



機能性微小空間を付与したDNA金ナノ粒子を用いる有害金属イオンの簡便・迅速検出

著者	金山 直樹
発行年	2011
その他のタイトル	Facile and rapid detection of toxic heavy metal ions using double-stranded DNA-gold nanoparticle conjugates containing mismatch base pair
URL	http://hdl.handle.net/2241/115268

機関番号：12102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21700495

研究課題名（和文） 機能性微小空間を付与したDNA金ナノ粒子を用いる有害金属イオンの簡便・迅速検出

研究課題名（英文） Facile and rapid detection of toxic heavy metal ions using double-stranded DNA-gold nanoparticle conjugates containing mismatch base pair

研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA NAOKI)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師

研究者番号：80377811

研究成果の概要（和文）：DNA 二重鎖を修飾した金ナノ粒子の分散状態変化に伴う色の変化を利用して、試料中に存在する微量の水銀イオン（ Hg^{2+} ）を目視検出する手法を開発した。自由末端近傍にチミン-チミン（T-T）ミスマッチ部位を導入した DNA 二重鎖担持金ナノ粒子は、高イオン強度水溶液中においても安定に分散し赤色を示したが、この分散液に 0.1 ppm 以上の Hg^{2+} を添加すると、速やかな金ナノ粒子の凝集が誘起され溶液の色が赤色から無色へ変化し、 Hg^{2+} の存在を迅速に目視で確認できた。T-T ミスマッチ部位での T- Hg^{2+} -T 錯体形成が、DNA 二重鎖の自由末端を剛直化させ、粒子間のエントロピー斥力が低下したものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Colorimetric detection of mercury ions (Hg^{2+}) with the naked eye was accomplished by a combination of non-crosslinking aggregation of double-stranded DNA-carrying gold nanoparticles (dsDNA-GNP) and complex formation of thymine- Hg^{2+} -thymine (T- Hg^{2+} -T). The dsDNA-GNP having a T-T mismatch site located near the distal end aggregated spontaneously within 1 min in the presence of $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ at a sub-micromolar concentration in aqueous media at room temperature, resulting in the distinct color change of the particle's dispersion from red to colorless. This unique colloidal behavior was presumably due to the decrease in the entropic repulsion between the particles induced by the T- Hg^{2+} -T complex formation at the interface between the dsDNA layer and the dispersal medium.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：DNA, 金ナノ粒子, 重金属イオン, ミスマッチ塩基対, 非架橋凝集

1. 研究開始当初の背景

(1) 水銀、鉛、カドミウムなどに代表される重金属類の多くは、電気・熱伝導性、発色特性など多くの優位性のため古くから工業・産業的応用が広く行われてきた。これら

の重金属類はイオンとして生体内に取り込まれた場合、生体内に蓄積してタンパク質機能を阻害・暴走させ、消化器系・神経系の臓器障害の原因となることが確認されており、現在では厳しい使用管理制限が設けられている。しかしながら、使用規制や環境管理が

制定される以前の水源や土壌への流出物が、現在もなお健康被害を引き起こす元凶となり得るうえ、これらの重金属類は本来、自然界にも一定量存在しており、環境および健康管理の観点から、我々の生活環境圏内における有害重金属イオンの動態を、随時、モニタリングする必要がある。

(2) 現在、我が国における有害重金属イオン系の環境汚染物質の検出法(公定法)は、原子吸光度計や ICP 発光分析装置を用いる還元気化原子吸光法と定められているが(例えば、環境庁告示第 59 号)、大型かつ高額な装置の設置が必要となるうえ、実施には一定の熟練した技能が要求され、その実施は必ずしも容易ではない。そのため、環境中や事業所などからの排水中における基準値を超える量の有害金属イオンの有無を、必要に応じて随時、簡便にモニタリング可能な新しい手法の開発が強く望まれている。即ち、特別な分析装置や技術を必要とせず、対象試料における有害重金属イオンの簡便かつ迅速な検出を可能にする分析法の確立が急務となっているのである。

(3) DNA や RNA などの核酸類と金属イオンの相互作用は、生命活動における核酸の機能の発現において重要な役割を果たしていることが知られており、重金属イオンを含め古くから系統的な研究が行われてきている(例えば Chem. Rev. 1971, 71, 439 など)。近年、この核酸-金属イオン間で働く特異的な相互作用を利用し、試料中の有害金属イオン検出を行う試みが活発化しており、オリゴ核酸をベースとした様々な有害金属イオン検出素子が考案されている。

2. 研究の目的

(1) 核酸をベースとした有害金属イオン検出システムの代表的なものに、化学修飾オリゴ DNA を用いた水銀(II)イオン(Hg^{2+})の検出が挙げられる。チミン塩基(T)は Hg^{2+} に対し高い親和性を示し、水溶液中で自発的に $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$ の2:1錯体(図1)を形成する。この錯体形成を利用し、オリゴ DNA 鎖の高次構造変化を誘起させ、予め DNA 鎖内に導入しておいた蛍光あるいはレドックスプローブからのシグナル変化を利用して Hg^{2+} を検出するのである。

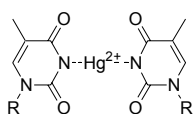


図1. $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$ 錯体の構造

(2) 前述の DNA の高次構造変化を利用した Hg^{2+} 検出法は高感度であり、比較的簡便な操作で実施することができる。しかしながら、プローブからのシグナルを取り込むため分光器や電気化学測定装置などの測定機器、およびサンプル温度の制御装置を必要とするものも多く、実際の試料の採取現場で迅速な“その場計測”を実現する手段として適切とは言い難い。

(3) 上記の点に鑑み、チミンを含む DNA 鎖の高い Hg^{2+} 識別能を利用しつつ、 Hg^{2+} 検出に伴うシグナルを“可視情報”として出力することが可能な分析デバイス、即ち、特別な分析装置を用いることなく試料採取現場で迅速に Hg^{2+} の“その場計測”を実行可能な分析デバイスの構築を本研究の目標とした。

3. 研究の方法

(1) 本研究の目標を達成するための手段として、研究代表者は DNA 二重鎖担持ナノ粒子の非架橋凝集現象に着目した。DNA 二重鎖を担持したナノ粒子の水中における分散安定性は、DNA 二重鎖の自由末端側の塩基対構造に強く依存することが知られている。(例えば、J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 8102 など) ナノ粒子表層の DNA 二重鎖の自由末端が相補的な塩基対構造である場合、0.5 M 程度の塩を添加すると、ナノ粒子は架橋構造を形成することなく速やかに凝集・沈殿する。一方、DNA 二重鎖の自由末端が非相補的な塩基対、即ち、ミスマッチ構造である場合、ナノ粒子は 0.5 M 以上の塩が共存する溶液中においても長時間、分散状態を保持するのである(図2)。

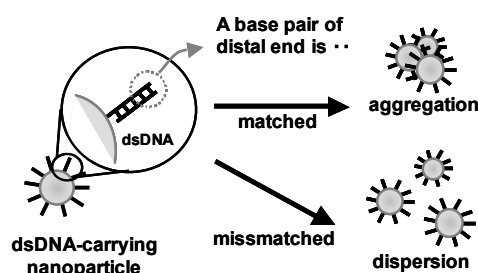


図2. DNA 二重鎖担持ナノ粒子が示す非架橋凝集現象

(2) 研究代表者は、自由末端に T-T ミスマッチ部位を導入した DNA 二重鎖担持ナノ粒子は、系中に Hg^{2+} が存在すると T-T ミスマッチ部位で図1に示した $\text{T-Hg}^{2+}\text{-T}$ 錯体を形成し、その自由末端は相補的な塩基対と同様に振

る舞うのではないかと考えた。もし、この仮説が正しければ、系中に Hg^{2+} が存在しない場合は自由末端の T-T ミスマッチによりナノ粒子は安定に分散し、 Hg^{2+} が存在すると自由末端で形成される T- Hg^{2+} -T 錯体が相補的な塩基対と同様に振る舞うためナノ粒子は速やかに凝集する、というコロイド分散系が実現できるはずである。さらに、ナノ粒子担体として分散状態が溶液の色に敏感に反映される金ナノ粒子を使用すれば、 Hg^{2+} 検出に伴うシグナル（分散状態変化）を明瞭な可視情報として得ることが期待できる。

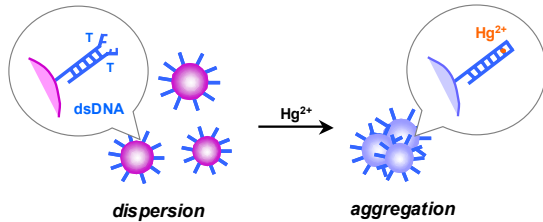


図 3. DNA 二重鎖担持金ナノ粒子の非架橋凝集現象を利用した Hg^{2+} 検出システム

(3) 上記のコンセプトに基づき、T-T ミスマッチ部位を自由末端付近に含む DNA 二重鎖を担持した金ナノ粒子 (dsDNA-GNP) を設計・調製した。定法に従い、5'末端 SH 化オリゴ DNA (16 mer) で修飾した金ナノ粒子 (d = 40 nm) を調製し、これにさらに相補鎖をハイブリダイスさせ dsDNA-GNP を得た。金ナノ粒子上に形成させた dsDNA の塩基配列は、以下のとおりである (図 4)。

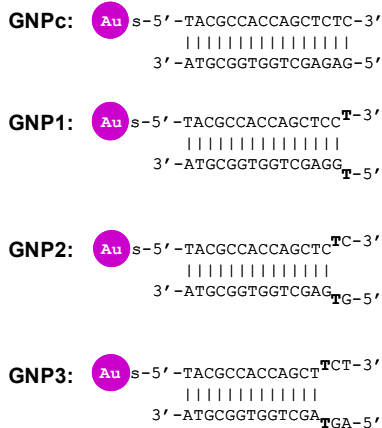


図 4. dsDNA-GNP の塩基配列

各 dsDNA-GNP の高イオン強度環境下における分散安定性、および Hg^{2+} に対する応答性を評価した。

4. 研究成果

(1) GNP 表面に導入された dsDNA の自由末端が完全相補な GNPc は、1 M NaNO_3 共存下において速やかに凝集したが、自由末端が T-T ミスマッチの GNP1 は同条件下においても安定に分散した (図 5)。この結果は、従来の知見とよく一致する。また、自由末端から 2 番目、あるいは 3 番目の塩基対が T-T ミスマッチである GNP2 および GNP3 も同条件下において安定に分散し、赤色の分散液を与えることがわかった (図 5)。

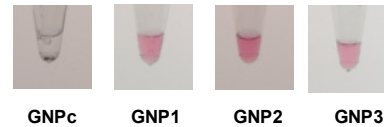


図 5. 各 dsDNA-GNP の 1 M NaNO_3 溶液中 (pH 7.4) における分散安定性

従来、DNA 二重鎖を担持したナノ粒子の分散安定性は、自由末端の一对の塩基対構造にのみ依存すると考えられており、自由末端から 2, 3 番目の塩基対構造がナノ粒子の分散安定性に影響するとは、予想外の結果である。

(2) GNP1~3 の分散液に $\text{Hg}(\text{ClO}_4)_2$ を添加し、 Hg^{2+} に対する応答性を評価した。その結果、GNP1 は Hg^{2+} に全く応答せず、GNP2 および GNP3 が Hg^{2+} に応答し速やかに (< 1 min) 明瞭な色の変化 (赤→無色) を示した (図 6)。

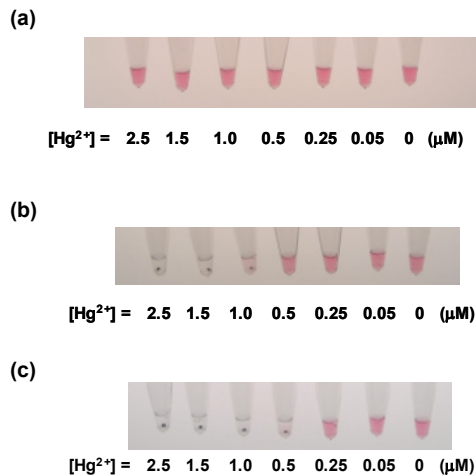


図 6. dsDNA-GNP の Hg^{2+} 応答性 (1 M NaNO_3 , pH 7.4) (a) GNP1, (b) GNP2, (c) GNP3.

また、GNP2, GNP3 は他の種類の二価の金属イオンには全く応答しないことが確認され (図 7)、 Hg^{2+} に対し特異的な応答を示すこと

が確認された。

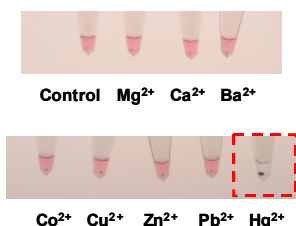


図 7. GNP3 の二価の金属イオンに対する応答性 ($[M^{2+}] = 1 \mu\text{M}$, 1M NaNO_3 , pH 7.4).

以上の結果から、自由末端から 2 番目ないし 3 番目の位置に T-T ミスマッチ構造を導入した dsDNA-GNP は、 Hg^{2+} に対し選択的に応答し、この分散液に試料を混和するだけで $0.5 \mu\text{M}$ (0.1 ppm) 程度の Hg^{2+} の存在を可視情報として迅速に与えることが明らかとなった。本システムの Hg^{2+} の検出感度は、使用する金ナノ粒子のサイズや粒子濃度などのファクターの最適化により、さらに向上するものと考えられる。

(3) Hg^{2+} に対する dsDNA-GNP の応答性において、T-T ミスマッチ部位の導入位置の影響がみられた原因を明らかにするため、dsDNA-GNP 表層の dsDNA の自由末端から 9 bp 分のモデル配列を用い、 Hg^{2+} の有無における dsDNA の融解温度 (T_m) の変化を測定した。その結果、GNP2 および GNP3 上のモデル配列 dsDNA は、 Hg^{2+} の存在下では Hg^{2+} が存在しない場合に比べ T_m が約 10°C 上昇したのに対し、GNP1 上のモデル配列 dsDNA は Hg^{2+} の有無による T_m の変化は見られなかった。このことは、GNP2 および GNP3 上の dsDNA では T-T ミスマッチ部位で T- Hg^{2+} -T ペアが形成されるが、GNP1 では形成されないことを示唆しており、GNP1 が Hg^{2+} 応答性を示さなかったこととも一致する。GNP1 の自由末端に導入された T-T ミスマッチは構造の自由度が高く、DNA 鎖末端の fraying motion のため T- Hg^{2+} -T ペアを安定に保持できなかったものと考えられる。一方、GNP2 や GNP3 の場合は、T- Hg^{2+} -T ペアが形成されることによって dsDNA の自由末端部位が剛直化し、dsDNA-GNP 間のエントロピー反発が低下した結果、非架橋凝集が誘起され色の変化として応答が見られたものと考えられる。

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 3 件)

- ① Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Mizuo Maeda, Rapid naked-eye detection of mercury ion based on non-crosslinking aggregation of double-stranded DNA carrying gold nanoparticles, Chemical Communications, 査読有、Vol. 47、2011、pp.2077-2079
- ② Naoki Kanayama, Swapan Kumar Saha, Naoki Nakayama, Jun Nakanishi, Katsuhisa Kitano, Satoshi Hamaguchi, Yukio Nagasaki, Facile creation of biointerface on commodity plastic surface by combination of atmospheric plasma and reactive polymer coating, Journal of Photopolymer Science and Technology, 査読有、Vol. 23、2010、pp. 579-583
- ③ 金山直樹, 前田瑞夫, DNA コンジュゲート材料によるバイオ計測法の開発、ファルマシア、査読無、46 巻、2010、317-322

[学会発表] (計 5 件)

- ① 金山直樹, 宝田徹, 前田瑞夫, DNA 二重鎖の“柔らかさ”に着目した水銀イオン検出法、第 25 回高分子学会関東支部茨城地区若手の会交流会、つくば、2010 年 10 月 27 日
- ② Naoki Kanayama, Tohru Takarada, Mizuo Maeda, Facile and rapid naked-eye detection of mercury (II) ions using non-crosslinking aggregation behavior of double-stranded DNA carrying gold nanoparticles, The 37th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010 (ISNAC2010), Yokohama, 2010 年 11 月 10 日
- ③ 金山直樹, 宝田徹, 前田瑞夫, DNA 鎖で金ナノ粒子を繋る～水銀イオンセンサーへの応用～、第 24 回高分子学会関東支部茨城地区若手の会交流会、つくば、2009 年 10 月 29 日
- ④ 金山直樹, 宝田徹, 前田瑞夫, ミスマッチペアを導入した DNA 二重鎖担持金ナノ粒子を用いる水銀 (II) イオンの簡便・迅速検出、第 58 回高分子討論会、熊本、2009 年 9 月 16 日
- ⑤ 金山直樹, 宝田徹, 前田瑞夫, DNA 二重鎖を担持した金ナノ粒子を用いる水銀 (II) イオンの簡便・迅速検出、東京コンファレンス 2009、幕張、2009 年 9 月 4 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金山 直樹 (KANAYAMA NAOKI)

筑波大学・大学院数理物質科学研究科・講師

研究者番号：80377811