

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月23日現在

DNA ソフト界面の特性を活かしたバイオマテリアルの創製
Creation of Biomaterials Endowed with Unique Properties
of DNA Soft-Interfaces

課題番号：25220204

前田 瑞夫 (MAEDA MIZUO)

国立研究開発法人理化学研究所・前田バイオ工学研究室・主任研究員



研究の概要

研究代表者が見出した DNA ソフト界面が示す特異物性をバイオ材料の表面設計に応用する。特性の発現メカニズムを解明し、それに基づいて、線形ナノ構造体（1次元）、ゲル（3次元）、平面基板（2次元）という空間次元の異なる反応場を精密に設計する。従来には無い界面特性をもつ薬物運搬体や細胞培養基板、遺伝子診断用ナノ粒子の実現を目指す。

研究分野：複合領域、人間医工学、生体医工学・生体材料学

キーワード：核酸、細胞・組織、バイオ材料、ゲル、ソフト界面

1. 研究開始当初の背景

さまざまな生体物質と密接な相互作用をするバイオ材料（たとえば人工臓器）は、表面構造が機能発現の鍵となる。高度に構造を制御した合成高分子や、多彩で優れた機能をもつ生体分子などのソフトマターで形成した界面（ソフト界面）の高い有効性が認められつつあった。研究代表者が開発した、短い DNA 二重鎖が密生したソフト界面（DNA 界面）もその1つである。その特異な物性は、DNA 二重鎖をブラシ状に固定したナノ粒子の分散安定性が、分散媒（水）と DNA 層の境界に位置する末端塩基の対合に応じて極めて鋭敏に変化する、という予想外の現象として見出された。

2. 研究の目的

上記の界面特性の発現メカニズムを解明し、バイオ材料の表面設計に応用することを目指す。この特性が、(1)規則構造をもつナノ粒子集合体の内部で発現すること、(2)ハイドロゲルの内部や分子混雑環境で生じること、(3)核酸とタンパク質の間で生じること、線形集合体、ゲル、平面基板という空間次元の異なる反応場を使って明らかにし、合目的的に界面特性を付与したバイオ材料を作製する。さらに、(4)界面特性を利用したバイオ分析法の開発も試みる。

3. 研究の方法

(1)DNA ナノ粒子組織体の動的構造制御：繰り返し配列をもつ一本鎖 DNA の鋳型の上に DNA 担持金ナノ粒子を多数配置して糸ビ-

ズ状のナノ粒子集合体を作製する。イオン強度の増大によって隣接粒子同士を凝集させて全体構造を変換する。集合体は遺伝子運搬体やクロマチンモデルに応用する。

(2)刺激応答性を示す DNA 担持ハイドロゲルの開発：温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) と DNA のブロック共重合体のミセル形成過程とそのコロイド物性を調べる。ミセル内部に化学架橋または物理架橋を施してナノゲルを作製し、薬物運搬体などに応用する。

(3)DNA 界面の特性解析に基づく細胞培養基板の開発：DNA 界面の最表層の塩基が対合する場合はタンパクが塩基対部位に疎水性相互作用で吸着するが、対合しない場合は DNA 鎖末端のミクロブラウン運動によりタンパク吸着が抑制されることが期待できる。仮説を細胞接着関連タンパクで検証し、界面特性を活かした細胞培養基板へ展開する。

(4)DNA ナノ粒子を用いるバイオ分析法：DNA 担持金ナノ粒子は、表面 DNA を完全二重鎖にすると凝集するが、一塩基突出した粒子は安定に分散する。金ナノ粒子の凝集に伴う溶液の色変化を利用して、この現象を遺伝子一塩基多型 (SNP) の識別に応用する。

4. これまでの成果

(1)ナノ粒子組織体：鋳型 DNA に金ナノ粒子を3つ配置した糸ビーズ状集合体を作製した。粒子表面の DNA を二重鎖にすると粒子が接近して集合体が収縮するが、末端ミスマッチの場合は生じないことを実証した（発表論文1）。さらに、300個以上の粒子を配置した長

鎖集合体を構築した。表面 DNA が完全相補の場合は円盤状に収縮し、末端ミスマッチの場合は線状に伸展することを見出した。

短鎖の線形集合体との比較のため、DNA 担持金ナノロッドも研究対象に加えた。従来の球状粒子と同様の DNA 界面特性が確認されたが（発表論文 2）、独自の現象も見出された。異なる配列の DNA でナノロッドの両端面と側面を修飾し、側面 DNA の相補鎖と、両端面 DNA の末端ミスマッチ鎖を加えたところ、ナノロッドが側面同士で接して横に並んだ。逆に、側面がミスマッチで両端面が相補のときは縦に並んだ集合体が形成された。水銀イオンを介する非天然型塩基対合を末端部位に導入して、ナノロッドの横並びと縦並びを自在に変換することにも成功した。

(2)DNA ハイドロゲル：PNIPAAm と DNA のブロック共重合体は、高イオン強度下で DNA 鎖を二重鎖にしても、DNA 鎖同士の集積による集合体形成は観測されなかった。一方、適度な共重合体組成比の場合、水溶液を下限臨界溶解温度 (LCST) 以上に加熱すると、PNIPAAm 鎖が自己集合して形成した核のまわりを DNA 鎖が覆ったコアシェル型の球状ミセルが生成した。DNA 鎖を二重鎖にして運動性を低下させると、高塩濃度下では球状ミセルは直ちに凝集した。この凝集はミセル間の斥力相互作用の低下により生じたものと考察される（発表論文 3）。

得られたミセルは物理架橋ゲルであり、LCST 以下で崩壊してしまうため、反応性の第三成分モノマーを PNIPAAm 鎖に導入し、ミセル形成時に架橋剤を添加して構造を安定化した。得られた化学架橋ナノゲルが疎水性物質を内包できることを明らかにした。

(3)DNA 界面の特性解析：コロイドプローブ AFM 法を用い、NaCl 溶液中で DNA 界面間の表面力を測定した。表層が塩基対合した界面同士を近づけると、NaCl 濃度 100 mM 以下で斥力、250 mM 以上で引力が観測された。一方、表層が塩基対合していない界面同士では、NaCl 濃度によらず斥力が生じた。塩濃度の上昇で DNA 鎖の水和が低減して疎水性相互作用が増幅される機構が示唆された。

また、DNA 界面に光応答性を付与することにも成功した。アゾベンゼンの光異性化を利用して、表層塩基対合を光刺激で可逆的に制御できることを、DNA 担持金ナノ粒子の分散挙動を使って証明した。

(4)遺伝子目視診断法：薬剤代謝関連遺伝子を診断対象に選び、化学合成モデルを使って原理の妥当性を実証した（発表論文 4）。つづいて、ヒト由来サンプルを用いて SNP 識別を実施した。被験者 3 名の毛根から抽出したゲノムを鋳型として一塩基伸長反応を行い、反応物を DNA 金ナノ粒子に結合させた。凝集に基づく溶液の色変化が数分で生じ、迅速かつ簡便に SNP を目視判別することができた。

5. 今後の計画

(1)ナノ粒子組織体：DNA 担持ナノ粒子の糸ビーズ状集合体について、短鎖（3 量体程度）のものを siRNA 運搬体に、長鎖（300 量体以上）をクロマチンモデルに応用する。

(2)DNA ハイドロゲル：第三成分の反応性モノマーの比率や架橋剤の長さを変えて架橋点間距離を制御した化学架橋ナノゲルを作製する。また、PNIPAAm-DNA グラフト共重合体をクロスリンカーに用いて物理架橋ナノゲルを構築し、物質包接・徐放性を評価する。DNA を担持した金属ナノ材料を用いるハイドロゲルも検討し、金属ナノ粒子の光学特性や電気・電子特性を刺激応答性高分子の構造変化で制御する。

(3)細胞培養基板：光ビセットによるナノ光学解析で DNA 界面特性の発現メカニズムをさらに詳細に検証する。また、DNA 界面の塩基配列と立体構造を最適化し、タンパク吸着とそれに伴う細胞接着の制御を目指す。

(4)遺伝子目視診断法：20 名以上の被験者に複数遺伝子の SNP 診断を実施し、本分析法の信頼性と汎用性を証明する。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

- (1) Y. Akiyama, H. Shikagawa, N. Kanayama, T. Takarada, M. Maeda, Modulation of interparticle distance in discrete gold nanoparticle dimers and trimers by DNA single-base pairing, *Small* **11**, 3153–3161 (2015).
- (2) G. Wang, Y. Akiyama, T. Takarada, M. Maeda, Rapid non-crosslinking aggregation of DNA-functionalized gold nanorods and nanotriangles for colorimetric single-nucleotide discrimination, *Chem. Eur. J.* **22**, 258–263 (2016).
- (3) M. Fujita, H. Hiramane, P. Pan, T. Hikima, M. Maeda, Effects of complementary DNA and salt on the thermoresponsiveness of poly(*N*-isopropylacrylamide)-*b*-DNA, *Langmuir* **32**, 1148–1154 (2016).
- (4) Y. Akiyama, H. Shikagawa, N. Kanayama, T. Takarada, M. Maeda, DNA dangling-end-induced colloidal stabilization of gold nanoparticles for colorimetric single-nucleotide polymorphism genotyping, *Chem. Eur. J.* **20**, 17420–17425 (2014).

その他、原著論文 2 報、総説 5 報、招待講演 26 件、国際会議 11 件、国内学会発表 69 件。

ホームページ等

<http://www.riken.jp/lab-www/bioengineerin g/>