

9609 DNAネットワークを用いる $Mg^{2+}$ 選択性センサシステム

助成研究者：前田 瑞夫(九州大学 工学部)

バイオセンサに用いられる生体素子は、酵素や抗体などのタンパク質が中心である。一方、分子認識に関与する生体成分としてDNAも重要である。しかしDNAを用いるセンサは遺伝子センサを除き殆ど前例がない。筆者らは、DNA二重らせんを特異的なアフィニティー機能物質とみなし、これをセンサの分子認識素子として用いる研究を進めてきた。例えば、DNA二重らせんを電極上に固定化することにより、DNA結合性薬物を同定・定量するセンサを世界で最初に報告した。このDNA修飾電極はその後の研究で、 $10^{-7}$  M レベルの  $Mg^{2+}$  に対して特異的な応答を示すこともわかってきた。

本研究では制限酵素などのDNA分解酵素が  $Mg^{2+}$  を必須金属として要求することに着目し、DNAを用いた高感度  $Mg^{2+}$  計測システム設計のための高分子デバイス開発を計画した。DNAとビニル系合成高分子からなる複合ハイドロゲルに、DNA分解酵素とレポーター分子（蛍光色素など）を包埋する。酵素が  $Mg^{2+}$  に依存してゲルの骨格であるDNAを加水分解すれば、ゲルは次第に崩壊しゲル中に閉じこめられた色素化合物が系中に放出される。こうして化学増幅型の高感度・高選択的マグネシウムセンサが構築されると期待される。

本年度はこれを実現するために、DNAネットワーク調製法の確立とマグネシウム依存性酵素反応のネットワークへの適用について基礎的検討を行った。DNAネットワークについては、当初計画していたビニル誘導体化DNAとアクリルアミドの架橋型ゲル作成ではなく、研究の途上で偶然見出されたポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)・DNA複合体がつくるハイドロゲルを研究対象とした。もちろん架橋型ゲルの調製も平行して進め、その調製法も確立している。但し、同架橋型ゲルについては酵素分解性の検討がまだ不十分である。

一方、本研究を開始した後に、ビニル高分子との複合化に伴いDNAが酵素分解を受け難くなるのではないかと危惧が生じた。事実、DNA複合体においては高分子修飾率の増加とともに被切断効率が著しく低下する傾向が明らかとなった。このため、センサシステム構築への取り組みを一時中断し、高分子修飾時の酵素マスキングについて基礎的な検討を行った。その結果、複合体調製時にあらかじめ酵素を共存させておくだけで、マグネシウムイオン依存性の分解活性を保ったまま、複合体を容易に作製できることが明らかとなった。

以上のように、研究当初に十分に配慮していなかった問題に直面し、その解決に時間を要したため、期限内に最終目的である「選択的センサシステム」の実現には至らなかった。しかし、同システムを構成する化学部品は今回の研究で全て手に入れることが出来たので、その完成には何ら技術的な困難はないと考えている。引き続き研究を進めているところである。



9609 DNAネットワークを用いる $Mg^{2+}$ 選択性センサシステム

助成研究者：前田 瑞夫(九州大学 工学部)

## 1. 研究目的

生体成分を活用した計測法として、バイオセンサはいまや実用の域に達している。用いられる生体素子は、酵素や抗体などのタンパク質が中心である。これらが分子認識素子として、そしてまた信号変換素子として、センサの選択性と応答性を支配している。

一方、分子認識に関与する生体成分として、タンパク質や糖質とならびDNAがある。DNAは多彩な分子認識作用を示す。DNA二重らせんに見られる相補的な塩基対形成については説明するまでもないであろう。一方、遺伝調節に関わる諸因子はその作用機序においてまずDNAにアクセスするのであるから、DNAは遺伝調節因子に対するアフィニティリガンドとなる。またある種の薬剤は、DNAとの特異的相互作用を介してその生理活性を発現する。多環芳香族化合物のもつ変異原性、発ガン性は、DNAへの結合が引金になると考えられている。

しかし、DNAを用いるセンサは遺伝子センサを除き殆ど前例がない。筆者らは、DNA二重らせんを特異的なアフィニティ機能物質とみなし、これをセンサの分子認識素子として用いることに興味を持ち、研究を進めてきた。例えば、DNA二重らせんを電極上に固定化することにより、DNA結合性薬物を同定・定量するセンサを世界で最初に報告した。このDNA修飾電極はその後の研究で、 $10^{-7}$  M レベルの  $Mg^{2+}$  に対して特異的な応答を示すこともわかってきた。すなわち  $Na^+$ 、 $K^+$  に対し10万倍、 $Ca^{2+}$  に対しては数十倍という高い選択性が示された。これは  $Mg^{2+}$  の生体内での役割を考えると興味深い。

一方筆者らは、制限酵素などのDNA分解酵素が  $Mg^{2+}$  を必須金属として要求することに着目し、DNAを用いた高感度  $Mg^{2+}$  計測システム設計のための、高分子デバイス開発を計画した。具体的には、DNAにビニル重合能を与える新規物質を用い、DNAとビニル系合成高分子とを複合ゲル化する。DNAはDNA分解酵素存在下で、マグネシウムイオンに特異的に応答して加水分解されるため、生成するヌクレオチドを分光学的にオプトロード計測することにより、従来にはない高感度のマグネシウムセンサが構築されると期待される。

## 2. 研究方法

本研究で筆者らは、遺伝子DNAを機能物質として用い、生体親和反応に依拠した高選択性マグネシウムイオンセンシングシステムを提案しようとしている。この目的のため、以下の3つの小テーマについて、計測システム構築に向けた基礎研究を行った。

- 1) DNA二重らせん固定化電極の調製とマグネシウムセンサへの適用
- 2) DNA二重らせんを含有するハイドロゲルの調製
- 3) DNA二重らせんを含有する高分子材料のマグネシウム依存酵素分解の検討

### 3. 研究結果と考察

#### 3.1 DNA固定化電極とマグネシウムイオン検出系

DNA末端にホスホジエステル結合を介して2-ヒドロキシエチルジスルフィドを導入し、金-硫黄配位結合を利用してDNAの電極固定を行った。この末端修飾DNAで処理した金表面の赤外反射吸収スペクトルを測定したところ、DNAキャスト膜の透過スペクトルと同様の波数領域に吸収を示すことから、金表面にDNAが固定化されていることが確かめられた。コントロールとして末端修飾していないDNA断片を作用させた金表面では、このようなスペクトルは観測されなかった。

DNAの固定化量は水晶発振子重みセンサにより検討した。測定には金を蒸着した発振子を用い、この表面への吸着量を発振子の共振周波数変化から算出した。30 - 300 bpの分布を持つDNA断片を用いた場合、1 cm<sup>2</sup>あたり10 μgのDNAが固定化されていることがわかった。電極の実効表面積およびDNA二重らせんの幾何学的断面積から見積もった表面の被覆率は、約60%となった。

電極表面に固定化したDNA層自身は、電気化学的には不活性である。このため、酸化還元活性種(マーカーイオン, K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] / K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>])を共存させ、そのボルタモグラムをもとに表面の特性を評価した。図1に示すようにポリアニオンであるDNAは、これらアニオン性マーカーイオンの電極反応を抑制することがわかる。なおコントロールとして、2-ヒドロキシエチルジスルフィドで処理した電極では、反応の阻害は見られず未修飾電極と類似のボルタモグラムを示した。

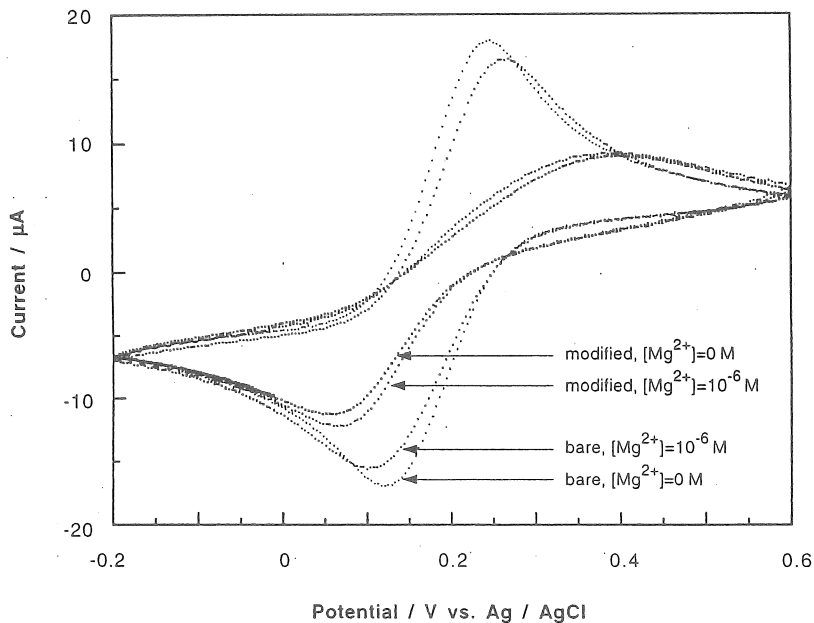


Fig.1 The Mg<sup>2+</sup>-dependent changes in cyclic voltammograms of the bare and the DNA-immobilized Au electrodes at 25 °C.

この測定系にマグネシウムイオンを添加したところ、ボルタモグラムが変化することがわかった(図1)。すなわち  $10^{-7}$  M レベルの極低濃度から濃度に依存したピーク電流値の増加が観察された(図2)。DNAにマグネシウムイオンが結合すると、電極近傍のアニオンサイトが減少し、アニオン性マーカの電極への接近が容易になるため、電極上での酸化還元反応に基づく電流値が増加したものと理解できる(図3)。原理的には梅澤(東大理)らが提唱する「イオンチャンネルセンサ」の応用である。

図2には、カルシウムイオンやバリウムイオンとの比較が示されている。これらの応答濃度域は1桁以上、高濃度側にシフトしていることがわかる。また測定は、大過剰のカリウムイオン(10 mM)共存下で行われていることを指摘したい。すなわち、このDNA修飾電極はアルカリ金属、アルカリ土類金属の中で  $Mg^{2+}$  に対し選択的な応答を示すことがわかる。これは  $Mg^{2+}$  の生体内での役割を考えると興味深い。さらにこれら一連の応答特性はDNA二重らせんの性質を反映したものであることが、DNA一本鎖固定化電極との比較から明らかとなっている。

### 3.2 DNAハイブリッド材料の調製とハイドロゲルの生成

筆者らは一方でDNA修飾法の研究を行ってきた。すなわちDNAに光架橋することが知られるソラレンのビニル誘導体を合成し、これとDNAとの光反応により、DNAに重合性のビニル基を導入することができる。このビニル化DNA共存下で水溶性モノマー(例えばアクリルアミド)の重合を行えば、DNAはポリアクリルアミド鎖に共重合の形で取り込まれ、結果としてグラフト型複合体が生成する。また、 $31^{\circ}C$ 以上で可逆的に沈殿する性質を持つポリ(N-イソプロピ

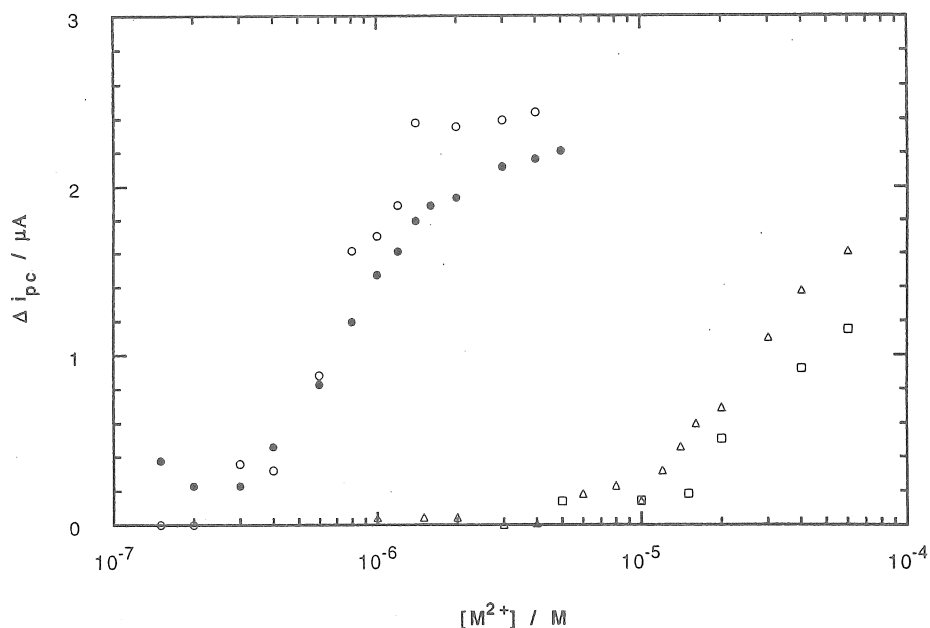


Fig. 2 The metal-ion dependent changes in the cathodic peak current on the DNA-immobilized Au electrode. ○ and ●,  $Mg^{2+}$  (for two different electrodes); △,  $Ca^{2+}$ ; □,  $Ba^{2+}$ .

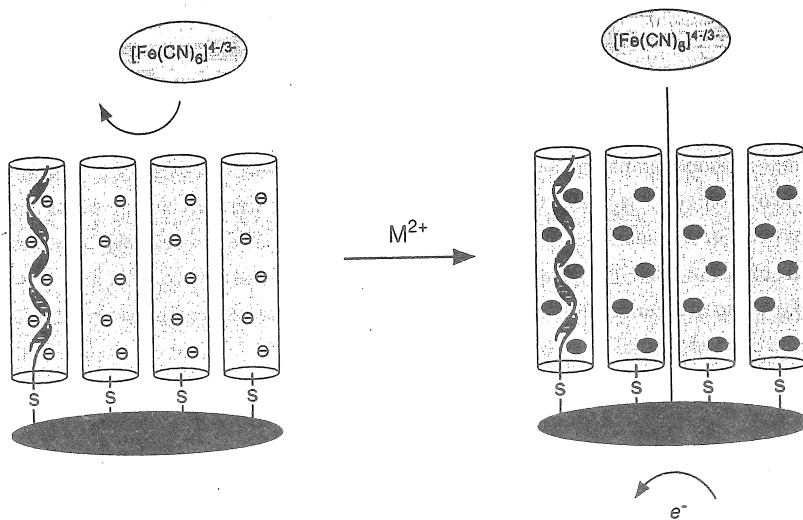


Fig. 3 Schematic illustration of the Au electrode modified with double-stranded DNA and its response to  $Mg^{2+}$  in the presence of redox active species.

ルアクリルアミド) をグラフトしたところ、この複合体は制限酵素や発ガン物質のアフィニティ一沈殿分離に有望であることが示されている。

本研究において筆者らは新たに、末端にソラレンを導入したビニルポリマーを用いるハイブリッド体合成法を検討した(図4)。これによれば、修飾ポリマー鎖のキャラクタライズが容易に行えることに加え、DNAの構造への影響が必要最小限で済む、様々な機能性モノマーを共重合で取り込ませることができる、などの特色がある。本研究ではこの経路でポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)とDNAとの複合体合成を試み、以下の通りこれを確立した。

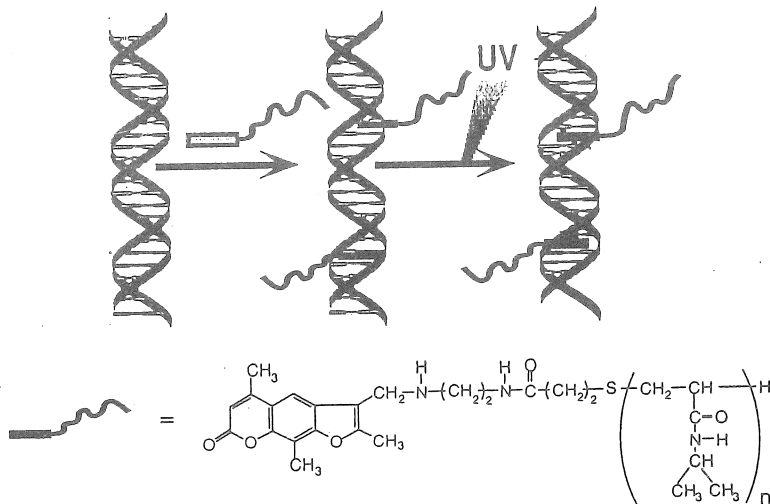


Fig. 4 Modification of double-stranded DNA with psoralen-terminated poly(N-isopropylacrylamide).

末端にカルボキシル基を持つポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の合成と活性エステル化は文献に従った。これとアミノアルキル化ソラレンとの反応で、DNA結合性ポリマーを合成した。分子量は5400、コイル・グロビュール相転移温度は30.8℃であった。このポリマーは低分子のソラレン誘導体と全く同様に、紫外線照射下においてプラスミドDNAの二重らせんを架橋、結合することを確かめた。またその結果、ゲル電気泳動分析においてDNAの移動度が著しく影響を受けることから、DNAが同ポリマーにより修飾されていることが確かめられた。

得られる複合体(コンジュゲート)はポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)鎖の性質を反映して、31℃付近で相転移を起こし、系は白濁した。こうした性質を持つDNA複合体をN-イソプロピルアクリルアミドのホモポリマー水溶液(1wt%)に添加し、40℃で遠心分離したところ、ハイドロゲル状の凝集体が形成されることが見出された。これは絡み合ったポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)鎖の脱水和に伴い、疎水結合がネットワーク状に形成されることが原因と考えられるが、詳細はまだわかっていない。

興味深いことに、この様な嵩高い集合体は系内にDNA複合体が存在しないときには形成されない。N-イソプロピルアクリルアミドのホモポリマーや、それとDNAとの単純な混合物では、粘ちような沈殿物を生じるだけである。ここで用いているグラフト型複合体がポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)のネットワーク形成を、いわば「かすがい」となって支えているとともに、DNAの持つ高い親水性がこのハイドロゲルの保水能力を担っていると考えている。

### 3.3 DNAハイブリッドの制限酵素分解

一般に生体分子の高分子固定化においてはその構造に与える摂動が心配される。上述の方法によるDNAのポリマー修飾においても、DNA分解酵素に対する親和性の低下が懸念される所である。筆者らはこれをマスキングの概念導入により解決した。

実験操作は以下の手順に従った。

#### (1) 複合体の合成とマスキング

プラスミドDNA(pBR322)溶液に制限酵素EcoRI(100unit)を加え、次に末端ソラレン化ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を加えた。反応系にはマグネシウムイオンが含まれておらず、この条件でプラスミドが切断されることはない。これに氷浴上で紫外線(500W超高压水銀灯、310nm以下をカット、30mW/cm<sup>2</sup>)を15分間照射した。照射時の濃度は[pBR322]=62μM(塩基対濃度)、[ソラレン化ポリマー]=20、40、60μM(末端基濃度)とした。

#### (2) 非マスク複合体の合成

対照実験として制限酵素でマスクしていない複合体も同様の操作で合成した。このとき合成条件(塩濃度など)を合わせるため、100℃で30分間処理した熱変性EcoRIを用いている。

#### (3) 酵素反応

マスキングを行った複合体合成の反応溶液に、マグネシウムイオンを含む酵素反応用緩衝液を加え、さらに熱失活EcoRI(100unit)を加えた後に、28℃で24時間インキュベートした。ここで失活EcoRIを加えているのは、以下の非マスキング系と最終的な塩濃度を揃えるため、また温度

設定が低めなのは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)の相転移を防ぐためである。一方、マスキングを行っていない複合体溶液には、制限酵素 Eco RI(100unit)、マグネシウムイオンを含む酵素反応用緩衝液を加え、同様の条件でインキュベートを行った。酵素反応時のDNA濃度は、[pBR322]=46.5 μM (塩基対濃度)であった。インキュベート後各サンプルは、1%アガロースゲル電気泳動分析を行い、エチジウム染色後の各バンドの強度比から、切断効率の決定を行った。

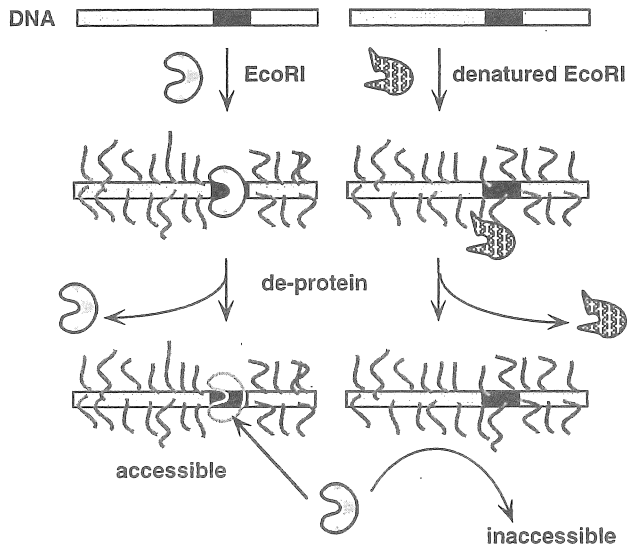


Fig. 5 Masking of double-stranded DNA by Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease on the modification by the psoralen-terminated vinyl polymer.

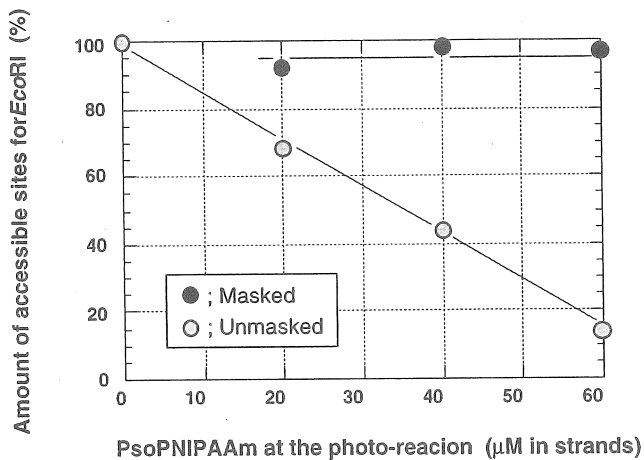


Fig. 6 Effect of the masking procedure on Mg<sup>2+</sup>-dependent degradation of DNA hybrid.



以上のように今回は、マグネシウム依存性酵素の典型例として制限酵素 EcoRI を、プラスミドDNA pBR322 (HindIII で直鎖状にしてある) との組み合わせにおいて用いた (図5)。EcoRI は pBR322 を1カ所で切断し二つのフラグメント (切断片) を与える。酵素反応後のゲル電気泳動分析によれば、DNAは末端ソラレン化ポリマーとの光反応に伴う泳動の遅れが観察されるほか、マグネシウムイオンを添加しても酵素による切断がおこりにくくなっていることがわかった (非マスキング系)。またその度合いは、光反応時に供給するソラレン化ポリマーの濃度の増加に伴い、より顕著になる傾向がはっきりと観察された。これはプラスミドDNAの周りにグラフトされたビニルポリマー鎖が制限酵素の接近を阻害しているためであると考えられる。これに対しソラレン化ポリマーとの光反応時に酵素マスキングを施した系においては、マグネシウム添加に伴う複合体切断の効率は殆ど影響を受けることなく、ほぼ完全に二つのフラグメントに分裂した。

縦軸に被切断率、横軸に光反応時のポリマー濃度を取り、マスキング系、非マスキング系それぞれについてプロットした (図6)。マスキングを行っていない複合体ではポリマー濃度が増加するに従い切断効率が低下していているが、一方マスキングを行った複合体では殆ど低下が見られない。これらのことよりマスキング操作によってDNA鎖上の EcoRI 認識部位が非常に高い効率で保存されていることが明らかとなった。また、このマスキング時の酵素添加量を変化させて切断効率を検討したところ、EcoRI 添加量が約 20unit あたりから切断効率の差が大きくなり、マスキング操作時の EcoRI 量を増やすに従ってマスキング効果が増大していることが明らかとなった。

制限酵素 EcoRI を用いてマスキング操作を行うことにより、かなりの確率でDNA鎖上の認識部位が保存されることが明らかとなった。またマスキング操作時の EcoRI 濃度を変えて同様の切断実験を行ったところ、酵素量が増えるにつれてその効果が増大していることが明らかとなった。これらの結果は図5に模式的に示したとおり、DNA二重らせんを土台 (テンプレート) とし、その上に合成高分子を配置することによりハイドロゲルを調製する場合において、DNA分解酵素の作用点を確保することが可能であることを明確に示しており、マグネシウム依存性酵素分解反応をマグネシウムイオンの計測に利用する上で重要な知見である。

#### 4. 今後の課題

DNAを架橋子としてもつハイドロゲルに、DNA分解酵素 (DNase) を内包すると、ゲルは生分解性を獲得し、しかもそのプロセスは共存する金属イオンに制御される。すなわち、DNaseの活性には Mg(II) が必須であるため、マグネシウムイオンによってゲルの分解が開始されるという新しい応答性システムが構築される。ゲル中に適当な蛍光色素を含有させておけば、ゲルの分解によりこの色素が分泌され、これを分光学的に容易に定量することができる。このシステムでは超微量のマグネシウムイオンに応答して、多量の蛍光色素が放出されてくる。すなわち、この手法は「化学増幅」の概念を含んでいる。

本研究では図7に示すこの「DNAネットワークを用いるMg<sup>2+</sup>選択性センサシステム」を実現するために、その基礎となるDNAネットワークの調製法の確立とマグネシウム依存性酵素

反応の適用に関する基礎的検討を行った。DNAネットワークの調製法については、当初計画していたビニル誘導体化DNAとアクリルアミドの架橋型ゲル作成ではなく、研究の途上で偶然見出されたポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）・DNAグラフト体ハイドロゲルを研究対象とした。もちろん架橋型ゲルの調製も平行して進めており、その調製法も確立している。しかし、同架橋型ゲルについては酵素分解性の検討が不十分であり、今回の報告からは除外した。

一方、本研究を開始した後に、高分子修飾に伴いDNAが酵素分解を受け難くなるのではないかとの危惧が生じ、事実、高分子修飾率の増加とともに被切断効率が著しく低下する傾向が明らかとなった。このため、センサシステム構築への取り組みを一時中断し、高分子修飾時の制限酵素マスキングについて基礎的な検討を行った。その結果、複合体調製時にあらかじめ酵素を共存させておくだけで、マグネシウムイオン依存性の分解活性を持った複合体を容易に作製できることが明らかとなった。

以上のように、研究当初に十分に配慮していなかった問題に直面し、その解決に時間を要したため、最終目的である「選択的センサシステム」の実現には至らなかった。しかし、図7に示すシステムの全ての部品は今回の研究で手に入れることが出来た。また本研究の前半で示したDNA固定化電極も、そのままDNAネットワークシステムと組み合わせることが出来るので、高感度な電気化学的計測法とのハイブリッド化も今後の重要な課題であると考えている。現在も引き続き研究を進めているところである。

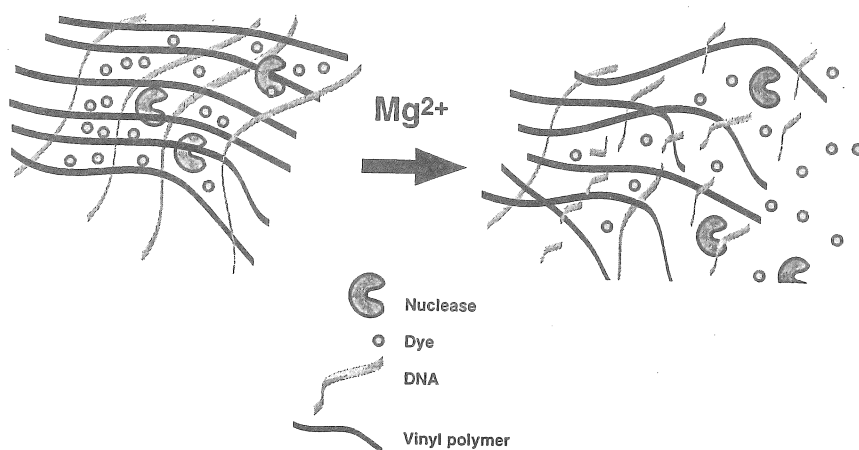


Fig. 7  $Mg^{2+}$ -Selective sensing system from DNA networks entrapping  $Mg^{2+}$ -dependent nuclease and reporter dye molecule.

文献

- 1) M. Maeda, D. Umeno, C. Nishimura, M. Takagi, Conjugation of DNA with Functional Vinyl Polymers by Using Vinyl Derivative of Psoralen as a Linker, in "Hydrogels and Biodegradable Polymers for Bioapplications" (ACS Symp. Ser., Vol. 627), R.M. Ottenbrite, S.J. Huang, K. Park, eds., American Chemical Society (1996) pp197-208.
- 2) M. Maeda, D. Umeno, M. Takagi, Hybrid Biomaterials Comprising Double-Helical DNA. Covalent Coupling Between  $\lambda$  phage DNA and Poly(N-isopropylacrylamide), in "Advanced Biomaterials in Biomedical Engineering and Drug Delivery Systems", N. Ogata, S.W. Kim, J. Feijen, T. Okano, eds., Springer, Tokyo (1996) pp235-236.
- 3) 梅野太輔、前田瑞夫、機能性DNAの合成と応用、高分子, 46, 314-318 (1997).
- 4) D. Umeno, M. Maeda, Approach for Affinity Separation of Genotoxins with Poly(N-isopropylacrylamide) Carrying Double-Stranded DNA, Anal. Sci., in press (1997).
- 5) 前田瑞夫、DNAバイオセンサ、化学と工業, 50(7), in press (1997).
- 6) K. Nakano, M. Maeda, S. Uchida, M. Takagi, Bioaffinity Sensor Using Oligonucleotide-Modified Au Electrode, Anal. Sci., submitted.
- 7) D. Umeno, M. Kawasaki, M. Maeda, Photo-Induced Conjugation of Double-Stranded DNA with Psoralen-Terminated Poly(N-isopropylacrylamide), Nucleic Acids Res., submitted.

## Mg<sup>2+</sup>-Sensing System Using DNA Networks

Mizuo Maeda

Department of Chemical Science and Technology, Faculty of Engineering,  
Kyushu University

### Summary

DNA is interesting not only as a pool of genetic information, but as a source of advanced materials for molecular recognition. In this context double-stranded (ds) DNA would be important rather than single strand, since DNA is recognized in "ds" form by the molecules accessing to it in most of events occurring in vivo. Moreover, dsDNA have unique and highly regulated structure: dsDNA can be utilized as building blocks for molecular architecture such as hydrogel materials.

We have developed a series of methods to prepare soluble conjugates between dsDNA and synthetic polymers. As an extension of the study, we synthesized vinyl polymers having a terminally-introduced psoralen moiety which can be photochemically conjugated to dsDNA. UV irradiation to the mixture of DNA and the polymers resulted in direct and covalent grafting of the polymers on DNA.

In this work, the conjugate between pBR 322 plasmid DNA and poly(N-isopropylacrylamide) (NIPAAm) was studied. PolyNIPAAm is known to have a lower critical solution temperature in aqueous media: the transition between the coil (soluble) and globule (insoluble) conformations takes place reversibly at around 31 °C. The modification of the DNA with polyNIPAAm was found to make the conjugate temperature-responsive. The conjugate formed hydrogel which can entrap a Mg<sup>2+</sup>-dependent restriction endonuclease, EcoRI. An interesting finding here is that the degradation efficiency of the DNA strands by EcoRI was enhanced when the conjugate was prepared in the presence of EcoRI, probably due to the footprinting effect.

The hybrid system from dsDNA, Mg<sup>2+</sup>-dependent nuclease, and the vinyl polymer should form a hydrogel which can contain a reporter molecule such as fluorescent dye, redox active compound, etc. Mg<sup>2+</sup>-Dependent degradation of the gel would result in the release of a large number of the reporter molecules which can be detected effectively. As an extension of the present research, the work on the Mg<sup>2+</sup>-sensing system is now in progress.