

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19710104

研究課題名 (和文)

超分子ヘリカルナノファイバーによる一塩基多型解析システムへの応用

研究課題名 (英文) Application of supramolecular helical nanofibers for single nucleotide polymorphism analysis

研究代表者

岩浦 里愛 (IWAURA RIKA)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 主任研究員

研究者番号：00450312

研究成果の概要：本研究課題では、オリゴ DNA との核酸塩基対形成により自己集合体を形成し、ナノファイバーとなる双頭型ヌクレオチド脂質を用いて、顕微鏡観察下で標的オリゴ DNA を検出する新規 DNA 検出手法の開発および SNPs 解析応用への可能性を検討した。双頭型チミジル酸脂質とオリゴアデニル酸 (10、20、30、40 量体) の二成分系自己集合体についてそれぞれ AFM 観察および CD スペクトル測定したところ、すべて右巻きのヘリカルナノファイバーとなっていることがわかった。さらにヘリカルナノファイバーのセクションプロファイルから、らせんピッチに相当する周期的な凹凸構造が観察でき、そのピッチ長は鋳型オリゴアデニル酸の長さ強く依存することを見いだした。さらに、双頭型チミジル酸脂質と sticky end 部位をもつ鋳型 DNA、sticky end と相補的な DNA による多成分系自己集合を試みた。その結果、ナノファイバーは sticky end と相補的な DNA が存在するときのみ形成され、塩基配列選択的なナノファイバー形成が可能となった。

以上のように、双頭型ヌクレオチド脂質と DNA との多成分系自己集合がナノファイバーを与え、さらに鋳型 DNA の長さや塩基配列を変化させることで、ナノファイバー構造を制御できることがあきらかとなり、SNPs 解析応用への可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,400,000 | 0 | 2,400,000 |
| 2008年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 270,000 | 3,570,000 |

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：ナノ材料、ナノバイオ、分子認識、自己集合

1. 研究開始当初の背景

SNPs(Single nucleotide polymorphism)解析は、病気治療や農作物の突然変異など、医療、農業などの分野だけでなく食品分野でも食料の生産向上や産地の特定、遺伝子組み換え食

品の検出など非常に重要な研究課題である。これまでに、DNA マイクロアレイや DNA 担持微粒子、MALDI-TOF MSなどで SNP 解析を行う試みが数種類報告されている。一方、両親媒性化合物が形成するミセルやベシク

ルといった球状集合体は、従来から化粧品や薬剤など多方面で用いられてきた。しかし、ナノファイバーをはじめとする一次元的なナノ構造を用いた応用例は、ほとんど報告されていなかった。我々はこれまで、双頭型ヌクレオチド脂質と DNA の二成分系自己集合体が、超分子ヘリカルナノファイバーとなることを報告してきた。本課題では、DNA との分子認識によってピッチや長さが構造制御された超分子ヘリカルナノファイバーの形成メカニズムと構造を明らかにし、このナノファイバーを用いた一塩基多型 (SNPs) 分析システムの開発を試みた。

2. 研究の目的

我々は、双頭型ヌクレオチド脂質とオリゴ DNA が二成分系自己集合体を形成することで、鋳型オリゴ DNA の塩基配列の違い、長さの違いが、ヘリカルナノファイバーのピッチや長さの違いとして表現され AFM で識別することが可能となるものと考えた(図1右)。一方、光リソグラフィやエッチング、インクジェット技術などのトップダウン手法により製造される DNA マイクロアレイは、有力な遺伝子解析の手段として確立されつつある。このデバイスは、ガラスやシリコン基板上に種々の遺伝子 DNA を高密度にスポットしたデバイスであり、DNA プロブの種類と基板上的位置が対応しているため(図1左)、シグナルをスキャナで読みとり解析することができる。我々は、二成分系集合体から得られるヘリカルナノファイバーを DNA マイクロアレイのスポットに相当するものとみなし、このファイバーの形状情報や蛍光シグナルを AFM や SNOM (走査型近接場顕微鏡) で読みとることができれば、DNA マイクロアレイのように遺伝子解析が可能であると考えた。そこで本研究では、超分子ヘリカルナノファイバーの構造制御と、それを用いたボトムアップ型核酸検出デバイスの開発を目的とした。



図 1. 超分子ヘリカルナノファイバーを用いた SNPs 解析デバイスの概念図

3. 研究の方法

(1) 二成分自己集合体の形成メカニズムおよび構造の解明

長鎖オリゴメチレン鎖の両末端にチミジル酸を連結した化合物 **1** を合成した (図 2)。この化合物 **1** と、アデニンのみが 10~40 個繋がったオリゴ DNA **dA₁₀–dA₄₀** (図 2) を水溶液中で混合し **1** の濃度を $1.8 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ とし、オリゴ DNA 中のアデニンが **1** のチミンと等モルとなるようサンプルを調製した。この水溶液を加熱して溶解した後、そのまま

室温で放置した (このサンプルを **1+dA₁₀** のように表す)。これを少量 ($< 1 \mu\text{L}$) 取り、高配向熱分解黒鉛 (HOPG) 基板上に載せ、原子間力顕微鏡 (AFM) により観察した。

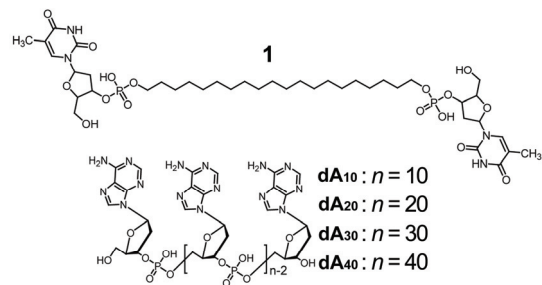


図 2 合成脂質分子 **1** とオリゴアデニル酸の分子構造

(2) 超分子ヘリカルナノファイバーを用いた標的核酸の検出

次に、超分子ヘリカルナノファイバーを用いた標的核酸検出を試みた。合成脂質 **1** を超音波照射および加熱 (90°C) により $0.1 \times \text{TE}$ バッファー (Tris-HCl 1 mmol/L , EDTA 0.1 mmol/L , pH 8.0) へ溶解した。この溶液に、**2, 3** (20 塩基のアデニン部位と標的核酸 **4** との相補鎖から成るオリゴヌクレオチド) を含む水溶液をそれぞれ加え、この混合液を三等分した。そのうちの二つには、標的核酸である **4**、または非相補鎖から成る **5** のオリゴヌクレオチドを加え室温で放置した (それぞれの系を **1/2/3/4** および **1/2/3/5** と表記する)。残りの一つはそのまま放置した (**1/2/3**)。それぞれの構造式、核酸塩基配列を図 3a に示す。得られた集合体を高配向熱分解黒鉛(HOPG)基板上に滴下し、大過剰の水で洗ったものを原子間力顕微鏡 (AFM) のサンプルとして用いた。また、 0.5°C/min で温度を上昇させながら 260 nm の吸光度変化を測定し、**1/2/3/4**、**1/2/3**、および **2/3/4** の $0.1 \times \text{TE}$ バッファー水溶液中での融解温度測定を行った。

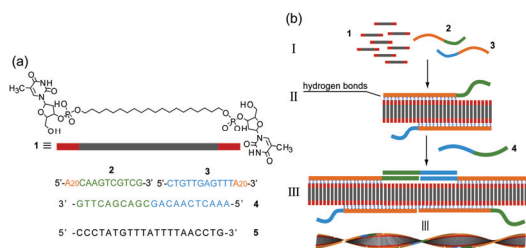


図 3 (a) 合成脂質 **1** と DNA **2, 3** および標的 DNA **4**、非標的 DNA **5** の塩基配列。(b) 標的 DNA によるナノファイバー形成機構。I **1, 2, 3** をバッファー中で混ぜる、II **1** のチミン部位と **2, 3** のアデニン部位が相補的核酸塩基対を形成して集合体の前駆体となる、III **2, 3** と標的 DNA **4** のハイブリダイゼーションによりナノファイバー構造が伸長する。

4. 研究成果

(1) 二成分自己集合体の形成メカニズムおよび構造の解明

1+dA₁₀ から生成したナノファイバーの縦断面の表面形状を測定した結果、表面に周期的な凹凸構造が観察され、その周期は 11 nm であった (図 4 a, b)。CD スペクトル測定の結果から、このファイバーは右巻きのらせん構造を形成していることが示唆され、AFM で得られた凹凸構造は、右巻きらせんのピッチに相当しているものと推察された。同様に、アデニンをそれぞれ 20、30、40 個もつオリゴ DNA**dA₂₀**、**dA₃₀**、**dA₄₀** についても、ナノファイバー構造を形成することがわかり、**1+dA₄₀** の場合ではらせん構造を明確に観察することができた (図 4 g)。また、断面形状を測定すると、**1+dA₁₀** の場合と同様に周期的な凹凸構造が観察でき、興味深いことに、そのピッチは **1+ dA₂₀** で 18 nm、**1+ dA₃₀** で 24 nm、**1+ dA₄₀** で 40 nm となり、**1** に加えるオリゴ DNA の長に応じて変化することがわかった (図 4 c-h)。これらのナノファイバーは、オリゴ DNA 中のアデニンと化合物 **1** 中のチミンがペアをつくりながら分子同士が集合し、形成されたものと推察している。また、加えるオリゴ DNA の長さによりヘリカルナノファイバーの形状が変化することから、本ナノファイバーが、本課題の目的である DNA 検出、SNPs 検出へ応用できる可能性が明らかとなった。

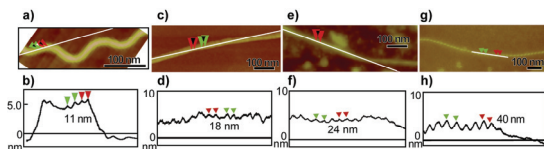


図 4 合成脂質分子 **1** と鎖長の異なるオリゴアデニル酸から得られたナノファイバーの AFM 像 (上段) と断面プロファイル (下段)。a, b); **1+dA₁₀**、c, d); **1+dA₂₀**、e, f); **1+dA₃₀**、g, f); **1+dA₄₀**。

(2) 超分子ヘリカルナノファイバーを用いた標的核酸の検出

AFM によりそれぞれの多成分系自己集合体を観察した結果、**1/2/3/4** の系では長さが 300 nm~3 μm、径が 7~8 nm、らせんのピッチ 52 nm のヘリカルナノファイバー構造が観察できた (図 5 a, b)。一方、**1/2/3/5** および **1/2/3** の多成分自己集合体はファイバー構造を形成せず、径が 15 nm 程度の球状構造を与えた (図 5 c, d)。この結果は、ヘリカルナノファイバー構造形成に標的 DNA である **4** の存在が必要であることを示している。

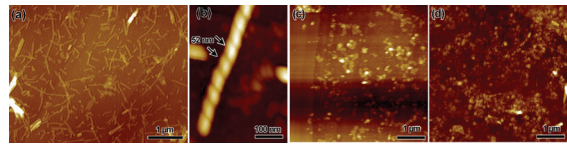


図 5 (a)、(b) **1/2/3/4** から形成したナノファイバー、(c) **1/2/3** および (d) **1/2/3/5** から生成した球状構造の原子間力顕微鏡像。

次に、**1/2/3/4**、**1/2/3**、**2/3/4** の 0.1 × TE バッファー水溶液を用いて 15 °C から 70 °C まで温度をゆっくりと変化させ、UV 融解温度測定を行った (図 6)。**1/2/3** および **2/3/4** の系で得られた融解曲線の一次微分から、それぞれの融解温度 T_m は 60 °C および 35 °C と求められた。一方、**1/2/3/4** の系で同様の測定を行った結果、融解曲線は二相性の形状を示し、一次微分から T_m は 37 °C および 57 °C と求められ **2/3/4**、および **1/2/3** の T_m に近い値を示した。

これらの結果から、**1/2/3/4** の多成分系自己集合体から形成されるヘリカルナノファイバー中では、まず **1** と **2**、**3** 間の相補的核酸塩基対形成により前駆体が生成し (図 3b I→II)、次に **2**、**3** と **4** 間の相補的核酸塩基対形成によりヘリカルナノファイバー構造の伸長が促進される (図 3b II→III) のものと推察された。

以上のように、双頭型ヌクレオチド脂質とオリゴ DNA から自己集合により形成する超分子ヘリカルナノファイバーは、オリゴ DNA の種類により形状が変化するため、顕微鏡による新しい核酸検出手法として提案できる。しかしながら、最終的な目標であった SNPs については、まだ検討段階であり結果が出ていないため、今後も継続して検討していく必要がある。

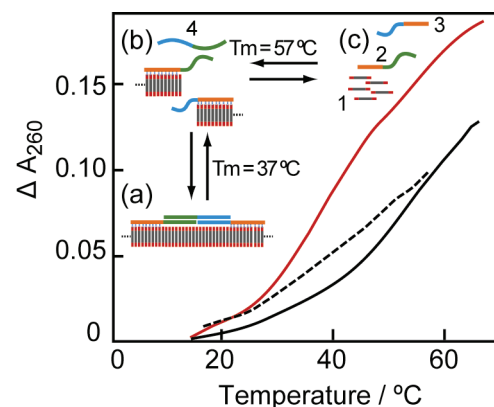


図 6 **1/2/3/4** (—)、**1/2/3** (---)、**2/3/4** (····) の UV 融解曲線。λ = 260 nm、TE バッファー (pH = 8.0) 中で測定。

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) Rika Iwaura, Mayumi Ohnishi-Kameyama, and Toshimi Shimizu

“Nanofiber Formation from Sequence-selective DNA-templated Self-assembly of a Thymidylic Acid-appended Bolaamphiphile” *Chem. Commun.*, **2008**, 5770-5772. （査読有）

(2) Rika Iwaura, Yoshihiro Kikkawa, Mayumi Ohnishi-Kameyama, and Toshimi Shimizu

“Effects of OligoDNA Template Length and Sequence on Binary Self-Assembly of a Nucleotide Bolaamphiphile” *Org. Biomol. Chem.*, **2007**, 5, 3450-3455. （査読有）

〔学会発表〕（計 7 件）

(1) Rika Iwaura, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Toshimi Shimizu 「Sequence-selective Quaternary Self-assembly of a Thymidylic Acid-appended Bolaamphiphile and DNA as Templates」 Hybrid Materials 2009, 2009 年 3 月 15 日、フランス

(2) 岩浦里愛 「DNA を鋳型とした超分子ナノファイバーの創製」第 3 回機能性分子シンポジウム、2008 年 10 月 25 日、つくば

(3) 岩浦里愛、亀山眞由美、清水敏美 「標的オリゴ DNA による超分子ヘリカルナノファイバー形成」第 57 回高分子討論会、2008 年 9 月 16 日、大阪

(4) 岩浦里愛、亀山眞由美、清水敏美 「標的 DNA による超分子ナノファイバー形成」第 54 回高分子夏季大学、2008 年 7 月 17 日、鹿児島

(5) Rika Iwaura, Yoshihiro Kikkawa, Mayumi Ohnishi-Kameyama, Toshimi Shimizu 「AFM observations of the binary self-assembly from nucleotide bolaamphiphile and oligonucleotide as templates」 Singapore International Chemistry Conference 5、2007 年 12 月 17 日、シンガポール

(6) 岩浦里愛 「ヌクレオチド脂質と DNA によるナノファイバーアーキテクトニクス」、第 7 回界面ナノアーキテクトニクスワークショップ ナノアーキテクトニクスとイノベーション創出、2007 年 12 月 13 日、つくば

(7) 岩浦里愛、吉川佳広、亀山眞由美、清水敏美、「DNA 鋳型を用いた双頭型チミジル酸脂質ヘリカルナノファイバーのピッチ制御」第 56 回高分子討論会、2007 年 9 月 20 日、名古屋

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：標的核酸の検出方法

発明者：岩浦里愛、亀山眞由美、清水敏美

権利者：（独）農研機構、（独）産総研

種類：特許権

番号：特願 2008-102096

出願年月日：2008 年 4 月 10 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://nfri.naro.affrc.go.jp/guidance/soshiki/bunseki/seibunkaiseki/iwaura-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩浦 里愛 (IWAURA RIKA)

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 主任研究員

研究者番号：00450312

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：