

東京大学 大学院新領域創成科学研究科
基盤科学研究系物質系専攻

平成19年度
修士論文

非架橋型DNA担持コロイドの
凝集構造の研究

2008年2月28日提出
指導教員：伊藤耕三 教授

66156 山越 静人

目次

第1章	序論	1
1.1	遺伝子の歴史からバイオ工学へ	1
1.2	SNPs とテーラーメイド医療	2
1.3	DNA 融解温度曲線	5
1.4	NIPAAm-DNA コンジュゲートによる SNP 検出	6
1.5	金コロイドを用いた SNP 検出	10
1.6	コロイドの分散安定性	12
1.7	本研究の目的	17
第2章	実験	19
2.1	試料	19
2.1.1	チオール化 DNA の精製 (エタノール沈殿)	19
2.1.2	金コロイドとチオール化 DNA の結合	19
2.1.3	target DNA	20
2.1.4	凝集実験	24
2.2	X 線小角散乱法 (SAXS)	26
2.2.1	SAXS の原理と解析	26
2.2.2	測定環境	32
第3章	実験結果	35
3.1	凝集実験結果	35
3.2	SAXS の測定結果	37
3.2.1	DNA のついていない金コロイドのみの散乱	38
3.2.2	target DNA が完全相補鎖の場合 (分散状態)	40
3.2.3	target DNA が完全相補鎖の場合 (凝集状態)	43
3.2.4	target DNA が末端一塩基変異鎖の場合	55
3.2.5	target DNA が無い (一本鎖の) 場合	57
第4章	考察	59
4.1	NaCl 系について	59
4.2	MgCl ₂ 系について	61
4.3	表面間距離の塩濃度依存性	62

第5章 結論

謝辭

第1章 序論

1.1 遺伝子の歴史からバイオ工学へ

当たり前なことではあるが我々は両親に似ている。しかし、なぜ我々は両親に似ていて、なぜカエルの子はカエルなのかという難問に答えるには Mendel の登場をまたねばならなかった。

1866年に Mendel は有名なエンドウの交配の実験により「遺伝が対となる因子 (遺伝子) によって支配され、その因子が、別々の配偶子に1つずつ分離される」という分離の法則と、違う形質は独立に遺伝するという独立遺伝の法則を導いた。これによりそれまで漠然と表現されていた“遺伝”という現象を遺伝子という概念を用いて科学的に説明することに成功したのである。

以来、遺伝学、分子生物学は目覚ましい進歩を遂げた。1869年には核酸が発見され、1952年にはバクテリオファージと大腸菌を用いた実験により遺伝子が DNA であると同定された。また、広く知られているように1953年には Watson と Crick らが X 線結晶構造解析技術を用いた実験結果を元に DNA の“二重らせんモデル”を提唱した。以降、遺伝情報が DNA → RNA → たんぱく質と流れるというセントラルドグマという概念が Crick により発表され、何塩基で1つのアミノ酸をコードしているのかという遺伝暗号解読が1966年には完了し、遺伝子組み換えの技術が進歩していった。1985年にはヒトの全ゲノムの塩基配列を決定しようというヒトゲノムプロジェクトが始まった。そして、2001年にはヒトゲノム全塩基配列の大まかなデータが発表され、2003年には完全に解読された。

このヒト全ゲノム塩基配列の決定により、21世紀開始早々ポストゲノムシーケンシング時代に入り新たな研究の流れが起こってきた。ゲノム情報をもとに新たな薬を作る“ゲノム創薬”や、情報解析技術を駆使して膨大なゲノム情報を効率よく蓄積し、使いやすように加工する技術を開発して情報科学的に解析を行う“バイオインフォマティクス”、個々の患者の遺伝情報をもとに患者の個人差に合わせた医療を行う“テーラーメイド (オーダーメイド) 医療”などがそうである。こうした流れの中で個人個人におけるゲノムの塩基配列の違いを調べる一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms : SNPs) 解析が重要になってくるのである。

1.2 SNPs とテーラーメイド医療

ヒトゲノムの全塩基配列には個人差があり、その中で一塩基レベルの個人差を一塩基多型 (SNPs, 図 1.1) と呼んでいる。ヒトゲノムの塩基配列のうち 0.1% 程度は SNP があり、300 万から 1000 万箇所の SNP が存在すると考えられている。もし SNP がたんぱく質の発現をコントロールする場所やたんぱく質をコードする場所にあった場合、体内で作られる酵素などのタンパク質の量や働きが微妙に変わる。この SNP が今まで“体質”として表現されてきたものの原因であると考えられている。つまり、同じ症状の人に同じ薬を投与しても効き目に個人差があり、薬がほとんど効かない人もいればよく効く人もいる、というのは SNP に起因しているのである。他にも SNP は遺伝子に起因する病気のかかりやすさや薬物の代謝にも影響する。このような場合テーラーメイド医療では事前に患者の SNP を理解し、薬の効きにくい患者には多めの薬を与え、まったく効かない患者には他の治療を行うといった選択が可能となる。これにより患者は薬の持つ副作用のリスクを回避、あるいは軽減することが可能となるのである。

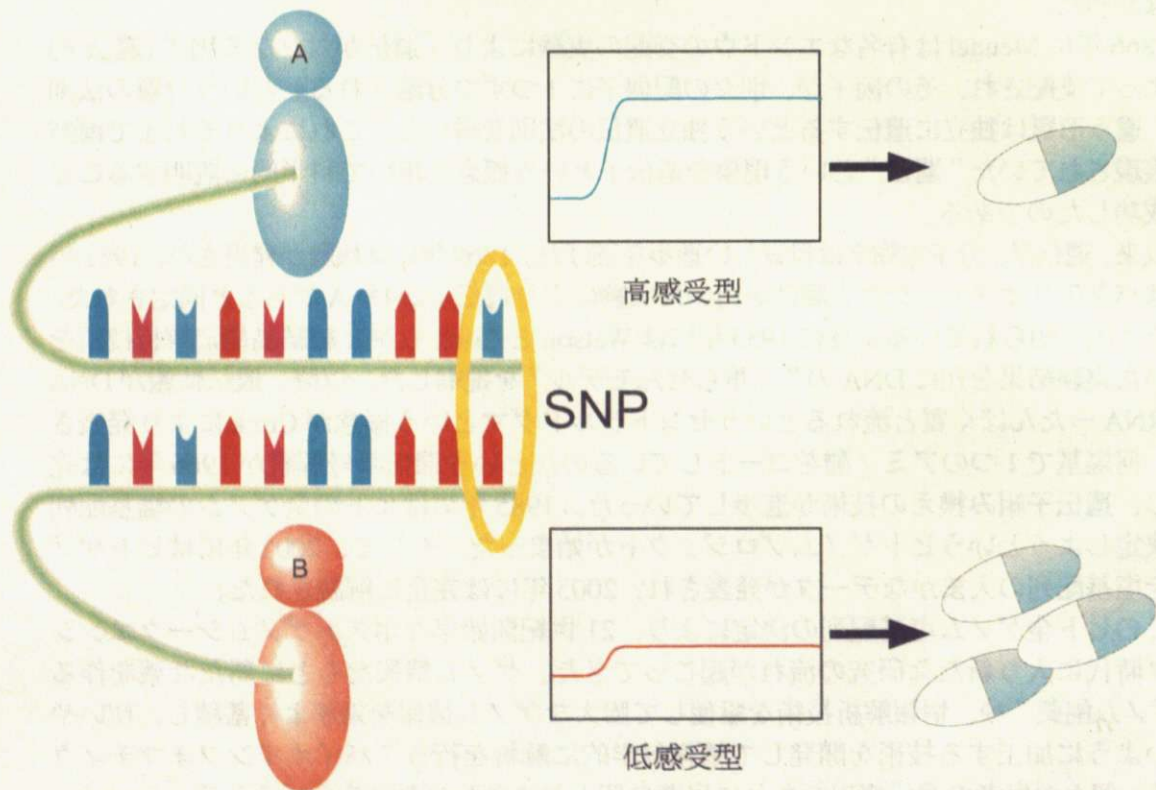


図 1.1: SNP とテーラーメイド医療

このようなテーラーメイド医療を実現していくためには

1. 患者の SNPs を判別する技術
2. どの SNP がどんな影響を与えるのかというデータベース

が必要となってくる。

実際に一塩基多型 (SNP) を検出する方法の多くは、ゲル電気泳動法および放射性同位体標識法に立脚しているが、これには煩雑な操作と特別な施設が必要になるため、より簡便で迅速な手法の開発が待たれている。現在では多くの企業が DNA チップ等を用いた DNA 診断技術の実用化を目指しており、激しい開発競争が行われている。

一方、DNA チップ以外の SNP 検出方法も発見されている。例えば、米国ノースウェスタン大学の Mirkin と Letsinger がナノテクノロジーを利用した新しい遺伝子診断方法を提案している^{1,2,3)}。彼らは溶液中に特定の遺伝子配列が存在することを検知する手段として、2種類の DNA を固定した直径 13 nm の金ナノ粒子を使った。2種類というのは、一方は対象となる配列の半分と相補的な DNA、もう一方は残り半分と相補的な DNA である。これらが別々に付いた金ナノ粒子溶液中に対象となる配列を持った DNA が存在すると、この DNA によって先ほどの2種類の金コロイドが架橋されて、金ナノ粒子が凝集する。通常の金ナノ粒子溶液は、このサイズでは表面プラズモンの吸収により赤色をしているが、凝集するとプラズモンの吸収が低波長側にシフトするため溶液は青色へと変わる。ところが、適切な温度設定・制御を行うと、対象となる DNA と完全に相補的ではない DNA を溶液に加えてもこのような変化が起らず、溶液は赤色のままなのである。これにより金微粒子を用いた SNP の識別が可能になった (図 1.2)。

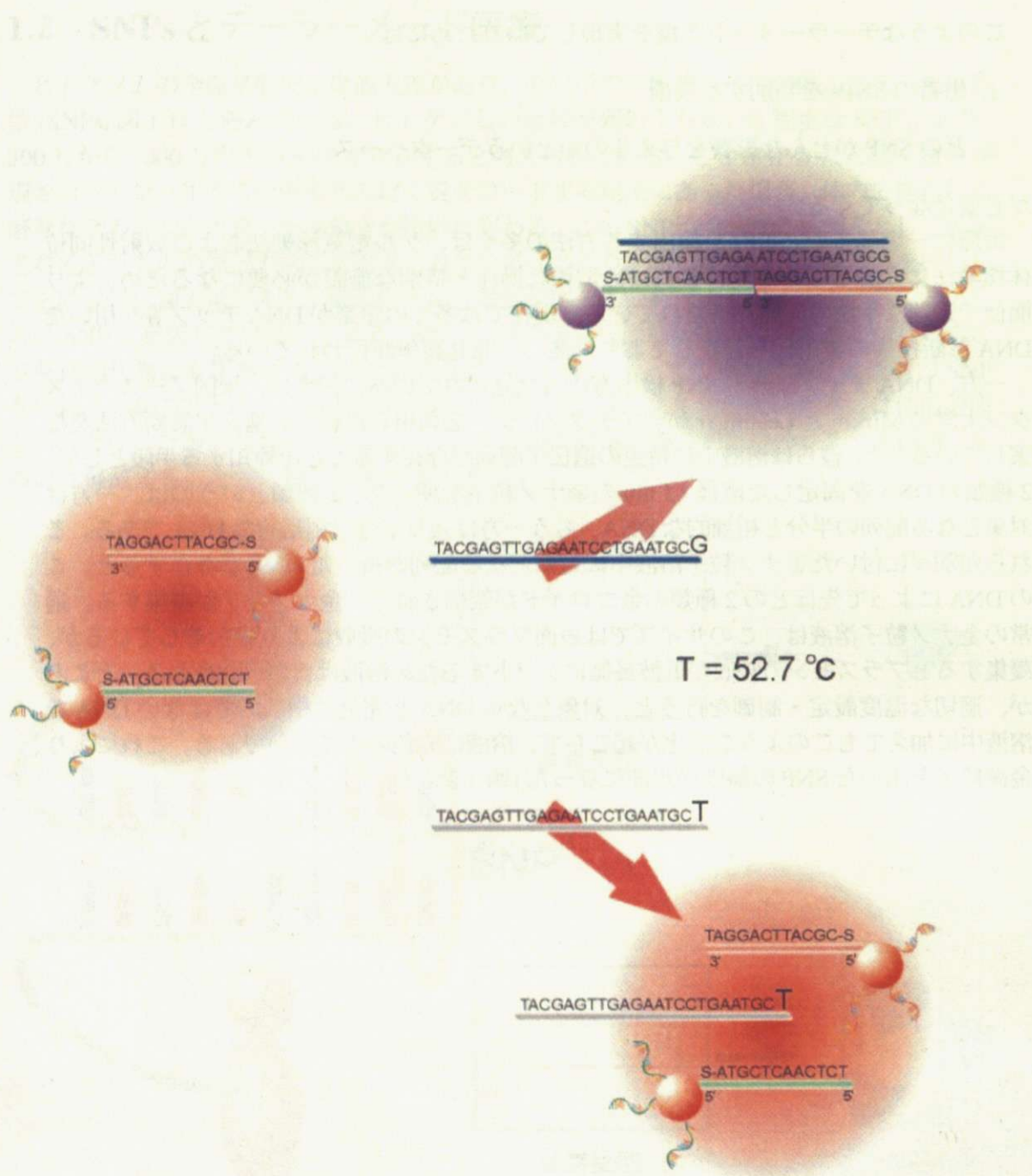
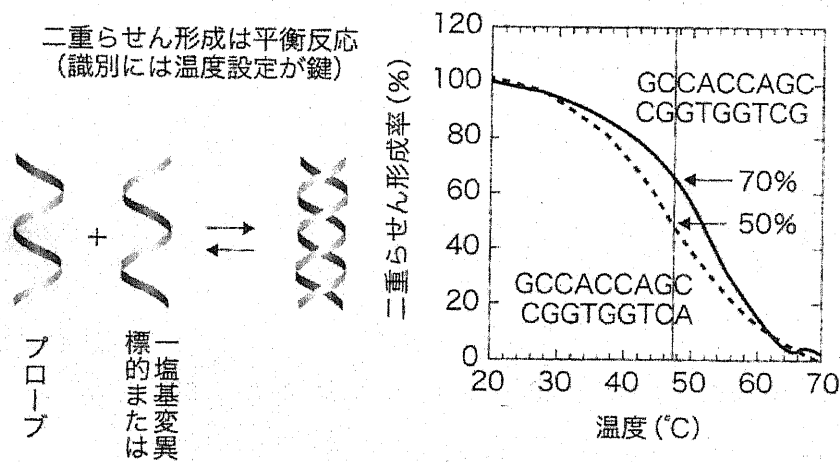


図 1.2: Mirkin らによる Cross-link 型 SNP 判別法

1.3 DNA 融解温度曲線

SNP 検出の方法としてはこれまでゲル電気泳動法、放射性同位体標識法、DNA チップ、DNA を担持した金コロイドの架橋などの方法を挙げてきたが、これらの多くは DNA の二重鎖形成 (ハイブリダイゼーション) を利用している。しかし、DNA の一塩基の違い (SNP) は DNA の二重鎖形成に対してわずかな影響しか与えない。というのは、たとえ一塩基違っていたとしても他の塩基同士が完全に離れてしまうわけではないのである。

DNA 同士は負電荷を持ちながらも塩基対間の水素結合により二重らせんの形状を取っている。しかし、温度を上昇させていくとこの二重らせんがほどけていくことが知られている。また、DNA が二重鎖を組んでいるときと二重鎖を組まずにばらばらになっているときでは特に 260 nm の波長での吸光度が違い、温度を変えながら二重鎖を形成している DNA の 260 nm での吸光度を測定すると吸光度が徐々に変化していく。この温度と 260 nm の吸光度の曲線を描いて、低温での吸光度の極限と高温での吸光度の極限をそれぞれ二重鎖形成率 100%、0% として相対評価したものを DNA 融解温度曲線という (図 1.3)。この DNA 融解温度曲線が二重鎖の解離・形成の度合を示していると考えられている。例えば、9 mer の DNA で完全相補の場合と最後の塩基のみ違う場合の DNA 融解温度曲線を見比べると、一番差が出るのは 47°C 付近である。その差を見ると、完全相補のものは二重鎖形成率が 70% であるのに対して、一塩基違うものは 50% であり、それほど大きな差があるとは言いがたい⁴⁾。そのため、SNP を検出するときに温度条件を最適化すること



一塩基の違いでは二重らせん形成率に大きな差はない
(曖昧なエビデンス・誤診の危険)

図 1.3: DNA 融解温度曲線

が困難であり、また一塩基違うかどうかと問われたときの判断の根拠としては曖昧さが残ると言わざるを得ない。

1.4 NIPAAm-DNA コンジュゲートによる SNP 検出

一方、理化学研究所前田バイオ工学研究室では熱応答性高分子である poly-N-isopropyl acrylamide (polyNIPAAm) を疎水核として、その表面上に DNA を担持させたコロイドナノ粒子 (NIPAAm-DNA コンジュゲート) の調製に成功し、それを用いた SNP 検出法が開発された⁹⁾(図 1.4)。

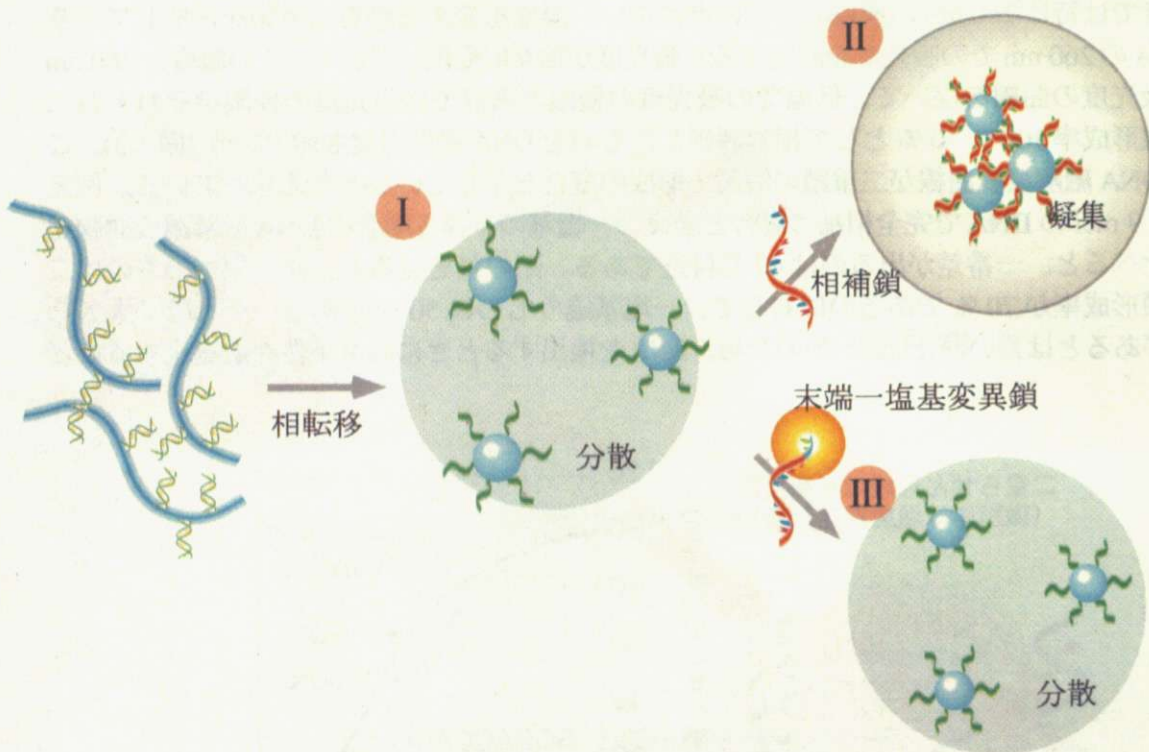


図 1.4: NIPAAm-DNA コンジュゲートによる SNP 判別

この NIPAAm-DNA コンジュゲートとは、末端をビニル化した DNA と感熱性高分子である NIPAAm を共重合させたものである (図 1.5)。polyNIPAAm は室温では水に溶解するが相転移温度 (純水中では 32 °C) 以上では脱水和により急激に不溶となる特性を持っている。一方 NIPAAm-DNA コンジュゲートは相転移温度以上に加熱すると、polyNIPAAm 部分を疎水核として、表面には DNA を担持した高分子コロイド粒子が形成される (図 1.4-I)。この状態では高分子コロイドは分散しているが、液中に担持させた DNA と相補的な DNA を加えると溶液が少量の塩により凝集し白濁する (図 1.4-II) のに対して、末端一塩基変異型 DNA を加えた場合は分散液にまったく変化が見られない (図 1.4-III)。このように凝集するかどうかにより、末端の一塩基が相補的なのかそうでないのかが分かり SNP が検出できるのである。

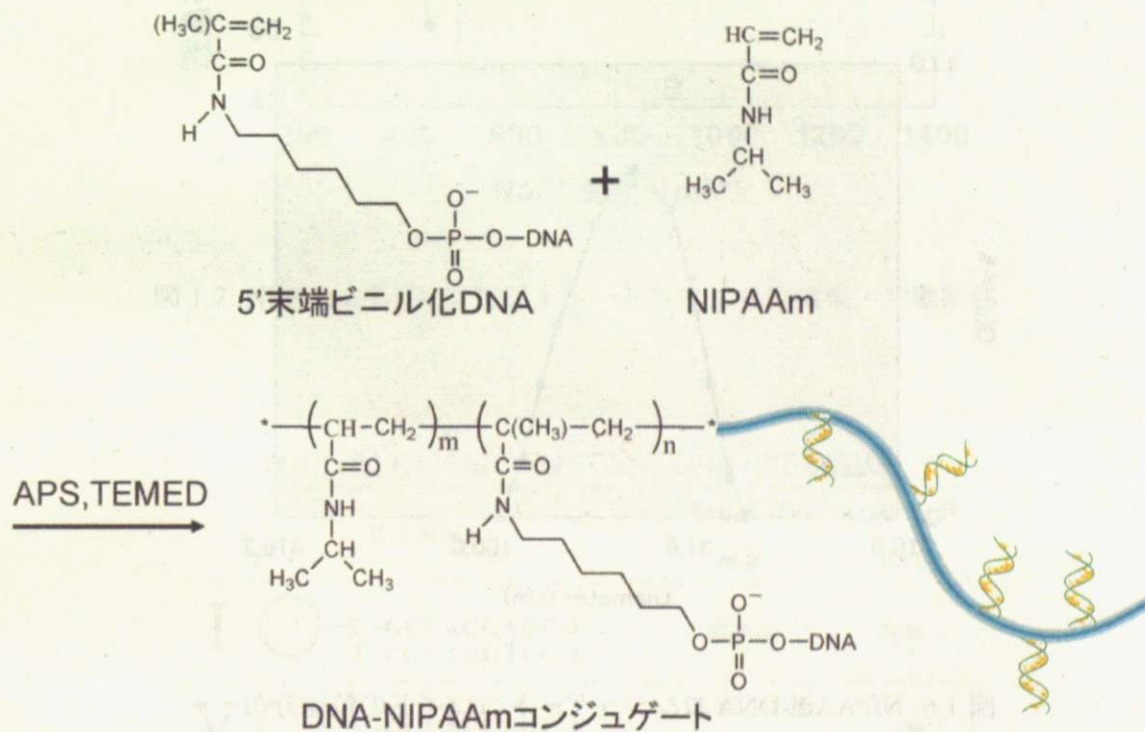


図 1.5: NIPAAm-DNA コンジュゲートの合成

NIPAAm-DNA コンジュゲートについて

コンジュゲートに含まれる DNA 量は、ヌクレオチドの配列に由来する 260 nm における吸光度より求められ、これによりコンジュゲートに含まれる NIPAAm の量および NIPAAm と DNA のモル比が求まる。また平均分子量が静的光散乱法から得られる。これらの測定により、例えば DNA の塩基数が 8 塩基 (GCCACCAGC) の場合には、コンジュゲート分子に平均約 11 個の DNA がグラフトされていることがわかっている。

相転移温度以上でコンジュゲートがコロイドになっている状態では、動的光散乱法によって粒径の測定が行われている (図 1.6)。また、静的光散乱法で測定したコロイド粒子の分子量を用いることによって一つのコロイド粒子が平均 22 個のコンジュゲート分子から構成されていることが分かっている。

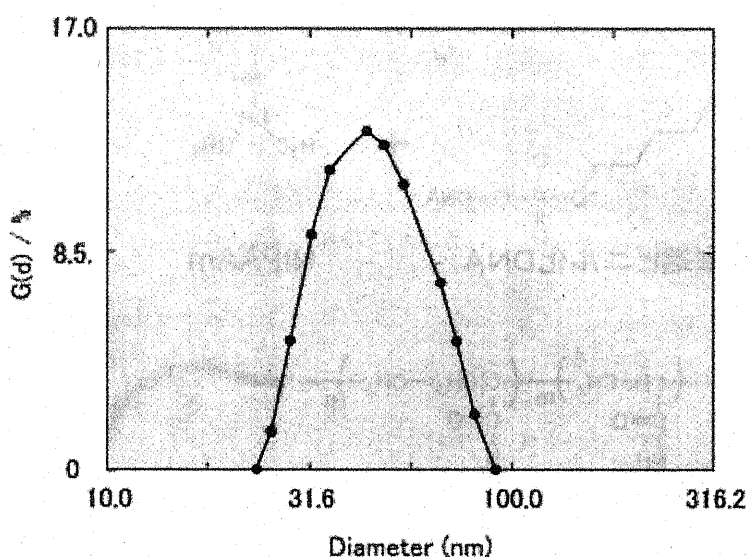


図 1.6: NIPAAm-DNA コンジュゲートコロイドの粒径分布

このような DNA-NIPAAm コロイドが具体的にいかなる条件で凝集、分散状態になるかを図 1.7 に示す。図中の I、V、VI、VII、VIII はそれぞれ表 1.1 の同番号と対応している。I はコンジュゲートに結合している DNA と相補的な DNA が存在している場合の結果である。NaCl 濃度が 300–400 mM 程度で透過率が急激に減少しており、凝集が起こっていることが分かる。それに比べ、末端の一塩基が違う V、VI、VII や末端が一塩基分長い VIII では NaCl をどれだけ加えても透過率はほぼ 100% のままで、コンジュゲートコロイドが分散したままであることが伺える (ここには示していないが、液中に DNA が存在しない場合でもこれらと同様の挙動を示す)。この透過率の違いにより、末端の一塩基の違い (SNP) が識別できる⁷⁾。

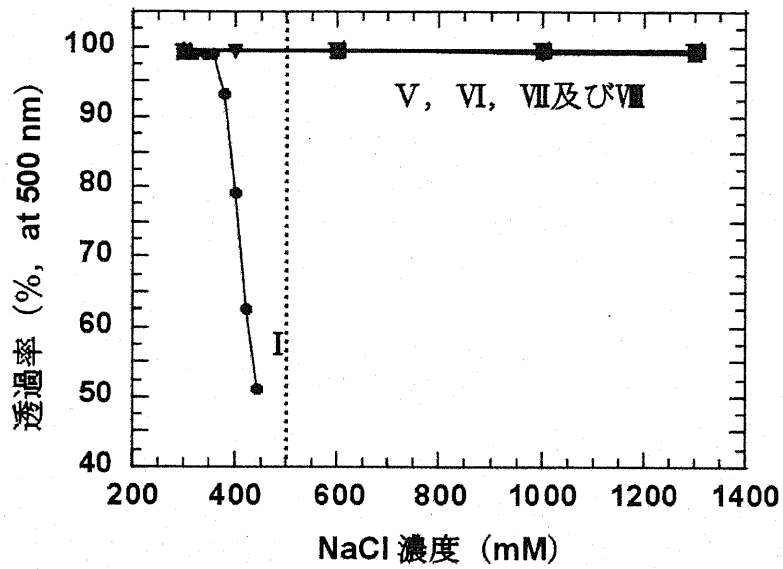


図 1.7: NIPAAm-DNA コンジュゲートコロイドの凝集・分散条件

表 1.1: 図 1.7 に用いられている DNA の塩基配列

粒子表面	一塩基変異の種類	凝集・分散状況
I ○ 5'-GCCACCAGC-3' 3'-CGGTGGTCG-5'	相補鎖	凝集
V ○ 5'-GCCACCAGC-3' 3'-CGGTGGTCT-5'	5'末端一塩基置換	分散
VI ○ 5'-GCCACCAGC-3' 3'-CGGTGGTCA-5'	5'末端一塩基置換	分散
VII ○ 5'-GCCACCAGC-3' 3'-CGGTGGTCC-5'	5'末端一塩基置換	分散
VIII ○ 5'-GCCACCAGC-3'A 3'-CGGTGGTCGA-5'	5'末端一塩基延長	分散

1.5 金コロイドを用いた SNP 検出

また前田バイオ工学研究室では、NIPAAm-DNA コンジュゲートだけでなく金コロイドを使った方法でも同様の結果を得ている。金コロイドの場合は5'末端をチオール化したDNAを用いることで、金-チオール結合によってDNAを金ナノ粒子に結合させている。金コロイドに結合させたDNAと相補的なDNA鎖を液中加入し、さらに少量の塩を加えると、分散状態では赤かった溶液の色が、金コロイドの凝集により青みがかかった色に変化する^{8,12)}(図1.8)。これに対し、末端に一塩基変異があるものを加えて、さらに少量の塩を添加しても溶液は赤いままで金コロイドが分散しているのがわかる。金コロイドを用いることにより、この凝集・分散に対応する青・赤という溶液の色の違いによりSNPの検出が可能になる。NIPAAmを使って検出を行う場合は、NIPAAm-DNA コンジュゲートを相転移させるため、温度を40℃付近に設定しなければならなかったが、金コロイドでは粒子は温度に影響されず安定に存在しているため、室温で検出できることがNIPAAmを使った場合との大きな違いになっている。

これらの前田バイオ工学研究室で開発された方法は、先ほどまで述べてきたような方法とは違い、二重鎖を組んでいるかどうかを吸光度により直接検出するのではなく、コロイドの凝集・分散という現象を通して検出するため、検出の判断に曖昧な部分がない。また温度条件も厳密にこだわる必要がないのが特徴である。

今までは、どういったDNA配列のときにどの程度の塩により粒子の凝集が起こるのということが丁寧に調べられてきた。しかしながら現段階では、なぜこれらのDNA担持粒子で、二重鎖を組むDNAの末端の一塩基の違いが粒子の分散安定性に対して極端な影響を及ぼすのかは十分に明らかになっていない。

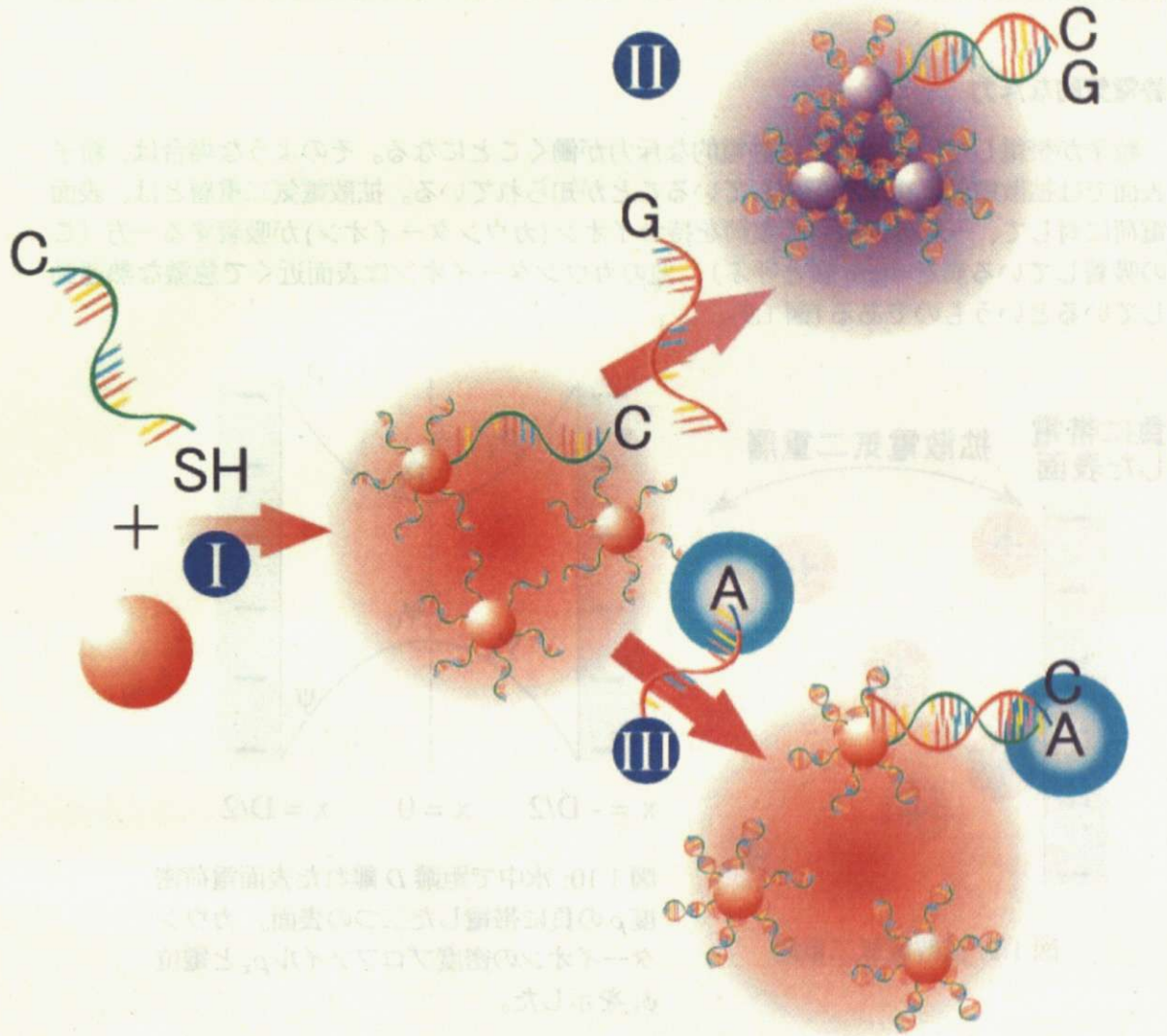


図 1.8: 金コロイドを用いた SNP 検出

1.6 コロイドの分散安定性

DNA 担持粒子の分散安定性を考えるため、まずは一般的なコロイドの分散安定性について考えよう。溶液中に存在する粒子を考えると、必ず van der Waals 力が働いている。これは引力であるから、この力のみが働いているなら粒子は見るまもなく凝集してしまう。実際には溶液中の粒子間で斥力が働いているからこのようなことは起こらないのである。

静電的な斥力

粒子が帯電している場合には静電的な斥力が働くことになる。そのような場合は、粒子表面では拡散電気二重層を形成していることが知られている。拡散電気二重層とは、表面電荷に対して、一部の逆符号の電荷を持つイオン(カウンターイオン)が吸着する一方(この吸着している層を Stern 層と呼ぶ)、他のカウンターイオンは表面近くで急激な熱運動しているというものである(図 1.9)。

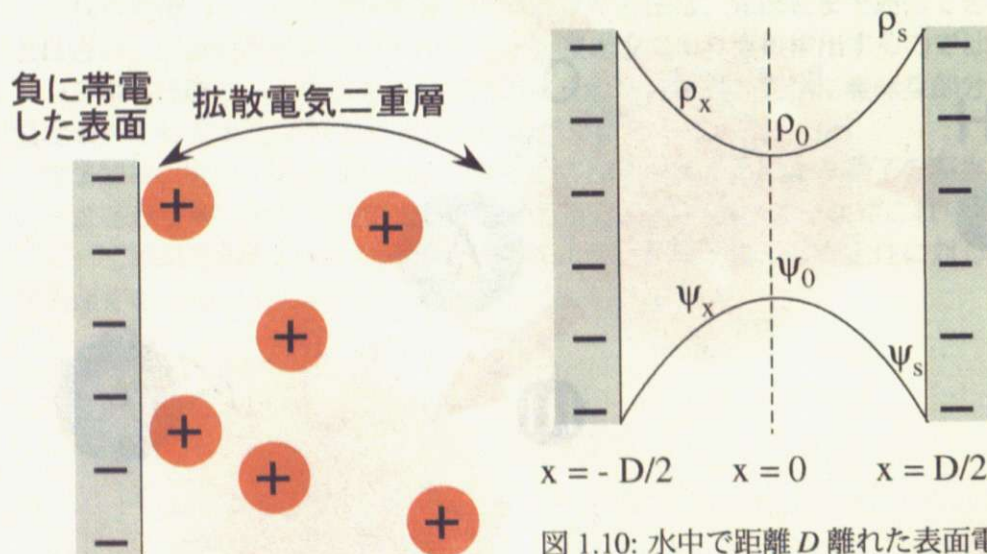


図 1.9: 拡散電気二重層

図 1.10: 水中で距離 D 離れた表面電荷密度 ρ の負に帯電した二つの表面。カウンターイオンの密度プロファイル ρ_x と電位 ψ_x を示した。

水中(電解質が加えられていない状態)での帯電表面

溶液中にカウンターイオンのみが存在する(表面から解離した対イオンのみがある)場合は、任意の化学ポテンシャルは

$$\mu = ze\psi + kT \log \rho \quad (1.1)$$

と表せる。ここで、 ψ は電位、 ρ は二つの表面間の任意の点 x における価数 z のイオンの数密度である。電位の差のみが物理的に意味を持つので、中央の点 ($x = 0$) で $\psi_0 = 0$ とおいてもよく、この点では $\rho = \rho_0$ とする。対象性から、 $(d\psi/dx)_0$ である。化学ポテンシャルがいたるところで一様であるという平衡条件から、

$$\rho = \rho_0 e^{-\frac{z e \psi}{kT}} \quad (1.2)$$

とボルツマン分布になる。さらに Poisson の式

$$z e \rho = -\epsilon_r \epsilon_0 \rho_0 \left(\frac{d^2 \psi}{dx^2} \right) \quad (1.3)$$

を組み合わせると以下のような Poisson-Boltzmann 方程式が得られる。

$$\frac{d^2 \psi}{dx^2} = -\frac{z e \rho_0}{\epsilon_r \epsilon_0} e^{-\frac{z e \psi}{kT}} \quad (1.4)$$

これを解くことで、表面間隙の任意の点 x における電位 ψ 、電場、および対イオン密度 ρ が分かる。特に対イオン濃度は、

$$\rho_x = \rho_0 + \frac{\epsilon_r \epsilon_0}{2kT} \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_x^2 \quad (1.5)$$

となる。 ρ_0 は 2 平面の中央での値である。

いま、中心から任意の点 x における対イオンの圧力 P は $\left(\frac{\partial p}{\partial x} \right)_{x,T} = \rho \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right)_{x,T}$ で与えられるので、二つの平板が一定温度で無限遠から $D/2$ まで接近するとき、 x における圧力の変化は次式で与えられる。

$$P_x = - \int_{x'=D/2}^{x'=\infty} \rho_0 \left[z e \rho \left(\frac{d\psi}{dx} \right) dx' + kT d\rho_x \right] \quad (1.6)$$

$z e \rho$ を Poisson の式で置き換えることで、次のようになる。

$$P_x(D) - P_x(\infty) = -\frac{1}{2} \epsilon_0 \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_{x(D)}^2 + kT \rho_x(D) + \frac{1}{2} \epsilon_0 \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_{x(\infty)}^2 - kT \rho_x(\infty) \quad (1.7)$$

ここで、添え字 x は、2 表面が D または ∞ の距離にあるときに、 x で計算を行うことを意味する。この力は二つに分解できる。第一の寄与は、二乗にマイナス符号をつけたもので常に負である（引力である）。これは静電場エネルギーの寄与であり、表面間が近づくほどカウンターイオンが表面に近づき静電相互作用によって有利になるものである。第二の寄与は、正であり、したがって斥力である。これはエントロピーの寄与である。表面間が近づくことでカウンターイオンの分布は平衡状態から外れるため、浸透圧が斥力的に働く。

電解質中における帯電表面間の電気二重相互作用

電解質溶液中において帯電した二つの同種表面の間に働く相互作用圧力はこの場合、すべてのイオンを考慮して

$$P_x(D) - P_x(\infty) = -\frac{1}{2}\epsilon\epsilon_0 \left[\left(\frac{d\psi}{dx} \right)_{x(D)}^2 - \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_{x(\infty)}^2 \right] + kT \left[\left(\sum_i \rho_{xi}(D) - \sum_i \rho_{oi}(\infty) \right) \right] \quad (1.8)$$

となる。式(1.5)より、電解質中における全イオン濃度は

$$\sum_i \rho_{xi} = \sum_i \rho_{mi} + \frac{\epsilon\epsilon_0}{2kT} \left(\frac{d\psi}{dx} \right)_x^2 \quad (1.9)$$

である。ここで、 $\sum_i \rho_{xi}$ は中央の面 $x = 0$ における全イオン濃度である。式(1.9)を式(1.8)に代入し、 $P_x(D = \infty) = 0$ とおくと

$$P_x(D) = kT \left[\left(\sum_i \rho_{mi}(D) - \sum_i \rho_{oi}(\infty) \right) \right] \quad (1.10)$$

が得られる。これは間隙を隔てて電解質イオンと表面に対して(位置 x に無関係に)一様に働く圧力である。 P がバルク浸透圧に相対的な中央の面におけるイオンの過剰浸透圧であることを示している。 $\sum_i \rho_{oi}(\infty)$ はバルク電解質濃度から分かるので、有限の D に対して中央の面におけるイオン濃度 $\rho_{mi}(D)$ を見つけることで P が分かる。しかし、解析的な結果を得るには、中央の面の電位 ψ_m が小さいことを仮定しなければならない。さらに ψ_m が、各表面から $x = D/2$ の距離における電位の和であると仮定すると、NaCl のような 1 : 1 電解質の場合には

$$P = kT 64 kT \rho_{\infty} \gamma^2 e^{-\kappa D/2} \quad (1.11)$$

ここで κ は

$$\kappa = \left(\frac{\sum_i \rho_{oi} e^2 z_i^2}{\epsilon\epsilon_0 kT} \right)^{1/2} \quad (1.12)$$

であり、 $1/\kappa$ は拡散電気二重層の特徴的な長さ、すなわち"厚さ"を表しており、Debye 長と呼ばれる。

上記の圧力に対応する単位面積当たりの相互作用自由エネルギーは、 D について積分し、さらに平面間の単位面積当たりのエネルギーにより、二つの球の間に働く力を与える Derjaguin 近似を用いると、粒子間の二重相互作用が算出される⁹⁾。

$$W = \left(\frac{\pi kTR \rho_{\infty} \gamma^2}{\kappa^2} \right) e^{-\kappa D} \quad (1.13)$$

特性減衰距離は Debye 長になっている。

ここで、溶液中の塩濃度 ($\rho_{\infty i}$) の増加は (1.12) により Debye 長 $1/\kappa$ を小さくする。すなわち拡散電気二重層の厚さを薄くする。さらに Debye 長の減少は式 (1.13) により電気二重層の相互作用エネルギーを減少させるとともに、その特性減衰距離も短くなることとなる。

DLVO 理論

DLVO 理論とは、全相互作用として van der Waals 力と電気二重層斥力を考え、コロイド粒子の分散安定性を論じた理論である。式 (1.13) のように電気二重層斥力によるポテンシャルは表面間距離に対して指数関数的に減少する。一方、van der Waals 相互作用ポテンシャルはベキ法則に従う。よって、距離が大きいときと小さいときは van der Waals 力が優勢となるが、中間領域においては二重層斥力が優勢となってエネルギー障壁を生じることがある (図 1.11)。もし、塩濃度が非常に小さいのならば二重層斥力のポテンシャルはより遠方に及ぶため、粒子が反発しあうことになり、安定な状態であるといえる。van der Waals 相互作用は電解質濃度に対してあまり敏感ではないのに対して、電気二重層相互作用ポテンシャルは、電解質濃度が高まるにつれ表面電荷がより遮蔽されるようになるために、ポテンシャルの大きさ自体も小さくなるとともに、そのポテンシャルが及ぶ範囲も短くなっていく。電解質濃度が上昇し、エネルギー障壁が低くなってくると凝集が起り始め、障壁のトップが $W = 0$ 軸以下に下がると、粒子が急速に凝集する (図 1.11 赤)。このようにして、塩濃度の上昇が二重層斥力の遮蔽を増加させることにより、粒子が分散安定性を失うのである¹⁰⁾。

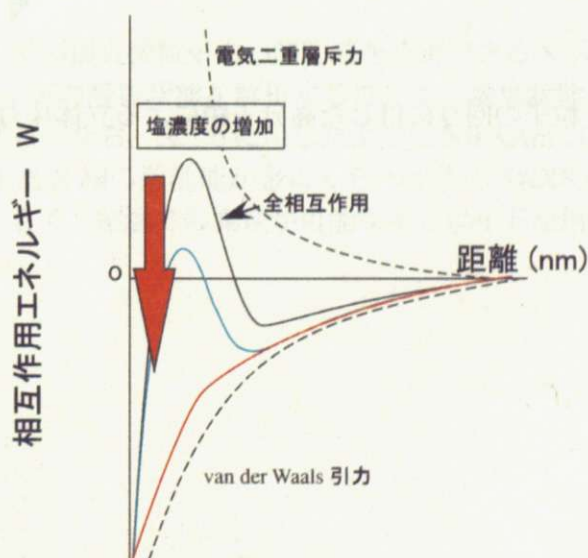


図 1.11: DLVO 相互作用のエネルギー

立体斥力

本論文で扱う系においては、このような van der Waals 力と電気二重層斥力以外にも、粒子の周りの高分子鎖に起因する立体斥力を考える必要がある。立体斥力とは、高分子で覆われた二つの表面が接近する場合に、それぞれの外側のセグメントが重なり始めると生じる力のことである。この相互作用は浸透圧による斥力であるといわれている^{9,10)}。なぜなら、鎖が表面間に閉じ込められエントロピー的に不利になるからである。これは工業的にもよく知られた現象であり、インクのトナーや塗料、化粧品などを溶液中で安定に分散するのに応用されている。定性的にいうと、表面に高密度で、長い高分子が付いているほどより遠距離から大きな斥力が働くことになる。

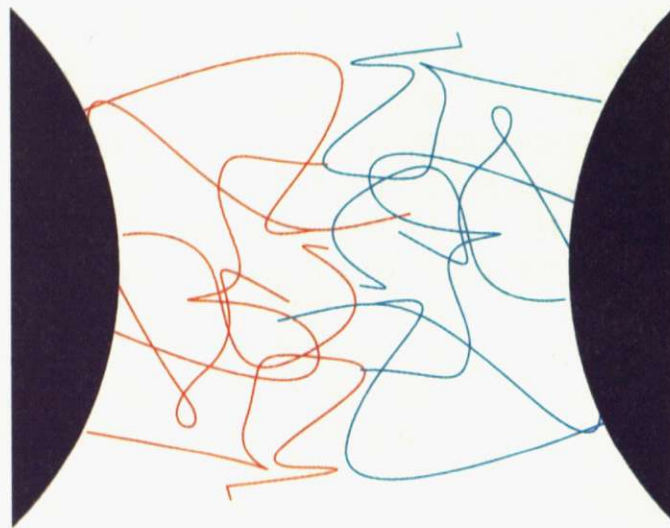


図 1.12: 粒子の回りに付した高分子鎖による立体斥力

1.7 本研究の目的

DNA 担持コロイドがなぜ末端の一塩基の違いで分散安定性が大きく変わるのかを考えてみよう。いったい末端一塩基が違うだけで何が違うのであろうか。通常の DLVO 理論によれば、末端の一塩基が違うだけでは van der Waals 力は変わらないであろうし、電荷密度は不変なので電気二重層斥力も違いがあるようには思えない。立体斥力という点から見れば、非常に微小な違いではあるが、末端の一塩基が違うことにより末端の局所的な運動性が上昇し、この効果が斥力的に働くのかもしれない。もし、末端の一塩基が斥力的に働いているならば、凝集体は末端間の衝突を避けあって凝集するはずである (図 1.13A)。

また、凝集が起こるといふ観点からみると、末端が相補的なときにのみ働く (又は相補的な場合により強く働く) 引力的相互作用により凝集するという可能性も否定できない。この場合には、相補鎖がある場合とそうでない場合で異なる凝集体 (粒子中心間距離) を形成する可能性がある。例えば、一つの DNA が金粒子間を架橋するような相互作用であれば、その粒子表面間距離は DNA の長さ程度であろうし (図 1.13A)、DNA がお互いに入り組むことによる相互作用であれば DNA の長さの 1, 2 倍程度の表面間距離が与えられる (図 1.13A と B の中間状態)、もし末端間の相互作用であれば DNA の長さの 2 倍程度の表面間距離が観測されるであろう (図 1.13B)。

これまでの研究においては、DNA の塩基配列をいろいろと変えながらどのくらいの塩を加えると凝集が起こるのかという、分散安定性の評価が詳細に行われてきた。先に述べたように、コロイド科学という観点からもこの現象はきわめて興味深く、従来のコロイド科学の研究手法を用いることにより「なぜ DNA 担持コロイドは末端の一塩基の違いだけで分散安定性が大きく変わるのか」という興味深い現象に何らかの回答が得られるのではないかと考えられる。

本研究では、溶液中での最近接粒子中心間距離を測定できる X 線小角散乱 (SAXS) 法を用い、DNA 担持コロイドの凝集状態を解析することで、凝集状態についての詳細な知見を得ることを目的とする。なお、図 1.6 に示したように NIPAAm コンジュゲートの粒径はばらつきが大きく、また X 線の散乱能が金にくらべ小さく SAXS の測定に適していないため、粒径の分布が小さく、室温での測定が可能な金コロイドを用いて測定を行うことにした。

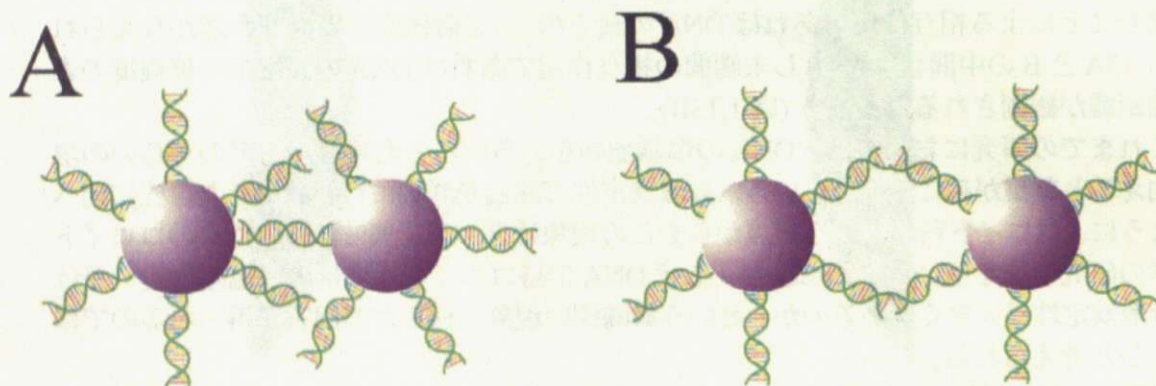


図 1.13: 想定される凝集構造

第2章 実験

2.1 試料

2.1.1 チオール化DNAの精製(エタノール沈殿)

金コロイドに修飾させる5'末端チオール化DNA(一本鎖)はタカラバイオ(株)より購入し、probe DNAとした。塩基の数が15塩基から45塩基まで5塩基(以下塩基の数を15merなどと表現する)おきに異なった試料を用意した(図2.1)。通常、チオールはチオール同士で反応してジチオールを形成してしまうので、それを防ぐために購入時点では液中にDTT(ジチオスレイトール)が入っている。このDTTを取り除き5'末端チオール化DNAを精製するためにエタノール沈殿を行う。これは、DNAがエタノールに溶けにくいことを利用して、液中からDNAの沈殿を取り出し精製するものである。

手順としては、まず5 nmol程度の核酸をエッペンに用意し、核酸水溶液の0.1倍量の3 M酢酸ナトリウムを加え混合した。ナトリウムイオンがあるとDNAの負電荷が遮蔽され沈殿しやすくなるためである。次に100%エタノールを核酸水溶液の2.5倍量加え混合したのち、-10℃で10分静置し、後4℃、12000Gの条件で25分遠心にかけて。遠心にかけてすることでDNAの沈殿が容器の底にたまっていく。遠心機からエッペンを取り出し、エッペンの底に白色の沈殿を確認し、注意しながらピペットを用いてその上清を捨てた。この時点では沈殿中には塩が残存しており、そのまま使用すると不都合を生じるのでリンスする。エッペンに70%エタノール1 mlを加えて、エッペンの中身を軽く混ぜ、再び4℃、12000 Gで3分遠心した。先ほどと同様に沈殿を失わないように注意して上清を捨て、エッペンを減圧乾燥ケースに入れて水分を完全にとばし、最後にTE buffer 50 μ lをエッペンに加え沈殿を再溶解させ、精製したチオール化DNAを得た(TE bufferとは10 mM TrisHCl 1 mM EDTAのことでDNAを保存しておくときに使う)。

2.1.2 金コロイドとチオール化DNAの結合

精製したチオール化DNAと金ナノ粒子を結合させる(図2.2)。金コロイドはBritish Biocell International社のGold Colloidの粒径が15 nm、40 nmのものを用意した(表2.1)。金コロイド溶液は通常赤く見えている。

精製したDNA及びTE buffer 50 μ lが入ったエッペンに金ナノ粒子溶液1 ml入れ、これを50℃で24時間放置する。一度エッペンを回収し、NaClおよびリン酸緩衝液(pH7)を、

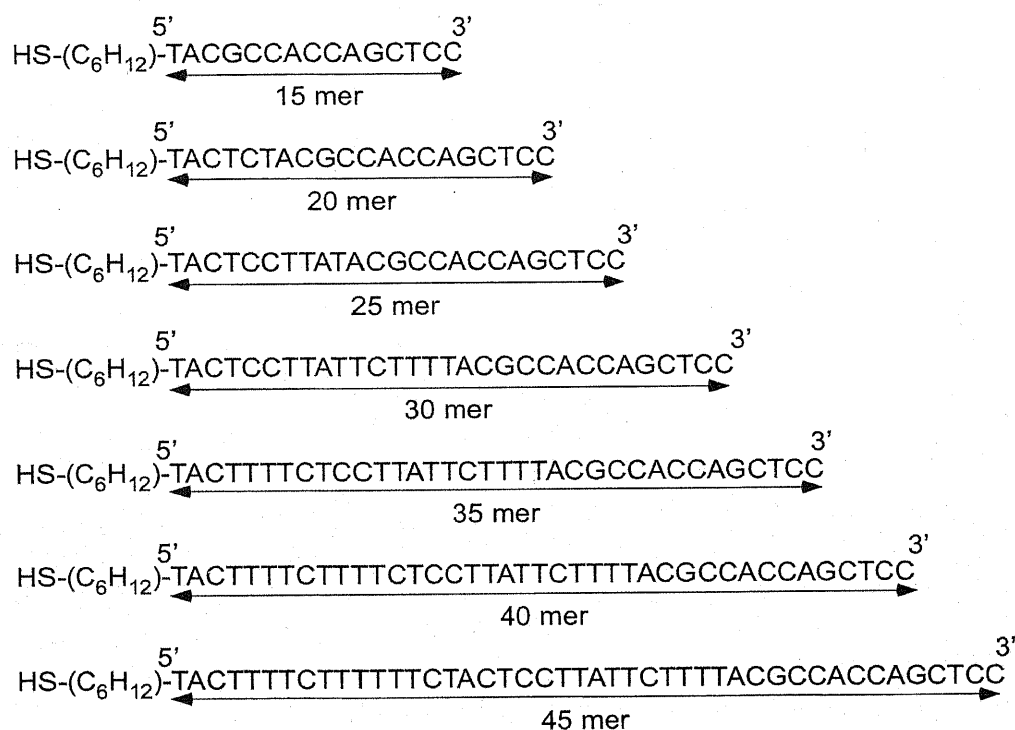


図 2.1: 金コロイドに結合させた probe DNA の塩基配列

表 2.1: 金コロイド (CV=標準偏差/平均値)

サイズ (nm)	粒径幅 (% CV)	粒子数/ml
15	≤ 10%	1.4×10^{12}

最終濃度 0.1 M および 10 mM になるように、2.5 M NaCl を 40 μ l、500 mM リン酸緩衝液を 20 μ l 添加し 50 $^{\circ}$ C で 40 時間放置した。エッペンを 12000 G、15 $^{\circ}$ C で 25 分遠心する。赤くなっている底の部分 (DNA のついた金コロイドがある) を残すに上清を捨てた。0.1 M NaCl in 10 mM リン酸緩衝液 0.5 ml を加えて再び溶かし、12000 G、15 $^{\circ}$ C で 25 分遠心した。先ほどと同様に上清を取り除き、0.1 M NaCl in 10mM リン酸緩衝液 0.25 ml で分散させて、DNA を結合させた金コロイド溶液を得た。

2.1.3 target DNA

金コロイドに結合させた probe DNA に対して二重鎖を形成させるために後から投入する DNA を、ここでは target DNA と呼ぶ。これはつくばオリゴサービスより購入した。購

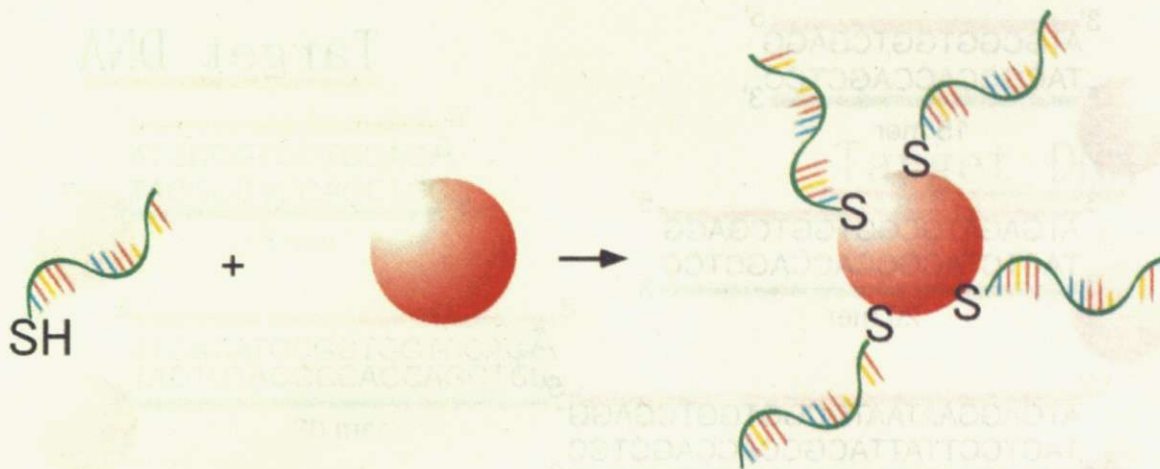


図 2.2: DNA 担持金コロイドの修飾

入時には乾燥した状態で届くため、10 mM リン酸緩衝液を適量加え、紫外分光を用いて濃度を調べ、さらに 10 mM リン酸緩衝液を加えて $100\mu\text{M}$ に調製した。target DNA は、金コロイドに結合させた probe DNA に合わせて、15 から 45 mer のフルマッチとなる DNA と末端ミスマッチとなる DNA を用意した。フルマッチとなる target DNA (図 2.3) はそのすべての塩基が相補的 (adenine(A) と thymine(T)、guanine(G) と cytosine(C) が対応している) である。一方末端ミスマッチとなる target DNA は 5' 末端が A であり、probe DNA の 3' 末端が C であるので末端の一塩基のみがそれぞれ相補的ではない (図 2.4)。

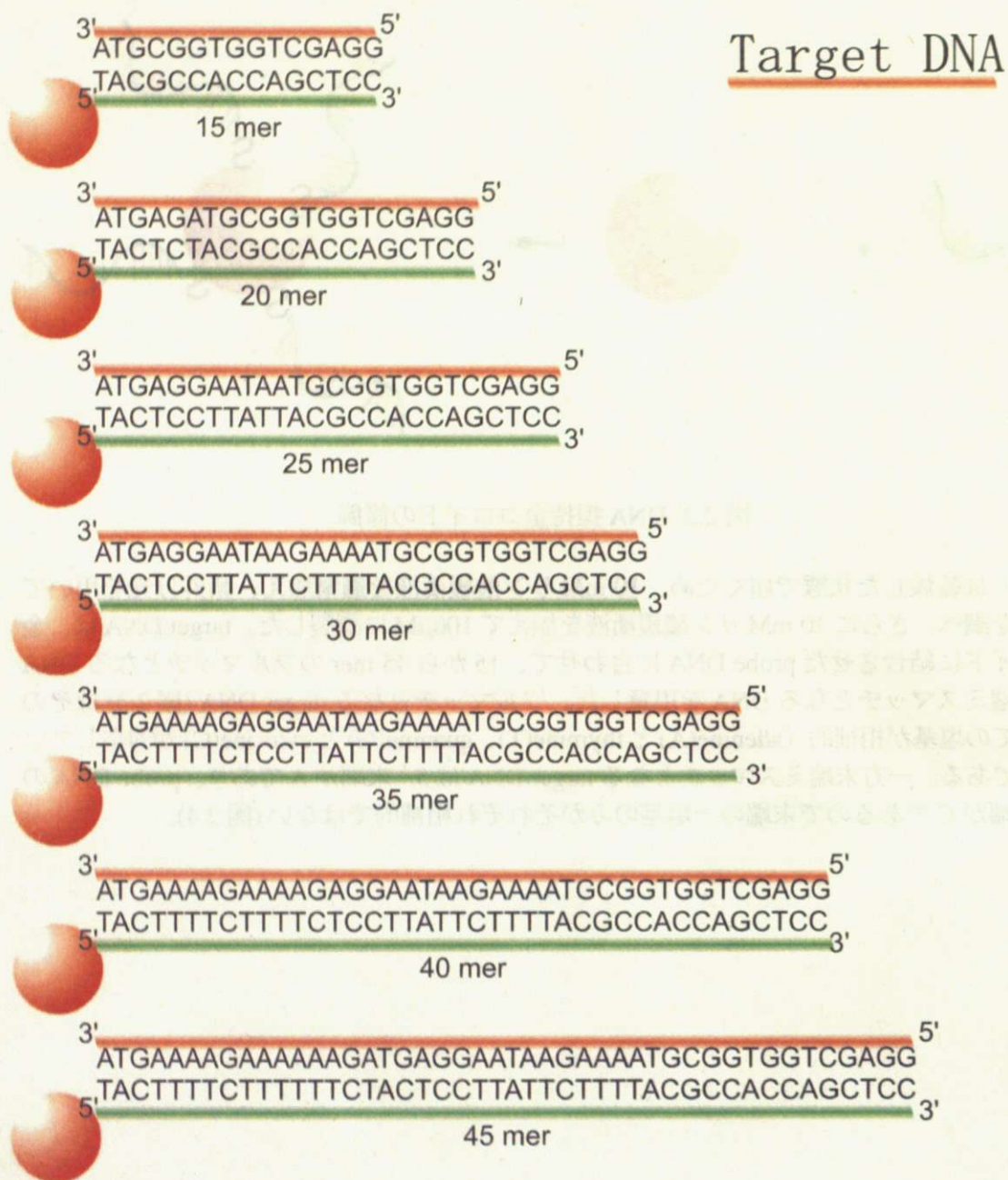


図 2.3: target DNA (完全相補) の塩基配列

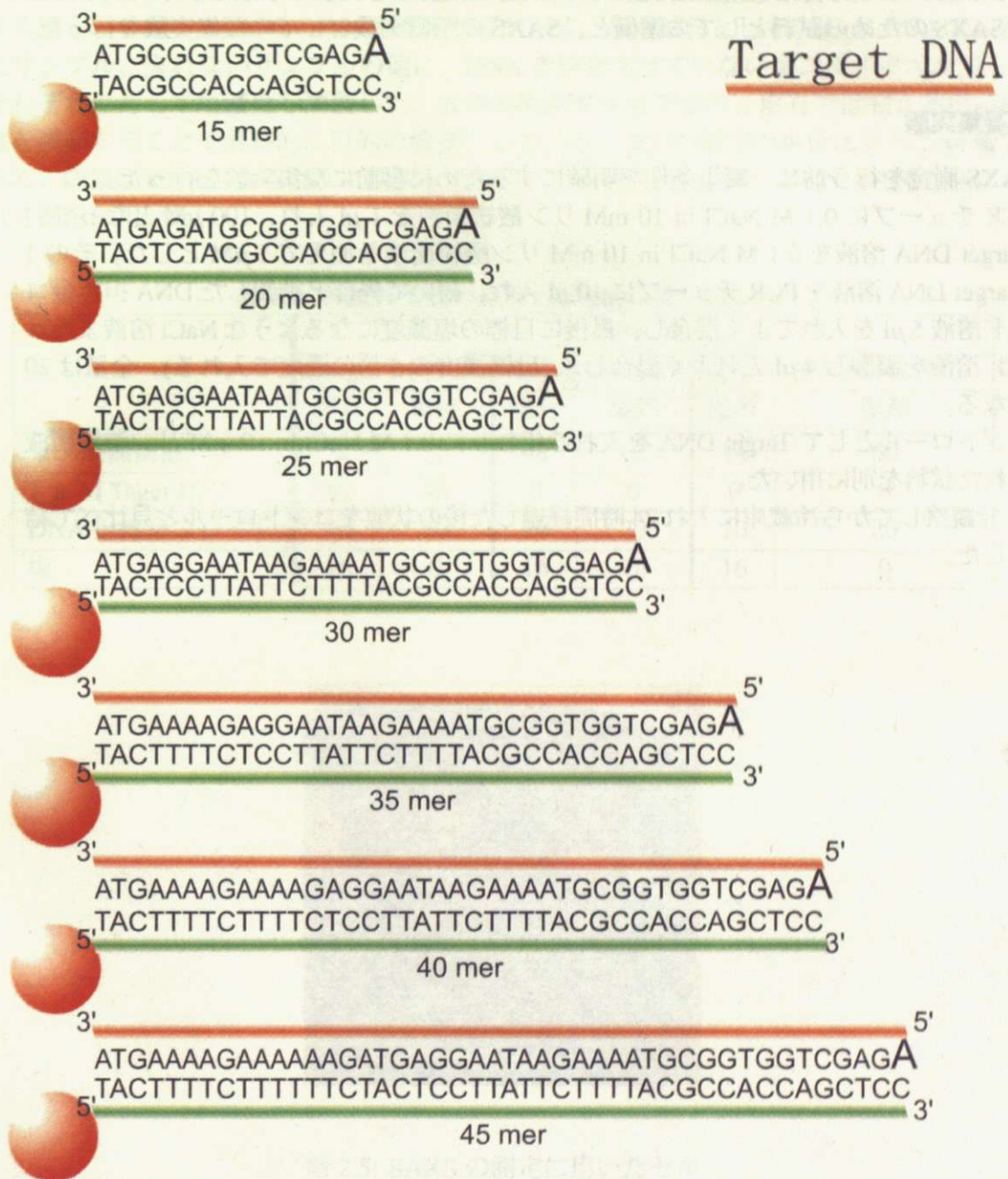


図 2.4: target DNA (末端一塩基変異) の塩基配列

2.1.4 凝集実験

これまでの手順で得た DNA 担持金コロイドを凝集させる実験の手順を以下に示す。今回は SAXS のための試料としての準備と、SAXS の予備実験としての凝集実験を行った。

事前凝集実験

SAXS 測定を行う前に、凝集条件を明確にするために事前に凝集実験を行った。

PCR チューブに 0.1 M NaCl in 10 mM リン酸緩衝液を 1 μ l 入れ、100 μ M となっている Target DNA 溶液を 0.1 M NaCl in 10 mM リン酸緩衝液を加えて 1 μ M とした。その 1 μ M target DNA 溶液を PCR チューブに 10 μ l 入れ、続いて先ほど調製した DNA 担持金コロイド溶液 5 μ l を入れてよく混合し、最後に目標の塩濃度になるような NaCl 溶液または $MgCl_2$ 溶液を調製し 4 μ l 入れよく混合した (目標濃度の 5 倍の濃度で入れる)。全量は 20 μ l となる。

コントロールとして Target DNA を入れる代わりに 0.1 M NaCl in 10 mM リン酸緩衝液を入れた試料を別に用いた。

10 分観察してから冷蔵庫に入れ 24 時間経過した後の状態をコントロールと見比べて結果とした。

SAXS 試料

SAXS 測定を行うための試料の調製手順は前項の事前凝集実験と同じであるが、量が大きく違うので表 2.2 に試料の作成量をそれぞれ示す。測定試料として、target DNA を入れたサンプル、入れないサンプルの他に、DNA を結合させていない金コロイドを用意し、それぞれに対して塩濃度を調製した。表中の塩無が 0 M であり、塩有では加える塩の濃度を調節することで最終的に目的の濃度に行っている。表中の数字の単位はすべて μl 量である。総量は $80 \mu\text{l}$ となるように調製してあり、うち $50 \mu\text{l}$ を SAXS 用のセル (図 2.5) に入れて撮影に用いた。

表 2.2: 各試料溶液の成分 (各数値の単位は μl)

	試料の種別					
	Target DNA 有		Target DNA 無		金コロイド (DNA 無し)	
	塩有	塩無	塩有	塩無	塩有	塩無
リン酸緩衝液	4	20	44	60	44	60
$1 \mu\text{M}$ Target DNA	40	40	0	0	0	0
DNA 担持金コロイド	20	20	20	20	20	20
塩	16	0	16	0	16	0

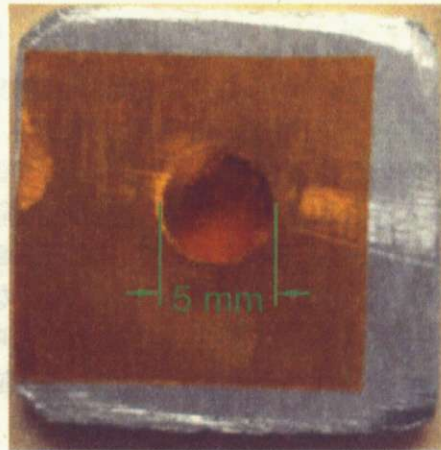


図 2.5: SAXS の測定に用いたセル

2.2 X線小角散乱法 (SAXS)

X線小角散乱法 (Small Angle X-ray Scattering : SAXS) は X線ビームを試料に入射し、散乱された X線の強度の散乱角度依存性を測定するものであり、顕微鏡で観察するには小さすぎ、X線回折では大きすぎて見ることのできない微小粒子や巨大分子集合体などの大きさや形を解析するために用いられる実験手法である。例えば、高分子のラメラ層、コロイド、ミセルなどがこの測定範囲に含まれる。一般的には、 $20 \text{ \AA} - 1000 \text{ \AA}$ 程度のいわゆるメソ構造が対象となる (図 2.6)。

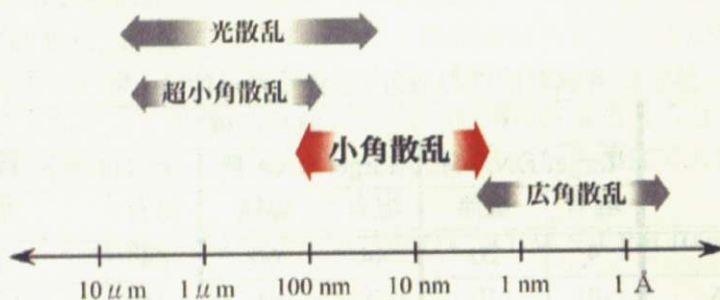


図 2.6: 小角散乱のディメンジョン

2.2.1 SAXSの原理と解析

相互干渉を無視できる“孤立した”粒子からなる単分散系を対象として考えてみる。X線の照射によって引き起こされる粒子内の電子からの2次波は互いに重なり合って散乱波を形成する。図 2.7には球状粒子内の2点について、光路差が波長と等しくなる方向 (2θ) への散乱を示す。この 2θ よりも大きな散乱方向では、粒子内の全ての電子からの散乱は重ね合わせると互いに打ち消しあうように干渉するので、この領域には散乱は観測されないこととなる。一方、より小さな散乱角領域では光路差は小さくなり、散乱波は互いに強めあうような干渉をみせる。このような領域の散乱を小角散乱と呼び、その散乱角 2θ の範囲は $3 \sim 6^\circ$ 程度である。(a)、(b)を見比べるとわかるが大きい粒子の散乱がより小角側に集中することになる。

孤立粒子系 (粒子間干渉のない場合)

基本的に X線は電子により散乱される。今、ある物質内の点 k を考え、図 2.8 のように入射光 X線ビーム方向の単位ベクトルを s_0 、ある散乱方向の単位ベクトルを s とする。 $s' = s - s_0$ と定義し、点 k の位置ベクトルを r_k とすると、原点 O と点 k で散乱角 2θ 方向へ散乱された X線の経路差は $r_k \cdot s'$ となる。X線の波長を λ とすると、この経路差は位相差 ϕ_k に対応する。

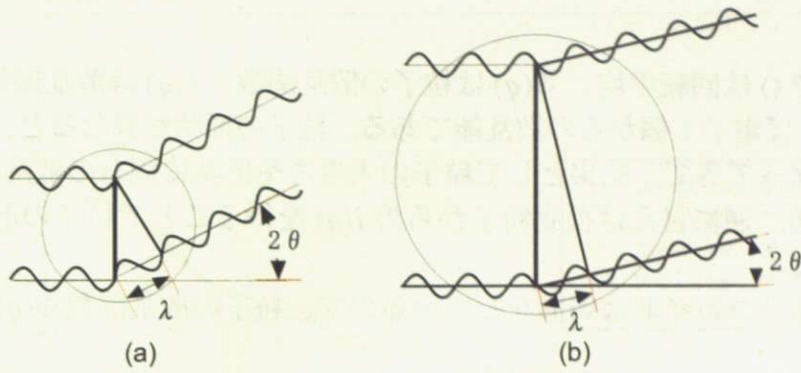


図 2.7: 小粒子 (a) および大粒子 (b) からの散乱

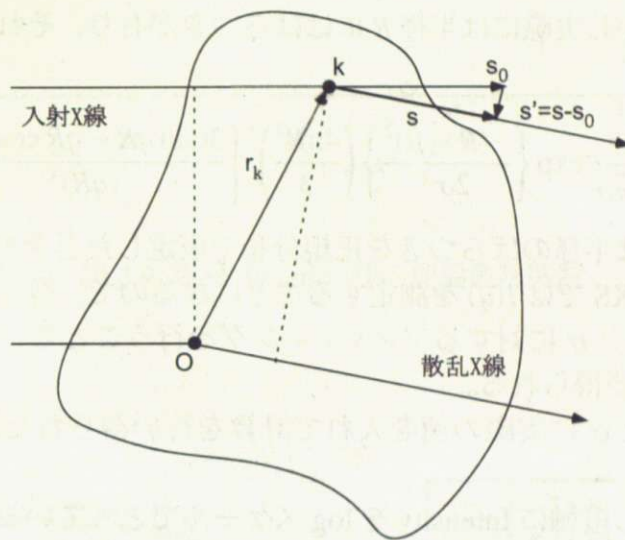


図 2.8: 粒子間干渉のない場合の散乱

ϕ_k は λ を用いて次式で表される。

$$\phi_k = \frac{2\pi(\mathbf{r}_k \cdot \mathbf{s}')}{\lambda} \quad (2.1)$$

散乱ベクトル \mathbf{q} を

$$\mathbf{q} = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \mathbf{s}', \quad q = 4\pi \frac{\sin \theta}{\lambda} \quad (2.2)$$

で定義すると、 ϕ_k は $\mathbf{r}_k \cdot \mathbf{q}$ となる。各散乱角における散乱強度 $I(\mathbf{q})$ はすべての点についてこの位相差を足し合わせたものになり、

$$\begin{aligned} I(\mathbf{q}) &= I_e \Phi(\mathbf{q}) = I_e |f(\mathbf{q})|^2 \\ &= I_e \sum_k b_k^2 |\exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_k)|^2 \end{aligned} \quad (2.3)$$

$$I(q) = \langle I(\mathbf{q}) \rangle \quad (2.4)$$

で表される。ここで $\langle \rangle$ は回転平均、 $\Phi(\mathbf{q})$ は粒子の散乱関数、 $f(\mathbf{q})$ は散乱振幅、 b_k は点 k における散乱能、 I_e は電子 1 個からの散乱能である。粒子の形状が異なると、位相差を足し合わせる点が異なってきて、結果として粒子の大きさや形状に固有の散乱関数 $\Phi(\mathbf{q})$ が得られることになる。逆に言えば孤立粒子からの $I(q)$ を得ることで粒子の形状と大きさがわかることになる。

今回測定に用いる金コロイドは球形をしているので、粒子の散乱関数 $\Phi(\mathbf{q})$ は球の理論散乱関数

$$I_{th}(q) = \Phi^2(q) = \left[\frac{3(\sin x - x \cos x)}{x^3} \right]^2, \quad x = qR \quad (2.5)$$

になるはずである¹³⁾。しかし実際には半径 R にはばらつきがあり、それを考慮すると得られる散乱強度は

$$I(q) \propto \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp\left\{ -\frac{(R-\mu)^2}{2\sigma^2} \right\} \left(\frac{4\pi R^3}{3} \right)^2 \left[\frac{3(\sin qR - qR \cos qR)}{(qR)^3} \right]^2 dR \quad (2.6)$$

で与えられる。ここで μ は半径のばらつきを正規分布で仮定したときの半径の平均、 σ はその標準偏差である。SAXS では $I(q)$ を測定することになるので、得られた $I(q)$ vs q について、式 (2.6) を用いて μ と σ に対するフィッティングを行うことで、金コロイドの半径の平均値 μ と標準偏差 σ が得られる。

例として式 (2.6) の μ と σ に実際の値を入れて計算を行い得られた散乱関数を図 2.9、2.10 に示した。

両図ともに横軸を q とし縦軸に Intensity を log スケールでとっている。図 2.9 と 2.10 を見比べてみると、直径が 40 nm である図 2.9 の曲線の方が、直径が 15 nm である図 2.10 の曲線よりもピークと溝が小角側にあり、さらにピーク間の周期が短いことがわかる。またそれぞれの図において標準偏差の変化に着目すると、標準偏差が大きくなるにつれて、溝が埋まってくるのがわかる。

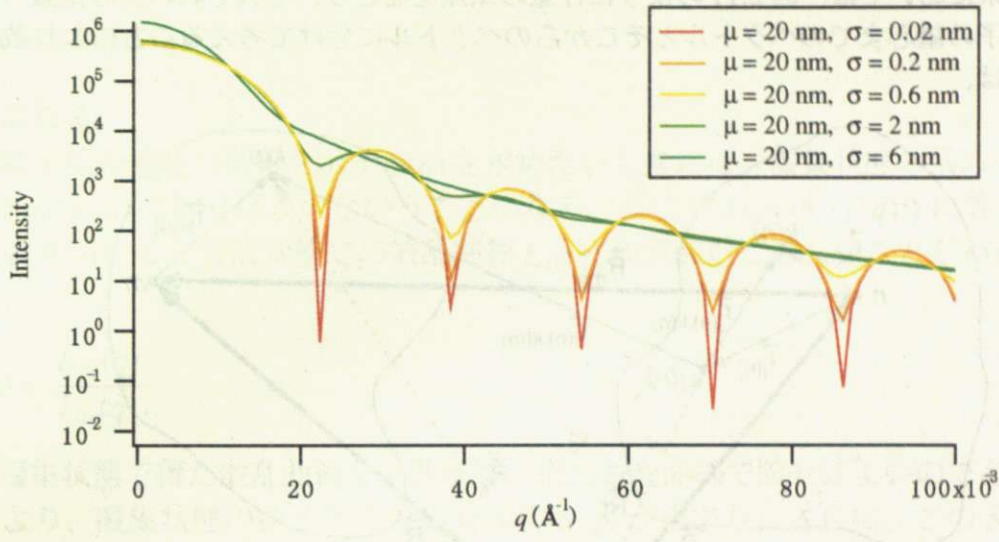


図 2.9: 直径 40 nm の球の理論散乱関数

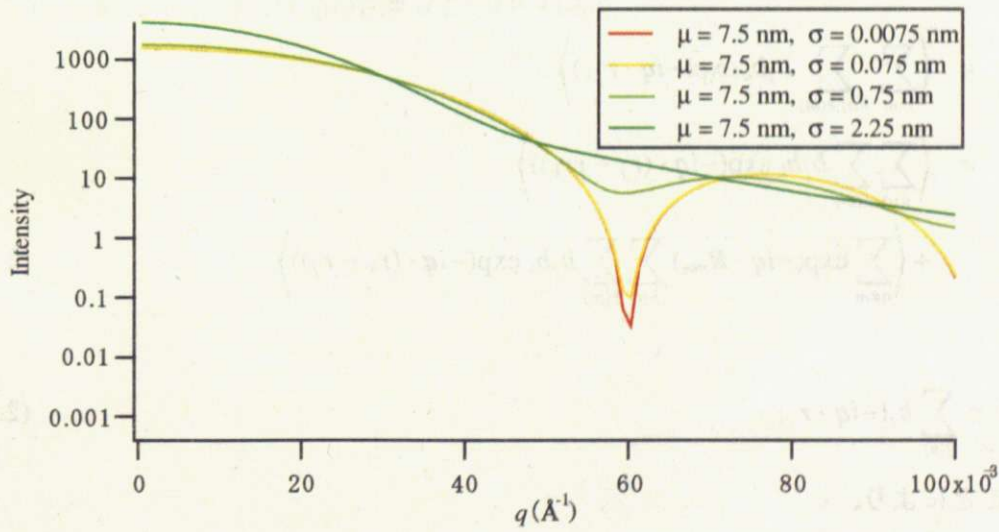


図 2.10: 直径 15 nm の球の理論散乱関数

多粒子系 (粒子間干渉のある場合)

多粒子系においては、図 2.11 のように任意の原点ををとり、それぞれの点の位置ベクトルを粒子の重心までのベクトルとそこからのベクトルに分けて考えることにより散乱強度 $I(q)$ は、

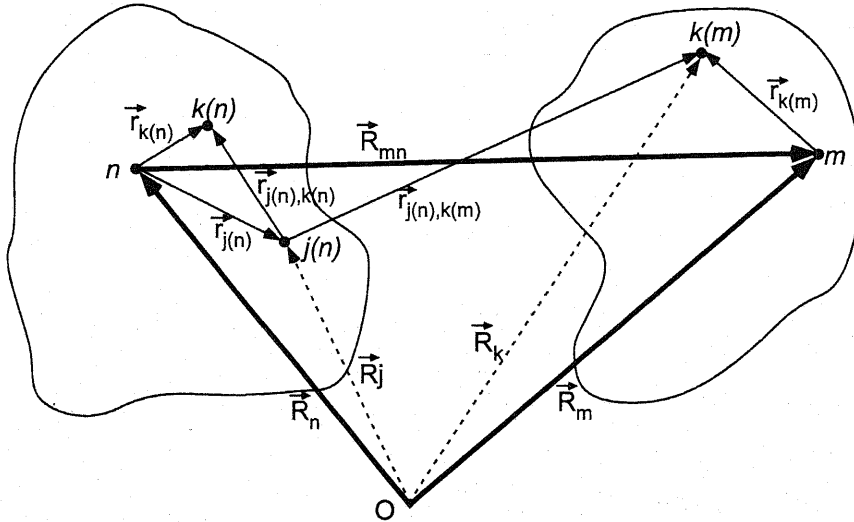


図 2.11: 多粒子系での粒子内、粒子間干渉

$$\begin{aligned}
 I(q) &= \left\langle \sum_{n,m} \sum_{j(n),k(m)} b_j b_k \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_{j,k}) \right\rangle \\
 &= \left\langle \sum_{j(n)} \sum_{k(m)} b_j b_k \exp(-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_j - \mathbf{r}_k)) \right\rangle \\
 &\quad + \left\langle \sum_{n \neq m} \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_{mn}) \sum_{j(n)} \sum_{k(m)} b_j b_k \exp(-i\mathbf{q} \cdot (\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_j)) \right\rangle
 \end{aligned} \tag{2.7}$$

が得られ、

$$f(\mathbf{q}) = \sum_{j(n)} b_j (-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j) \tag{2.8}$$

を用いることにより、

$$\begin{aligned}
 I(q) &= N \langle |f(\mathbf{q})|^2 \rangle + N \langle |f(\mathbf{q})|^2 \rangle^2 \left\langle \sum_{n \neq m} \exp(-i\mathbf{q} \cdot \mathbf{R}_{mn}) \right\rangle \\
 &= N \langle |f(\mathbf{q})|^2 \rangle + N \langle |f(\mathbf{q})|^2 \rangle^2 (S(q) - 1) \\
 &= N [S(q) \langle |f(\mathbf{q})|^2 \rangle + \{ \langle |f(\mathbf{q})|^2 \rangle - \langle |f(\mathbf{q})|^2 \rangle^2 \}]
 \end{aligned} \tag{2.9}$$

が最終的に得られる。ここで $S(q)$ は粒子間構造因子 (Structure factor) であり、 N は粒子数である。

粒子が単分散に近い系では $\langle f^2 \rangle \approx \langle f \rangle^2$ である。これを $F(q)$ とおくと式 (2.9) は

$$I(q) \sim NF(q)S(q) \quad (2.10)$$

という形になる。

よって粒子間の構造の情報を出す $S(q)$ を求めたいときには、凝集状態の系の $I_{agg}(q)$ を計測しそれを $F(q)$ で除せばよいということになる。ここで $F(q)$ は $\langle f(q)^2 \rangle$ に等しく、式 (2.3)、(2.4) を用いると分散状態での散乱関数 $I_{dis}(q)$ の定数倍に等しいことがわかる。すなわち

$$S(q) \propto \frac{I_{agg}(q)}{I_{dis}(q)} \quad (2.11)$$

であり、凝集状態で得た散乱曲線を分散状態で得た散乱曲線で除せばよいのである。

これにより、凝集状態の粒子間の構造を出す $S(q)$ が求まり、さらに、この $S(q)$ を式 (2.12) をもちいて逆フーリエ変換することで実空間での粒子の存在確率を示す対分布関数 (Pair distribution function)、 $g(r)$ が求まる

$$g(r) = 1 + \frac{\rho r}{2\pi^2} \int q(S(q) - 1) \sin(qr) dq \quad (2.12)$$

このピークの位置から粒子中心間距離 d が得られる。

2.2.2 測定環境

今回の SAXS による測定は、高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory (図 2.12) の放射光を用いて行った。

放射光とは、高エネルギーの電子が磁場の中を運動し、磁場によるローレンツ力を受けて運動方向を変えると、それにともなって接線方向に放射される電磁波のことである。その特徴としては

1. 高指向性 …… 指向性が強く、ほとんど平行光に近い
2. 白色性 …… 紫外領域から X 線領域まで、滑らかな連続スペクトルである
3. 高輝度性 …… 実験室系の光源と比較して、その輝度が大きい
4. 偏光特性 …… 軌道面で直線偏光である

などが挙げられる。



図 2.12: 高エネルギー加速器研究機構

光学系

今回用いたビームラインは Photon Factory (PF) の BL15A である。このビームラインは X 線小角散乱実験を行うことを主目的としたステーションである。光学系は、輝度の高い集光単色 X 線を得るための湾曲全反射ミラー及び湾曲結晶モノクロメータの光学素子からなる (図 2.13)。

湾曲全反射ミラーは、長さ 100 cm の Pt コート溶融石英を用い、垂直方向 0.3 mrad の X 線束の収束及び短波長領域の X 線の除去を行う。湾曲結晶モノクロメータは、ミラー下

表 2.3: KEK-PF リングの性能

最大貯蔵電子エネルギー	2.5 GeV
最大貯蔵電流強度	450 mA
電磁石磁場の強さ	1 T
貯蔵電子ビームの寿命	60 時間以上
代表的な放射光のエネルギー	4 keV
(代表的な放射光の波長)	3 Å
エミッタンス	30 nmrad

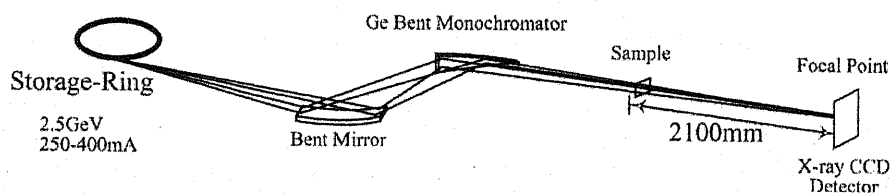


図 2.13: 光学系

流に位置し、円筒面に湾曲させた三角形単結晶で水平方向 1.2 mrad の X 線の集光及び単色化を行う。BL15-A の性能を表 2.4 に示す。

今回の実験では検出器に CCD 型 X 線検出器を用いた。また、一回ごとの読み取り時間については露光時間 1 秒 × 1 回の測定では、濃度が薄かったため余りはっきりと散乱像が取れなかったためそれぞれのサンプルについて必要回数積算し結果として用いた。光学系の設定については表 2.5 に示す。

表 2.4: BL15A の性能

エネルギー領域	波長 1.5 Å (8.3 keV)
分解能 ($\Delta E / E$)	$\sim 3 \times 10^{-3}$
ビームサイズ (焦点位置)	横 0.35 mm × 縦 0.53 mm (理論値)
ビーム強度 (Flux)	$\sim 1 \times 10^{11}$ photons / sec

表 2.5: BL15A での光学系の設定

波長	1.5 Å(8 keV)
ミラースリット	横 3 mm × 縦 1.8 mm
スリット 1	横 1.2 mm × 縦 1 mm
カメラ長	2100 mm(実測)
ビームストップ直径	7 mm
小角分解能	$q \approx 0.008 \text{ \AA}^{-1}$ ($d \approx 800 \text{ \AA}$)
露光時間	1 秒 × 10 回

第3章 実験結果

3.1 凝集実験結果

2.1.4節において説明した凝集実験の結果を以下に示す。表3.1はTarget DNAを加えたとき、表3.2は相補鎖のtarget DNAを加えたとき、表3.3は末端一塩基変異となっているtarget DNAを加えたときに、DNA担持金コロイドが凝集の有無を表している。○が凝集を、×が分散したままであることを表している。

塩(NaCl)がない状態ではいずれの場合も分散状態であった。target DNAがない場合は塩を入れてもほとんど分散しているが、target DNAが相補鎖の場合には塩を加えると凝集が起こることがわかる。また、DNAの塩基数が15の試料についてはtarget DNAが相補鎖の場合には塩を加えると凝集していたのに、target DNAが末端一塩基変異の場合には分散しているのが分かる、すなわちtarget DNAの末端の一塩基の違いによって、凝集と分散の間で大きな変化が見られた。

表 3.1: target DNA がない場合

NaCl濃度(M)	DNA(塩基数)		
	15	30	45
0.0	×	×	×
0.5	×	×	×
1.0	×	×	×

表 3.2: target DNA が相補鎖の場合

NaCl濃度(M)	DNA (塩基数)		
	15	30	45
0.0	×	×	×
0.5	○	○	○
1.0	○	○	○

表 3.3: target DNA が末端一塩基変異の場合

NaCl濃度(M)	DNA (塩基数)
	15(末端一塩基変異)
0.0	×
0.5	×
1.0	×

3.2 SAXSの測定結果

表2.2の条件で調製した試料を用い、フォトンファクトリーBL15Aにおいて表2.5の設定でSAXSの測定を行った結果を示す。なお、すべての散乱情報はCCDカメラで2次元の強度分布として得られるが、強度と散乱ベクトルの散乱曲線に変換する際、散乱ベクトル q への変換にはベヘン酸銀の58.38 Åのピークを利用した。ベヘン酸銀からの散乱を示す(図3.1)。この2次元の散乱イメージを円環平均し、散乱ベクトル q に対して強度をプロットした散乱曲線を図3.2に示す。

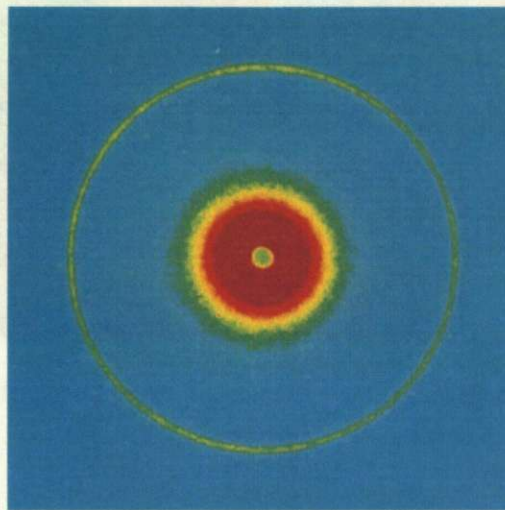


図 3.1: ベヘン酸銀からの散乱

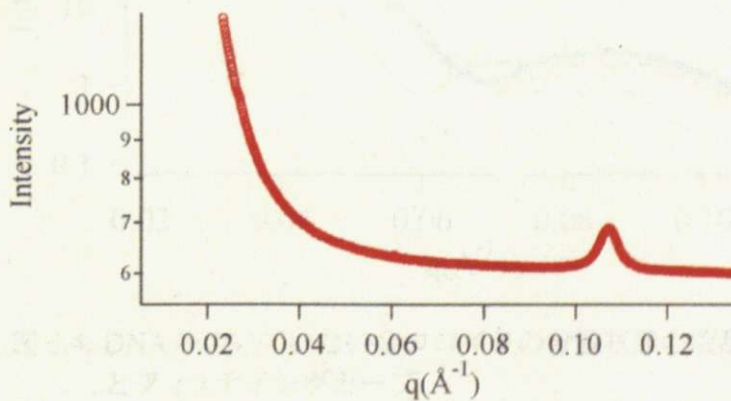


図 3.2: ベヘン酸銀散乱曲線

3.2.1 DNA のついていない金コロイドのみの散乱

粒子間の構造を知るためには、式(2.11)によれば、凝集状態だけではなく粒子間相互作用のない分散状態での測定が必要である。そのために、金コロイド溶液中に塩を加えていない分散状態での SAXS の測定結果を示す。

図 3.3 は表面に DNA を修飾していない金コロイドの散乱強度の二次元イメージである。散乱パターンは等方的であり、大まかに見て外側に向かうほど強度が弱くなっているのが分かる。それを円環平均し q に対してプロットしたものが図 3.4 の赤い円である。図 3.4 の青の実線は式(2.6)の理論散乱曲線でフィッティングした結果である。図を見る限り、球の理論散乱関数でよくフィッティングされている。フィッティングの結果、粒径 13 nm, 標準偏差 1.1 nm 程度であることが分かった。緑の実線は粒径 15nm の理論曲線であり測定結果とは大きく異なる。また q の増加に伴ってピークと溝ができていくのがわかる。

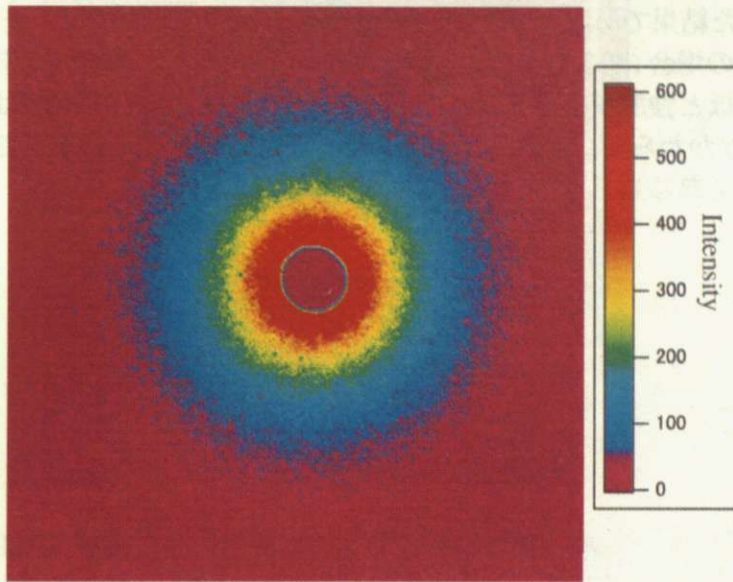


図 3.3: DNA のついていない金コロイドの分散状態の散乱パターン

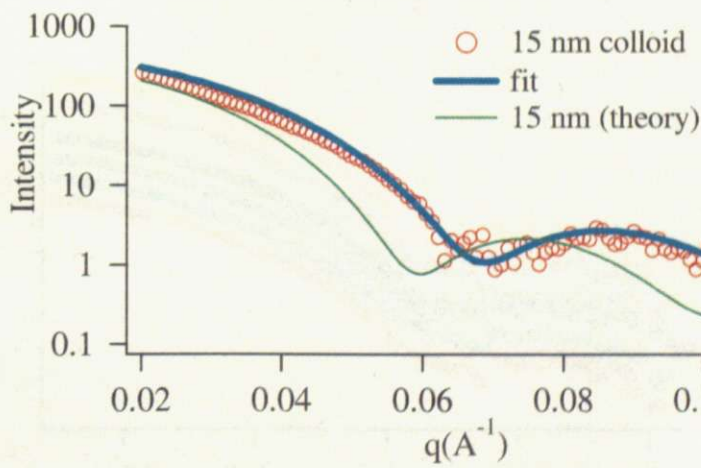


図 3.4: DNA のついていない金コロイドの分散状態の散乱曲線とフィッティングカーブ

3.2.2 target DNA が完全相補鎖の場合 (分散状態)

図 3.5 は DNA 担持金コロイドに、完全相補となる target DNA を加え、塩を加えていない分散状態で測定した結果である。図 3.5 の散乱イメージを見る限りでは、先ほどの DNA がついていない状態の場合 (図 3.3) とほとんど同じように見える。等方的であり、大まかに見ると外側に行くほど強度が小さくなっている。また図 3.6 の散乱曲線では、結合している DNA の長さにかかわらず、ほぼ同じ散乱曲線となっている (そのままでは重なるためそれぞれ定数倍してある)。

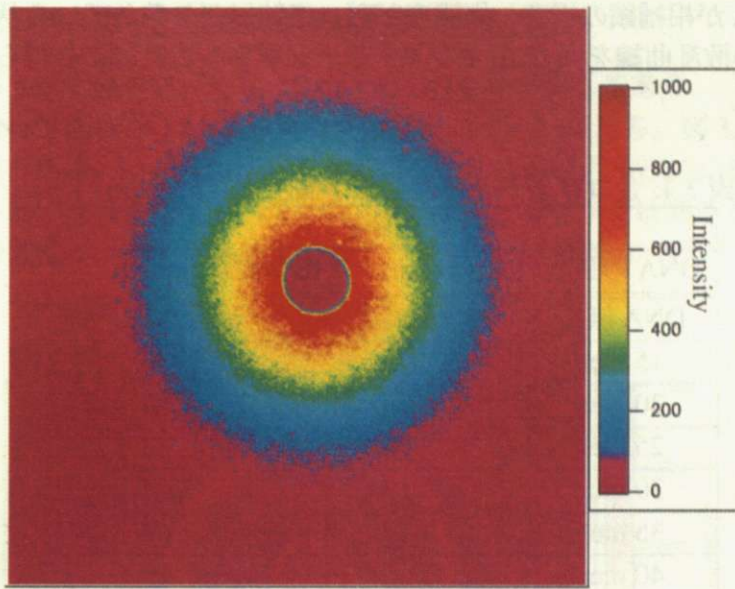


図 3.5: DNA を結合させた金コロイドの分散状態の散乱パターン
(粒径 15 nm、DNA15 mer、完全相補鎖、塩無し)

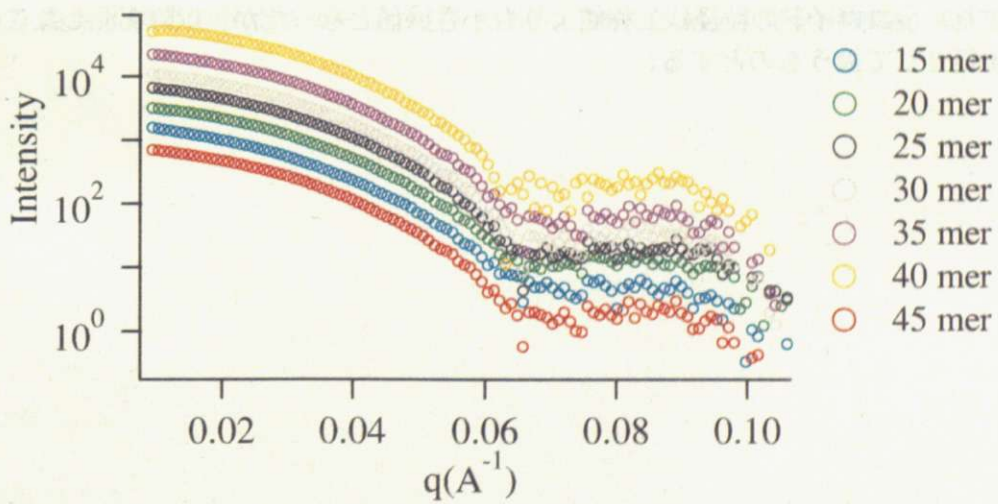


図 3.6: DNA を結合させた金コロイドの分散状態の散乱曲線
(粒径 15 nm、DNA15 - 45 mer、完全相補鎖、塩無し)

以上が target DNA が相補鎖の場合、塩濃度がゼロで粒子が分散している状態の結果である。図 3.4、3.6 の散乱曲線を式 (2.6) でフィッティングすることにより得られた粒子の情報を表 3.4 に示す。

表 3.4: 金コロイドの粒径と標準偏差 (粒径 15nm)

粒径 15 nm		
DNA の長さ	粒径 (nm)	標準偏差 (nm)
DNA 無し	13	1.1
15 mer	13	1.4
20 mer	13	1.4
25 mer	13	1.4
30 mer	13	1.4
35 mer	13	1.4
40 mer	13	1.4
45 mer	13	1.4

粒径の平均、分散ともに、DNA の長さに伴う系統的な変化は見られず、ほぼ一定の粒径と分散を与える結果となった。DNA からの散乱が反映されるならば、その長さに伴う変化が見られるはずであるので、本実験においては DNA の散乱は金コロイドの散乱に比べ非常に弱く無視できるものと考えられる。これは、X 線が電子によって散乱されるので、DNA に比べ電子密度が非常に大きい金コロイドの散乱が支配的であるためだと考えられる。また、金コロイドの粒径は公称値よりも小さい値となったが、以降実測したこの 13 nm を粒径として扱うものとする。

3.2.3 target DNA が完全相補鎖の場合 (凝集状態)

図 3.7 は、13 nm の金コロイドに 15 mer の DNA が修飾してあり、フルマッチとなる DNA を加えて NaCl 濃度を 1 M とした場合の散乱パターンである。図 3.5 は図 3.7 に塩を加える前の状態である。両者を見比べると、塩を加える前はだまかに見ると中心に近づくほど強度が高いという特徴が見られていたのに対して、図 3.7 ではあるところにピークが現れリング状の散乱イメージが確認できる。このピークが凝集に由来するピークである。



図 3.7: 凝集状態での散乱イメージ (粒径 13 nm、DNA 15 mer、完全相補鎖、NaCl 1 M)

図 3.8 は、13 nm の金コロイドに 15 – 45 mer の DNA を修飾し、完全相補となる DNA を加え、さらに NaCl 濃度を 1 M とした場合の散乱曲線である。比較対象として塩を投入していない(分散状態の)場合のグラフも黒色で表示してある。

塩を投入していない散乱曲線では q に対して散乱強度は単調減少であったが、塩を入れることでピークが現れるようになり、粒子が凝集しているのが分かる。また、凝集由来のピークは修飾した DNA が長くなればなるほど q の小さい領域に移動していることが見て取れる。

式 (2.11) により、図 3.8 の凝集状態の散乱曲線をそれぞれの分散状態(黒)の曲線で割ることで粒子間構造因子 $S(q)$ が求まる。それぞれの粒子間構造因子 $S(q)$ を図 3.9 に示す。構造因子に変換したことでピークの位置が明確になった。

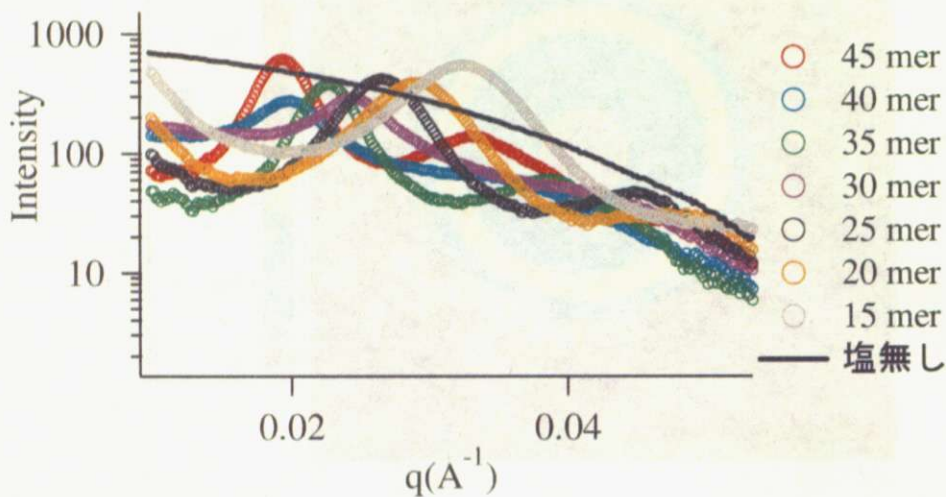


図 3.8: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer、完全相補、NaCl 1 M の場合の散乱曲線

得られた $S(q)$ を式 (2.12) により逆フーリエ変換することで、図 3.10 のような対分布関数 (Pair distribution function) が求まる。これらの対分布関数のピーク位置から中心間距離が得られた。

対分布関数について、塩の種類及び濃度依存性を調べた。それぞれの長さの DNA に対する粒子間構造因子 $S(q)$ と対分布関数 (Pair distribution function) を図 3.11 から 3.24 に示す。それぞれの構造因子を見ると、非常にわずかな差ではあるが塩の濃度が高いほどピークが広角側に出ており、より小さな中心間距離となっていることが分かる。対分布関数も同様に塩の濃度が高いほど中心間距離が小さくなることを示している。

各条件で求めた中心間距離を表??にまとめた。表中の表面間距離は(粒子中心間距離)-(測定により得られた粒径)である。DNA の長さは金コロイドに結合している DNA が二重らせんを形成したときの長さ (B-form を仮定し完全に伸びきったときの長さ) を示している。

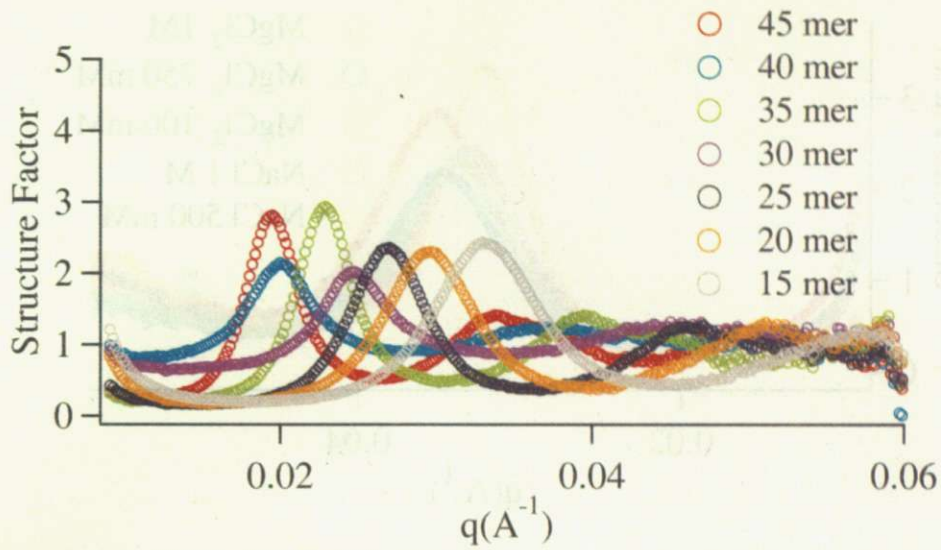


図 3.9: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer、 v 、NaCl 1 M の場合の構造因子

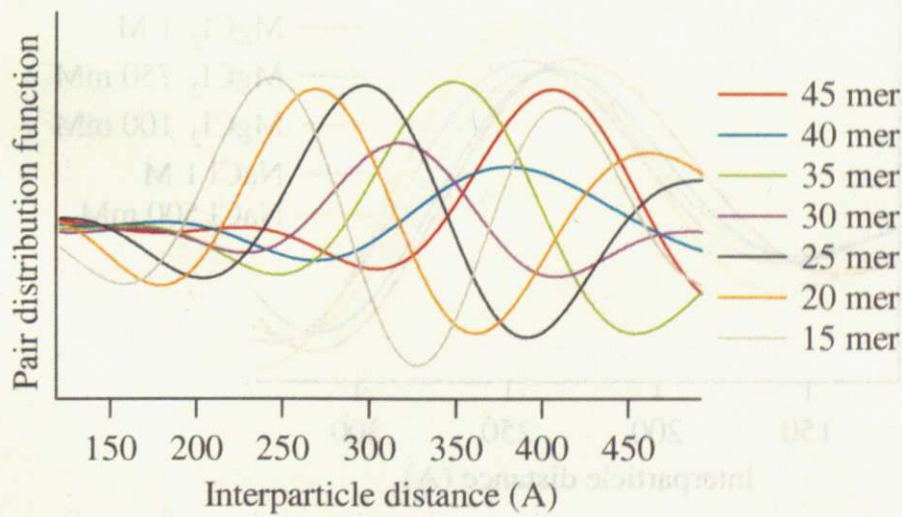


図 3.10: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer、完全相補、NaCl 1 M の場合の対分布関数

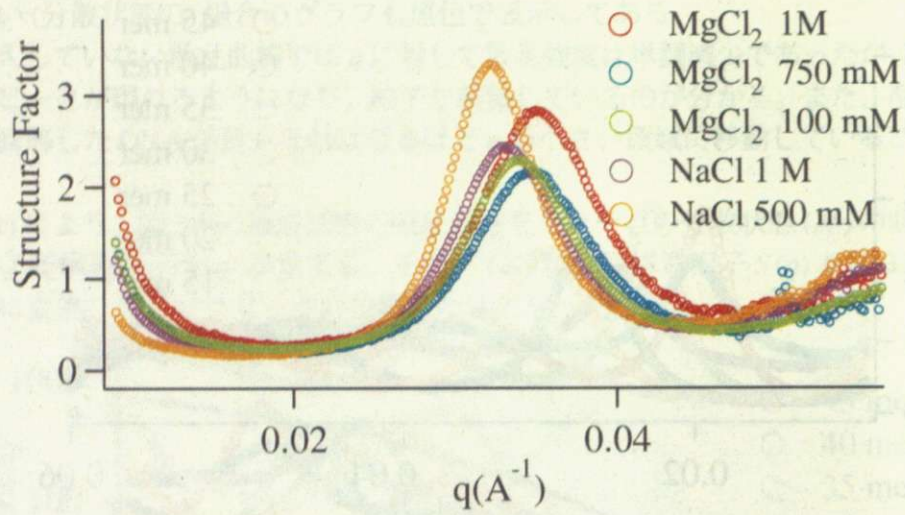


図 3.11: 粒径 13 nm、DNA15 mer、完全相補の場合の構造因子の塩濃度依存性

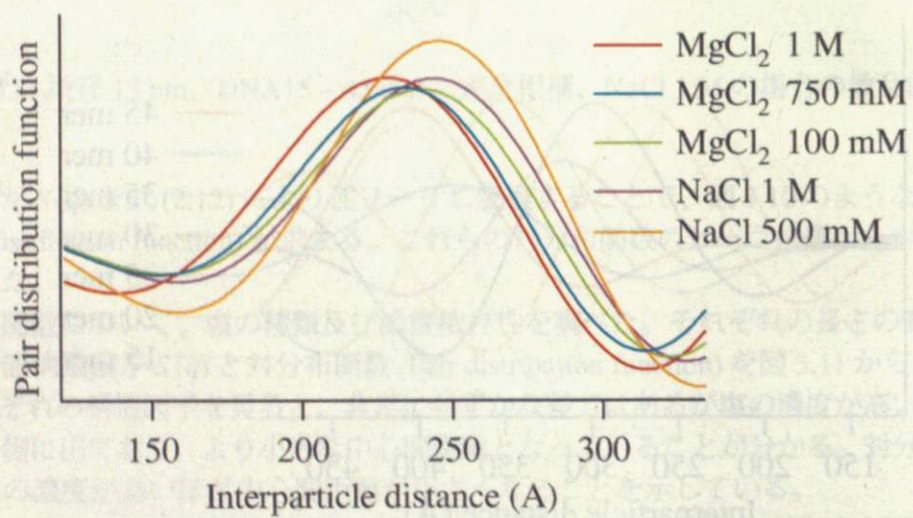


図 3.12: 粒径 13 nm、DNA15 mer、完全相補の場合の対分布関数の塩濃度依存性

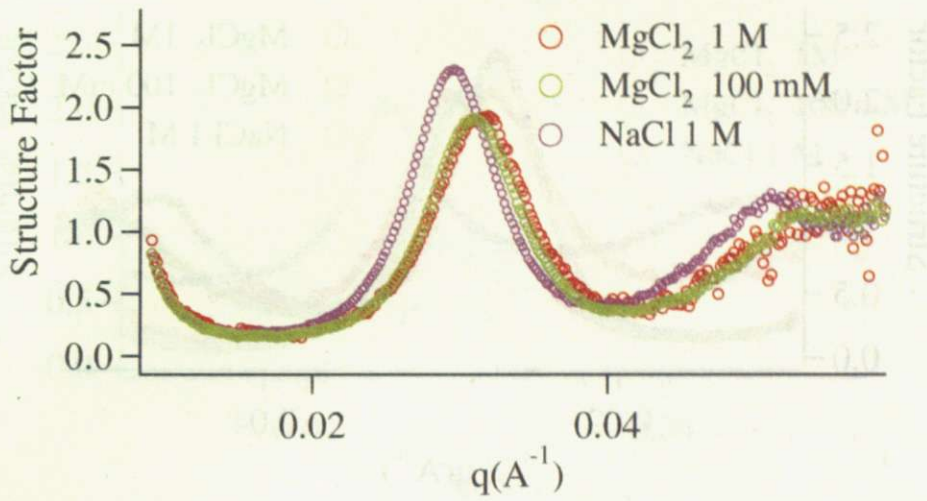


図 3.13: 粒径 13 nm、DNA20 mer、完全相補の場合の構造因子の塩濃度依存性

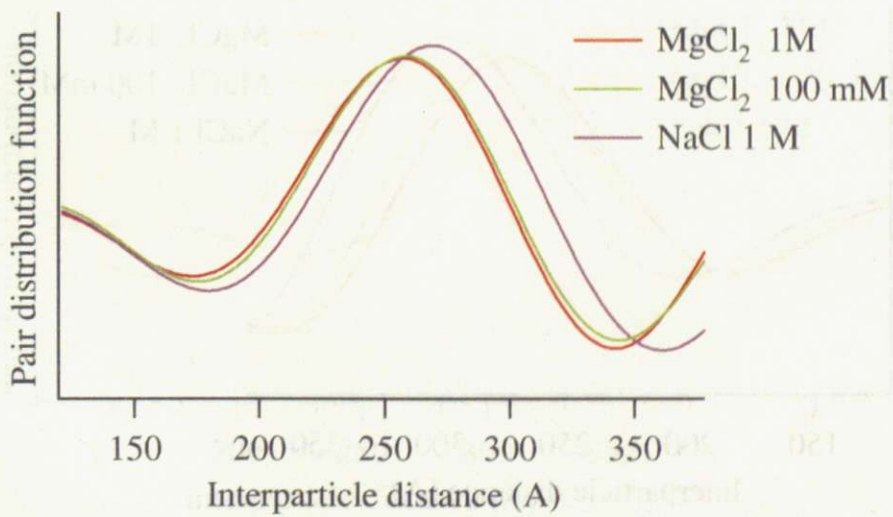


図 3.14: 粒径 13 nm、DNA20mer、完全相補の場合の対分布関数の塩濃度依存性

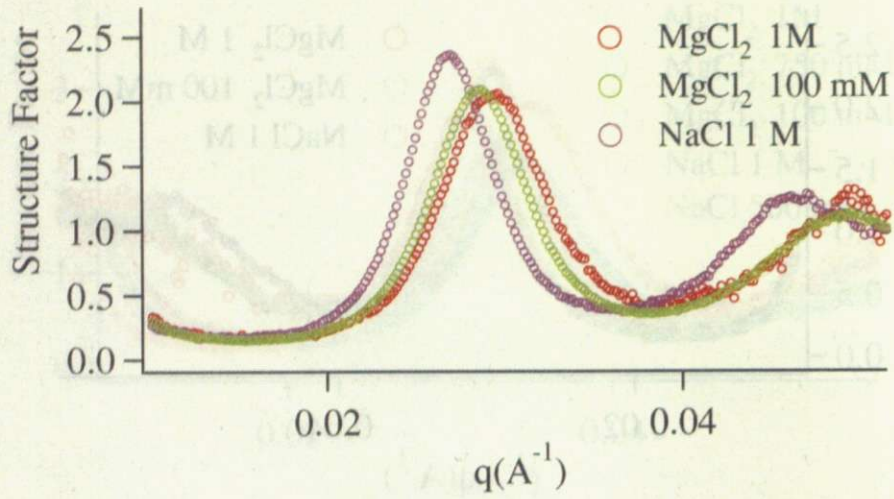


図 3.15: 粒径 13 nm、DNA25 mer、完全相補の場合の構造因子の塩濃度依存性

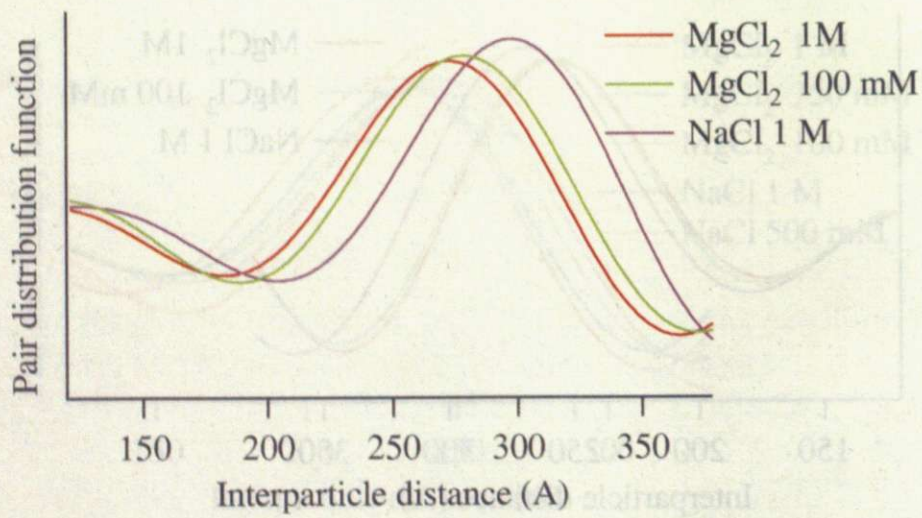


図 3.16: 粒径 13 nm、DNA25 mer、完全相補の場合の対分布関数の塩濃度依存性

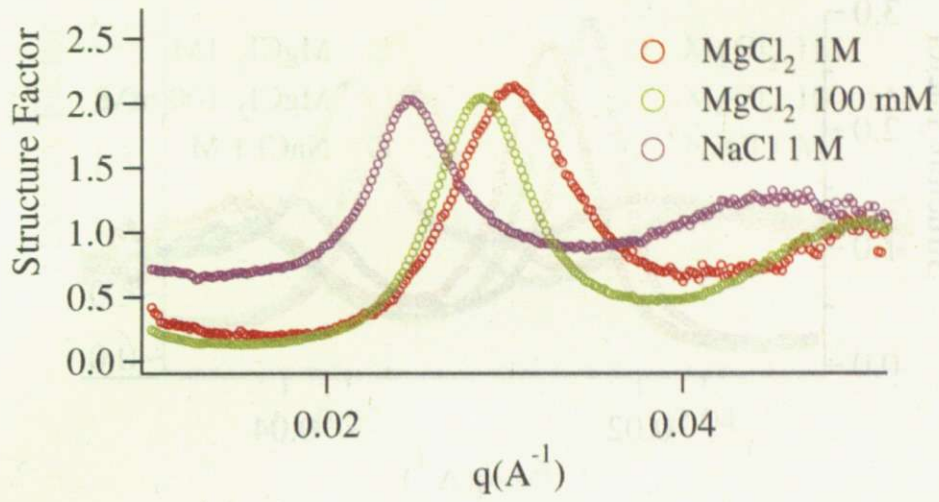


図 3.17: 粒径 13 nm、DNA30 mer、完全相補の場合の構造因子の塩濃度依存性

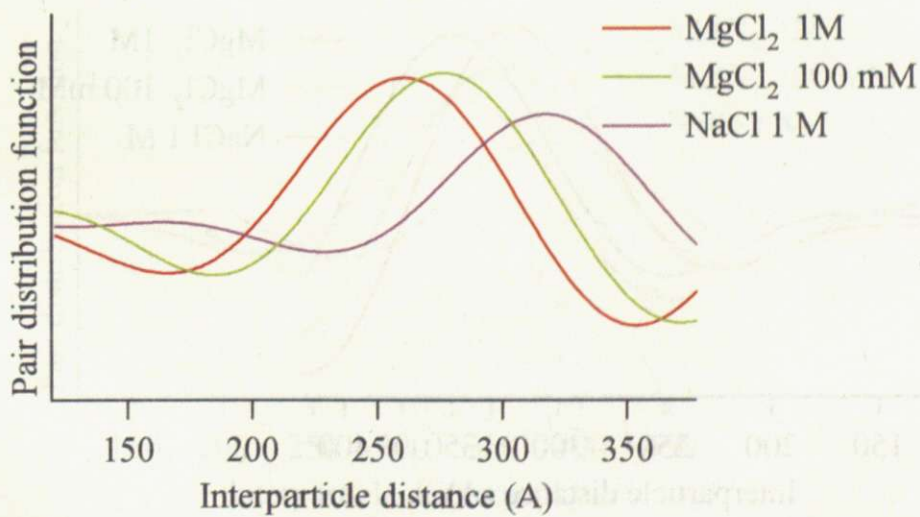


図 3.18: 粒径 13 nm、DNA30 mer、完全相補の場合の対分布関数の塩濃度依存性

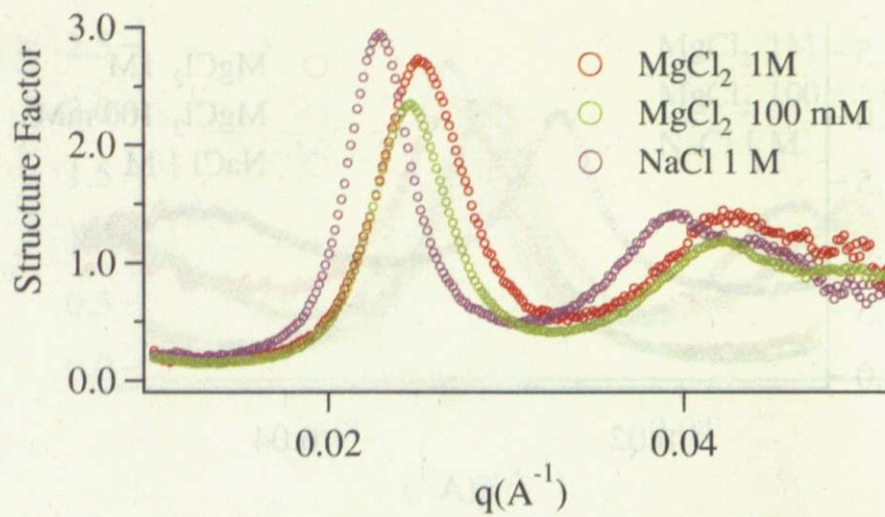


図 3.19: 粒径 13 nm、DNA35 mer、完全相補の場合の構造因子の塩濃度依存性

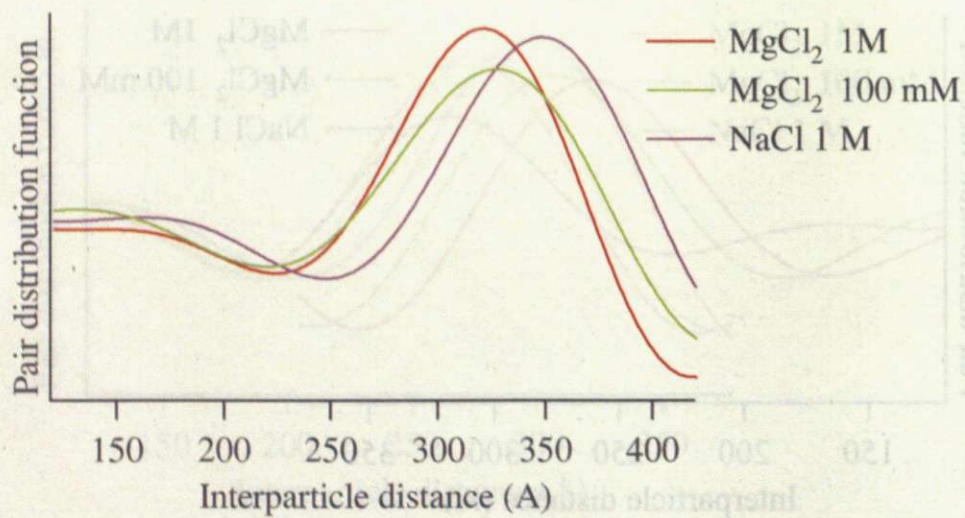


図 3.20: 粒径 13 nm、DNA35 mer、完全相補の場合の対分布関数の塩濃度依存性

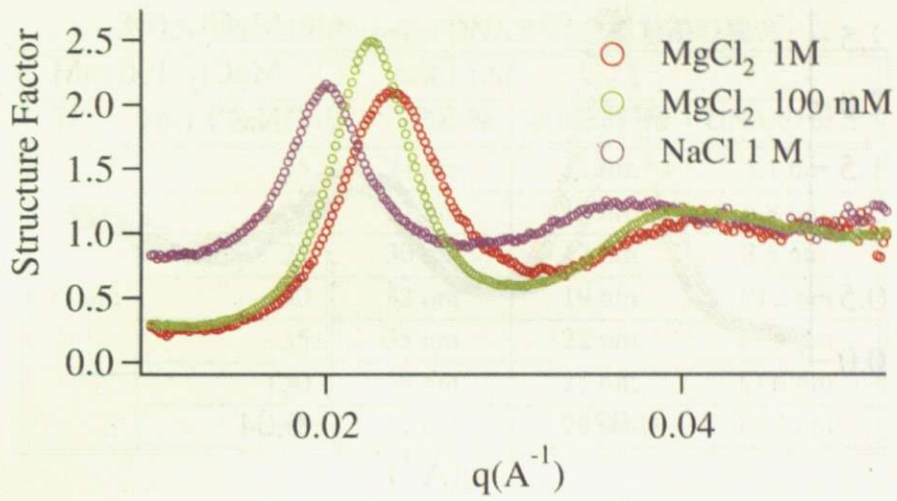


図 3.21: 粒径 13 nm、DNA40 mer、完全相補の場合の構造因子の塩濃度依存性

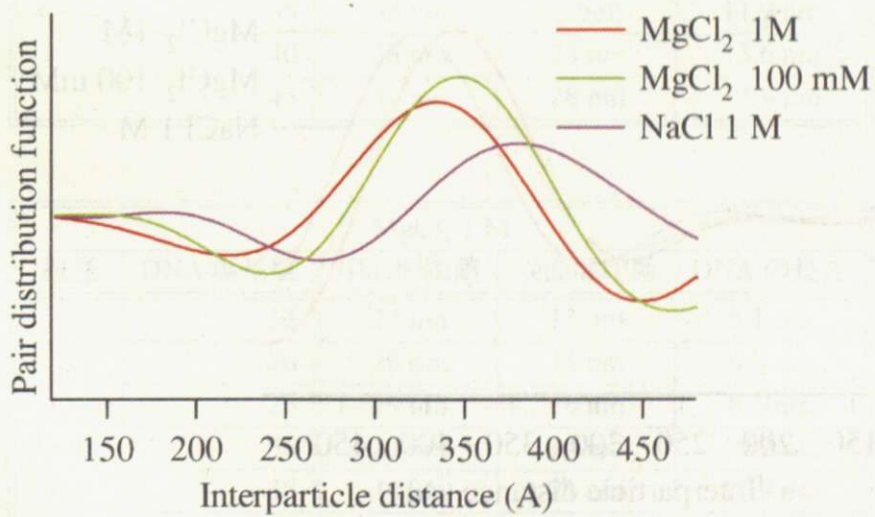


図 3.22: 粒径 13 nm、DNA40 mer、完全相補の場合の対分布関数の塩濃度依存性

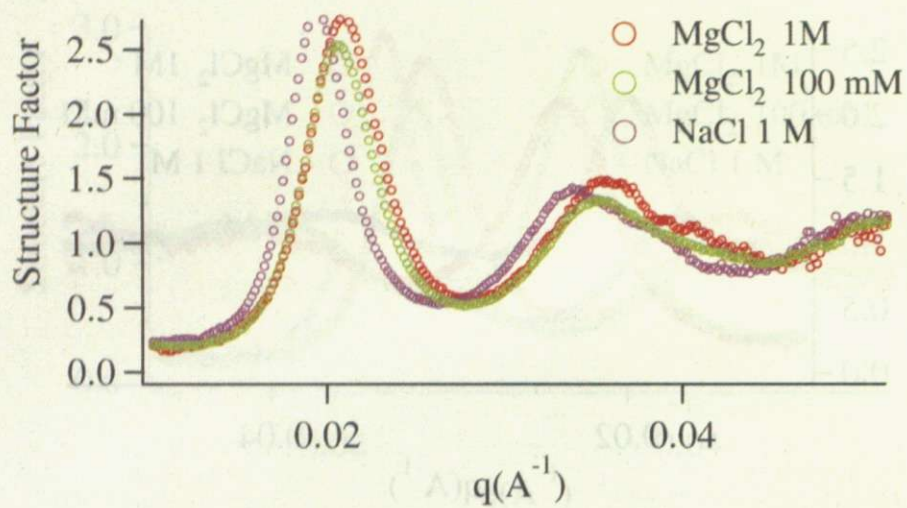


図 3.23: 粒径 13 nm、DNA45 mer、完全相補の場合の構造因子の塩濃度依存性

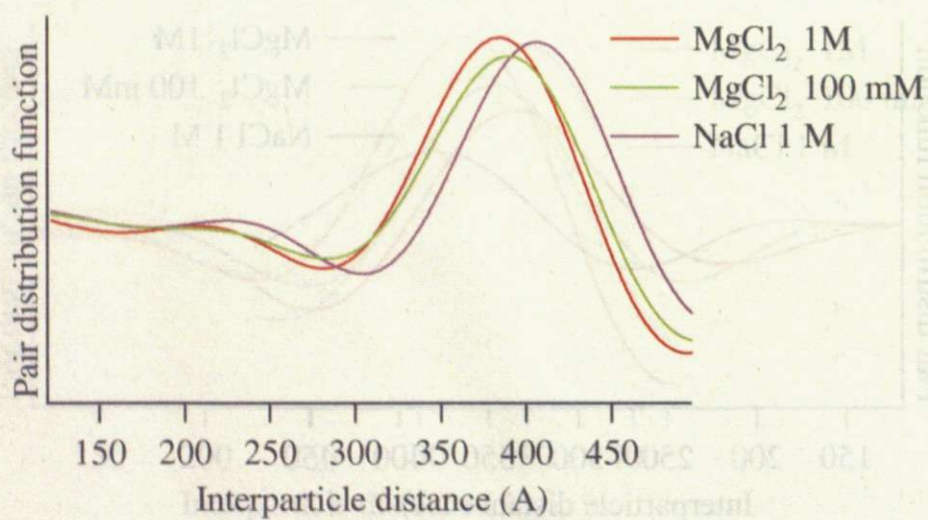


図 3.24: 粒径 13 nm、DNA45 mer、完全相補の場合の対分布関数の塩濃度依存性

表 3.5: 表面間距離 (target DNA が完全相補鎖の場合)

NaCl 1 M				
粒径	DNA 塩基数	中心間距離	表面間距離	DNA の長さ
13 nm	15	24 nm	11 nm	5.1 nm
	20	27 nm	14 nm	6.8 nm
	25	30 nm	17 nm	8.5 nm
	30	32 nm	19 nm	10.2 nm
	35	35 nm	22 nm	11.9 nm
	40	38 nm	25 nm	13.6 nm
	45	41 nm	28 nm	15.3 nm

MgCl ₂ 0.1 M				
粒径	DNA 塩基数	中心間距離	表面間距離	DNA の長さ
13 nm	15	24 nm	11 nm	5.1 nm
	20	26 nm	13 nm	6.8 nm
	25	28 nm	15 nm	8.5 nm
	30	17 nm	19 nm	10.2 nm
	35	35 nm	22 nm	11.9 nm
	40	38 nm	25 nm	13.6 nm
	45	41 nm	28 nm	15.3 nm

MgCl ₂ 1 M				
粒径	DNA 塩基数	中心間距離	表面間距離	DNA の長さ
13 nm	15	25 nm	12 nm	5.1 nm
	20	28 nm	15 nm	6.8 nm
	25	29 nm	16 nm	8.5 nm
	30	27 nm	14 nm	10.2 nm
	35	34 nm	21 nm	11.9 nm
	40	35 nm	22 nm	13.6 nm
	45	42 nm	29 nm	15.3 nm

表 3.6: 表面間距離 (target DNA がフルマッチの場合)

15 mer					
粒径	塩の種類	塩の濃度	中心間距離	表面間距離	DNA の長さ
13 nm	NaCl	500 mM	25 nm	12 nm	5.1 nm
	NaCl	1 M	24 nm	11 nm	5.1 nm
	MgCl ₂	100 mM	24 nm	11 nm	5.1 nm
	MgCl ₂	750 mM	24 nm	11 nm	5.1 nm
	MgCl ₂	1 M	23 nm	10 nm	5.1 nm

3.2.4 target DNA が末端一塩基変異鎖の場合

完全相補鎖を加える代わりに、末端一塩基変異鎖の target DNA の場合に、塩を入れ凝集させた場合の散乱曲線を図 3.27 に示す。本来この試料は凝集しにくく NaCl によって凝集させることはできないが、 $MgCl_2$ を用いることで凝集させて散乱パターンを得ている。この場合も完全相補鎖に塩を加え凝集させた場合と同様に、塩を加えていない状態の散乱曲線とは異なり、ピークが出現している。これらの構造因子を図 3.27 に示す。全体として DNA が長いほど小角側にピークが出ているようであるが、30 mer は 20 mer よりも広角側に出ている。

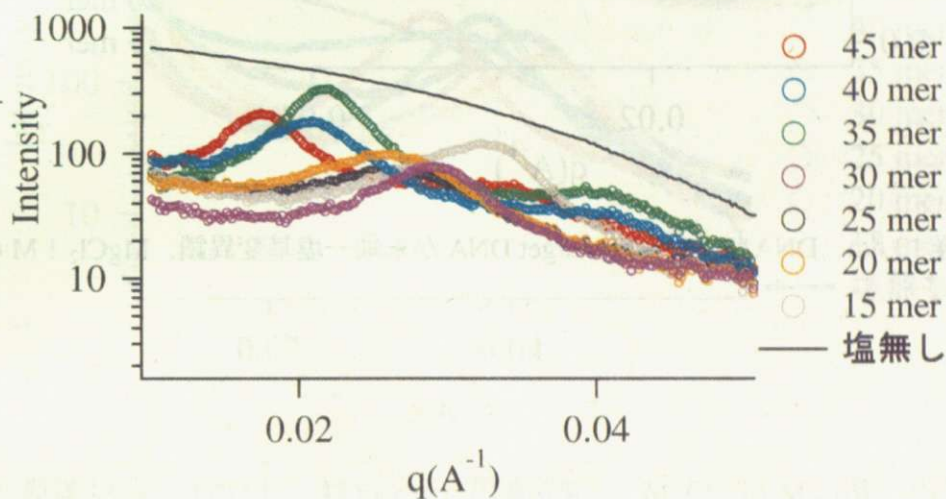


図 3.25: 粒径 13 nm、DNA 15 – 45 mer、arget DNA が末端一塩基変異鎖、 $MgCl_2$ 1 M の場合の散乱曲線)

表 3.7: 表面間距離 (target DNA が末端一塩基変異鎖の場合)

MgCl ₂ 1 M				
粒径	DNA 塩基数	中心間距離	表面間距離	DNA の長さ
13 nm	15	25 nm	12 nm	5.1 nm
	20	28 nm	15 nm	6.8 nm
	25	29 nm	16 nm	8.5 nm
	30	27 nm	14 nm	10.2 nm
	35	34 nm	21 nm	11.9 nm
	40	35 nm	22 nm	13.6 nm
	45	42 nm	29 nm	15.3 nm

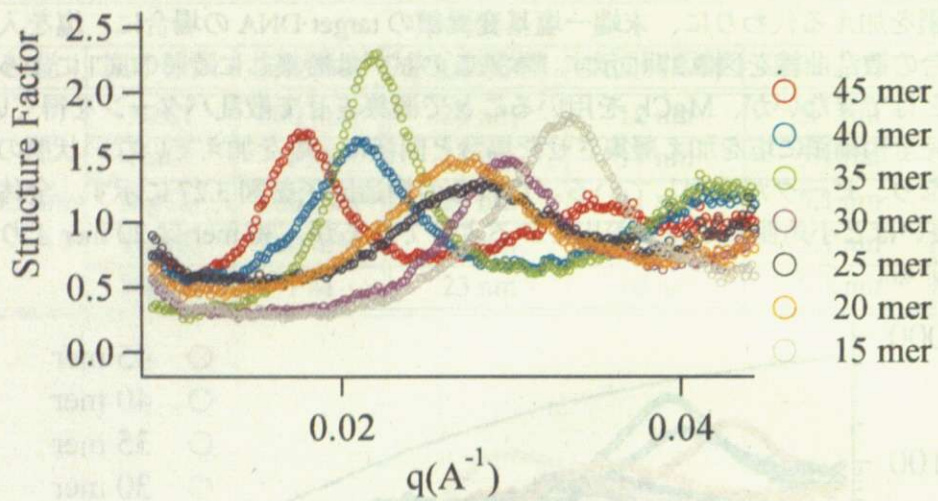


図 3.26: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer、target DNA が末端一塩基変異鎖、 $MgCl_2$ 1 M の場合の構造因子

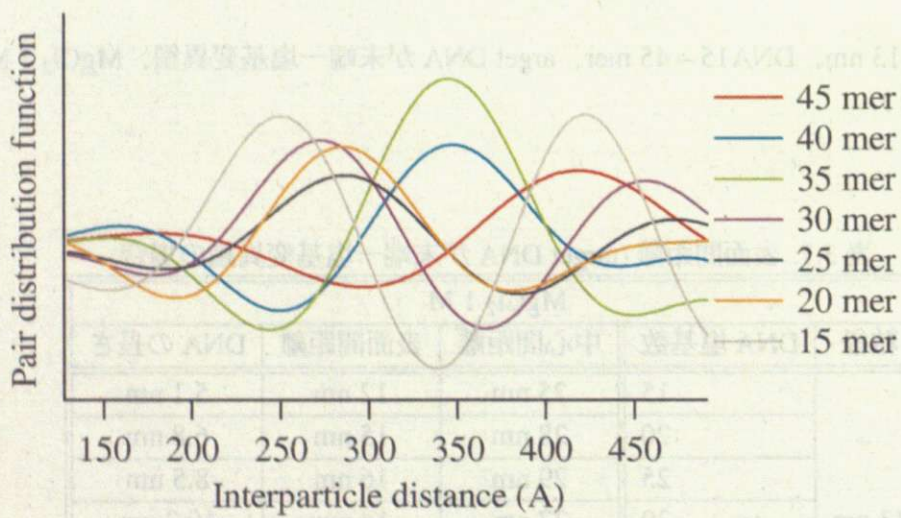


図 3.27: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer、target DNA が末端一塩基変異鎖、 $MgCl_2$ 1 M の場合の対分布関数

3.2.5 target DNAが無い(一本鎖の場合)

今までは溶液中に金コロイドと結合したDNAに対するtarget DNAが存在する場合の結果であったが、ここでは相補鎖が存在しない(したがって金コロイドに結合したDNAは一本鎖状態である)場合に塩を入れて凝集させた場合の結果を示す。target DNAが末端一塩基変異鎖の場合と同様、本来この試料は凝集しにくくNaClによって凝集させることはできないが、 $MgCl_2$ を用いることで凝集させて散乱パターンを得ている。

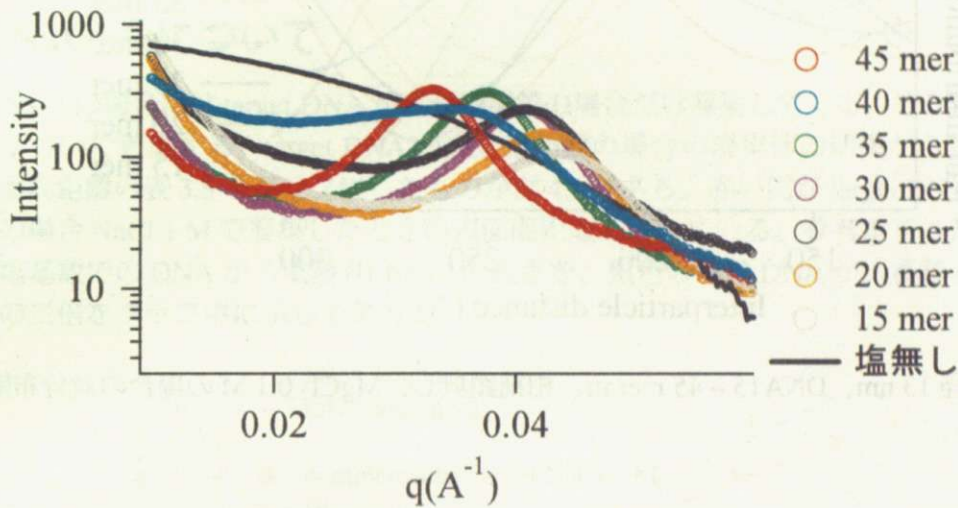


図 3.28: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer m、相補鎖無し、 $MgCl_2$ 0.1 M の場合の散乱曲線

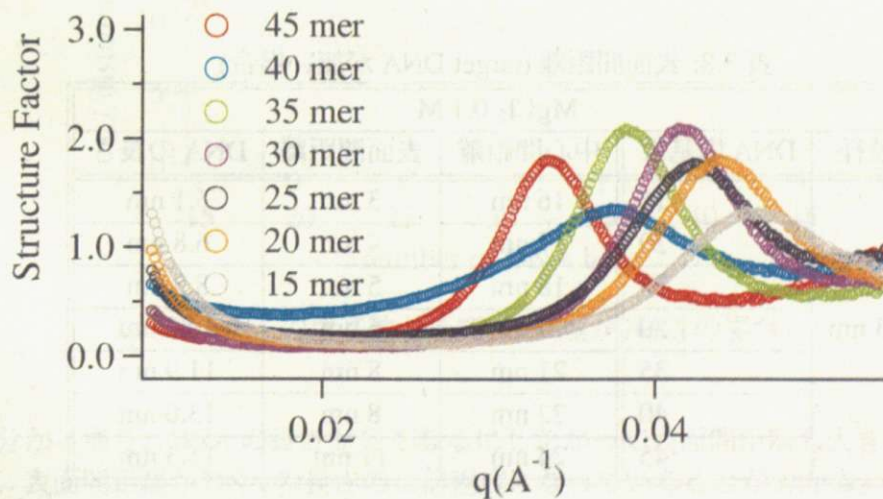


図 3.29: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer m、相補鎖無し、 $MgCl_2$ 0.1 M の場合の構造因子

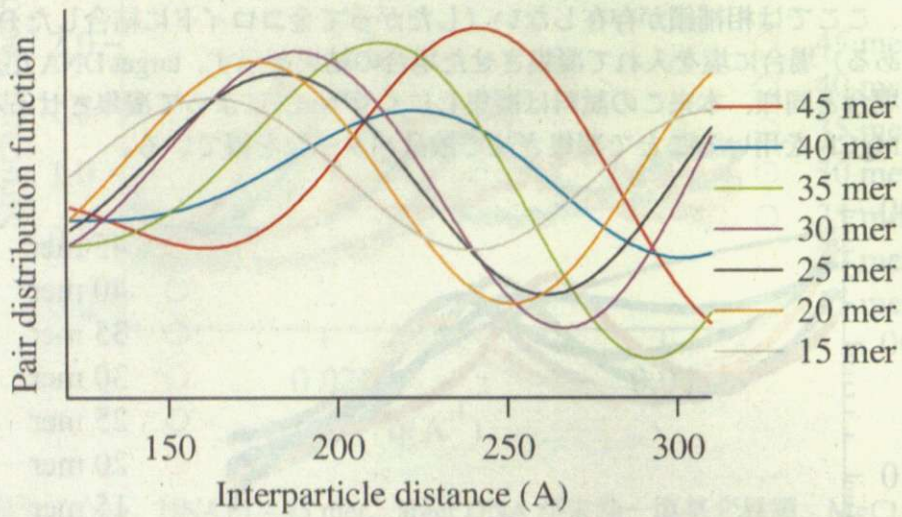


図 3.30: 粒径 13 nm、DNA15 – 45 mer m、相補鎖無し、MgCl₂ 0.1 M の場合の対分布関数

表 3.8: 表面間距離 (target DNA が無い場合)

MgCl ₂ 0.1 M				
粒径	DNA 塩基数	中心間距離	表面間距離	DNA の長さ
13 nm	15	16 nm	3 nm	5.1 nm
	20	17 nm	4 nm	6.8 nm
	25	18 nm	5 nm	8.5 nm
	30	19 nm	6 nm	10.2 nm
	35	21 nm	8 nm	11.9 nm
	40	22 nm	8 nm	13.6 nm
	45	24 nm	11 nm	15.3 nm

第4章 考察

4.1 NaCl系について

塩が NaCl の場合には target DNA が完全相補鎖の場合だけ凝集してくる。その粒子表面間距離について考察する。target DNA が完全相補鎖の場合の凝集体の結果から得られた粒子表面間距離を表 3.5 をグラフにしたものが図 4.1 である。赤い円が target DNA が完全相補鎖の場合 NaCl 1 M で凝集したときの表面間距離を表している。参考までに茶色の線でその塩基数での DNA が二重鎖 (B-form) の長さを、黒色の線で DNA が二重鎖 (B-form) の長さの二倍をグラフ中に示してある。

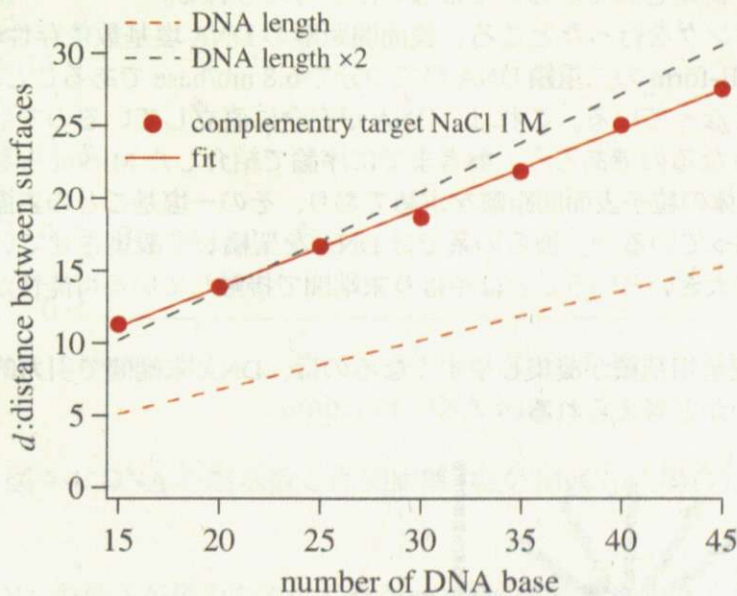


図 4.1: DNA の塩基数と面間距離 (塩が NaCl の場合)

図から分かる通り、DNA の長さが長くなるにしたがって表面間距離も大きくなっている。また、表面間距離が DNA の長さの二倍程度になっていることが分かる。まず、このことから、金コロイド表面で形成した二重鎖はその表面に対して直立に近い状態になっていると考えられる。なぜならば、そうでなければこれほど大きな表面間距離で金コロイドが凝集することはなく、もっと近い表面間距離が観測されるはずだからである。また、

DNAの二倍に近い表面間距離は、粒子同士に結合しているDNAが互いに入り組むことなく、DNA層の表面付近で接触、または若干その内側同士で入り組んだ構造をとっていることを強く示唆している。なぜならば、もしDNAの結合していない表面同士で接触しているならば表面間距離はDNAの長さによって変化することはなく、DNAが互いに入り組んで凝集しているならば、もっと短い表面間距離が測定されるはずだからである。

ここで今、DNA末端表面におけるDNA二重鎖の占める面積を考えたい。簡単のため図4.3の金コロイド表面上での二重鎖の占める面積を100%と仮定し、半径を r としてDNA二重鎖の金コロイドに付着していない方での仮想的な球面を考える。その球の表面積に占めるDNA二重鎖の割合を計算すると図4.3のようになる。例えば、今回測定に用いた一番長い45塩基のものを考えると、その末端においては10%程度しか二重鎖が無い、つまり大きな隙間のある状態になっている(図4.2右)。しかも、これは表面での二重鎖の面積を100%と仮定しているが実際にはもっと小さいことに注意してほしい。

また、なぜ凝集してくるかということを見ると、互いに入り組むことで(DNAの側面間での)引力的相互作用をしているとすれば、より入り組んだほうが安定であるはずである。以上ことを総合して考えると、コロイド凝集体では末端間で接触しているためにこのような表面間距離が測定されているのではないかと考えられる。

また、フィッティングを行ったところ、表面間距離のDNA塩基数依存性の傾きは5.5 nm/baseであった。B-formの二重鎖DNAが二つ分で6.8 nm/baseであることを考えると、それよりも若干短くなっている。これは、DNAが完全に直立しているのではなくやや傾いているためにこうなるのであろう。参考までに序論で紹介したMirkinらも同様の実験により図1.2の凝集体の粒子表面間距離を求めており、その一塩基ごとの表面間距離の伸びは5 nm/baseとなっている¹⁶⁾。彼らの系ではDNAを架橋して凝集させていることを考えれば、この値より大きいということはやはり末端間で接触している可能性が高いと考えられる。

以上のように、完全相補鎖が凝集しやすくなるのは、DNA末端間で引力的相互作用しているからではないかと考えられる。

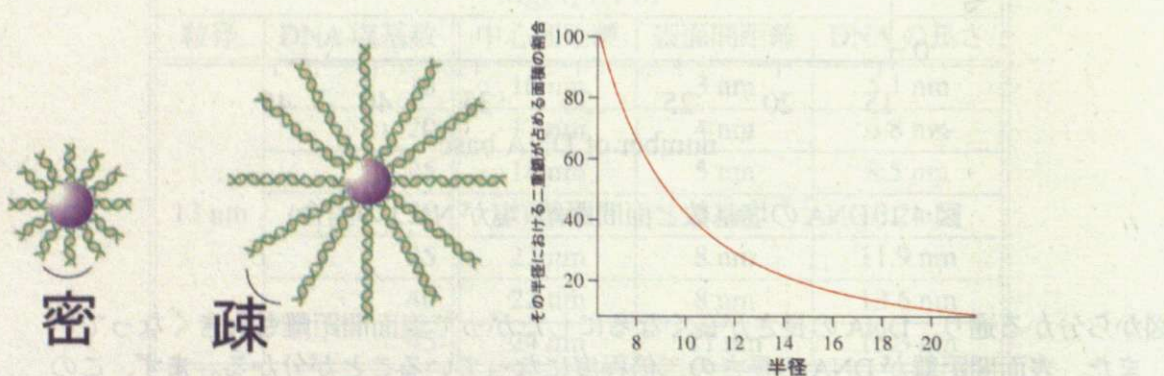


図 4.2: 二重鎖の粗密 (左)DNA が短い場合 (右)DNA が長い場合

図 4.3: 半径 r の球表面上で二重鎖の占める割合

4.2 $MgCl_2$ 系について

$MgCl_2$ を投入することで $NaCl$ では凝集しなかった target DNA が一塩基変異鎖の場合と target DNA が無い場合でも凝集が起こった。これらと $MgCl_2$ 中における target DNA が相補鎖の場合を比較する。target DNA が一塩基変異鎖の場合の凝集状態の結果から得られた粒子表面間距離の表 3.8 をグラフにしたものが図 4.4 の水色のクロスである。target DNA が無く一本鎖の場合の凝集状態の結果から得られた粒子表面間距離の表 3.8 をグラフにしたものが図 4.4 の紫の三角である。さらに比較のために 1 M の塩濃度での target DNA が相補鎖の場合の凝集状態の表面間距離を赤い円で表している。

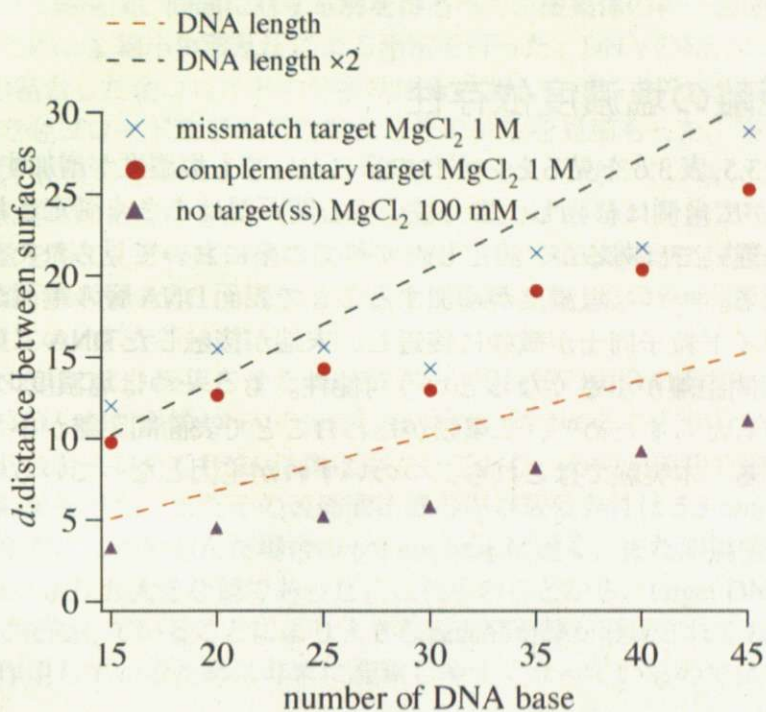


図 4.4: DNA の塩基数と面間距離 (塩が $MgCl_2$ の場合)

いずれの系も DNA の長さが長くなるにしたがって表面間距離も大きくなっている。target DNA が無い(一本鎖)の場合の表面間距離は二重鎖に比べて明らかに小さい表面間距離となっている。これは、一本鎖の DNA が塩によってクーロン相互作用が遮蔽され、分子内、分子間の反発力が弱まったことで、DNA が縮んできたことが一つの理由であると考えられる。高塩濃度化では DNA の一本鎖の持続長(高分子の剛直性を表す指標)は 1 nm 以下であるのに対して¹⁷⁾、二重鎖の持続長は 50 nm 程度であるので¹⁸⁾、比較的やわらかい一本鎖は金コロイド間で押しつぶされているような形態をとっているものと考えられる。このことから改めて二重鎖の剛直性と、二重鎖が金コロイド表面に対して平衡になっているのではなく起垂直になっているであろうことが示唆される。なぜならば、いくら剛直とは言っても二重鎖が表面に吸着して平行になっているのならば一本鎖とそれほど変わらない

表面間距離が測定されるであろうし、その剛直性が小さくても大きな表面間距離にはならないと考えられるからである。

一方、target DNA が一塩基変異の場合は、30 mer が特に異常な値を示しているがそれを除いて考えると、相補鎖の場合と比べてほとんど変わらない表面間距離が得られた。もし、相補鎖の場合のみ末端間の引力が働くのであれば相補鎖と一塩基変異鎖で異なる表面間距離が測定されるはずである。つまり、末端間で引力的に相互作用しないならば、もっと近い表面間距離が測定される、そうではなかった。これは、末端変異鎖の場合も同様の引力的相互作用が働いているのではないかと考えられる。相補鎖との凝集しやすさの違いはその大きさが違うからではないかと推測される。

4.3 表面間距離の塩濃度依存性

図 3.11-図 3.24, 表 3.5, 表 3.6 を見るといずれの系においても塩濃度が増加するほど structure factor のピークが広角側に移動し、また粒子中心間距離は小さく測定されている。いずれもごくわずかな違いではあるが、測定したすべての系において見られた。これは二つの可能性が考えられる。一つは塩濃度が増加することで表面 DNA 層の電荷がより遮蔽されていくためにコロイド粒子同士が微妙に接近し、末端が接触した DNA 二重鎖がより傾いていくために表面間距離が小さくなるという可能性。もう一つは塩濃度の増加が DNA 鎖の持続長の減少をもたらすため¹⁸⁾、二重鎖がたわむことで表面間距離が小さくなるという可能性が考えられる。本実験ではこれら二つのいずれが主因となっているのかは判別できない。

第5章 結論

本研究では、DNA 担持ナノ粒子でなぜ末端の一塩基の違いにより分散安定性が大きく変化するのかという興味深い問題に対する解を得るべく、凝集体の粒子表面間距離についての情報を得るために X 線小角散乱法による測定を行った。DNA の結合していない金コロイドと DNA の結合した金コロイドの分散状態を計測し、得られた散乱曲線をフィッティングすることで金コロイド粒子の平均粒径とその分散を見積もった。また、散乱強度は DNA と金の電子密度の差によって DNA の影響をほとんど受けていないことを確認した。さらに、凝集状態での散乱曲線から粒子間構造因子を求め、それを逆フーリエ変換することで対分布関数を得て、そのピークの位置から粒子中心間距離を決定するに至った。この粒子中心間距離から粒径を差し引くことで表面間距離とし、その表面間距離と二重鎖を組んだ DNA の長さの比較を行った。

その結果、NaCl により凝集させた target が完全相補鎖の場合の凝集体は、表面間距離がその表面に修飾した二重鎖 DNA のほぼ二倍に近い値であることが分かった。これにより、金コロイド表面において DNA はほぼ直立しており、その末端間で接触しているのではないかという結果を得た。またその表面間距離の塩基数依存性は 5.5 nm/base であり、これは二重鎖が垂直に二つ分並んだ場合の 6.8 nm/base に近く、また架橋型の凝集体の結果である 5 nm/base よりも大きな値であった。これらのことから、target DNA が相補鎖の場合には末端間で接触していることにより大きな表面間距離が形成されており、その末端間で引力的相互作用しているために非常に凝集しやすくなっているのではないかと推察される。

MgCl₂ により凝集させた target DNA が存在しない (一本鎖の場合) の凝集体においては、二重鎖の場合に比べて非常に小さい表面間距離となった。このことから、二重鎖に比べて柔軟な一本鎖が凝集体間をつぶれているという結果を得た。また、これにより改めて二重鎖の場合の凝集体においては二重鎖が金コロイド表面にほぼ垂直になっていることが示唆された。一方 target DNA が末端一塩基変異の場合には完全相補鎖を加えた凝集体とほとんど変わらない表面間距離が測定された。このことから、target DNA が末端一塩基変異の場合にも完全相補鎖の場合と同様に末端間で接触していると考えられる。

なぜ、末端の一塩基の違いによって分散安定性が大きく変わるのかという問いに対しては、相補鎖、一塩基変異鎖どちらの場合も末端間で引力的に相互作用するのだが、その程度に差があるために分散安定性に違いが出てくるのではないかと結論された。

謝辞

本論文の結びにあたり、お世話になった方々への感謝の意を表したいと思います。

本研究を行うに当たり、伊藤耕三教授にはこのような興味深いテーマを与えていただくとともに、研究方針から測定結果の解釈にいたるまで、ご多忙の中、丁寧に御指導していただきました。深く感謝の意を表します。

本研究室助手の酒井康博氏には、本研究のあらゆる点におきましてきめ細やかな指導をしていただくと共に、測定の際にも手伝っていただきました。ありがとうございました。

理化学研究所前田バイオ工学研究室の前田瑞夫主任研究員をはじめ、宝田徹研究員、金山直樹協力研究員には、DNA 担持金コロイド、DNA-NIPAAm コンジュゲートについての現在までの経緯等を御教授いただくとともに、測定結果とその解釈に対して御指導いただきました。また、同研究室の佐藤保信基礎科学特別研究員には DNA 担持金コロイドの合成手法を、宮本大輔協力研究員には DNA-NIPAAm コンジュゲートの合成手法を丁寧に教えていただきました。前田バイオ工学研究室で開発されたこれらのサンプルと、皆様のご助力なくしては本研究はありえませんでした。厚く御礼申し上げます。

雨宮慶幸教授と雨宮研究室助教の篠原佑也氏には PF での SAXS 測定において、機器の調整をしていただくとともに、解析手法などを丁寧に御指導していただきました。厚く御礼申し上げます。

本論文を作成するにあたり、ここにお名前を挙げるのでできなかった数多くの方々のご助力、激励がありました。その方々に感謝の言葉を述べて謝辞とさせていただきます。

参考文献

- [1] Mirkin, C. A.; Letsinger, R.L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* 1996, 382, 607.
- [2] Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* 2000, 289, 1757.
- [3] Storhoff, J. J.; Elghanian, R.; Mucic, R. C.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 1959.
- [4] 高分子学会編; ナノバイオ - 微細加工と計測技術の新展開: NTS 2005
- [5] Mori, T.; Maeda, M. *Polym. J.* 2002, 34, 624.
- [6] Mori, T.; Maeda, M. *Langmuir* 2004, 20, 313
- [7] Zhonglan TANG: 九州大学大学院工学研究科材料物性工学専攻 博士論文 2004
- [8] K.Sato; K.Hosokawa,; M.Maeda *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 8102.
- [9] J. N. Israelachvili *Intermolecular and Surface Forces* 1992
- [10] 日本化学会編; コロイド科学 I 基礎及び分散・吸着 1995
- [11] E. J. Clayfield, and E. C. Lumb *J. Colloid Interface Sci* 1966, 22, 269
- [12] Bohren, C. F.; Huffman, D. R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles*; John Wiley & Sons: New York, 1983.
- [13] Feigin, L. A.; Svergun, D. I. *Structure Analysis by Small-Angle X-ray and Neutron Scattering*; Plenum Press: New York, 1982
- [14] H. Brumberger *Modern Aspects of Small-Angle Scattering*; Kluwer Academic Publishers,
- [15] Demers, L. M.; Mirkin, C. A.; Mucic, R. C.; Reynolds, R. A. III.; Letsinger, R. L.; Elghanian, R.; Garimella Viswanadham *Anal. Chem.* 2000, 72, 5535.
- [16] So-Jung Park, Anne A, Lazarides, James J. Srothoff, Lorenzo Pesce, and Chad A. Mirkin *J. Phys. Chem. B* 2004, 108, 12375

- [17] Bernard Tinland, Alain Pluen, Jean Sturm, and Gilbert Weill *Macromolecules* 1997, 30, 5763
- [18] Christoph G. Baumann, Steven B. Smith, Victor A. Bloomfield, and Carlos Bustamante *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, 94, 6185