸固相化担体として、粒子上にアミノ基を修飾したアミノ基修飾磁気微粒子を開発しており、簡便かつ迅速なアミノ基修飾磁気微粒子の作製法として、粒子表面にアミノシランカップリング剤である 3-[2-(2-aminoethylamino) ethylamino] propyl-trimethoxysilane (AEEA) および 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) を導入した AEEA 修飾磁気微粒子および APTES 修飾磁気微粒子の作製に成功している (Yoza et al. 2002, Nakagawa et al. 2005)。さらに、アミノシランを修飾した磁気微粒子上に第 6 世代までの PAMAM デンドリマーを合成し、Divergent 法を用いてより高密度にアミノ基をもつデンドリマー修飾磁気微粒子の作製に成功している。デンドリマーは、中心から規則的に分岐した構造を持つ、高度に分子量が制御された樹状高分子化合物である。デンドリマー分子中央部をコア、樹状部分をデンドロンと呼び、世代 (Generation: G) の増加と共に最外殻の官能基数が倍増するため、高密度に官能基を保持することが可能である。また、アミノ基修飾粒子は負電荷を帯びた細胞膜をもつ微生物と静電的に相互作用する性質を持つ。アミノ基修飾磁気微粒子を微生物やウイルスの吸着担体として利用することで、微生物由来の水質汚染の除去や微生物検出への応用研究も報告されている。例えば、シリカをコーティングした後に APTES 修飾した磁気微粒子を用いた河川から大腸菌を高効率に回収する手法やアミノ基修飾したシリカ粒子を用いたウイルスの吸着・脱離が可能なウイルスの回収濃縮法が提案されている (Huang et al. 2010; Chen et al. 2006)。このようにアミノ基修飾磁気微粒子は、ウイルスやバクテリアの回収担体としての利用が可能であることが示されている。本研究では、アミノ基修飾磁気微粒子を用いて、細胞やデバイス内でターゲット遺伝子を静電的に相互作用させることで高効率に回収し、その後リン酸緩衝液を添加することによりリン酸基と置換させ、ターゲット遺伝子の脱離可能な系の開発を行った。

2. 研究の目的

本研究では、磁気誘導加熱の可能な磁気微粒子表面を反応場として利用した、新しい原理に基づいた遺伝子増幅技術の開発を目的とする。磁性体は、外部から照射された交流磁場によって得られるエネルギーを、瞬時に熱に変換する性質を持つ。この磁気誘導加熱によって粒子表面に生じる熱と、粒子近傍の溶液の対流による冷却を利用して温度サイクルを構築し、粒子表面上でのターゲット遺伝

子の効率的な増幅技術を開発する。また、磁気微粒子への交番磁場の印加による局所加熱とアミノ基修飾磁気微粒子による微生物への静電的吸着という 2 つの性質を利用し、新規の微生物不活化法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

【1】アミノ基修飾磁気微粒子の作製

10 mg の磁気微粒子 (MNPs) に対して、アミノシランの一種である 2% 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) 溶液 20 mL (in ethanol) を添加し、5 分おきに超音波分散させながら 10 分間反応させた。次に *N,N*-dimethylformamide (DMF) で同粒子を 1 回洗浄した後、DMF を 20 mL 加え、120°C で 30 分間加熱処理することにより、シランカップリングの安定化を行った。この際、10 分おきに超音波分散処理を行った。最後に、脱水メタノールを用いて 3 回洗浄した後に得られた APTES 修飾 MNPs (APTES-MNPs) は同溶媒に懸濁し、4°C 下で保存した。また、0.5 mM の PAMAM dendrimer, cystamine core, generation 6 (G6 デンドリマー) 及びメタノール溶液それぞれ 100 μ L に対し、PBS で 0.5 mM に調整した DTT を 400 μ L 加えた。その後、攪拌しながら室温で 24 時間インキュベーションすることでシスタミンコアを還元し、解離させたものを G6 デンドロンとした。次に、PBS を用いて架橋剤である GMBS を 1 mM に調整し、APTES-MNPs に対して粒子濃度が 0.5 mg/mL となるように加えた。その後、5 分おきに超音波により粒子を拡散させながら室温で 45 分間反応させ、GMBS 修飾磁気微粒子 (GMBS-MNPs) を作製した。PBS を用いて 10 倍希釈した G6 デンドロンを、GMBS-MNPs に対して粒子濃度が 0.5 mg/mL となるように加えた。5 分おきに超音波により粒子を拡散させながら室温で 45 分間反応後、脱水メタノールを用いて 3 回洗浄したものを G6 アミンデンドリマー修飾磁気微粒子 (dendrimer-modified MNPs: d-MNPs) とし、脱水メタノール中、4°C で保存した。

【2】アミンデンドリマー修飾磁気微粒子を用いた *S. enterica* からの DNA 回収及び PCR 高濃度のデオキシリボヌクレオシド 3 リン酸 (dNTP) を含む溶液を用いて、PCR 反応の条件検討を行った。dNTP 濃度に合わせて、MgCl₂ 濃度を dNTP 濃度よりも 2.5 mM 高くなるよう設定し、10⁰~10⁴ コピーのテンプレートを用いて PCR を行った。次に、加温によって溶菌処理をした 10⁰~10⁵ cells のサルモネラ菌 (*S. enterica*) から、0.5 μ g の d-MNPs を用いて DNA の回収を行った。d-MNPs からの DNA の脱離溶液として 30 mM dNTP を 15 μ L 添加し、80°C、20 分間インキュベーションした。DNA 回収溶液 15 μ L 全量をテンプレートとし

て用いて PCR 反応（反応溶液量；30 μ L）を行い、*S. enterica* 特異的な増幅産物の確認を行った。

【3】アミノ基修飾磁気微粒子を用いた大腸菌の回収

MNPs 表面へのアミノ基修飾による大腸菌の回収条件の検討を行った。1.0 \times 10⁴ cells/ml の大腸菌溶液に 1 mg の APTES-MNPs および d-MNPs を添加し 30 分静置した後、アミノ基修飾 MNPs による大腸菌の回収率を評価した。また pH 5-8 のリン酸緩衝液を用いて、前検討と同様に回収率を評価した。

【4】アミノ基修飾磁気微粒子による大腸菌の不活化

アミノ基修飾 MNPs の局所加熱による大腸菌の不活化の検討を行った。前述と同様に 1 mg の APTES-MNPs および d-MNPs と 10⁸ cells/ml の大腸菌の懸濁液を調製した後、交番磁場（5 kW, 621.3 A, 248 kHz）を 3 分間印加し、交番磁場印加後の大腸菌の生存率を評価した。また同条件で交番磁場を印加した後の大腸菌を propidium iodide (PI) を用いて染色した後、蛍光顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

【1】アミノ基修飾磁気微粒子表面のアミノ基数の評価

① APTES 修飾磁気微粒子のアミノ基数の評価
MNPs の表面は溶液中では OH 基に覆われている。この OH 基の数は 1 nm² あたり 2 つであることが知られている (Joseph et al. 1999)。APTES は OH 基と反応することで MNPs 表面に修飾される。そこで 1 粒子あたりの表面積から 1 粒子が持っている OH 基の数を算出し、OH 基と APTES が 1 対 1 で結合していると仮定することで、1 粒子の MNPs 表面に導入可能なアミノ基数を算出した。その結果、本研究で用いた粒子は粒径が 40 nm であるため、1 粒子当たりの表面積が 5.0 \times 10³ nm² であることから、1 粒子当たり 1.0 \times 10⁴ 個のアミノ基が導入可能であることが示された。一方、アミノ基定量の結果 1 粒子の APTES-MNPs に修飾されたアミノ基数は 0.3 \times 10⁴ 個であった。

② デンドリマー修飾磁気微粒子のアミノ基数の評価

デンドリマーはコアを中心として三次元的に分枝状に構築された高分子であり、その分子径は世代ごとに予測されている (Tomalia et al. 2003)。そこで、MNPs を直径 40 nm の球体であると過程し、MNPs 表面上に修飾可能なデンドロンの数から一粒子に固定化可能なアミノ基数の理論値を算出した。本手法で用いたデンドロンは、球体状である PAMAM デンドリマーを二等分に分割した構造を持ち、半球体状とみなすことができる。デンドロンと MNPs との結合は、デンドロンのチオール

基と MNPs 表面に修飾された架橋剤である GMBS のマレイミド基との間で起こり、デンドロンのチオール基は、半球体状のデンドロン平面中心に位置している。デンドロンが MNPs 表面に最密充填している時、その最密単位格子面積は、8 $\sqrt{3}$ r² nm² (r：デンドロン底面の半径) で表すことができ、最密単位格子中にはデンドロン 4 つ分のアミノ基が含まれている。また、粒径 R nm の MNPs 表面積は πR^2 nm² と計算できる。これらのことから、1 粒子の MNP 表面に固定可能なアミノ基数を、 $[(\pi R^2 \text{ nm}^2 / 8\sqrt{3} r^2 \text{ nm}^2) \times 4 \times \text{各世代デンドロンのアミノ基数}]$ の数式を用いて算出した。その結果、今回用いたデンドロンは第 6 世代であるため、そのアミノ基数は 256 個である。その結果、d-MNPs 1 粒子あたりに導入可能なアミノ基数は 1 粒子当たり 1.6 \times 10⁴ 個のアミノ基が導入可能であることが示された。一方、アミノ基定量の結果、1 粒子の d-MNPs に修飾されたアミノ基数は 0.8 \times 10⁴ 個であった。

【2】アミンデンドリマー修飾磁気微粒子を用いた *S. enterica* からの DNA 回収及び PCR 検出評価

PCR 反応に利用する溶液の条件検討を行った結果、PCR 反応液 (30 μ L) 中の dNTP 及び MgCl₂ の終濃度をそれぞれ 15 mM 及び 17.5 mM と設定した場合に、10 コピー以下のプレートからキャピラリー電気泳動により確認可能な量の PCR 産物 (7.7 \times 10⁸ コピー/ μ L 以上) を得ることができた (Fig. 1)。次に、d-MNPs を用いて *S. enterica* 懸濁液から DNA を濃縮・回収し、上記の反応条件で PCR を行った。その結果、10² cells/160 μ L の *S. enterica* 懸濁液から、キャピラリー電気泳動により視認できるレベルの PCR 増幅産物を得ることが可能であった (Fig. 2)。更に、サンプルの容量を増やし、10² cells/mL の *S. enterica* 懸濁液を用いても同様に検討を行ったところ、同サンプルからも増幅産物を得ることができた。以上のことから、本手法によって 10² cells/mL の細菌の特異的検出が可能

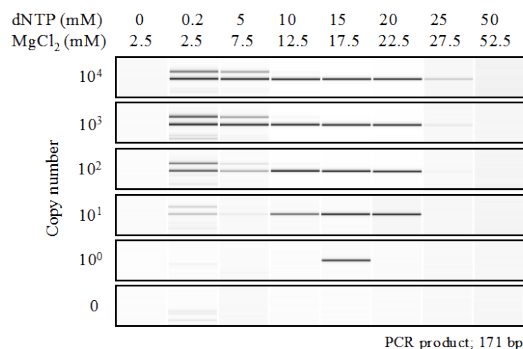


Fig. 1 PCR amplification of *B. subtilis gryB* gene using various dNTP and MgCl₂ concentrations.

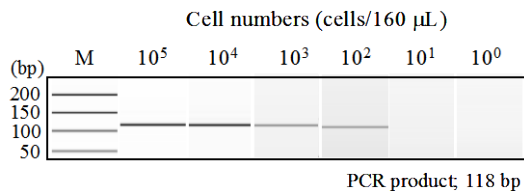


Fig. 2 PCR amplification of *iroB* gene from *S. enterica*.

The PCR templates were prepared from suspensions containing various *S. enterica* cell numbers using d-MNPs.

M : Marker

であることが示された。また、検出プロセスにDNAマイクロアレイを採用したオンチップ型デバイスの検出限界は約 6.0×10^6 コピー/ μL 程度であることから、本手法はオンチップ型デバイスに適用可能であることが示唆された。

【3】アミノ基修飾磁気微粒子を用いた大腸菌の回収

アミノ基修飾磁気微粒子による大腸菌回収条件の検討を行ったところ、APTES-MNPs および d-MNPs 共に95%以上の高い回収率を示した。また、pHの異なるリン酸緩衝溶液中におけるアミノ基修飾磁気微粒子の大腸菌の回収能を確認した。その結果、全ての pH においてAPTES-MNPs および d-MNPs 共に大腸菌の回収率には顕著な差は見られず、pHによるアミノ基修飾磁気微粒子の大腸菌の回収能への影響は確認されなかった。このことから、アミノ基修飾磁気微粒子が大腸菌の回収能に影響する要因として、溶液のイオン強度が関係していると考えられる。

【4】アミノ基修飾磁気微粒子による大腸菌の不活化

アミノ基修飾 MNPs の局所加熱による大腸菌の不活化の検討を行った結果、交番磁場印加3分後の大腸菌の生存率は、MNPs、APTES-MNPs、d-MNPs を用いた場合はそれぞれ32%、16%、5%であった (Fig. 3)。MNPs を用いた場合とアミノ基修飾 MNPs を用いた場合の交番磁場印加後の大腸菌の生存率の差は、MNPs の発熱の

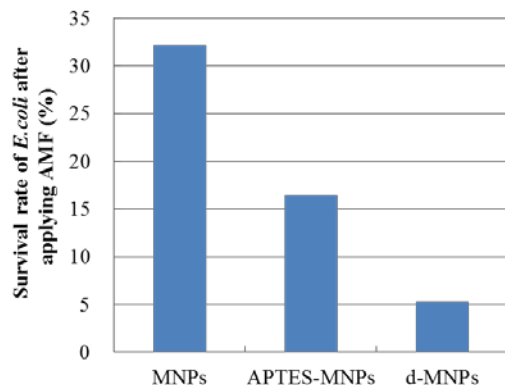


Fig. 3 Survival rates of *E. coli* after applying alternating magnetic field in the presence of various MNPs.

影響によるものと考えられた。よって、アミノ基修飾 MNPs の局所加熱を利用することで大腸菌の不活化が可能であることが示された。

【5】蛍光顕微鏡観察による交番磁場印加後の大腸菌の評価

MNPs, APTES-MNPs および d-MNPs を分散した大腸菌溶液を交番磁場印加前および印加後で染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて大腸菌の観察を行った。その結果、MNPs を分散した大腸菌溶液では、交番磁場印加前および印加後に PI による染色は確認されなかった (Fig. 4)。これにより、溶液温度による大腸菌の不活化において、細胞膜の損傷は見られないことが示された。一方で、APTES-MNPs および d-MNPs を分散した大腸菌溶液では、磁場印加前の大腸菌の少数は PI による染色が見られた (Fig. 5)。これは、大腸菌に対してアミノ基修飾磁気微粒子が吸着する際に、膜に損傷を受けるためであると考えられた。そしてAPTES-MNPs および d-MNPs を分散した大腸菌溶液の磁場印加後の大腸菌は、交番磁場印加前に比べ、PI によって染色された菌体数が増加した。これにより、磁気微粒子の発熱によって大腸菌が細胞膜に損傷を受けたことが示唆された。以上のことから、アミノ基修飾磁気微粒子の局所加熱により、大腸菌は細胞膜に損傷を受けることが示された。

したがって本手法は、微生物による水質の汚染除去や、マイクロ流体デバイスを用いた微生物検査における簡便な微生物の回収濃縮法として導入可能な技術であると考えられる。また、アミノ基修飾磁気微粒子を吸着した微生物に対し局所加熱する事で、高効率な不活化が可能であると考えられた。

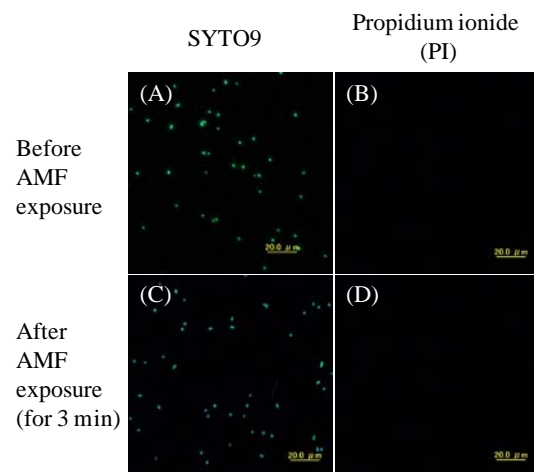


Fig. 4 Fluorescence microscopic images of *E. coli* suspension in the presence of MNPs.

Before (A, B) and after (C, D) applying alternating magnetic field (AMF). The cells were stained with SYTO9 (A, C) and propidium ionide (B, D).

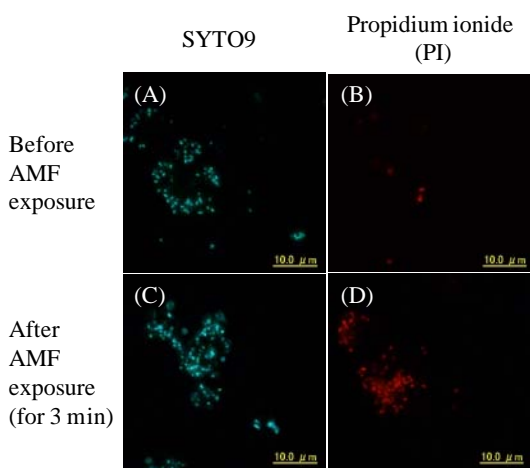


Fig. 5 Fluorescence microscopic images of *E. coli* suspension in the presence of APTES-MNPs.

Before (A, B) and after (C, D) applying alternating magnetic field (AMF). The cells were stained with SYTO9 (A, C) and propidium ionide (B, D).

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2件)

① Atsushi Arakaki, Keiyu Shibata, Takeyuki Mogi, Masahito Hosokawa, Keiichi Hatakeyama, Hideyuki Gomyo, Tomoyuki Taguchi, Hitoshi Wake, Takeo Tanaami, Tadashi Matsunaga and Tsuyoshi Tanaka. Efficient DNA release from PAMAM dendrimer-modified superparamagnetic nanoparticles for DNA recovery. *Polymer Journal*, (査読有), in press, 2012. 10.1038/pj.2012.32

② Tsuyoshi Tanaka, Keiyu Shibata, Masahito Hosokawa, Keiichi Hatakeyama, Atsushi Arakaki, Hideyuki Gomyo, Takeyuki Mogi, Tomoyuki Taguchi, Hitoshi Wake, Takeo Tanaami, Tadashi Matsunaga. Characterization of magnetic nanoparticles modified with thiol core, functionalized PAMAM dendron for DNA recovery. *J. Colloid Interface Sci.* (査読有), 377: 469-475, 2012. 10.1016/j.jcis.2012.03.039

[学会発表] (計3件)

①高橋真美、細川正人、新垣篤史、田中剛、松永是、「アミノ基修飾ナノ粒子の局所加熱を用いた微生物不活化法の開発」、電気化学会第79回大会、2012年3月30日、アクトシティ浜松(静岡県)

②高橋真美、新垣篤史、田中剛、松永是、

「Development of influence virus gene detection technique based on located heating of magnetic nanoparticles」、62nd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry、2011年9月12日、朱鷺メッセ(新潟県)

③高橋真美、細川正人、新垣篤史、田中剛、松永是、「磁気微粒子の局所加熱による微生物の不活化条件の検討」、2011年電気化学会秋季大会、2011年9月9日、朱鷺メッセ(新潟県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tuat.ac.jp/~biomol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新垣 篤史 (ARAKAKI ATSUSHI)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号：10367154

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし