

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410173

研究課題名(和文) 完全弾性体を目指したDNAナノゲル薄膜の構築とその評価

研究課題名(英文) Construction of thin DNA-gel film with perfectly elasticity

研究代表者

古澤 宏幸 (Furusawa, Hiroyuki)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：60345395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は精密な構造を形成可能な生体高分子であるDNAを利用して完全均一性構造体のゲル薄膜をすり振動を生じる水晶発振子基板上に構築し、27および81 MHzで振動させることで動的粘弾性測定を行い、従来の不均一構造体のゲルでは見られないような特異な力学物性を示すかどうかを明らかにすることを目的とし、(1) DNA鎖の組み合わせによりテトラポッド構造のDNAブロックを作製しDNAネットワーク構造体を調製できたこと、(2)水晶発振子を用いた動的粘弾性測定を行いDNAネットワーク構造体の弾性率を求めることができたこと、(3)ポリジメチルシロキサン(PDMS)の弾性率に近い値を示したことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is (1) construction of a perfectly even structure using biomolecules of DNA strands, that allow us to provide a rigorous building block, and (2) measurement of dynamic viscoelasticity for the DNA-network gel made from the DNA strands. In this study, a tetrapod-like DNA structure was designed as a building block, and then the thin film of the DNA-network gel was prepared with the tetrapod-like DNA on a plate of Quartz-crystal microbalance, which can be used for dynamic viscoelasticity measurement. As a result, the DNA-network gel indicates the similar viscoelasticity as that of PDMS.

研究分野：化学

キーワード：水晶発振子 アドミッタンス解析 エネルギー散逸値 動的粘弾性測定 貯蔵弾性率 損失弾性率 DNAネットワーク薄膜

## 1. 研究開始当初の背景

4本に分岐した同じ長さの親水性合成高分子鎖を持つスターポリマーどうしを3次的に交互に結合した高次構造体は、架橋分岐点間の距離が一定な高分子ゲルを形成し、従来の不均一な架橋ゲルが外力に対して脆く崩壊してしまうのとは異なり含水率が80%を超えているにもかかわらずスーパーボールのように弾むほぼ完全な弾性体の性質を示すことが報告された。

DNAは二重らせんの精密な構造を形成する生体高分子として知られている。DNAの二重らせん形成における塩基配列の相補性の高さを利用して、互いに相補的な配列をもつ4本の一本鎖DNAを混合することで、スターポリマーのような4分岐二本鎖DNA構造を作ることが可能である。DNAを利用した精密な構造体は従来の不均一構造体では見られなかった特異な力学的物性を示すと期待される。しかしながら合成高分子と異なりDNAのような生体分子を用いる場合は、微量しか入手できず手で持てるサイズのサンプルが調製できないことから物性評価が困難である問題点があった。

これまでに、ナノグラム・オーダーの微量天秤として利用できる水晶発振子マイクロバランス法(QCM)をバイオセンサーとして開発してきた。水晶発振子は水晶薄板の両面に金電極を蒸着し交流電圧を印加することにより水晶板を規則正しく振動させたものであり、振動をプローブとしているためその電極上に吸着した物質の慣性質量や動的粘弾性といった物理量を測定できるデバイスである。水晶発振子にネットワークアナライザーを接続した水晶発振子アドミタンス法(QCM-A)を用いると、質量変化だけでなく振動のエネルギー散逸値変化から基板上的物質の粘弾性変化を同時に測定できる。微量な物質質量でも応答できる水晶発振子を用いれば微量なDNAによる構造体の力学物性評価が可能になるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、力学物性を評価できる水晶発振子基板上にナノメートル・オーダーのさまざまな精密なDNAネットワーク構造体を構築し、動的粘弾性のパラメーターである貯蔵弾性率 $G'$ や損失弾性率 $G''$ で評価することで構造体形状と力学物性との定量的な相関関係を明らかにすることを目的とした。

具体的には、アビジンを固定した水晶発振子基板上に足場DNAとしてビオチン化一本鎖DNAを固定化し、そこへ4分岐二本鎖DNAどうしのネットワーク架橋構造を形成させ四面体ネットワーク構造のDNAナノ薄膜のゲルを構築し、水晶発振子で測定しながら1層ごとに質量変化から層構造を形成していることを確認し、粘弾性測定からその薄膜の力学物性を評価することを検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 動的粘弾性測定可能な水晶発振子装置を構築した。水晶発振子にネットワークアナライザーを接続し、水晶発振子の振動現象を複数の周波数で解析できる装置を開発した。異なる複数の周波数( $F_1, F_2, \dots$ )でのエネルギー散逸値( $D_1, D_2, \dots$ )を同時に測定することで動的粘弾性測定が可能であることが理論的に示されているので、水晶発振子のオーバー・トーン発振を利用して複数の周波数でのエネルギー散逸値を測定できる装置を構築し、得られる $F$ 値と $D$ 値の組み合わせから貯蔵弾性率 $G'$ と損失弾性率 $G''$ を算出することを検討した。

(2) DNA鎖を組み合わせてDNAナノ薄膜のゲル構造体を構築した。水晶発振子基板上に4分岐型DNAを用いて四面体ネットワーク形成によりダイヤモンド構造様の構造体を有するDNAナノ薄膜を調製した。4ヶ所の3'末端のうち1つが配列X、3つは配列Bが突出する4分岐DNA(Bx)を設計し、同様に1つが配列M、残りが配列Rの4分岐DNA(Rm)、1つが配列N、3つが配列Bのもの(Bn)、1つが配列Y、3つが配列Rのもの(Ry)を調製する。配列X-Y、M-N、B-R

は相補的な配列とする。アビジン固定水晶発振子基板上に配列 Y をもつビオチン化一本鎖 DNA を足場 DNA として固定化し、そこへ Bx 4 分岐 DNA、Rm 4 分岐 DNA を順次添加し、洗浄後 Bn 4 分岐 DNA、Ry 4 分岐 DNA を添加して、DNA ネットワークの多層構造体を構築する。一層毎に質量測定と動的粘弾性測定を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 水晶発振子装置にネットワークアナライザーを接続した粘弾性を測定できる装置を構築した。この装置を利用して、ポリスチレンやポリジメチルシロキサン (PDMS) の粘弾性を測定した。さらに、異なる複数の周波数での粘弾性を測定し、動的粘弾性測定を行った。架橋度の異なる PDMS を測定したところ、架橋度が増加するに従って貯蔵弾性率が大きくなることが確認できた。

(2) 4 分岐型 DNA を調製し、QCM 基板上に順次滴下していくと、DNA ネットワークを形成し層構造を形成している様子が QCM の質量変化で確認できた。4 分岐型 DNA 同士をつなぐ突出部分を欠損させると層形成が見られなかったことから、DNA 同士のネットワーク架橋が重要であることがわかった。また、一層の高さが約 14 nm とすると、およそ 200 nm ほどの薄膜が基板上に構築できた。動的粘弾性測定を行ったところ、4 層のネットワークが構築できるまでは膜厚の増加にともなって弾性率は上昇したが、4 層以降は一定となった。4 分岐型 DNA を構築する DNA 鎖を 30, 50, 70 mer の 3 種類で DNA ナノ薄膜を調製した場合、50 mer の場合が最も弾性率が大きく、70 mer では逆に小さな値となった。

(3) 50 mer の 4 分岐型 DNA で調製した DNA ナノ薄膜の貯蔵弾性率を PDMS の弾性率と比較したところ、ほぼ同じ値であることがわかった。これは、天然ゴムであるポリイソプレンよりおよそ 1000 倍大きな値であり、ポリスチレン-ブタジエン-コポリマーの貯蔵弾性率とほぼ匹敵する値であることがわかった。

以上、水晶発振子で動的粘弾性測定を行う

ことのできる装置を構築し、DNA ナノ薄膜が 90% が水であるにもかかわらず弾性率が PDMS に匹敵するほど大きいことが明らかとなり、従来の不均一構造体では見られなかった特異な力学的物性を示していることを明らかにすることができた。

#### 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 8 件)

(1) Hiroyuki Furusawa, Tomomi Sekine, and Tomomitsu Ozeki  
Hydration and Viscoelastic Properties of High- and Low-Density Polymer Brushes Using a Quartz-Crystal Microbalance Based on Admittance Analysis (QCM-A)  
*Macromolecules*, **49**, 3463-3470 (2016). (査読有)  
DOI: 10.1021/acs.macromol.6b00035

(2) Hiroyuki Furusawa and Tomomitsu Ozeki  
DNA compaction determined by energy dissipation measurements on a quartz-crystal oscillator  
*Microsyst. Technol.*, **22** 65-71 (2016). (査読有)  
DOI: 10.1007/s00542-015-2655-8

(3) Hiroyuki Furusawa, Yumi Tsuyuki, Shuntaro Takahashi, and Yoshio Okahata  
In situ monitoring of structural changes during formation of 30S translation initiation complex by energy dissipation measurement using 27-MHz quartz-crystal microbalance  
*Anal. Chem.*, **86** 5406-5415 (2014). (査読有)  
DOI: 10.1021/ac500487b

[学会発表](計 16 件)

(1) 古澤 宏幸、薛 シン瑤  
DNA ゲルネットワーク・フィルムの作製  
第 26 回バイオ高分子シンポジウム、2016 年 7 月 28 日、東京工業大学(東京)

(2) S. Xue, S. Kobayashi, M. Tanaka, H. Furusawa  
Hydration and viscoelasticity measurements of biocompatible polymers by using quartz-crystal microbalance with energy dissipation technique  
2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015)  
2015 年 12 月 15 日~20 日、Hawaii Convention Center (Honolulu, Hawaii)

(3) 古澤 宏幸(招待講演)

水晶発振子マイクロバランス(QCM)法について  
第9回 QCM 研究会、2015年8月28日、機械振  
興会館(東京)

(4) S. Xue, S. Kobayashi, M. Tanaka, H.  
Furusawa

Evaluation of Physical Properties of Bio-related  
Polymers based on Energy Dissipation of a  
Quartz-Crystal Microbalance

The 10th SPSJ International Polymer Conference  
(IPC2014)

2014年12月2日～5日、つくば国際会議場(茨  
城県・つくば)

(5) S. Xue, S. Kobayashi, M. Tanaka, H.  
Furusawa

Measurements of Hydration Amount and  
Viscoelasticity of Biocompatible Polymers using  
Quartz-Crystal Microbalance with Dissipation  
Technique

The 2nd International Conference of Smart  
System Engineering 2014 (SmaSys2014)

2014年10月17日、伝国の杜(山形・米沢)

(6) 古澤 宏幸(招待講演)

水晶発振子で生体分子の構造変化をみる  
平成 25 年度東北地区先端高分子セミナー  
2014年3月11日、仙台秋保温泉

(7) 古澤 宏幸(招待講演)

生体分子と高分子の粘弾性を測る  
関東高分子若手研究会 2013 秋の講演会 2013  
年 11 月 9 日、東京工業大学

(8) 古澤 宏幸、吉田 亜矢、岡畑 恵雄

水晶発振子アドミッタンス法を用いる Hfq の RNA  
シャペロン活性の動的解析

第7回バイオ関連化学シンポジウム、2013年9  
月29日、名古屋大学

(9) 古澤 宏幸、春原 有美子、吉田 亜矢、岡  
畑 恵雄

水晶発振子アドミッタンス法を用いる RNA 鎖の  
動的構造変化の追跡

第 62 回高分子討論会、2013年09月13日、金  
沢大学

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

古澤 宏幸 (Furusawa, Hiroyuki)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：60345395