

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 8 月 30 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05177

研究課題名(和文) DNAと両親媒性脂質の超分子集合による導電性ナノファイバーの構築と機能制御

研究課題名(英文) Construction and functional control of conductive nanofibers formed from supramolecular assembly of DNA and amphiphilic molecules

研究代表者

岩浦 里愛 (IWAURA, Rika)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・食品研究部門・上級研究員

研究者番号：00450312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：イノシン酸部位を有する新規ヌクレオチド脂質dl(20)を合成し、サケ白子由来DNAの二成分自己集合を行った結果、dl(20)-DNAの二成分自己集合からナノシート構造が得られた。このナノシートは、dl(20)のイノシン酸部位とサケ白子由来DNA中の核酸塩基が塩基対形成して形成されていることがわかった。吸収および蛍光スペクトル測定の結果から、これらの核酸塩基部位はCT状態を形成して安定化していることが示唆された。ナノシートを熟成すると直径6 nmのナノファイバーを形成し、その静電気力顕微鏡観察でコントラストの強い像が得られたことから、このナノファイバーは導電性を有すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAは核酸塩基が積み重なった - スタッキングにより、古くから導電性を持つことが予想されており、導電性ナノワイヤとしての利用が期待されている。しかし、実際はDNAを基板上へ配置すると構造がこわれ、導電性を発現させることが困難である。本研究では双頭型イノシン酸脂質とサケ白子由来DNAを複合体化し剛直なナノシート構造を形成させたところ、この複合体中で核酸塩基の電荷移動遷移状態が安定化された。さらにこの複合体を熟成すると直径6 nmのナノファイバーが生成し、このナノファイバーの静電気力顕微鏡観察より、ナノファイバーが導電性を持つことが示唆され、DNAによる導電性ナノワイヤ構築につながる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We synthesized a novel nucleotide bolaamphiphile dl(20) with an inosinic acid moiety and performed two-component self-assembly with salmon sperm DNA, resulting in a nanosheet structure. The nanosheet was found to be formed by base pairing between the inosinic acid moiety of dl(20) and nucleobases in salmon sperm DNA. Absorption and fluorescence spectroscopic measurements suggest that these nucleobase moieties form a CT state and are stabilized. Upon aging of the nanosheets, nanofibers with a diameter of 6 nm were formed, and electrostatic microscopy of the nanofibers showed a strong contrast image, suggesting that the nanofibers are conductive.

研究分野：超分子化学

キーワード：DNA 脂質 自己集合 ナノ構造 導電性

## 1. 研究開始当初の背景

DNA は、相補的核酸塩基対形成を駆動力とした自己集合による二重らせん形成や、モノマーであるヌクレオチドの配列が厳密に規定できる高分子であるという優れた特徴をもつため、低エネルギープロセスで、かつ構造が明確に定義されたナノ構造体を構築するためのビルディングブロックとして非常に魅力的な分子である。また、らせん軸方向に核酸塩基が積み重なった構造 ( $\pi$ - $\pi$ スタッキング) をもつため、 $\pi$ 軌道が重なることによって導電性を発現することが古くから予想されている (例えば、F. Belezney et al, *Phys. Lett.*, **1964**, *11* 234.)。このような DNA の優れた性質を利用すれば、ナノスケールで精密に構造が制御された DNA 導電性ナノワイヤを容易に製造することができ、電子デバイスなど電子・情報機器の大幅な機能向上などをもたらすブレークスルー技術となり得る。このような期待から、これまで DNA の導電性に関する数多くの研究が行われてきた。しかし、未だに DNA による導電性ナノワイヤ製造技術は確立されていない。これは、DNA の構造がもろく、基板上ではつぶれるために、導電性が再現性良く発現しなかったり、長距離(数ナノメートル以上)の導電機能が発現しなかったりするためである (E. Scheer, *Nature Nanotech.*, **2014**, *9*, 960.)。実際、基板上に伸ばした状態での DNA の直径は、本来の直径 (約 2 nm) より極端に小さく ( $\sim 0.4$  nm、例えば H. Nakao et al, *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 7162.)、構造が大きく変化していることが報告されている。すなわち、二重らせん DNA そのものを電子回路や導電性ナノワイヤとして活用することは、根源的に難しいと言わざるを得ない。

一方、我々はこれまで、両親媒性分子である双頭型ヌクレオチド脂質 (図 1a) を開発し、この脂質と DNA を水中で混ぜると、DNA の二重らせん形成と同様に、双頭型ヌクレオチド脂質両末端の核酸塩基と DNA 中の核酸塩基が相補的核酸塩基対を形成し、さらには双頭型ヌクレオチド脂質の疎水鎖同士が集まって自発的に集合し、直径 5-6 nm、長さ数十マイクロン以上の一次元ヘリカルナノファイバーが生成することを見いだした (図 1b)。種々の測定から、このナノファイバー中では  $\pi$ - $\pi$ スタッキング相互作用により核酸塩基対がナノファイバーの長軸方向に積み重なり、さらにはオリゴメチレン鎖の疎水性相互作用と相補的核酸塩基対など多数の非共有結合によって構造が非常に安定化されていることが明らかとなった (図 2)。すなわち、双頭型ヌクレオチド脂質との複合体化により DNA の構造を安定化・強化し、基板上で二重らせん様の構造と核酸塩基の  $\pi$ - $\pi$ スタッキングを維持することができれば、それは導電性の DNA ナノワイヤとして働くのではないかと着想した。

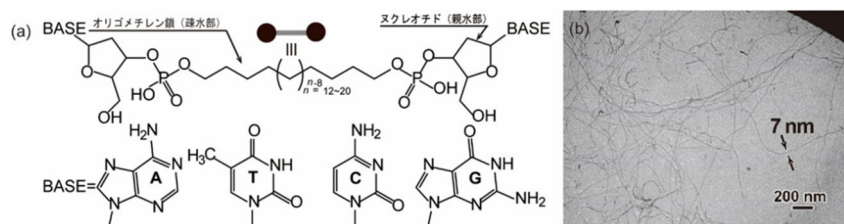


図 1 (a)双頭型ヌクレオチド脂質の構造式および(b)核酸塩基部位がTのものオリゴアデニル酸の二成分系自己集合により生成したナノファイバーの透過型電子顕微鏡写真。

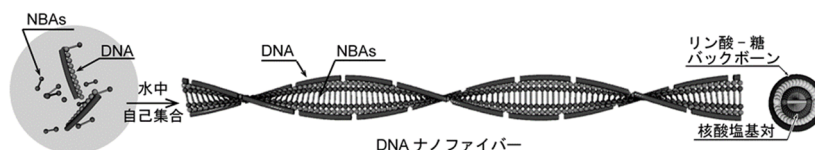


図2 双頭型ヌクレオチド脂質とオリゴDNAの二成分系自己集合により得られるナノファイバー構造の模式図。図右端はファイバーを長軸方向から見た構造。

## 2. 研究の目的

本研究では、双頭型ヌクレオチド脂質と複合体化し構造安定化および構造制御された DNA ナノファイバーを構築し、その電気的性質を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-(1)ユニバーサル塩基をもつ双頭型脂質の合成

本研究では、双頭型ヌクレオチド脂質の核酸塩基部位にユニバーサル塩基 (4種類の核酸塩基全てと塩基対を形成する) であるイノシン酸およびインドールを導入した新規イノシン酸脂質 dI(n) (nはアルキレン鎖の炭素数、n= 18, 19, 20) および 5-ニトロインドール脂質 NI(n) (n=18, 20) を合成した (図 3)。合成はそれぞれのホスホロアミダイト試薬と 1,  $\omega$ -アルキレンジオールをカップリングさせることにより行った。

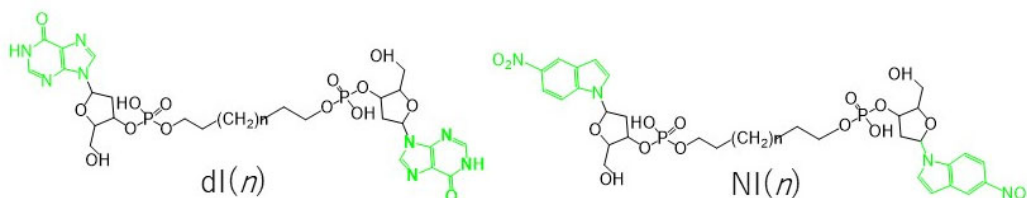


図3 ユニバーサル塩基をもつ双頭型核酸塩基脂質

### 3-(2)自己集合実験

自己集合体は、水中で双頭型ヌクレオチド脂質 (dI(n)または NI(n)) のみ、または双頭型ヌクレオチド脂質と DNA の混合水溶液を加熱溶解した後に、室温で放置して得た。DNA は、サケ白子由来 DNA (和光純薬製) を用いた。それぞれの双頭型ヌクレオチド脂質の濃度は  $3 \times 10^{-3}$  mol/L とし双頭型ヌクレオチド脂質の核酸塩基と DNA の核酸塩基が同濃度になるよう DNA を加えた。

### 3-(3)原子間力顕微鏡による構造および電気的性質の評価

自己集合体を含むサンプル水溶液をマイカまたは高配向性熱分解グラファイト上で乾燥させ、加除量の MilliQ 水で洗浄し、濾紙で水分を吸い取った後一晩乾燥させた。静電気力顕微鏡観察では、チップボルテージを 0、+3 および -3 V として像を得た。

### 3-(4)ゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は TBE バッファー中、3.3 V、50 分の泳動条件で行った。泳動終了後、ゲルをラップで包んだシリカゲル 60 254F アルミシート状に置き、254 nm の UV ランプを照射して (UV シャドウイング法) バンドを検出した。または、EtBr で染色した。

### 3-(5) UV/Vis および蛍光スペクトル測定

UV/Vis および蛍光スペクトルは、自己集合体を含む水溶液を 10 倍希釈し、測定前に 25 °C で 30 分静置したものを 0.1 cm 光路長の石英セルを用いて測定した。

## 4. 研究成果

### 4-(1)原子間力顕微鏡による構造観察

自己集合実験の結果、dI(20)の自己集合体を含む水溶液はやや粘性を示し白く濁った。また、dI(20)とサケ白子由来 DNA の二成分自己集合体 (dI(20)-DNA) を含む水溶液はわずかにオレンジに着色し、沈殿を生じた。一方、dI(18)、dI(19)、dI(18)-DNA、dI(19)-DNA、NI(18)、NI(19)、NI(18)-DNA、NI(19)-DNA は透明な水溶液であった。

dI(20)の自己集合体を AFM で観察したところ、厚さ 3.5 nm のナノシートが層状に積層している構造を示した。dI(20)分子の分子長はオリゴメチレン鎖が伸びきった状態で約 3.5 nm であるため、観察されたナノシート構造は dI(20)分子が伸びきった単分子膜を形成したものと考えられた。dI(20)-DNA の二成分自己集合体は、厚さ 6 nm で 5  $\mu$ m 四方に広がるナノシート構造を形成し、dI(20)単一成分の自己集合体より厚みが増していることがわかった。このことは、dI(20)分子と DNA が複合体を形成し、ナノシート構造となっていることを示唆する。

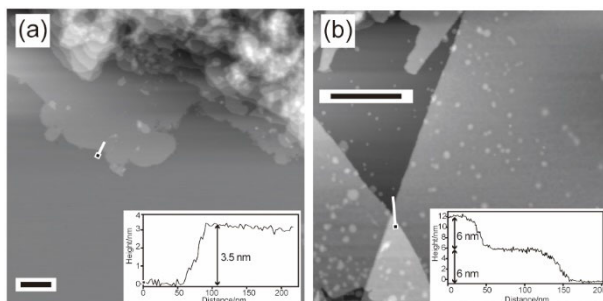


図4 (a) dI(20)自己集合体、(b)dI(20)-DNA 自己集合体、の原子間力顕微鏡像。挿入した図は各像の白ラインに沿った高さプロファイル。

### 4-(2)アガロースゲル電気泳動

dI(20)と DNA の複合体形成を検討するため、アガロースゲル電気泳動を行った (図5)。サケ白子由来 DNA のバンドは、DNA マーカーの 100 bp のバンド付近に観察された (レーン 1、4)。dI(20)の自己集合体を含む水溶液は、原点付近に暗いバンドが現れ (レーン 3)、EtBr で染色した場合、バンドは観察されなかった (レーン 6) ことから、EtBr は dI(20)に結合しないことが



わかった。dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含む水溶液のサンプルでは、UV シャドウイング法および EtBr 染色どちらの方法でもサケ白子由来 DNA に相当するバンドは観察されなかったことから、フリーのサケ白子由来 DNA は含まれないことが示唆された (レーン 2 および 5)。さらに、UV シャドウイング法で検出された dI(20)-DNA サンプルの原点のバンドの濃さは、dI(20)のバンドよりも暗かったため、imageJ (NIH) によるバンドの暗さを定量的に比較したところ、レーン 3 よりレーン 2 には約 1.7 倍の核酸塩基が存在するものと推定された。これらのことは、dI(20)-DNA の二成分自己集合体中で dI(20)とサケ白子由来 DNA が複合体形成していることを強く示唆する結果である。

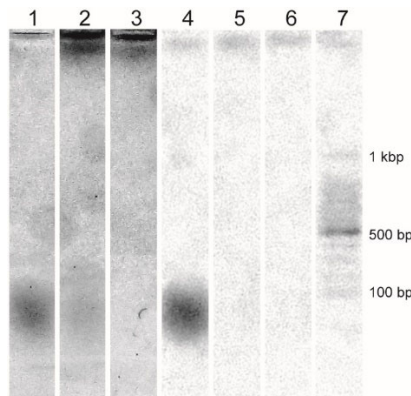


図 5 レーン 1-3: それぞれサケ白子由来 DNA、dI(20)-DNA 二成分自己集合体、dI(20)自己集合体のサンプルを UV シャドウイング法で検出。レーン 4-7: それぞれサケ白子由来 DNA、dI(20)-DNA 二成分自己集合体、dI(20)自己集合体、100-bp DNA ladder marker を EtBr で染色。1, 5 % アガロースゲル、3.3 Vcm<sup>-1</sup>。

#### 4-(3) UV/Vis および蛍光スペクトル測定

dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含む水溶液はオレンジ色を呈する一方、dI(20)、サケ白子由来 DNA それぞれを含む水溶液は無色透明であった。dI(20)、サケ白子由来 DNA を含む水溶液の吸収スペクトルは、それぞれ  $\lambda=260$  nm と 250 nm に吸収極大をもつ核酸塩基の  $\pi-\pi^*$ 遷移にもとづくバンドを示した。さらに、これらのバンドの吸収領域は、ヌクレオチドや DNA で一般的に見られるように約 300 nm であった。一方、dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含む水溶液では、 $\lambda=250$  nm を吸収極大として 500 nm 程度まで広がるブロードな吸収バンドが観察された。吸収バンドが長波長領域へ拡張したことから、dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含む水溶液がオレンジ色を呈することが説明できる。また、このことは dI(20)-DNA の二成分自己集合体中の核酸塩基部位が、dI(20)の自己集合体やサケ白子由来 DNA 中の核酸塩基部位より安定化されていることを示唆する。さらに、dI(20)-DNA の二成分自己集合体は  $\lambda=320$  nm を極大吸収とするショルダーバンドが生じたが、このバンドは dI(20)の自己集合体やサケ白子由来 DNA を含む水溶液のスペクトル中には観察できないものであった。この 500 nm まで拡張したショルダーバンドの強度は、25 °C から温度を上昇させていくと減少し、60 °C で消失した。この観察結果は、長波長領域の吸収バンドの温度依存性が、二成分自己集合体中の核酸塩基部位の会合/解離にもとづくものであることを示唆する。

dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含む水溶液の蛍光スペクトルは、dI(20)の自己集合体およびサケ白子由来 DNA を含む水溶液の蛍光スペクトルと異なる挙動を示した。dI(20)の自己集合体とサケ白子由来 DNA を含むサンプルでは、360 nm で励起するとそれぞれ 415 nm および 415、420 nm を極大とする弱い発光が得られるが、この発光は核酸塩基のエキシマー形成に帰属できる。一方、dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含むサンプルでは、415 および 450 nm を極大とする発光が観察でき、その強度は dI(20)やサケ白子由来 DNA の発光強度より強くなった。さらに、発光バンドは 600 nm 付近まで拡大した。吸収および発光バンドの長波長領域への拡大は、dI(20)-DNA の二成分自己集合体中で核酸塩基の基底状態および励起状態のどちらもが dI(20)およびサケ白子由来 DNA 単一成分の場合より安定化されていることを示唆する。

Banyasz ら (*JACS*, 2011, 133, 5163.) は、電荷移動 (CT) 状態を形成した一重 (dT20, dA20) および二重らせん (dT20-dA20) DNA が、特徴的な吸収および発光バンドをそれぞれ ~400 nm および 400~600 nm に示すことを報告している。dI(20)-DNA の二成分自己集合体を示す吸収および発光スペクトル測定の結果は Banyasz の報告した吸収および発光バンドの波長とよく一致していることに加え、吸収バンドのモル吸光係数は一重および二重らせん DNA のそれより 1~2 桁高い。したがって、DNAdI(20)-DNA の複合体中では一重および二重らせん DNA より CT 状態がより多く安定化されているものと考えられた。

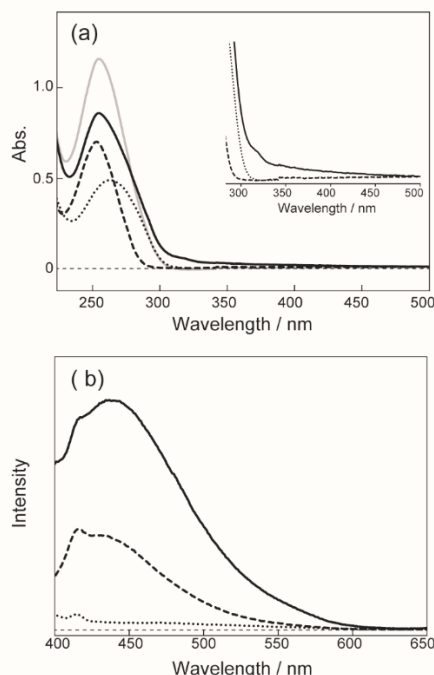


図 6 サケ白子由来 DNA (---)、dI(20)-DNA 二成分自己集合体 (—)、および dI(20)自己集合体 (···)、を含む水溶液の(a)UV/Vis スペクトルおよび(b)蛍光スペクトル (ex. =360 nm)。

#### 4-(4) 静電気力顕微鏡観察

dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含む水溶液を 3 か月熟成すると、ファイバー構造が形成されることがわかった (図 7(a))。このファイバーは高さ約 6 nm であることから、自己集合実験直後に得られたナノシートから構造変化したものと考えられる。このハイブリッドファイバーを静電気力顕微鏡で観察した。チップボルテージが 3 V、および -3 V で観察した場合、ファイバー部分のみが高いコントラストを与えた (図 7(b) および (d))。一方、チップボルテージが 0 V の場合、ファイバー部分にコントラストのついた像は得られなかった (図 7(c))。したがって、dI(20)-DNA の二成分集合体から得られるファイバーは、電気的に分極していることが示唆された。一方、DNA のみでは、チップボルテージの値にかかわらず、ほとんどコントラストのつかない像しか得られなかった。これらのことから、DNA と双頭型イノシン酸脂質を二成分自己集合によりハイブリッド化することで導電性を有する構造体になったものと考えられた。

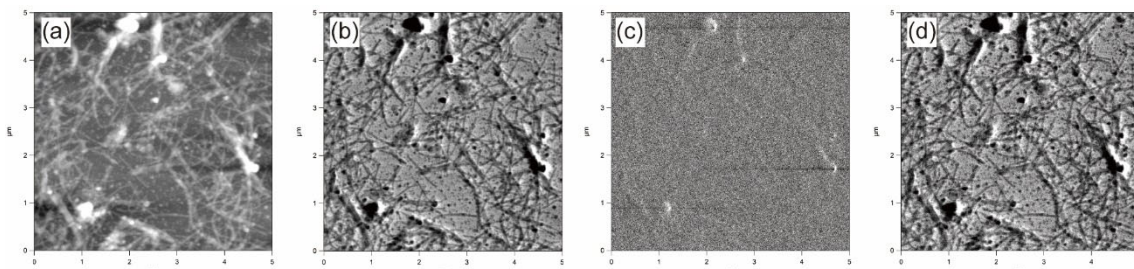


図 7 dI(20)-DNA 二成分自己集合体の原子間力顕微鏡観察による(a)形状像、および(a)と同じ視野の (b)チップボルテージ 3 V、(c)チップボルテージ 0 V、(d)チップボルテージ-3 V、における静電気力顕微鏡像。

以上の通り、ユニバーサル塩基であるイノシン酸および 5-ニトロインドール部位を有する新規ヌクレオチド脂質を合成し、これらのヌクレオチド脂質とサケ白子由来 DNA の二成分自己集合を行った結果、dI(20)-DNA の二成分自己集合からはナノシート構造が得られた。アガロースゲル電気泳動実験から、dI(20)-DNA の二成分自己集合体中では dI(20)のイノシン酸部位とサケ白子由来 DNA 中の核酸塩基が塩基対形成し、複合体化しているものと考えられた。さらに、dI(20)-DNA の二成分自己集合体を含む水溶液の吸収および蛍光スペクトル測定の結果から、これらの核酸塩基部位は CT 状態を形成して安定化していることが示唆された。dI(20)-DNA の二成分自己集合を熟成すると直径 6 nm のナノファイバーを形成し、その静電気力顕微鏡観察でコントラストの強い像が得られたことから、このナノファイバーは導電性を有する可能性があることがわかった。この導電性は、核酸塩基の安定した CT 状態にもとづくものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwaura Rika, Komba Shiro, Kajiki Takahito	4. 巻 17
2. 論文標題 Supramolecular fibrous gels with helical pitch tunable by polarity of alcohol solvents	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Soft Matter	6. 最初と最後の頁 1773 ~ 1778
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0SM02136A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T. Kajiki, S. Komba, R. Iwaura	4. 巻 85
2. 論文標題 Supramolecular Organogelation Directed by Weak Noncovalent Interactions in Palmitoylated 1,5-Anhydro-d-Glucitol Derivatives.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ChemPlusChem	6. 最初と最後の頁 701-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cplu.202000147	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 岩浦 里愛, 今場 司朗, 加治木隆仁
2. 発表標題 デンプン由来の1,5-アンヒドロ-D-グルシトール系糖脂質が形成するオルガノゲルとその特性
3. 学会等名 日本化学会第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩浦 里愛, 今場 司朗, 加治木隆仁
2. 発表標題 1,5-アンヒドロ-D-グルシトール系糖脂質の溶媒に依存したゲル化挙動
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩浦 里愛, 今場 司朗, 加治木隆仁
2. 発表標題 天然糖1,5-アンヒドロ-D-グルシトールから製造した低分子ゲル化剤のアルコール類のゲル化特性
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 R. Iwaura
2. 発表標題 Bluish-White Light Emission of a DNA-Based Supramolecular Nanosheet
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩浦 里愛
2. 発表標題 DNAとイノシン酸脂質の二成分系自己集合により発現する核酸の発光特性
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 R. Iwaura, S. Komba, T. Kajiki
2. 発表標題 Weak C-H...O=C Hydrogen Bond-Directed Self-Assembly of Supramolecular Fibers from a 1,5-Anhydro-D-Glucitol Derivative Having Palmitoyl Moieties
3. 学会等名 Okinawa Colloids 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------