

アゾベンゼンの光異性化に誘発されたDNA二重鎖の揺らぎを利用するナノ粒子間相互作用の可逆的制御

金山直樹, 岸里美, 宝田徹, 前田瑞夫

理研・前田バイオ工学研究室

生物の遺伝情報媒体であるDNAは、アデニン(A)、チミン(T)、グアニン(G)、およびシトシン(C)の4種類の核酸塩基のいずれかが結合したデオキシリボースとリン酸が交互に連結した高分子電解質、ポリアニオンである。AとT、GとCの核酸塩基の組み合わせは相補的、それ以外は非相補的(ミスマッチ)と表現され、相補的な塩基配列のDNA鎖はWatson-Crick塩基対(A-T、G-C)形成を介して自発的に二重鎖を形成する。タンパク質や糖鎖などと同様に、水中におけるDNAの二重らせん構造は、DNA鎖のミクロブラウン運動やDNA二重鎖内部へ侵入する水分子による局所的な塩基対の開閉運動(ブリーディング)によって動的に揺らいでいる。このようなDNA二重らせん構造の揺らぎは、遺伝情報の転写や複製などの生命プロセスをスムーズに進行させる重要な要素と考えられている[1]。本プロジェクトにおいて我々は、生体システムの特徴である「しなやかさ」や「柔軟性」に着目し、その根源である“構造の揺らぎ”を機能発現・制御に積極的に取り入れた、新しい分子システムの構築を目指している。

これまでに我々のグループでは、比較的短い(> 50 bp)DNA二重鎖でブラシ状に覆われたナノ粒子(以下、DNAナノ粒子)間に働く相互作用が、表層の僅かな塩基対構造を反映して変化することを見出している[2]。例えば、0.4 Mを上回る高塩濃度の水溶液中において、相補的な塩基対を表層に有するDNAナノ粒子間には引力的な相互作用が働き、凝集・沈殿が起こる。一方、塩基対を形成しないミスマッチ配列が表層に存在するDNAナノ粒子間では、斥力的な相互作用が支配的となり、同条件下においてDNAナノ粒子は安定に分散する。これは、DNAナノ粒子表層におけるミスマッチ配列が、大きな表層構造の揺らぎを生起し、DNAナノ粒子間に働く反発力(主に、立体斥力)が増幅されることに起因している。つまり、DNAナノ粒子表層の核酸塩基が生起する構造揺らぎが、粒子間に働く相互作用を決定(斥力的 or 引力的)しているのである。この現象を手掛かりに、分子システム設計の方法論を検討している。

昨年度は、化学刺激(重金属イオン)の印加によるDNAナノ粒子表層の構造揺らぎ制御を試みた[3]。本年度は、系中における物質の出入りを伴わず“可逆的に”DNAナノ粒子表層に摂動を与えることを目標とし、フोटクロミック化合物の光異性化の利用を検討した。アゾベンゼンは、照射波長に応じて可逆的な *trans-cis* 光異性化挙動を示す代表的なフोटクロミック化合物である。これまでに、Azユニット(Fig.1)を複数導入したオリゴDNAと相補鎖間における二重鎖形成と解離の光制御がAsanumaらにより報告されている[4]。DNAナノ粒子の表層近傍にAzユニットを導入することにより、Fig.2に示すAzユニットの光異性化をトリガーとするDNAブラシ界面近傍の塩基対の可逆的な形成-解離、すなわちDNAナノ粒子表層の構造ゆらぎの光刺激による制御が期待される。

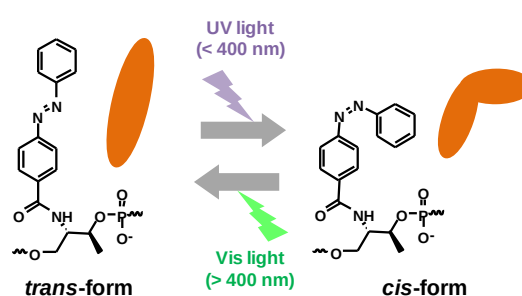


Fig.1 Azユニットの構造と光異性化挙動

既法[3]をベースに、Az ユニットを末端近傍に有する DNA ブラシで覆われた金ナノ粒子(Az-DNA-GNP)の調製を行った。DNA ブラシの鎖長は 16 bp, コア部の金ナノ粒子は 15 および 40 nm のサイズのものについて検討を行った。光照射実験においては、Xe ランプ (MAX-302, 朝日分光)を光源として採用し、バンドパスフィルターを介して紫外光 (350 ± 10 nm, 20 mW/cm²), および可視光 (450 ± 10 nm, 10 mW/cm²)を取り出し、ペルチエ素子で 20 °C に温度を保持しながら照射を行った。

検討を行った Az-DNA-GNP の一例を Fig.3 に示す。この粒子は、Az ユニットが *trans* 体である場合、低イオン強度溶液中では安定に分散し溶液は赤色を呈したが、1 M NaCl 共存下では速やかに凝集し、580 nm 付近にブロードな表面プラズモンピークを有する薄紫色の溶液に変化した(Fig.4(a) 左)。この結果は、従来の DNA ナノ粒子の分散挙動とよく一致する[2,3]。1 M NaCl 共存下で凝集状態にある Az-DNA-GNP に、Az ユニットの *trans-cis* 光異性を誘起する 350 nm の光を照射したところ、溶液の色が徐々に赤色へ変化し(Fig.4(a) 中央), 600 秒後には 520 nm にピークトップを有するシャープなプラズモンピークが確認された(Fig.4(b) 赤線)。このことは、紫外光照射によって Az-DNA-GNP が凝集状態から分散状態へ変化したことを意味する。さらに、分散状態の Az-DNA-GNP に 450 nm の可視光を照射し Az ユニットの *cis-trans* 異性を誘起したところ、徐々に溶液の色が薄紫色へ変化し(Fig.4(a) 右), 600 秒後には表面プラズモンピークは 580 nm 付近へブルーシフトした(Fig.4(b) 青線)。このことは、Az-DNA-GNP が再び凝集状態へ戻ったことを意味する。この光照射による可逆的な Az-DNA-GNP の分散—凝集変化は、3 サイクル以上繰り返し誘起することが可能であった。

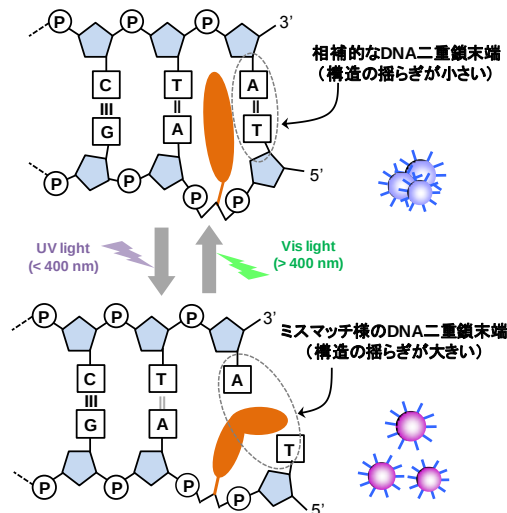


Fig.2 Az ユニットの光異性化に伴う DNA ナノ粒子表面の構造揺らぎの変化。



Fig.3 Az-DNA-GNP の模式図。

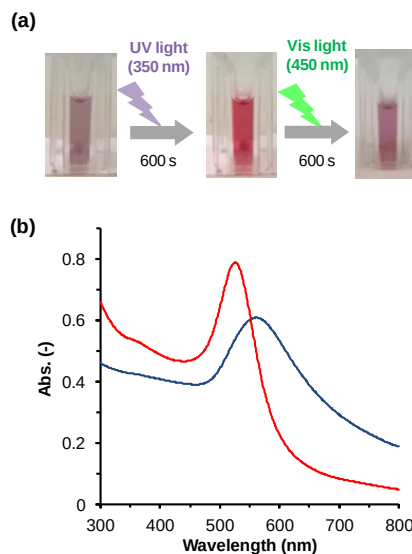


Fig.4 (a) Az-DNA-GNP 分散液の光照射による色調の変化. (b) Az-DNA-GNP 分散液の UV スペクトル (赤：紫外光照射後, 青：可視光照射後)。

【引用文献】

- [1] Ambjornsson, T.; Banik, S. K.; Krichevsky, O.; Metzler, R. *Biophysical J.* **2007**, 92, 2674. [2] (a) 金山直樹・前田瑞夫, バイオマテリアル, 4 月号, 2014 年. (b) Kanayama, N.; Takarada, T.; Maeda, M. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2077. [3] Kanayama, N.; Takarada, T.; Fujita, M.; Maeda, M. *Chem. Eur. J.* **2013**, 9, 10794. [4] Asanuma H.; Liang X.; Nishioka H.; Matsunaga D.; Liu M.; Komiyama, M. *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 203.

DNA修飾金ナノ粒子の塩基数識別能を利用した遺伝子診断法の開発

鹿川裕翔^{1,2}, 秋山好嗣¹, 宝田徹¹, 前田瑞夫^{1,2}

理研・前田バイオ工学¹, 東大院・新領域²

遺伝子のある塩基が別の塩基に置換して生じる一塩基多型 (SNP) は、重要な遺伝的体質と密接に関係する場合がある。これらの SNP 部位の塩基の種類がわかれば、副作用のない薬剤の選択や病気の発症リスクの予測が可能になる[1]。これまでにリアルタイム PCR 法やマイクロアレイ法などの優れた SNP 識別法が開発されてきたが、高価な検出装置や特殊な解析法が必要であるため、医療現場での実用性に課題を残している[2]。当研究室ではこれまでに、一本鎖 DNA で修飾された金ナノ粒子 (ssDNA-AuNP) の凝集挙動を利用した SNP 比色分析法を提案してきた[3,4]。すなわち、ssDNA-AuNP の分散液に完全相補的な ssDNA を添加して粒子表面で二重鎖 (ds) DNA を形成させると、高塩濃度下で自発的な粒子凝集が誘起され、AuNP の表面プラズモン共鳴シフトにより溶液の色は赤から青紫へ変化する。一方、dsDNA-AuNP の最末端が一塩基ミスマッチの場合は分散状態を保ち、溶液は赤色を呈する。これにより、一塩基の種類の違いを目視で識別することができる。しかし、末端ミスマッチ部位が比較的安定な擬似塩基対 (たとえば G-A) を形成する場合は粒子が凝集してしまうため、完全相補 (G-C) として誤診する懸念が指摘されていた[5]。本研究では、この比色分析の信頼性を高めるために、塩基の種類ではなく数の違いに基づいた診断法を開発した。

既報にしたがって、3'末端にチオール基をもつ化学修飾 ssDNA (16 塩基) を AuNP (粒径 15 nm) の表面に Au-S 結合で固定化し、AuNP 1 つあたり約 90 本の ssDNA がブラシ状に担持された粒子を調製した[3]。得られた ssDNA-AuNP の分散液に、化学合成した相補鎖 (16 塩基) または一塩基延長鎖 (17 塩基) を添加して、粒子表面上で二重鎖を形成させた。1 M NaCl 共存下では、相補鎖を加えた場合は迅速な粒子凝集が生じて、数分で溶液の色が赤から青紫に変化した (図 1, X = none)。それに対して、17 塩基の ssDNA が結合して最外層から一塩基が突出した dsDNA-AuNP は、同条件で安定に分散して溶液は赤色を示し、しかもこの分散安定化は突出した塩基の種類によらなかった (図 1, X = A, G, C, T)。これは、粒子の凝集分散を指標にすると、系中に加えた一本鎖 DNA の塩基数の違い (鎖長の違い) を目視で識別できることを意味する。一塩基突出部位のミクロブラウン運動によって、粒子間にエントロピー反発が誘起されたためと考えられる。

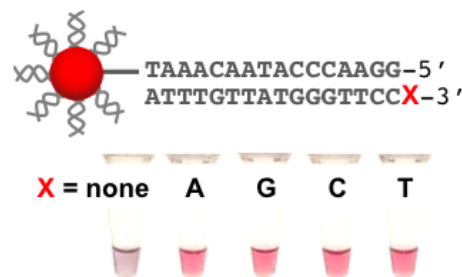


図 1. 一塩基突出部位による dsDNA-AuNP の分散安定化。

この特異なコロイド現象を利用して SNP 識別を行なった[6]。本診断法は、一塩基伸長反応による試料調製とコロイド凝集アッセイからなる (図 2)。診断対象に、薬剤の副作用に関連するシトクロム P450 2C19 (CYP) 遺伝子、および心筋梗塞の発症リスクに関連する内皮性一酸化窒素合成酵素 (NOS) 遺伝子を選んだ。各遺伝子の SNP 部位を含む領域 (56 塩基対) を正常型と一塩基変異型でそれぞれ化学合成し、遺伝子モデルとした。次に、SNP 部位の 3'側隣接領域と相補するオリゴヌクレオチド (16 塩基) を化学合成し、これを診断用プライマーとした。上記の遺伝子モデルと診断用プライマー、ジデオキシヌクレオチド三リン酸 (ddNTP : N = A, G, C, T)、および DNA ポリメラーゼを用いた一塩基伸長反応を、ddNTP の塩基ごとに異なる 4 本の反応チューブで同時に行なった。この診断用プライマーと相補する ssDNA (16 塩基) で表面を修飾した AuNP を上述の

方法で調製し、一塩基伸長反応液にこの ssDNA-AuNP と NaCl を添加して、粒子の凝集と分散を溶液の色調変化として目視識別した。たとえば遺伝子モデルの SNP 部位が A の場合は、ddATP、ddGTP、ddCTP を添加した3つの反応チューブでは診断用プライマーは伸長されないで粒子表面は鎖長の揃った二重鎖となり、粒子凝集によって溶液は青紫色になる(図2左)。一方、ddTTP を加えた反応チューブでは診断用プライマーが 3'末端側に一塩基 (T) だけ伸長されて 17 塩基となり、粒子表面に一塩基突出部位ができるので、粒子は安定に分散して溶液は赤色を示すはずである (図2右)。

実験結果はこの作業仮説と一致した。CYP 遺伝子の SNP 部位は、正常型が G、変異型が A である。まず、正常型の遺伝子モデルと診断用プライマー、および ddATP、ddGTP、または ddTTP (いずれも正常型の G とミスマッチ) を使って一塩基伸長反応を行なった。各反応液に ssDNA-AuNP と NaCl を添加すると、いずれも直ちに粒子が凝集して溶液は青紫色になった (図3a 左)。一方、ddCTP を使用した場合は一塩基伸長反応が順調に進行し、溶液は赤色を示した。また、変異型の遺伝子モデルを使用すると、ddTTP (変異型の A と相補) を使った場合のみ溶液の色が赤になり、それ以外は青紫になった (図3a 中央)。さらに、正常型と変異型の遺伝子モデルの等量混合物 (ヘテロ接合体モデル) を用いた場合は、ddCTP または ddTTP を使ったときに溶液は赤色になり、これら以外は青紫色になった (図3a 右)。以上の結果は、本法によって正常型のホモ接合体、変異型のホモ接合体、正常型と変異型のヘテロ接合体を目視識別できることを示唆している。さらに、NOS 遺伝子の SNP 部位 (正常型 T、変異型 C) についても同様に識別できた (図3b)。2つの実施例をあわせると (CYP 遺伝子の G と A、NOS 遺伝子の T と C)、SNP 部位が4種類のどの塩基であっても目視検出できたことになる。

以上のように、ssDNA-AuNP の塩基数識別能を利用することにより、遺伝子における一塩基の違いを溶液の色調変化として目視検出できる分析法を開発した。簡便で迅速な SNP 識別法として、医療のみならず環境や食品などさまざまな分野で使用されることが期待できる。

【参考文献】

- [1] McCarthy, J. J.; Hilfiker, R. *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 505.
- [2] Syvänen, A. C. *Nat. Rev. Genet.* **2001**, *2*, 930.
- [3] Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 8102.
- [4] Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Nucleic Acids Res.* **2005**, *33*, e4.
- [5] Sato, Y.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *Colloids Surf. B* **2008**, *62*, 71.
- [6] Shikagawa, H.; Akiyama, Y.; Kanayama, N.; Takarada, T.; Maeda, M., in preparation.

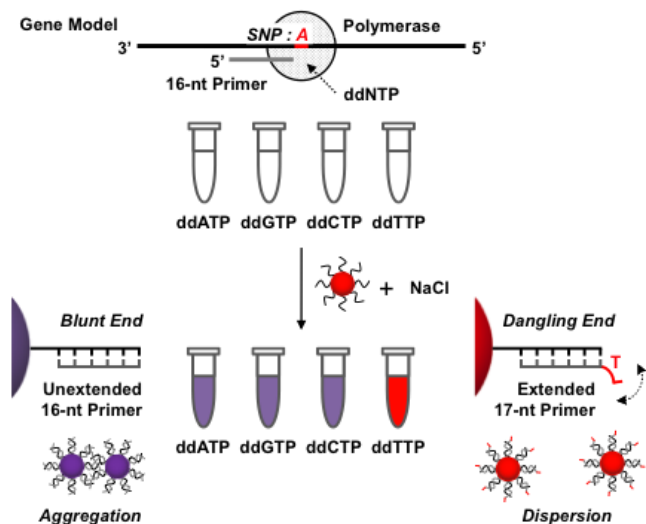


図2. 一塩基伸長法とコロイド凝集アッセイからなる SNP 識別法。

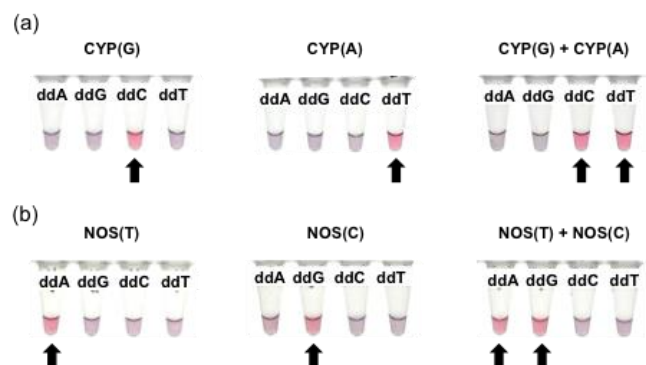


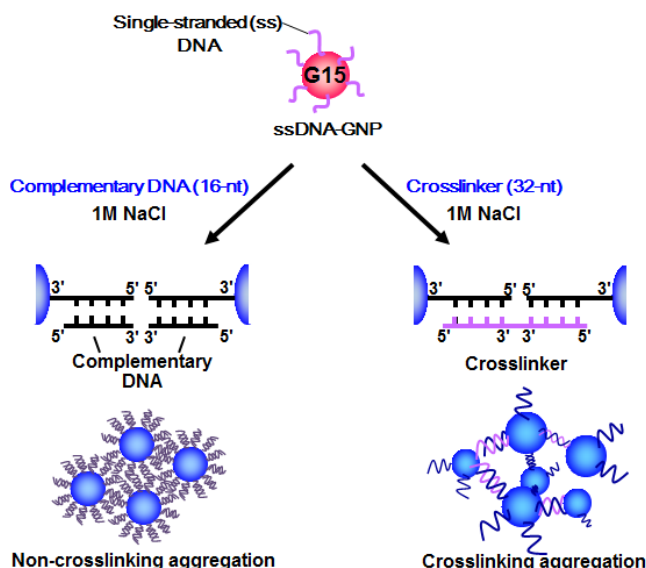
図3. (a) CYP 遺伝子と(b) NOS 遺伝子の SNP 識別。

二重鎖DNA修飾金ナノ粒子の迅速な非架橋凝集：架橋凝集との比較

秋山好嗣、鹿川裕翔、宝田徹、前田瑞夫

理研・前田バイオ工学

一本鎖DNAを高密度に固定化したDNA修飾金ナノ粒子（DNA-GNP）は、高度な分子認識能を有するDNAと金ナノ粒子の鮮やかな発色特性を複合化した機能性ナノ材料である。その物性は多彩かつユニークで、その一例として、DNA-GNPに担持された二重鎖DNAの末端塩基対合に依存した非架橋的な凝集現象が挙げられる[1]。これは、DNA-GNPに担持された二重鎖DNAが完全相補のとき、高イオン強度条件において自発的な（非架橋的な）凝集が誘起され、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴シフトに伴う明確な色変化が観察されるというものである。興味深いことに、末端がわずかに一塩基だけ異なるミスマッチ鎖を添加した場合では、粒子は凝集せず分散状態を保持する。この一塩基の違いが色変化を与えるという新奇現象は、これまでに一塩基多型（SNP）識別をはじめとするさまざまな目視検出技術[2]に応用されてきた。特筆すべきは、このDNA-GNPの非架橋型の凝集が迅速で可逆性に優れた応答を示す点にある。一方で、MirkinらはDNA-GNPの粒子間での二重鎖形成をドライビングフォースとした架橋型凝集について包括的な研究を展開してきている[3]。しかし、これまでに非架橋凝集と架橋凝集を同一条件で比較した報告例はない。そこで、本研究では共通のDNA-GNPを使用して、非架橋凝集と架橋凝集の迅速性と可逆性を比較考察した（Scheme 1）。



Scheme 1. Schematic illustration of non-crosslinking and crosslinking aggregation of DNA-GNP.

本実験で使用したDNA-GNPは、既報に従い3'末端にSH基が導入されたssDNA（16塩基）をGNP（粒径15 nm）に固定化することで調製した[1]。次に、このDNA-GNPにNaCl（最終濃度：1 M）を添加した後に相補鎖（16塩基のssDNA）あるいはクロスリンカー（32塩基からなる非天然型（tail-to-tail型））を添加することで、非架橋凝集と架橋凝集をそれぞれ誘起させた。相補鎖とクロスリンカーの最終濃度は、0.5 μ Mに統一した。

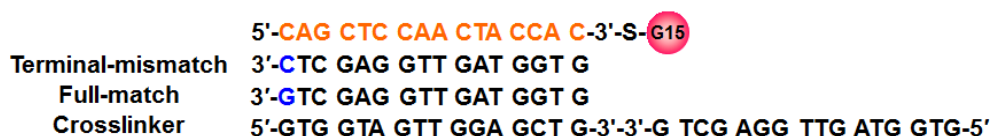


Figure 1. The DNA sequence attached to GNP. The terminal-mismatch and full-match sequences for non-crosslinking aggregation and the crosslinker sequence are also given.

UV-visスペクトルを用いて、金ナノ粒子の分散状態を示すプラズモンバンド ($\lambda = 525 \text{ nm}$) の吸光度の経時変化を追跡した結果をFigure 2に示す。架橋凝集は、10分後でも約10%の吸光度の減少に留まり、明確な色変化も観察されなかった。一方で、同一条件で行った非架橋凝集の場合は、相補鎖の添加直後から急激に吸光度が減少し、10分後には約30%減少した。さらに、これに伴って溶液の色が赤から青紫に変化したことから (Figure 2, 写真)、非架橋的な粒子凝集が示唆された。特に、非架橋型は架橋型よりも大きな初期凝集速度を示した。これは、架橋凝集が1本のクロスリンカーと2つの一本鎖DNA-GNPがある局所空間に特定の方向で共存して初めて誘起されるのに対して、非架橋凝集は、2つの二重鎖DNA-GNPが任意の向きで邂逅すれば誘起されるという、両者のメカニズムの違いを反映していると考えられる。

次に、架橋型凝集体と非架橋型凝集体を加熱によって再分散させ、凝集体の熱安定性を評価した (Figure 3)。まず、塩とssDNAを含むDNA-GNP溶液を室温で60分静置させて、架橋型と非架橋型の双方を凝集させた (Figure 3, 左上と右上)。

次に、それぞれの溶液を50℃で10分間加熱したところ、架橋凝集では色の変化は確認されず粒子は再分散しなかった (Figure 3, 左下)。

興味深いことに、非架橋型の相補鎖を添加した系では溶液の色が青紫から赤へと明確に変化した (Figure 3, 右下)。粒子上で形成される16塩基対の二重鎖DNAの融解温度は、1 M NaCl存在下で60℃以上であることから、架橋凝集は二重鎖DNAの熱力学的安定性によって再分散が抑制されたのに対して、非架橋型凝集体は二重鎖DNAの完全な解離を伴わずに瞬時に再分散できることが示された。

よって、二重鎖DNA修飾金ナノ粒子の塩添加による非架橋凝集が、一本鎖DNA修飾金ナノ粒子のクロスリンカーによる架橋凝集よりも迅速であり、しかも凝集体が低温で再分散することが明らかとなった。

【参考文献】

- 1) K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, J. Am. Chem. Soc. 125, 8102-8103 (2003).
- 2) For example, N. Kanayama, T. Takarada, and M. Maeda, Chem. Commun. 47, 2077-2079 (2011).
- 3) For example, N. L. Rosi and C. A. Mirkin, Chem. Rev. 105, 1547-1562 (2005).

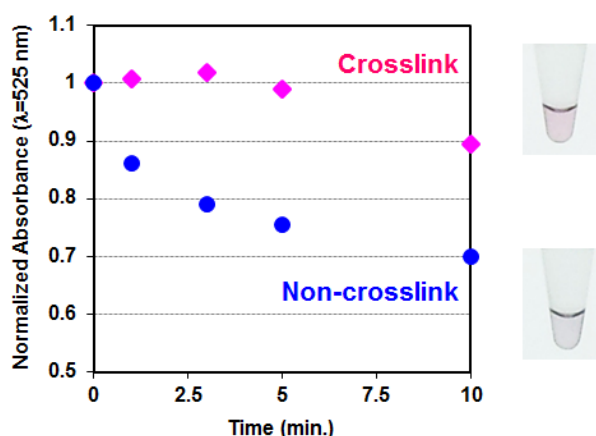


Figure 2. Time courses of extinction at 525 nm of DNA-GNP aggregation in a crosslinking and non-crosslinking fashion. Final conc.; ssDNA = 0.5 μM , NaCl = 1 M, DNA-GNP = 2.5 nM. A photograph of each sample at 10 min was also shown.

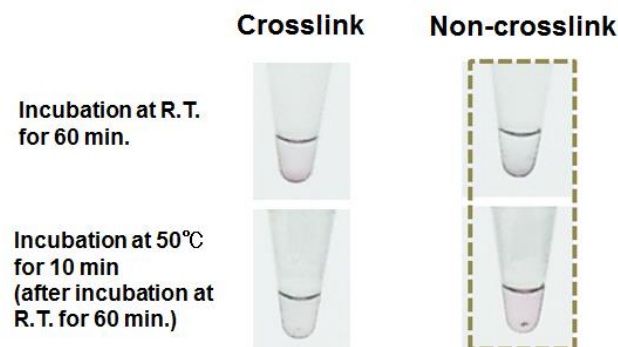


Figure 3. Examination of the reversibility against thermal changes for non-crosslinking (a) and crosslinking aggregation (b). [ssDNA] = 0.5 μM , [NaCl] = 1 M, [DNA-GNP] = 2.5 nM.

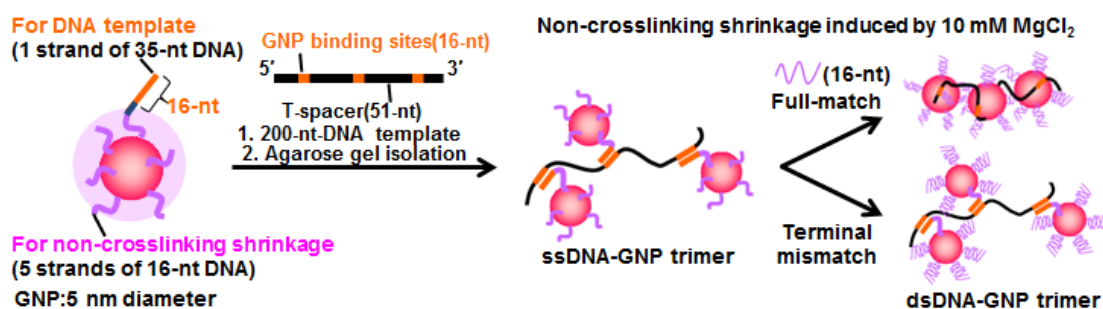
Double-Stranded DNA-Functionalized Gold Nanoparticle Oligomers with a Beads-on-a-String-Like Structure: Dependence of Interparticle Distance on Ionic Strength

Yoshitsugu Akiyama, Hiroto Shikagawa, Tohru Takarada, and Mizuo Maeda

Bioengineering Laboratory, RIKEN

Linear arrays formed with gold nanoparticle (GNP) are gaining considerable interest because of their unique properties that cannot be obtained from the solitary and amorphous states [1]. To construct the linear GNP arrays, DNA-templated assembling approaches [2] are often straightforward; however, further methodologies towards the achievement of their effective and reversible structural changes responding to external stimuli have insufficiently been established. Here, we describe preparation of double-stranded (ds) DNA-GNP oligomers with a beads-on-a-string-like structure and their interparticle distance changes induced by increasing ionic strength [1].

To prepare ssDNA-GNP trimers, GNPs modified with two kinds of single-stranded (ss) DNA were assembled with a DNA template (Scheme 1). Briefly, GNPs (5 nm in diameter) covalently functionalized with one strand of 35-nucleotide (nt) ssDNA and five strands of 16-nt ssDNA were mixed with a 200-nt ssDNA template having three binding sites. The feed number of GNP per binding site of the template was 4. The mixture was incubated in 0.5X TBE buffer containing 75 mM NaCl for 10 min at 60 °C, followed by further incubation for overnight at room temperature. The trimer was purified by electrophoresis on a 3% agarose gel, and was characterized by dynamic light scattering (DLS) measurements (Zetasizer Nano ZS, Malvern) and transmission electron microscope (TEM) observations (JEM 1230, JEOL).



Scheme 1. Preparation of DNA-GNP trimers and their structural changes.

The ssDNA-GNP trimer purified with agarose gel electrophoresis was characterized by DLS measurements. The ssDNA-GNP monomer without the DNA template and the trimer were 18.1 nm and 32.8 nm in averaged hydrodynamic diameter, respectively (Figure 1). This obvious increase in size indicates the formation of the GNP assemblies. In addition, the formation of the trimer was directly confirmed by TEM observations (Figure 2).

Next, to evaluate an interparticle distance change induced by non-crosslinking shrinkage of the trimers, we performed TEM observation and its statistical analysis. The ssDNA-GNP trimer was treated with complementary ssDNA (full-match) or its terminal-base-substituted ssDNA (terminal-mismatch) to form dsDNA-GNP trimers. The mixture thus prepared was incubated in the presence of 10 mM MgCl_2 . Typical TEM images are shown in Figure 2a and 2b for dsDNA-GNP trimers having full-match and terminal-mismatch sequence, respectively. Each image showed that a significant portion of GNPs can be identified as trimers. We evaluated the interparticle distance between GNPs within the trimer using an in-house software. For triangle structure in the images, the observed interparticle distance longer than the contour length of 51-nt T-spacer in the DNA template (ca. ~ 25 nm) was excluded to avoid bias in a statistical analysis. From these coordinates, average interparticle distance was then calculated. As shown in Figure 2c and 2d, histograms revealed that an effective shrinkage of the trimer having the full-match sequence took place by adding 10 mM MgCl_2 (the average interparticle distance: 9.6 ± 2.7 nm). Interestingly, this shrinkage was strongly inhibited when a terminal-mismatch was located at the outermost surface of dsDNA-AuNP (14.0 ± 3.9 nm). This is probably due to an increase in entropic repulsion between the particles induced by micro Brownian motion of the unpaired mononucleotides.

In conclusion, we have demonstrated the efficient construction of ssDNA-GNP trimers with a beads-on-a-string-like structure based on DNA-templated methodology, as well as the effective shrinkage of the trimers induced by increasing ionic strength. The present approach will allow for creation of stimuli-responsive materials with controlled morphological features.

References

- [1] Z. Tang and N. A. Kotov, *Adv. Mater.* 17, 951-962 (2005).
- [2] For example, Y. Zhao *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* 4, 641-647 (2013).
- [3] K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* 125, 8102-8103 (2003).

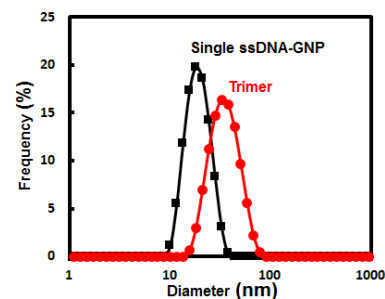


Figure 1. Size distribution of single ssDNA-GNP without the DNA template and its trimer measured with dynamic light scattering (GNP conc.; 75 nM, temperature; 25 °C).

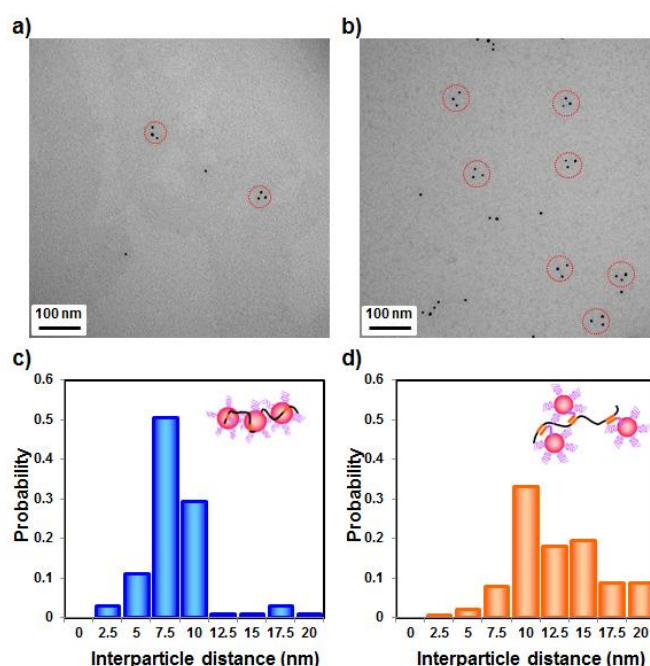


Figure 2. Non-crosslinking shrinkage of dsDNA-GNP trimers induced by 10 mM MgCl_2 . A TEM image and a histogram of interparticle distance for the full-matched trimer (a and c) and the terminal-mismatched trimer (b and d). Scale bars are 100 nm.

DNA担持ポリマーミセルの構造物性

藤田雅弘, 平峯勇人, Pan Pengju, 前田瑞夫

理研・前田バイオ工学研究室

ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAAm) は温度応答性高分子として知られ、その水溶液は32 °C付近に下限臨界溶液温度 (LCST) を有し、LCST以上で水溶液は白濁する。PNIPAAm に一本鎖DNA (ssDNA) がグラフトされた共重合体 (PNIPAAm-*g*-DNA) もLCSTを示す。DNA の導入比率に依るが、LCST以上で疎水性のPNIPAAmセグメントどうしが会合し、その表層に親水性のDNA鎖が密生したナノミセル (DNA担持ナノ粒子) が形成される。そのナノ粒子は安定的に水中で分散するため、系は無色透明のままである。ナノ粒子表層のDNAに対し、完全に相補的なDNA鎖を系中に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 (非架橋凝集) し、系は白濁する。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には、高塩濃度でさえもナノ粒子は安定に分散状態を保ち、無色透明のままである (図1)。この界面現象のメカニズムの全貌を明らかにすべく、本研究では構造の明確なPNIPAAm-*b*-DNA共重合体を合成し、その共重合体から成るナノ粒子の形成、構造ならびに分散安定性について詳細に調査している[1,2]。

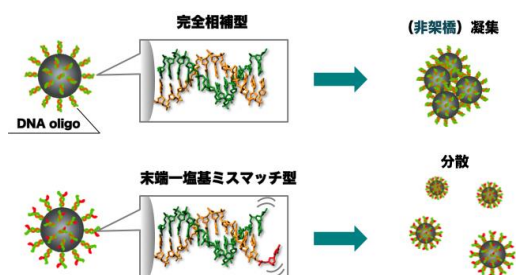


図1 末端塩基対形成に応答する DNA 担持ナノ粒子の分散安定性.

片末端にアジド基を有するPNIPAAmを原子移動ラジカル重合 (ATRP) 法により合成した。その後、予め調製した5' 末端にアルキン基を有する9塩基あるいは15塩基のオリゴDNAとカップリングさせ、PNIPAAmとssDNAとのブロック共重合体 (PNIPAAm-*b*-DNA) を得た。一次構造の影響を調べるために、種々のPNIPAAmブロック長や分子骨格 (AB 線型ならびにA₃Bミクトアーム星型) から成る共重合体を調製した。これら共重合体に対し、GPC-MALS、紫外可視分光光度計 (UV-Vis) や動的光散乱法 (DLS) など特性評価を行った。全ての測定は、10 mM リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.4) で行い、塩としてNaNO₃を用いた。さらに、ミセル形成や粒子内部の構造の詳細は、大型放射光施設SPring-8 (BL45XU) での小角X線散乱 (SAXS) 法により解析した。

線型とミクトアーム星型いずれの PNIPAAm-*b*-DNA も、分子量の制御された分布の狭いものであった。PNIPAAm ブロックの重合度が 150~400 程度の共重合体では、それらの LCST 以上で半径がおおよそ数十 nm ほどの球状ミセルを形成した。PNIPAAm ブロック長の増大に伴い、ミセルサイズは大きくなった。DSC や透過率測定により PNIPAAm-*b*-DNA 水溶液の相転移を観察すると、DSC 測定では 35~40°C付近 (LCST) で吸熱ピークを示すものの、透過率は 100%のままで変化せず、ナノミセルは安定的に水中で分散していることがわかった。

溶液 SAXS 測定では、LCST 以上になると小角領域での散乱強度が急激に上昇するとともに明瞭な極大が観察され、LCST でのミセル形成を捉えることができた。ギニエ解析に基づいてミセル形成時における PNIPAAm-*b*-DNA 会合数を評価すると、PNIPAAm ブロック長に依存して数十

から 200 分子程度の PNIPAAm-*b*-DNA 鎖の会合により一つのナノ粒子（ミセル）を形成するのがわかった。精密合成されたブロック共重合体からなる球状ミセルは、サイズが均一で構造の明確なものであった。PNIPAAm を疎水核としてその表層に DNA が密生したようなコア・シェル型の構造をとるが、PNIPAAm ブロック鎖長が増大すると会合数が増大し、それに応じて疎水核径が増大した。さらに、線型共重合体から成る粒子に比べ、ミクトーム星型共重合体から形成される粒子では疎水核径の低下を示すものの、高密度を有することなどを明らかにした。

LCST (40 °C) 以上でミセル形成をさせた後に、完全相補鎖を系中に導入して DNA 二重鎖を形成させても粒子は安定的に分散したままであるが、塩を加える（例えば、1 M NaNO₃）と直ちに系は白濁する。このような試料を SAXS 測定すると粒子間の凝集による干渉性のシグナルが観測された（図 2）。散乱強度データより得られる構造因子の解析の結果、DNA 層が互いに深く貫入しながら粒子どうしが凝集していることが判明した。DNA 末端間のスタッキング相互作用の影響を受けていないようである。

予め塩濃度を 1 M とし、完全相補鎖を LCST 添加した系に関しても、その温度応答性を追跡した。その結果の一例を図 3 に示す。LCST 以下では共重合体は孤立状態にあると考えられ、二重鎖 DNA ブロックを基点とした会合体形成は認められなかった。LCST 以上で見かけの分子会合が観測されたが、おそらくは PNIPAAm ブロックを核としたミセル形成とその後の粒子凝集が速やかに生じたものと考えられる。さらに加熱すると SAXS プロファイルは粒子の形状因子のみを反映したものとなり、二重鎖の融解によるミセルの分散が生じていることがわかった。

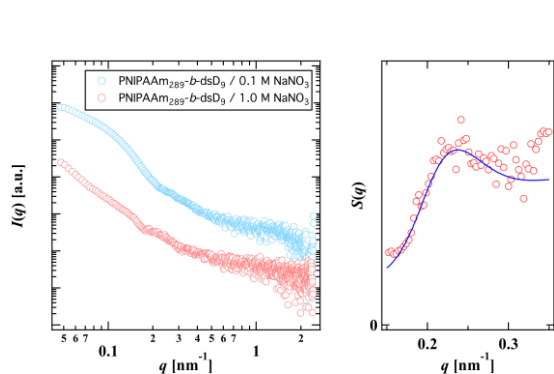


図 2 (左) 線型ブロック共重合体から成るミセルからの SAXS プロファイル (40 °C) : (青) [NaNO₃] = 0.1 M、(赤) [NaNO₃] = 1.0 M. (右) 対応する構造因子.

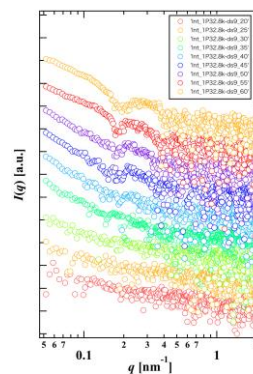


図 3 昇温過程における線型ブロック共重合体の SAXS プロファイル (20 – 65 °C) . 1M NaNO₃、完全相補鎖存在下にて行われた.

【参考文献】

- [1] Pan, P.; Fujita, M.; Ooi, W. Y.; Sudesh K.; Takarada, T.; Goto, A; Maeda, M. *Polymer* 2011, **52**, 895–900.
- [2] Pan, P.; Fujita M.; Ooi, W. Y.; Sudesh K.; Takarada, T.; Goto, A; Maeda, M. *Langmuir* 2012, **28**, 14347-14356.

分子シャペロンスモールヒートショックプロテインの アミロイドβ蛋白質凝集への影響

座古保, 吉田知識, Karin Sorgjerd, 前田瑞夫

理研・前田バイオ工学

タンパク質はポリペプチドとして合成された後、折れたたむことにより配列特異的な立体構造を形成して初めて生理活性を有する。一方、折れたたみに失敗したポリペプチド鎖や変性したタンパク質が細胞内で凝集体として蓄積し、細胞の障害をもたらすことが近年分かってきた。アルツハイマー病や狂牛病はその例である。これらの病気では共通してアミロイド線維と呼ばれるタンパク質凝集体が疾病の原因とされている。近年アルツハイマー病の原因物質とされているアミロイドベータ(Aβ)のアミロイド線維形成において、分子シャペロンタンパク質の1種であるsHsp(small heat shock protein)の関与が示唆されている。sHspは低分子量(12~40kDa)のモノマーが二量体(dimer)と多量体(multimer)のふたつの会合状態をとる。様々な分子量のsHspが存在し、共通してαクリスタリン配列を有する。sHspは通常 multimer で存在し、ストレス条件下で dimer に解離する。この dimer 解離が凝集抑制活性に重要だと考えられている。sHspのひとつであるHSP27は心臓や骨格筋など人体の様々な器官から見つかっており、アルツハイマー病の患者の脳内にも存在している。近年HSP27は通常 multimer 状態をとるが、リン酸化されることで dimer 状態になることが報告された[1]。非リン酸化HSP27(multimer)が試験管内でAβの凝集を防ぐことが知られている。一方、我々はこれまでに酵母由来のsHspがdimer状態とmultimer状態でAβ凝集に異なる影響を与えることを見いだしている[2]。しかし、ヒト由来sHspであるHSP27のdimer状態がAβ凝集に与える影響は未だ調べられていない。そこで本研究ではMAPKAPキナーゼでリン酸化したHSP27とAβモノマーをインキュベートしたサンプルの細胞毒性、凝集体の量や構造を評価した。

HSP27のリン酸化およびdimer化はphos-tag SDS PAGE、HPLCで確認した。リン酸化されたHSP27(p-HSP27)及びリン酸化されていないHSP27存在下においてAβ42モノマー(25 μM)を37℃で24時間インキュベートし、線維状凝集体の量がHSP27の会合状態(dimer, multimer)や濃度によって変化するかどうかをThT assayで調べた(図2a)。その結果、p-HSP27(dimer)は濃度依存的にAβ凝集を抑制し、0.2 μM以上ではAβ線維状凝集形成をほぼ完全に抑制することがわかった。また、非リン酸化HSP27(multimer)を用いた場合も同様に0.2 μM以上でAβ線維状凝集形成をほぼ完全に抑制することがわかった。

次に、HSP27とAβモノマーをインキュベートしたサンプル中にある可溶性画分のAβの分子量をNative-PAGE/WBで評価した(図2b)。p-HSP27(dimer)を用いた場合、0.5 μM以上のHSP27濃度では、モノマーやプロトフィブリルが観察された。一方、0.2 μM以下では可溶性画分は観察されなかったため、Aβは不溶性の大きな凝集体を作っていることが示唆された。同じサンプルをHSP27抗体で染色したところ、0.5 μM以上のHSP27とインキュベートしたサンプルに関して、枠で示すように高分子量のプロトフィブリルと思われるバンドにHSP27が観察されたことから、AβとHSP27の複合体形成が示唆された。また、非リン酸化HSP27(multimer)を用いた場合も同様の結果が得られた。すなわち非リン酸化

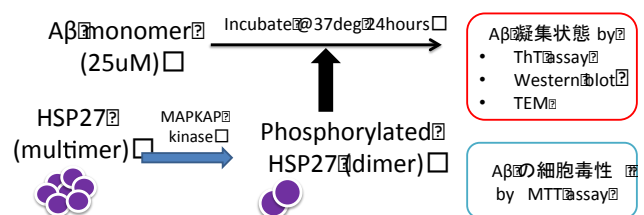


図1. 構造の異なるHSP27によるAβ凝集への影響

HSP27 (multimer)が 0.5 μ M 以上のときにモノマーやプロトフィブリルと思われるバンドが観察され、さらに A β と HSP27 の複合体形成が示唆された。

HSP27 と A β モノマーをインキュベートしたサンプルを PC12 細胞に加えた時の細胞毒性を MTT 法により評価した(図 2c)．HSP27 非存在下で形成した A β 凝集体(Fibril)を加えたときの細胞生存率は約 50%であった．それに対し 0.2 μ M 以上の p-HSP27(dimer)存在下では A β サンプルの毒性は低下していた．また、非リン酸化 HSP27 (multimer) を用いた場合も同様に、0.2 μ M 以上の HSP27 存在下では A β サンプルの毒性は低下していた．以上の結果より、ヒト由来の sHsp である HSP27 に関して、リン酸化した HSP27(dimer)は非リン酸化 HSP27 (multimer)同様、濃度依存的に A β の線維状凝集体形成及び毒性を抑制することがわかった[3]．

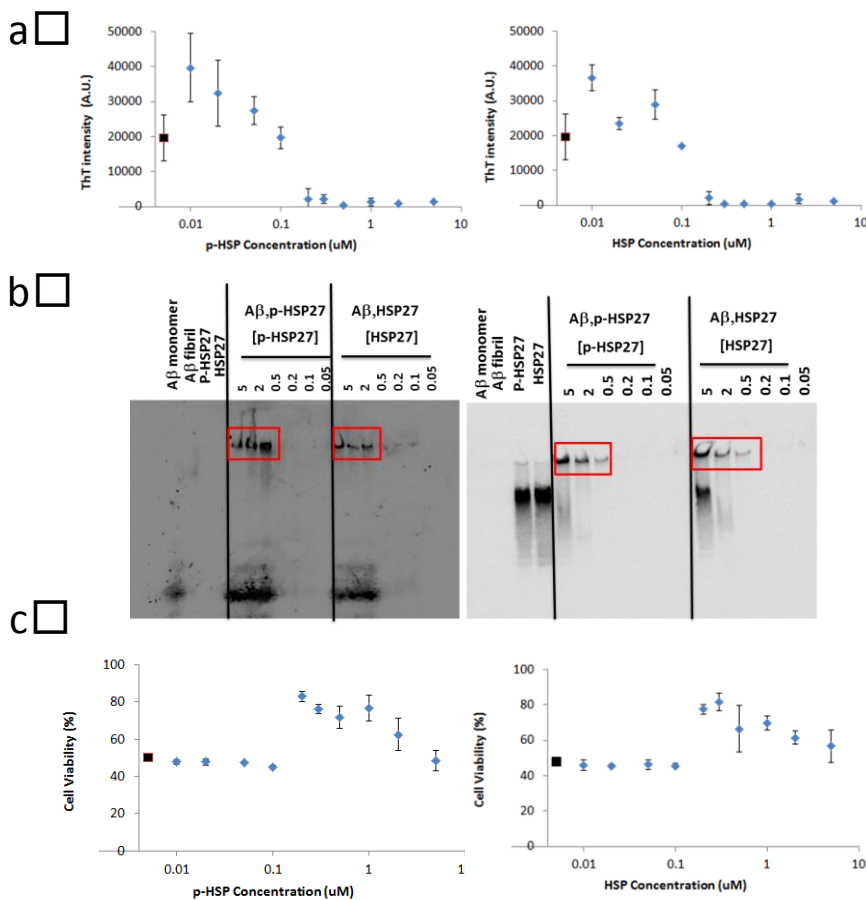


図 2. multimer・dimer(リン酸化)の HSP27 の存在下、非存在下における A β 凝集評価. a) ThT 蛍光. 450nm の励起光による 482 nm の蛍光を測定. b) Native PAGE/western blot. (枠: プロトフィブリル)

左: A β 抗体で染色 右: HSP27 抗体で染色 c) 細胞毒性. PC12 細胞にサンプルを加えた際の細胞生存率を MTT 法により評価

【参考文献】

- [1] Hayes D.; Napoli, V.; Marukie, A.; Stafford, W.F.; Graceffa, P. *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 18801. [2] Sakono, M.; Utsumi, A.; Zako, T.; Abe, T.; Yohda, M.; Maeda, M. *Biochem Biophys Res Commun.* **2013**, 430, 1259. [3] 吉田 知識・座古 保・カリン ソルヤード・前田 瑞夫、第 13 回日本蛋白質科学会、2013, 1P090

Biostructure Interaction Analysis using strong Metal-based Nanomagnets

Tamotsu Zako¹, Aline Rotzetter^{1,2}, Christoph Schumacher^{1,2}, Wendelin Stark², Mizuo Maeda¹

Bioengineering Laboratory, RIKEN¹, Institute for Chemical and Bioengineering, ETH Zurich²

Magnetic nanomaterials offer high specific surface areas, ease of separation and the opportunity of application-tailored surface modifications. They have been proposed for use in catalysis, drug-delivery or as contrast agents. Beside high chemical stability and advantageous properties of ferromagnetic cores, carbon-coated cobalt nanomagnets offer a simple platform for chemical functionalization and rapid physical movement. Previously, the selective removal of large biomolecules (e.g. inflammatory mediators) using non-oxidic nanomagnets in protein-rich media such as human whole blood by immobilized FAB-fragments has been shown [1]. This highlights the importance of specific surface-structure interactions under competitive adsorption conditions. However, the complex binding characteristics of a specific antibody usually restricts its use to broader target ranges. Beside structural selectivity, affinities of large biomolecules can also arise from basic physical surface properties including hydrophobicity, topology or electric charge. This concept is successfully applied in phosphopeptide enrichment.

Amyloid fibrils are complex strain-shaped protein structures which are formed from smaller peptide monomer units. Their physiological presence and tissue deposition is associated with neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease (AD) and different types of amyloidosis. Thioflavin T (ThT) or Congo Red can access the beta-sheet structure of a large variety of amyloid fibrils and are therefore widely used in their analytics. The binding of amyloid fibrils to ultra-strong metal-based nanomagnets offers a convenient base to examine the interaction of a family of complex biological structures with different basic physical surface characteristics (i.e. electrostatic properties, hydrophobic interactions). Here, we systematically investigate surface adsorption of A β fibrillar aggregates on carbon-coated cobalt nanomagnets which were functionalized with various polymers revealing different physical characteristics (charge, hydrophobicity). To afford a better understanding on biologically more relevant competitive adsorption, the surface affinities were also examined in solutions containing an excess in bovine serum albumin (BSA) (100-fold excess in weight regarding fibrillar aggregates). This simulates an environment similar to blood plasma.

Carbon coated nanoparticles were functionalized with polyethyleneimine (PEI), polyacrylic acid or poly(diallyldimethylammonium chloride) (polyDADMAC). Irreversible attachment of polymer coatings was confirmed with elemental microanalysis and diffuse reflectance Fourier transform infrared spectra (DRIFTS). Adsorption of A β fibrillar aggregates on functionalized nanomagnets was determined by the amount of aggregates remaining in the supernatant after collection of nanomagnets (Fig.1). Concentrations of A β fibrillar aggregates were determined by staining the fibrils with amyloid specific dye ThT.

amyloid β 42 catching with nanomagnets

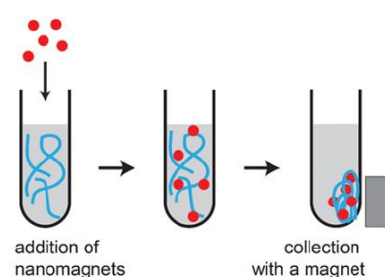


Fig.1 Amyloid catching procedure using nanomagnets

Figure 2 shows adsorption isotherms of A β fibrillar aggregates on blank as well as PEI-coated nanomagnets at different particle concentrations. Both particle types exhibit a similar adsorption behavior in solutions with PBS only. At the highest tested particle concentrations we found almost complete fibril extraction (>95%). All adsorption isotherms reveal a curved shape, which is likely to be a dilution effect of the fibrillar concentration in the extracted medium. Adsorption isotherms on charged polymer surfaces (negative charge at neutral conditions: polyacrylic acid; positive charge: poly diallyl(dimethylammonium chloride); polyDADMAC) show a significantly lower binding affinity.

The presence of large concentrations of BSA compared to the target species establishes a strongly competitive environment for selective extractions. Such situations are frequent in natural systems such as blood. As expected, all particles adsorbed amyloid fibrils in a lower extent when BSA was present (Fig. 2a-d). Despite from this, the PEI-coated nanomagnets still revealed a considerable ability to bind amyloid fibrillar aggregates (75% extraction extent at highest particle concentration). As found earlier, BSA is not able to rapidly bind onto PEI functionalized particles. This enables a favorable adsorption environment to fibrils within the conducted extraction time frame, despite much higher BSA concentration compared to fibrils (100-fold). These findings highlight the possibility of selective extractions from complex media when advantageous basic physical surface properties are chosen [2].

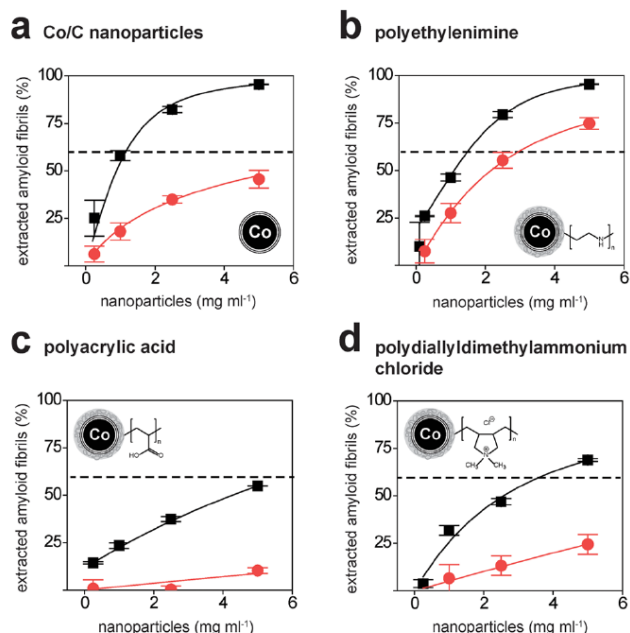


Fig.2 Adsorption isotherms of A β amyloid without (squares) and with BSA (circles) on a) blank carbon-coated nanomagnets b) PEI functionalized c) polyacrylic acid functionalized d) polyDADMAC functionalized nanomagnets (broken lines, 60% extraction)

References

- [1] Herrmann, I. K.; Uner, M.; Graf, S.; Schumacher, C.M.; Roth-Z'graggen, B.; Hasler, M; Stark, W.J.; Beck-Schimmer, B. *Adv. Health Mater.* **2013**, 2, 829
- [2] Rotzetter, A.C.C.; Schumacher, C.M.; Zako, T.; Stark, W.J.; Maeda, M. *Langmuir* **2013**, 29, 14117

Microscopic Detection of Single-nucleotide Polymorphism

Using Nucleic Acid-conjugated Gold Nanoparticles

Tong Bu, Tamotsu Zako, Masahiro Fujita, Mizuo Maeda

Bioengineering Laboratory, RIKEN

Metal nanoparticles (NP) have attracted much attention due to their special optical, electronic and catalytic properties. Among various metal particles, gold nanoparticles (AuNP) have been extensively investigated. Particularly, the AuNPs assemblies give rise to high-order structures with potential applications in sensors for bio diagnosis, heavy metal and protein sensing.

Early and accurate detection of DNA mutation is crucial for identification and diagnosis of various diseases. Aggregation of probe DNA-modified AuNPs and its application to DNA detection has been attracting considerable interests. It was discovered that formation of fully complementary duplexes on AuNP surfaces induces the aggregation, while the single-base mismatches at the distal ends greatly stabilize the colloidal dispersion; the color difference between which can be distinguished by naked eyes and UV-spectroscopy, which enables easy detection of single nucleotide polymorphisms (SNPs) [1]. One of the drawbacks of the current measurements is low detection sensitivity (DNA detection limit = 60-500 nM range). In this study, in an aim to achieve highly sensitive detection of SNPs, we employed dark field microscopy (DFM), which can detect scattered light from individual single metal nanostructures to examine AuNP aggregations at single particle level.

The 15-mer single strand DNA (ssDNA) was immobilized as probe on surface of 40 nm AuNPs as previously described. Solution of complementary DNA (target DNA) was mixed with AuNP-DNA probe solution. Aggregation of AuNPs was induced by addition of 1.0 M NaCl. Olympus microscopy BX53 with oil immersed dark-field condenser (U-DCW) was used to examine the dispersed or aggregated AuNPs immobilized on silane coated slide glass. Scattered lights from AuNP-DNA were captured by high sensitive camera (Olympus DP73). The aggregation can be estimated by the brightness of each spot, which informs the degree of aggregation caused by DNA hybridization. Figure 1a showed images of dispersed (left) and aggregated AuNPs (right) taken by DFM. It is clearly seen that the dispersed AuNPs scatters less light than aggregates because bigger size results in higher scattering efficiency, which showed the size difference between dispersed and aggregated AuNPs.

The intensity of particles/clusters on the image was determined for drawing intensity histogram. The change of the intensity histograms was used to determine the detection limit. To determine the detection limit of DFM, increasing concentrations of complementary DNA ranging from 0 to 500 nM were added to AuNP colloids. As shown in the Fig. 1b, the peak of the histogram shift from left to right gradually, indicating that the intensity of scattered light from each particle/cluster increased due to the enlargement of each clusters with increased complementary DNA concentration. The percentage of aggregates, which showed brighter intensities than the monomer, at each target DNA concentration was estimated and plotted (Fig. 1c). As shown in the figure, the percentage of aggregate increased at higher target DNA concentration. The LOD was evaluated to be 100 fM by the 3σ criterion method.

Taking advantage of single particle analysis by DFM measurement, the AuNP aggregation model was investigated by studying the assembly dynamics using DFM. Two growth models of NP aggregates have been proposed based on theoretical studies: the particle-cluster aggregation model in which aggregates grow via the addition of individual particles, and the cluster-cluster aggregation model in which aggregates grow by the combination of aggregates of any size (Fig.2a). The aggregation time scale was roughly estimated by DLS (Fig.2b, open triangle). The aggregation process is still in progress after 2 hours of incubation. In contrast, the change of the ratio of monomer AuNPs over time after the addition of 50 nM of target ssDNA estimated with DFM showed that the ratio of monomers decreased relatively quickly to 20% at the first 15min, and to 2% of all particles after 60 min. Therefore, the monomer-cluster aggregation model is unlikely to account for our results, indirectly suggesting that cluster-cluster aggregation is the dominant model for dsDNA-AuNP aggregation at the early stage [2].

In conclusion, the presented results indicated that measurement of scattering intensity from dark-field imaging allowed us to visualize and quantify the AuNPs aggregation with respect to the amount of target DNA with high sensitivity, which can be applied as the base for highly sensitive bio analytical tool development.

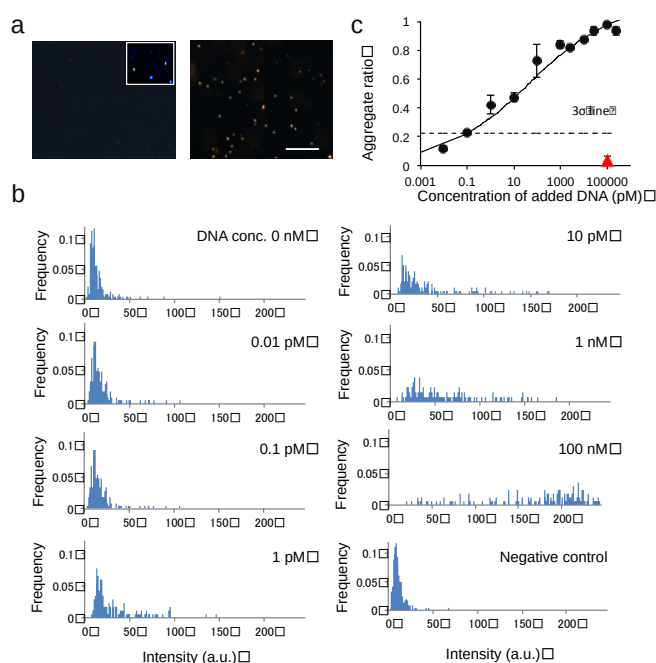


Fig.1 (a), DFM images of dispersed (left) and aggregated AuNPs (right). The scale bar=20 μm. (b), Intensity histogram of AuNPs aggregates observed by DFM caused by adding different concentration of the target complementary DNA. Mismatched ssDNA (100nM) was added as a negative control. (c), Ratio of aggregated AuNPs at various complementary DNA concentration.

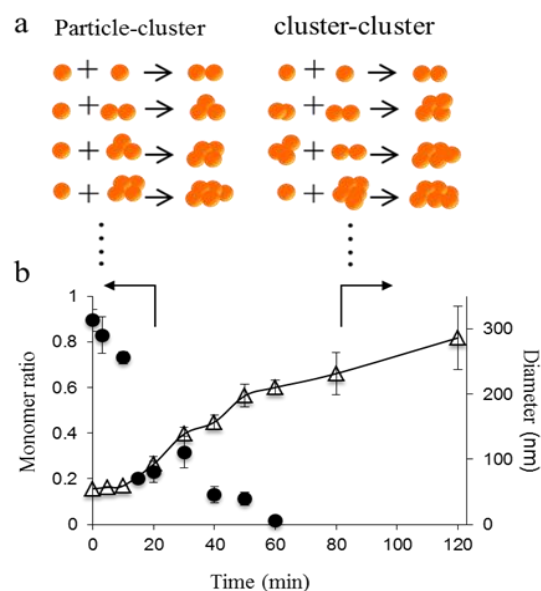


Fig.2 (a), Schematic diagram of NPs aggregation model. (b), DNA induced AuNP aggregation dynamics. Left axis, Change in monomer ratio obtained from the histograms of DFM images. Right axis, Change in diameter measured by DLS.

References

- [1] Sato, K.; Hosokawa, K.; Maeda, M. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 8102 [2] Bu, T.; Zako, T.; Fujita, M.; Maeda, M. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7531

マイクロ流路中に閉じ込めたミドリムシの 化学走性の計測

尾笹一成¹, Simon Song², Jeessoo Lee², 前田瑞夫¹

理研・前田バイオ工学¹, Hanyang University・Mechanical Eng.²

ミドリムシは光合成を行う水棲の単細胞微生物（図1）で、鞭毛によって遊泳し、光合成に適当な光強度の場所に留まる光走性と環境化学物質に反応する化学走性を示す。生物の有する諸性質を化学反応の「階層構造を持つ分子システム複雑系」と見た場合、ミドリムシの走性は階層の最上層の複雑系レスポンスに位置する。具体的には、光や化学物質に反応するレセプタータンパクが刺激を受け、細胞内メタボリック信号伝達系を通じて鞭毛の運動が制御される。これまでの他グループの研究によって刺激レセプター分子は特定されつつあるが、中間信号伝達系や鞭毛運動の制御系に関与しているタンパクなどは、系の複雑さゆえにまったくわかっていない。



図1. 遊泳性光合成微生物ミドリムシ。

このような状況のもと、我々は分子システム階層の最上層の走性を利用して環境センシングマイクロデバイスなどを構築するマイクロエージェント化戦略と、酵素タンパクのノックダウンの走性への影響を調べて信号伝達系や鞭毛運動制御系に迫る走性因子解明戦略を立てて研究を行っている[1]。ここでは前者のマイクロエージェント化戦略のひとつとして、ミドリムシをマイクロスケールのセンサーおよびインジケータとして用いる研究を紹介する。マイクロ流路中の完全閉空間にミドリムシ細胞群を閉じ込め、その運動をリアルタイムで計測数値化する技術を開発した。それによって計測したミドリムシのCO₂に対する化学走性を計測し、環境センサーとしての有効性を実証した[2]。

化学走性計測のために作製したマイクロデバイスの流路構造を図2に示す。マイクロ流路は多孔質で透明なシリコン樹脂であるPDMSで作製しており、下面はスライドガラスとなっている。16の扇形部分と中央の円形部分がミドリムシ細胞群を閉じ込めるエリアで、その周囲を2本のバイパス流路が取り囲む構造となっている。2本のバイパスにそれぞれテスト流体と比較流体を流すと流体分子はPDMSの壁を透過拡散し、中央の閉空間（マイクロアクアリウム）に濃度勾配となって現れる。その化学濃度勾配をミドリムシが感知し、テスト流体側（正の化学走性の場合）あるいは比較流体側（負の化学走性の場合）に集まる。ミドリムシの行動を定量的に捉えるために、顕微鏡に取り付けたビデ

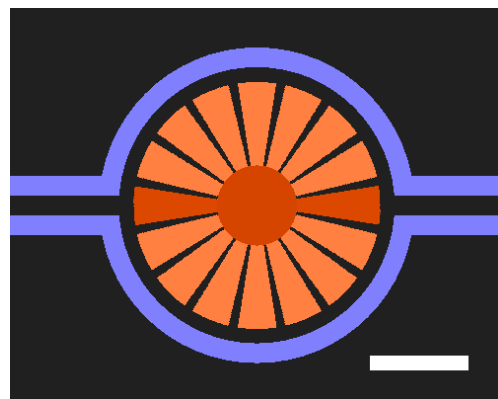


図2. 作製したマイクロデバイスの流路構造。
スケールバーは1mm。

カメラからの画像をフレーム毎に差分をとり、閾値による2値化と積算を行い1.6秒おきにピクセル数として計数する (Trace Momentum, TM)。この処理によって細胞の個体識別を行わずに、遊泳している細胞のみを区画ごとにリアルタイムで定量計測できる。テスト流体に近い7区画のTM (s-TM) と比較流体に近い7区画のTM (r-TM) より Chemotactic reaction ratio を $(s-TM - r-TM) / (s-TM + r-TM)$ で算出する。

図3と図4に得られた結果の代表例を示す (テスト流体=CO₂、比較流体=空気)。テスト流体として流すCO₂の濃度に応じて15%以上では負の化学走性が、15%以下では正の化学走性が計測された。ミドリムシの光合成に適したCO₂濃度と過剰で有害なCO₂濃度に対応した結果である。また64 ppmまでの低濃度のCO₂に対して反応が計測され、「物質を特定せずに生体への毒性を計測する環境定質センサー」としてミドリムシを用いたマイクロデバイスが有効であることが示された。作製したマイクロデバイス中に閉じ込めたミドリムシは2ヶ月程度維持でき、適当な光照射を行えば増殖させることもできることがわかった[2]。

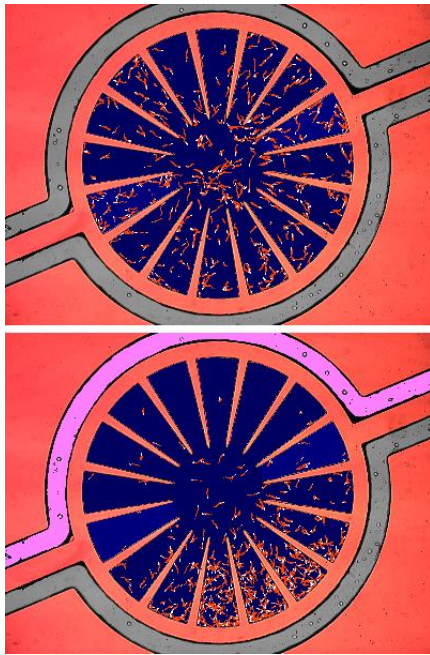


図3. ミドリムシの分布の変化。テスト流体を流す前(上)と上の流路に100%-CO₂を流した時(下図)。

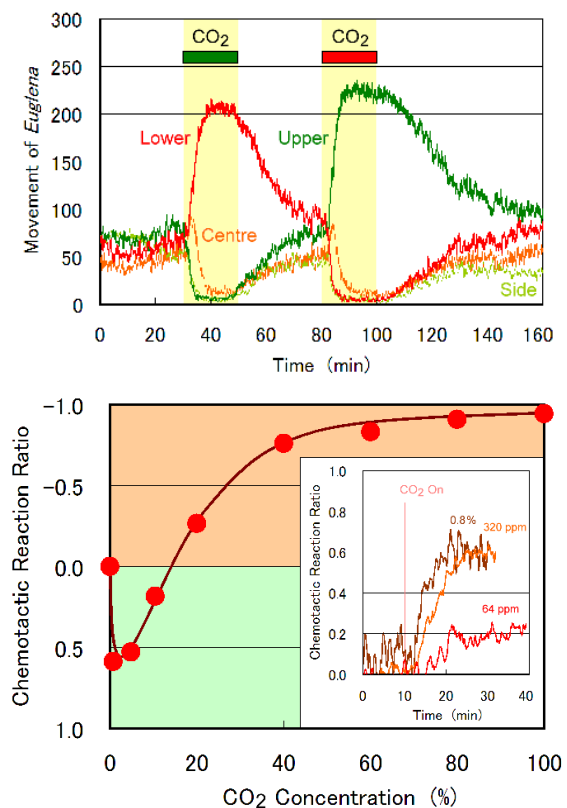


図4. 定量化したミドリムシの分布の時間変化 (上图) と化学走性反応率 (下图)。64 ppm までのCO₂に対する反応が計測できた (下挿入図)。

【参考文献】

[1] K.Ozasa, J.Lee, S.Song, M.Hara, M.Maeda, LabChip, 11 (2011) 1933-1940. "Two-dimensional optical feedback control of Euglena confined in closed-type microfluidic channels". [2] K.Ozasa, J.Lee, S.Song, M.Hara, M.Maeda, LabChip, 13 (2013) 4033-4039. "Gas/liquid sensing via chemotaxis of Euglena cells confined in an isolated micro-aquarium".

さらに本法は、細胞表面に対しても温和な条件下に様々な生理活性分子を複合化できることが判明した。図 1 のイメージ図では、FITC で蛍光標識した糖ペプチド（上スキーム参照）を HeLa 細胞に対して複合化した結果であるが、プローブ 1 の共存下で細胞表面が標識されていることが分かる。

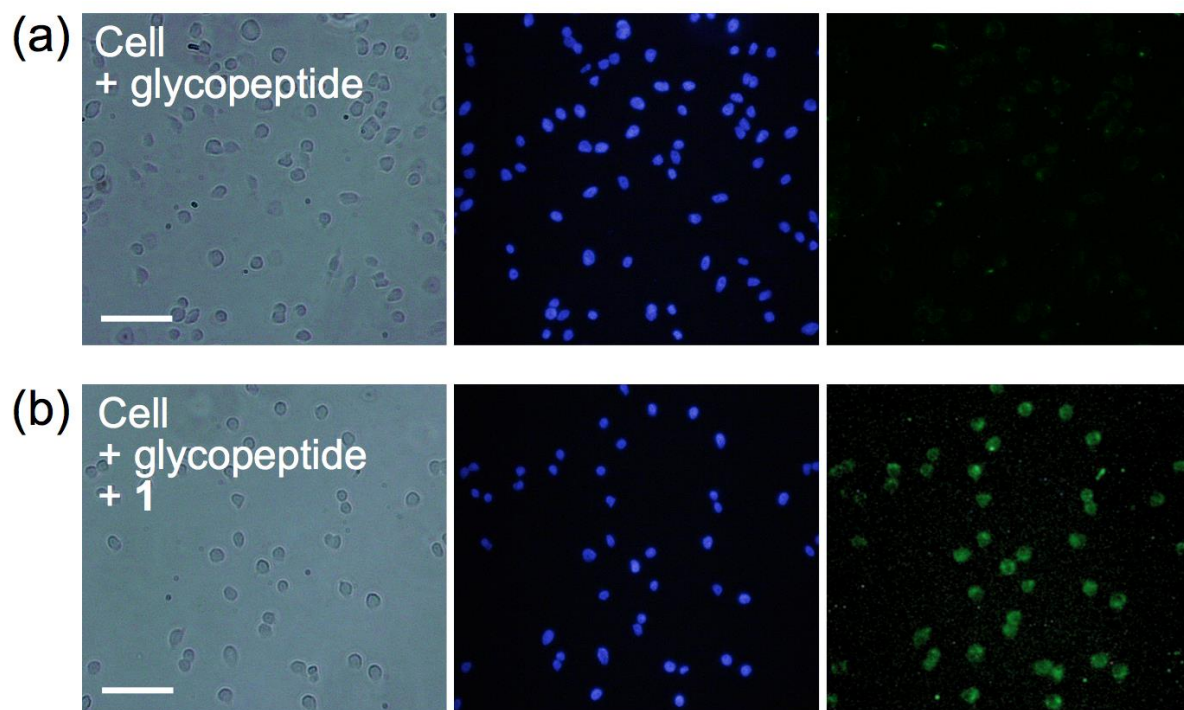


Fig. 1. Microscopy images of HeLa cells conjugated to FITC-labeled disialoglycopeptide using the amino-glue molecule **1**; bars indicate 100 μm . (a, b) Cells treated with FITC-labeled disialoglycopeptide (green) in the absence (a) or presence (b) of **1**. From left to right: phase contrast, DAPI (blue), and FITC.

以上のように、報告者のアザ電子環状反応と歪み解消のクリック反応を効果的に融合させることにより、生体分子同士を効果的に結合させることに成功した。今回開発した手法は、予め生体分子を官能基化することなく、2つの生体分子や細胞とプローブ **1** を混合だけで、簡便かつ直接的にリジン残基のアミノ基などを介して複合化できる。生体内の分子システムを解明する新たな戦略となりうる。

【参考文献】

(1) [1] Review: Tanaka, K.; Fukase, K.; Katsumura, S. *Synlett* **2011**, 2115. [2] Kii, I.; Shiraishi, A.; Hiramatsu, T.; Matsushima, T.; Uekusa, H.; Yoshida, S.; Yamamoto, M.; Kudo, A.; Hagiwara, M.; Hosoya, T. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 4051. [3] Tanaka, K.; Nakamoto, Y.; Siwu, E. R. O.; Pradipta, A. R.; Morimoto, K.; Fujiwara, T.; Yoshida, S.; Hosoya, T.; Tamura, Y.; Hirai, G.; Sodeoka, M.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7326.

アザ電子環状反応を起点としたカスケード型反応プロセスによる 細胞表面分子の選択的蛍光「スイッチオン」可視化

田中克典¹, 北谷方嵩², 筒井歩¹, Ambara R. Pradipta¹, 今牧理恵³,
北爪しのぶ³, 谷口直之³, 深瀬浩一²

理研・田中生物機能合成化学¹, 阪大・院理², 理研・グローバル研究クラスター³

近年、化学的な手法や概念を基盤とするタンパク質の標識が盛んに検討されている。特に蛍光標識化においては、標的タンパク質が標識された際にのみ蛍光を示すプローブ（蛍光のスイッチオン）を開発することは重要な課題である。本研究では、不飽和共役アルデヒドプローブ **1** (図1) をデザインし、**1** とタンパク質中の特定のリジン残基との高速 6π -アザ電子環状反応に続く自然酸化、エステル加水分解を含むドミノ反応を利用して、FRET からの蛍光回復による標的タンパク質の選択的蛍光標識法を開発した。

プローブ **1** の末端アミノ基に対して、蛍光色素であり、また標的タンパク質として用いたヒト血清アルブミン (HSA) のリガンドでもある 7-ジエチルアミノクマリンを導入した。一方、クマリンの消光基として DABCYL 基をエステル基に対して導入した。このプローブ **1** は、PBS 緩衝液中ではクマリンの蛍光が効率的に消光されていたが、標的タンパク質であるヒト血清アルブミンを室温で作用させた際にのみ、望むリジン残基とのドミノ型反応が進行して、時間依存的に蛍光が回復した。本法では、 10^{-9} M の低濃度の標的タンパク質を作用させた場合にも、効率的に蛍光検出することが可能であった。さらに、様々なタンパク質の混合物に対してプローブ **1** を作用させたところ、標的のヒト血清アルブミンが存在する系でのみ蛍光を高感度で検出することに成功した[1]。

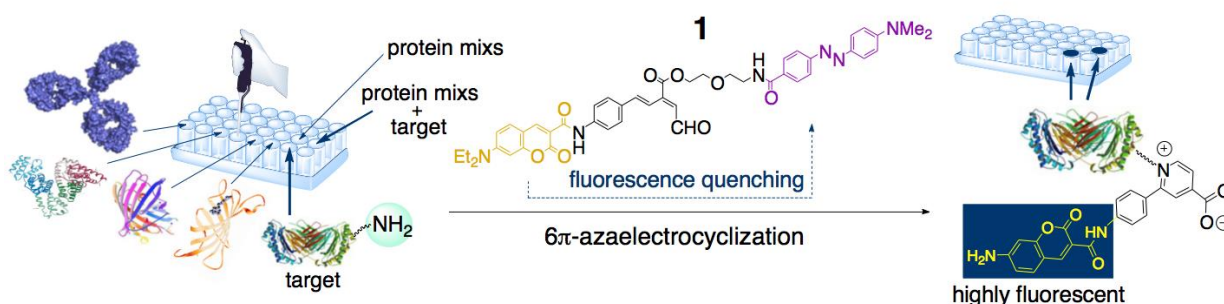


Fig. 1. Fluorescence “switched on” labeling of target protein.

さらに、癌細胞に過剰発現する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンリガンドであるRGDペプチドを共役アルデヒドプローブのエステル部位に導入することにより、細胞表面の分子選択な可視化が可能であるかどうかを検討した (図2)。ここでも報告者のアザ電子環状反応を最大限に利用した。すなわち、歪んだアセチレン、およびアジド基を含む共役アルデヒド**2**, **3**を調製した後、まずリガンドとなる環状RGDyKペプチドに対してアザ電子環状反応で歪んだアセチレン部分を導入した。次いで、歪み解消のクリック反応により、さらに共役アルデヒド部分を導入した後、得られたプローブ**4**を細胞表面へ作用することにより、アザ電子環状反応を起点とするカスケード型反応プロセスを

実施した。種々検討の結果、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを過剰発現しないHep3B細胞では、蛍光が見られなかったのに対して、過剰発現するRAW264.7細胞では、その表面に顕著な蛍光が認められた（図2下）。さらに、これらの反応条件下では細胞毒性が全く認められなかった。このように、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンのようなタンパク質特異的なリガンドの相互作用を有効に利用することにより、細胞表面分子でも選択的に可視化することに成功した[2]。

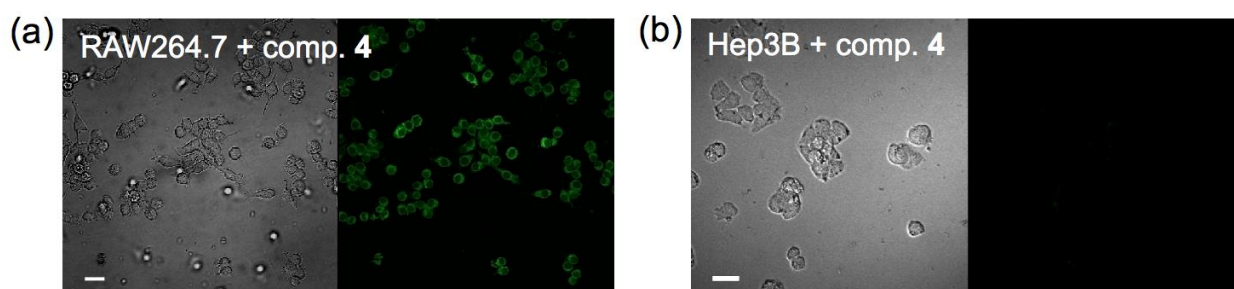
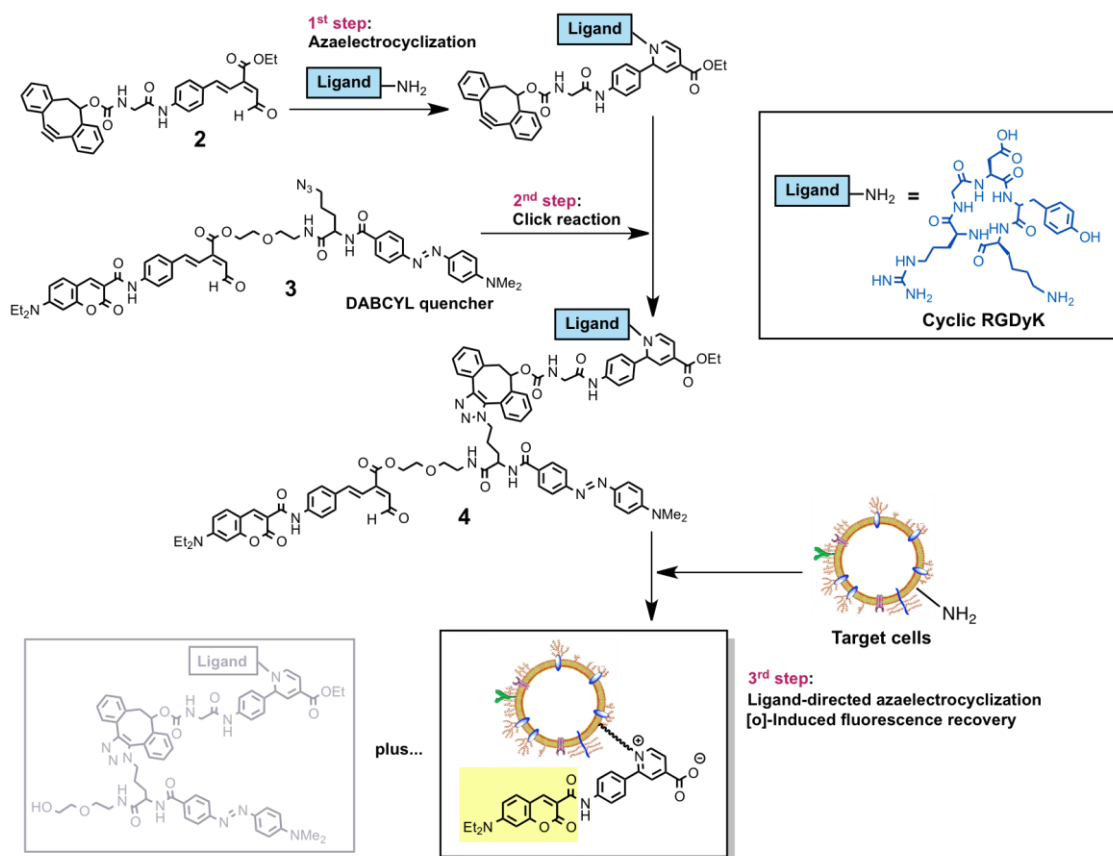


Fig. 2. Fluorescence “switched on” labeling of cell surface protein. Microscopy images of RAW264.7 and Hep3B cells treated with the probes 4. The bars indicate 20 μm. (a) RAW264.7 cells treated with the probes 4. (b) Hep3B cells treated with 4.

【参考文献】

(1) [1] Tanaka, K.; Kitadani, M.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, 9, 5346. [2] Tanaka, K.; Kitadani, M.; Tsutsui, A.; Pradipta, A. R.; Imamaki, R.; Kitazume, S.; Taniguchi, N.; Fukase, K. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, 12, 1412.

水酸基やアミノ基が活性化する共役イミンの[4+4]環化反応： 生体機能制御の可能性

田中克典¹, 筒井歩¹, Ambara R. Pradipta¹, 松本梨沙², 深瀬浩一², 今牧理恵³,
北爪しのぶ³, 花島慎弥³, 山口芳樹³, 金田雅仁⁴, 大石真也⁴, 藤井信孝⁴, 谷口直之³

理研・田中生体機能合成化学¹, 阪大・院理², 理研・グローバル研究クラスター³, 京大・院薬⁴

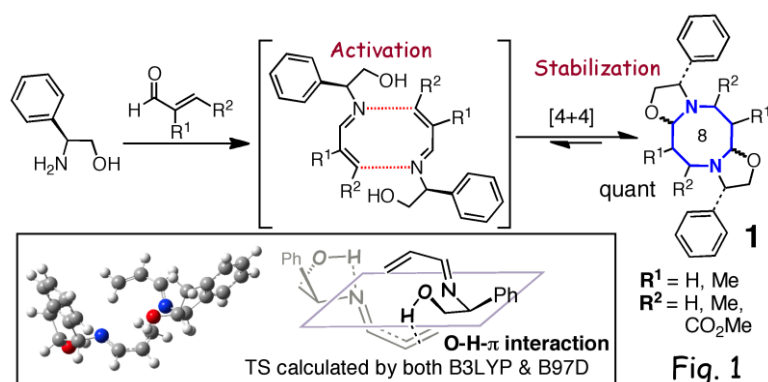
共役アルデヒドに対して一級アルキルアミンを作用させると、速やかに対応する共役イミンが得られる。窒素上に電子求引基を持つ共役イミンとは対照的に、アルキル基を持つイミンは、加水分解や酸、あるいは熱に対して不安定であり、有機合成にはほとんど利用されてこなかった。我々は、水酸基やアミノ基を持つ α -アルキル共役イミンが、速やかに[4+4]環化反応を起こし、1,5-ジアザオクタン化合物を与えることを見出した。この見過ごされてきた共役イミンの新奇な反応性が、ポリアミンによる酸化ストレスや生体内での機能調節に関与する可能性を見出した。

(1) 共役イミンの[4+4]環化反応の発見

これまでに、共役アルデヒドに対して1,2-エタノールアミン誘導体を作用させると、対応する共役イミンやアミノアセタールが得られると信じられてきた。しかし我々は、中間に生じる共役イミンが速やかに[4+4]環化反応を起

こし、8員環化合物である1,5-ジアザビシクロオクタン誘導体 **1** が生成していることを見出した (図1)。すなわち、置換基を持たないアクロレイン、またはメチル基やエステル基を持つメタクロレインやクロトンアルデヒド、あるいはフマル酸アルデヒドに対して、1当量のフェニルグリシノールやシスアミノインダノールを室温で作用させたところ、5分以内で8員環化合物 **1** を定量的に得ることができた。共役イミンの調製法は古くから知られているが、イミンがさらに2量化反応を起こしていることを明確に示したのは初めてである[1]。

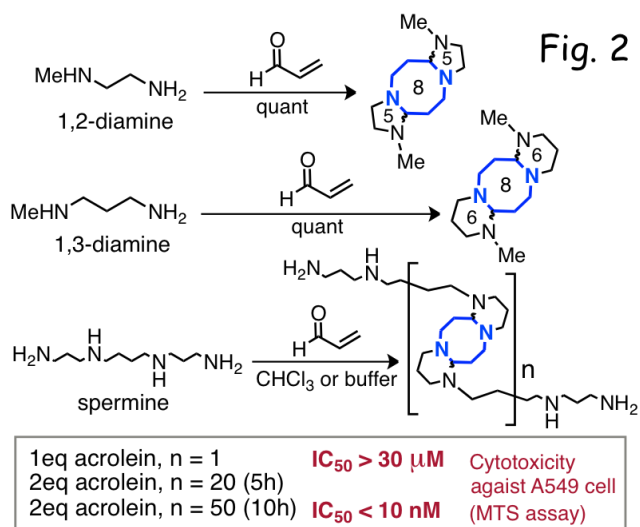
8員環化合物は共役イミンと平衡下に存在すると考えられるが、環化化合物が優先的に得られた理由として、アミンの隣接位にある水酸基がアミノアセタールを形成することにより環状生成物 **1** を安定化させたためであると考えられる。さらに水酸基は反応遷移状態において、二重結合とO-H π 相互作用することにより (図1)、基質のイミン同士を近づけるとともに、二重結合の電荷をより分極させて、イミン窒素原子の共役反応を促進させていることが明らかとなった。



(2) ポリアミン由来のイミン[4+4]反応と酸化ストレスや生体内機能制御への関与

さらに、共役イミンに存在するアミノ基も同様に[4+4]環化反応を促進させることが分かった (図2) [2]。アクロレインと1,2-ジアミンや1,3-ジアミンと反応させることにより、対応する8員環化合物を定量的に与えた。1,3-ジアミンは、スペルミンやスペルミジンなどの天然ポリアミン

の部分構造である。そこで、アクロレインに対して様々なポリアミンを有機溶媒中、または水中で反応させたところ、予期したように共役イミンから[4+4]環化反応が進行した（図2）。さらにアクロレインを過剰量作用させると、時間経過とともに8員環が連なったポリマーが得られることが分かった。

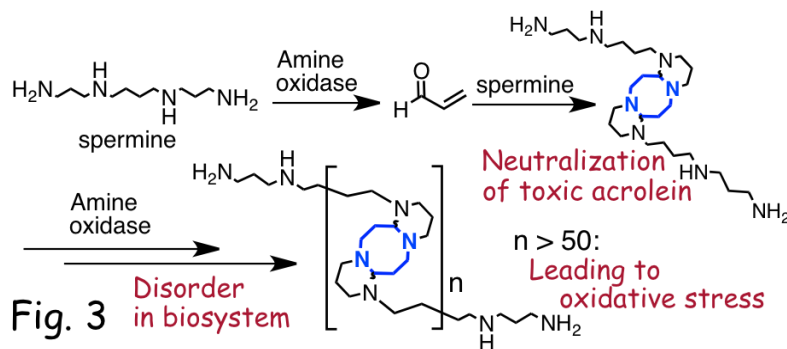


動脈硬化やアルツハイマー、あるいは癌などの酸化ストレスを要因とする疾患の原因物質として、これまでにポリアミンから酵素酸化により生じる毒性物質、アクロレインがその候補として議論されてきた。共役アルデヒドであるアクロレインが生体内でポリアミン自身から生産されることを考えると、今回見出したアクロレインとポリアミンから生じる環状化合物は、疾患の原因や生体内での様々な機能制御を担っている可能性がある。

そこで、様々なポリアミンから得られる環状化合物の細胞毒性活性の評価と酸化ストレスへの影響を検討した（図2下）。その結果、（1）8員環の単量体自体はほとんど細胞毒性を示さないのに対して、（2）アクロレインを過剰量作用させたときに生じる8員環ポリマーは、特に分子量が 15,000 以上になると（n = >50）、アクロレインを遥かに凌ぐ細胞毒性を示すことが判明した。さらに、（3）細胞毒性を示す分子群は、酸化ストレスマーカーである HO-1 (heme oxygenase-1) の細胞内レベルを顕著に向上させた。

以上の結果から、生体内（細胞内）ではアミン酸化酵素によってポリアミンからアクロレインが生じるが、これは近傍に大量に存在するポリアミンと速やかに反応し、環状化合物を与えることでアクロレインの毒性が中和されていると考えられる（図3）。一方、生体内での制御機構が破綻すると、ポリアミンから大量のアクロレインが生産され、8員環のポリマーを与え、酸化ストレスの亢進に繋がることが示唆された。

このように、従来見過ごされてきた共役イミンの反応性として、[4+4]反応によるジアザビシクロ



オクタン生成を明らかにするとともに、ポリアミンから生成する8員環ポリマーは酸化ストレス原因物質の1つである可能性を提唱した。生体内ではポリアミンが自身でアクロレインを生産し、自身の構造をダイナミックに変化させることによって、様々な生体内機能を制御している可能性を示す。

【参考文献】

- [1] Tanaka, K.; Matsumoto, R.; Pradipta, A. R.; Kitagawa, Y.; Okumura, M.; Manabe, Y.; Fukase, K. *Synlett* DOI: 10.1055/s-0033-1340859. [2] 一部の成果: Tsutsui, A.; Tanaka, K. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 7208.