

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700488

研究課題名(和文) 界面特性の異なる高密度DNAブラシを担持したナノ粒子の創製と細胞との相互作用評価

研究課題名(英文) Surface properties of DNA brush layers and their applications

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・研究員

研究者番号：80377811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、比較的短い(~50 bp) DNA二重鎖が固体表面にブラシ状に集積して形成されるDNAブラシ界面に関して、その表層構造の僅かな差に連動して変化する界面特性を表すためのパラメータ、およびその評価法の探索を目的とし研究を行った。シリコンカンチレバーを用い、周波数変調AFM(FM-AFM)法によってDNAブラシ層の垂直方向を走査しX-Z断面図を得たところ、DNAブラシ最表層の僅か一組の塩基対の構造の差(マッチorミスマッチ)が明瞭にdf断面分布に反映されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：In general, double-stranded DNA (dsDNA) undergoes the small thermal fluctuations that transiently break hydrogen bonds and unstuck bases (so-called "breathing") even below the melting temperature. A base pair that is located at the terminal exhibits a higher frequency of breathing than those in the middle part of dsDNA strand. Such conformational dynamics of dsDNA play important roles in various biological processes, including DNA transcription and replication. In this study, we found that the surface properties of a brush layer composed of dsDNA largely depend on their terminal dynamics.

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 界面

1. 研究開始当初の背景

[1] ナノ粒子表面に密に形成されたブラシ状の DNA は、溶液中のフリーな DNA とは大きく異なる特異な物性を示すことが知られている。例えば、密なブラシ状の DNA 鎖は、溶液中のフリーな状態のものに比べ相補鎖認識能（一塩基変異識別能）に優れ、またナノ粒子表面に形成された DNA 二重鎖の熱安定性は、フリーな状態のものより高くなる（Mirkin ら Science, 1997. など）。これらの現象は、DNA ブラシ内のリン酸基と対イオン形成するカチオンが、溶液中から DNA ブラシ近傍に濃縮され（対イオン凝縮）、局所的なイオン凝縮場が形成されることに起因していると考えられている（Schaltz ら J.Phys.Chem.B, 2006.）。

[2] 最近、密なブラシ状の DNA 鎖が核酸分解酵素に対して耐性を示すこと、密なブラシ状の DNA 鎖で覆われたナノ粒子が負電荷密度の高い表面であるにも関わらず効率的に細胞内に取り込まれることなど興味深い現象が幾つか報告されてきている（例えば、Mirkin ら Nano Lett., 2007. など）。これらは、ナノ粒子表面という分子集合場が、溶液中のフリーな DNA 鎖とは異なる特異な物性の発現に寄与することを示唆している。

[3] これまでに申請者は、密なブラシ状の DNA 二重鎖で覆われたナノ粒子の表層におけるごく僅かな塩基対構造の差が、当該ナノ粒子の分散安定性に明敏に反映されることを報告している。例えば、ナノ粒子表層の DNA 二重鎖末端が相補的塩基対である場合、このナノ粒子は高イオン強度溶液（例えば 0.5 M NaCl）中において速やかに凝集・沈殿する。これに対し、ナノ粒子表層の DNA 二重鎖の自由末端の僅か一つの核酸塩基が塩基対を形成しないミスマッチ構造である場合は、高イオン強度溶液においてもナノ粒子自体は凝集・沈殿することなく安定に分散状態を保持するのである（React. Funct. Polym., 2011. など）。

[4] さらに申請者は、安定な塩基対を形成しないチミン - チミン (T-T) ミスマッチを末端近傍に有する DNA 二重鎖で密に（ブラシ状に）覆われた安定な金ナノ粒子の分散液が、水銀イオン (Hg(II)) の存在下で選択的に分散安定性が低下し、凝集・沈殿形成に伴う溶液の明瞭な赤 - 薄紫色の色調変化を示すことを見出した（Chem. Commun., 2011.）。この際、T-T ミスマッチ部位には Hg(II) が取り込まれ、非ワトソン - クリック塩基対 (T-Hg(II)-T ペア) が形成される。

[5] 以上の事実は、ナノ粒子表面にブラシ状に集積した DNA 二重鎖からなる界面（以下、DNA ブラシ）の特性が、表層の僅かな塩基

対構造の変化を反映して大きく変化することを強く示唆するものである。

2. 研究の目的

前項で述べたように、これまでに申請者は、ナノ粒子上に形成された DNA ブラシの界面特性が、表層の僅かな塩基対構造に連動して大きく変化することを、当該 DNA ブラシで覆われたナノ粒子の分散安定性の変化に基づいて評価してきた。このような定性的な評価の一方で、DNA ブラシの界面特性そのものを議論するにあたり、DNA ブラシの「どのような」特性値が、末端近傍の塩基対構造に依存して「どれだけ」変化するかを定量的に表すパラメータが、従来の検討において欠如していた。本課題ではこの点に鑑み、DNA ブラシ界面の構造 - 物性相関を定量的に議論することを目標とし、DNA ブラシ界面のごく微小な構造の差を反映して変化する界面特性値（定量的パラメータ）の探索を行った。

3. 研究の方法

[1] DNA ブラシ界面における“柔らかさのパラメータ”解析

DNA ブラシで覆われた金ナノ粒子（以下、DNA ナノ粒子）に対し、Oshima らにより提案されている、表面に透水性の高分子層を有する粒子の電気泳動挙動に関する理論式（Oshima-Healy-White の近似式 (eq.1)）をもとに、ナノ粒子上の DNA ブラシの柔らかさのパラメータ (softness parameter: $1/\lambda$ 値) 解析を試みた。

$$\mu(n) = \frac{2\varepsilon_r\varepsilon_0}{3\eta} \frac{\Psi_{na} + \Psi_{nm}}{\frac{1}{\kappa_m} + \frac{1}{\lambda}} f(d/a) + \frac{ZeN}{\eta\lambda^2} \quad (\text{eq.1})$$

ここで、 μ : 電気泳動移動度、 n : バルク中のイオン強度、 ZeN : 電荷層内部の体積電荷密度、 $1/\lambda$: 柔らかさのパラメータ、である。

[2] ナノ力学計測法による DNA ブラシ界面の特性評価

後述するように、本課題の遂行過程において、電気泳動法に依存した実験[1]のアプローチでは、本課題の目的である DNA ブラシの界面特性を定量的に評価することが困難であることが判明した。そこで、電気泳動法に依存しない DNA ブラシ界面の特性評価法として、ナノ力学計測法の適用に関して検討を行った。DNA ブラシ層を形成させた金基板を緩衝液に浸し、周波数変調 AFM

(Frequency-modulation AFM: FM-AFM, プロトタイプ機)で液中における DNA ブラシ界面近傍を FM モードで走査した。

[3] 新しい外部刺激応答性 DNA ブラシ界面の探索

申請者はこれまでに、DNA ナノ粒子表面の T-T ミスマッチ塩基が、分散媒に添加した Hg(II)をとりこんで、2:1 錯体(T-Hg(II)-T)を形成すると、ナノ粒子の分散安定性が著しく低下することを報告している。これは、T-T ミスマッチ部での Hg(II)を介した塩基対合が DNA 二重鎖末端構造の揺らぎ(ブリーディング)を抑制し、粒子間のエントロピー斥力を弱めることに起因する。この知見をもとに、C-C ミスマッチ塩基と 2:1 錯体(C-Ag(I)-C)形成する Ag(I)と、上記の Hg(II)の二種類の化学シグナル(入力)に対し、その組み合わせを認識して凝集応答し、表面プラズモン共鳴シフトに起因する可視情報(出力)を与える論理素子様の刺激応答性を示すシステムの設計を行った。

4. 研究成果

[1] DNA ブラシ界面における“柔らかさのパラメータ”解析

ブラントエンド、ダングリングエンド、ターミナルミスマッチ、ターミナルバルジなど、様々な表層構造の DNA ブラシで覆われた金ナノ粒子(粒径:40 ナノメートル)を調製した。これらの DNA ナノ粒子に対し、分散液のイオン強度を変えながら電気泳動移動度を測定し、Oshima-Healy-White の近似式(eq.1)を用いフィッティング解析することで、DNA ブラシ界面の柔らかさのパラメータの導出を検討した。比較的低イオン強度条件(0.01~0.15 M)では、各 DNA ナノ粒子の電気泳動移動度(μ)を精度よく測定することができたが、イオン強度が高くなるにつれ、電気泳動中に発生するジュール熱や水の電気分解に起因するノイズ成分の影響を排除しつつ解析に耐えうる精度の電気泳動移動度を得ることが困難となった。特に、従来の研究成果から、DNA ナノ粒子の表層構造に依存した界面特性の明瞭な差が現れることが期待される 0.5 M NaCl 以上の高塩濃度環境においては、再現性のある測定を行うことが極めて困難であることが明らかとなり、本アプローチによる定量的パラメータの獲得は断念した。

[2] ナノ力学計測法による DNA ブラシ界面の特性評価

実験[1]の結果を受け、新たに電気泳動法に依存しない DNA ブラシ界面の特性評価法として、ナノ力学計測法の適用に関して検討を行った。100 mM NaCl を含む Tris-HCl 緩衝液(pH 7.5)中で平衡化した二種類の DNA ブラシ層(末端フルマッチ,末端ミスマッチ)に対し、シリコンカンチレバーを FM モードで DNA ブラシ層の垂直方向に走査し、 Δf 断面分布(X-Z 断面図)を得た。その結果、DNA ブラシ最表層の僅か一組の塩基対の構造の差(マッチ or ミスマッチ)を、明瞭な Δf 断面分布の差として検知(識別)可能であることがわかった。さらに、従来のコロイド分散系において表層構造に依存した DNA ブラシの界面特性の差が確認される高塩濃度条件下においても本手法が適用可能であることも確認でき。以上の結果から、FM-AFM 法による DNA ブラシ界面のナノ力学特性評価が定量的な界面特性パラメータを与える有効なツールとなりうることが示された。

[3] 新しい外部刺激応答性 DNA ブラシ界面の探索

本課題の遂行過程において、DNA ナノ粒子の分散安定性が、最表層から約 1 ナノメートルの厚さの空間内における塩基対構造(最末端から 3 塩基対に相当)を反映して変化することがわかった。この知見をもとに、Ag(I)と Hg(II)の二種類の入力シグナルに対し、その組み合わせを認識して凝集応答し、光学的出力(色調変化)を与える論理素子様の刺激応答性システムの設計を検討したところ、以下に示す末端構造を有する DNA ナノ粒子が二項演算型(AND および OR)の論理素子様の刺激応答性を示すことを見出した。

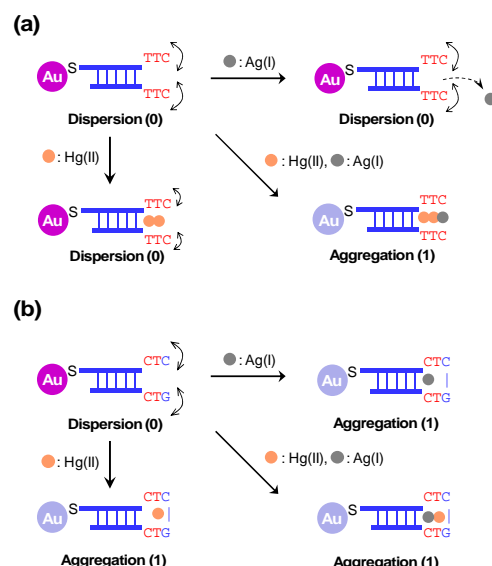


図 二項演算型の刺激応答性を示す DNA ナノ粒子の概略図。(a) AND型、(b) OR型。

尚, この論理素子様の刺激応答性を示す DNA ブラシ (DNA ナノ粒子) は, 研究計画立案時には想定していなかったものであり, 課題の遂行過程において偶然見出された成果である.

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 3 件)

金山直樹、前田瑞夫、DNA 密生層でみられる特異な界面現象、バイオマテリアル - 生体材料、査読無、32 巻、2014、95-101

Naoki Kanayama、Tohru Takarada、Masahiro Fujita、Mizuo Maeda、DNA terminal breathing regulated by metal ions for colloidal logic gates、Chemistry A European Journal、査読有、19 巻、2013、10794-10798

DOI:10.1002/chem.201301995

金山直樹、前田瑞夫、ポリマーの生長・分解を利用するシグナル増幅、ぶんせき、査読無、450 巻、2012、307-311

[学会発表](計 16 件)

Naoki Kanayama、Tohru Takarada、Masahiro Fujita、Mizuo Maeda、DNA terminal breathing regulated by metal ions for colloidal logic gates、The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2013)、2013 年 11 月 14 日、神奈川大学 横浜キャンパス

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、金属イオンに対し論理的な凝集応答を示す DNA ナノ粒子界面の設計、第 64 回コロイドおよび界面化学討論会、2013 年 9 月 19 日、名古屋工業大学

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、DNA ブラシの界面特性を制御する末端構造のダイナミクス設計、第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 12 日、金沢大学

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、DNA 二重鎖ブラシを有するコロイド分散系の金属イオンによる論理制御、第 62 回高分子学会年次大会、2013 年 5 月 31 日、京都国際会館

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、DNA 二重鎖担持金ナノ粒子を用いる光学的論理ゲート素子、第 62 回高分子学会年次大会、2013 年 5 月 30 日、京都国際会館

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、DNA 二重鎖ブラシ界面間における特異的相互作用の発現と応用、第 15 回高分子表面研究討論会、2013 年 2 月 1 日、東京理科大学森戸記念館

Naoki Kanayama、Masahiro Fujita、Tohru Takarada、Mizuo Maeda、Target-induced stability change of DNA brush-protected gold nanoparticle dispersions、The 9th SPSJ International Polymer Conference (IPC2012)、2012 年 12 月 12 日、神戸国際会議場

Naoki Kanayama、Tohru Takarada、Masahiro Fujita、Mizuo Maeda、Logical regulation of the dispersion stability of DNA duplex-immobilized gold nanoparticles via metal-mediated base pairing、The 39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2012)、2012 年 11 月 15 日、名古屋大学

金山直樹、DNA 複合化ナノ構造体の開発、神奈川大学理学研究科セミナー、2012 年 11 月 9 日、神奈川大学平塚キャンパス

Naoki Kanayama、Tohru Takarada、Masahiro Fujita、Mizuo Maeda、Simple and rapid colorimetric biosensors based on non-crosslinking aggregation of DNA-immobilized gold nanoparticles、The 7th Sweden-Japan BioNano workshop、2012 年 10 月 16 日~2012 年 10 月 17 日、Hogberga Gard、Stockholm、Sweden

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、DNA ブラシ界面の柔軟性に基づくコロイド粒子の分散制御、第 61 回高分子討論会、2012 年 9 月 19 日、名古屋工業大学

Naoki Kanayama、Masahiro Fujita、Tohru Takarada、Mizuo Maeda、Double-stranded DNA-carrying gold nanoparticles with single-base mismatch site for colorimetric detection of mercury(II) ion、The 6th International Conference on Gold Science Technology and its Applications (Gold 2012)、2012 年 9 月 6 日、京王プラザホテル

金山直樹、藤田雅弘、宝田徹、前田瑞夫、末端ミスマッチ構造により分散安定化した DNA 二重鎖担持金ナノ粒子の金属イオン選択的凝集応答、第 22 回バイオ・高分子研究会、2012 年 6 月 26 日、東京大学先端科学技術研究センター

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、チミン・チミンミスマッチ末端を有する DNA 二重鎖担持金ナノ粒子の水銀イオン選択的凝集現象、第 61 回高分子学会年次大会、2012 年 5 月 31 日、パシフィコ横浜

金山直樹、宝田徹、藤田雅弘、前田瑞夫、ミスマッチ構造により分散安定化した DNA 二重鎖担持金ナノ粒子の重金属イオン選択的凝集応答、第 61 回高分子学会年次大会、2012 年 5 月 30 日、パシフィ

コ横浜

Naoki Kanayama, Masahiro Fujita, Tohru Takarada, Mizuo Maeda, Mercury (II) ion-specific non-cross linking aggregation behavior of double-stranded DNA-carrying gold nanoparticles with a thymine-thymine mismatch, International Association of Colloid and Interface Scientists 2012 (IACIS 2012)、2012年5月16日、仙台国際センター

〔図書〕(計 2 件)

金山直樹、前田瑞夫、エヌ・ティー・エス出版、先端バイオマテリアルハンドブック(分担執筆)、2012年

金山直樹、前田瑞夫、化学同人、CSJ Current Review 09 金属および半導体ナノ粒子の科学(分担執筆)、2012年

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・研究員

研究者番号：80377811