

福岡工業大学 機関リポジトリ

FITREPO

Title	メソポーラスシリカ表面へのssDNAの修飾 -DNAシグナル制御型分子ロボットに向けて-
Author(s)	古賀 朋代, 宮元 展義
Citation	福岡工業大学総合研究機構研究所所報 第2巻 P39-P43
Issue Date	2020-2
URI	http://hdl.handle.net/11478/1528
Right	
Type	Departmental Bulletin Paper
Textversion	Publisher

Fukuoka Institute of Technology

メソポーラスシリカ表面への ssDNA の修飾 —DNA シグナル制御型分子ロボットに向けて—

古賀 朋代 (大学院工学研究科生命環境科学専攻※)

宮元 展義 (工学部生命環境化学科)

※旧専攻名称 修了生

Modification of Mesoporous Silica Surface with Single Stranded DNA — Toward Molecular Robots Controlled by DNA Signal —

Tomoyo KOGA (Department of Life, Environment and Materials Science, Graduate School of Engineering)
Nobuyoshi MIYAMOTO (Department of Life, Environment and Applied Chemistry, Faculty of Engineering)

Abstract

The outer surface of mesoporous silica (MCM-41) particles was modified with ssDNA attached with FAM (fluorescent moiety) and gate control of the pores was investigated. Infrared spectra confirmed the successful modification of MCM-41 with the ssDNA via 4 synthetic steps. To close the pore gate, the surface ssDNA was hybridized with linker ssDNA having complementary base sequence on both ends. The pore gate was then opened again by hybridization with the ssDNA having complementary base sequence only on one end and BHQ-1 (fluorescence quencher) on the other end. The gate opening process was confirmed by observing the fluorescence quenching of the FAM on the surface-modified ssDNA caused by the BHQ-1.

Keywords : mesoporous silica, ssDNA, surface modification

1. 緒言

外部刺激などに応答して変形するという特性を持つゲルは、ゲルアクチュエーターや分子ロボットとしての応用が期待されている。実際に自励振動応用した自律歩行ゲル¹や、光に応答して伸縮するゲル²などが報告されている。また外部刺激のみならず特定の物質に応答して膨潤収縮を行うゲルの研究も行われており、このようなゲルもアクチュエーターやセンサー、ドラッグデリバリーシステムなどに利用されている。中でも ss (single stranded : 一本鎖) DNA に応答する系は注目に値する。ssDNA は相補的な塩基配列をもつ他の ssDNA とのみ二重鎖を形成するという特徴を持ち、また塩基配列を厳密に規定した ssDNA の合成法は確立されている。これらの特徴を利用することで、DNA の塩基配列に規定される nm スケールの任意形状の DNA 構造体を得る DNA オリガミヤ、DNA コンピューティングなどの DNA ナノテクノロジーの研究が盛んとなっている。さらなる応用として、例えば DNA 計算回路から出力される ssDNA に応答して動作するゲルに基づいた分子ロボットも構想されている。しかしながら、ゲルの架橋を DNA の二重鎖形成で制御する様な設計の場合、ゲル架橋点と同

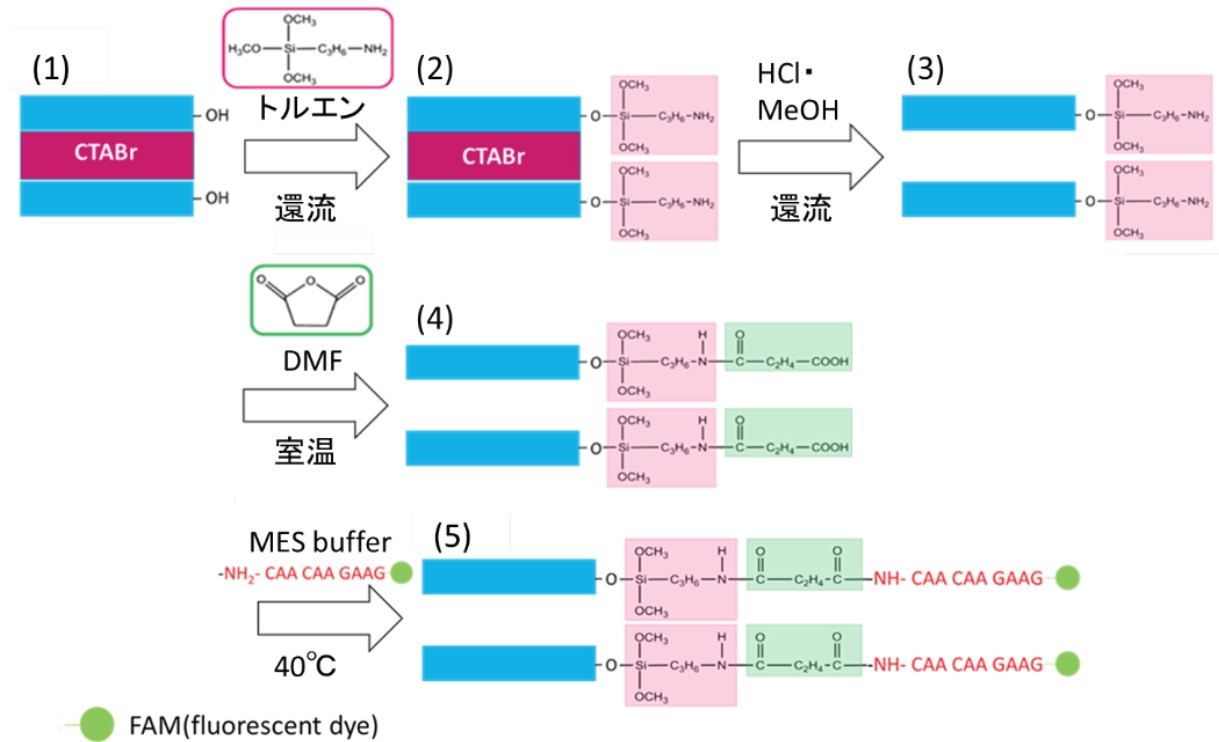
じ数の ssDNA 入力が必要となり、かつ膨潤収縮を繰り返すことが不可能である。したがって、少量の DNA 分子情報に応答させるために、DNA 分子情報の増幅機構が欠かせない。

そこで我々は、分子情報増幅機構を内包したゲル型分子ロボットの作製を最終目的とし、そのために ssDNA ゲート型メソポーラスシリカ (MPS) を利用する事を計画した。MPS は数 nm~数十 nm の均一な細孔径をもつ多孔質材料である。ゲルを収縮させる物質を MPS 細孔に充填して細孔入り口を塞いでおき、少量の DNA によって入り口を開放して大量のゲル駆動物質を放出させる機構によって、少量の DNA シグナルを増幅する設計を考えている。本論文では、このような研究の一環として、ssDNA ゲート型メソポーラスシリカの合成と細孔入り口の開閉について検討した結果を報告する。

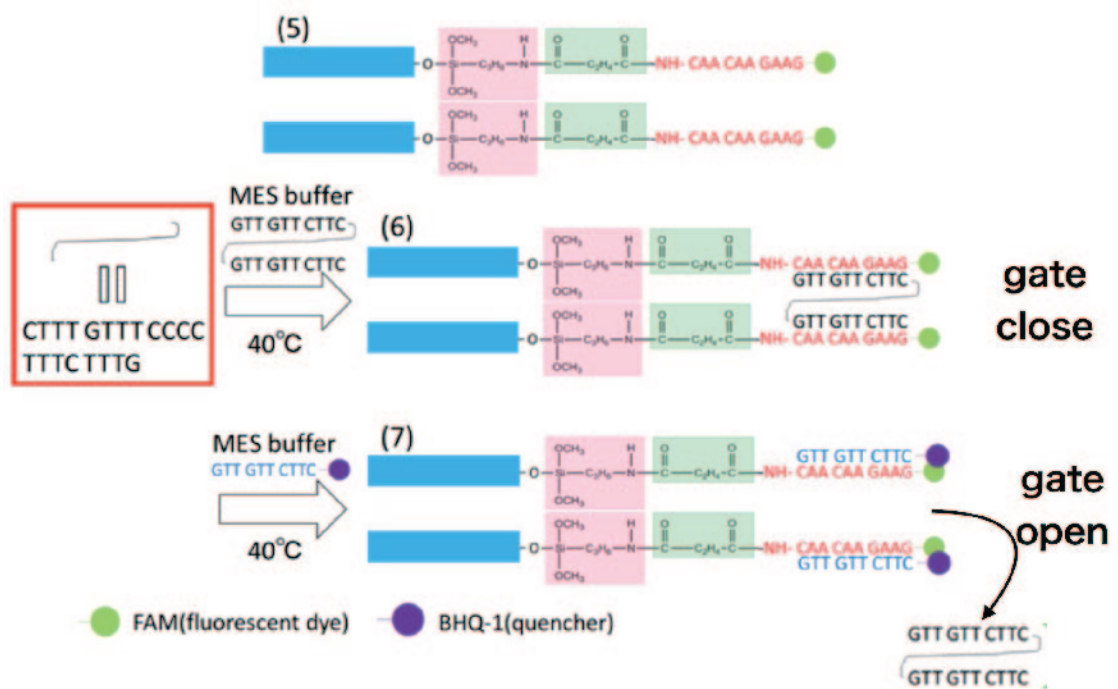
2. 実験方法

2.1 MPS の合成

MPS は多くの種類が報告されているが、今回はその一種である MCM-41 を合成した。500 mL ポリプロピレン瓶 (NALGENE) にセチルトリメチルアンモニウムブロミド



Scheme 1 MPS 細孔入り口への ssDNA 修飾のスキーム



(CTABr) 500 mg、純水 250 mL、1M 水酸化ナトリウム溶液 3.5 mL を加えて、マグネチックスターラーを 500 rpm・95 °C に設定して 30 分攪拌した。攪拌後 TEOS 2.5 mL を加えて、引き続き 500 rpm・95 °C で 2 時間攪拌した。この時白色生成物が見られた。攪拌終了後放冷し、遠心分離機 (HITACHI、CF15RXII) を 9500 rpm・25 分・25°C に設定して白色生成物と上澄みとに分離させた。上澄みを捨て、

生成物をキリヤマロートを用いて純水で 5 回洗浄及び吸引した。シャーレに生成物を広げ乾燥機で乾燥させた。このようにして細孔内に鑄型の界面活性剤が残存した MCM-41 前駆体を得て、以後の操作で、界面活性剤を除去することで、MCM-41 を得た。

2.2 MPS への ssDNA 修飾

ssDNA ゲート型 MPS の合成手順を Scheme 1 に示す。100 mL ナス型フラスコに MCM-41 前駆体 0.4g、アミノプロピルトリメトキシシラン(APTMS) 870 μ L、トルエン 50 mL を加えて 24 時間還流した。その後キリヤマロートを用いて、トルエンで 5 回洗浄及び吸引ろ過を行った。これをシャーレに広げて乾燥させ、APTMS 修飾 MCM-41 を得た。

続いて別の 100 mL ナス型フラスコに APTMS 修飾 MCM-41 0.3 g、メタノール 80 mL、35%塩酸 1 mL を加えて 24 時間還流した。その後キリヤマロートを用いて、メタノールで 5 回洗浄及び吸引ろ過を行った。これをシャーレに広げて乾燥させ、CTABr 除去 MCM-41 を得た。

スクリー管に無水コハク酸 1 g、DMF 20 mL を加えて、無水コハク酸が DMF に完全に溶解するまで 450 rpm・室温で攪拌した。攪拌後 CTABr 除去 MCM-41 0.1 g を加えて、引き続き 450 rpm・室温で 8 時間攪拌した。攪拌後キリヤマロートを用いて、クロロホルムで少なくとも 10 回以上洗浄及び吸引ろ過を行った。これをシャーレに広げて乾燥させ、無水コハク酸修飾 MCM-41 を得た。

スクリー管に MES buffer 5 mL、EDC 50 mg、sulfo-NHS 50 mg を加えて、EDC と sulfo-NHS が MES buffer に完全に溶解するまで 400 rpm・室温で攪拌した。その後無水コハク酸修飾 MCM-41 0.08 g、PBS buffer 20 μ L、100 μ M 蛍光標識(FAM)付の ssDNA(FAM-ssDNA)の溶液 80 μ L を加えて、マグネチックスターラーを 400 rpm・40 $^{\circ}$ C に設定して 6 時間攪拌した。この時 FAM の光による分解を抑える為、スクリー管はアルミホイルで巻いていた。攪拌後キリヤマロートを用いて純水で素早く 3 回洗浄及び吸引ろ過を行った。これをシャーレに広げて自

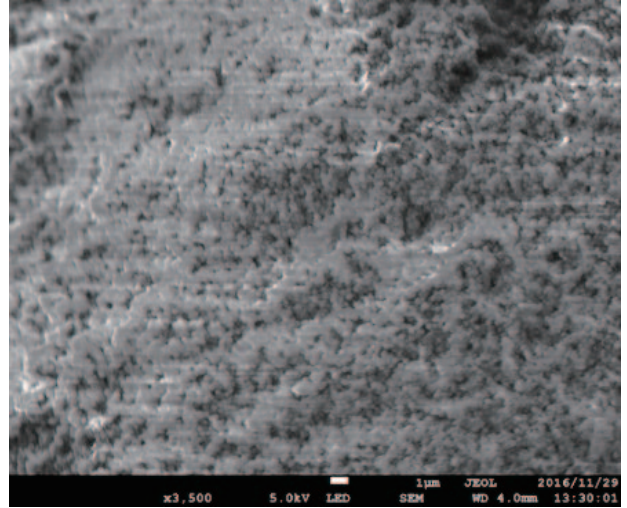


Figure 1 MCM-41 前駆体の FE-SEM 像。スケールバーは 1 μ m を表している。

然乾燥させ、FAM ssDNA 修飾 MCM-41 を得た。

2.3 ssDNA ゲートの開閉

以上の操作で得られた DNA ゲート型 MPS (FAM ssDNA 修飾 MCM-41) に対して、細孔入口の開閉の操作を以下の手順で行った。開閉操作の概要を Scheme 2 に示す。まず、細孔入り口に修飾した FAM-ssDNA と相補の塩基配列を両末端に配した Linker ssDNA を用意した。スクリー管に MES buffer 5mL、FAM ssDNA 修飾 MCM-41 0.05 g、100 μ M Linker ssDNA 溶液 50 μ L を加えて、マグネチックスターラーを 400 rpm・40 $^{\circ}$ C に設定して 6 時間攪拌した。この時スクリー管はアルミホイルで巻いていた。攪拌後

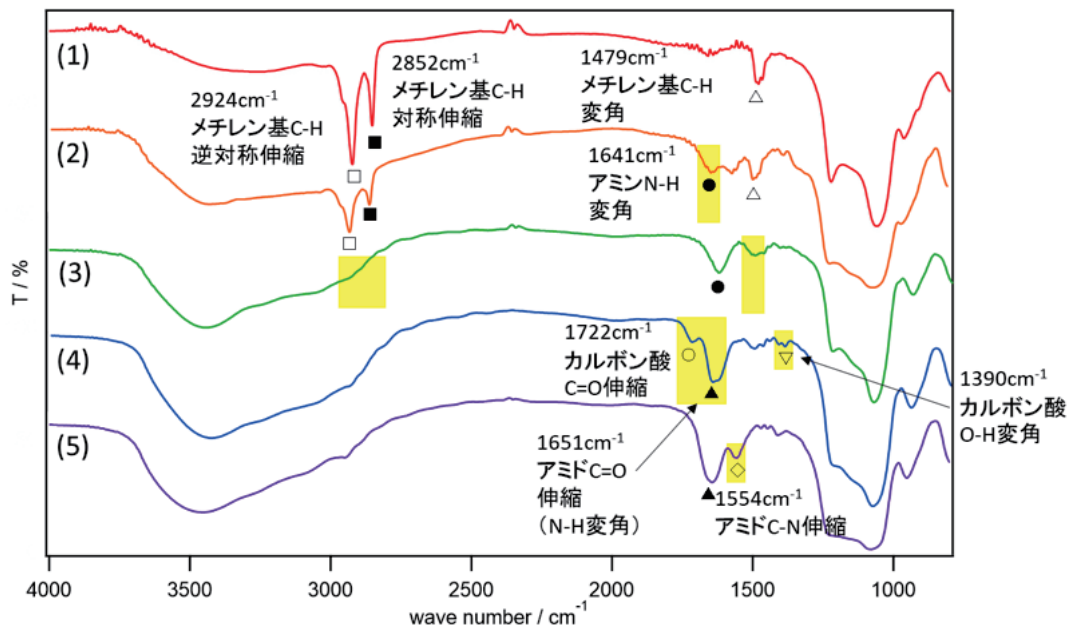


Figure 3 赤外吸収スペクトル測定結果。(1)MCM-41 前駆体、(2)APTMS 修飾 MCM-41、(3)CTABr 除去 MCM-41、(4)無水コハク酸修飾 MCM-41、(5)FAM ssDNA 修飾 MCM-41。

キリヤマロートを用いて純水で素早く 3 回洗浄及び吸引ろ過を行った。これをシャーレに広げて自然乾燥させた。この操作により、細孔入り口の ssDNA と Linker ssDNA の両末端が二重鎖を形成して入り口に固定され、蓋が閉じられたことになる。

その後、蓋を開けるため BHQ-1 ssDNA を用意した。この DNA は細孔入り口に修飾した FAM-ssDNA と相補の塩基配列をもち、また末端に蛍光消光作用のある BHQ-1 が修飾されたものである。スクリー管に MES buffer 5 mL、Linker ssDNA 修飾 MCM-41 0.04 g、100 μM BHQ-1 付 ssDNA 溶液 30 μL を加えて、軽く振りまぜマグネチックスターラーを 0rpm・40 °C に設定して 24 時間静置した。この操作により、Linker ssDNA が BHQ-1 ssDNA によって置き換えられて除去され、蓋が開いたことになる。

2.4 キャラクターゼーション

合成した MCM-41 前駆体は電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM)(日本電子株式会社、JSM-7100F/TTL)を用いて形状観察した。小角 X 線散乱(SAXS)(Rigaku)を用いて細孔

構造解析を行った。各サンプルのフーリエ変換赤外分光測定 (FT-IR) は KBr 法にてアジレントテクノロジー Cary670 を用いて行った。共焦点レーザー顕微鏡観察は、株式会社

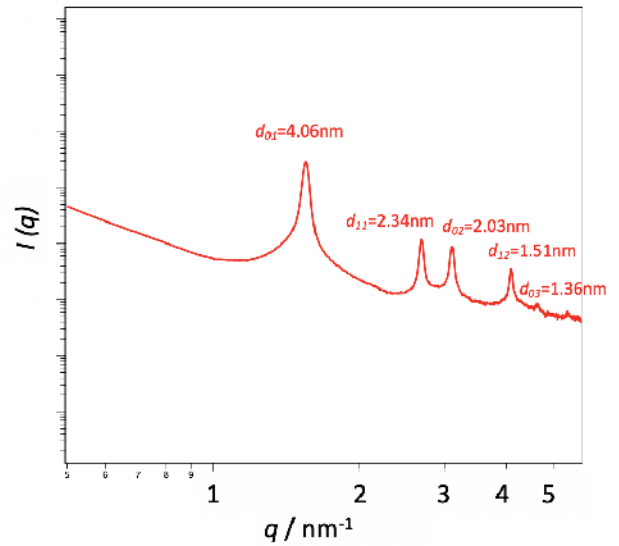


Figure 2 MCM41 前駆体の SAXS プロファイル

ニコンインステック、ECLIPSE Ti を用いて散乱モード及び蛍光モードで DNA 修飾及びハイブリダイゼーションの確認をそれぞれ行った。散乱モードの波長は 405nm、蛍光モードの励起波長は 488nm、蛍光波長は 521nm とした。

3. 結果・考察

3.1 MPS 合成

MCM-41 前駆体の FE-SEM 観察結果 (Figure 1) より、粒径約 0.3 μm の均一な球状粒子状の MCM-41 が得られたことがわかった。MCM-41 前駆体の SAXS による細孔構造解析結果 (Figure 2) では、底面間隔 $d = 4.06 \text{ nm}$, 2.34 nm , 2.03 nm , 1.51 nm , 1.36 nm それぞれにピークが観察された。この相対比が $1:1/\sqrt{3}:1/2:1/\sqrt{7}:1/3$ となる為、MCM-41 (前駆体) は 4.68 nm 間隔で 1 次元孔が配列した 2 次元へキサゴナル構造を有することがわかった。この構造や細孔径は既報と一致しており、MCM-41 の合成が確認された。

3.2 MPS への ssDNA 修飾

Scheme 1(1)~(5)に示した全てのサンプルそれぞれの赤外吸収スペクトル測定結果を Figure 3 に示す。MCM-41 前駆体 (Figure 3(1)) で 2924 cm^{-1} (□)にメチレン基の C-H 逆対称伸縮振動、 2852 cm^{-1} (■)にメチレン基の C-H 対称伸縮振動、 1479 cm^{-1} (△)にメチレン基の C-H 変角振動に帰属されるピークがそれぞれ見られる。APTMS 修飾 MCM-41 (Figure 3(2)) ではこれら 3 つのピークに加えて、 1641 cm^{-1} (●)にアミンの N-H 変角振動に帰属されるピークが出現していることから、MCM-41 前駆体に APTMS が修飾されたことがわかった。次に、塩酸・メタノール混合溶液での還流を行ったサンプル (Figure 3(3)) ではメチレン基に

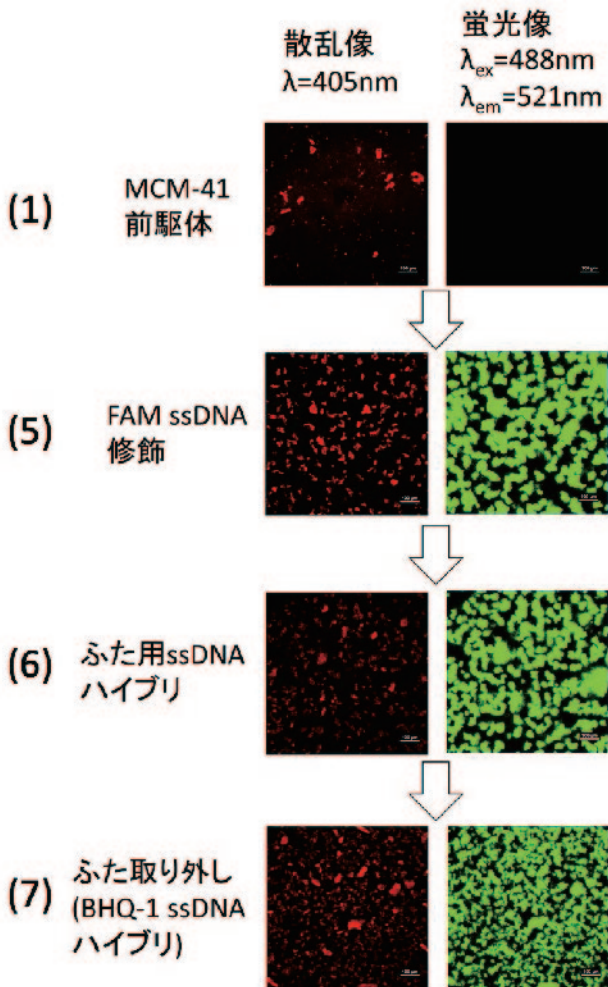


Figure 4 共焦点レーザー顕微鏡像。(1)MCM-41 前駆体、(5)FAM-ssDNA 修飾 MCM-41、(6)linker-DNA での処理によりゲートを閉じた MCM-41、(4)BHQ-1-ssDNA との

帰属されるピークが全て消失しており、この操作によって CTABr が除去できたと考えられる。

無水コハク酸修飾 MCM-41 (Figure 3(4)) では、 1722 cm^{-1} (○)にカルボン酸の C=O 伸縮振動、 1390 cm^{-1} (▽)にカルボン酸の O-H 伸縮振動に帰属されるピークがそれぞれ見られる。また 1651 cm^{-1} (▲)にもピークが出現しており、アミドの C=O 伸縮振動 (アミド I 吸収帯) に帰属されると考えられるが、アミドの N-H 変角振動 (アミド II 吸収帯) に帰属されるピークが見られない。アミドが存在している場合、吸収帯が 2 つセットで出現するはずである為、このピークはアミンの N-H 変角振動に帰属されるものと考えた。以上より無水コハク酸の修飾が確認された。

FAM ssDNA 修飾 MCM-41 (Figure 3 (5)) においては、無水コハク酸修飾 MCM-41 (Figure 3 (4)) と同様にアミンの N-H 変角振動に帰属されるピークが見られるが、更に 1554 cm^{-1} (◇)にアミドの C-N 伸縮振動に帰属されるピークが出現している。また無水コハク酸修飾 MCM-41 (Figure 3(4)) に見られるカルボン酸の C=O 伸縮振動に帰属されるピークとカルボン酸の O-H 変角振動に帰属されるピークが FAM ssDNA 修飾 MCM-41 (Figure 3(5)) では消失している。これらのことから、MCM-41 に FAM ssDNA が修飾できたと考えた。

次に、MCM-41 への FAM ssDNA 修飾をさらに確認するため、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った(Figure 4)。MCM-41 前駆体では、散乱像で粒子の存在が確認されるが、蛍光分子が存在しないため、蛍光像では何も観察されていない。FAM ssDNA 修飾 MCM-41 では、蛍光像において散乱像と対応する場所に粒子の存在が確認されていることから、蛍光分子 FAM を末端に持つ ssDNA が MCM-41 粒子に修飾されていることが確認された。粒子の大きさに着目すると、共焦点レーザー顕微鏡では数~数十 μm の粒子が数多く観察されている。これは、SEM(Figure 1)で観察された 300 nm の粒子よりはるかに大きいことから、多くの粒子が凝集し 2 次粒子を形成しているものと考えられた。

3.3 細孔入り口の開閉

Scheme 2(5)-(7)で示したような細孔入り口の開閉を確認するため、さらに共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った(Figure 4 (6), (7))。Linker-ssDNA 修飾 MCM-41 は FAM ssDNA 修飾 MCM-41 とほぼ同じ散乱像と蛍光像を示している。Linker-ssDNA の導入後も、凝集状態などに大きな変化が無く、また FAM ssDNA の脱着が起こっていないことが分かる。

BHQ-1 ssDNA 添加後 (Figure 4(7)) の蛍光像では蛍光強度が僅かに減少した。BHQ-1 ssDNA が粒子表面の FAM-ssDNA と二重鎖を形成し、BHQ-1 の作用で FAM の蛍光が消光されたためであると考えられる。BHQ-1 ssDNA が入り口の FAM-ssDNA と二重鎖形成した場合、Linker-ssDNA が外れてゲートが開く設計となっているため、これによってゲートが開いたものと思われた。しかし、蛍光強度の減少は僅かであった。これは、BHQ-1 ssDNA と FAM ssDNA の二重鎖形成が一部しか進行していないことを示している。この原因としては、合成過程(Scheme 2 (6))において、FAM ssDNA が MCM-41 細孔内に吸着したことが考えられる。細孔内に FAM ssDNA が吸着している場合、BHQ-1 ssDNA が細孔内まで拡散し二重鎖形成をすることは困難であると思われるため、このような結果になったのではないかと考えられる。

4. 結論

粒子表面 (細孔の入り口) に ssDNA を修飾したメソポーラスシリカ粒子を合成した。相補配列を両末端にもつ linker DNA と細孔入り口の ssDNA との二重鎖形成によって細孔を閉じ、さらにその後相補配列 1 つを末端にもつ ssDNA との二重鎖形成によって細孔を開くプロセスの一部を確認した。今後、合成手順を改良して細孔の開閉をより確実かつ効率的に行い、またゲル収縮物質の充填とその制御放出を実現する事で、DNA 分子情報増幅機構を内蔵した分子ロボット創成につなげていきたい。

5. 謝辞

本研究の一部は、福岡工業大学総合研究機構の研究支援制度により実施したものである。

(令和元年 10 月 18 日受付)

文 献

- (1) S. Maeda, Y. Hara, T. Sakai, R. Yoshida and S. Hashimoto: "Self-walking gel" *Adv. Mater.*, Vol 19, 2007, pp. 3480-3484
- (2) T. Inadomi, S. Ikeda, Y. Okumura, H. Kikuchi and N. Miyamoto: "Anomalous thermo- and photo-responsive anisotropic deformation of poly(N-isopropylacrylamide) gel hybridized with liquid crystalline inorganic nanosheets aligned by electric field" *Macromol. Rapid Commun.*, Vol. 35, 2014, pp. 1741-1746