

Poly(*N*-isopropylacrylamide)-DNA コンジュゲートの精密合成と特性評価

物質系専攻 47-116044 平峯勇人

指導教員：前田瑞夫（教授）

キーワード：PNIPAAm、DNA、ATRP、SAXS

【諸言】 これまでに我々の研究室では、一本鎖 DNA (ssDNA) がグラフトされた poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) 共重合体 (PNIPAAm-*g*-DNA) の合成とその特性評価を行ってきた[1,2]。PNIPAAm は 32 °C 付近に下限臨界溶液温度 (LCST) を示す温度応答性高分子である。PNIPAAm-*g*-DNA の場合、LCST 以上では PNIPAAm セグメントが凝集し、その表層に DNA 鎖が密生したナノ粒子を形成することで、水中で安定に分散する。そのナノ粒子表層の DNA に完全に相補鎖的な DNA を添加して二重鎖形成させると、ある塩濃度以上でナノ粒子は直ちに凝集し、溶液は白濁する。一方、末端に一塩基だけ変異が導入された相補鎖と二重鎖形成させた場合、高塩濃度でも粒子は安定に分散状態を保ち、無色透明である (図 1)。このように DNA 担持ナノ粒子の分散安定性は末端塩基対構造に明敏に応答するので、新しい一塩基多型検出の原理として期待されている。しかし、その現象のメカニズムは不明のままである。そこで本研究では、構造の明確な DNA 共重合体の合成とナノ粒子の作製を行ったうえで、構造パラメーターを系統的に変化させつつ、この特異的な界面現象の解明を目指すことにした。

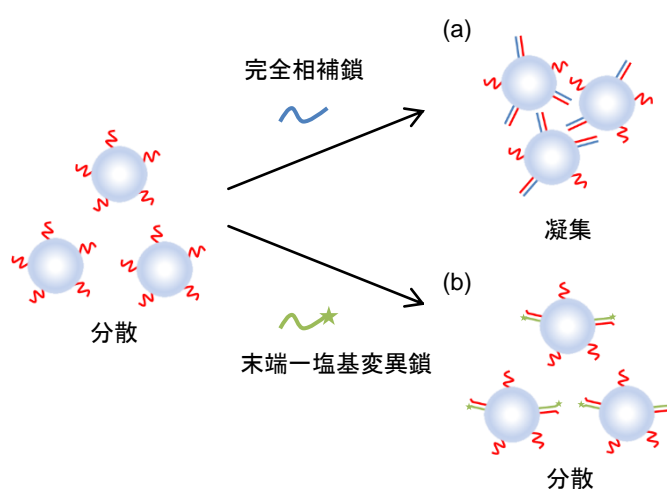
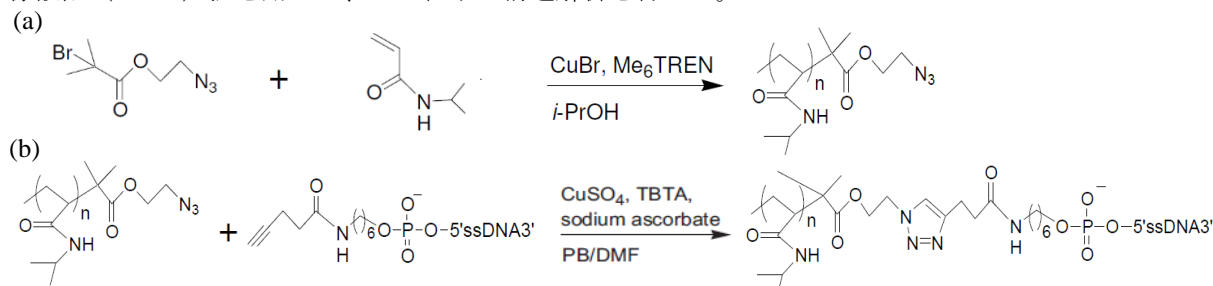


図 1 DNA 担持ナノ粒子の非架橋凝集. (a) ある塩濃度以上で完全相補 DNA が加えられると凝集が起こる. (b) 同じ条件でも末端に変異があるとナノ粒子は安定に分散した状態を保つ[1].

【実験】 Scheme 1 に示したように、片末端にアジド基を有する PNIPAAm を ATRP 法により合成した。クリックケミストリーを利用して、5' 末端にアルキン基を有する DNA とカップリングさせ、PNIPAAm と DNA とのブロック共重合体 (PNIPAAm-*b*-DNA) を得た[3]。一次構造の影響を調べるために種々のブロック長や分子骨格から成るブロック共重合体を調製した。得られた共重合体に対し、GPC-MALS や紫外可視分光光度計 (UV-Vis) など特性評価を行った。さらに、動的光散乱法 (DLS) や小角 X 線散乱 (SAXS) 法を用いて、ナノ粒子の構造解析を行った。



Scheme 1 ATRP 法による PNIPAAm の精密重合 (a) とクリックケミストリーによる PNIPAAm-*b*-DNA の調製 (b) .

【結果・考察】 ATRP およびクリックケミストリーを用いて調製した PNIPAAm-*b*-DNA の重量平均分子量 (M_w)、多分散度 (M_w/M_n) を表 1 に示す。線状型とミクトーム型共重合体のいずれも分子量を制御でき、 $M_w/M_n \approx 1.1$ と非常に分子量分布が狭い PNIPAAm-*b*-DNA を得ることができた。次に、UV-Vis による濁度測定により、PNIPAAm-*b*-DNA の相転移を観察した。図 2 には PNIPAAm-*b*-DNA 水溶液の透過率の温度変化を示した。比較のために、PNIPAAm ホモポリマーの結果も載せた。PNIPAAm 水溶液は、LCST より温度が高くなると急激に透過率が低下した。一方で、PNIPAAm-*b*-DNA 水溶液の透過率には変化がなかった。これは、PNIPAAm-*b*-DNA がナノ粒子を形成したためだと考えられる。次に、PNIPAAm-*b*-DNA 水溶液の DLS 測定よりナノ粒子の形成を確認した。すべての PNIPAAm-*b*-DNA は LCST 以上でナノ粒子を形成し、その流体力学的半径 (R_h) は 26-32 nm であり (表 2)、PNIPAAm セグメントおよび DNA 鎖長の増大とともに、 R_h が大きくなった。

SAXS を用いて PNIPAAm-*b*-DNA から成るナノ粒子の構造評価を行った。図 3 には、25 °C から 60 °C まで 5 °C ずつ昇温した際の SAXS の強度プロファイルの一例を示した。図に示したように、40 °C 以上になると低 q 領域での強度が急激に上昇し、明瞭な極大が出現し始めた。これは PNIPAAm-*b*-DNA が会合によりミセルを形成したことを意味している。また、従来の PNIPAAm-*g*-DNA より PNIPAAm-*b*-DNA から形成するナノ粒子は均一なサイズを有していることが分かった。これは、精密重合した PNIPAAm-*b*-DNA の一次構造が制御されたことに起因している。この SAXS プロファイルを解析することで、慣性半径 (R_g)、分子鎖の会合数 (N_{agg})、疎水核の大きさ (R_{core})、DNA 相の厚さ (L_{shell}) などを評価した (表 2)。ナノ粒子の大きさは、PNIPAAm セグメントの分子量が増大すると、 N_{agg} の増大とともに大きくなっていることがわかる。一方、DNA 鎖長は N_{agg} を低下させ、疎水核径を小さくさせる効果がある。DNA 鎖が長くなると、静電反発と立体反発が増すため、低い会合数で小さな粒子を形成すると考えられる。分子

表 1 PNIPAAm-*b*-DNA の分子量と多分散度.

Code ^a	M_w	M_w / M_n
1P ₂₈₉ -1ssD ₉	42.1	1.11
1P ₃₇₂ -1ssD ₉	47.1	1.11
1P ₂₈₉ -1ssD ₁₅	39.5	1.06
1P ₃₇₂ -1ssD ₁₅	51.1	1.10
3P ₃₈₆ -1ssD ₁₅	44.7	1.02

^aXP_m-YssD_n : X, Y はそれぞれ PNIPAAm および ssDNA のブロック数を意味する。下付きの m, n はそれぞれ PNIPAAm の重合度と DNA の塩基数を表す。

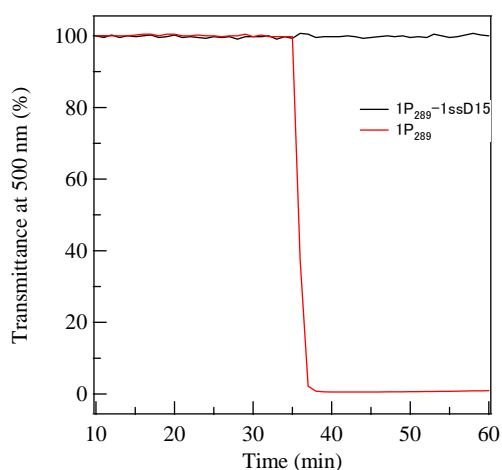


図 2 波長 500 nm における 1P₂₈₉ および 1P₂₈₉-1ssD15 の透過率の温度変化。濃度 : 0.5 g/L, 溶媒 : 10 mM PB (pH 7.4).

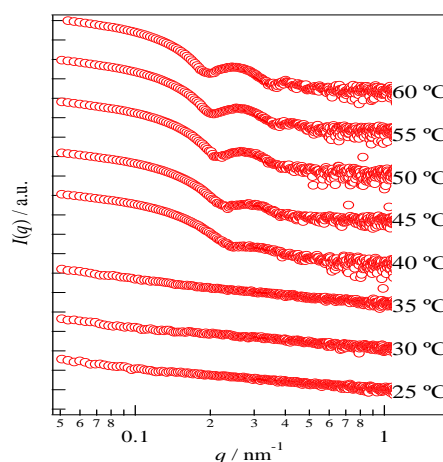


図 3 25 °C から 60 °C の温度変化による 1P₂₈₉-1ssD15 の SAXS プロファイル。濃度 : 2.0 g/L, 溶媒 : 10 mM PB (pH 7.4).

表 2 PNIPAAm-*b*-ssDNA から成るナノ粒子の構造パラメーター.
温度 : 40 °C, 濃度 : 2.0 g/L, 溶媒 : 10 mM PB (pH 7.4).

Code	R_h (nm)	R_g^a (nm)	R_g / R_h	N_{agg}^b (chains)	R_{core} (nm)	L_{shell} (nm)	R_{total} (nm)	ρ_{core}^c (g/cm ³)
1P ₂₈₉ -1ssD ₉	26.0	21.4	0.82	78	14.4	6.8	21.2	0.34
1P ₂₈₉ -1ssD ₁₅	30.0	19.2	0.64	65	13.6	7.7	21.3	0.34
1P ₃₇₂ -1ssD ₉	29.4	19.2	0.65	98	15.5	7.0	22.6	0.44
1P ₃₇₂ -1ssD ₁₅	31.9	21.6	0.67	25	14.2	6.0	20.2	0.15
3P ₃₈₆ -1ssD ₁₅	26.9	18.5	0.68	41	9.7	6.3	16.1	0.58

^a慣性半径: Guinier 法に基づき算出した. ^b会合数. ^cコア密度.

骨格の違いも粒子のサイズを変化させ、ミクトアーム型の場合コア密度が増大することがわかった。ミクトアーム型共重合体は線状共重合体とは異なり、分子内での凝集が優先的に起き、疎水核が密にパッキングされたと考える。次に、ナノ粒子表層の DNA が二重鎖を形成した際の分散安定性を評価した。40 °C でナノ粒子を形成させ、その温度で相補鎖を加えた。終濃度が 1.0 M になるように NaNO₃ 水溶液添加した後、濁度の変化を追跡した。図 4 には透過率の時間変化を示すが、DNA 二重鎖末端の塩基対構造に依存した分散安定性を示した。末端に一塩基変異があると粒子は安定に分散したままだが、完全に相補的な DNA 鎖と二重鎖形成すると非架橋凝集を起こし、溶液は白濁した。透過率が低下する速度は、共重合体の分子骨格や組成に依存した。ミクトアーム型共重合体から成るナノ粒子のほうが、非架橋型凝集が迅速に起きた。

ミクトアーム型共重合体から成るナノ粒子は疎水核が小さいものの、高いコア密度を有する。高いコア密度がファンデルワールス力を増大させたため、ナノ粒子がより迅速に凝集したと思われる。

【結言】 ATRP とクリックケミストリーを用いて、異なる組成や一次構造を有する温度応答性 PNIPAAm-*b*-DNA を合成した。PNIPAAm-*g*-DNA に比べ、一次構造が制御された PNIPAAm-*b*-DNA の方が分散度の低い粒子を形成した。また、ナノ粒子の構造は共重合体の組成や分子骨格に依存した。PNIPAAm セグメントが長くなると、会合数は増加し、結果として粒子サイズが増大した。線状型共重合体から成るナノ粒子に比べ、ミクトアーム型共重合体から形成されるナノ粒子ではサイズ低下を示すものの、高いコア密度を示した。高いコア密度を有するナノ粒子は、より迅速に非架橋凝集することが観察された。

【参考文献】 [1] Mori, T.; Maeda, M. *Langmuir* 2004, 20, 313–319. [2] Ooi, W.-Y. ; Fujita, M.; Pan, P.; Tang, H. Y.; Sudesh K.; Ito, K.; Knayama, N.; Takarada, T. ; Maeda, M. *J. Colloid Interface sci.* 2012, 374, 315-320. [3] Pan, P.; Fujita, M.; Ooi, W. Y.; Sudesh K.; Takarada, T.; Goto, A; Maeda, M. *Polymer* 2011, 52, 895–900.

【学会発表】 第 22 回バイオ・高分子シンポジウム「Poly(N-isopropylacrylamide)-DNA コンジュゲートの精密合成と特性評価」. 他 6 件.

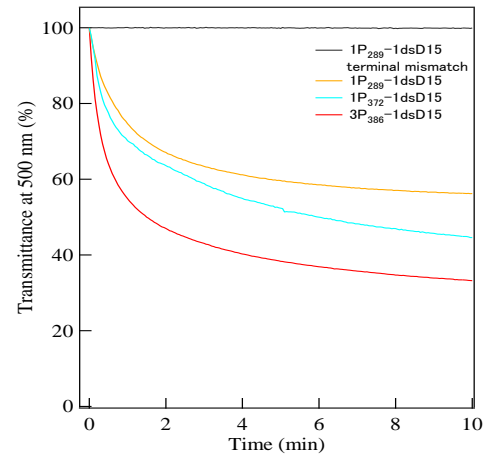


図 4 1Pn-1ssDm および 3P₃₈₆-1ssD15 から成るナノ粒子の濁度. 40 °C で粒子形成させた後、1.0M NaNO₃ 存在下で相補鎖を添加した時からの時間変化. 濃度:0.5g/L, 溶媒: 10 mM PB (pH 7.4). 完全相補鎖: 5'GCTGGTGGC3'. 末端一塩基変異鎖: 5'CCTGGTGGC3'.