溶媒蒸発により伴われる DNA のナノファイバ形成

中尾秀信¹・田口知弥¹・椎木 弘²・三木一司¹

¹(独) 物質・材料研究機構ナノ有機センター ☎ 305-0044 茨城県つくば市並木 1-1
ナノアーキテクチャーグループ

²大阪府立大学先端科学イノベーションセンター ☎ 599-8570 大阪府堺市中区学園町 1-2

(2009 年 3 月 24 日受理)

Formation of DNA Nanofibers by Solvent Evaporation

Hidehiko NAKAO¹, Tomoya TAGUCHI¹, Hiroshi SHIIGI² and Kazushi MIKI¹

¹Nanoarchitecture Group, Organic Nanomaterials Center, National Institute for Materials Science,
1-1 Namiki, Tsukuba, Ibaraki 305-0044

²Frontier Science Innovation Center, Osaka Prefecture University, 1-2 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8570

(Received March 24, 2009)

We have reported a one-step method that can enable the growth and parallel patterning of DNA nanofibers on a substrate. This method is based on the processes of solvent vapor-induced buildup and controlled drying front movement and forms parallelly aligned DNA nanofibers exceeding several hundred micrometers in length and 40 nm in diameter on a PDMS sheet. DNA nanofibers initially present on the PDMS sheet were transferred onto another surface using transfer-printing (TP). It was also possible to realize crossed two-dimensional patterns of DNA nanofibers by repeating TP. Polarized fluorescent microscope observations revealed that intercalated dyes are highly ordered in molecular alignment and that DNA strands in the fiber are aligned parallel to the growing direction of fibers.

KEYWORDS : AFM, DNA, nanofiber, transfer printing, intercalator

1. は じ め に

ナノワイヤやナノファイバなどの 1 次元のナノ構造体はナノスケールにおける様々な物理現象を解明するための理想的な実験系であり、またナノスケールの光・電子デバイスを構築するためのビルディングブロックとしても利用できる。一般的に有機分子は無機分子に比べ、分子設計が容易であり、この結果様々な性質を持った材料が合成できる。有機分子としてある種の色素や π 共役ポリマーは溶媒蒸発または貧溶媒中からの自己集合的凝集により数から数百 μm の長さを持った一次元結晶を形成する¹⁻³⁾。作製された様々な有機一次元結晶はサブミクロンの直径を持つ導波路やレーザ発振を可能とする微小共振器そして光電変換として利用されることが報告されている¹⁻⁵⁾。

一方、多くの生体高分子は本質的に 1 次元の構造制御されたナノワイヤである。特に DNA は直径が 2 nm で長さが数十 μm に達する高いアスペクト比を持った 1 次元ナノ構造体である。また負電荷を持つ DNA リン酸バックボーンへ静電的に様々なナノ物質の結合が可能であり、この結果様々なナノ物質の一次元配列が作製できる⁶⁻¹¹⁾。したがって DNA は様々な一次元ナノ構造体を作製するためのテンプレートとして役立つ。

また DNA のもう一つの利点はインターカレータ色素を DNA の二重鎖構造に沿って高度に配向 (インターカレーション) できることである。一般に芳香核を 3 つ以上持つカチオン性の色素は DNA の塩基対間に挿入しやすい¹²⁾。DNA 塩基対の疎水空間に収納される色素は溶媒分子からの相互作用と色素同士の会合が低減されるため、その発光強度は増加する。このようなインターカレーションを利用した特異的光機能を有する DNA-カチオン性脂質のフィルムが作製されている¹³⁻¹⁷⁾。上述した

機能を単一の DNA においても利用できれば、特異的光機能を持った 1 次元ナノ構造体を作製でき、ナノスケールの光・電子デバイスのビルディングブロックとして利用できるかもしれない。しかしながら、シリコン基板表面に吸着した単一の DNA は表面との強い相互作用のため、その二重鎖構造は大きく変形していると思われる。原子間力顕微鏡 (AFM) により観察される、基板表面上の DNA の直径 (高さ) はその理論値である 2 nm の半分以下である¹⁸⁾。一方単一の DNA が数十から数百本束ねられたファイバに関して、その内部は基板表面との相互作用はなく、DNA 二重鎖構造は保たれていると思われる。したがって、様々な機能性色素が整列配置した DNA ナノファイバは特異的光・電子機能を持った新しい 1 次元ナノ構造体であり、各種ナノスケールデバイスのビルディングブロックとして利用できると思われる。

しかしながら基板表面に無秩序に固定された DNA ナノファイバは、十分に整列配置した構造体群 (アレイ) を要求するデバイス構築においては大きな問題となる。DNA ナノファイバを含む様々な 1 次元ナノ構造体を基板表面にアレイ化する方法が報告されているが、それらは複雑で特別な機械装置の使用を伴う^{19~21)}。したがって基板表面に簡単に DNA ナノファイバをアレイ化およびパターンニングする方法の開発が低コストで大面積のデバイスを構築するために必要である。本研究紹介では特別な機械装置を使用しない再現性の良い DNA ナノファイバ・アレイの作製法に関して報告する。本作製法は溶媒蒸発に伴う界面移動現象と DNA の自己集合を利用したものである。

2. 実験

本研究で用いた試薬は全て特級あり、水は Milli-Q 水

を用いた。DNA 溶液は λ -DNA (Wako Nippon Gene, 450 ng/ μ L in 10 mM Tris $\cdot$ HCl/1 mM EDTA, pH 8) をバッファー水溶液 (1 mM Tris $\cdot$ HCl/10 mM EDTA/10 mM NaCl, pH 8) 中 4.5 ng/ μ L に希釈した。DNA の染色は YOYO-1 (absorption max : 491 nm, emission max : 503 nm, Molecular Probe Inc.) を用い、色素 : 塩基対比が 1 : 5 になるように混合し、暗所、室温で 1 時間インキュベートした。

PDMS シートはオリゴマー (SILPOT 184, Dow Corning) と開始剤 (CATALYST SILPOT 184, Dow Corning) を 10 : 1 で混ぜ、ペトリ皿に流し込み 65°C で一晩加熱した。

DNA ナノファイバ・アレイの作製手順を Fig. 1 に示す²²⁾。DNA 水溶液 1 μ L を 8 μ L のエタノールに滴下する。この溶液をスライドガラスに固定されたポリジメチルシロキサン (PDMS) シート (2 $\times$ 8 mm) 上に広げ、室温において蒸発させる。スライドガラスを 15° に傾けることで、溶媒蒸発により生ずる界面移動が PDMS シートの上端部から下端部へ生じる。溶液中に分散した DNA は溶媒蒸発により生じる対流により移動界面方向に引っ張られ、界面上において析出する。また界面において生じる表面張力が DNA を効率良く伸張・整列させる。一般的に DNA はエタノール中では不溶であるため、この場合の溶液中において DNA 同士は容易に集合もしくはバンドル化していると思われる。したがってこの方法により生じる DNA の 1 次元ナノ構造体は孤立した分子ではなく、バンドルの連続体すなわちナノファイバとなる。

カバーガラス (24 $\times$ 36 mm, Matsunami Glass) 上への転写印刷は、DNA ナノファイバが作製された PDMS シートをカバーガラスに 5 分間接触させ、その後注意深く取り除いた。DNA ナノファイバの 2 次元パターン

Fig. 1. Procedure of solvent vapor-induced buildup for generating DNA nanofibers.

製は上記操作を同一表面に2度繰り返した。

DNA ナノファイバの蛍光顕微鏡観察は蛍光顕微鏡 (ECLIPSE 80i, NIKON) に接続したデジタルカメラ (Power Shot A640, NIKON) を用いて撮影した。青色励起フィルタ (EX: 450-490 nm, DM: 505 nm, BA: 520 nm, NIKON) が YOYO-1 染色 DNA ナノファイバの撮影において使用された。

AFM 測定は Nanowizard II (JPK Instruments) を用い、タッピングモードで行った。AFM 探針は 42N/m のばね定数を持つオリンパス光学社製 OMCL-AC160TS を用いた。イメージングのためのスキャン速度は主に 0.5 Hz で行った。

3. 結果と考察

PDMS 表面に作製された DNA ナノファイバ・アレイの蛍光顕微鏡写真を Fig. 2 に示す。YOYO-1 色素が DNA に結合された結果、表面上に成長した DNA ナノファイバは明確に観察される。DNA ナノファイバは溶媒の蒸発により生じる界面移動方向に並行整列し、その長さは数百 μm 以上に達していた。また作製された DNA ナノファイバ・アレイの原子間力顕微鏡 (AFM) 象を Fig. 3 に示す。観察される DNA ナノファイバの高さは約 40 nm であり、これは単一の DNA が 2, 3 本束ねられた大きさに相当する (Fig. 4)。このプロセスは理論長 16.3 μm の λ -DNA をより長い DNA 一次元構造にすることができるため、光学顕微鏡観察下における DNA ナノファイバ1本のマニピュレーションや電極間ギャップへの配置が容易であり、ナノファイバの力学特性や光・電気特性の評価を容易にすると思われる。

マイクロコンタクト・プリンティングは PDMS 凹凸パターン上の構造物を別の基板表面に写し取る (転写印刷) 方法である。我々は以前、PDMS 上に伸張・整列固

Fig. 2. (a) Fluorescent optical image of DNA nanofibers formed via solvent vapor-induced buildup. (b) Enlarged image. In the image, the drying front moved downwards.

定された DNA の他基板表面への転写印刷を報告した²³⁾。本開発技術により PDMS 上に作製された DNA ナノファイバ・アレイもまた別の基板表面に転写印刷が可能である。また転写印刷を同一基板表面に繰り返すことにより、DNA ナノファイバの2次元パターンの作製も可能である。Fig. 5 (a) はカバーガラス表面に繰り返し転写印刷された DNA ナノファイバの2次元パターンの蛍光顕微鏡写真である。また市販のくし型電極パターン上に DNA ナノファイバ・アレイを転写印刷することも可能であった (Fig. 5 (b))。電極ギャップ間の広範囲にわたり橋渡しされることで、DNA ナノファイバの電気応答感度を向上させることができるとされる。転写印刷法の優位性は DNA ナノファイバ・アレイを望む位置・方向に再配置できることである。また異なる機能性物質で機能化された DNA ナノファイバを同一基板表面に集積することも可能である。したがって本研究による開発技術は DNA ナノファイバを用いる複雑なデバイス構築を容易にすると思われる。

前述したように基板表面に固定された DNA ファイバに関してはその内部における2重鎖構造は保たれており、また内部に結合した蛍光色素の配向性も保たれていると期待される。我々の DNA ナノファイバに関してこ

Fig. 3. (a) AFM image of DNA nanofibers on the PDMS surface. (b) Cross section profile along the white line on the AFM image (a). (c) Enlarged AFM image. (d) Cross section profile along the white line on the AFM image (c). The drying front moved upward in the image.

Fig. 4. An illustration of our prepared DNA nanofiber.

Fig. 5. (a) Fluorescent micrograph of 2D pattern of DNA nanofibers produced by repeating TP process. (b) Fluorescent micrograph of DNA nanofibers transferred onto micro electrode gaps.

Fig. 6. (a), (b) Polarized fluorescent micrographs of 2D DNA nanofibers. (c) Unpolarized fluorescent micrograph of 2D DNA nanofibers. Arrows indicate the directions of excitation and detected polarization. (d) Schematic drawing of YOYO-1 alignment in DNA; arrows indicate the direction of its transition dipole moments.

のことを確認するために、偏光蛍光顕微鏡によるDNAナノファイバ・アレイの観察を行った。この確認のためにDNAナノファイバの2次元パターンを用いた。水平方向に並んだDNAナノファイバの蛍光像は垂直に偏光励起した時もっとも明確であり、一方垂直方向に並んだDNAナノファイバは水平に偏光励起した時もっとも明確であった (Fig. 6 (a), (b))。しかしながら偏光励起を行わない場合、観察されるDNAナノファイバの蛍光

の強度は一樣であった (Fig. 6 (c))。ここで用いられた蛍光試薬 YOYO-1 はビス・インターカレータとしてよく知られ、DNA の塩基対間にその発色団分子は平行に収納されるため²⁴⁾、発色団の励起双極子モーメントはDNA鎖方向に対して90°の傾きを持つ (Fig. 6 (d))。したがって上述の結果は我々のDNAナノファイバ内部においてYOYO-1は配向された状態にあり、ファイバ内のDNA二重鎖もファイバの成長方向に対して平行に

配向していることを示す。加えて、転写印刷後でさえ、DNA ナノファイバ内部の分子の配向性は保たれていること示す。十分に一方向に配向された DNA-カチオン性脂質フィルム内に結合された色素からのレーザ発振が報告されている^{15, 16)}。この現象において重要なことはフィルム内の DNA にインターカレートされた色素は孤立した状態で配列されるため、DNA マトリックスは色素の凝集による発光強度の減少を低減することにある。したがって我々の DNA ナノファイバもナノスケールの微小光共振器や導波路として機能することが期待できる。

4. ま と め

特別な機械装置の使用を伴わない、簡単に再現性の良い DNA ナノファイバ・アレイの作製技術を述べた。PDMS 表面に作製された DNA ナノファイバは直径およそ 40 nm で長さは数百 μm 以上に達していた。また PDMS 上に作製された DNA ナノファイバ・アレイは他の基板表面に他の基板表面に転写印刷が可能であり、また転写印刷の繰り返しにより DNA ナノファイバの 2 次元パターンの作製も可能であった。偏光蛍光顕微鏡観察により DNA ナノファイバ中に結合したインターカレタ色素は配向状態にあり、またファイバ中の DNA 二重鎖も配向していることを明らかにした。さらに転写印刷後もこれら配向状態は保たれていた。したがって本研究において述べた開発技術は DNA ナノファイバを用いるより複雑なデバイス構築の達成においてたいへん有効である。

DNA ナノファイバ中へはインターカレタ色素だけでなく、様々なナノ物質の結合も可能である。したがって様々な光・電子機能を持った一次元ナノ構造の構築が可能である。さらに DNA 塩基配列のデザインと DNA に結合可能な生体分子との組み合わせにより、多様な機能を持った様々な DNA ナノファイバの作製を可能にすると思われる。今後は作製した DNA ナノファイバ・アレイの機能化およびその物性評価を行う予定である。

文 献

- 1) Y.S. Zhao, A. Peng, H. Fu, Y. Ma and J. Yao : *Adv. Mater.* **20**, 1661 (2008).
- 2) K. Takazawa, Y. Kitahama, Y. Kimura and G. Kido : *Nano Lett.* **5**, 1293 (2005).
- 3) D.H. Kim, Y.D. Park, Y. Jang, S. Kim and K.K. Cho : *Macromol. Rapid Commun.* **26**, 834 (2005).
- 4) D. O'Carroll, I. Lieberwirth and G. Redmond : *Nat. Nanotechnol.* **2**, 180 (2007).
- 5) C. Zhang, X. Zhang, X. Zhang, X. Fang, J. Jie, J.C. Chang, C.-S. Lee, W. Zhang and S.-T. Lee : *Adv. Mater.* **20**, 1716 (2008).
- 6) H. Nakao, H. Shiigi, Y. Yamamoto, S. Tokonami, T. Nagaoka, S. Sugiyama and T. Ohtani : *Nano Lett.* **3**, 1391 (2003).
- 7) H. Xin and A.T. Woolley : *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 8710 (2003).
- 8) Y. Ma, J. Zhang, G. Zhang and H. He : *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 7097 (2004).
- 9) H. Nakao, H. Hayashi, F. Iwata, H. Karasawa, S. Sugiyama and T. Ohtani : *Langmuir* **21**, 7945 (2005).
- 10) M. Kopaczynska, M. Lauer, A. Schulz, T. Wang, A. Schaefer and J.-H. Fuhrhop : *Langmuir* **20**, 9270 (2004).
- 11) Y. Xu, J. Ye, H. Liu, E. Cheng, Y. Yang, W. Wang, M. Zhao, D. Zhou, D. Lir and R. Fang : *Chem. Commun.* 49 (2008).
- 12) 國武豊喜 : “図解高分子新素材のすべて” (工業調査会, 2005) p. 114.
- 13) K. Tanaka and Y. Okahata : *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 10679 (1996).
- 14) S. Jiang and M. Liu : *Chem. Mater.* **16**, 3985 (2004).
- 15) Y. Kawabe, L. Wang, S. Horinouchi and N. Ogata : *Adv. Mater.* **12**, 1281 (2000).
- 16) Y. Kawabe, L. Wang, T. Nakamura and N. Ogata : *Appl. Phys. Lett.* **81**, 1372 (2002).
- 17) T. Kakibe and H. Ohno : *Chem. Commun.* 377 (2008).
- 18) J. Storm, J. van Noort, S. de Vries and C. Dekker : *Appl. Phys. Lett.* **79**, 3881 (2001).
- 19) D. Bensimon, A.J. Simon, V. Croquette and A. Bension : *Phys. Rev. Lett.* **74**, 4754 (1995).
- 20) Y. Okahata, T. Kobayashi and K. Tanaka : *Langmuir* **12**, 1326 (1996).
- 21) L.M. Bellan, E.A. Strychalski and H.G. Craighead : *J. Vac. Sci. Technol. B*, **25**, 2255 (2007).
- 22) H. Nakao, T. Taguchi, H. Shiigi and K. Miki : *Chem. Commun.* 1858 (2009).
- 23) H. Nakao, M. Gad, S. Sugiyama, K. Otobe and T. Ohtani : *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 7162 (2003).
- 24) A. Larsson, C. Carlsson, M. Jonsson and B. Albinsson : *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8459 (1994).