

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22655059

研究課題名（和文） 環状DNAのプログラマブルナノメッキによるメタマテリアルの創製

研究課題名（英文） Fabrication of meta-material by programmable plating of DNA

研究代表者

居城 邦治 (IJIRO KUNIHARU)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：90221762

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、独自の環状構造を有するDNAを塩基選択的に金属化することで負の屈折率を持った物質であるメタマテリアルを自己組織化的に作製することである。これまでミリ波や赤外線を対象にしたメタマテリアルが作られてきたが、微細加工限界のため可視光に対して負の屈折率を持つ構造は作れなかった。本提案では酵素合成した環状二重らせんDNAを部分的に金属化することで、理論的に可視光に負の屈折率を持つと予測される **single split-ring resonators (SSRRs)** のサイズを制御して作製できる技術を確立することをめざし、**poly(dG)・poly(dC)** に結合したシスプラチンの還元によるプラチナナノワイヤーの作製手法を基本にして金属ナノギャップを作製した。これによりメタマテリアルを作製する要素技術を確立した。

研究成果の概要（英文）：

Top-down processes, such as photolithography, have been approaching a limit with regard to the fabrication of fine structures. For the preparation of molecular-scale fine structures, it is important that conventional self-assembly methods should be adapted to a “programmable self-assembly” as a next-generation bottom-up system. We aim to fabricate nano-gap electrodes by sequence-selective metallization of template DNA. We have already reported the fabrication of sequence-selective platinum nano-wires using poly(guanine) and poly(adenine-thymine) diblock DNA, which is enzymatically polymerized as a template. That method, however, cannot be extended to the preparation of oligoblock DNA. In this study, we prepared triblock DNA sequences using guanine as a platinum-binding natural nucleotide and 7-deaza-guanine as a platinum-nonbinding unnatural nucleotide for the construction of platinum nano-wires with nano-gap structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学、機能材料・デバイス

キーワード：DNA、自己組織化、メッキ、メタマテリアル、微細加工

1. 研究開始当初の背景

メタマテリアルとは、電磁波が材料中を伝播する際の挙動を記述するパラメータとして重要な誘電率 (ϵ) と透磁率 (μ) が共に負となる材料のことで、左手系材料とも呼ばれる。2000年に米カリフォルニア大学で電磁波の波長よりも微細な構成要素の繰り返し単位を周期的に並べた共振器型の材料が、マイクロ波の領域で負の誘電率・透磁率を持つことが発見され、俄然注目が集まっている。理研の河田・田中らはナノサイズの **single split-ring resonators (SSRRs)** が可視光に対して負の屈折率を与えることを理論的に示した (*Phys. Rev. Lett.* **95**, 237401, 2005)。しかしながら、従来の加工技術ではこのような構造を作ることは不可能であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、独自の環状構造を有するDNAを塩基選択的に金属化することで負の屈折率を持った物質であるメタマテリアルを自己組織的に作製することである。これまでミリ波や赤外線を対象にしたメタマテリアルが作られてきたが、微細加工限界のため可視光に対して負の屈折率を持つ構造は作れなかった。本提案では酵素合成した環状二重らせんDNAを部分的に金属化することで、理論的に可視光に負の屈折率を持つと予測される **single split-ring resonators (SSRRs)** のサイズを制御して作製できる技術を確認する (Fig. 1) とともに、ラングミュアー・プロジェクト法による三次元積層構造の構築をめざす。

3. 研究の方法

(1) Klenow Fragment exo- (KF^-) によるDNAの重合における非天然塩基の導入 (Fig. 2)

PCR チューブに template primer (dG10, dC10)、ヌクレオチド (dGTP と dCTP、または 7-deaza-dGTP と dCTP)、リン酸カリウム緩衝液 (pH7.4), $MgCl_2$, KF^- を加え、 $37^\circ C$ でインキュベートすることでDNAの伸長反応を行った。所定の時間反応した後、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) を添加することで反応を停止した。得られたDNAは、アガロースゲルを用いた電気泳動によって分離し、SYBR Green I による染色を行い、伸長反応について確認を行った。DNAの伸長反応効率については、TSK-GEL G-DNA-PW (TOSHO) を用いたサイズ排除クロマトグラフィーを行い、260 nm の吸光度の測定値より算出した。

(2) DNAの金属化と Langmuir-Blodgett (LB) 法を用いたDNAの伸長固定化

重合したDNA溶液 (10 mM Tris-HCl 緩衝液

pH 8.0) をシャーレに移し、そこに洗浄しておいたマイカ基板を沈めた。15分後、脂質 ($2C_{16}N^+2C_1Br^-$) のクロロホルム溶液 (3 mg / 5 ml) の液滴 ($5 \mu l$) を水溶液の表面に置くように静かに展開した。30分後、マイカ基板をゆっくり引き上げ (2 mm/min)、デシケーター内で乾燥させた後に Atomic Force Microscopy (AFM; NanoScope IIIa, Veeco; タッピングモード) で観察した。また、DNA溶液に cisplatin (DNA濃度に対し500当量) を加え15分静置した後、脂質溶液を展開し、その後10 mM DMABを下水相に添加し cisplatinの還元を行った。その後基板を引き上げ、乾燥させた後AFM観察を行った。

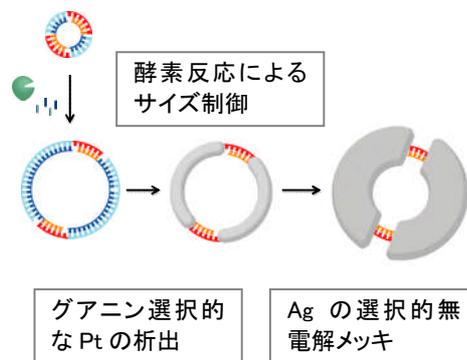


Fig. 1 Schematic illustration of the preparation of SSRR based on DNA

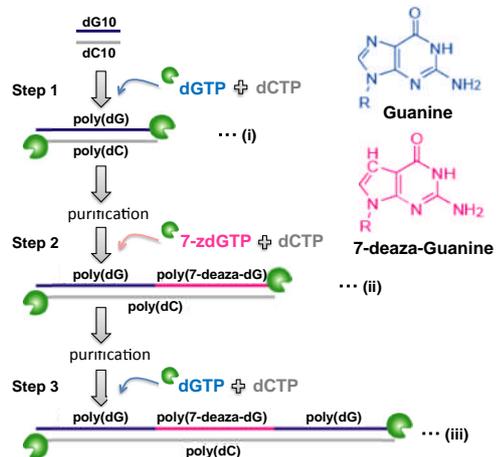


Fig. 2 Schematic illustration of the preparation of tri-block DNA

4. 研究成果

(1) 非天然塩基を含む poly(7-deaza-dG) / poly(dC) の重合
 KF^- による伸長反応を利用したオリゴブロック型DNAの調製の手順を Fig. 3 に示した。7-deaza-dG は、PCR法を用いた場合において

は代替塩基として天然ヌクレオチドと同様に用いることが可能であるが、KFによるSlippage extension reaction (SER)においても同様に適用可能であることの確認を行った。15, 30, 45, 60 分間反応を行った後、アガロースゲル電気泳動によって重合されたDNAの長さを観察した結果、天然ヌクレオチドを用いた poly(dG) / poly(dC) の KF による重合は、およそ 40 bp / min の速度で時間に比例することが確認できた。非天然ヌクレオチド 7-deaza-dG を用いて重合した DNA poly(7-deaza-dG) / poly(dC) は、SYBR-Green I ではほとんど染色されず、アガロースゲル電気泳動の結果からは反応についての評価は難しかった。そこで、High performance liquid chromatography (HPLC) を用いてサイズ排除クロマトグラフィーを行い、UV 吸収を観察することで重合反応の確認を行った。サイズ排除クロマトグラフィーによって重合反応を行った DNA 溶液を分析した結果、非天然ヌクレオチドを用いた poly(7-deaza-dG) / poly(dC) において、60 分間の反応によってモノマーの約 1/3 が重合反応に用いられ、高分子量の DNA が得られたことが確認された (Fig. 3(B) (i))。この結果は、天然ヌクレオチドを用いて DNA poly(dG) / poly(dC) の重合反応を行った結果と一致した (Fig. 3)。また、LB 法を用いて、重合した Poly(dG) / poly(dC) および Poly(7-deaza-dG) / poly(dC) をマイカ基板上に伸長固定化し、AFM による観察を行った。その結果、Poly(dG) / poly(dC) と同様に μm オーダーまで伸長した poly(7-deaza-dG) / poly(dC) 分子が観察された (Figure 2B)。HPLC および AFM 観察の結果より、非天然ヌクレオチド 7-deaza-dG を用いた場合においても天然ヌクレオチド dG と同じ速度で重合反応が進行していることが確認できた。

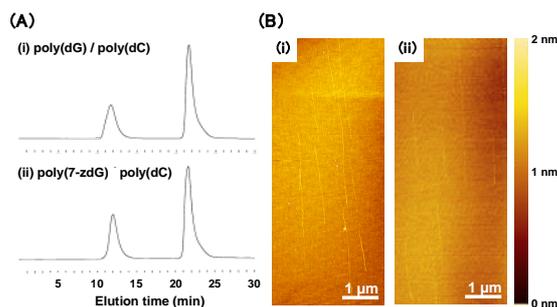


Fig. 3 Size exclusion chromatography of the polymerized DNA solution (A) and AFM images of stretched DNA molecules (B); (i) poly(dG) / poly(dC), (ii) poly(7-deaza-dG) / poly(dC)

(2) DNA の選択的金属化

得られた DNA に cisplatin を加え、DMAB により還元することで DNA の金属化を行なった。

LB 法により基板に伸長固定化し、AFM によって観察した。さらに、Fig. 2 の step 2 まで反応を行ったジブロック型 DNA に対しての金属化も行った。その結果、poly(dG) / poly(dC) では金属化により DNA の太さ (高さ) が大きくなっているのに対し、Poly(7-deaza-dG) / poly(dC) においては高さほとんど変わっていないことが確認された (Fig. 4)。これは、天然ヌクレオチドで構成されている DNA にのみ選択的に金属化が可能であることを示している。

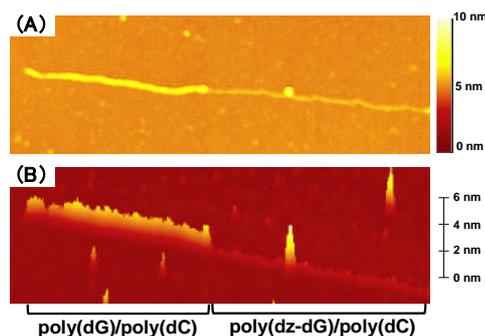


Fig. 4 AFM image (A) and height profile (B) of metallized diblock DNA

(3) poly(dG)-poly(7-deaza-dG)-poly(dG) トリブロック型 DNA の作製

これまでの結果から非天然ヌクレオチド 7-deaza-dGTP を用いた場合においても dGTP と同様に酵素 (KF) による伸長反応を行うことができ、また cisplatin を用いた金属化においては選択的であることが確認された。そこで、非天然ヌクレオチドを用いた、ナノギャップ構造を有する金属ナノワイヤーを作製するためのトリブロック型 DNA の作製を行った (Fig. 2)。まず、テンプレートである dG10, dC10 に酵素 (KF) および dGTP, dCTP を加え、金属ナノワイヤーを形成可能な天然塩基対のブロックポリマーの重合 (Step 1) を行った。重合した DNA poly(dG) / poly(dC) を Illustra GFX PCR purification Kit (GEヘルスケア) を用いて精製した後、7-deaza-dGTP + dCTP による非天然塩基対のブロックポリマーの重合 (Step 2)、さらに dGTP + dCTP による天然塩基対のブロックポリマーの重合 (Step 3) を行った。各 Step (1, 2, 3) の重合終了後のサンプルをアガロースゲル電気泳動により分析を行い、その重合反応の確認を行った (Fig. 5)。その結果、Step 2, Step 3 と Step 数を増やしていくに従って重合した DNA の分子量 (bp) が大きくなっていることが確認され、目的とする非天然ヌクレオチドのブロックを含んだトリブロック型 DNA 分子が重合できたことが確認された。また、これを 4. 2 の手法で塩基選択的に金

属化することで、目的のスプリット構造が得られることがわかった (Fig. 6)。

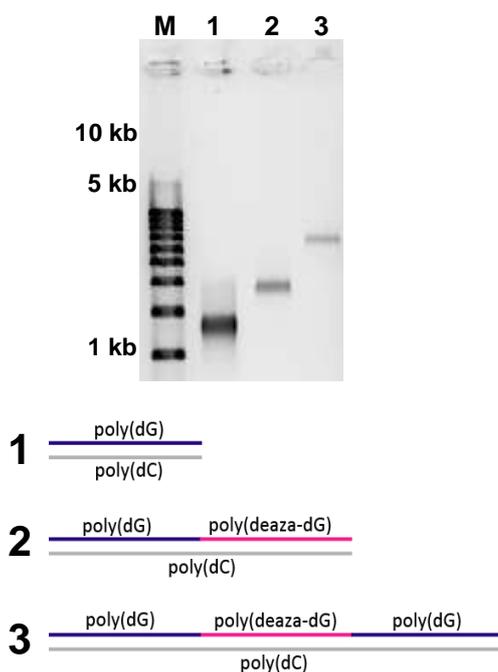


Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of the polymerized block DNA (lane M: Marker, lane 1: poly(dG) / poly(dC), lane 2: poly(dG)-poly(7-deaza-dG) / poly(dC), lane 3:

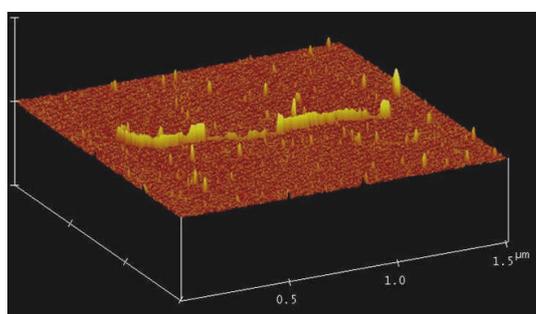


Fig. 6 AFM image of metallized triblock DNA

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 11 件)

- ① K. Nagakawa, K. Niikura, T. Suzuki, Y. Matsuo, M. Igarashi, H. Sawa, K. Ijro, Virus Capsid Coating of Gold Nanoparticles via Cysteine-Au Interactions and their Effective Cellular Uptakes, *Chem. Lett.*, 査読有, **41**(1), 2012, 113-115

DOI: 10.1246/cl.2012.113

- ② G. Wang, A. Ishikawa, A. Eguchi, Y. Suzuki, S. Tanaka, Y. Matsuo, K. Niikura, K. Ijro, Sequence-Specific Metallization of Single Divalent DNA-Nanoparticle Conjugates: A Potential Route to Single-Electron Devices, *ChemPlusChem*, 査読有, **77**(7), 2012, 592-597
DOI: 10.1002/cplu.201200096
- ③ H. Akita, T. Masuda, T. Nishio, K. Niikura, K. Ijro, and H. Harashima, Improving in Vivo Hepatic Transfection Activity by Controlling Intracellular Trafficking: The Function of GALA and Maltotriose, *Mol. Pharmaceutics*, 査読有, **8**(4), 2011, 1436-1442
DOI: 10.1021/mp200189s
- ④ K. Niikura, K. Nambara, T. Okajima, R. Kamitani, S. Aoki, Y. Matsuo, and K. Ijro, Artificial Polymeric Receptors on the Cell Surface Promote the Efficient Cellular Uptake of Quantum Dots, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 査読有, **9**, 2011, 5787-5792
DOI: 10.1039/C1OB05420A
- ⑤ G. Wang, T. Nishio, M. Sato, A. Ishikawa, K. Nambara, K. Nagakawa, Y. Matsuo, K. Niikura and K. Ijro, Inspiration from chemical photography: accelerated photoconversion of AgCl to functional silver nanoparticles mediated by DNA, *Chem. Comm.*, 査読有, **47**, 2011, 9426-9428
DOI: 10.1039/C1CC13385C
- ⑥ S. Sekiguchi, K. Niikura, N. Iyo, Y. Matsuo, A. Eguchi, T. Nakabayashi, N. Ohta, and K. Ijro, pH-Dependent Network Formation of Quantum Dots and Fluorescent Quenching by Au Nanoparticle Embedding, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 査読有, **3**(11), 2011, 4169-4173
DOI: 10.1021/am201013n
- ⑦ K. Sano, R. Kawamura, T. Tominaga, N. Oda, K. Ijro and Y. Osada, Self-Repairing Filamentous Actin Hydrogel with Hierarchical Structure, *Biomacromolecules*, 査読有, **12**(12), 2011, 4173-4177
DOI: 10.1021/bm2009922
- ⑧ K. Ijro, A. Tanaka, Y. Matsuo, Y. Hashimoto, K. Nagakawa, N. Ohtake, T. Suzuki, H. Sawa, K. Niikura, Self-assembled Hierarchic Structures of Metal-Molecule Hybrids for Sensing and Electronic Devices, *ICEP 2010*

Proceedings, 査読有, 2010, 179-184

- ⑨ Y. Hirai, H. Yabu, Y. Matsuo, K. Ijiro, M. Shimomura, Arrays of Triangular Shaped Pincushions for SERS Substrates Prepared by Using Self-Organization and Vapor Deposition, *Chemical Communications*, 査読有, **46**, 2010, 2298-2300
DOI: 10.1039/B923514K
- ⑩ K. Niikura, K. Nambara, T. Okajima, Y. Matsuo, K. Ijiro, Influence of Hydrophobic Structures on the Plasma Membrane Permeability of Lipid-like Molecules, *Langmuir*, 査読有, **26**(12), 2010, 9170-9175
DOI: 10.1021/la101039w
- ⑪ T. Nishio, K. Niikura, Y. Matsuo and K. Ijiro, Self-lubricating Nanoparticles: Self-Organization into 3D-Superlattices during a Fast Drying Process, *Chem. Commun.*, 査読有, **46**, 2010, 8977-8979
DOI: 10.1039/C0CC03538F

[学会発表] (計 20 件)

- ① K. Ijiro, G. Wang, H. Tanaka, L. Hong, Y. Matsuo, K. Niikura, M. Abe, K. Matsumoto, T. Ogawa “Room temperature coulomb blockade in a DNA-templated metal/polymeralternated hybrid nanowire”, 2012 Optics + Photonics, SPIE, San Diego Convention Center, San Diego, California, USA, 2012.8.12-16 (招待講演)
- ② K. Ijiro “Fabrication of functional nanowires by DNA-mediated self-assembly”, imec Handai International Symposium, ISIR, Osaka Univ., 2012.6.4-5 (招待講演)
- ③ K. Ijiro “DNA-conjugated silver nanoparticles for fluorescence and Raman scattering dual-modal imaging”, CIF’12, Chitose Institute of Science and Technology, Chitose, Hokkaido, 2011.10.13-14 (招待講演)
- ④ K. Ijiro, G. Wang, T. Nishio, K. Nambara, Y. Matsuo, K. Niikura, “DNA-assisted fabrication of luminescent and Raman active silver nanoparticles for dual-modal bioimaging”, SPIE Optics + Photonics 2011, San Diego Convention Center, San Diego, California, USA, 2011.8.21-25 (招待講演)
- ⑤ K. Ijiro, O. Haruta, K. Niikura, Y. Matsuo, “DNA-Templated Assembly of

Azobenzene at the Air-Water Interface”, PACIFICHEM 2010, HAWAII Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 2010.12.15-20 (招待講演)

[図書] (計 4 件)

- ① 居城邦治: シーエムシー出版、次世代バイオミメティクス研究の最前線-生物多様性に学ぶ-, 「DNA ミメティクス」、第 3 章 13 節、226-230、2011
- ② 新倉謙一、居城邦治、関口翔太: (財)金原一郎記念医学医療振興財団、生体の科学、「糖鎖修飾によるナノ粒子の核移行」、62(5)、496-497、2011
- ③ 居城邦治: シーエムシー出版、ソフトナノテクノロジーにおける材料開発、「DNA の金属化」、第 1 編第 2 章、151-156、2011
- ④ 松尾保孝、居城邦治: 丸善株式会社、現代界面コロイド科学の事典、「ナノワイヤー」、第 7 章第 4 節、166-167、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

居城 邦治 (IJIRO KUNIHARU)
北海道大学・電子科学研究所・教授
研究者番号: 90221762

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし