

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26410232

研究課題名(和文) DNAブラシ界面間における特異な相互作用の発現に対する水和状態の寄与評価

研究課題名(英文) Effect of Hydration on Interfacial Interactions between DNA Brush Layers

研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA, Naoki)

信州大学・総合工学系研究科・准教授(特定雇用)

研究者番号：80377811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：水溶液中で2つの向かい合ったブラシ状のDNA二重鎖(DNAブラシ)の間に生じる相互作用を、コロイドプローブ原子間力顕微鏡を用いたフォースカーブ測定により物理的な力(界面間力)として実測することに成功した。相補的な塩基対(GCペア)を表層に提示したDNAブラシ界面間では、NaCl濃度の上昇に伴って界面間力が斥力・引力へと徐々に変化することがわかった。一方、非相補的な(CCミスマッチ配列)表層のDNAブラシ界面間では、NaCl濃度と関係なく斥力が支配的であった。このDNAブラシ界面間力の違いは、ブラシ表層の局所的な水和状態が反映されていることが示された。

研究成果の概要(英文)：Colloidal probe atomic force microscopy was employed to examine how the outermost base pairs affect the interaction between the dsDNA-grafted layers (dsDNA layers). The dsDNA layers having complementary (GC) or mismatched (CC) outermost base pairs were grafted onto the surfaces of colloidal probes and gold substrates. Force-distance curves measured in an aqueous medium under high-salt conditions revealed that the surface forces between the dsDNA layers were bilateral in nature and were governed by the outermost base pairs. Between complementary outermost dsDNA layers, the surface force changed from repulsive to attractive with an increase in the NaCl concentration (10-1000 mM). The attraction observed under high-salt conditions was attributed to the site-specific interaction proceeded only between complementary dsDNA terminals. In fact, between mismatched outermost dsDNA layers, the repulsive force was mostly dominant within the same NaCl concentration range.

研究分野：生体関連高分子

キーワード：DNA 界面 水和 界面間力 フォースカーブ

1. 研究開始当初の背景

高電荷密度の高分子電解質（ポリアニオン）である DNA が固体表面にブラシ状に集積すると（以下、DNA ブラシ）、溶液中のフリーな DNA 鎖とは異なる特異な物性を発現することが報告されている。例えば、ブラシ状の DNA はフリーの DNA に比べ相補鎖認識能に優れ（R. Elghanian ら *Science*, 1997 年）、熱安定性や核酸分解酵素に対する耐性が高くなる（D. S. Seferos ら *Nano Lett.*, 2009 年）。このような現象の主な原因として、DNA ブラシ近傍に溶液中のカチオンが静電的相互作用により自発的に濃縮され、特異なイオン凝縮場が形成されることが指摘されている（H. Long ら *J. Phys. Chem. B* 2006 年）。

これまでに研究代表者らの研究グループは、DNA ブラシ末端の僅かな塩基対構造の差が、その界面特性に明敏に反映されることを報告してきた（*CSJ CurrentReview09*, 2012 年^{ほか}）。その典型的な例として、DNA ブラシで覆われたナノ粒子（DNA ナノ粒子）の特異な分散挙動が挙げられる。DNA ブラシ末端が相補的塩基対構造である DNA ナノ粒子は、溶液中の塩濃度の上昇に伴って自発的に凝集・沈殿する。これに対し、DNA ブラシ末端の僅か一組の塩基対がミスマッチ配列であれば、同じ高塩濃度条件においても凝集することなく、安定に分散状態を保持するのである。この現象は、コア部位の材料が異なる（ポリマーミセル、金ナノ粒子、ラテックス^{など}）DNA ナノ粒子において共通して観察されていることから、ナノ粒子表層の DNA ブラシ間に生じる相互作用の差が分散挙動に反映されたものと考えられる。

2. 研究の目的

DNA を含めた所謂、高分子電解質からなるブラシ層の間で作用する相互作用として、静電相互作用、浸透圧、立体斥力など様々な要因が考えられる。研究代表者は、前項で述べた DNA ブラシの末端構造に対応した界面特性の差が、DNA 鎖の電荷中和が完了していると考えられる高塩濃度条件で顕在化する点に鑑み、DNA ブラシの「水和状態」に着目した。即ち、DNA ブラシ表層の塩基対構造に対応して異なる水和状態が存在し、これが DNA ブラシ間における特異な相互作用が発現する主たる要因なのではないかと考えた。

そこで本研究では、DNA ブラシ界面間に生じる相互作用を物理的な力（界面間力）として実測することを第一の目標とし、さらに DNA ブラシ末端構造と界面間力の関連性を水和の観点から解明することを目指した。

3. 研究の方法

金蒸着処理を施したコロイドプローブ、およびシリコン基板表面に DNA 二重鎖ブラシを形成させ、原子間力顕微鏡（AFM）を用いて水溶液中で 200 nm/sec の速度で DNA 二重鎖ブラシを接近させた際に観測される界面間力と界面間距離の関係（フォースカーブ）を溶液中の NaCl 濃度を変えながら系統的に測定した。また、DNA 二重鎖ブラシのゼータ電位は、当該 DNA 二重鎖ブラシで覆われた金ナノ粒子（ $d = 40 \text{ nm}$ ）を用いて、電気泳動光散乱法により測定した。

4. 研究成果

- (1) DNA ブラシ末端の僅かな表層構造の差が与える影響を評価するためのプラットフォームとして、均一な表層構造を有する DNA 二重鎖ブラシの構築法を確立した。具体的には、ステム・ループ型の自己相補配列のオリゴ DNA 鎖をデザインし、ループに相当する部位に固体材料表面へのアンカーとなる官能基（SH 基）を導入することによって、従来のハイブリダイゼーションを利用した手法では達成が困難であった均一な構造の DNA 二重鎖ブラシの形成が可能となった。
- (2) 水溶液中で 2 つの向かい合った DNA 二重鎖ブラシの間に生じる相互作用をコロイドプローブ AFM によるフォースカーブ測定により界面間力として計測した。ステム・ループ型 DNA からなる均一な構造の DNA 二重鎖ブラシを対象に、表層（末端）構造が界面間力に及ぼす影響を評価した。その結果、相補的な塩基対（G-C ペア）を表層に提示した DNA 二重鎖ブラシ同士を接近させた場合、NaCl 濃度が 100 mM 以下では斥力が観測されたが、NaCl 濃度が 250 mM 以上では DNA 二重鎖ブラシ間距離が約 8 nm 以下の領域で引力が支配的となり、さらに NaCl 濃度が 500 mM 以上では 100 pN 以上の強さの明瞭な引力ピークがフォースカーブ上で確認された。一方、非相補的な（C-C ミスマッチ）表層構造の DNA 二重鎖ブラシ同士を接近させた場合では、NaCl 濃度に関わらず観測されるフォースカーブは斥力が支配的であり、表層構造の違いに連動した明瞭な界面間力の差を実測することに成功した。
- (3) DNA 二重鎖ブラシのゼータ電位を電気泳動光散乱法で測定したところ、NaCl 濃度の上昇に伴って電荷中和が徐々に進行するものの、DNA 二重鎖ブラシのゼータ電位は、DNA 二重鎖密度が同等であれば表層構造の影響はなく殆ど同じ値であった。この結果より、フォースカーブ測定で確認された DNA ブラシ界面間力の差

は、表面電荷の違いによるものではなく、表層の局所的な水和状態の差を反映したものであることが強く示唆された。

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 6 件)

金山直樹, 「見て・診る」ための金ナノ粒子, *ファルマシア*, 54 巻, 31-35, 2018, 査読無

DOI: https://doi.org/10.14894/faruawpsj.54.1_31

金山直樹, 医療応用を指向したナノ粒子型 DNA ハイブリット材料, *工業材料*, 65 巻, 43-49, 2017 年, 査読無

金山直樹, 前田瑞夫, ナノ粒子上の DNA ブラシ層が示す特異な性質, *高分子*, 66 巻, 110-112, 2017 年, 査読無

Naoki Kanayama, Taito Sekine, Kazunari Ozasa, Satomi Kishi, Takashi Nyu, Tomohiro Hayashi, Mizuo Maeda, Terminal-Specific Interaction between Double-stranded DNA Layers: Colloidal Dispersion Behavior and Surface Force, *Langmuir*, 32 巻, 13296-13304, 2016 年, 査読有

DOI: [10.1021/acs.langmuir.6b03470](https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03470)

金山直樹, 「診る」バイオマテリアル - 情報を収集し, 自律的にシグナル変換・出力する材料 -, *バイオマテリアル*, 34 巻, 180-184, 2016 年, 査読無

金山直樹, 前田瑞夫, ナノバイオエンジニアリング, *人工臓器*, 44 巻, 182-185, 2015 年, 査読無

DOI: <https://doi.org/10.11392/jsao.44.182>

[学会発表](計 32 件)

金山直樹, 今村星香, 前田瑞夫, アミノシラン化ガラス表面への DNA 修飾金ナノ粒子の吸着挙動, *日本化学会 第 98 春季年会*, 2017 年

金山直樹, DNA ブラシ界面の設計と機能発現, *第 39 回日本バイオマテリアル学会大会 (依頼講演)*, 2017 年

金山直樹, オリゴ DNA 鎖が関わるコロイド・界面現象, *平成 29 年度 富山大学生命融合科学教育部シンポジウム (招待講演)*, 2017 年

金山直樹, DNA ブラシが関わるコロイド・界面現象の研究, *信州コロイド & 界面科学研究会 第 3 回研究討論会 (招待講演)*, 2017 年

金山直樹, ブラシ状の DNA 鎖が関わるコロイド・界面現象, *第 68 回コロイドおよび界面化学討論会 (依頼講演)*, 2017 年
金山直樹, 機能性高分子としての化学合

成 DNA, 機能性高分子材料研究会 平成 29 年度第 1 回研究会 (招待講演), 2017 年
金山直樹, 関根泰斗, 尾笹一成, 丹生隆, 林智広, 前田瑞夫, コロイドプローブ AFM 法による DNA ブラシ界面間相互作用の直接計測, *第 66 回高分子討論会*, 2017 年
金山直樹, DNA を含むソフトマター ~ ミセルからブラシまで ~, *第 1 回 菌類・微生物ダイナミズム創発研究センター (CFMD) 研究交流ワークショップ (招待講演)*, 2017 年

Naoki Kanayama, Taito Sekine, Kazunari Ozasa, Takashi Nyu, Tomohiro Hayashi, Mizuo Maeda, Terminal-Specific Interaction between Double-Stranded DNA Layers: Colloidal Dispersion Behavior and Surface Force, *3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS 2016)*, 2016 年

金山直樹, DNA で覆われたナノ粒子, *信州コロイド & 界面科学研究会 第 2 回研究討論会 (招待講演)*, 2016 年

金山直樹, 関根泰斗, 尾笹一成, 丹生隆, 林智広, 前田瑞夫, 末端塩基対合に対応した DNA ブラシ間力の変化, *第 67 回コロイドおよび界面化学討論会*, 2016 年

金山直樹, 関根泰斗, 尾笹一成, 岸里美, 丹生隆, 林智広, 前田瑞夫, フォースカーブ測定による末端塩基対合依存的な DNA ブラシ間相互作用の評価, *第 65 回高分子討論会*, 2016 年

金山直樹, 関根泰斗, 尾笹一成, 丹生隆, 林智広, 前田瑞夫, 完全二重鎖 DNA 界面間における末端塩基対合に対応した表面力変化, *第 26 回バイオ・高分子シンポジウム*, 2016 年

金山直樹, 関根泰斗, 尾笹一成, 岸里美, 丹生隆, 林智広, 前田瑞夫, DNA ブラシ間における末端塩基対合に対応した表面間力測定, *第 65 回高分子年次大会*, 2016 年

Naoki Kanayama, Satomi Kishi, Tohru Takarada, Mizuo Maeda, Photo-Responsive DNA Brush Surface for Reversible Gold Nanoparticle Assembly, *2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem 2015)*, 2015 年

金山直樹, 岸里美, 宝田徹, 前田瑞夫, 水 - DNA ブラシ界面の分子設計に基づく刺激応答性 DNA ナノ粒子の開発, *第 64 回高分子討論会*, 2015 年

金山直樹, 岸里美, 前田瑞夫, ステム・ループ型 DNA ブラシ界面で覆われたナノ粒子の特異な分散挙動, *第 64 回高分子学会年次大会*, 2015 年

金山直樹, 岸里美, 宝田徹, 前田瑞夫, 表層にアゾベンゼン部位を有する DNA 二重鎖担持金ナノ粒子の可逆的な非架橋凝

集現象，第 64 回高分子学会年次大会，
2015 年

金山直樹，岸里美，宝田徹，前田瑞夫，
刺激応答性 DNA ブラシ界面，第 24 回日本
MRS 年次大会，2014 年

金山直樹，岸里美，前田瑞夫，生理的イ
オン強度下で誘起される DNA ブラシ界面
の末端認識現象，第 36 回日本バイオマテ
リアル学会大会，2014 年

- 21 Naoki Kanayama, Satomi Kishi, Tohru
Takarada, Mizuo Maeda, Photo-
Responsive DNA Brush Surface for
Reversible Nanoparticle Assembly, The
41th International Symposium on
Nucleic Acids Chemistry (ISNAC2014),
2014 年
- 22 金山直樹，岸里美，宝田徹，前田瑞夫，
ナノ・バイオ機能性材料への応用を指向
した DNA ブラシの界面設計，第 63 回高
分子討論会，2014 年
- 23 金山直樹，岸里美，宝田徹，前田瑞夫，
アゾベンゼンを有する DNA ブラシ層で覆
われた金ナノ粒子の光間にピュレシー
ョン，第 63 回高分子討論会，2014 年
- 24 金山直樹，岸里美，宝田徹，前田瑞夫，
様々な刺激応答性を示す DNA ブラシの界
面設計，第 65 回コロイドおよび界面化学
討論会，2014 年
- 25 金山直樹，岸里美，宝田徹，前田瑞夫，
アゾベンゼン部位を有する DNA ブラシ層
で覆われた金ナノ粒子の光応答挙動，第
63 回高分子学会年次大会，2014 年

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA, Naoki)

信州大学・総合工学系研究科・准教授 (特
定雇用)

研究者番号 : 8 0 3 7 7 8 1 1