

# 基板に固定した一本鎖 DNA を核とする DNA ナノ構造体の自己組織化

畑 宏明\*<sup>1</sup> 山田 純也\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup> 東京大学 理学系研究科 物理学専攻, hata@genta. c. u-tokyo. ac. jp

\*<sup>2</sup> 東京大学 理学系研究科 化学専攻, junya@chem. s. u-tokyo. ac. jp

**概要** - DNA の自己組織化によって構築したナノ構造体を固体表面に配置する技術は、様々な機能を持つナノデバイスの構築に応用されてきた。しかし、固体表面に固定された DNA 鎖を核とし、基板上で直接 DNA ナノ構造体を自己組織化させることは未だ実現されておらず、また、基板と DNA の相互作用が DNA 構造にどのような影響を及ぼすかも理解されていない。そこで我々は本研究において、金基板上に固定した一本鎖 DNA を核として、DNA ナノ構造体を自己組織化させる手法を開発した。また、有機分子観察に特化した走査型電子顕微鏡を用いることで、金基板上に配置した DNA 構造体を観察することに成功した。得られた結果より、DNA 構造体の自己組織化について、溶液中と基板上における違いが明らかになった。

## 1. 著者紹介

畑 宏明：専門は核酸工学。本研究において、DNA ナノ構造体の設計と構築、ならびに原子間力顕微鏡(AFM)による観察を担当。

山田 純也：専門は固体表面の化学修飾と電子顕微鏡による有機分子の観察。本研究において、金基板の表面修飾と走査電子顕微鏡(SEM)による観察を担当。

本研究計画は、著者らが MERIT 特別講義において交わした議論から生まれた。当時、畑は DNA 自己組織化と他の材料分子と組み合わせた研究に興味があり、山田は DNA ナノ構造体の SEM 観察に関心を持っていた。

## 2. はじめに

近年、DNA の自己組織化（以下、DNA アセンブリ）により非常に複雑なナノ構造体の構築が実現されており、ボトムアップ型のナノテクノロジーとして注目を集めている。<sup>1</sup> 特に、DNA ナノデバイスを固体表面と組み合わせた研究は、バ

イオセンシングや細胞生物学、材料科学など、広い分野で利用されている。<sup>2</sup> しかし、固体表面に固定した DNA を核として、DNA ナノ構造体を基板上で直接構築することは未だ実現されておらず、また基板の DNA アセンブリへの影響も調べられていない。そのような基板表面に核を作る DNA アセンブリは新しいナノデバイスの構築に利用できるだけでなく、DNA アセンブリの過程を基板と DNA の相互作用を通して調べることができる。その結果得られる実験的な知見は、DNA セルフアセンブリに関する近年の理論的な研究結果を検証できるため非常に有用である。<sup>3</sup>

本研究において、我々は固体表面に固定した DNA 鎖を核として DNA ナノ構造体を構築する方法を考案した。図 1 に本手法の概要を示す。はじめに、末端をチオール修飾した一本鎖 DNA (ssDNA) を S-Au 結合によって金基板表面に固定した。次に、DNA の基板表面への非特異的吸着を防ぎ、かつ S-Au 結合の熱安定性を上げるため、金基板表面をメルカプトウンデカノール (MCU) で覆った。そして、DNA 構造体を構築する DNA 鎖

(brick DNA) の溶液に基板を浸し、DNA アセンブリを促すアニーリングを行った。最後に、基板表面の DNA 構造体を AFM, ならびに SEM で観察した。

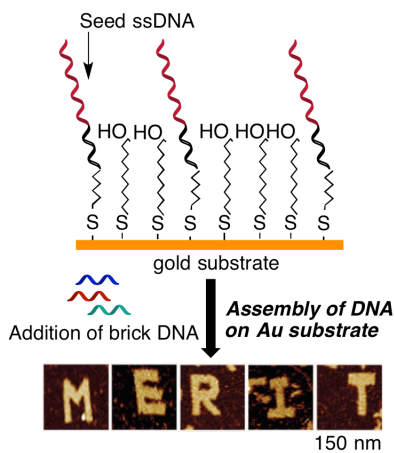


図 1. 本研究の目的と概要. AFM 画像は文献 4 より引用.

### 3. 実験方法

#### 3.1. DNA ナノ構造体のデザイン

DNA 構造体は Wei 等の報告<sup>4</sup>をもとに設計した. 図 2 に本研究で用いた DNA ナノ構造体のデザインを示す. 全 90 種類の ssDNA を使用し, 図中に示した長方形の構造を構築する. そのうち一つの DNA の末端がチオール修飾されており, 金基板表面に結合する (図 2b, seed brick DNA). この長方形の溶液中におけるサイズの理論値は 61 x 28 nm である.

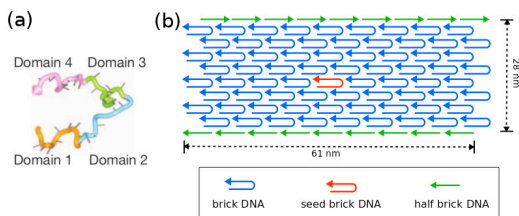


図 2. DNA ナノ構造体. (a) brick (DNA レンガ) のモチーフ. 文献 4 より引用. 各ドメインはそれぞれ別の brick DNA と結合する. (b) 本研究で用いた DNA ナノ構造体のデザイン.

#### 3.2. 金基板表面の修飾

金基板の表面修飾は Levicky 等の報告<sup>5</sup>を参考にして行った. 49 塩基長の ssDNA (以下, シード ssDNA. 構造式は RSS-ssDNA. R = 6-*O*-di(*p*-methoxyphenyl)phenylmethylhexyl, DMTr) をリン酸カリウムバッファー (1 M, pH 6.7) に 2  $\mu$ M の濃度で溶かし, UV/O<sub>3</sub> 処理した Au/Si 基板に 24 時間かけて吸着させた. その後, 基板表面を純水で洗い, MCU のエタノール溶液 (1 mM) に 2 時間浸した. 続いて, 溶液全体を 50 °C で 28 時間加熱し, エタノールと純水で表面を洗浄した. 最後に, シード ssDNA とともに基板に吸着した DMTr 基を取り除くため, 80%酢酸溶液に基板を浸し, 表面を水で洗浄した. 全工程において, 基板の乾燥は窒素ガスの噴霧により行った.

#### 3.3. DNA ナノ構造体の構築

DNA ナノ構造体は Wei 等<sup>4</sup>の DNA レンガ法にしたがって構築した. 以下に簡潔に述べる. デザインした構造体を構築するため, 塩基配列が異なる 90 種類の ssDNA (brick DNA) を当濃度 (500 nM in 0.5 $\times$  TE buffer, 25 mM MgCl<sub>2</sub>) で混合した溶液を作成した. その後, 表面修飾を施した金基板を溶液中に沈め, 90 °C から 25 °C まで 30 時間以上かけてアニーリングした.

#### 3.4. 基板の接触角測定

接触角の測定は DM-301 (Kyowa Interface Science Co. Ltd.), 解析は FAMAS software を用いて行った. 表面修飾を施した Au/Si 基板を測定器のステージに置き, 3  $\mu$ L の水滴を基板表面に落とした. 表 1 に示した水に対する接触角は 3 回の測定の平均値である.

#### 3.5. XPS 測定

X 線光電子分光測定 (XPS) は PHI 5000 VersaProbe (ULVAC PHI Inc.) を用いて行った. サンプルは, 接触角測定と同じものを用いた. 電子線とアルゴンイオンビームにより電荷中和した X 線ビーム (100  $\mu$ m, 25 W, 15 kV) を照射し, C<sub>1s</sub>, N<sub>1s</sub>, ならびに P<sub>2p</sub> のシグナルを検出した.

S/N 比を上げるため、 $N_{1s}$  と  $P_{2p}$  についてはそれぞれ 30 回と 100 回、測定を繰り返した。

### 3.6. AFM 観察

DNA ナノ構造体を構築した後、基板表面を純水で洗い、自然乾燥させた。その後、基板表面を気相 AFM 観察した。AFM 画像は、マルチモードヘッドの NanoScope IIIa (Digital Instruments) に、カンチレバー OMCL-TR400PSA-1 (Olympus Inc.) を用いて撮影した。

### 3.7. SEM 観察

SEM 観察は FEI Magellan 400L (FEI Inc.) を用いて行った。基板上で DNA ナノ構造体を構築したサンプル、ならびに溶液中で構築した後に基板表面に塗布したサンプルについて観察した。真空条件は  $5 \times 10^{-5}$  Pa, ビームの接地電圧は 1 kV を採用した。表面の導電層コーティングは行っていない。

## 4. 結果と議論

### 4.1. 基板表面の特性解析

はじめに、基板の表面修飾を、水に対する接触角測定により評価した。表 1 に得られた金基板の水接触角を示す。シード ssDNA の修飾後、接触角は  $30.2^\circ$  減少した。この結果から、親水性のシード ssDNA が金基板上に Au-S 結合によって固定され、基板表面の濡れ性が向上したとわかる。シード ssDNA と MCU の混合 SAM (以下、混合 SAM) の形成後、水接触角はさらに減少した。これは MCU 分子が基板表面のうち、シード ssDNA が結合していない部分に結合したためと考えられる。

表 1. 金基板表面の水接触角.

Modification	UV/O <sub>3</sub> treatment	w/ seed ssDNA	mixed w/ MCU
C.A. (°)	$72.3 \pm 2.2$	$42.1 \pm 2.1$	$36.3 \pm 2.3$

次に、シード DNA が基板表面に存在することを確認するため、XPS 測定を行った。(i) シード DNA と MCU で修飾した基板、(ii) MCU のみで修

飾した基板、をそれぞれ測定した。その結果、ssDNA 分子内のみ存在する  $P_{2p}$  と  $N_{1s}$  のシグナルが (i) のサンプルからのみ検出された。以上の結果から、金基板表面にシード ssDNA と MCU の混合 SAM が構築されていると判断した。

### 4.2. DNA ナノ構造体の観察

表面修飾を施した金基板を使い、基板表面で DNA ナノ構造体を構築した。その後、DNA ナノ構造体を観察するため、金基板表面を AFM で観察した。しかし、混合 SAM で修飾した基板表面は AFM でうまく観察することができなかった。これは基板表面が柔軟すぎたためと考えられる。図 3 に SAM 表面の AFM 像を示す。ただし、MCU ではなくメルカプトヘキサノール (MCH) SAM のアニーリング後のものである (MCU SAM 表面の観察は機械故障のため実施できていない)。ここでも基板表面ははっきりと観察できていない。しかしここで、表面の高低差が 10 nm 以上あることがわかった。本研究で用いた DNA 構造体の高さ (約 2 nm) と比較して、基板表面の凹凸が非常に大きい。そのため、仮に DNA ナノ構造体が基板上に存在したとしても、基板の凹凸と区別することが難しい。よって本研究では、AFM 測定は金基板上の DNA ナノ構造体を観察するのに適当でないと言える。



図 3. MCH で修飾した金基板表面の AFM 画像.

次に、SEM による DNA ナノ構造体の観察を行った。図 4 に得られた SEM 画像を示す。まず、設計した通りの長方形構造が非染色の状態で観察できた。一般に、有機分子の SEM 観察には何らかの染色が必要であると考えられており、この結果は我々の SEM 観察技術の有用性を示す。

(i) 混合 SAM 上で、(ii) MCU SAM 上で、それぞれ SEM 画像 ( $2.0 \mu\text{m} \times 1.7 \mu\text{m}$ ) を場所を変えて 30 枚撮影し、確認できた DNA ナノ構造体の数を調べた。その数は (i) が 90、(ii) が 57 であった。MCU SAM における DNA アセンブリや DNA ナノ構造体の非特異的吸着を完全に抑えることはできなかったが、この結果はシード ssDNA が基板表面での DNA ナノ構造体の形成を促進することを示すものである。

また、DNA アセンブリについて、基板表面と溶液中の違いを調べるために、SEM 画像から DNA ナノ構造体のサイズ分布を解析した。溶液中のサンプルは、溶液中で構築した DNA ナノ構造体の溶液を混合 SAM 表面に塗布し、同様に SEM で観察した。DNA ナノ構造体の長軸側の長さ分布を図 5 に示した。3 種類のサンプルに共通して、ほとんどの DNA ナノ構造体が最大サイズ (61 nm) まで成長してなかった。これと同様の傾向が DNA レンガを用いた先行研究でも報告されている。Wei 等は DNA レンガによってデザインした構造ができる確率は 50% 未満であると報告している。<sup>4</sup> この収率は DNA オリガミのほぼ 100% に比べて非常に低い。この原因は DNA レンガが短い ssDNA のみから作られること及び、その成長課程で溶液中において、DNA ナノ構造体同士が衝突することより構造崩壊が容易に起こりやすいからだと考えられる。また短い DNA 鎖は互いに結合しやすいため、アニーリング過程で多くの核を形成し、最大サイズまで成長する構造体の数を減らす可能性がある。

DNA ナノ構造体のサイズ分布によると、熱力学的に安定な DNA ナノ構造体の大きさは、溶液中では 26–30 nm (4 brick DNAs)、固体表面では 16–25 nm (3–4 brick DNAs) であった。また、特に混合 SAM の場合、全体のうち 13% の DNA ナノ構造体が最大サイズまで成長した。その比は溶

液中の値 (7%) に比べ高い。この理由は、DNA ナノ構造体同士の衝突による構造の崩壊が、溶液中より基板上の方が少ないためと考えられる。一方で、基板上での DNA アセンブリでは DNA 構造体の形が完全な長方形になっておらず、丸い球状の構造になっているものが多くあった。これは基板表面の凹凸の影響を受けてデザインされた DNA ナノ構造体の成長が阻害された可能性が高い。

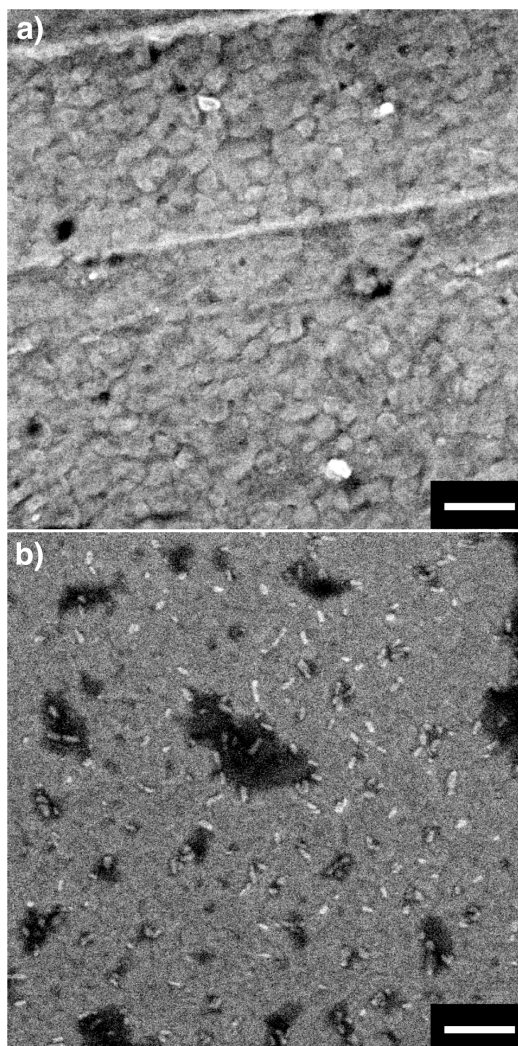


図 4. DNA ナノ構造体の SEM 画像. (a) シード DNA と MCU の混合 SAM 表面の DNA ナノ構造体. (b) 溶液中でセルフアセンブリした DNA 構造体を同じ SAM に塗布した基板表面の SEM 像. スケールバーは 200 nm.

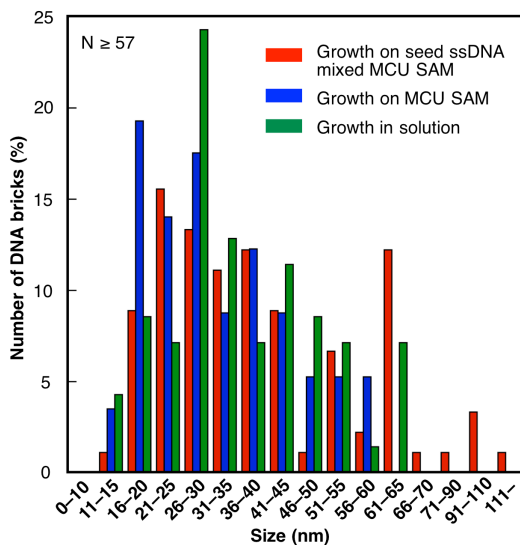


図 5. DNA ナノ構造体のサイズ分布. それぞれ, シード ssDNA 混合 SAM 上 (赤), MCU SAM 上 (青), 溶液中 (緑) で構築した DNA ナノ構造体. カウントした構造体の数は全てのサンプルについて 57 以上.

基板上で構築した 2 種類のサンプルを比較すると, シード ssDNA ありの基板(図 5, 赤)の方がシード ssDNA なしの基板(図 5, 青)に比べて, 大きなサイズの DNA ナノ構造体が明らかに多い. これは, シード無しの基板では構造体が基板と結合していないため, アニール後の洗いで流されたからと考えられる. よって, このことから, シード ssDNA を核として成長した DNA 構造体が, シード ssDNA を介して基板と強く結合していることがわかる.

## 5. 結論

固体表面での DNA アセンブリが, 金基板にシード ssDNA を固定することで実現できることを示した. また, その基板上的 DNA ナノ構造体を SEM によって非染色観察することに成功した. 得られた結果から, シード ssDNA が基板上での DNA アセンブリを促進することを定量的に示した.

基板上での DNA アセンブリでは, DNA ナノ構造体同士の衝突による構造の崩壊が抑えられ, 溶液中での DNA アセンブリに比べ大きな DNA ナノ構造体が観察された. しかし, 基板表面の凹凸が DNA アセンブリに及ぼす影響により, DNA ナノ構造体のサイズや形状を完全に制御することはできていない. ゆえに, 基板上で DNA ナノ構造体をより精密に構築するためには, 基板表面をより滑らかにすること, また基板の凹凸に影響を受けにくい構造デザインにすることが有効であると考えられる.

## 謝辞

本研究の遂行にあたり, 加藤隆史先生, 中村栄一先生, 陶山明先生, 田中肇先生に多大なご支援, ご協力をいただきましたことを深く感謝いたします. またこのような機会を与えていただきました MERIT プログラムに心より感謝いたします.

## 参考文献

- [1] Pinheiro, A. V.; Han, D.; Shih, W. M.; Yan, H. Challenges and opportunities for structural DNA nanotechnology. *Nat. Nanotechnol.*, **6**, 763–772 (2011).
- [2] Howorka, S. DNA nanoarchitectonics: Assembled DNA at interfaces. *Langmuir*, **29**, 7344–7353 (2013).
- [3] Reinhardt, A.; Frenkel, D. Numerical evidence for nucleated self-assembly of DNA brick structures. *Phys. Rev. Lett.*, **112**, 238103 (2014).
- [4] Wei, B.; Dai, M.; Yin, P. Complex shapes self-assembled from single-stranded DNA tiles. *Nature*, **485**, 623–626 (2012).
- [5] Levicky, R.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J.; Satija, S. K. Using Self-Assembly To Control the Structure of DNA Monolayers on Gold: A Neutron Reflectivity Study. *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9787–9792 (1998).