DNA 担持ナノ粒子による 遺伝子診断

宝田 徹
前田 瑞夫*

Gene Diagnosis Using DNA-linked Nanoparticles

Tohru Takarada and Mizuo Maeda*

Highly sensitive and selective DNA detection has attracted extensive attention for its importance in clinical gene diagnosis. Recently, we developed a simple method for visually detecting single nucleotide mutation by using spontaneous aggregation of DNA-linked colloidal nanoparticles, which was prepared through the phase transition of the amphiphilic copolymer consisting of DNA as the hydrophilic part and thermo-responsive poly (*N*-isopropylacrylamide) as the hydrophobic part. Adding the complementary DNA into the nanoparticles dispersion, the nanoparticles aggregated rapidly by a non-crosslinking mechanism, based on the salting-out techniques. The aggregation of DNA-linked colloidal nanoparticles was induced by the duplex formation on their surfaces. The instabilization of the nanoparticles would be derived from the decrease of both electrostatic repulsion and entropic effect of the DNA strand tethered to the surfaces of nanoparticles. In contrast, the nanoparticles kept dispersing in the presence of the point-mutated DNA under the identical conditions. Moreover, we improved this method for detecting single nucleotide mutation of sample DNA longer than the DNA attached to the surfaces of the nanoparticles.

Key words: nanoparticle, gene diagnosis, SNPs, poly (*N*-isopropylacrylamide), DNA

はじめに

2001年2月にヒトゲノムの塩基配列がほぼ解読された。ポストゲノムシーケンス時代をまさに迎えた現在、最重要課題の1つに挙げられているのが一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphisms; SNPs) の全容解明である。多型とは、遺伝子の塩基配列における個人差のことで、1つの塩基が別の塩基に変異しているもの (SNPs)、一塩基だけ挿入または欠損しているものなど種々のタイプがある。その中でも出現頻度が突出して高いのが SNPs であり、ヒトゲノム全体で 300 万から 1000 万箇所存在すると推定されている¹⁾。SNPs には、病気のかかりやすさや薬の効きやすさ、副作用の有無などと密接に関連するものが存在することがわかっており、近い将来、患者がどのような SNPs を持つかを調べて最適な治療方法を選択する「オーダーメイド医療」が実現するものと期待されている。

そこで重要となるのが、DNA のわずか一塩基の違いを正確かつ簡便に識別する分析手法の開発である。我々

は、表面に一本鎖 DNA を担持した高分子コロイド粒子の凝集・分散現象を活用した、一塩基変異識別法の開発を行っている (図 1)。粒子表面に担持した DNA と相補的な配列のサンプル DNA を粒子分散液に加えると、粒子は直ちに凝集して系は白濁する。それに対して、一塩基変異型のサンプル DNA を加えても粒子凝集は全く起

Fig. 1 Schematic illustration of the single nucleotide mutation assay using DNA-linked nanoparticles.

* 独立行政法人理化学研究所 バイオ工学研究室

* Bioengineering Laboratory, RIKEN

こらず、系は無色透明のままとなる。診断対象の遺伝子 DNA における一塩基変異の有無を可視化した情報としてアウトプットできることから、簡便かつ迅速な SNPs 識別法となることが期待できる。

1. 熱応答性高分子の核酸分離への応用

ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)は熱応答性高分子の代表例である。この水溶液を相転移温度以上に加熱すると、脱水和による不溶化が生じて系は急激に白濁する。混濁液を遠心分離して、不溶化した高分子を回収することも可能である。我々の研究グループは当初、標的とする核酸を混合液から分離することにこの現象を応用しようとしていた。

まず、標的とする核酸と相補的な塩基配列をもつ DNA を側鎖に結合したポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)(DNA コンジュゲート)を図 2 にしたがって合成した。DNA コンジュゲートは、5'末端をメタクリロイル基で化学修飾した短鎖 DNA(DNA マクロモノマー)と *N*-イソプロピルアクリルアミドのラジカル共重合によって容易に得ることができる。DNA コンジュゲートを核酸混合液に加えると、標的配列のみが DNA コンジュゲートの側鎖と二重鎖を形成する。この二重鎖が解離してしまわない程度に溶液を加熱して、DNA コンジュゲートを相転移させる。遠心分離で凝集体を回収したのち、低塩濃度の緩衝液に再溶解すれば、二重鎖が解離して標的配列のみを選択的に分離することができる。実際に、(dT)₁₆ を側鎖にもつ DNA コンジュゲートを用いて、細胞から抽出したすべての RNA から mRNA (3'末端に poly(A) を有する) を選択的に分離することに成功している。

2. DNA コンジュゲートの自己組織化によるコロイド粒子の形成

標的配列の分離効率を向上させるために、DNA マクロモノマーの共重合組成を 0.033 mol% から 0.34 mol% まで約 10 倍に増加させた。得られた DNA コンジュゲートの重量平均分子量は静的光散乱法によって 4.0×10^5 と算出された。これは、DNA コンジュゲート 1 分子あたりに平均 10 分子の DNA が結合している計算になる²⁾。

DNA 担持量を 10 倍に増加した DNA コンジュゲートの水溶液を加熱したところ、興味深いことに水溶液は無色透明のままで全く白濁しなくなった。ちなみに、DNA コンジュゲートが 36.8 °C で相転移していることは示差走査熱量分析から明らかである。これは、脱水和して不溶化したポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)を疎水核とし、その表面から親水性の DNA が分散媒(水)に向かって突き出ているコロイド粒子が自発的に形成して、溶液中で安定に分散したためであることがわかった。なお、担持させた DNA の塩基配列は、5'-GCCACCAGC-3' である。

まず動的光散乱法によって、平均粒径 36 nm の微粒子が安定に分散していることが明らかになった^{3,4)}。さらに静的光散乱法により、1 粒子あたりの平均分子量は 6.6×10^6 と算出された。上述のように DNA コンジュゲートの平均分子量は 4.0×10^5 であるため、1 つのコロイド粒子は 17 分子の DNA コンジュゲートが自己組織化したものであり、その表面には 170 本の DNA が担持されている計算になる。従って、疎水核表面で DNA 1 分子が占める面積は約 24 nm² になり、これは B 型二重鎖 DNA の断面積(約 3 nm²)の 8 倍に相当する。

Fig. 2 Synthesis of the DNA-poly(*N*-isopropylacrylamide) conjugate.

本稿では、このコロイド粒子のことを DNA 担持ナノ粒子と表記する。

3. 二重鎖形成による DNA 担持ナノ粒子の凝集

粒子表面に担持された DNA と相補的でかつ鎖長が等しい DNA (3'-CGGTGGTCG-5') をサンプル溶液として準備する。これを DNA 担持ナノ粒子の分散液に加えると、数分以内に白濁することを偶然に見出した (図 3)。粒子表面での二重鎖形成がひきがねとなって、粒子の分散安定性が著しく低下したと考えられる。なお、系の白濁が観測されたのはサンプル DNA によって粒子間が架橋されたためではなく、あくまで自発的に粒子が凝集したためであることに注意されたい。本研究で用いるサンプル DNA は、粒子を架橋することが不可能な配列である。これまでに、DNA による金コロイド粒子の架橋反応を利用した一塩基ミスマッチ検出法が Mirkin らによって報告されているが⁵⁾、本研究で見出された現象はこれとは原理的に異なっている。

Fig. 3 Turbidity change of the DNA-linked nanoparticle dispersion (a) before and (b) 1 min after addition of complementary DNA.

そこでまず最初に、DNA 担持ナノ粒子の塩に対する安定性を調べた³⁾。親水性コロイドは多量の塩を加えると凝集する (塩析)。塩が電離して生じるイオン種が粒子表面の電荷を中和し、かつコロイド表面の水和水を奪うためである。凝集するのに必要な最低塩濃度を凝析価という⁶⁾。同じ塩を用いて塩析したときに凝析価が低くなれば、そのコロイドは塩に対して安定性が低下したことになる。

具体的な実験手順は以下の通りである。0.1 mg/mL の DNA コンジュゲートを 10 mM のトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン-塩酸緩衝液 (pH 7.4, 300 mM 塩化ナトリウムを含む) に溶解し、40 °C で 30 分間温めて DNA 担持ナノ粒子を自発的に形成させる。温度を 40 °C に保持した粒子分散液に塩化マグネシウムまたは塩化ナトリウムを加えていき、系の濁度を波長 500 nm の光の透過率で評価する。ちなみに透過率がおおよそ 80% を下

回ると、白濁として目視判定することができる。

2 価カチオンであるマグネシウムイオンを塩化物として系に加えた場合、DNA 担持ナノ粒子のみの場合よりも、相補鎖 DNA を添加して粒子表面で二重鎖を形成させた場合の方が、より低い塩濃度で凝集が始まる (図 4)。1 価カチオンのナトリウムイオンの場合は、両者の違いがさらに際立つ (図 5)。DNA 担持ナノ粒子のみでは実験を行った塩濃度範囲で透過率はほぼ 100% のままであるが、相補鎖 DNA を加えると塩化ナトリウム濃度 370 mM から透過率は急激に低下して白濁する。分散液の塩化ナトリウム濃度をたとえば 1.0 M にあらかじめ設定しておけば、粒子分散液に相補鎖 DNA を添加すると直ちに白濁する系ができる。すなわち、分散媒中の塩条件を適切に設定すれば、ある特定の DNA の有無を目視判定することが可能となる。

Fig. 4 Salting out of the DNA-linked nanoparticles using MgCl_2 with or without complementary sample DNA.

Fig. 5 Salting out of the DNA-linked nanoparticles using NaCl with or without complementary sample DNA.

なお、粒子表面上の DNA が確実に相補鎖 DNA と二重鎖を形成していることは以下の実験から実証されている。ポリ (*N*-イソプロピルアクリルアミド) は 260 nm 前後の波長領域に吸収帯をもたないため、DNA 担持ナノ粒子と相補鎖 DNA の融解曲線を実測することができ

る。得られる融解曲線は、溶液中の DNA 二重鎖のそれと非常によく一致する。300 mM 塩化ナトリウム存在下において溶液中の融解温度が 52.5 °C であるのに対して粒子表面上では 51.8 °C であり、淡色効果による吸光度変化も同程度である。これは、溶液中の DNA と全く同じように、粒子表面上に固定化された DNA も二重鎖を形成できることを示している。ゆえに、相補鎖添加によって粒子が凝集したのは、粒子表面の DNA が二重鎖を形成したことが原因であることは明らかである。

4. DNA 担持ナノ粒子の凝集メカニズム

粒子表面で DNA が二重鎖を形成すると粒子の分散安定性が低下する原因としては、静電反発およびエントロピー反発の減少が挙げられる。一本鎖 DNA が二重鎖を形成すると、リン酸基間距離が短縮されて (4.0 Å → 1.7 Å) 粒子表面の負電荷密度は上昇するが、これを打ち消すように分散媒中の金属イオンと DNA リン酸基の対イオン形成が促進される。Manning の理論計算によると、リン酸基 1 つ当たりの 1 価カチオンの数は、二重鎖の場合で 0.76 個、一本鎖の場合で 0.44 個であり、結果的に二重鎖の方が一本鎖よりも電氣的に中和されることになる⁷⁾。その結果、粒子間の静電反発が緩和され、塩に対する分散安定性が低下すると考えられる。

二重鎖形成に伴うもう 1 つの重要な物性変化は鎖の剛直化である。DNA 鎖は相補の塩基対形成によってランダムコイルから二重らせんへと構造変化し、そのコンホメーションの自由度は大幅に制限される。一般的に、粒子表面に高分子を吸着させて得られる分散安定化は、粒子が凝集すると高分子鎖がとりうるコンホメーションの数が減少してエントロピーの低下を招いてしまうことで説明される⁸⁾。粒子表面の DNA の剛直性が二重鎖形成によって増大すれば、上記のエントロピー反発が低減するため、同じく分散安定性が低下すると考えられる。DNA のような高分子電解質の剛直性変化では、上述の静電反発とエントロピー反発を明確に区別して議論することは一般的には困難である。現在我々は、一本鎖および二重鎖 DNA 担持ナノ粒子の電気泳動移動度のイオン強度依存性を測定し、その結果に「柔らかい粒子」モデルの理論式⁹⁾をカーブ・フィッティングすることによって、静電反発とエントロピー反発の寄与を定量的に比較することを試みているところである。

5. 短鎖 DNA (9 量体) の一塩基変異識別

次に我々は、この DNA 担持ナノ粒子の凝集・分散現象を、DNA の一塩基変異の目視検出に応用することを試みた。粒子表面上の DNA の相補鎖を一塩基だけ置換、挿入または欠失させた変異鎖をそれぞれ添加して塩析を試みた結果を表 1 および図 6 (サンプル II–IV) にまとめる。いずれの場合も透過率はほぼ 100% のままで、実験を行った塩化ナトリウム濃度範囲では凝集は全く生じなかった^{10, 11)}。先にも述べたように、相補鎖 DNA を添加した場合は塩化ナトリウム濃度が約 370 mM 以上で凝集が生じるため (サンプル I)、たとえば塩濃度を 1.0 M にあらかじめ設定しておけば、いずれの変異鎖を添加しても系は無色透明のままで、相補鎖を添加した場合にだけ白濁することになる。

形成される DNA 二重鎖の熱安定性を考えれば、この結果は容易に理解することができる。粒子表面上に担持されたプローブ DNA と、一塩基置換型、挿入型、欠失型の変異鎖が形成する二重鎖の融解温度は、それぞれ、29.1 °C、37.8 °C、33.0 °C である (表 1)。いずれも測定温度の 40 °C よりも低い。つまり、これらの変異鎖はプローブ DNA と安定な二重鎖を形成することができない。粒子表面上の DNA が一本鎖状態のままであるため、塩に対する安定性は変化しないわけである。

Fig. 6 Salting out of the DNA-linked nanoparticles using NaCl with various sample DNAs (I–VI). Sample numbers are defined in Table 1.

Table 1 Melting temperature T_m (°C) of the duplexes between sample DNA and probe DNA tethered to the surface of the DNA-linked nanoparticle.

Sample No.	Sequence	T_m (°C)*	Mutation type
I	3'-CGGTGGTCG-5'	54.3	Normal
II	3'-CGGTAGTCG-5'	29.1	Substitution
III	3'-CGGTAGGTCG-5'	37.8	Insertion
IV	3'-CGGT-GTCG-5'	33.0	Deletion
V	3'-CGGTGGTCA-5'	49.6	Substitution at 5'-end
VI	3'-CGGTGGTCGA-5'	58.1	Addition at 5'-end

* In 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) containing 1.0 M NaCl, [sample DNA]₀ = [probe DNA] = 3.0 μM.

6. 短鎖 DNA(9 量体)の末端変異識別

上記の変異鎖はいずれもその変異が鎖の中央部分に生じた場合であるが、末端部位に変異が生じている場合も同様に識別が可能である。5′末端を一塩基置換または一塩基延長したサンプル DNA を加えて塩析を試みた結果を図 6 に示す(サンプル V と VI)。いずれの場合も、実験で試みた塩濃度範囲で透過率はほぼ 100% のままであり、凝集は全く観測されなかった^{10, 11)}。

しかしながら識別機構には中央変異の場合と異なる点がある。注目するのは先と同じく、変異鎖とプローブ DNA が形成する二重鎖の熱安定性である。1.0 M 塩化ナトリウム存在下では、5′末端に一塩基置換(G → A)がある場合の融解温度は 49.6 °C、5′末端側に一塩基だけ延長した場合は 58.1 °C である(表 1)。いずれも測定温度の 40 °C よりも高く、特に後者は融解曲線より見積もると、ほぼ 100% のプローブ DNA がサンプル DNA と二重鎖を形成している。つまり、粒子表面上のプローブ DNA が二重鎖を形成しているのにもかかわらず、粒子が安定に分散していることになる。

その理由としては以下のように考えられる。5′末端置換および 5′末端延長のサンプル DNA は、粒子表面に担持された DNA と二重鎖を形成すると、いずれも粒子の最外殻側(分散側)に一本鎖部位をもつことになる。これは、内側の二重鎖層に比べて金属イオンによって中和されにくいリン酸基が最外殻層に存在することを意味する。従って、この状態のナノ粒子を凝集させるには、相補鎖の場合よりも高濃度の金属イオンが必要になる。換言すれば、適当な塩濃度条件下では、相補鎖を添加した場合に比べて粒子表層が負に帯電しており、この静電反発によって粒子が安定に分散する。また、自由度の高い一本鎖部位によってエントロピー反発が増大することも要因として挙げられる。

7. 長鎖 DNA(39 量体)の一塩基変異識別

本法を遺伝子診断として実用化するためには、PCR に適用できる程度にまでサンプル DNA の鎖長を延長化することが不可欠である。しかしながら、15 量体のプローブ DNA を担持したナノ粒子を構築して同様の実験を行ったところ、相補鎖および一塩基置換鎖のいずれの場合も粒子凝集が生じてしまい、目視識別は不可能であった。粒子表面で形成される二重鎖の延長化に伴って一塩基ミスマッチ二重鎖の熱安定性が向上し、測定温度の 40 °C においても安定な二重鎖構造がとれるためと考えられる。

そこで、10 量体のプローブ DNA と 20 量体の補助 DNA を追加して、粒子表面で切れ目の入った二重鎖構

造を構築する方式を検討した(図 7)。39 量体のサンプル DNA が相補鎖(正常型)である場合は、粒子に固定した 9 量体 DNA、プローブ DNA および補助 DNA はいずれもサンプル DNA と二重鎖を形成して、粒子表面上の DNA はすべて二重鎖状態で存在することになる。一方、鎖中央部位を一塩基置換したサンプル DNA(変異型)の場合は、プローブ DNA のみがサンプル DNA と二重鎖が形成できないため(ミスマッチ二重鎖の融解温度が測定温度の 40 °C 以下になるようにプローブ DNA を設計)、粒子表面上には 10 塩基分の一本鎖部位が残存することになる。

Fig. 7 Schematic illustration of the DNA-linked nanoparticle designed for the single nucleotide mutation assay of 39 mer sample DNA.

前項と同様に塩に対する安定性を調べたところ、正常型のサンプル DNA を添加した場合は塩化ナトリウム濃度が約 900 mM 以上で粒子が凝集したのに対して、変異型の場合は 1.5 M でも均一のままであった(図 8)。従って、あらかじめ粒子分散液にプローブ DNA および補助 DNA を加えて塩化ナトリウム濃度を 1.5 M に調整しておけば、正常型サンプルを添加した場合は直ちに白濁し、変異型サンプルの場合は無色透明となる分析系が構築できることになる(図 9)。10 量体のプローブ DNA および 20 量体の補助 DNA は、鎖長およびその塩基配列を自在に設計できる。従って、任意の配列のサンプル DNA における一塩基変異の有無を目視検出することが原理的に可能である。

Fig. 8 Salting out of the DNA-linked nanoparticles using NaCl with normal and mutated sample DNAs (39 mer).

Fig. 9 Turbidimetric detection of single nucleotide mutation of 39 mer DNA using the DNA-linked nanoparticle.

おわりに

高分子コロイド粒子の塩析による濁度変化を活用して、長鎖 DNA の一塩基の違いを目視識別する分析手法を紹介した。粒子表面上に固定された一本鎖 DNA が二重鎖を形成すると、粒子の凝集開始塩濃度が著しく低下するという特異現象がその基本原理である。二重鎖形成に伴う DNA の物性変化をコロイド粒子の分散安定性にまで増幅するためには、DNA を粒子表面に高密度に集積化することが鍵ではないかと推定している。本稿で述べた現象は、コロイド粒子の疎水核をポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)から他の高分子(ポリスチレン)¹²⁾や金属(金微粒子)¹³⁾に置換しても確認されており、様々な分析デバイスへの応用が考えられる。

(2004 年 3 月 12 日受理)

文 献

- 1) SNP 遺伝子多型の戦略, 中村祐輔編, 中山書店, 2000, p 3

- 2) T. Mori, M. Maeda, *Polym. J.*, **33**, 830 (2001)
- 3) T. Mori, M. Maeda, *Polym. J.*, **34**, 624 (2002)
- 4) T. Mori, M. Maeda, *Langmuir*, **20**, 313 (2004)
- 5) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998)
- 6) 入門 コロイドと界面の科学, 鈴木四朗, 近藤保, 三共出版, 1994, p 26
- 7) G. S. Manning, *Quart. Rev. Biophys.*, **11**, 179 (1978)
- 8) 現代界面コロイド化学の基礎第 2 版, 日本化学会編, 丸善, 2002, p 35
- 9) ゼータ電位—微粒子界面の物理化学, 北原文雄, 古澤邦夫, 尾崎正孝, 大島広行, サイエントリスト社, 1995, p 33
- 10) 唐中嵐, 前田瑞夫, *バイオインダストリー*, **19**, 16 (2002)
- 11) 宝田徹, 前田瑞夫, *機能材料*, **22**, 13 (2002)
- 12) Y. Sakoda, Z. L. Tang, T. Takarada, M. Maeda, *Polym. Prep. Jpn.*, **51**, 1008 (2002)
- 13) K. Sato, K. Hosokawa, M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 8102 (2003)

PROFILE

宝田 徹 独立行政法人理化学研究所バイオ工学研究室・研究員
 [経歴] 1999 年東京大学大学院博士課程修了(博士(工学)), 2000 年東京大学先端科学技術研究センター協力研究員, 2001 年九州大学大学院工学研究院助手, 2003 年より現職。
 [専門] 生体機能関連化学

前田瑞夫 独立行政法人理化学研究所バイオ工学研究室・主任研究員
 [経歴] 1983 年東京大学大学院博士課程修了(工学博士), 同年東京大学工学部助手, 1988 年九州大学工学部助教授, 1995 年同教授, 2001 年理化学研究所主任研究員を兼務, 2002 年より現職。
 [専門] バイオ工学, バイオ材料学, 高分子化学, 分析化学