

# 技術紹介

## 2 金ナノ粒子に修飾したオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション活性

### DNA hybridization activity of single-stranded DNA-conjugated gold nanoparticles

吉良 敦史 Atsushi Kira 商品開発センター 技術マネージャー 博士(工学)  
松尾 幸祐 Kousuke Matsuo 商品開発センター  
中島 伸一郎 Shin-ichiro Nakajima 商品開発センター エグゼクティブマネージャー 博士(薬学)

キーワード: バイオセンシング、ナノ粒子、オリゴヌクレオチド、DNA、ハイブリダイゼーション

Keywords: Biosensing, Nanoparticles, Oligonucleotide, DNA, Hybridization

### 要旨

ナノ粒子は、通常のバルク材料では得られない物理化学特性を発現することから、エレクトロニクスをはじめとする様々な分野での応用が期待されています。ライフサイエンスにおいても様々な形で応用検討がされており、その一つが、生体分子検出技術においてナノ粒子のユニークな光学特性を標識ならびにシグナル増強プローブとして利用するものです。ナノ粒子を生体分子検出プローブとして用いる場合、検出対象となる標的分子に対して特異的に相互作用するプローブ分子をナノ粒子に修飾して用いられます。ナノ粒子に修飾されたプローブ分子には、プローブ分子間やナノ粒子表面を始めとする様々な相互作用が存在し、標的分子との親和性に影響を与えることが容易に想像されます。したがって、高感度かつ定量的に標的分子を検出するためには、ナノ粒子に修飾したプローブ分子を制御し、プローブとしての活性を確保することが鍵となります。

そこで本稿では、一本鎖 DNA (ssDNA) を修飾した金ナノ粒子のハイブリダイゼーション活性に関する調査を行い、ssDNA の修飾量の寄与とその機構に関して報告いたします。

### SUMMARY

Nanoparticles (NPs) including quantum dots and metal nanoparticles have the interesting characteristics derived from the quantum size effect. A lot of studies have been reported on a variety of applications using NPs in a wide field include electronics. Colloidal nanoparticles have potential applications in bio-sensing technologies as labels or signal enhancers. In order to meet demands for a development of biomolecular assays by a quantitative understanding of single-molecule, it is necessary to regulate accuracy of the NPs probes modified with biomolecules to optimize the characteristics of NPs.

In this study, we investigated the contribution of a density of single-stranded DNA (ssDNA) conjugating gold NP to hybridization activity. Hybridization activity decreased in accordance with increases in the density of attached ssDNAs, likely due to electrostatic repulsion generated by negatively charged phosphate groups in the ssDNA backbone. These results highlight the importance of controlling the density of ssDNAs attached to the surface of NPs used as DNA detection probes.

## 1. まえがき

半導体は、ムーアの法則に代表される技術指針に従い集積化が進んでおり、2017年にはDRAMでの1/2ピッチが20 nmとなることが予測されております。<sup>1,2)</sup> このような微細化の追求は、ナノメートル(10<sup>-9</sup> m)スケールの構造で起こる現象を理解し、制御する技術を生み出し、ナノテクノロジーの発展を牽引してきました。現在の半導体における微細化は、バルク材料や薄膜材料をリソグラフィやエッチング技術により微細構造を作製するトップダウン型(Sculpture型)のプロセスにより進展してきており、磁気記録デバイスや液晶ディスプレイといった様々な電子機器の製造技術に利用されています。一方で、トップダウン型の加工プロセスでの分解能は、主に光によるパターンニング(リソグラフィ)が律速となるため、これに代わる手法として分子やカーボンナノチューブ、微粒子といったナノ材料を自己組織化的に集積し、ナノ構造を形成するボトムアップ型の微細加工プロセスが提案されています。<sup>3-5)</sup> このように、ナノ材料は微細加工技術において注目されている一方、バルク材料では得られない電子の量子性が顕著に表れる量子サイズ効果や比表面積が大きくなることによる界面・表面効果等に由来するユニークな特性を発現することから、エレクトロニクスだけではなく、情報通信、環境・エネルギー、健康・医療といった幅広い分野において鍵材料として注目されています。ナノ粒子では、特有の光学特性や触媒活性を示すことが知られており、<sup>6-12)</sup> ディスプレイ、燃料電池、バイオセンシングに至るまで幅広い応用研究が進められています。<sup>13-19)</sup> 当センターにおいては、ナノ粒子を用いたメッキ手法による高機能膜の成膜技術の開発ならびに金ナノ粒子による微細配線形成を目的とした配列制御技術の開発を推進しており、その一環として、筆者らはナノ粒子の生体分子検出技術への応用を検討しております。<sup>20-22)</sup>

近年、ライフサイエンス分野においては、生細胞の機能、分化過程、適応度といった表現型を解析するために、mRNAを始めとする生体内で発現した生体分子を網羅的に解析するオミクス(-omics)技術が注目されております。<sup>23-31)</sup> このような生体分子解析技術においては、より高感度かつ選択的な検出技術が求められており、ナノ粒子のユニークな光学特性を標識もしくはシグナル増幅へ応用した技術が検討されております。<sup>17-19,32-35)</sup>

生体分子検出技術においてナノ粒子を用いる場合、検出対象である標的分子に対して特異的に相互作用するプローブ分子(抗体、アプタマー、オリゴヌクレオチド等)を修飾し検出プローブとします。したがって、データの定量性、再現性を確保するためには、ナノ粒子プローブの標的分子に対する親和性が重要となってきます。また、ナノ粒子の量子サイズ効果から得られる光学特性を利用するためには、その分散状態を維持する必要があります。ナノ粒子が安定して分散するためには、粒子間に働くvan der Waals力を始めとする引力に比べ電気二重層に由来する静電的斥力が十分に強い必要があります。これはDLVO理論で理解することができます。<sup>36,37)</sup> したがって、ナノ粒子プローブの標的分子に対する親和性の評価は、ナノ粒子表面に修飾されたプローブ分子の水和力や高次構造への影響だけではなく、ナノ粒子に由来する静電的斥力を始めとする相互作用を考慮して検討する必要があります。

そこで本稿では、オリゴヌクレオチド(ssDNA)を修飾した金ナノ粒子における、ハイブリダイゼーション活性に関して、ssDNAの修飾量が与える影響を詳細に調査し、その機構について報告いたします。

## 2. 金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾

### 2.1 試料と SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の調整

金ナノ粒子は、粒径が 20 nm の金コロイド溶液を BBI Solutions 社より入手し使用しました。本試料は、光路長 10 mm での 520 nm における吸光度 (O.D.<sub>520nm</sub>) が 1.0 となるように調整されており、これは  $7.0 \times 10^{11}$  粒子/ml の濃度に相当します。

一本鎖 DNA (ssDNA) は、表 1 に示す塩基配列を有する 3 種類を用いました。これらの試料においては、5'側に金ナノ粒子と結合させるための mercapto 基 (-SH) と立体構造への影響を最小限に抑えるためのスペーサ SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-TTTTT を配置し、Thiol-ssDNA (SH-ssDNA) としました。試料 SH-Probe-A と SH-Target-A においては、互いに相補的な塩基配列とし、SH-Probe-B は SH-Probe-A ならびに SH-Target-A に対して非相補配列試料であり、コントロール試料として用いました。

表 1. SH-ssDNA サンプルの名称および塩基配列

サンプル名称	塩基配列 (5'-3')
SH-Probe-A	SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -TTT TTT CTC TCC CAG GAC AGG CAC A
SH-Target-A	SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -TTT TTT GTG CCT GTC CTG GGA GAG A
SH-Probe-B	SH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -TTT TTA CAG CTT TGA GGT GCG TGT T

金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾は、次のような方法により行いました (図 1)。<sup>35,38)</sup> まず、第一段階として  $7.0 \times 10^{12}$  粒子/ml の金ナノ粒子溶液に金ナノ粒子 1 粒子に対して 1000 分子の SH-ssDNA を水溶液として混合し、4°C にて 2 時間反応させます [図 1 (c)]。続いて、濃縮リン酸緩衝液 (PB) を用いて終濃度が 10 mM Phosphate, 0~500 mM NaCl (pH 7.0) となるように調整し、さらに 4°C にて 12 時間反応させます [図 1 (d)]。本方法の第一段階では、金ナノ粒子表面に SH-ssDNA が低密度で吸着し、その主鎖リン酸基に由来する静電的斥力により金ナノ粒子の分散が安定します。次に、濃縮 PB を添加することで塩濃度が上昇すると、SH-ssDNA 中のリン酸基におけるイオン活量が減少することによりその静電的斥力が遮蔽され、結果として高密度の SH-ssDNA が修飾された金ナノ粒子 [図 1 (e)] を分散状態で調整することが可能です。尚、作製した SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子は、遠心沈降により精製を行いました。

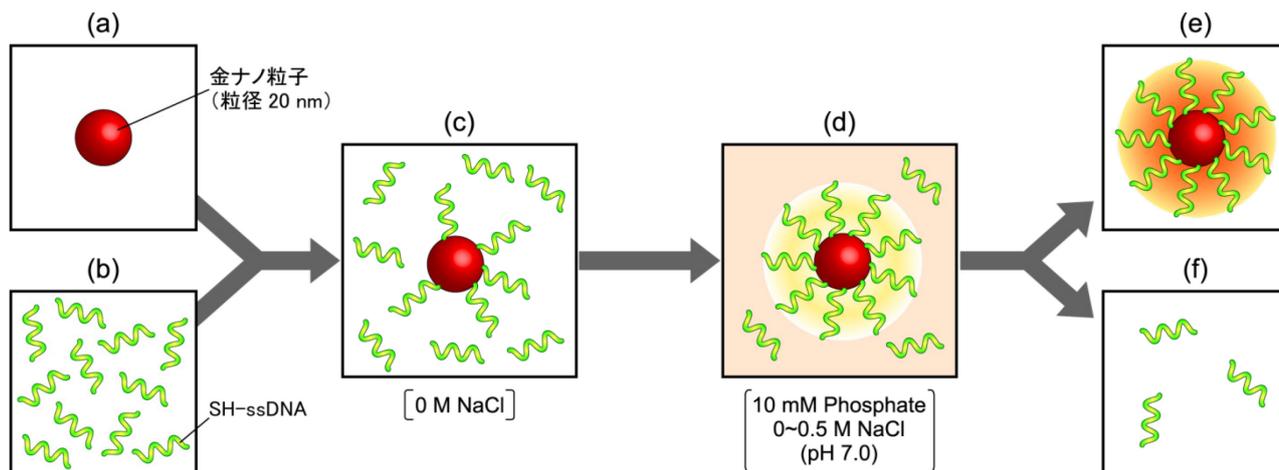


図 1. 金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾工程

## 2.2 金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾量の見積りと塩濃度の寄与

粒径 20 nm の金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾量は、修飾前後に存在するフリーの SH-ssDNA 量 [図 1 (b), (f)] を 260 nm の吸光度により見積もることができます。尚、本稿における紫外可視吸光度ならびに吸光スペクトル測定は、紫外可視近赤外分光光度計 U-5100 (日立ハイテクノロジーズ) にて光路長 10 mm のセルを用いて実施しました。図 2 (a) に、 $7.0 \times 10^{11}$  個/ml の粒径 20 nm の金ナノ粒子に 1.186  $\mu\text{M}$  の SH-Probe-A を 500 mM NaCl (10 mM Phosphate, pH7.0) において修飾した場合の修飾前後における未修飾 SH-Probe-A の紫外可視吸収スペクトルを示します。この結果、260 nm での吸光度は、0.27 から 0.13 に減少しており、この吸光度差 0.14 に相当する 615.0 nM の SH-probe が  $7.0 \times 10^{11}$  個/ml の金ナノ粒子に修飾したことが分かりました。したがって、金ナノ粒子 1 粒子当りに 528.9 分子の SH-Probe-A が修飾されたと見積もることができました。

これまでの研究から、SH-ssDNA の金ナノ粒子への修飾量は、修飾時の塩濃度が影響することが知られております。<sup>35,38)</sup> そこで、修飾時の PB 中 NaCl 濃度に対する SH-Probe-A および SH-Target-A の金ナノ粒子 1 粒子当りの修飾量を調べました [図 2 (b)]。その結果、塩基配列の違いに関係なく、修飾時の NaCl 濃度が上昇するに従い SH-ssDNA の修飾量が増加することが分かりました。この修飾量変化は、修飾時のイオン強度が上昇することで、DNA 主鎖に存在するリン酸基に由来する SH-ssDNA 間の実効的な静電的斥力が減少し、より高密度に SH-ssDNA が AuNPs に修飾されることを示しています。<sup>38)</sup> したがって、本手法は、金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾量を制御するために有効な手段であることが分かりました。

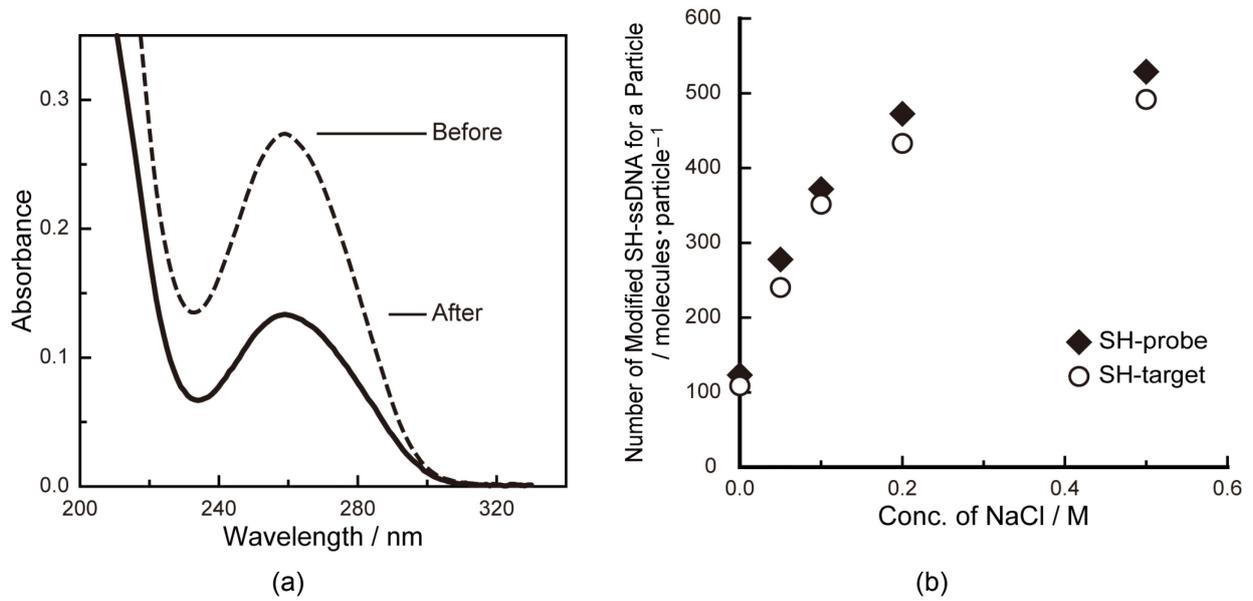


図 2. 金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾量

- (a) 未修飾 SH-Probe-A の 500 mM NaCl 中での修飾前後における紫外可視吸収スペクトル
- (b) 塩濃度に対する金ナノ粒子 1 粒子当りの SH-Probe-A および SH-Target-A の修飾量

### 3. ハイブリダイゼーションに伴う SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の変化

#### 3.1 金ナノ粒子の凝集

金属表面の自由電子が光などの外部磁場により集団振動を起こす現象をプラズモンといいます。金属のナノ粒子では、自由電子の集団振動により分極が誘起され、発生したプラズモンがその表面に局在化することが知られています。これは局在表面プラズモン共鳴 (LSPR : localized surface plasmon resonance) と呼ばれており、金ナノ粒子の場合、可視光域では 520 nm 付近に特徴的な吸収を有し、粒径、形、分散状態、周囲の誘電率等を反映することが知られております。<sup>38-41)</sup>

図 3 に、粒径 20 nm の金ナノ粒子が分散したコロイド溶液と、これに NaCl を 0.5 mM 添加した溶液の外観写真と紫外可視吸収スペクトルを示します。金ナノ粒子が分散した状態 (図 3 A) では、LSPR に由来する 520 nm 付近に極大吸収波長を有する特徴的な光の吸収により赤色を呈します。一方、NaCl を添加した試料 (図 3 B) では、赤色が失われ、ブロードな吸収スペクトルへ変化していることから、金ナノ粒子が凝集したことが分かります。<sup>38,39)</sup>

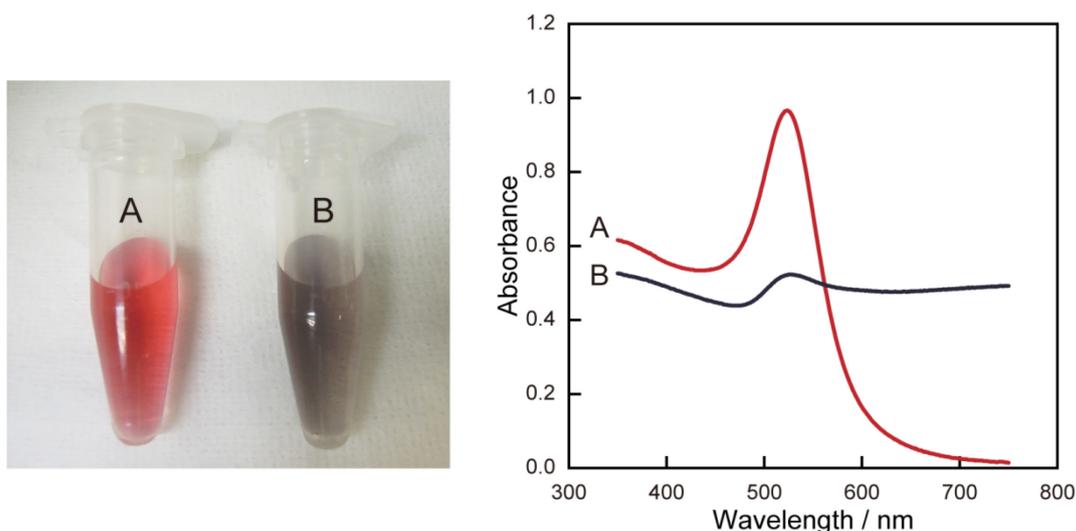


図 3. 金ナノ粒子 (金ナノ粒子) の外観 (左図) と紫外可視吸収スペクトル (右図)  
A : 分散コロイド溶液, B : 0.5 M NaCl を添加した凝集溶液

金ナノ粒子が安定して分散している条件は、前述した DLVO 理論によれば、粒子間に働く引力に比べ静電的斥力が大きい状態でなければなりません。<sup>36,37)</sup> これに対して、図 3 B の場合、塩が添加されることで溶液中のイオン強度が増大し、実効的な静電的斥力が小さくなることで可逆的な凝集が誘起されたと説明できます。このように、金ナノ粒子の分散状態は、紫外可視吸収スペクトルにより把握することが可能で、次項においてはハイブリダイゼーションによる SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の状態変化に関して調査を行いました。

### 3.2 ハイブリダイゼーションの誘起する SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の変化

金ナノ粒子に修飾した SH-ssDNA がハイブリダイゼーションを起こすことで、その分散状態にどのような影響を与えるか調べました。ハイブリダイゼーションは、250 mM NaCl, 10 mM PB (pH 7.0) を緩衝液とした  $7.0 \times 10^{11}$  粒子/ml (O.D.<sub>520nm</sub>=1.0) の SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子試料を用い、サーマルサイクラーにより 95°C, 3 分間の熱変性過熱と 60°C, 2 時間の反応処理により行いました。

まず、非相補的な塩基配列を有する組合せである SH-Probe-B と SH-Target-A を修飾した金ナノ粒子における変化を確認しました。試料は 0 mM NaCl 中で調整したもので、金ナノ粒子 1 粒子当り SH-Probe-B は 110.9 分子、SH-Target-A は 108.8 分子が修飾されています。図 4 は、SH-Probe-B および SH-Target-A 修飾金ナノ粒子を 1 対 1 で混合した試料におけるハイブリダイゼーション処理前後の紫外可視吸収スペクトルです。この結果、ハイブリダイゼーションの処理により、極大吸収波長 ( $\lambda_{\max}$ ) が 523.0 から 527.7 nm へのシフトと  $\lambda_{\max}$  での吸光度におけるわずかな減少 (0.974 から 0.930) が認められましたが、その分散状態に大きな変化はないことが確認されました。

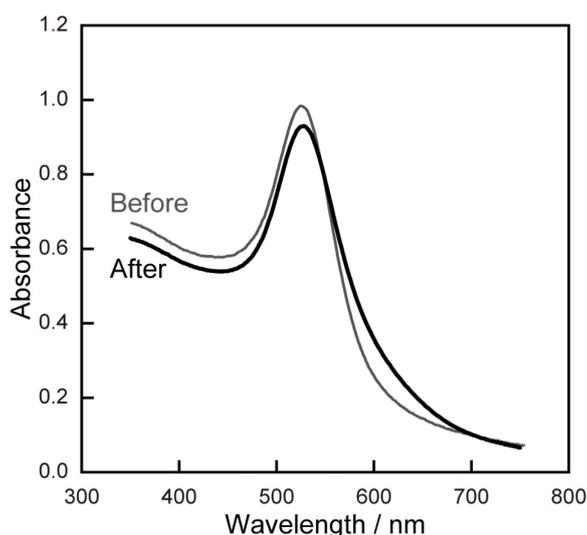


図 4. SH-Probe-B および SH-Target-A 修飾金ナノ粒子のハイブリダイゼーション前後の紫外可視吸収スペクトル

次に、相補的な組合せである SH-Probe-A と SH-Target-A を修飾した金ナノ粒子において同様の実験を実施しました。各 SH-ssDNA は、0, 50, 100, 200 そして 500 mM の NaCl を含む PB 中で金ナノ粒子へ修飾し、同濃度の NaCl 下で作製した試料を 1 対 1 で混合、 $7.0 \times 10^{11}$  粒子/ml の濃度でハイブリダイゼーションを行いました。図 5 にハイブリダイゼーション後の試料の外観と紫外可視吸収スペクトルを示します。コントロールサンプルは、0 mM NaCl 中で調整した SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子で、金ナノ粒子 1 粒子当り 123.2 分子の SH-Probe-A が修飾されています。本試料においては、ハイブリダイゼーション処理後においても赤色を呈しており、その吸収スペクトルにおいては 523.7 nm に  $\lambda_{\max}$

を有する LSPR 由来の吸収が得られました (図 5 A). この結果は, 図 4 と同様, ハイブリダイゼーションが起こらない SH-ssDNA 金ナノ粒子試料においては分散状態に大きな変化がないことを示しております.

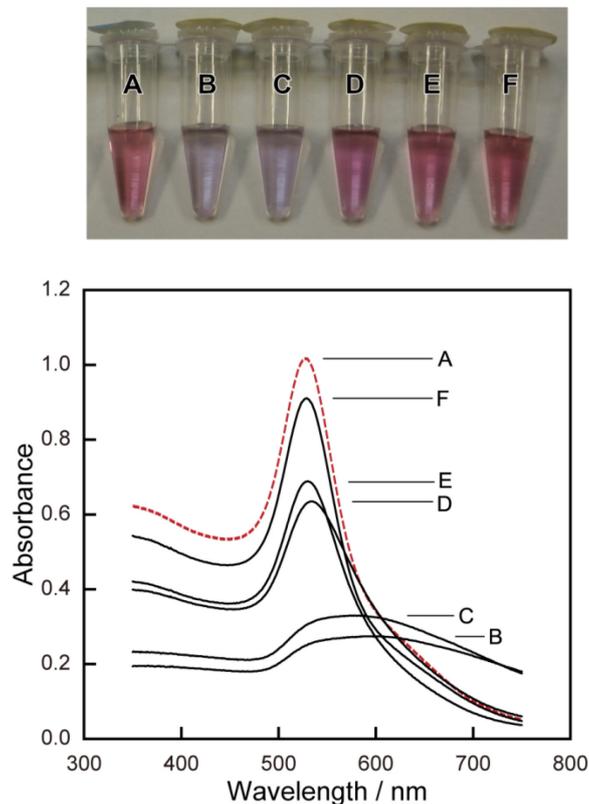


図 5. SH-Probe-A および SH-Target-A 修飾金ナノ粒子のハイブリダイゼーション後の外観および紫外可視吸収スペクトル

A : コントロールサンプル (0 mM NaCl 中で調整した SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子), B~F : 0, 50, 100, 200, 500 mM NaCl 中で調整した SH-Probe-A および SH-Target-A 修飾金ナノ粒子

これに対し, 0 mM NaCl 下で調整した金ナノ粒子 1 粒子当たり 123.2 分子の SH-Probe-A と 108.8 分子の SH-Target-A が修飾されている金ナノ粒子の混合試料 (図 5 B) では, 試料の色が赤から青色へ変化していることが分かりました. そして, その吸収スペクトルにおいては  $\lambda_{\max}$  が 601.1 nm へシフトしていると同時に吸収スペクトルはブロードなものへ変化していることが明らかとなりました. 前述したとおり, 金ナノ粒子の LSPR 由来の吸収はその分散状態を反映し, 凝集によってブロードなスペクトルへと変化します (図 3). したがって, SH-Probe-A と SH-Target-A 間のハイブリダイゼーションによって SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子間の凝集を誘起することが示されました.

一方, SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子を調整する際の NaCl 濃度が高くなると, 試料の色の変化はコント

ロールサンプル (図 5 A) に近づき、吸収スペクトルにおいても  $\lambda_{\max}$  が短波長側へシフトすると同時にその吸光度は増加し、シャープなスペクトルへ変化していることが分かりました (表 2)。

表 2. ハイブリダイゼーション後における SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の極大吸収波長とその吸光度

NaCl 濃度 <sup>a)</sup> (mM)	金ナノ粒子への SH-ssDNA 修飾量 <sup>b)</sup> (molecules/particle)		極大吸収波長 (nm)	極大吸収波長 における吸光度
	SH-Probe-A	SH-Target-A		
0	123.2	108.8	601.1	0.27
50	277.8	240.3	585.3	0.33
100	371.9	351.7	534.0	0.64
200	472.5	433.0	530.3	0.69
500	528.9	491.8	528.7	0.91

a) 金ナノ粒子への SH-ssDNA 修飾時の NaCl 濃度

b) 図 2 (b) から得られた値

これらの結果は、金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾量が、ハイブリダイゼーションによる凝集に影響を与えることを示しています。金ナノ粒子に修飾された SH-ssDNA は、主鎖に存在するリン酸基が負の電荷を有するため静電的斥力として働く一方、相補的な SH-ssDNA 間のハイブリダイゼーションは引力として寄与します。つまり、金ナノ粒子への SH-ssDNA の修飾量が多くなると、リン酸基由来の静電的斥力が増大することで粒子間の凝集が阻害され、逆に SH-ssDNA の修飾量が少ないとハイブリダイゼーションによって生じた引力により凝集が誘起されやすくなると説明することができます (図 6)。

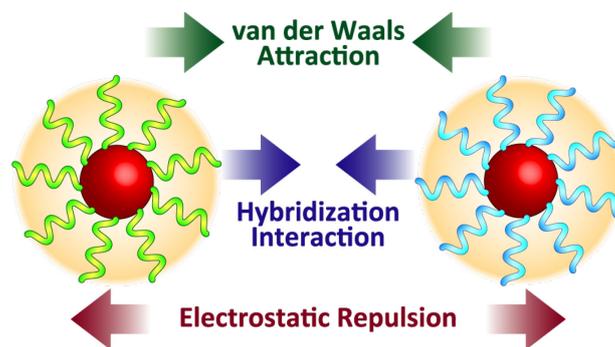


図 6. SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子間の相互作用

## 4. ハイブリダイゼーションに伴う SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の変化

前項では、相補的な配列を有する SH-ssDNA を修飾した金ナノ粒子では、ハイブリダイゼーションによって誘起される凝集が SH-ssDNA の修飾量によって大きく影響を受けることを示しました。一方、ナノ粒子を生体分子検出のプロブとして用いる場合、検出対象である標的分子に対する親和性が重要となります。そこで、SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子のハイブリダイゼーション活性を水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法により評価を行いました。

QCM 測定には、27 MHz の基本周波数を有する水晶振動子をアドミタンス解析により周波数変化を計測するシステム (Affinix Q<sub>N</sub> Pro, イニシウム) を用いました。また、センサーは金電極を有する水晶振動子を使用しました。QCM 測定では、水晶振動子の周波数変化量 ( $\Delta F$ ) と電極表面への質量負荷 ( $\Delta m$ ) の関係は Sauerbrey 式と呼ばれる以下式で表されます。<sup>42)</sup>

$$\Delta F = -\frac{2F_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m \quad (1)$$

ここで、 $F_0$  は水晶振動子の基本周波数 ( $27 \times 10^6$  Hz)、 $A$  は水晶振動子上の金電極の面積、 $\rho_q$  は水晶の密度 ( $2.65 \text{ g cm}^{-3}$ )、そして  $\mu_q$  は水晶のせん断応力 ( $2.95 \times 10^{13} \text{ g m}^{-1}\text{s}^{-2}$ ) です。基本周波数が 27 MHz の水晶振動子の場合、1 Hz の周波数減少は電極上において  $0.61 \text{ ng/cm}^2$  の質量負荷に相当します。また、本研究ではより正確に質量変化を解析するために、溶液の粘性変化の影響を受けない F2 と呼ばれる周波数を用いて解析を行いました。<sup>43)</sup>

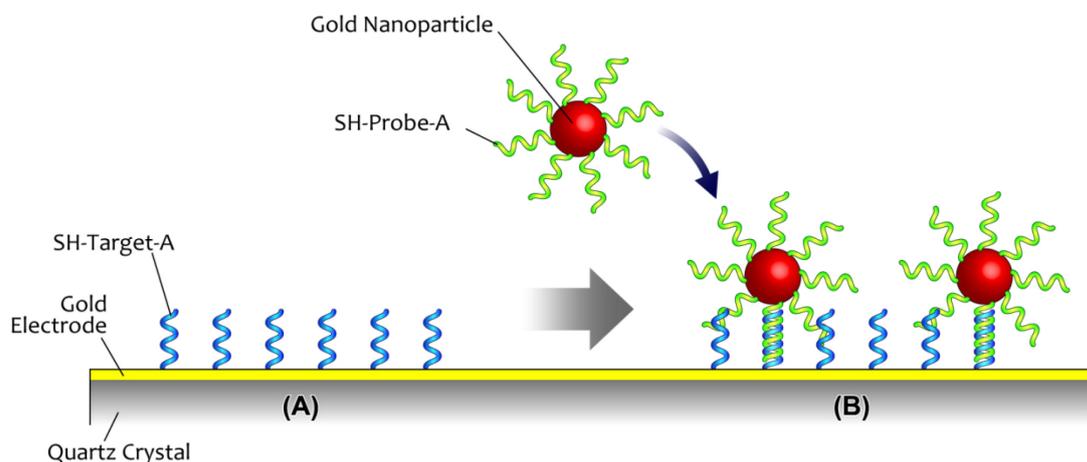


図 7. QCM 測定の概略図

図 7 に測定方法の概略図を示します。あらかじめ金電極を有する水晶振動子を酸素プラズマにより洗浄した後、SH-Probe-A と相補的な配列を有する SH-Target-A の固定化を行いました (図 7 A)。SH-Target-A の固定化は、 $50 \mu\text{M}$  の SH-target-A を  $100 \text{ mM}$  NaCl,  $0.5 \text{ wt}\%$  Triton X-100 を含む  $10 \text{ mM}$

PB (pH 7.0) 中で 25°C にて 2 時間反応させることで行いました。ハイブリダイゼーションの測定は、SH-target-A 固定化水晶振動子に対して SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子を 250 mM NaCl, 0.5wt% Triton X-100 を含む 10 mM PB (pH 7.0) に添加し、25°C にて行いました (図 7 B)。

SH-Target-A 固定化水晶振動子に対して、1 nM の SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子を反応させた際の F2 周波数経時変化を図 8 に示します。尚、SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の濃度は、1 粒子を 1 分子として換算しました。非相補的プローブである SH-Probe-B を修飾した金ナノ粒子(金ナノ粒子 1 粒子当たり 110.9 分子の SH-Probe-B が修飾)の場合、その周波数減少は  $151 \pm 13$  Hz で飽和することが分かりました [図 8 (a)]。これに対し、相補的プローブである SH-Probe-A を 0 mM NaCl 中で修飾し、1 粒子当たり 123.2 分子の SH-Probe-A が修飾されている金ナノ粒子の場合、試料添加 30 分後に周波数が 8273 Hz 減少しました [図 8 (b)]。この結果から、相補的配列を有する SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子は、水晶振動子上に固定化された SH-Target-A に対して特異的に反応することが示されました。一方、500 mM NaCl 中で作製した 1 粒子当たり 528.9 分子の SH-Probe-A が修飾された金ナノ粒子では、資料添加後 30 分の時点での周波数減少が 6892 Hz であることが分かりました [図 8 (c)]。このことから、SH-Probe-A の修飾量によって金ナノ粒子プローブの SH-Target-A に対する反応量が異なることが明らかとなりました。

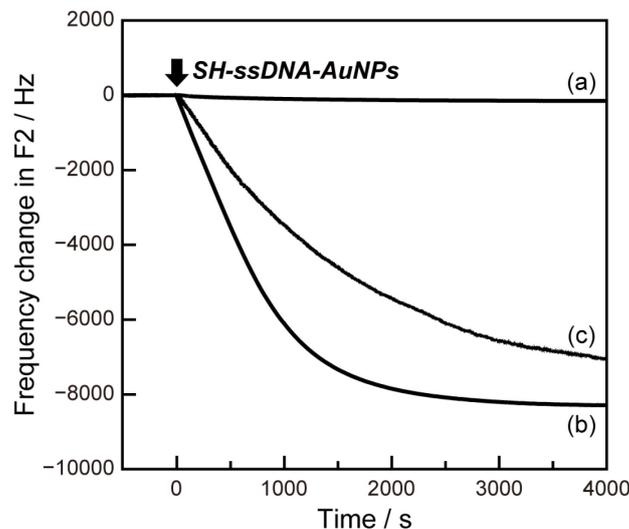


図 8. 1 nM SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子の添加にともなう周波数変化  
(a) 1 粒子当たり 110.9 分子の SH-Probe-B が修飾された金ナノ粒子  
(b) 1 粒子当たり 123.2 分子の SH-Probe-A が修飾された金ナノ粒子  
(c) 1 粒子当たり 528.9 分子の SH-Probe-A が修飾された金ナノ粒子

次に、SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子のハイブリダイゼーション活性を定量的に評価するため、動力学解析を行いました。SH-Target-A を固定化した水晶振動子に対して、0 mM NaCl 下で調整した 1 粒子当たり 123.2 分子の SH-Probe-A が修飾されている金ナノ粒子を 0.5~3.5 nM 添加した場合の F2 周波数

の経時変化を図9に示します。この結果、添加する SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子の濃度が上昇するに従い、周波数減少量（吸着量）が大きくなると同時にその反応速度が速くなることが分かりました。

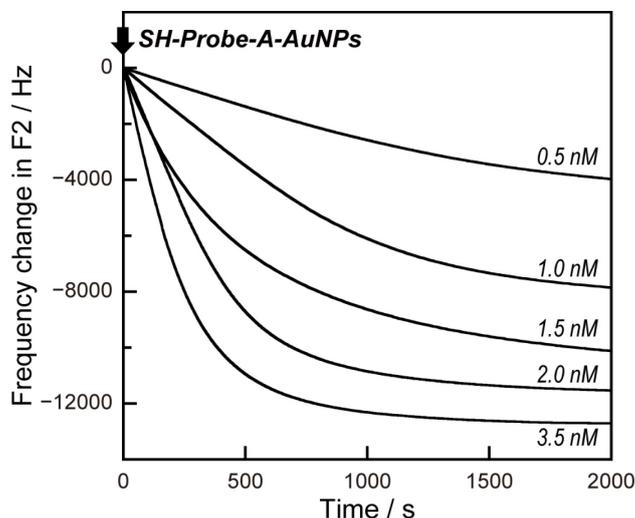


図9. SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子の添加にともなう周波数変化

ハイブリダイゼーションを介した SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子と SH-Target-A との相互作用における解離定数 ( $K_d$ ) は次式で記述できます。

$$K_d = \frac{[C]}{[P][T]} = k_- / k_+ \quad (2)$$

ここで、[P]、[T]、[C] は、SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子、SH-Target-A、およびハイブリダイゼーションにより形成される複合体の濃度です。また、 $k_+$  と  $k_-$  は結合速度定数と解離速度定数になります。QCM 測定で得られる周波数変化量は、SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子の結合量に換算することができ、時間  $t$  における周波数変化量 ( $\Delta F_t$ ) は、次のように表されます。

$$\Delta F_t = \Delta F_\infty (1 - \exp(-t/\tau)) \quad (3)$$

ここで、 $\Delta F_\infty$  は平衡での周波数変化量を意味しており、そして、時定数 ( $\tau$ ) は、次式で記述できます。<sup>44,45)</sup>

$$1/\tau = k_+[P] + k_- \quad (4)$$

QCM の周波数の経時変化のデータを式(3) によるフィッティングを行うことで、 $\Delta F_\infty$  および  $\tau^{-1}$  が得られます。図 10 A に 1 粒子当たり 123.2 分子の SH-Probe-A を修飾した金ナノ粒子における周波数の経時変化 (図 9) から得られた  $\tau^{-1}$  を濃度に対してプロットしたものを示します。式(4) に従い、 $\tau^{-1}$  と金ナノ粒子プローブの濃度の線形相関より各反応速度定数を算出した結果、結合速度定数 ( $k_+$ ) は  $11.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、解離速度定数 ( $k_-$ ) は  $2.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  であることが分かりました。そして、解離定数 ( $K_d$ )

は、式(2) より 0.2 nM と見積もられました。

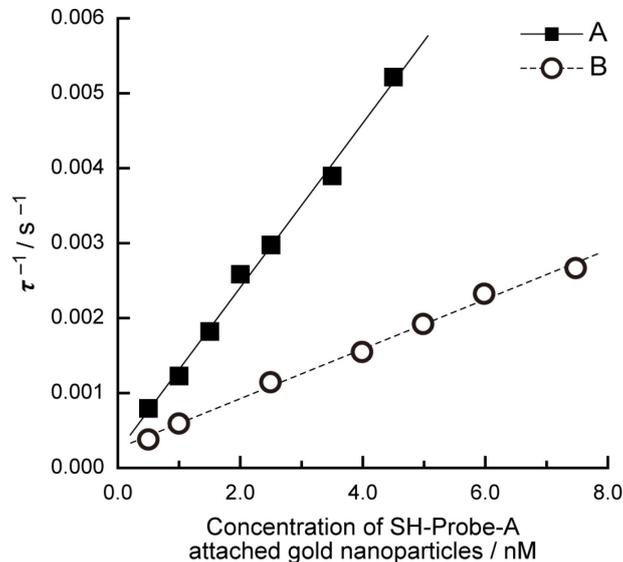


図 10. SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子におけるハイブリダイゼーション反応における動力学解析結果

A : 1 粒子当り 123.2 分子の SH-Probe-A が修飾されている金ナノ粒子, B : 1 粒子当り 528.9 分子の SH-Probe-A が修飾されている金ナノ粒子

同様に、500 mM NaCl にて調整した 1 粒子当り 528.9 分子の SH-Probe-A が修飾されている金ナノ粒子において解析を行いました。得られた  $\tau^{-1}$  を濃度に対してプロットしたものを、図 10 B に示します。この回帰直線より、結合速度定数 ( $k_+$ ) および解離速度定数 ( $k_-$ ) は、それぞれ  $3.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  ,  $2.6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  と求まり、解離定数 ( $K_d$ ) は 0.8 nM と見積もられました (表 3)。この結果、0 mM NaCl 下で調整した SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子は、500 mM NaCl にて調整した試料に比べ結合速度定数 ( $k_+$ ) が 3.3 倍大きい値となっているのに対し、解離速度定数 ( $k_-$ ) では大きな差がないことが分かりました。そして、SH-Target-A に対する親和性は、500 mM NaCl にて調整した SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子に比べ、0 mM NaCl 下で調整した試料では約 4 倍高いことが示されました。これらの結果から、SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子のハイブリダイゼーション活性は、SH-ssDNA の修飾量が大きく寄与し、特に結合速度定数 ( $k_+$ ) に対して影響を与えることが明らかとなりました。

前項において、SH-ssDNA の主鎖に存在するリン酸基に由来する負電荷は、修飾した金ナノ粒子間の静電的斥力として働き、その分散状態に影響を与えることを示しました。同様に、本結果は、SH-ssDNA の金ナノ粒子への修飾量が標的 DNA との相互作用において静電的斥力へ寄与し、そのハイブリダイゼーション活性へ影響することが示唆されました。

表 3. SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子と SH-Target-A の相互作用における結合速度定数 ( $k_+$ ), 解離速度定数 ( $k_-$ ), および解離定数 ( $K_d$ )

NaCl <sup>a)</sup> (mM)	金ナノ粒子への SH-Probe-A の修飾量 (molecules/particle)	$k_+$ <sup>b)</sup> ( $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ )	$k_-$ <sup>b)</sup> ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	$K_d$ <sup>c)</sup> (nM)
0	123.2	11.0	2.2	0.2
500	528.9	3.3	2.6	0.8

a) SH-Probe-A 修飾金ナノ粒子調整時の NaCl 濃度

b) 式(5) を用いたカーブフィッティングにより得られた値

c) 式(2) より算出した値

## 5. まとめ

本稿では、ナノ粒子を生体分子検出技術に応用するための基礎検討として、オリゴヌクレオチド (ssDNA) を修飾した金ナノ粒子のハイブリダイゼーション活性に関して詳細に調査を行いました。相補的な組合せの SH-ssDNA を修飾した金ナノ粒子の混合試料においては、ハイブリダイゼーションによって誘起される凝集に SH-ssDNA の修飾量が大きく寄与することが分かりました。また、SH-ssDNA 修飾金ナノ粒子のハイブリダイゼーション活性に関して動力学解析を用いて調査を行った結果、SH-ssDNA の修飾量が増加するに従い、結合速度定数が小さくなることで親和性が減少することを明らかにしました。以上の結果は、SH-ssDNA の主鎖に存在するリン酸基由来の負電荷の静電的斥力が粒子の分散状態ならびにハイブリダイゼーション活性に大きく寄与することを示唆しており、SH-ssDNA の修飾量でその活性を制御できることを示しております。<sup>46)</sup>

また、本稿で示したプローブ分子の修飾量で生体分子活性を制御する手法は、生体分子検出プローブを開発する上で有効な手段であり、今後は遺伝子を始めとするバイオマーカの細胞内発現解析技術開発へ展開していきたいと考えております。

## 【参考文献】

- 1) ITRS International Roadmap Committee, “ITRS 2013 Edition”, Chapter 4, page 19, Figure PIDS5.
- 2) G.E. Moore, *Proc. SPIE* (1995) **2437**, 2–17.
- 3) D. Zschech, D.H. Kim, A.P. Milenin, R. Scholz, R. Hillebrand, C.J. Hawker, T.P. Russell, M. Steinhart, and U. Gösele, *Nano Lett.* (2007) **7**, 1516–1520.
- 4) N. Sasao, R. Yamamoto, N. Kihara, T. Shimada, A. Yuzawa, T. Okino, Y. Ootera, Y. Kawamonzen, H. Hieda, T. Maeda, Y. Kamata, and A. Akitsu, *J. Photopolym. Sci. Technol.* (2012) **25**, 27–32.
- 5) A. Nunns, J. Gwyther, I. Manners, *Polymer* (2013) **54**, 1269–1284.
- 6) K.A. Willets and R.P. Van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem.* (2007) **58**, 267–297.
- 7) P. Ndokoye, X. Li, Q. Zhao, T. Li, M.O. Tade, and S. Liu, *J. Colloid. Interface Sci.* (2016) **462**, 341–350.
- 8) D. Bera, L. Qian, T.K. Tseng, and P.H. Holloway, *Materials* (2010) **3**, 2260–2345
- 9) F. Zhang, F. Liu, C. Wang, X. Xin, J. Liu, S. Guo, and J. Zhang, *ACS Appl. Mater. Interfaces* (2016) **8**, 2104–2110.
- 10) K. Ankur, W.W. Andrew, M.A. Lauren, N.J. David, and A.S. Eray, *Chem. Commun.* (2011) **47**, 11721–11723.
- 11) B.R. Cuenya, J.R. Croy, S. Mostafa, F. Behafarid, L. Li, Z. Zhang J.C. Yang, Q. Wang, and A.I. Frenkel, *J. Am. Chem. Soc.* (2010) **132**, 8747–8756.
- 12) M. Stratakis and H. Garcia, *Chem. Rev.* (2012) **112**, 4469–4506.
- 13) X. Chen, S.S. Mao, *Chem. Rev.* (2007) **107**, 2891–2959.
- 14) T.H. Kim, K.S. Cho, E.K. Lee, S.J. Lee, J. Chae, J.W. Kim, J.Y. Kwon, G. Amaratunga, S.Y. Lee, B.L. Choi, Y. Kuk, J.M. Kim, and K. Kim, *Nat. Photonics* (2011) **5**, 176–182.
- 15) Y. Shirasaki, G.J. Supran, M.G. Bawendi, and V. Bulović, *Nat. Photonics* (2013) **7**, 13–23.
- 16) T. Imaoka, H. Kitazawa, W.J. Chun, and K. Yamamoto, *Angew. Chem. Int. Ed.* (2015) **54**, 9810–9815.
- 17) I.L. Medintz, T. Uyeda, E.R. Goldman, H. Mattoussi, *Nat. Mater.* (2005) **4**, 435–446.
- 18) L. Tang, J. Casas, and M. Venkataramasubramani, *Anal. Chem.* (2013) **85**, 1431–1439.
- 19) E.S. Speranskaya, N.V. Beloglazova, S. Abé, T. Aubert, P.F. Smet, D. Poelman, I.Y. Goryacheva, S. De Saeger, and Z. Hens, *Langmuir* (2014) **30**, 7567–7575.
- 20) S. Nakajima, K. Yamada, and K. Onishi, *信学技報* (2008) **OME2008-35**, 19–24.
- 21) S. Nakajima and K. Onishi, *電子情報通信学会論文誌 C* (2009) **J92-C**, 183–184.
- 22) 山田一彦, 三井亮介, 林泰之, 國方 亮太, 香川加奈, 大西賢, 中島 伸一郎. 『航空電子技報』 (2010) **33**. 1.
- 23) U. Maskos and E.M. Southern, *Nucl. Acids Res.* (1992) **20**, 1679–1684.

- 24) M. Schena, D. Shalon, R.W. Davis, and P.O. Brown, *Science* (1995) **270**, 467–470.
- 25) D.J. Lockhart, H. Dong, M.C. Byrne, M.T. Follettie, M.V. Gallo, M.S. Chee, M. Mittmann, C. Wang, M. Kobayashi, H. Norton, and E.L. Brown, *Nat. Biotechnol.* (1996) **14**, 1675–1680.
- 26) J.R. Pollack, C.M. Perou, A.A. Alizadeh, M.B. Eisen, A. Pergamenschikov, C.F. Williams, S.S. Jeffrey, D. Botstein, P.O. Brown, *Nat. Genet.* (1999) **23**, 41–46.
- 27) J. Ziauddin and D.M. Sabatini, *Nature* (2001) **411**, 107–110.
- 28) M. Schutkowski, U. Reimer, S. Panse, L. Dong, J.M. Lizcano, D.R. Alessi, and J.S. Mergener, *Angew. Chem., Int. Ed.* (2004) **43**, 2671–2674.
- 29) P. Bertone, V. Stolc, T. E. Royce, J. S. Rozowsky, A. E. Urban, X. Zhu, J. L. Rinn, W. Tongprasit, M. Samanta, S. Weissman, M. Gerstein, and M. Snyder, *Science* (2004) **306**, 2242–2246.
- 30) A. Kira, K. Okano, Y. Hosokawa, A. Naito, K. Fuwa, J. Yuyama, and H. Masuhara, *Appl. Surf. Sci.* (2009) **255**, 7647–7651.
- 31) B.Y. Liao, M.P. Weng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2015) **112**, 4707–4710.
- 32) T.A. Taton, C.A. Mirkin, and R.L. Letsinger, *Science* (2000) **289**, 1757–1760.
- 33) M. Han, X. Gao, J.Z. Su, and S. Nie, *Nat. Biotechnol.* (2001) **19**, 631–635.
- 34) S.J. Park, T.A. Taton, and C.A. Mirkin, *Science* (2002) **295**, 1503–1506.
- 35) H. Kim, A. Kira, and K. Yasuda, *Jpn. J. Appl. Phys* (2010) **49**, 06GK07.
- 36) J.N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces* (Elsevier, Amsterdam, 2011) 3rd ed., Part 2, Chap. 10.
- 37) T.H. Anderson, S.H. Donaldson, H. Zeng, and J.N. Israelachvili, *Langmuir* (2010) **26**, 14458–14465.
- 38) A. Kira, H. Kim, and K. Yasuda, *Langmuir* (2009) **25**, 1285–1288.
- 39) C.A. Mirkin, R.L. Letsinger, R.C. Mucic, and J.J. Storhoff, *Nature* (1996) **382**, 607–609.
- 40) P. K. Jain, K. S. Lee, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, *J. Phys. Chem. B* (2006) **110**, 7238–7248.
- 41) K. A. Willets and R. P. Van Duyne, *Annu. Rev. Phys. Chem.* (2007) **58**, 267–297.
- 42) G. Sauerbrey, *Z. Phys.* (1959) **155**, 206–222 (in German).
- 43) A. Itoh and M. Ichihashi, *Meas. Sci. Technol.* (2011) **22**, 015402.
- 44) T. Xavier, R.J. Orlando, and D.S. Randall, *Langmuir* (2008) **24**, 3880–3887.
- 45) A. Kira, N. Javkhlantugs, T. Miyamori, Y. Sasaki, M. Eguchi, I. Kawamura, K. Ueda, and A. Naito, *J. Phys. Chem. B* (2014) **118**, 9604–9612.
- 46) A. Kira, K. Matsuo, and S. Nakajima, *Jpn. J. Appl. Phys.* (2016) **55**, 02BE04.