

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06576

研究課題名(和文) DNAの分子認識能を活用した新規分子認識ゲート膜の創製

研究課題名(英文) DNA-conjugated stimuli-responsive material for fabrication of molecular recognition gating membrane

研究代表者

田巻 孝敬 (TAMAKI, Takanori)

東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授

研究者番号：80567438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核酸の分子認識に伴うナノスケールの構造変化をマクロスケールへと変換する分子認識材料として、DNAと感温性ポリマー(pNIPAM)を複合化したDNA-pNIPAMについて研究を行い、標的分子認識に伴いDNAが標的分子を捕捉する標的分子捕捉モードを用いてDNA-pNIPAMの分散・凝集状態を制御した。標的分子捕捉前の初期状態での検討から、二本鎖(ds)DNAの余剰配列部の末端構造の有無により、分散・凝集挙動を制御できることが示された。続いて、標的分子であるトロンビンを追加した実験の結果、標的分子捕捉モードを用いたdsDNA-pNIPAMの分子認識が可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：DNA-conjugated stimuli-responsive materials coordinate the molecular recognition properties of DNA and actuator properties of thermoresponsive polymer, poly(N-isopropylacrylamide) (pNIPAM). In some specific conditions, DNA-pNIPAM changes its dispersion state in response to whether conjugated DNA is single-stranded (ss) or double-stranded (ds). Under the condition where entropic repulsion controls the aggregation behavior of the conjugate, the aggregation was controlled by whether the dangling end of dsDNA had a specific structure (e.g. G-quadruplex) or not. Then, this property was combined with the molecular recognition of a DNA aptamer. The target protein, thrombin, bound to DNA-pNIPAM, and this binding changed the aggregation behavior of the conjugate.

研究分野：化学工学

キーワード：分子認識材料 DNA 核酸 アプタマー 感温性ポリマー バイオセンサー G4重鎖

### 1. 研究開始当初の背景

DNA や RNA(核酸)は遺伝情報を保存・複製するだけでなく、生体内のリボスイッチに代表されるように、標的分子を特異的に認識し、生理活性を調整している。核酸の分子認識能を人工的に活用する試みは、抗体様の分子認識能を有する核酸オリゴマー(核酸アプタマー)の発見により注目を集め、創薬分野ではアプタマー医薬品として実用化例も報告されている。しかし、機能材料への応用については報告例が限られており、現状では核酸の分子認識に伴うナノスケールの構造変化をマクロスケールの変化へ効率良く変換・増幅するシステムは存在せず、応用用途が制限されてきた。

本研究グループでは、DNA の分子認識能を活用し、感温性ポリマー poly(*N*-isopropylacrylamide) (pNIPAM) のアクチュエータ機能と協調させた分子認識材料を開発するために、DNA を側鎖へ化学的に結合した共重合ポリマー-DNA-pNIPAM について研究を行ってきた(図 1)。

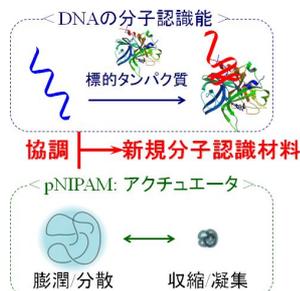


図 1. DNA と感温性ポリマー-pNIPAM の複合化による分子認識材料開発の概念図

これまでの研究により、標的分子の認識に伴う DNA 二本鎖の解離をトリガーとして、DNA-pNIPAM が分散状態から凝集状態へと移行すること(二本鎖解離モード)を示している。また、二本鎖解離モードを示す共重合ポリマーを多孔基材へ固定した分子認識ゲート膜を開発し、標的分子の認識に伴い、膜が閉塞状態から解放状態へと遷移し、膜の透過性が増加することを示している。

### 2. 研究の目的

本研究では、核酸の分子認識に伴うナノスケールの構造変化をマクロスケールへと変換する分子認識材料として、DNA と感温性ポリマー-pNIPAM を複合化した DNA-pNIPAM について研究を行う。図 2 に示すように、これまでに検討してきた標的分子の認識に伴う二本鎖解離を利用した二本鎖解離モードに加えて、DNA アプタマーの標的分子認識に伴い標的分子を捕捉する標的分子捕捉モードについての検討を行い、分子認識ゲート膜へ展開した際に、標的分子の認識に伴い膜が開放状態から閉塞状態へと遷移するように凝集・分散挙動の制御を行う。

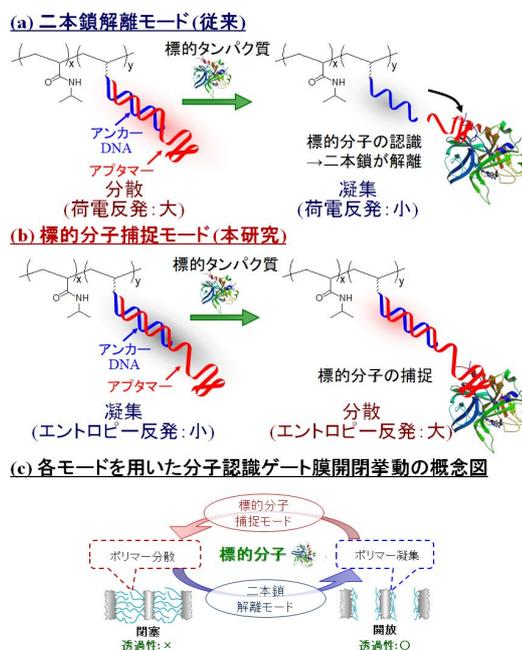


図 2. DNA-pNIPAM の(a) 二本鎖解離モード(従来)、(b) 標的分子捕捉モード(本研究)、(c) 各モードを分子認識ゲート膜へ展開した際の開閉挙動の概念図

### 3. 研究の方法

DNA-pNIPAM の合成は以下のように行った。はじめに NIPAM と *N*-[2-(2-pyridyl disulfide) ethyl]acrylamide (PDSAm) の共重合を行い、得られた poly(NIPAM-co-PDSAm)へチオール末端を有する DNA(アンカー-DNA)を反応させることで、一本鎖(ss)DNA-pNIPAM を合成した。続いて、標的分子を捕捉する分子認識アプタマーとの相補鎖形成により、二本鎖(ds)DNA-pNIPAM とした。

本研究で対象とする標的分子捕捉モードでは、初期状態は DNA-pNIPAM が凝集状態を取り、標的分子の認識に伴い分散状態へと移行するため、はじめに初期状態で DNA-pNIPAM が凝集状態を取る条件の検討を行った。続いて、標的分子を添加し、分子認識性を評価した。DNA-pNIPAM の凝集・分散挙動はポリマー溶液の濁度測定により評価し、UV-vis を用いて測定した 600 nm における吸光度を濁度とした。

### 4. 研究成果

本研究で対象とする標的分子捕捉モードにおける初期状態の検討として、はじめに dsDNA-pNIPAM が凝集状態を取る条件について検討を行った。

本研究グループでは、これまでにポリマー中の DNA 固定率とイオン濃度に応じたポジショニングマップ(図 3)を報告している。DNA-pNIPAM は、DNA 固定率および塩濃度が低い場合は、ssDNA-pNIPAM がより凝集する荷電反発支配の挙動を示す。一方で、DNA 固定率および塩濃度が高い場合は、構造が剛直な完全相補鎖の dsDNA-pNIPAM が

より凝集するエントロピー反発支配の挙動を示す。

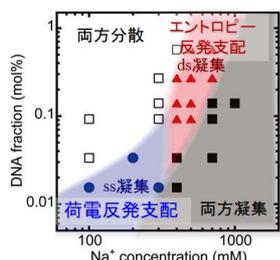


図 3. DNA-pNIPAM の凝集-分散挙動のポジショニングマップ (Sugawara Y., Chem. Lett., 42, 1568, 2013)

標的分子捕捉モードはエントロピー反発支配の領域を用いることで発現するものと考えられる。エントロピー反発は、相補鎖末端構造が重要であり、完全相補鎖で凝集する条件でも、余剰な一本鎖配列が存在すると分散状態となることが、理研の前田グループにより明らかにされている。本研究で用いるトロンビン認識アプタマーは末端に G 四重鎖構造を取ることから、余剰な一本鎖部位が構造形成する場合(GQ)と、構造形成をしない場合(NT)で分散・凝集する条件を探索した(図 4)。

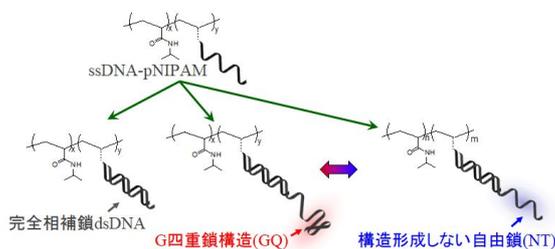


図 4. 相補鎖末端の構造による dsDNA-pNIPAM の分散・凝集挙動の制御

外部溶液中のイオン濃度を変化させ、相補鎖形成割合が分散・凝集挙動へ与える影響を評価した。なお、相補鎖形成割合は添加する相補鎖に対するアンカーDNA の割合を表している。また、この評価は簡易的なスクリーニングとして、高速昇温プロファイル 1 °C/min で実施した。特定のイオン濃度条件において、図 5 に示すように末端に G 四重鎖構造を取る GQ の方が、構造形成をしない NT より凝集することが示された。また、相補鎖形成割合が高くなり、構造形成をしない dsDNA-pNIPAM が完全に分散状態を保つ条件においても、G 四重鎖構造を取る dsDNA-pNIPAM は凝集することが示された。

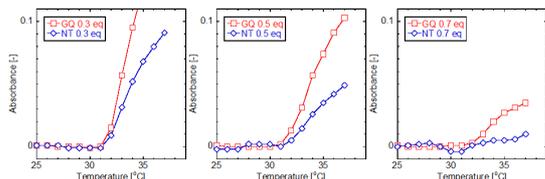


図 5. 相補鎖形成割合および末端構造形成が dsDNA-pNIPAM の分散・凝集挙動へ与える影響の評価(高速昇温プロファイル)

続いて、アンカーDNA に対して 1:1 となるように各種相補鎖を加え、0.5 °C の昇温ごとに 10 min 保持(各温度で吸光度が安定化するまで保持)する昇温プロファイルで測定を行った結果を図 6 に示す。図 6 には、末端に G 四重鎖構造を取る GQ および構造形成をしない NT の結果に加えて、アンカーDNA のみが pNIPAM に結合した ssDNA-pNIPAM、アンカーDNA と完全相補鎖を形成する WM-dsDNA-pNIPAM の結果を合わせて示す。GQ および NT は 34 塩基であるのに対して、WM はアンカーDNA と同じ 12 塩基の配列である。

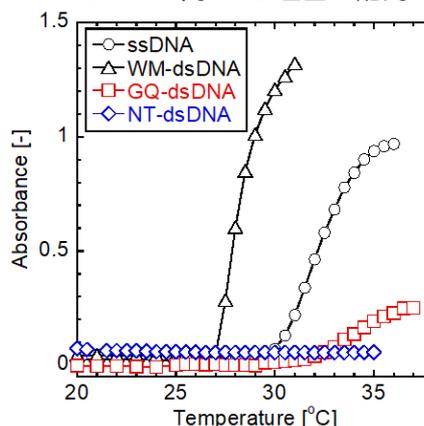


図 6. 相補鎖が dsDNA-pNIPAM の分散・凝集挙動へ与える影響の評価

構造が剛直な WM-dsDNA は、エントロピー反発が大きい ssDNA に比べて相転移温度が低温シフトして、より凝集しており、本条件がエントロピー反発支配の領域であることを示している。GQ および NT は WM や ssDNA に比べて塩基配列が長く、二本鎖を形成していない一本鎖部位が存在しており、エントロピー反発を示すことから、相転移温度が高温側にシフトし、ssDNA より分散しやすい状態であった。GQ と NT の凝集・分散挙動を比較すると、末端で構造形成をしない NT は分散状態を維持しているのに対して、G 四重鎖構造を取る GQ は凝集挙動を示し、末端構造の有無により分散・凝集挙動を制御できることが示された。また、以上の検討により、標的分子捕捉モードにおいて、初期状態となる GQ-dsDNA-pNIPAM が凝集状態を取る条件が明らかとなった。

そこで、標的分子捕捉モードにおいて、分子認識が分散・凝集挙動へ与える影響を評価した。予備的な実験として、pNIPAM 結合前の dsDNA へ標的分子を添加した際の dsDNA の解離度を測定した。各鎖末端を蛍光剤および消光剤でそれぞれ修飾した dsDNA は、相補鎖形成時には蛍光を発しないが、相補鎖が解離し、ssDNA となると蛍光剤と消光剤の距離が離れるため、蛍光が測定される。アンカーDNA と相補鎖形成する塩基配列の長さ、およびトロンビン認識部位と相補鎖形成の重複部を変化させて測定を行ったところ、塩基配列が 12 塩基で、かつトロンビン認識部位と相補鎖形成部位が重複しない場合は標的

分子を加えても二本鎖解離が起きず、標的分子を捕捉した状態を取ることが明らかとなった。標的分子を捕捉する配列のアンカーDNAをpNIPAMへ結合して、分散・凝集挙動へ与える影響を評価した。本測定では、はじめに標的分子を添加していない条件で濁度測定を行い、同じポリマー溶液へ標的分子であるたんぱく質トロンピンを添加し、同様に濁度測定を行った。したがって、ポリマー溶液濃度が標的分子の添加前後で異なるため、比較測定として標的分子を認識せず凝集挙動を示すssDNA-pNIPAM、WM-dsDNA-pNIPAMへ、トロンピンを添加した実験、およびBlank測定としてssDNA-pNIPAM溶液へトロンピンを含まず同量の水のみを添加した実験を行った。結果を図7へ示す。

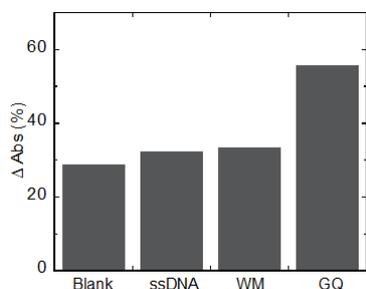


図7. GQ-dsDNA-pNIPAMの標的分子認識性の評価

比較実験であるssDNA-pNIPAMおよびWM-dsDNA-pNIPAMへ、トロンピンを添加した実験では、トロンピン添加前後の濁度の減少率 $\Delta Abs(\%)$ がBlank測定と同程度であった。これは、トロンピン認識配列を含まない系では、分子認識が起きないために、標的分子を添加しても分散・凝集挙動に影響がないことを示している。一方で、標的分子であるトロンピンを認識する配列を有するGQ-dsDNA-pNIPAMでは、 $\Delta Abs(\%)$ が比較実験やBlank測定結果よりも大きく、分子認識によりdsDNA-pNIPAMの分散・凝集挙動が変化した。すなわち、標的分子捕捉モードを用いたdsDNA-pNIPAMの分子認識が可能であることが示された。

本研究ではDNAと感温性ポリマーpNIPAMを複合化したDNA-pNIPAMについて、DNAアプタマーの標的分子認識に伴い標的分子を捕捉する標的分子捕捉モードについての研究を行った。はじめに、標的分子捕捉前の初期状態について検討を行った。エントロピー反発がDNA-pNIPAMの分散・凝集挙動を支配している条件において、dsDNAの余剰配列部の末端構造の有無により、分散・凝集挙動が制御され、G四重鎖構造を取る場合は、構造形成をしない場合と比較して、より凝集することが示された。続いて、標的分子の分子認識性の評価を行った。標的分子であるトロンピンの認識配列を有するdsDNA-pNIPAMでは、初期状態と比較して、

トロンピン添加により濁度が減少したことから、標的分子捕捉モードを用いたdsDNA-pNIPAMの分子認識が可能であることが示された。本研究で得られた知見をゲート膜へ展開した際には標的分子の認識に伴い膜が開放状態から閉塞状態へと遷移することとなり、従来の二本鎖解離モードとは逆の開閉挙動となる。ゲート膜ではポリマーの体積変化が膜の透過性へと変換されることから、核酸によるナノレベルの分子認識情報をさらにマクロな情報へと変換・増幅することとなり、幅広い用途への応用が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 8 件)

田巻孝敬、生体分子を用いた材料機能システム設計、化学工学会群馬大会 2015、2015年11月27日、桐生市民文化会館(群馬)

西ヶ谷龍太郎、田巻孝敬、王宇楠、横井俊之、山口猛央、高出力密度バイオ燃料電池の開発に向けたメソポーラスカーボンへの酵素吸着特性評価、化学工学会第48回秋季大会、2016年9月7日、徳島大学 常三島キャンパス(徳島)

Ryutaro Nishigaya, Takanori Tamaki, Yunan Wang, Toshiyuki Yokoi, Takeo Yamaguchi, Evaluation of enzyme adsorbed on mesoporous carbon for high-power-density biofuel cells, 12th Japan-Korea Symposium on Materials & Interfaces, 2016年11月3日, Gotemba Kogen Resort in Shizuoka, Japan

田巻孝敬、カーボン微粒子へのグラフト重合を用いた高出力密度バイオ燃料電池の開発、第8回マイクロカプセル研究会講演会(東京大会)、2017年1月18日、東京工業大学田町キャンパス(東京)

西ヶ谷龍太郎、田巻孝敬、王宇楠、横井俊之、山口猛央、バイオ燃料電池の高出力化へ向けたカーボン材料への酵素吸着特性評価、化学工学会第82年会、2017年3月6日、芝浦工業大学 豊洲キャンパス(東京)

田巻孝敬、生体材料を用いた材料システム設計、化学工学会第49回秋季大会、2017年9月20日、名古屋大学 東山キャンパス(愛知)

Takanori Tamaki, Systematic Material Design of Enzymatic Biofuel Cells, MIRAI Seminar 2017, 2017年10月18日, Ideon Science Park, Lund, Sweden

Takanori Tamaki, Systematic Material Design for Enzymatic Biofuel Cells, 2017 AIChE Annual Meeting, 2017 年 11 月 2 日, Minneapolis Convention Center, Minneapolis, MN, USA

〔図書〕(計 1 件)

Takanori Tamaki, Chap 17: Nano- structured materials for enzymatic biofuel cells, in Biocatalysis and Nanotechnology (Ed. Peter Grunwald), Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., Singapore, 2017, pp595-616

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.res.titech.ac.jp/~zairyosys/yamaguchi lab/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

田巻 孝敬 (TAMAKI, Takanori )  
東京工業大学・科学技術創成研究院・准教授  
研究者番号：8 0 5 6 7 4 3 8

(2)研究分担者 および (3)連携研究者  
該当なし

(4)研究協力者

小柳 房江 (KOYANAGI, Fusae )