

非架橋型 DNA 担持コロイドの凝集構造の研究

物質系専攻 66156 山越 静人
指導教員：伊藤 耕三（教授）

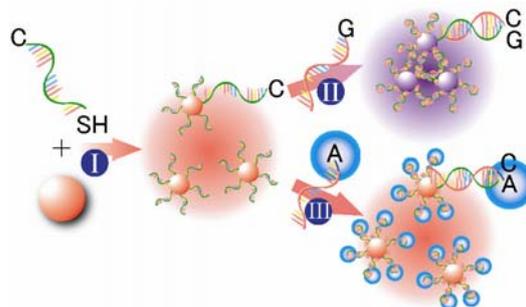
キーワード：金コロイド（金ナノ粒子）、DNA、SNPs、小角 X 線散乱

【背景・目的】

金コロイド（金ナノ粒子）溶液は、通常その表面プラズモンの吸収により赤色を呈している。しかし、表面が修飾されていない金コロイド粒子は分散安定性に乏しく少量の塩によって凝集してしまい、このとき溶液の色が赤から紫（または青）に変化することが知られている。この変化は表面プラズモンによる吸収ピークがシフトするためである。近年この凝集・分散状態での色の違いと、金-チオール結合による分子修飾のしやすさにより、金コロイドはナノ構造体の形成や、分子認識システムなどに盛んに応用されている。

特にDNAと金ナノ粒子との複合体はDNAの配列を制御することで構造体の空間配置を制御したり、DNAの配列を認識する可能性を秘めているため、大きな注目を集めている。DNAの配列認識においてはMirkinらの研究が有名であるが、これは一本鎖DNAを修飾した金ナノ粒子をDNAを用いて架橋することによりDNAの配列を判別する方法である¹。一方、DNA担持コロイドの非架橋型凝集を用い、架橋構造を伴わないDNAの配列認識手法(Scheme1)が佐藤らによって見出された²。例えば金コロイドに末端のヌクレオチド塩基がCである一本鎖DNA(probe DNA)をチオール基を用いて修飾する(Scheme1-I)。これによりDNAの負電荷と排除体積によって金コロイドは分散安定性が著しく高まる。この溶液中に修飾したDNAに対して完全に相補的なDNAを投入すると、分散安定性が減少し500 mM程度のNaClの投入によりコロイドは凝集し、溶液の色が紫に変わる(Scheme1-II)。ところが、末端の一塩基のみが相補的でないDNA(末端一塩基変異鎖)を加えたときには、逆に分散安定性が高まってしまい、500 mM程度のNaClでは凝集は起こらない(Scheme1-III)。この二者の溶液の色の違いにより、末端の一塩基が判別(後から投入したのがGなのかAなのか)できるため基礎・応用の両面から注目を集めているが、なぜ末端の一塩基が違うだけでこれほどまでに分散安定性が変化する理由については、クーロン相互作用や、末端の運動性の違いなどが考えられているが、決定的な解は得られていない。凝集・分散挙動のDNA配列依存性、塩濃度依存性については研究が進められているが、凝集体自体に対する研究はまだなされていない。本研究ではDNA担持コロイドの凝集体の構造をX線小角散乱を用いて調べることで、凝集体において金コロイド上のDNAの形態に関する知見を得ることを目的としている。

Scheme I



【実験】

金コロイド（公称値 粒径 15 nm）の溶液 1 ml (1.4×10^{12} particles)中に 5 nmolの 5'末端チオール化 DNA(probe DNA)を投入後、50°Cで 24 時間保持し、さらにNaClおよびリン酸緩衝液を最終濃度 0.1 M および 10 mMになるよう添加して、50°Cで 40 時間保持することでDNA担持金コロイドを作製した。probe DNAには 15 塩基から 45 塩基まで 5 塩基おきに異なった試料を用いた。

X線小角散乱測定の際には、DNA担持金コロイド溶液にtarget DNA（相補鎖または末端一塩基変異鎖）を添加しさらに塩を加えて測定を行った。加える塩についてはNaClの他に、MgCl₂も用いた。これはtarget DNAとして末端一塩基変異鎖を加えたときや、target DNAを加えない（一本鎖の）場合にはNaClでは凝集しないが、MgCl₂を用いれば凝集するためである。これにより、末端一塩基変異鎖を加えた場合やtarget DNAを加えない場合との凝集状態の比較が可能となった。

測定は高エネルギー加速器研究機構、BL15Aで行い、検出器には CCD 型 X 線検出器を用いた。

【結果・考察】

Fig. 1 中の上の散乱曲線は、DNAを修飾していない金コロイド粒子（分散状態）を測定したものである。この散乱曲線に対して球の理論散乱関数をフィッティングすることにより金コロイドの粒径として 13 nmの値が得られた。一方Fig. 1 下の散乱曲線は、金コロイドに対して 45 塩基の（長さの）DNAを修飾してtarget DNAとして完全に相補的なDNAを投入し、二重鎖 (double stranded(ds))を形成させてから 1 Mの塩を加えた凝集体の散乱曲線である。分散状態とは異なり小角側 ($q < 0.05$)に新しくいくつかのピークが見られる。凝集体の相互の位置情報を含んだ粒子間構造因子 $S(q)$ は、次式のように凝集体の散乱関数 I_{agg} (Fig. 1. 下) を分散状態の散乱関数 I_{disp} (Fig. 1. 上)で割った形で得られる。

$$S(q) \propto I_{agg}(q)/I_{disp}(q)$$

さらに $S(q)$ を逆フーリエ変換することで 実空間での 2 対の粒子の分布を示す pair distance distribution function (PDDF)が得られる。この PDDF のピークの位置から、最近接粒子中心間距離が得られる。

最近接粒子中心間距離から粒径を差し引くことでその凝集体における粒子表面間距離 d とした。

Figure 2 はそれぞれの系において、修飾した DNA の塩基数に対して粒子表面間距離を表したものである。また、二つの点線はその DNA の塩基数において DNA が二重鎖 (B-form)を形成した場合の長さ (3.4 Å/basepair) とその2倍の値を表している。どの系も表面に修飾した DNA の塩基数が多くなればなるほど表面間距離が大きくなるのが見て取れる。

完全に相補的な DNA を投入した系の凝集体の表面間距離 (Fig.2 diamond) は二重鎖の長さの 2 倍に非常に近くなっており、またその傾きもほぼ同じである (2.9 Å/basepair)。このことから、相補鎖を投入した凝集体は、その表面に修飾した DNA の二重鎖が末端間で接触した状態の凝集体を形成していると考えられる (Fig. 3A)。

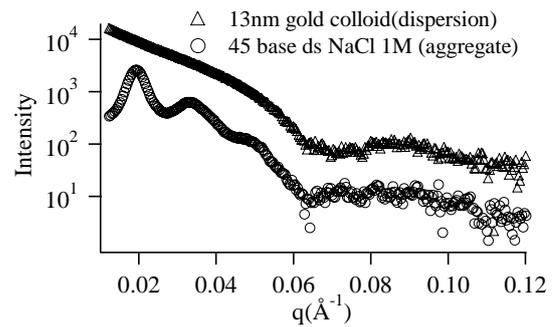


Fig. 1. Scattering profiles of dispersed particles (triangle) and aggregated particles (circle).

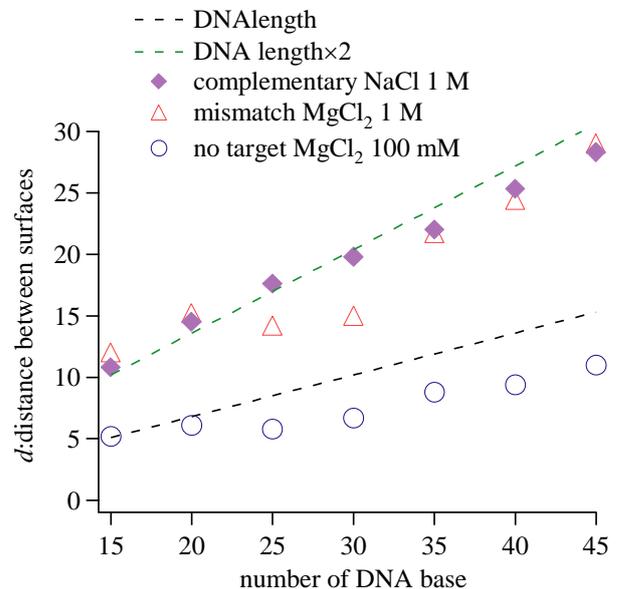


Fig. 2.. Distance between surfaces of gold nanoparticles plotted against the number of DNA base pairs. (diamond) 1.0 M NaCl and complementary DNA were added. (triangle) 1.0 M MgCl₂ and mismatch DNA were added. (circle) 0.1 M MgCl₂ and no target DNA. Dotted lines show (lower line) dsDNA length and (upper line) twice as long as dsDNA length where DNA is assumed to be in B-form.

末端の一塩基がミスマッチである DNA を投入し凝集させた系の凝集体の表面間距離は、これもほぼ二重鎖の長さの2倍に近い値となった。よって、この系でも凝集する塩の種類、価数は違うものの凝集体としては完全相補鎖を投入した場合と同様に末端間で接触しているような凝集体となっているのではないかと考えられる(Fig. 3A)。

target DNA を投入しない系においては、その表面距離は他の二つの系に比べ明らかに小さくなった。また表面に修飾した DNA の塩基数に対する依存性も小さくなっている。これは target DNA を投入しない系では表面の DNA は一本鎖 DNA となっており、そのために二重鎖の場合に比べて剛直性が低いので金コロイド間で押しつぶされているのではないかと考えられる(Fig. 3B)。

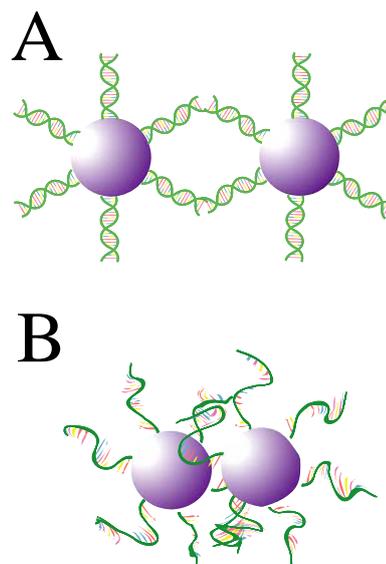


Fig. 3. Aggregation structure of DNA-modified gold nanoparticles. (A) Complementary DNA or terminal mismatch DNA was added. (B) no target DNA.

【まとめ】

本研究では金コロイドに一本鎖 DNA を修飾した DNA 担持金コロイドに対して、完全相補鎖を投入した凝集体、末端一塩基鎖を投入した凝集体、target DNA を投入せずに一本鎖のまま凝集させた凝集体を X 線小角散乱を用いて測定した。それぞれの系について DNA 塩基数の違う凝集体を測定し、その塩基数における二重鎖の長さや粒子表面間距離とを比較することで、完全相補鎖や末端一塩基鎖を投入した系では、DNA の末端同士が接触しているような構造を形成しており、一方、一本鎖のまま凝集させた系では、二重鎖よりも剛直性の低い一本鎖が金コロイド表面でつぶれた状態の構造を形成しているという結果を得た。

【参考文献】

1. Robert Mirkin, C. A., Letstinger, R. L., Mucic, R. C. Storhoff, J. J. (1996) *Nature*, **382**, 607-609.
2. Sato, K., Hosokawa, K., Maeda, M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8102-8103.

【論文・学会発表】

1. The Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry
「SAXS measurement of aggregate of DNA modified gold nanoparticles」
2. 第 55 回高分子討論会「DNA 修飾金コロイドの凝集挙動」
3. 第 55 回高分子学会年次大会「DNA 担持金コロイドの凝集構造」
4. 第 56 回高分子学会年次大会「DNA 修飾金コロイドの凝集の塩の価数による影響」