

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：19700412
 研究課題名（和文）DNA 担持ポリマーナノミセルの精密構造制御と高感度バイオセンシングデバイスへの応用
 研究課題名（英文）Structural control of DNA carrying polymer micelles for reliable biosensing
 研究代表者
 金山 直樹（KANAYAMA NAOKI）
 独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・客員研究員
 研究者番号：80377811

研究成果の概要：短鎖 DNA を一成分とする温度応答性ブロック共重合体を、精密且つ効率的に合成する手法を確立した。このブロック共重合体は、温度応答性セグメントの相転移温度以上の水中で、数十 nm のミセル様の会合体を自発的に形成した。会合体表層の短鎖 DNA からなるシェル層に、これと相補的な塩基配列を含む DNA 鎖をハイブリダイズさせ、任意の塩基対構造を有する DNA 二重鎖担持ナノ粒子を得た。DNA 二重鎖担持ナノ粒子の分散安定性は、表層の DNA 二重鎖の自由末端近傍の塩基対構造に強く依存し、例えば T-T ミスマッチ塩基対を適切な位置に配置すると、ごく微量の水銀（II）イオンにも明敏な応答を示すセンシングデバイスとなることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|----------|---------|----------|
| 2007 年度 | 2300,000 | 0 | 2300,000 |
| 2008 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3000,000 | 210,000 | 3210,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：DNA、ブロック共重合体、温度応答性高分子、ミセル、バイオコンジュゲート

1. 研究開始当初の背景

発ガン性物質や変異原物質の多くは、DNA に強く結合することで細胞代謝に大きく変化させ、生長を弱めたり停止させて強い毒性を発揮する。一方、DNA に強く結合することで、抗ガン活性や抗腫瘍活性など医薬品として極めて有用な特性を示す物質も数多く見出されている。

従来、低分子化合物と DNA の相互作用は、

質量分析法（Chemical Reviews 2001, 101, 377.）や核磁気共鳴法（Biochemistry 1997, 36, 8663.）などにより評価されてきたが、これらの手法は煩雑で大型の分析装置を必要とするため、DNA 結合性を簡便・迅速に評価する目的には適していない。

近年、医薬品開発ではコンビナトリアルケミストリーにより供される膨大な量の化合物ライブラリーの中から、所望の性質を有する化合物を迅速にスクリーニングすること

が要求されてきており、DNA 結合性評価の新たな方法論の確立が望まれている。すなわち、社会的ニーズの高い「発ガン性物質等の迅速なハザードセンシング」、「未知検体群から有用薬物のハイズループット・スクリーニング」の実現のために、その根幹技術となる“DNA 結合性化合物の簡便かつ高感度な検出技術”を確立することが急務となっている。

2. 研究の目的

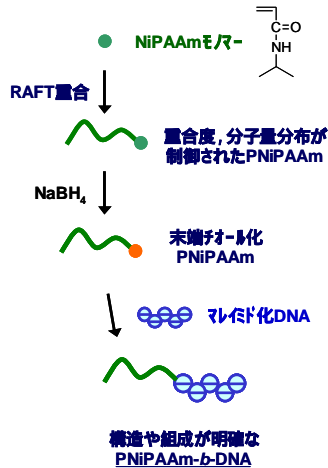
本申請研究では、精密に構造制御したDNA 担持ポリマーナノミセルをベースとし、DNA 結合性化合物を簡便に検出するセンシングシステムの可能性について検討を行った。

具体的には、(1) DNA 二重鎖を表層に有するポリマーナノミセルの簡便な製造技術の確立、(2) DNA 結合性化合物が共存する環境下において DNA 担持ポリマーナノミセルが速やかに凝集(応答)し、系が白濁するシステムの確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題は、以下の3段階の研究ステージに大別することができる。本研究課題の遂行にあたっては、(1)~(3)の各項目に関し、順を追って検討を行った。

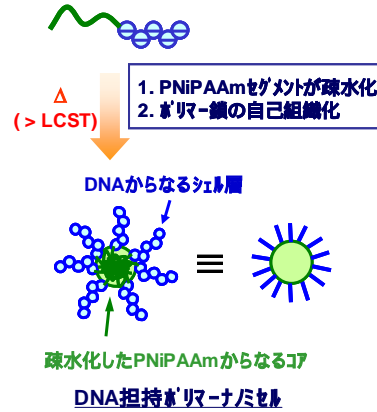
(1) DNA を一成分とする温度応答性ブロック共重合体 (PNiPAAm-*b*-DNA) の合成



リビングラジカル重合法の一つである、可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合法を用いて、下限臨界溶液温度 (LCST) を有することが知られている温度応答性ポリマー (PNiPAAm) を得た。本法により得られる PNiPAAm の片末端には、チオカルボニルチオベンジル基が導入されており、これを水素化ホウ素ナトリウムで処理することで、活性

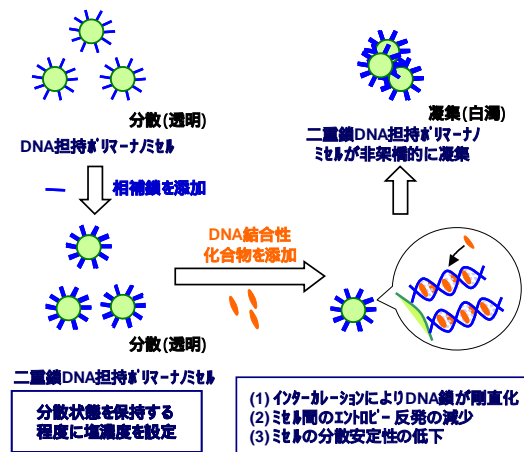
なチオール基へ変換した。得られた片末端チオール化 PNiPAAm と 5' 末端にマレイミド基を導入した短鎖 DNA をカップリングさせ PNiPAAm-*b*-DNA を得た。

(2) PNiPAAm-*b*-DNA の温度応答性を利用した DNA 担持ポリマーナノミセルの形成および評価



先に述べたように、PNiPAAm は LCST を有する温度応答性高分子であるため、PNiPAAm-*b*-DNA 水溶液を LCST 以上の温度に加温すると、脱水和した PNiPAAm セグメント同士が会合し、外殻に親水性の短鎖 DNA を有するコア-シェル構造の DNA ポリマーナノミセルの自発的な形成が期待される。ミセル形成挙動や粒径は、動的光散乱 (DLS) 測定、原子間力顕微鏡 (AFM) 観察、示差走査熱量測定などにより評価した。

(3) DNA 担持ポリマーナノミセルの非架橋凝集現象を用いた DNA 結合性化合物検出原理の有効性の検証



前項で調製した DNA 担持ポリマーナノミセル表面の短鎖 DNA に対し、相補的な塩基配列を含む一本鎖 DNA をハイブリダイズさせ DNA 二重鎖担持ポリマーナノミセルを調

製した。従来の研究結果より、完全に相補的な DNA 二重鎖を担持したポリマーナノミセルは、高イオン強度条件下で速やかに非架橋凝集することがわかっている。DNA 二重鎖担持ポリマーナノミセルの表層の DNA 二重鎖の自由末端近傍の塩基対構造に関し、様々な組み合わせのマッチ・ミスマッチ塩基対構造の導入を試み、高イオン強度条件下においても DNA 二重鎖担持ポリマーナノミセルが安定に分散する要件の抽出を行った。さらに、安定に分散することが確認された DNA 二重鎖担持ポリマーナノミセル分散液に DNA 結合性化合物を添加し、分散液の濁度（色）変化を追跡した。

4. 研究成果

前項(1)に示した手法によって、短鎖 DNA を一成分とする温度応答性ブロック共重合体 (PNiPAAm-*b*-DNA) をその組成や分子量を制御し且つ効率的に合成することができた。また、本手法は PNiPAAm のみならず、代表的なノニオン性高分子であるポリアクリルアミドにも容易に適用することができ、RAFT 重合法によって得られる合成ポリマーと生体分子との汎用的なバイオコンジュゲート法となることが示された。

このブロック共重合体は、温度応答性セグメントの LCST 以上の温度の水中で、数十 nm のミセル様の会合体を自発的に形成することが DLS 測定、AFM 観察の結果より明らかとなった。会合体表層の短鎖 DNA からなるシェル層に、これと相補的な塩基配列を含む DNA 鎖をハイブリダイズさせ、任意の塩基対構造を有する DNA 二重鎖担持ナノ粒子を得た。高イオン強度の水中における DNA 二重鎖担持ナノ粒子の分散安定性は、従来の知見どおり表層 DNA 二重鎖の自由末端近傍の塩基対構造に強く依存し、DNA 二重鎖が完全相補的であった場合、速やかに非架橋的に凝集した。一方、ダンダリングエンドやミスマッチ塩基対を自由末端近傍に配置すると、高イオン強度条件下においても DNA 二重鎖担持ナノ粒子は安定に分散することが確認できた。

さらに、水銀(II)イオンと特異的に錯構造を形成することが知られている T-T ミスマッチ塩基対を自由末端近傍に配置した DNA 二重鎖担持ナノ粒子は、高イオン強度下においても安定に分散したが、水銀(II)イオンを添加すると速やかに凝集することが確認された。本現象をもとに、ごく微量の水銀(II)イオンにも明敏な応答を示すセンシングシステムを構築できる可能性を示すことがで

きた。すなわち、DNA 二重鎖担持ナノ粒子の高感度センシングデバイスとしての有用性を示すことができた。

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 3 件)

Naoki Kanayama, Hideaki Shibata, Ayumi Kimura, Daisuke Miyamoto, Tohru Takarada, Mizuo Maeda "RAFT-Generated Polyacrylamide-DNA block Copolymers for Single-Nucleotide Polymorphism Genotyping by Affinity Capillary Electrophoresis" *Biomacromolecules*, 10, 805-813, 2009, 査読有

Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Hideaki Shibata, Ayumi Kimura, Mizuo Maeda "Evaluation of Single-Base Substitution Rate in DNA by Affinity Capillary Electrophoresis" *Analytica Chimica Acta*, 619, 101-109, 2008, 査読有

Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Ayumi Kimura, Hideaki Shibata, Mizuo Maeda "Affinity Capillary Electrophoretic DNA Separation Using PEG-Oligodeoxiribonucleotide Block Copolymers: Relationship Between Peak Resolution and Affinity Strength" *Journal of Separation Science*, 31, 837-844, 2008, 査読有

[学会発表](計 7 件)

金山直樹, 宝田 徹, 前田瑞夫「DNA二重鎖を担持した金ナノ粒子を用いる水銀(II)イオンの簡便・迅速検出」日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008、2008年11月18日、東京大学(東京)

金山直樹, 木村鮎美, 柴田秀彬, 宝田 徹, 前田瑞夫「プローブDNAを片末端に有するノニオン性ポリマーを用いた一塩基変異体混合物の電気泳動分離」第57回高分子学会年次大会、2008年5月29日、パシフィコ横浜(神奈川)

金山直樹, 藤田雅弘, 宝田 徹, 前田瑞夫「DNAを片末端に有するポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の感熱応答挙動」第57回高分子学会年次大会、2008年5

月 29 日、パシフィコ横浜（神奈川）

金山直樹,木村鮎美,柴田秀彬,宝田 徹,前田瑞夫「農作物病原菌の薬剤耐性検定を指向したアフィニティー電気泳動法の開発」第 8 回GSCシンポジウム、2008 年 3 月 6 日、一橋記念講堂（東京）

Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Ayumi Kimura, Mizuo Maeda “Synthesis of Diblock Copolymers Consisting of a Single-Stranded DNA and RAFT-Generated Polyacrylamides and Their Applications to Gene Mutation Assay” The 10th Pacific Polymer Conference (PPC10), Dec. 4, 2007, Kobe International Conference Center (Hyogo)

金山直樹,木村鮎美,柴田秀彬,宝田 徹,前田瑞夫「オリゴDNAを 1 成分とするブロック共重合体の構造・組成制御とナノ・バイオ機能」第 56 回高分子討論会、2007 年 9 月 20 日、名古屋工業大学（愛知）

金山直樹,宝田 徹,前田瑞夫「ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)-オリゴDNAブロック型コンジュゲートの合成と特性評価」第 56 回高分子学会年次大会、2007 年 5 月 30 日、京都国際会議場（京都）

〔図書〕(計 1 件)

金山直樹,前田瑞夫、シーエムシー出版「第 5 章 バイオ計測技術 2. DNA コンジュゲートポリマーによるバイオ計測」,次世代医療のための高分子材料工学、p.252-262, 2008 年

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：重金属イオンの検出法およびそのための試薬

発明者：金山直樹,宝田 徹,前田瑞夫

権利者：(独)理化学研究所

種類：特願

番号：2008-257206

出願年月日：平成 20 年 10 月 2 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA NAOKI)

独立行政法人理化学研究所・前田バイオ工
学研究室・客員研究員

研究者番号：80377811