

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	DNA配向化フィルムの作製と導電性の評価
Title(English)	
著者(和文)	中山元
Author(English)	
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第5095号, 授与年月日:2002年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第5095号, Conferred date:2002/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

平成十三年度 学位論文

DNA配向化フィルムの作製と 導電性の評価



東京工業大学生命理工学研究科
生体分子機能工学専攻

指導教官

岡畑 恵雄 教授

森 俊明 助教授

中山 元

Hajime Nakayama

目次

第1章 序論

1-1	生体高分子の機能性材料としての展開	1
1-2	DNAの構造的特徴	2
1-3	サケ精子由来DNAの有効利用	5
1-4	DNAの機能材料としての応用	6
1-5	導電性材料としてのDNA	12
1-5-1	DNA中の導電性メカニズム	12
1-5-2	DNAを用いた導電性材料	16
1-6	本論文の目的	18

第2章 DNA配向化フィルムのキャラクタリゼーション

2-1	緒言	27
2-2	実験方法	29
2-2-1	DNA-脂質複合体およびキャストフィルムの作製	29
2-2-2	X線回折測定	34
2-2-3	偏光顕微鏡観察	35
2-2-4	引っ張り試験	39
2-3	結果と考察	41
2-3-1	脂質の異なるDNA-脂質複合体の評価	41
2-3-2	X線回折測定によるフィルムの構造解析	46
2-3-3	偏光顕微鏡観察によるフィルムの配向度の定量化	57
2-3-4	引っ張り試験によるフィルムの強度解析	60
2-4	総括	64

第3章 DNA配向化フィルムの導電性測定

3-1	緒言	67
3-2	実験方法	69
3-2-1	電導度の算出方法とセル補正	69
3-2-2	DNA-脂質複合体キャストフィルムの 楕形電極上への固定化	70
3-2-3	直流法によるフィルムの電導度測定	72
3-2-4	交流法によるフィルムの電導度測定	73
3-3	結果と考察	74
3-3-1	延伸の効果	74
3-3-2	脂質の違いによる効果	75
3-3-3	電極間隔の効果	76
3-3-4	DNA鎖長の効果	77
3-3-5	交流法による測定結果	78
3-4	総括	81

第4章 DNA配向化フィルムの熱物性と電導度の温度依存性

4-1	緒言	83
4-2	実験方法	85
4-2-1	偏光顕微鏡による配向度の温度依存性の測定	85
4-2-2	DSC測定	86
4-2-3	スペクトル測定	86
4-2-4	粘弾性測定	87
4-2-5	電導度の温度依存性	92
4-3	結果と考察	93

4-3-1	フィルムの配向の温度変化	93
4-3-2	DSC測定によるフィルムの熱的挙動	94
4-3-3	フィルムのUVスペクトル	95
4-3-4	フィルムの動的粘弾性測定	96
4-3-5	常温よりも高温側での導電性	100
4-3-6	常温よりも低温側での導電性	101
4-4	総括	103

第5章 DNA・RNA-脂質複合体キャストフィルムの導電性測定

5-1	緒言	107
5-1-1	RNAの構造的特徴	109
5-1-2	木材資源から大量にとれるRNAの有効利用	111
5-1-3	RNAの機能性材料としての応用	113
5-2	RNA-脂質複合体フィルムの作製とキャラクターゼーション	114
5-2-1	RNAの抽出・精製および評価	114
5-2-2	RNA-脂質複合体の作製	121
5-2-3	RNA-脂質複合体の有機溶媒中での性質	123
5-2-4	RNA-脂質複合体キャストフィルムの作製	126
5-2-5	X線回折測定	127
5-2-6	偏光顕微鏡を用いた配向度の定量化	130
5-2-7	フィルムの配向性の温度変化	132
5-2-8	RNAフィルムの引っ張り試験	133
5-2-9	動的粘弾性測定	134
5-2-10	エチジウムブロマイド水溶液による RNAフィルムの染色実験	135

5-3	DNA・RNA-脂質複合体フィルムの導電性測定	136
5-3-1	実験方法	136
5-3-2	結果と考察	138
5-4	総括	140

第6章 DNA配向化フィルムの導電性におよぼすドーピングの効果

6-1	緒言	143
6-2	実験方法	146
6-2-1	DNA-脂質複合体フィルムへのヨウ素をドーピング	146
6-2-2	水晶発振子によるヨウ素の吸着量の定量	147
6-2-3	ヨウ素のドーピング量を追跡しながらの電導度測定	149
6-2-4	色素をドーブしたDNA-脂質複合体フィルムの作製	151
6-3	結果と考察	152
6-3-1	水晶発振子によるヨウ素吸着量の定量	152
6-3-2	ヨウ素ドーブの濃度効果	154
6-3-3	色素ドーピングの効果	160
6-4	総括	162

第7章 DNAメゾスコピック細線および

DNAナノワイヤの作製とその導電性測定

7-1	緒言	165
7-1-1	ナノテクノロジーにおける分子エレクトロニクス	166
7-1-2	単一分子測定の報告例	167
7-1-3	高分子のメゾスコピック細線	168
7-1-4	DNAナノワイヤの作製	169

7-2	実験方法	170
7-2-1	DNAマイクロワイヤの作製と観察	170
7-2-2	Conducting AFM による電導度測定	171
7-2-3	DNAナノワイヤの作製と観察	172
7-2-4	DNAナノワイヤの電導度測定	174
7-3	結果と考察	175
7-3-1	DNAマイクロワイヤの観察	175
7-3-2	Conducting AFM による電導度測定	179
7-3-3	DNAナノワイヤの観察	180
7-3-4	DNAナノワイヤの電導度測定	182
7-4	総括	188
第8章 結論		193
発表論文		199
学会発表		200

第1章 序論

1-1. 生体高分子の機能性材料としての展開

生体は生命活動を維持するためタンパク質、核酸、糖鎖、脂質膜などの多くの生体高分子を利用している。これら生体高分子は用途によってそれぞれの目的にあった多様な構造を持ち、そのため生体高分子間の情報伝達や反応の制御は非常に巧妙にできている。これら生体高分子の構造と機能を解明するために多く研究がなされてきた。

また生体を模倣した人工系で生体を上回る機能を目指す研究も数多く行われてきた。例えばタンパク質加水分解酵素であるキモトリプシンの活性中心では、アスパラギン酸、ヒスチジン、セリンが反応に関与し、charge-relay-systemを形成している¹⁾。ここに目を付け、ビニル基側鎖の頭部にカルボン酸、イミダゾール基、水酸基等を導入し、ランダム共重合したポリマー内で人工的に charge-relay-system を作り出そうとした例がある²⁾。しかしこの人工酵素は有する高選択性や高反応性までも模倣することはできなかった。

このようにこれまでの生体高分子に対するアプローチでは、その分子が生体中で担っている機能を生体外でそのまま化学的に模倣することやその機能を増幅することに主眼をおいており、実際には天然の生体高分子を超えることはできていない。

そこで本研究ではさらに一步進んで、化学的な改変によって生体高分子の機能や構造を本来の役割とは全く別の用途に応用することを考えた。先述の酵素の例でいえば、本来の触媒反応とは異なる新たな触媒反応として有機溶媒中で逆反応を行わせた例³⁾などがあげ

られる。

この、生体高分子を本来の役割とは別の機能に応用するという考えは古くから人類が自然に行ってきた方法でもある。例えば、植物の骨格を維持する糖鎖であるセルロースを利用して紙を作ったり、カイコが作るポリペプチド繊維である絹から衣類を作るなど多くの例があげられる。このように生体高分子の持つ制御された高次構造やそれにより発現される性質をうまく利用すれば、機能材料としてまだまだ多くの応用の可能性が期待できる。

1-2. DNA の構造的特徴

本研究では「生体高分子を本来の役割とは別の機能性材料として応用する」目的のために DNA を利用する。DNA は 1953 年にワトソンとクリックによってその二重らせん構造と遺伝子としての複製機能が明らかにされた⁴⁾。以来、遺伝子解析やゲノムの利用など遺伝子としての DNA の研究が飛躍的に進み、今日の遺伝子工学や分子生物学の分野の基礎となった。現在までに DNA の生物学的な働き、すなわち遺伝子としての機能や構造に関しては多くの知識が得られている⁵⁾。

このように DNA は本来遺伝を担う物質であるが、その構造に注目してみると非常に特徴的な分子と見なすことができ材料として応用できる可能性がある。図 1-1 に DNA の構造を示す。また DNA を機能性材料として応用する上で注目すべき構造的特徴を表 1-1 にまとめた。

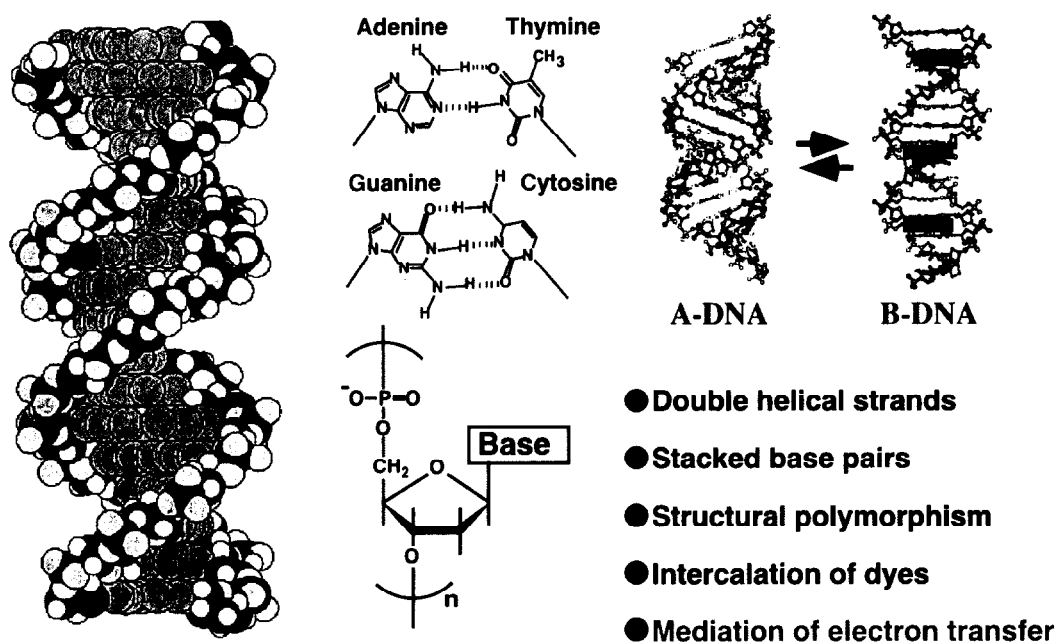


図 1-1. DNA の構造

表1-1 DNAの構造的特徴とその利点

-
- ・ ポリアニオン、水溶性、規則的高次構造、キラリティー
 - ・ 高い認識性とその多様性（相補的水素結合、その他の相互作用）
 - ・ 部位特異的に切断再結合可能（制限酵素）
 - ・ （自己）増殖（PCR）
 - ・ 生体適合性、毒性なし
 - ・ 化学的合成方法が確立されている（固相・液相）
 - ・ 豊富なパイ電子（分光、電気的特性）
 - ・ 物理化学的、生化学的測定方法が確立されている（ T_m 、UV など）
 - ・ 化学的に安定
-

DNA の最大の構造的特徴は相補的な核酸塩基の水素結合によって結ばれた二重らせんである⁶⁾。これは共通の軸にそって2本の長い鎖が反対向きにらせんを巻いている非常に

規則的な高次構造である。核酸塩基対の積み重なり（スタッキング）の間にはある種の芳香族化合物が入り込む（インターカレーション）ことがよく知られている⁷⁾。また DNA は分子量数百万の長い線状の高分子であり、骨格にリン酸アニオンを持っていることから非常に長いポリアニオンととらえることができる。さらに、このポリアニオンを構成するヌクレオチドは糖部分にキラリティーをもつ。このことから不斉を持つ化合物との特異的な相互作用が見いだされる可能性がある⁸⁾。さらに、DNA の核酸塩基は芳香環がスタックしていることから、 π 電子が豊富でしかもその π 電子が規則正しく積み重なったロッド状高分子とも見なせることから、分光学的、電気的特性が期待できる。このような特徴的な高分子構造は人工の合成高分子では作り出すことはできない。

次に、DNA の機能に注目してみると、他の分子に対する高い認識性とその多様性がある。この認識には核酸塩基の相補的水素結合、あるいは骨格部分の溝構造を介したその他の相互作用が含まれる。これらの相互作用の方法を利用してタンパク質、他の核酸、抗生物質などの低分子化合物と相互作用することが知られている⁹⁻¹¹⁾。

DNA を化学的に取り扱う上での特徴をあげてみると、第一に固相法または液相法での化学的合成方法が確立されている^{12,13)}。第二に、UV 吸収測定による二重らせんの融解温度 (T_m) 測定や CD スペクトルによる DNA 構造の解析、ゲル電気泳動による分子量の測定などといった物理化学的、生化学的測定方法が確立されている。第三に、通常の化学的な操作上は十分に安定であり、生化学的に不安定でヌクレアーゼ耐性などの問題がつきものの RNA と比較して安定である。さらに、制限酵素を用いて部位特異的に切断あるいは再

結合が可能である。また、近年盛んに用いられる PCR (Polymerase Chain Reaction) を用いることで DNA を増殖・複製することができる。

以上のように、DNA の特徴的な高分子構造をうまく利用すれば、あらたな機能性材料を生み出せる可能性がある。

1-3. サケ精子由来 DNA の有効利用

DNA 試料を用意する方法として、生体から DNA を抽出してくる方法¹⁴⁾と、ホスホアミダイド法によって化学合成する方法¹⁵⁾がある。前者には大量に採れるという利点と塩基配列は自由に作ることができないという欠点がある。後者では自由に塩基配列を設計できるが材料として応用するためには合成で得られる量が mg オーダーと少ない欠点がある。本研究では材料として DNA を扱うので前者の方法で DNA を用意した。生体由来の DNA はニシンやサケの魚類の精子由来、子ウシ胸腺、λファージなどが市販されている。これらの中で日本では特に北海道で大量のサケが捕獲されており、漁獲量は年間 10 万トン (5000 万匹) にもおよぶ。しかしその流通価格はメスの卵巣 (イクラ) によって決まっておりオスから採れる白子 (精子) は大量の廃棄物として年間 10,000 トンも棄てられている。この白子には大量の DNA が含まれており、年間 1,000 トンにもなる。サケ精子由来の DNA を有効利用して機能性材料にすることができれば新しい機能性材料の産業を生むだけでなく、生物資源の有効利用として環境問題に寄与することができる (図 1-2^{15,16)})。

鮭（さけ） 10万トン(5,000万匹)／年
200億円の漁獲量

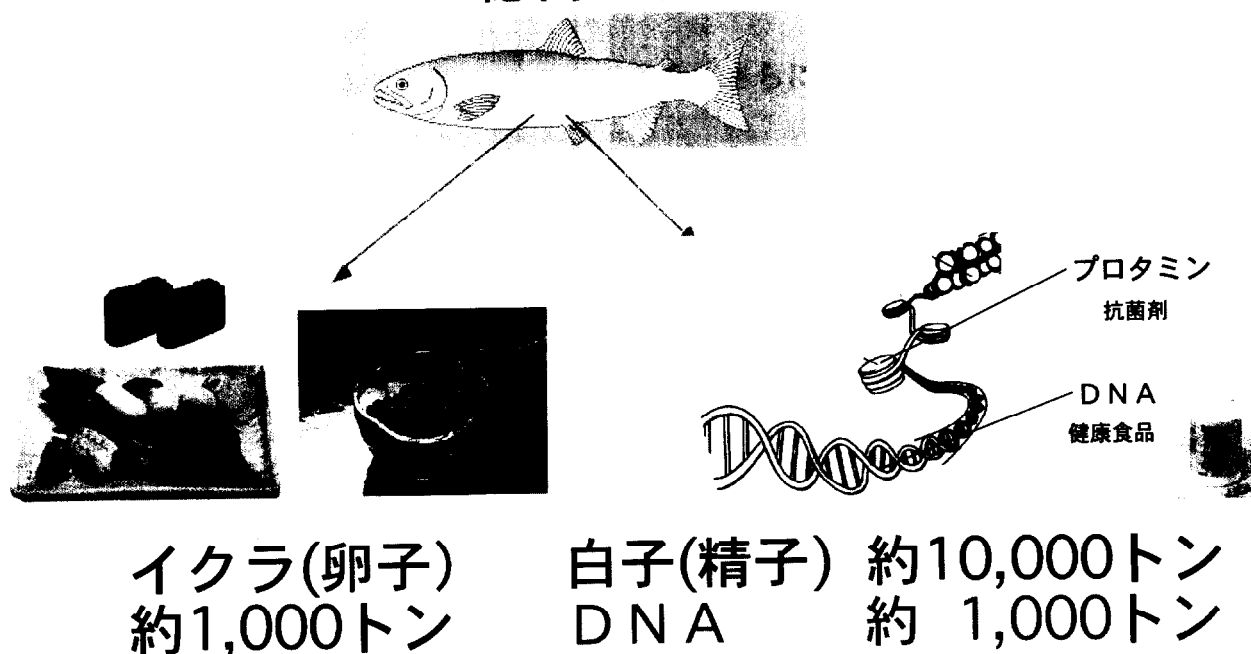


図 1-2. サケから採れる DNA

1-4. DNA の機能性材料としての応用

近年、DNA の構造や機能に着目して材料として用いようとする試みが多数行われている。Seeman らは DNA を超分子ナノ組織体の構築のためのビルディングブロックとして用いて DNA を二次元平面内で規則正しく結晶化するマテリアルとして利用することに成功している（図 1-3a¹⁷⁾）。また大矢らは DNA が制限酵素を用いて自由に切断・再結合でき

ることを利用して一次～三次元の組織体を作るためのビルディングブロックのマテリアルとしての利用を検討している（図 1-3b¹⁸⁾）。

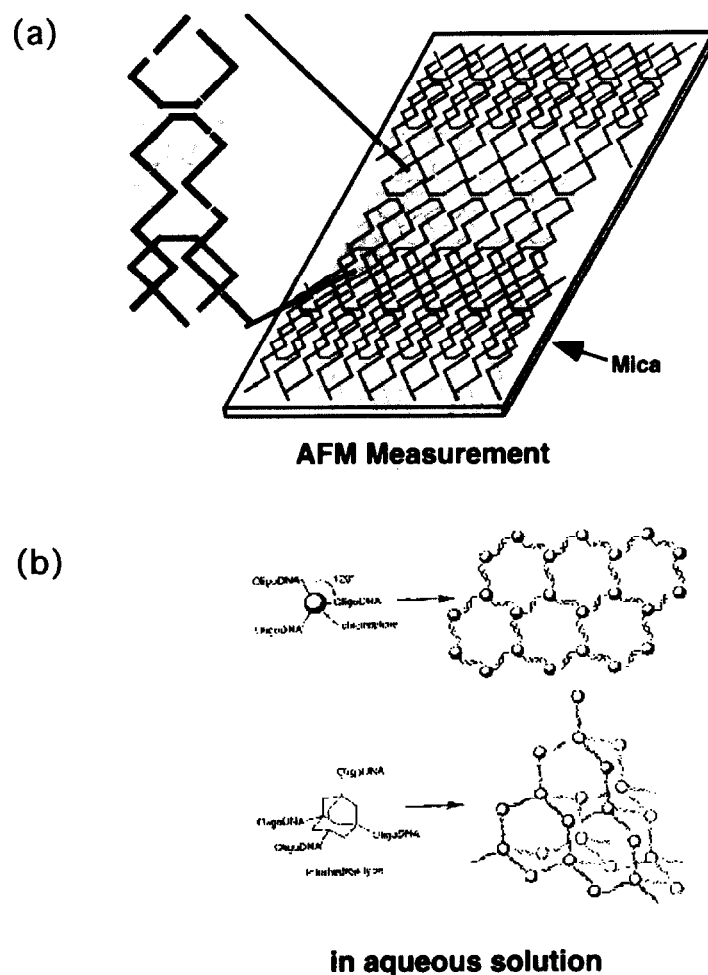


図 1-3. (a) DNA の二次元結晶化⁷⁾、(b) DNA による一次～三次元の組織体⁸⁾

DNA の規則構造とリン酸アニオンを生かして、金属の陽イオンをナノスケールの電極デバイスとして配列させる研究も行われている。Alivisatos らは DNA を利用して金コロイド粒子を精密配列させることに成功している（図 1-4a¹⁹⁾）。また Ben-Yoseph らは一本の DNA を鋳型として銀イオンを結合させ、DNA の長さ分しかない伝導性の微小ワイヤを作ることに成功している（図 1-4b²⁰⁾）。

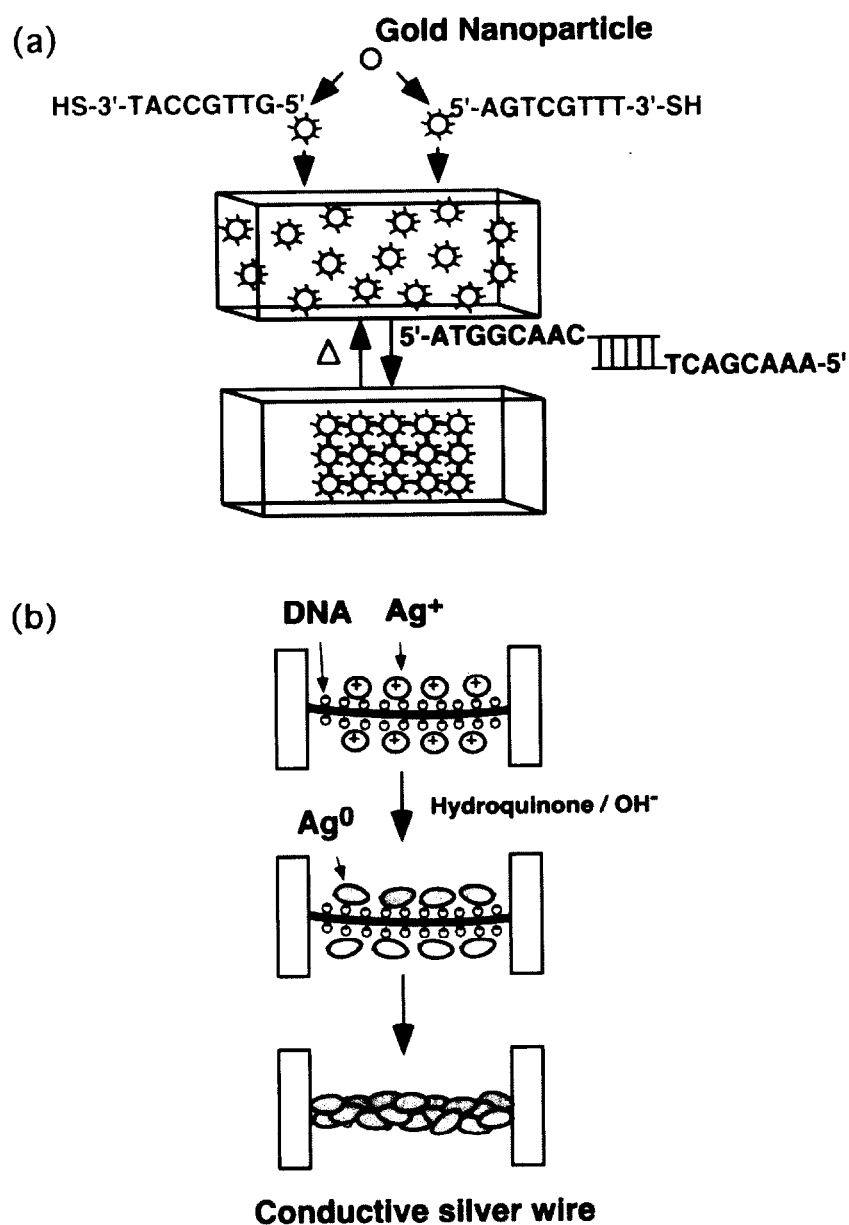


図 1-4. (a) DNA 鎖を結合させた金微粒子の自己集合と加熱による解離¹⁹⁾、(b) DNA を鋳型とした微小銀ワイヤの作製²⁰⁾

一方、DNA の塩基対の重なりをカラム状に π 電子がスタックした構造と見なせることから、DNA 塩基対のカラムの中での電子移動がさかんに議論されている。Barton らは DNA の塩基対間にインターカレートしたドナー分子とアクセプター分子の間で長距離の電荷移動を観察している (図 1-5a²¹⁾)。彼らは π スタックを介した電子移動という意味で " π -way"

と命名した。また居城らは脂質の単分子膜に DNA を並べ、二次元平面上で DNA の電子移動を観察し、分子エレクトロニクス素子としての DNA の可能性を検討している (図 1-5b²²⁾)。

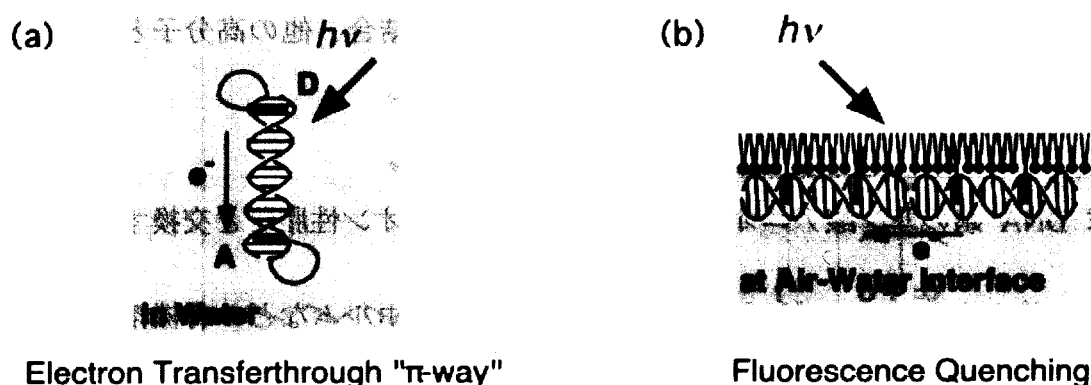


図 1-5. (a) DNA の塩基対の π 電子を介した電子移動²¹⁾, (b) 単分子膜に固定化した DNA での電子移動²²⁾

さらには DNA をコンピュータ素子として応用するという考えも生まれている。Adleman は DNA の 4 種類の核酸塩基からなる特異配列を「演算素子」と見立て、数学的にはいわゆる一筆書き問題の一種である「ハミルトン経路問題」を解くことに成功した²³⁾。彼はこのことから DNA 1 g で CD 3 兆枚もの情報を記憶できると概算し、従来の半導体コンピュータをはるかに上回る超高速計算機になる可能性があるとしている²⁴⁾。

以上のように DNA を材料として用いる試みはますます盛んになっており、あらたな機能を生みせる可能性は大きい。しかしながら、DNA を用いて実際の形を持った機能性材料として応用する研究はこれまでほとんど行われていない。その理由として、第一に天然素材として DNA を取り出すための分離・精製にかかるコストが大きいこと、また化学合

成では材料としての量を確保することが容易でないことがあげられる。第二に、DNA が水溶性で有機溶媒に不溶であるために安定に保持できないことがあげられる。DNA を機能性素材として利用する上ではこれらの弱点を克服しなければならない。そのために考えられる手段としては、DNA の化学修飾、架橋、担体への結合、他の高分子との複合化などが考えられる。

居城らは DNA 鎖のリン酸アニオンの対カチオンをカチオン性脂質と交換することにより水に不溶のポリイオンコンプレックスを作成し、クロロホルムなどの有機溶媒に可溶となることを報告している (図 1-6²⁵⁾)。またこのコンプレックスは有機溶媒に可溶であることから成形性の高さも期待できる。続いて田中はこのコンプレックスを有機溶媒に溶解し、溶媒を静かに蒸発させるキャスト法により DNA 脂質コンプレックスを薄膜化し、さらに延伸することでフィルム中で DNA を配向化することに成功した^{26,27)}。また当研究室の小林はこの配向化 DNA フィルムが無配向のフィルムよりも強度が向上することを示した²⁸⁾。また小林は DNA-脂質複合体 LB 膜をくし形電極に固定化し伝導度を測定したところ、DNA の配向方向に電流が流れやすいことから、DNA-脂質複合体の導電性材料としての可能性を示した²⁹⁾。

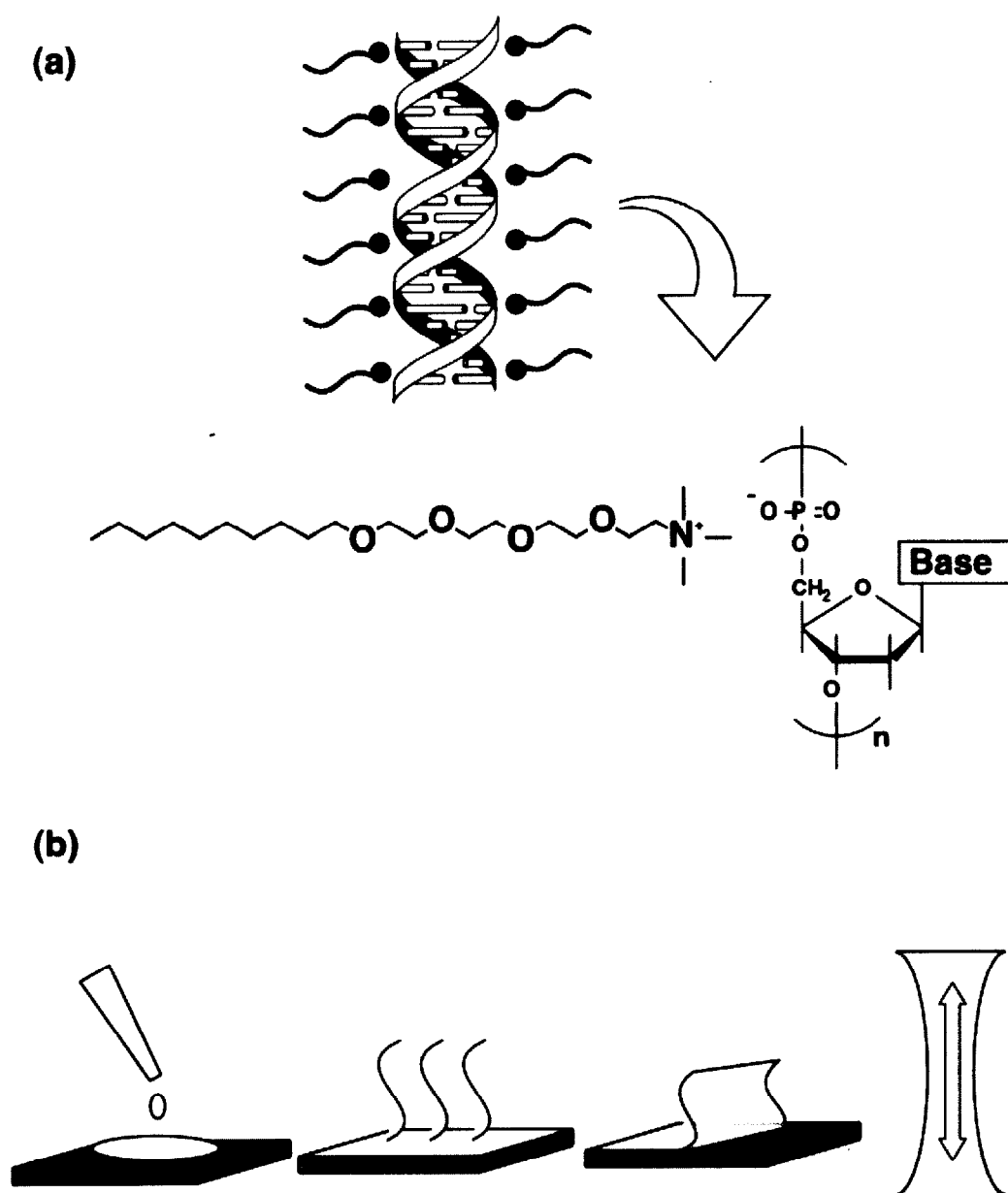


図 1-6. (a) DNA-脂質複合体の構造, (b) キャストフィルム作製の模式図

1-5. 導電性高分子としての DNA

ワトソン・クリック³⁰⁾以後、DNA は遺伝情報を保持し伝える機能を持つ分子であることには疑いがない。ところがここ数年、DNA 二重らせん鎖に沿って電気が流れるか? ということが活発な議論になっている。ポリアセチレン、ポリ *p*-フェニレンなどの π 共役系高分子は導電性を持つことが知られているが³¹⁾、DNA 二重らせん内部の核酸塩基もカラム状に π 電子が積み重なった構造と見なせることから核酸塩基対のスタッキング方向に電子が流れ、DNA が「分子ワイヤ」になるというのである。このことは核酸の構造が決まった 1953 年以後～1960 年代頃から考えられてはいたが³²⁾、定量的な実験は 1980 年後半に入って核酸の自動合成が可能になり、自由な配列をもった DNA を用いて実験が出来るようになってからである。そもそも議論の始まりは Barton たちのグループが 1993 年に *Science* に出した論文である²¹⁾。

1-5-1. DNA 中の導電性メカニズム

Barton らは DNA の塩基対間にインターカレートしたルテニウム (Ru) 錯体 (Electron Donor) とロジウム (Rh) 錯体 (Electron Acceptor) 間を 11 塩基対 (37 Å) 隔てた長距離電子移動を観察した (図 1-7²¹⁾)。彼女らは π スタックを介した電子移動という意味で " π -way" (高速の電子移動なので Highway をもじった) と命名した。DNA の核酸塩基の π スタックがきちんと形成されていれば電子移動は距離に依存しないことから、彼女らは電子

移動が距離に依存しないホッピングによって起こると考えた。

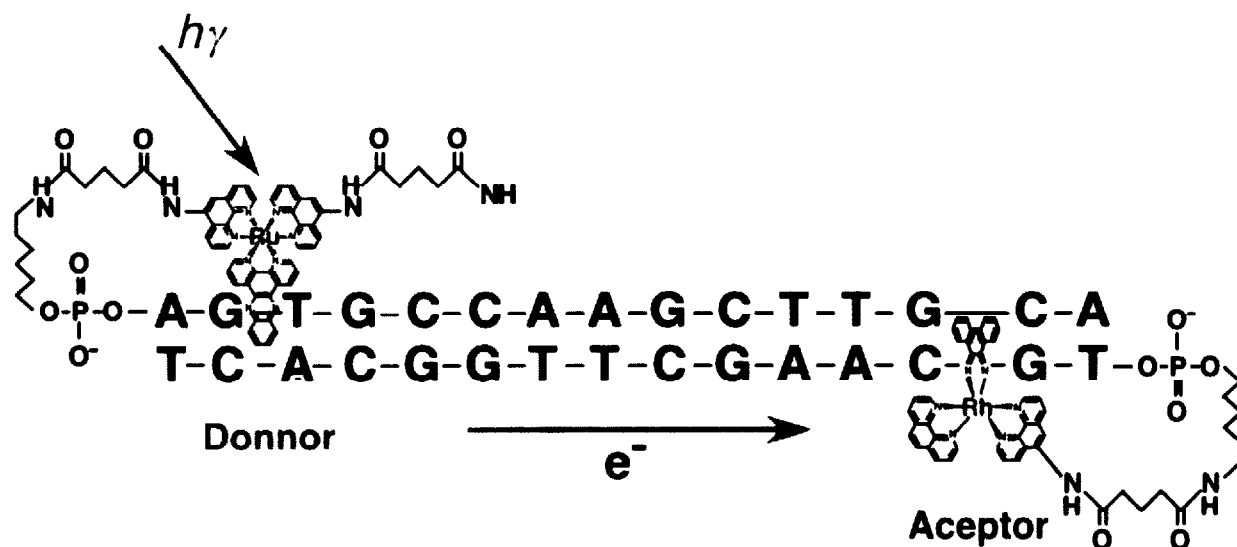


図 1-7. Barton らの実験系²¹⁾。Donnor=Ru, Bridge=DNA, Acceptor=Rh

Barton たちの高速電子移動の結果に対して、電子移動反応を扱っている研究者から多くの疑問が提出された³³⁻³⁷⁾。その多くは Barton たちの電子移動定数が同じ生体物質であるタンパク質の数 100 万倍であること、また通常の有機物質で起こる電子移動は 10 Å で検出限界（減衰してしまう）になるのに対して、40 Å 以上離れた距離でも電子移動が起こっている（距離によって減衰していない）ことを問題視している。距離に依存するかしらないのか、DNA の電子移動について多くの論文で一連の議論が取り上げられた³⁸⁻⁴⁰⁾。

その後 Wasielewski らのグループの実験によって電子移動のメカニズムが一步前進した⁴¹⁾。長距離でも減衰しないのか（肯定派）、短い距離でも距離に依存して電子移動速度が減少するのか（否定派）、がクリアできた。ドナーから橋渡しを伝ってアクセプターへ電子移動する Donor→Bridge→Acceptor (DBA) 系では 2 つの経路が考えられてきた (図 1-8³⁹⁾)。

これまでは経路 I (否定派) と経路 II (肯定派) のどちらが正しいかという議論だったが、Wasielowski らによって短距離でのトンネリング (経路 I)、長距離でのホッピング (経路 II) の 2 つの経路が混在するということが示された⁴¹⁾。この長距離での経路こそがまさに Barton らのいうところの DNA が分子ワイヤとして機能しているところである。

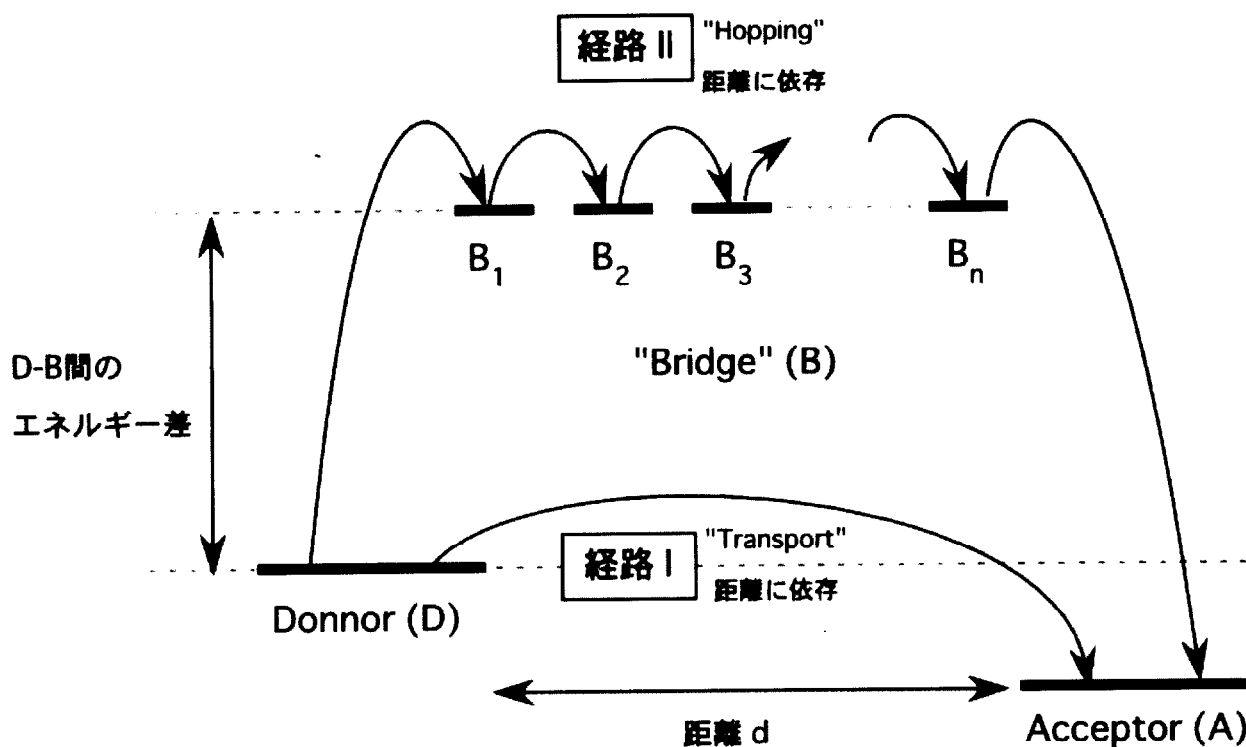


図 1-8. DNA 中での電子移動を説明する 2 つの経路³⁹⁾

ところで、そもそも DNA の電子移動能を確かめるためにはどうしても Donor (D) と Acceptor (A) が必要だった。実験系によって数値が異なるのもこのことが一因だった。DNA を分子ワイヤとして見なすのであれば、D や A が排除された系で DNA そのものの電導性を測る必要がある。この点を明らかにするため、Giese らのグループは電子を引き抜かれ

やすい(酸化が起こる)グアニン塩基(G)に注目し、Gのラジカルカチオン($G^{+\cdot}$) (Donor) から GGG ユニット (Acceptor) への電子移動(ここでは Hole/Charge Transfer といっている)を観察した⁴²⁾。結果、G (D) と GGG (A) の間にブリッジとなる G が含まれない場合の電子移動速度定数 k_{CT} は距離が 1 塩基分増えるごとに一桁ずつ減衰し、一方 G (D) と GGG (A) の間にブリッジとなる G が含まれる場合は電子移動速度定数 k_{CT} が一定であることから、 $G^{+\cdot}$ がもっとも隣接した G にランダムにホッピングして電子移動が起きているとしている。以上のことから、近距離に G 塩基があれば、距離に依存したトンネリングではなく、長距離電子移動はホッピングでおけると結論している(図 1-9)。

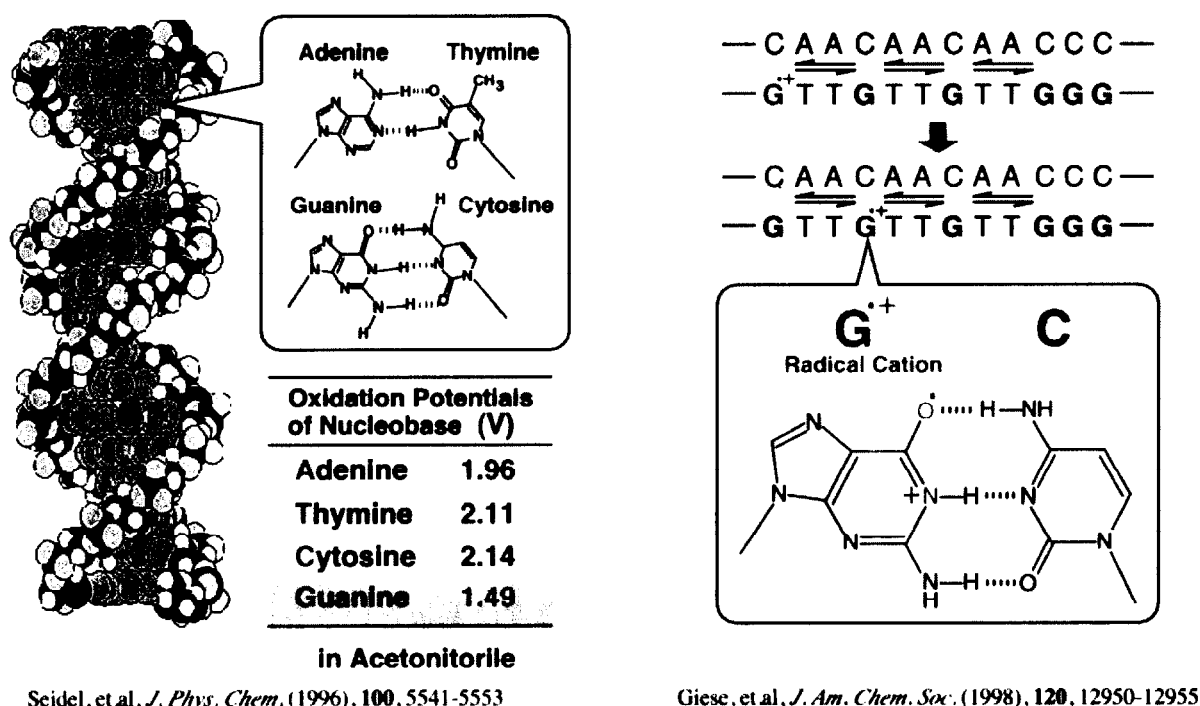


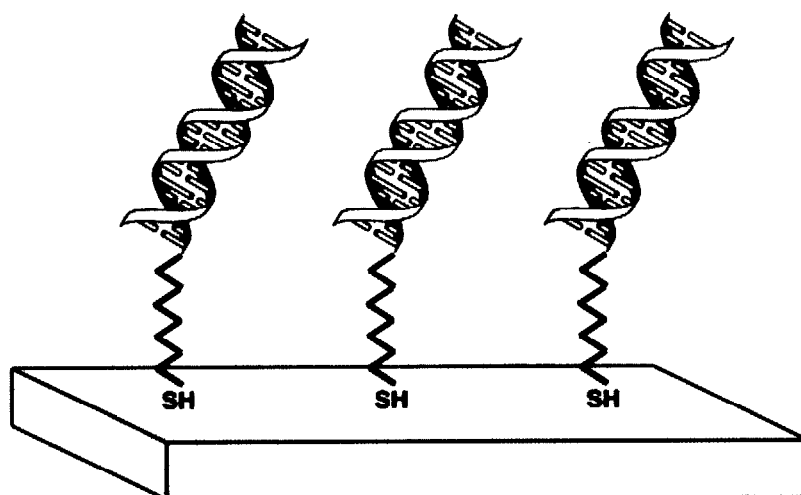
図 1-9. DNA 分子内での電子移動のメカニズム⁴²⁾

これらの研究によって、G 塩基の間でのみ、効率の良いホッピングが起きるとすれば Barton の長距離電子移動が説明できる。また Barton たちの論文で長距離の電子移動が起こる、としていた結果では常に G 塩基がちょうど良い距離で配置（およそ 2 塩基ごと）されたものだった⁴³⁻⁴⁶⁾。

1-5-2. DNA を用いた導電性材料

前節で述べた研究はいずれも DNA が溶液中（Native な状態）にあるとき、どれくらいの距離まで、どのようなメカニズムで電子が流れるのかが論点だった。次に実際に DNA を電子が流れる“wire”として用いることを考えると、Native な状態ではなく何らかの形で固定化（固体化）して材料として他の素材のように人工物として扱えるようにする必要がある。固定化（固体化）の方法の最も簡単な手法は、DNA を金基板に固定化する方法があげられる^{47,48)}。この方法では DNA の末端を金と相互作用する SH 基で修飾して金の基板に固定している。さらにサイクリックボルタンメトリーを用いて基板上での酸化還元能が調べられている^{49,50)}（図 1-10）。

しかし実際に DNA が確実に基板から「立った」一層の単分子膜を形成するという保証がないことと、実際の金基板上の DNA の電導度は基板という界面を用いているために導電性材料としての通常の電導度を求めることができていない。

図 1-10. 金基板への DNA の固定化⁴⁹⁾

そこで水溶液中でも基板上でもなく、固体としての DNA の電導度を直接測ることが求められるが、この例はこれまでに 2 例しか報告されていない (図 1-11)。Dekker らは、すべて G 塩基と C 塩基からなる(dG)-(dC) 30 bp のごく薄い水溶液を乾燥させた約 8 nm の微小ワイヤを作って直接電流を検出した⁵¹⁾。印加電圧を変化させるとある電圧で急激に応答電流が増大する I - V 曲線を示すことから、DNA は「バンドギャップを持つ半導体挙動を示す」と述べている。一方 Fink らは数本の束になった λ DNA のロープを作って先の尖ったチップの先で直接電流を検出したところ、直線的な I - V 曲線が得られ、DNA は「品質の良い半導体と同等の導電性を持つ」と結論した⁵²⁾。両者によって得られた導電性は一方ではバンドギャップを持ち、もう一方ではオーミックである。このように固体としての DNA の導電性測定は非常に微細な系で行わなければならない、測定方法による誤差が見られ、DNA そのものの導電性の評価は確定したとは言えないのが現状である。

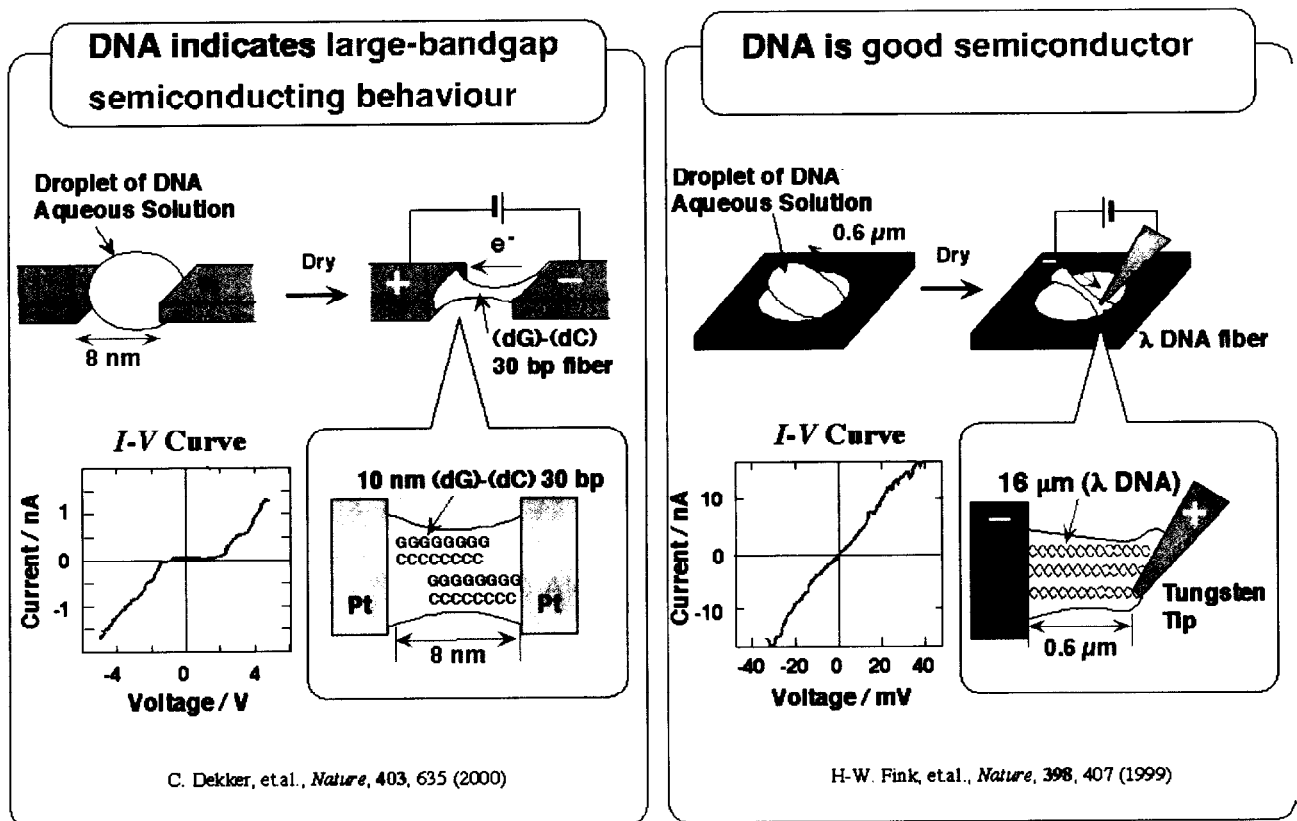


図 1-11. Native DNA の微小ファイバーを用いた電導度の直接測定 ^{51,52)}

1-6. 本論文の目的

1-5 で述べたように、Barton らの報告によって、ドナーとアクセプターを組み込んだ水溶液中の Native DNA に電気が流れる可能性が指摘された ^{21,43-46)}。また Dekker のグループと Fink らのグループによって Native DNA の水溶液を乾燥させた非常に短い DNA 繊維を直接的に電導度を測ったという報告がなされている ^{51,52)}。

これらの実験は DNA を「分子電線」として用いることができる可能性を示しているが、Barton らは水溶液中での実験、Dekker、Fink らの実験は微小な DNA 繊維と、非常に小さいスケールであるため実際に導電性材料として応用するには困難である。またこれらの実験系では DNA そのものの導電性が測定方法によって差があり、未だ確定していない。

そこで本研究では DNA を手に持てる大きさのフィルムとして、このフィルムの導電性を評価した (図 1-12)。フィルムの作製には DNA をカチオン性脂質との複合体として有機溶媒に可溶化させるキャスト法を用いた。導電性の評価にはフィルムを延伸して DNA 鎖を一方向に配向させ、くし形電極に固定化して DNA の方向に応じた導電性測定を行った。具体的には、まず DNA-脂質複合体フィルムの内部構造や熱的な物性の評価を行った。次に DNA の配向方向、DNA 鎖長、DNA を複合疎水化する脂質の構造などの違いがフィルムの導電性にどのように影響するか検討した。また DNA-脂質複合体フィルムの導電性が電子伝導かイオン伝導かのメカニズムについての検討を行った。さらにフィルムの熱的な物性やヨウ素、色素などのドーパントが電導度に与える影響について検討を行った。

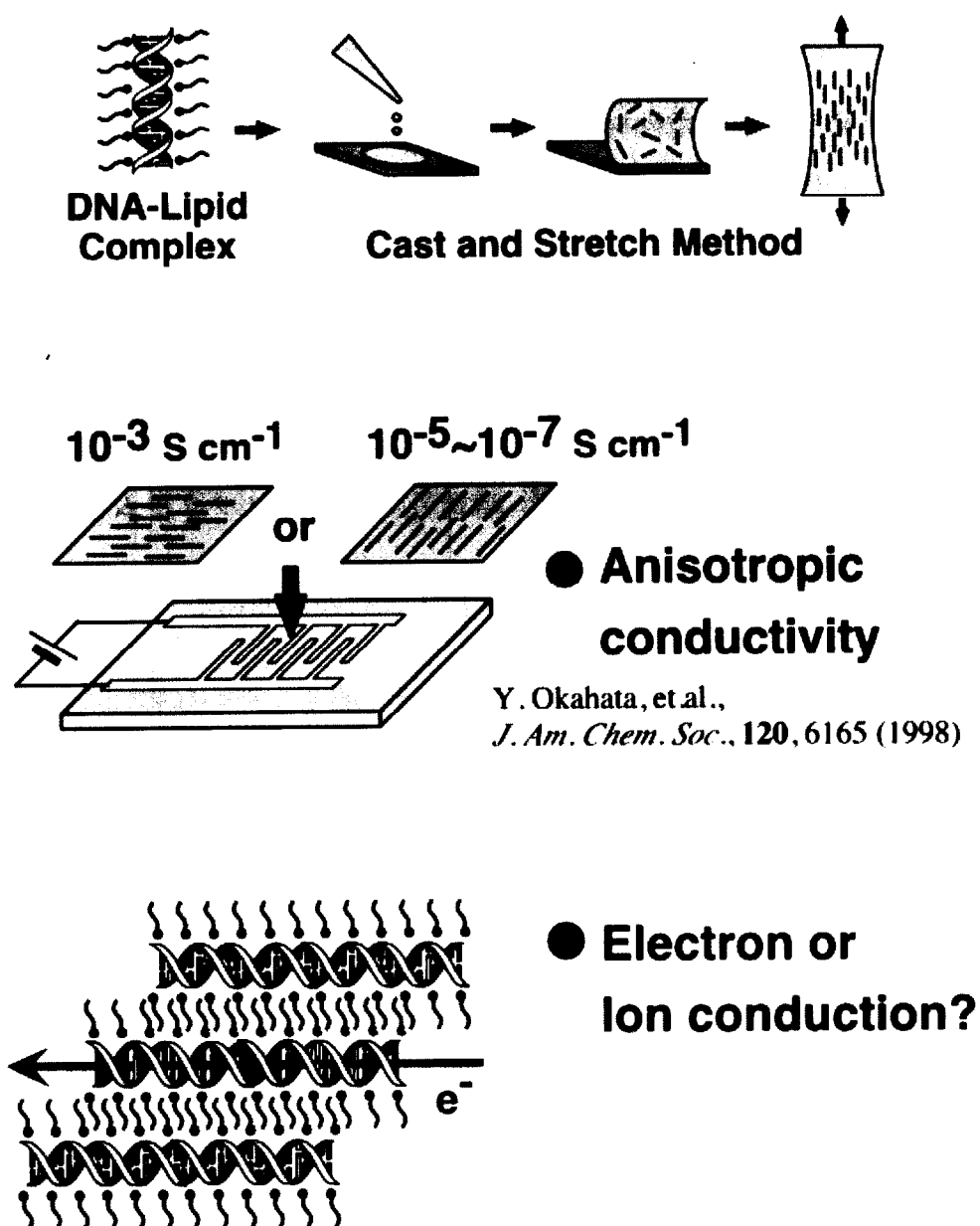


図 1-12. 本研究の概要

すなわち本論文では、DNA-脂質複合体フィルムの構造や物性、について詳しく解析し、さらには DNA を導電性の機能性材料として応用することを目的とした。本論文は以下の章で構成されている。

「第2章」では、DNA 配向化フィルムを作成し、その内部構造および物性評価について述べる。

「第3章」では、DNA 配向化フィルムの電導度を直流法と交流法を用いて行い、DNA 鎖に沿った導電性について議論する。

「第4章」では、DNA 配向化フィルムの電導度の温度依存性について議論する。

「第5章」では、多様な構造を持ちうる RNA を混合した DNA-脂質複合体フィルムの電導度について議論する。

「第6章」では、DNA 配向化フィルムにヨウ素や色素をドーピングをした際の電導度の測定を行い、ドーパントの効果について議論する。

「第7章」では、キャストフィルムよりもミクロな系の電導度を測定するため、DNA-脂質複合体のメゾスコピック細線および DNA を脂質単分子膜に固定した DNA 配向化単分子膜の電導度について議論する。

「第8章」では、全体の結果を総括し、DNA 配向化フィルムの今後の応用について展望する。

第1章 参考文献

- 1) P. F. Leadlay, “酵素化学入門”, 丸善株式会社 (1981)
- 2) T. Kunitake, Y. Okahata, and T. Sakamoto, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 7799 (1976)
- 3) T. Kunitake and Y. Okahata, *Adv. Polymer Sci.*, **20**, 159 (1976)
- 4) J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nature*, **171**, 737 (1953)
- 5) W. Zenger, “核酸構造”, シュプリンガー・フェアラーク東京 (1987)
- 6) L. Stryer, “生化学”, バイオメディクス (1991)
- 7) (a) M. J. Waring, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 159 (1981)
(b) 坪井正道, 現代科学, **9**, 56 (1995)
- 8) 和田健介, 菅原紀充, 井上佳久, バイオ・高分子シンポジウム予稿集, **8**, 31 (1998)
- 9) T. E. Ellenberger, *Cell*, **71**, 1123 (1992)
- 10) 中山元, 卒業論文, 東京工業大学 (1996)
- 11) 神鳥成弘, 田草川房夫, 蛋白質核酸酵素, **38**, 957 (1993)
- 12) M. H. Caruthers, *Science*, **230**, 281 (1985)
- 13) K. Itakura, J. J. Rossi, and R. B. Wallace, *Annu. Rev. biochem.*, **53**, 323 (1984)
- 14) 新生化学実験講座 核酸 I 分離精製, 日本生化学会, (1991)
- 15) (a) 岡畑 恵雄, 中山 元, 日刊工業新聞, 1999 年 10 月 5 日
(b) 岡畑 恵雄, 中山 元, 朝日新聞, 2000 年 6 月 2 日

- 16) (a) 西 則雄, 核酸ミクロシンポジウム要旨集, 98-1, 17 (1998)
 (b) 保住 健太郎, 岩田 一道, 坂入 信夫, 西 則雄, バイオ・高分子シンポジウム予稿集, 8, 67 (1998)
- 17) (a) E. Winfree, F. Liu, L. A. Wenzler, and N. C. Seeman, *Nature*, **394**, 539 (1998)
 (b) T-J. Fu and N. C. Seeman, *Biochemistry*, **32**, 3211 (1993)
- 18) 大矢裕一, 核酸ミクロシンポジウム要旨集, 98-1, 3 (1998)
- 19) C. A. Markin, R. L. Letsinger, R. C. Mucic and J. J. Storhoff., *Nature*, **382**, 607 (1996)
- 20) E. Braun, Y. Eichen, U. Sivan and G. Ben-Yoseph, *Nature*, **391**, 775 (1998)
- 21) C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, and J. K. Barton, *Science*, **262**, 1025 (1993)
- 22) (a) *Polymer Preprints, Japan* **70**, 877-878 (1996)
 (b) 深澤忠, 長谷部清, 池田俊明, 居城邦治, 下村政嗣, バイオ・高分子シンポジウム予稿集, 8, 3 (1998)
- 23) L. M. Adleman, *Science*, **266**, 1021 (1994)
- 24) L. M. Adleman, 日経サイエンス, **11**, 20 (1998)
- 25) K. Ijiro and Y. Okahata, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1339 (1992)
- 26) K. Tanaka and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10679 (1996)
- 27) 田中健太郎, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
- 28) 小林琢也, 修士論文, 東京工業大学 (1996)
- 29) Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka and M. Shimomura, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 6165

(1998)

- 30) Watson, J. D & Crick, F. H, *Nature*, **171**, 737-738 (1953)
- 31) 田中一義, 高分子の電子論, 共立出版 (1994)
- 32) R. A. Marcus, *J. Phys. Chem.*, **24**, 966 (1954,)
- 33) S. Priyadarshy, S. M. Risser, and D. N. Beratan, *J. Phys. Chem.*, **100**, 17678 (1996)
- 34) E. J. C. Olson, D. Hu, A. Hormann, and P. F. Barbara, *J. Phys. Chem. B*, **100**, 17678 (1996)
- 35) A. M. Brun and A. Harriman, *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 10383 (1994)
- 36) K. Fukui and K. Tanaka, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 175 (1998)
- 37) F. D. Lewis, T. Wu, Y. Zhang, R. L. Letsinger, S. R. Greenfield, and M. R. Wasielewski,
Science, **277**, 673 (1997)
- 38) *Science*, **275**, 1420 (1997)
- 39) *J. Chem, Eng. News*, JULY **27**, 51-54 (1998)
- 40) 化学, **53**, No. 9, 36 (1998)
- 41) W. B. Davis, W. A. Svec, M. A. Ratner, and M. R. Wasielewski, *Nature*, **396**, 60 (1998)
- 42) E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, and B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12950 (1998)
- 43) D. B. Hall and J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 5045 (1997)
- 44) M. R. Arkin, E. D. A. Stemp, R.E. Holmlin, J. K. Barton, A. Hormann, E. J. C. Olson, P. F.
Barbara, *Science*, **273**, 475 (1996)
- 45) S. O. Kelley, R.E. Holmlin, E. D. A. Stemp, J. K. Barton, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 9861

(1997)

- 46) R.E. Holmlin, P. J. Dandliker, J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.* **36**, 2714 (1997)
- 47) R. Levicky, T. M. Herne, M.J. Tarlov, and S. K. Satija, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9787 (1998)
- 48) S. O. Kelley, J. K. Barton, N. M. Jackson, L. McPherson, A. Potter, E. M. Spain, M. J. Allen, and M.G. Hill, *Langmuir*, **14**, 6781 (1998)
- 49) S. O. Kelley, N. M. Jackson, M.G. Hill, and J. K. Barton, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, No. 7, 941-945 (1999)
- 50) G. Hartwich, D. J. Caruana, T. de Lumley-Woodyear, Y. Wu, C. N. Campbell, and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 10803-10812 (1999)
- 51) D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, and C. Dekker, *Nature*, **403**, 635 (2000)
- 52) H-W. Fink and C. Schonenberger, *Nature*, **398**, 407-410 (1999)

第2章 DNA 配向化フィルムのキャラクタリゼーション

2-1. 緒言

これまで当研究室では水に可溶な DNA を疎水的な脂質分子で複合疎水化することにより、水に不溶でクロロホルムなどの有機溶媒に可溶となる DNA-脂質複合体を作製し、この有機溶媒溶液をキャスト法によってフィルム化することを見いだしてきた¹⁾。DNA のリン酸アニオンに対して等モルの、頭部に 4 級アンモニウム塩を持つカチオン性の脂質化合物を用いて静電的相互作用によって DNA を複合化してきた。さらに DNA-脂質複合体フィルムの内部構造について検討が行われ、フィルム内で DNA が二重らせん構造を維持する場合、フィルム中で DNA-脂質複合体のロッドがヘキサゴナルにパッキングした構造をとることが見いだされた²⁻⁴⁾。ヘキサゴナル構造を形成するためには、構造が柔らかく会合しにくい脂質を用いると良いことが分かった。また透明な自己支持性の DNA-脂質複合体フィルムを得るための脂質としても、アルキル鎖同士が会合しにくいものが適しているということがわかってきた⁵⁾。

しかしこれらの結果では DNA-脂質複合体フィルムを作製するにあたっての大まかな傾向としてどのような脂質が適しているかを示したにすぎず、脂質構造のより詳細な検討が行われていなかった。

本章ではまず、DNA 配向化フィルムを作製するために用いる脂質の構造を詳細に議論するため、脂質の頭部、脂質のアルキル鎖の本数、アルキル鎖長の数、アルキル鎖の柔らかさ（会合のしにくさ）について検討した。次にそれぞれの脂質で作製した DNA 配向化フィルムの常温でのキャラクタリゼーションを行った。具体的には、

フィルムの内部構造やフィルムの延伸による DNA 鎖の配向度を定量化した。また実際のフィルムの力学的強度についても検討した。

DNA 配向化フィルムは延伸によってフィルム中の DNA 鎖を配向させることができ、このときフィルムは異方性を持つ。これまで X 線構造解析によって定性的にそのことがわかっていたが、フィルムの異方性についての定量的な評価はなされていなかった。本章では偏光顕微鏡を用いて常温での DNA 配向化フィルムの異方性の大きさを定量的に評価する。この顕微鏡からは試料の複屈折の値が求められ、複屈折の値は試料の異方性の大きさに対応するから、これにより試料の異方性の大きさを定量的に評価することが可能である⁶⁾。

また、DNA-脂質複合体フィルムの強度については、これまでに動的粘弾性の測定によって検討が行われている^{4,5)}。しかしこの測定は熱をかけながらフィルムに振動を与えて引っ張る方法なため、熱的な物性と力学的な要素をわけて考えることができなかった。そこでもっとシンプルな測定方法として、常温のままフィルムに応力かける引張り試験を行うことにした。この測定方法は高分子フィルムや繊維などについて広く行われている強度試験の一種で、小さな外力から破壊するまでの大きな外力に対する材料の力学的応答性を調べるものである。

2-2. 実験方法

2-2-1. DNA-脂質複合体およびキャストフィルムの作製

本研究で用いた DNA はサケ精子由来であり、(株)ニチロから提供していただいたものである。DNA の精製方法を図 2-1 に示した。二通りの精製方法を行った。一方はマイルドな条件で DNA を本来の長さからなるべく切断しない状態で高分子量の DNA を取り出す方法と、もう一方は多少 DNA の切断がおこっても簡略に低分子量の DNA を精製できる方法である。

高分子 DNA を得る方法では、サケの白子をホモジナイザーで粉碎し、水で希釈した。これに 2 M NaCl を加え、さらにアニオン性界面活性剤である SDS を加えてカチオン性タンパク質（プロタミンなど）を沈澱させた。これを遠心分離し、上ずみ液にエタノールを加えて DNA を沈澱させ、凍結乾燥することにより繊維状の DNA を得た。

低分子 DNA を得る方法では、サケの白子の粉碎水溶液に 1 N HCl を加えて DNA を一部加水分解し、さらにプロテアーゼを加えてプロタミンを加水分解し、粉末状の DNA をエタノール沈澱により分離した。アガロースゲル電気泳動により、各々の DNA の分子量は約 30,000 bp と約 500 bp であることがわかった。この 2 種類の DNA を用いて DNA-脂質複合体の作製を行った。

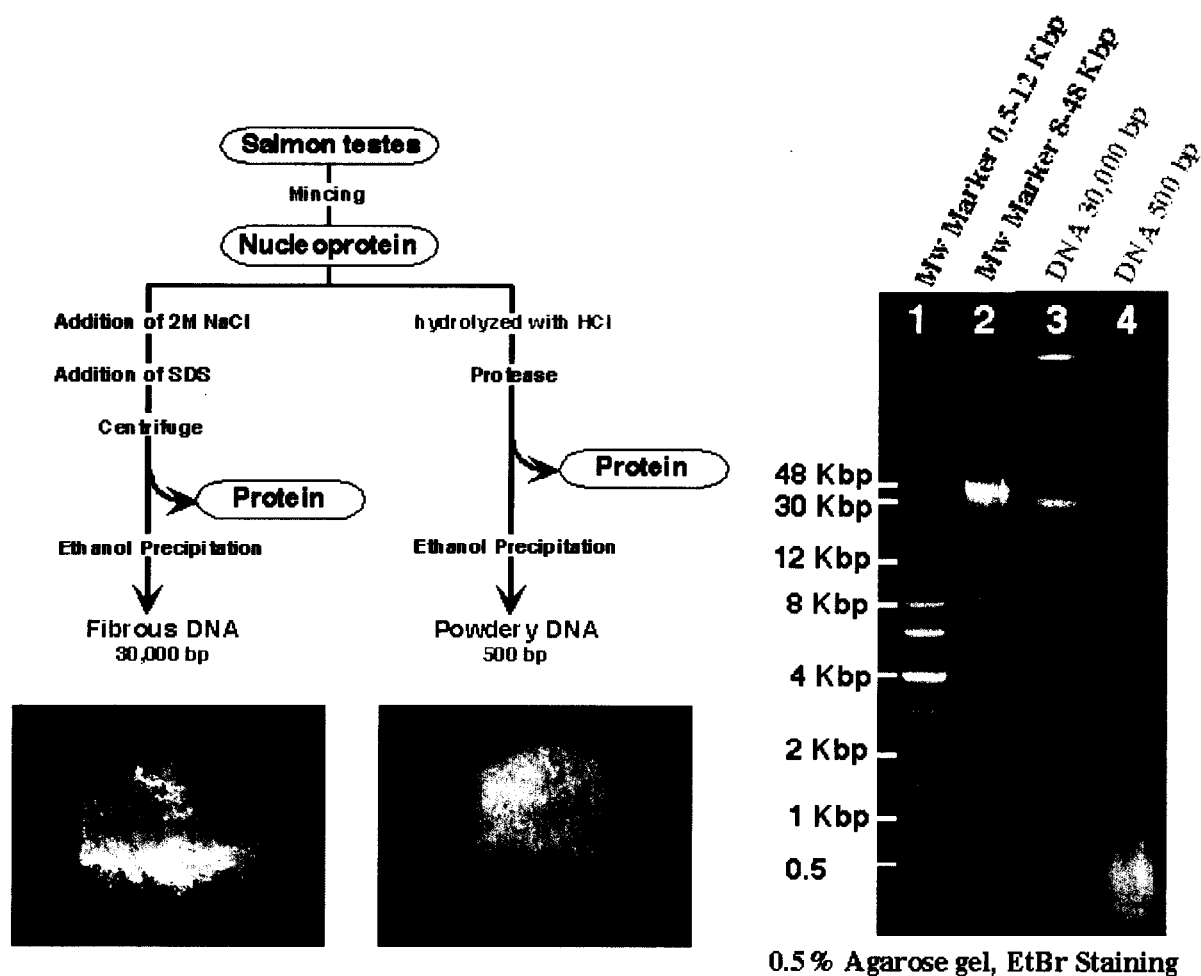


図 2-1. DNA の分離精製方法と DNA の分子量

DNA-脂質複合体の作製方法を以下に述べる (図 2-2)。

30,000 bp または 500 bp のサケ精子由来 DNA (分子量 660 bp^{-1}) 250 mg を 25 ml の水に溶解した。この DNA 水溶液を氷冷攪拌下、カチオン性脂質 (DNA のリン酸アニオンに対して脂質のカチオンが 1.1 当量になるように計算) の水溶液に加えると、直ちに白色の沈殿が生じた。そのまま数分間氷冷攪拌後、遠心分離 (3000 rpm、5 分間) により沈殿を回収し、ジエチルエーテルで 2 回洗浄したのち真空乾燥して白色繊維状 (30,000 bp) または白色粉末 (500 bp) の DNA-脂質複合体を得た。

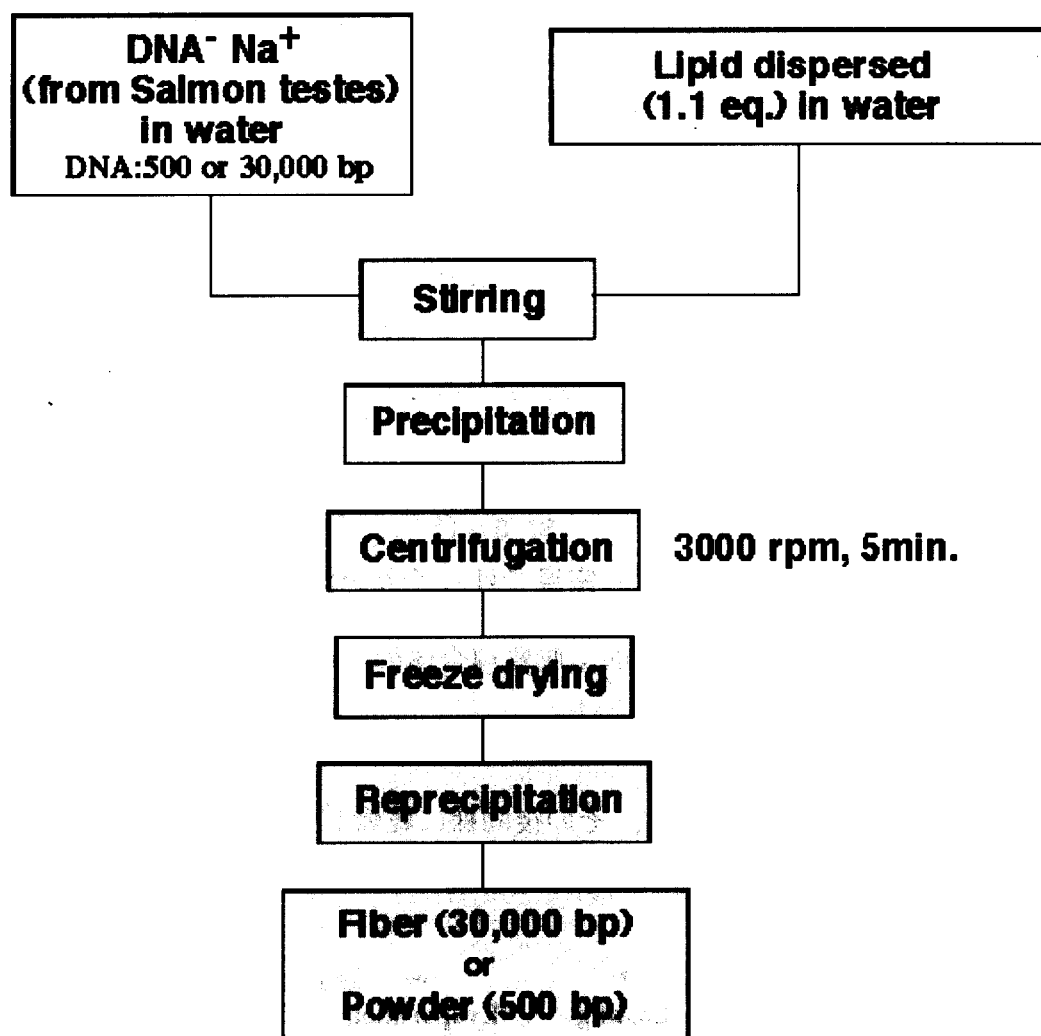


図 2-2. DNA-脂質複合体の作製方法

本章で用いた脂質化合物の略称とその構造を表 2-1 に示す。具体的には、アルキル鎖の本数が一本鎖、二本鎖、三本鎖のものを用いた。それぞれの頭部が 4 級アンモニウム塩や 1 級アミンと異なるものを用い、DNA のリン酸アニオンとの相互作用に違いが出るか検討した。またアルキル鎖の長さや構造を変えることで DNA-脂質複合体の出来具合、有機溶媒への溶解性、フィルムにした際の物性の違いを検討した。またアルキル鎖の柔らかさ（会合しにくさ）を変えるため、炭素のみからなる直鎖

だけでなく、エーテル結合を含むものや枝分かれを持つフィトール型やポリジメチルシロキサンについても検討した。全ての脂質は当研究室でこれまでに合成されたか、通常の試薬として購入したものをそのまま用いた。

図 2-3 に DNA-脂質複合体のキャストフィルムの作製方法を示した。DNA (500 bp)-脂質複合体 25 mg をクロロホルム / エタノール (4 : 1, vol./vol) 1 ml に完全に溶解した。(a) この溶液をテフロンプレート (3×1.5 cm) 1 枚に滴下し、(b) ガラスシャーレ中で溶媒飽和蒸気下に静置し室温でゆっくりと溶媒を蒸発させた。(c) 乾燥後テフロンプレートからはがし、DNA-脂質複合体のキャストフィルムを得た。(d) キャストフィルムをお湯の入った容器の上で水蒸気にさらし、数秒～数十秒間エージングした後、フィルムを延伸した。その後同様に乾燥して延伸フィルムを得た。

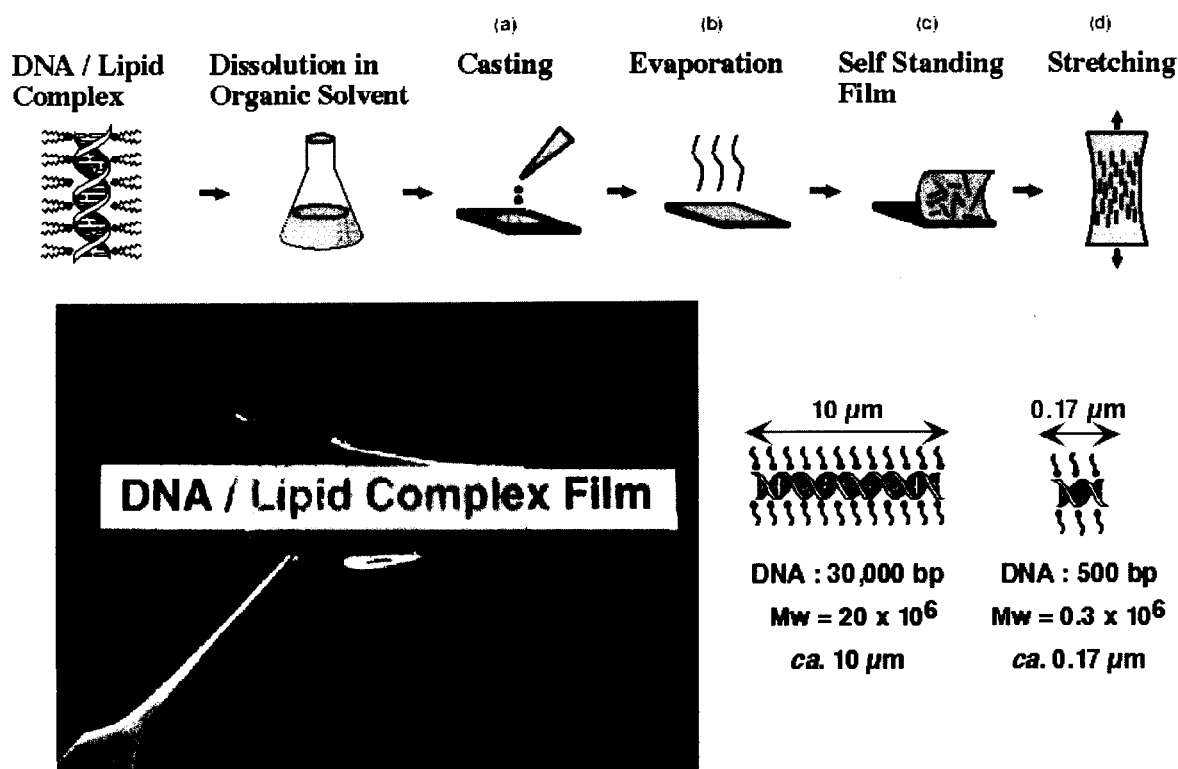
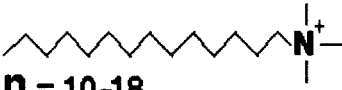
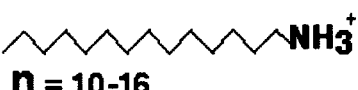
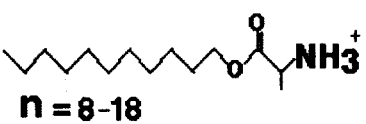
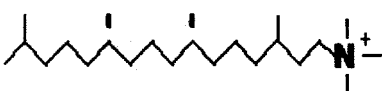
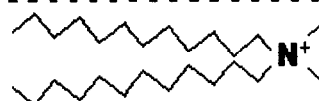
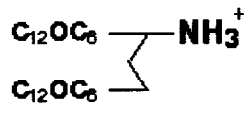
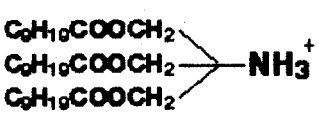


図 2-3. DNA-脂質複合体キャストフィルムの作製法

表 2-1. 本研究で用いた脂質の構造

Lipids		
一本鎖4級アンモニウム型	 $n = 10-18$	C_n-N^+-3C1
一本鎖1級アミン型	 $n = 10-16$	$C_n-NH_3^+$
一本鎖アラニン型	 $n = 8-18$	$C_n-Ala-NH_3^+$
一本鎖エーテル型	 $n = 10-18$	$C_{10-4G}-N^+$
一本鎖フィトール型	 $n = 10-18$	$Phy-N^+$
ポリジメチルシロキサン	$NH_2(CH_2)_3 \left(\begin{array}{c} \\ Si-O \\ \end{array} \right)_{14-15} \begin{array}{c} \\ Si \\ \end{array} (CH_2)_3-NH_3^+$	
二本鎖4級アンモニウム型	 $n = 10-18$	$2C_n-N^+-2C1$
二本鎖1級アミン型 (エーテル結合含有)	 $n = 10-18$	
三本鎖4級アンモニウム型	 $n = 8, 12$	$3C_n-N^+-C1$
三本鎖3級アミン型	 $n = 8-12$	$3C_n-NH^+$
三本鎖1級アミン型 (前章での合成品)	 $n = 8-12$	

2-2-2. X線回折測定

キャストフィルムのX線回折測定は、R-AXIS 4 広角透過型X線回折装置（理学電機製）を用いてイメージングプレート上に記録した。

未延伸または延伸したフィルムを自作したフィルム固定装置（図 2-4a）に取り付け、x, y, z の3方向からX線ビームを照射してそれぞれの角度からの回折パターンを解析した。装置の概略を図 2-4b に示す。カメラ長は 150 mm でX線管球の電圧と電流はそれぞれ 50 kV と 80 mA とし、CuK α 線（ $\lambda=1.54182$ nm）を用いて測定した。

X線の照射時間は3分間とした。

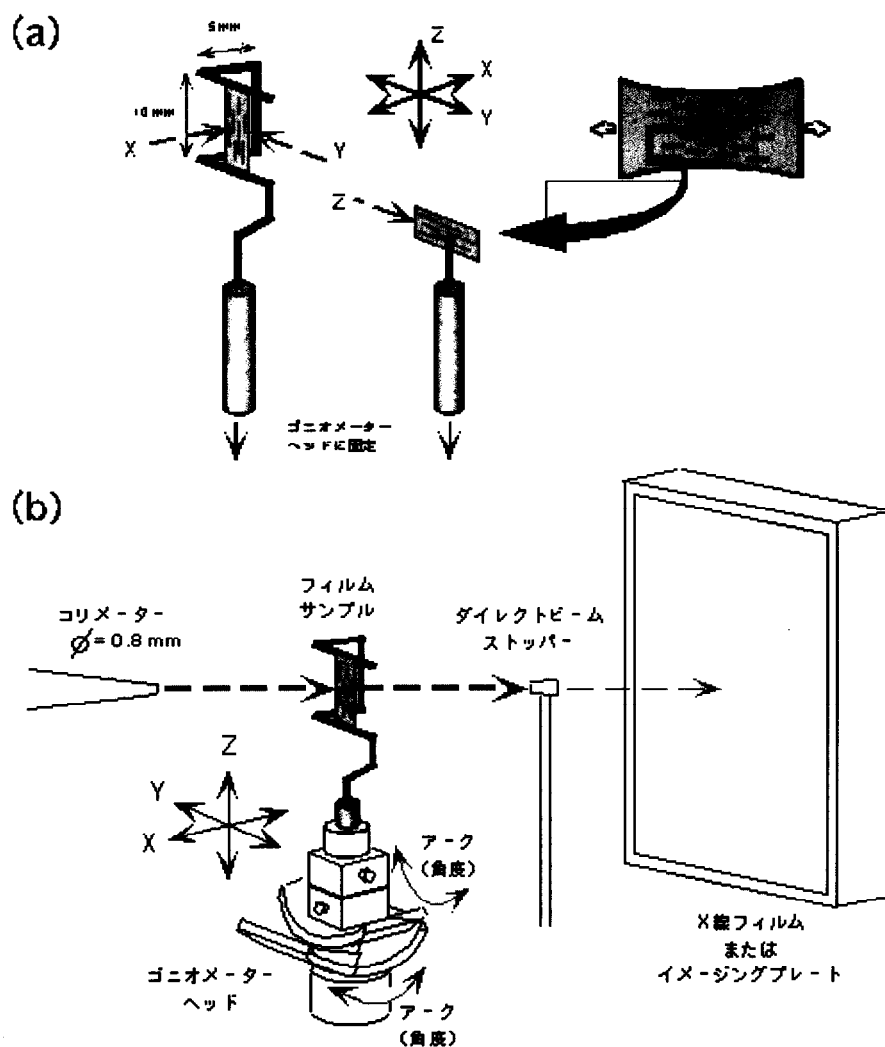


図 2-4. フィルムの固定化方法 (a)とX線回折測定装置の概略 (b)

2-2-3. 偏光顕微鏡観察

偏光顕微鏡は偏光を使って試料の光学的性質を調べるための特殊な顕微鏡である。

簡単に偏光顕微鏡の仕組みを示す (図 2-5)。

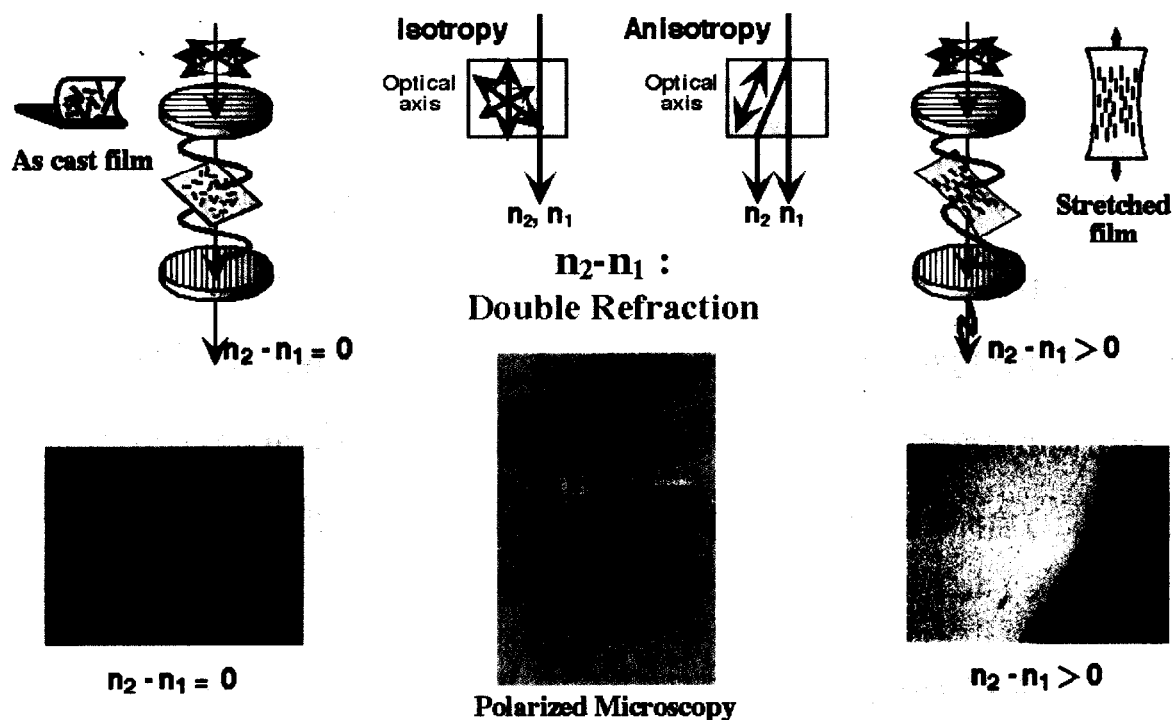


図 2-5. 透過偏光顕微鏡の外観と構成

偏光顕微鏡は、顕微鏡の光軸上の試料の前と後ろに偏光板を置いた装置である (図 2-6)。光源と試料の間の偏光板を偏光子 (ポラライザ)、試料と観測点の間の偏光板を検光子 (アナライザ) とよぶ。偏光板はある特定の振動方向の光のみを透過させる。その光の振動方向を偏光面といい、偏光面を互いに直交させて 2 枚の偏光板を組み合わせると光は透過しない (この状態を直交ニコルとよぶ)。しかし、これらの偏光板の間に光学的異方体 (屈折率が光の振動方向により異なる物体) を挟むと光が透過するようになる。

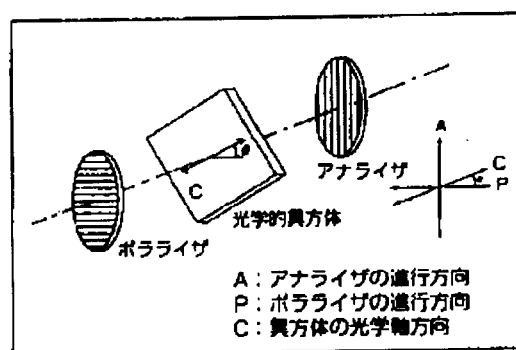


図 2-6. 直交ニコル間の異方体

ポラライザから出た直線偏光が光学的異方体に入射すると、光は互いに直交する振動面をもつ二つの平面波に分かれて進行する（図 2-7）。また、ある方向については分かれずに進み、この方向を光学軸という。光学的異方体の中で光はそれぞれの振動方向の屈折率に応じた速度で進行するため、異方体から出る時点で二つの平面波の間には屈折率差と異方体の厚みの積に比例した位相差（ δ ）が生じる。

$$\delta = 2\pi d (n_2 - n_1) / \lambda \quad (1)$$

ただし λ は光の波長、 d は異方体の厚さ、 n_1 、 n_2 は二つの平面波の屈折率を表す。

このとき光路差 R はリタデーションとよばれ、

$$R = \delta \lambda / 2\pi = d (n_2 - n_1) \quad (2)$$

で表される。 R は異方体中での二つの平面波のずれを空気中での距離に換算した値である。

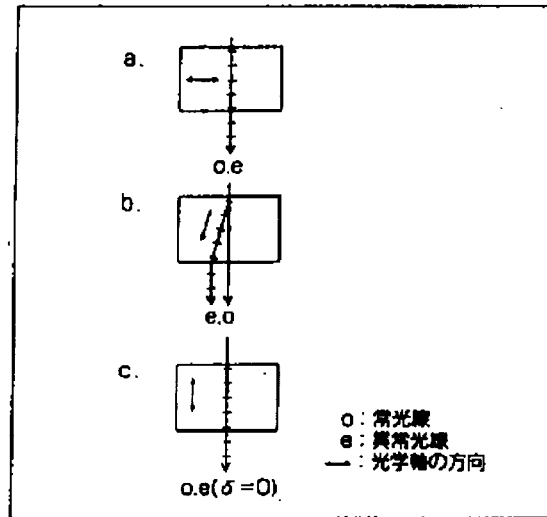


図 2-7. 結晶の光学軸方向と複屈折の関係

偏光顕微鏡は、上述の原理に基づいてリタデーションの測定により異方性の有無を判別したり、透過光の強度からリタデーションの値を計測したりするための装置である。リタデーションがわかれば、試料の厚み d とあわせて式 (2) により試料の光学的異方性、すなわち複屈折の値 ($n_2 - n_1$) を求めることができる。

さて、直交ニコル間に位相差 δ をもつ異方体が、その光学軸がポラライザの振動方向に対し角度 θ で置かれたとき、透過光の強度 I は次式のようにになる。

$$I = I_0 \sin^2 2\theta \sin^2(\delta/2) = I_0 \sin^2 2\theta \sin^2(\pi R/\lambda) \quad (3)$$

この式より、異方体の光学軸がポラライザの振動方向と一致したときまたは直交したときに、異方体が暗黒になる位置があることがわかる (図 2-8)。これを消光位という。その 45° 方向に最も明るくなる位置があり、これを対角位という。図のように異方体を回転させながら観察すると明るさが変化する。

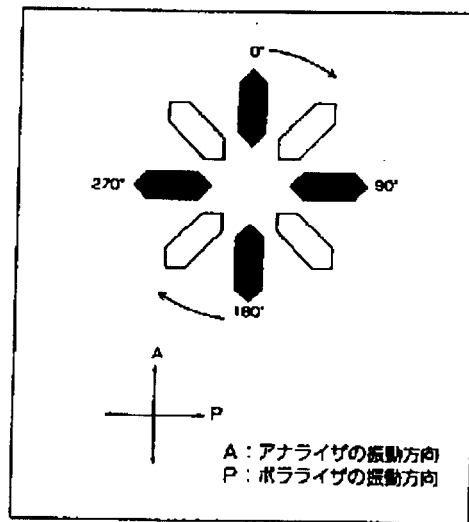


図 2-8. 異方体の対角位と消光位

異方体のリタデーション測定をするには、コンペンセータという、リタデーションを変化できる位相板からなる装置を用いる。リタデーションの測定は、試料で発生したリタデーションをコンペンセータで打ち消し、その時の目盛りを読み取ることによって行う。

本研究でリタデーションの測定に使用したのはベレックコンペンセータという種類のコンペンセータである（図 2-9）。コンペンセータの回転ダイヤルを回すとプリズムが光軸に対して傾いて、リタデーションの値が変化する。

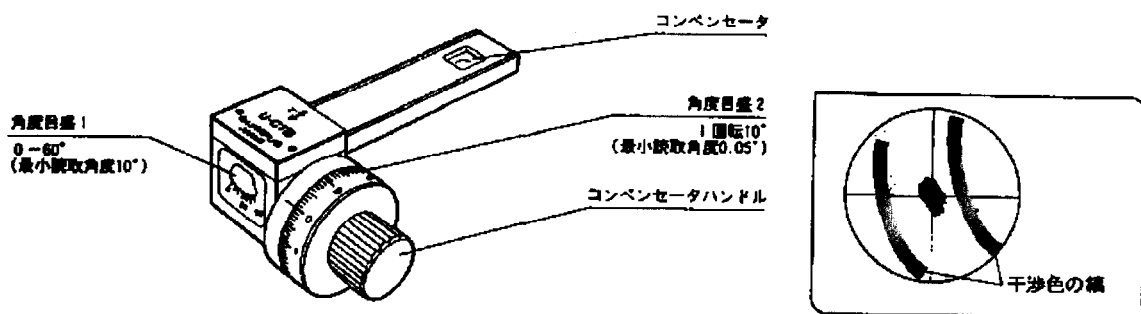


図 2-9. ベレックコンペンセータの概略

リタデーションの測定は、プリズムを傾けて試料の求めたい部分に黒い干渉縞を移動させ、その時の回転ダイヤルの目盛りを読み取ることによって行われる（このときにコンペンセータのリタデーションと試料のリタデーションが等しくなっている）。以下の手順によりリタデーションの測定を行った。

まずコンペンセータハンドルを回し、黒縞を視野中心に合わせ、その時の角度（プラス方向とマイナス方向の二つ）を角度目盛りにより読み取った。その後二つの角度の平均値を求めた。この平均値から製品に付属の換算表でリタデーション量を求めた。さらに式（2）および測定した試料の厚さから、複屈折の値（ $n_2 - n_1$ ）を計算した。作製した様々なフィルムに対してこの測定を行った。

2-2-4. 引っ張り試験

引っ張り試験は力学試験機 TEMSILON UTM-4L（ORIENTEC CORPORATION 製）もしくは TEMSILON RTM-25（ORIENTEC CORPORATION 製）を用いて行った。図 2-10 に装置の概略図を示す。0.5×4 cm に切り出したフィルムの膜厚を測り、25 mm の間隔でクリップに固定した。引っ張りの速度は 5 mm/min. とし、フィルムにかかる力とフィルムの伸びをプロッタに記録した。ただしフィルムの伸びは $\varepsilon = (L - L_0) / L_0$ で表した。

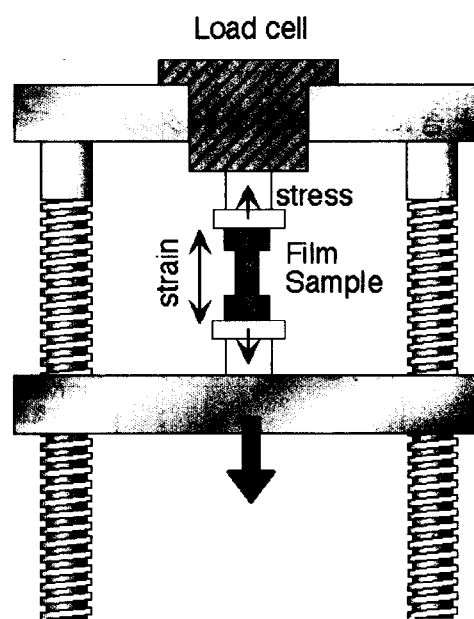
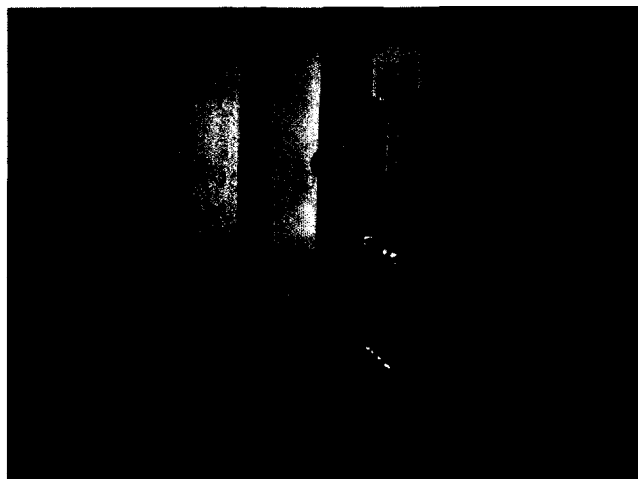


図 2-10. 引っ張り装置の概略図

2-3. 結果と考察

2-3-1. 脂質の異なる DNA-脂質複合体の評価

すべての結果を表 2-2 にまとめる。

脂質として一本鎖の 4 級アンモニウム塩型脂質 ($C_n-N^+-3C_1$) を用いた場合、アルキル鎖が短い $C_{8,10}$ ではコンプレックスが沈殿しにくかったが、 C_{12} 以上のアルキル鎖長のものは高収率でコンプレックスが沈殿した。有機溶媒への溶解性はアルキル鎖の長いものの方が良かった。 $C_{10,12}$ は溶解するのに 10 日から 2 週間かかったが $C_{14,16,18}$ では 2 日から 5 日でほぼすべて溶解した。アルキル鎖の長い脂質の方が疎水的であるはずなのでこの結果は妥当である。 $C_{12,14,18}$ では透明のフィルムができたが (図 2-11a)、 C_{16} では一部結晶化して不透明なフィルムができた (図 2-11b)。アルキル鎖が長くなるにつれて脂質の会合性が強くなると思われる。

一本鎖 1 級アミン型脂質 ($C_n-N^+H_3$) を用いた場合、すべて DNA-脂質複合体が沈殿したが、全体的に 2-30 %と低収率だった。 C_8 ではアルキル鎖が短いため疎水性が足らずに沈殿しにくく量がとれなかったのでフィルムを作製することができなかった。得られたコンプレックスの有機溶媒への溶解性はあまり良くなく、溶けるのに 10 日から 2 週間前後かかった。 C_{10} では透明のフィルムができたが薄くてほとんど延伸できず、 C_{12} ではやや結晶化、 $C_{14,16}$ では全面的に結晶化したフィルムになった。

一本鎖アラニン型脂質 ($C_n-Ala-N^+H_3$) を用いた場合、どれも高収率でコンプレックスが沈殿したが、これらのコンプレックスは有機溶媒に難溶なために大きなフィルムを作製することができなかった。 C_8 のフィルムは吸湿性が高く、常に空気中の水蒸気を含んだまま乾かなかった。 C_{10} 、 C_{12} のフィルムは透明だったが、薄すぎて延伸できなかった。それ以上アルキル鎖の長い C_{14} 、 C_{18} はフィルムは結晶化して不透明に

なってしまった。

表 2-2. 作製した全ての DNA-脂質複合体の評価

脂質の種類	アルキル鎖長	コンプレックスの収率	有機溶媒への溶解性	フィルムの様子
C_n-N⁺-3C1 	n=8	沈殿生成せず	—	—
	10	9%	△	透明なフィルム
	12	77%	△	透明なフィルム
	14	70%	○	透明なフィルム
	16	53%	○	一部結晶化
	18	69%	○	透明なフィルム
C_n-NH₃⁺ 	n=8	2%	—	—
	10	19%	△	透明なフィルム
	12	26%	△	一部結晶化
	14	36%	△	全面結晶化
	16	30%	△	乾いていない
C_n-Ala-NH₃⁺ 	n=8	47%	×	吸湿性高く乾かない
	10	62%	×	透明なフィルム
	12	61%	×	透明なフィルム
	14	70%	×	全面結晶化
	16	64%	×	全面結晶化
C10-4G-N⁺ 		68%	◎	透明なフィルム
Phy-N⁺ 		62%	◎	透明なフィルム
ポリジメチルシロキサン		17%	×	—
2C_n-N⁺-2C1 	n=10	73%	◎	透明なフィルム
	12	85%	◎	透明なフィルム
	14	84%	◎	透明だが数日たつと結晶化
	16	72%	◎	全面結晶化
	18	38%	◎	全面結晶化
C₁₂OC₆-NH₂ 		脂質が水に不溶で沈殿生成せず	—	—
3C_nN⁺C1 	n=8	少なすぎて回収不能	—	—
	12	脂質が水に不溶で沈殿生成せず	—	—
3C_n-NH⁺ 	n=8	脂質が水に不溶で沈殿生成せず	—	—
	10		—	—
	12		—	—
C₆H₁₃COOCH₂ C₆H₁₃COOCH₂ C₆H₁₃COOCH₂ 	n=10	脂質が水に不溶で沈殿生成せず	—	—

(a)



(b)

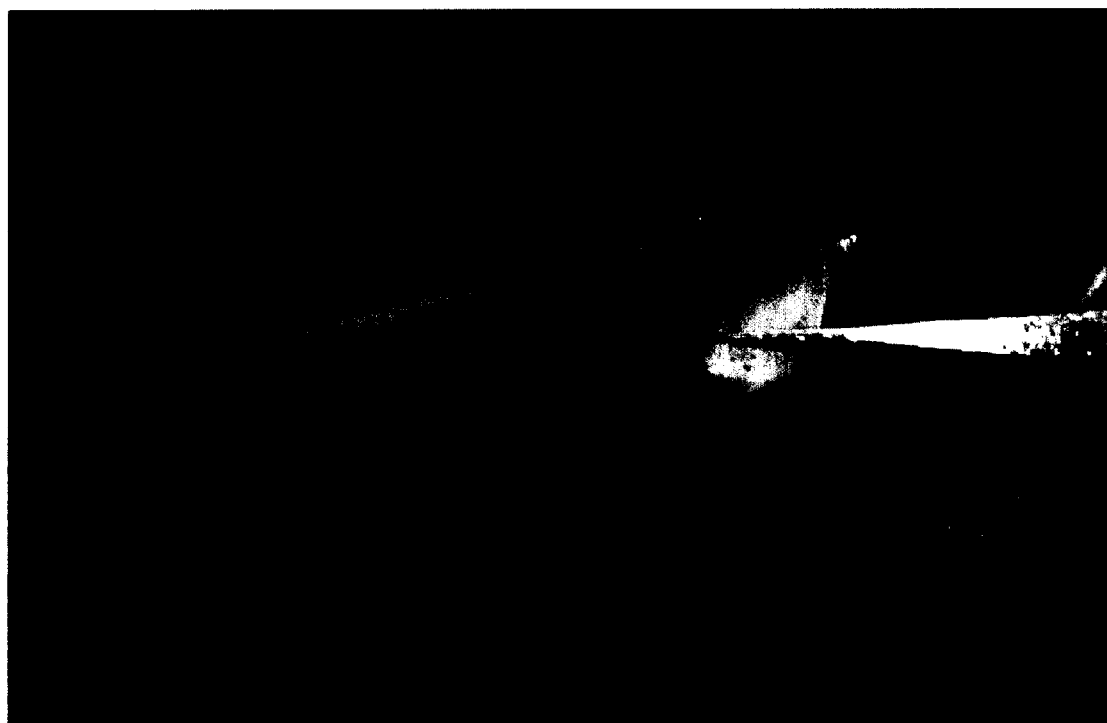


図 2-11. (a) 透明なフィルムと (b) 結晶化して不透明になったフィルム

一本鎖のエーテル型脂質 (C_{10} -4G- N^+ - $3C_1$) および一本鎖の枝分かれ型フィトール型脂質を用いた場合はどちらも非常に良い状態の透明なフィルムが得られた。ポリジメチルシロキサンを脂質として用いた場合、コンプレックスは沈殿したがオイル状の脂質が遊離してきて非常に乾きにくかった。収率はあまり良くなかった。このコンプレックスは有機溶媒には不溶であったので、フィルムを作製することはできなかった。この脂質も前述のエーテル結合含有脂質と同様に、脂質の会合性の低さが期待されたのだが、有機溶媒への溶解性に問題があったようである。

二本鎖脂質 ($2C_n$ - N^+ - $2C_1$) を用いた場合、 $2C_{10}$ - $2C_{18}$ のいずれの脂質でもコンプレックスが沈殿した。収率は全体的にとっても良かったが、 $2C_{18}$ のみが低収率だった。これは $2C_{18}$ の脂質が水に溶けにくいためだと思われる。得られたコンプレックスの有機溶媒への溶解性はかなり良く、すべて3日以内に完全に溶解した。 $2C_{10}$, $2C_{12}$, $2C_{14}$ のフィルムは透明だったが、そのうち $2C_{14}$ のフィルムは数日たつと中央から徐々に結晶化してきた。 $2C_{16}$, $2C_{18}$ のフィルムは全面結晶化していた。

エーテル結合含有の一級アミン型二本鎖脂質も試してみたが、脂質が水に溶けないのでコンプレックスを作製することができなかった。この脂質は内部にエーテル結合を有し、会合性が弱いのではないかと期待されたが、一級アミン型親水基のため水に不溶になってしまったと考えられる。

三本鎖の4級脂質 ($3C_n$ - N^+ - C_1) は C_8 が水に可溶、 C_{12} が水に不溶 (水/エタノールには可溶) であった。 C_8 は通常通りの方法でコンプレックスを作製したが、生じた沈殿の量が少なすぎて回収できなかった。また C_{12} の場合は DNA の水溶液と脂質の水/エタノール溶液を混ぜることによってコンプレックスを作製しようとしたが、この方法では脂質のみが析出してきてしまい、DNA-脂質複合体を作製することができなかった。

三本鎖の3級アミン型脂質 ($3C_n-NH^+$) は水、エタノール、アセトン、アセトニトリルのいずれにも不溶であった。仕方がないので水/エタノール溶液に脂質を懸濁させ、そこへ DNA の水溶液を加えたが、沈殿は生じなかった。

三本鎖の1級アミン型脂質は有機溶媒と水との混合溶媒には可溶だが、水のみには不溶であった。よって水/アセトン溶液に脂質を懸濁させ、これに DNA の水溶液を加えたが、脂質のみが析出してきてしまい、DNA-脂質複合体を作製することはできなかった。

以下にまとめの考察を行う。

アルキル鎖長については、アルキル鎖が短すぎると脂質の疎水性がたりないために DNA-脂質複合体が沈殿しにくいことがわかった。またアルキル鎖の長すぎるものについては、今度は脂質の会合性が高くなってしまうためにフィルムが結晶化してしまうことがわかった。従って、透明で自己支持性の DNA-脂質複合体フィルムを得るためには、程良いアルキル鎖長の脂質が要求されると考えられる。

アルキル鎖の本数については、一本鎖、二本鎖の両方で透明なフィルムが得られたが、三本鎖では疎水性が高くなりすぎるために脂質が水に溶けず、DNA と複合体が形成できないという結果が得られた。三本鎖脂質はアルキル鎖長を短くして水に溶けるようにしても、今度は複合体が沈殿しなくなるので、DNA を複合疎水化する脂質としては不適であると考えられる。

脂質頭部の構造については、一本鎖 4 級アンモニウム塩を用いた時に透明で自己支持性のフィルムが得られたのに対し、一本鎖 1 級アミン、アラニン型ともに脂質としては不適であった。これより、やはり DNA の複合疎水化には頭部に 4 級塩を持つ脂質が適しているということが確かめられた。1 級アミン、アラニン型のいずれにおいても、複合体が有機溶媒に難溶であるという結果になっているので、頭部に 4

級アンモニウム塩を持つ脂質を用いると、DNA の複合疎水化がより完全になり、有機溶媒に溶解しやすくなるという効果があるのかもしれない。

結果として、一本鎖 4 級アンモニウム塩のアルキル鎖長が 10~14, 18 のものと、一本鎖のエーテル型、フィトール型、二本鎖 4 級アンモニウム塩のアルキル鎖長が 10~14 のもので透明な自己支持性のフィルムが得られたので、以降の章ではこれらについての解析を行う。またこれらのコンプレックス形成の確認は元素分析により行い、DNA のリン酸アニオンに対しほぼ 1:1 の割合で脂質が静電的に相互作用していることがわかった。

2-3-2. X線回折測定によるフィルムの構造解析

前節で述べたように、透明で自己支持性のフィルムが得られた脂質のフィルムについてのX線回折を行った。

DNA 30,000 bp を用いて作製した DNA-脂質複合体のキャストフィルム中での構造を透過型 X 線回折測定により検討した。図 2-12 には一本鎖エーテル型の脂質である C_{10} -4G- N^+ を用いた C_{10} -4G- N^+ /DNA 30,000 bp のキャストフィルムの X 線回折パターンを示した。キャストフィルムの正面から X 線を照射した場合、側面から照射した場合、いずれも 41 Å の距離に同心円状の反射が現れた。側面から照射した場合はそのうちの赤道上の部分がやや濃くなっていたが、あまり大きな差ではなかった。これよりこのフィルム内では、ロッド状の DNA 鎖が 41 Å 間隔でパッキングしてある程度の大きさの会合体を形成し、これらのドメインがランダムに様々な方向を向き、わずかに膜厚方向に層状に配向した図 2-12 c に模式的に示したような構造が考えられる。

次に、延伸したフィルムのX線構造解析を行った。水蒸気下でエージングしたキャストフィルムを延伸後乾燥したときのX線回折測定の結果を図2-13に示した。延伸方向を子午線方向にとり、フィルムの正面および側面からX線を照射したところ、延伸前に見られた同一円周上の反射（図2-12 a, b）は消失し、赤道線上にDNAの二重らせんのロッド間距離を示すスポットのみが観測された。このロッド間距離は延伸前のロッド間距離と同様に $41 \text{ \AA}$ となり、延伸によるロッド間のパッキングの変化はないものと思われる。また延伸方向に平行なX線の照射に対しては同一の距離に円形の回折が得られた。以上の結果より、 $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+/\text{DNA } 30,000 \text{ bp}$ 延伸フィルム内ではDNA-脂質コンプレックスのロッドが延伸方向に配向した図2-13 d に示したような構造となっていることが示唆された。

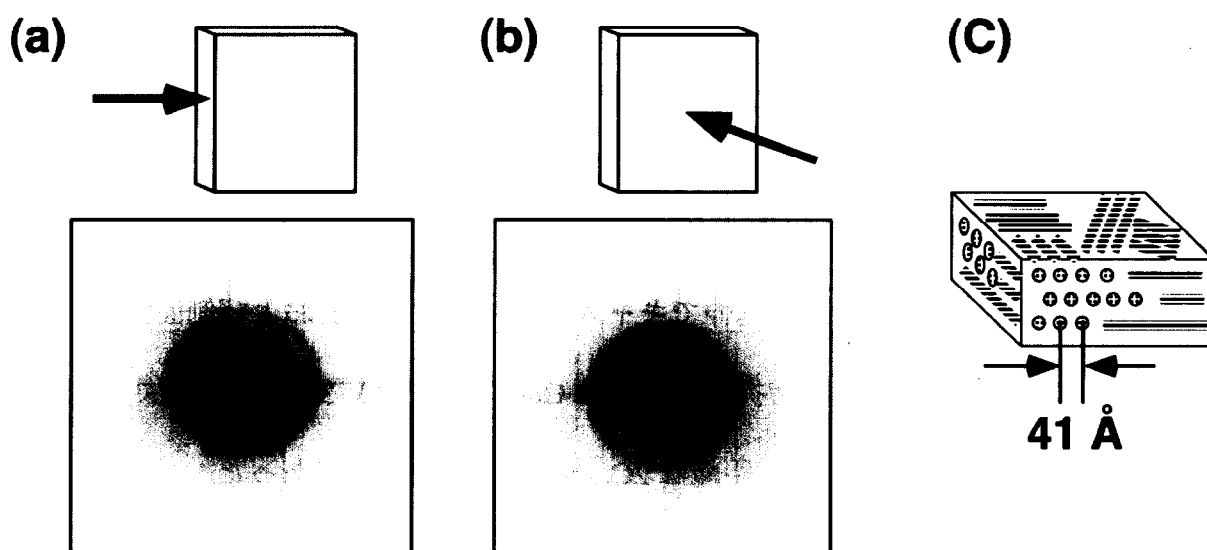


図2-12. $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+/\text{30,000bp}$ キャストフィルムのX線回折パターン。

(a)キャストフィルム側面から(b)キャストフィルム面に垂直にX線を照射した。(c) $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+/\text{30000bp}$ キャストフィルムの構造模式図

$\text{CuK}\alpha$, 40 kV, 100 mA, カメラ長 100 mm

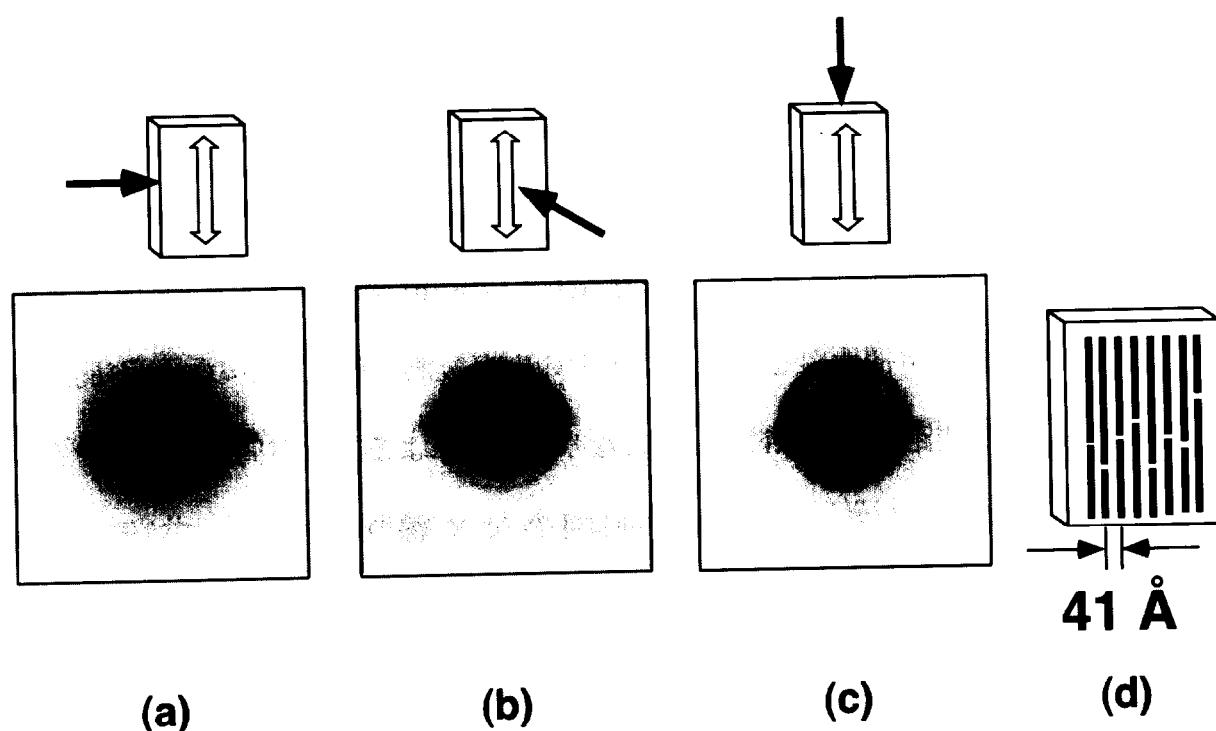


図 2-13. 延伸した C_{10} -4G- N^+ /30,000bp キャストフィルムの X 線回折パターン (a-c) とその構造 (d)

$CuK\alpha$, 40 kV, 100 mA, カメラ長 100 mm

図 2-14 に脂質として二本鎖脂質 $2C_{12}$ - N^+ - $2C_1$ を用いた時のキャストフィルムの X 線回折パターンを示した。未延伸でキャストフィルムの正面および側面から X 線を照射したところ、得られた回折パターンは C_{10} -4G- N^+ /DNA 30,000 bp (図 2-12) と同様であった。DNA ロッド間の距離は $2C_{12}$ - N^+ - $2C_1$ では 29 Åであった。

延伸したフィルムを用いて延伸方向を子午線方向にとり、フィルムの正面および側面から X 線を照射したところ、延伸前に見られた同心円状の反射は C_{10} -4G- N^+ /DNA 30,000 bp の場合と同様に赤道に DNA のロッド間距離を示すスポットが得られた。このロッド間距離は延伸前のロッド間距離と同様に 29 Åとなった。また延伸方向に平行な X 線の照射に対しては同一の距離に円形の回折が得られた。以上の結果より、

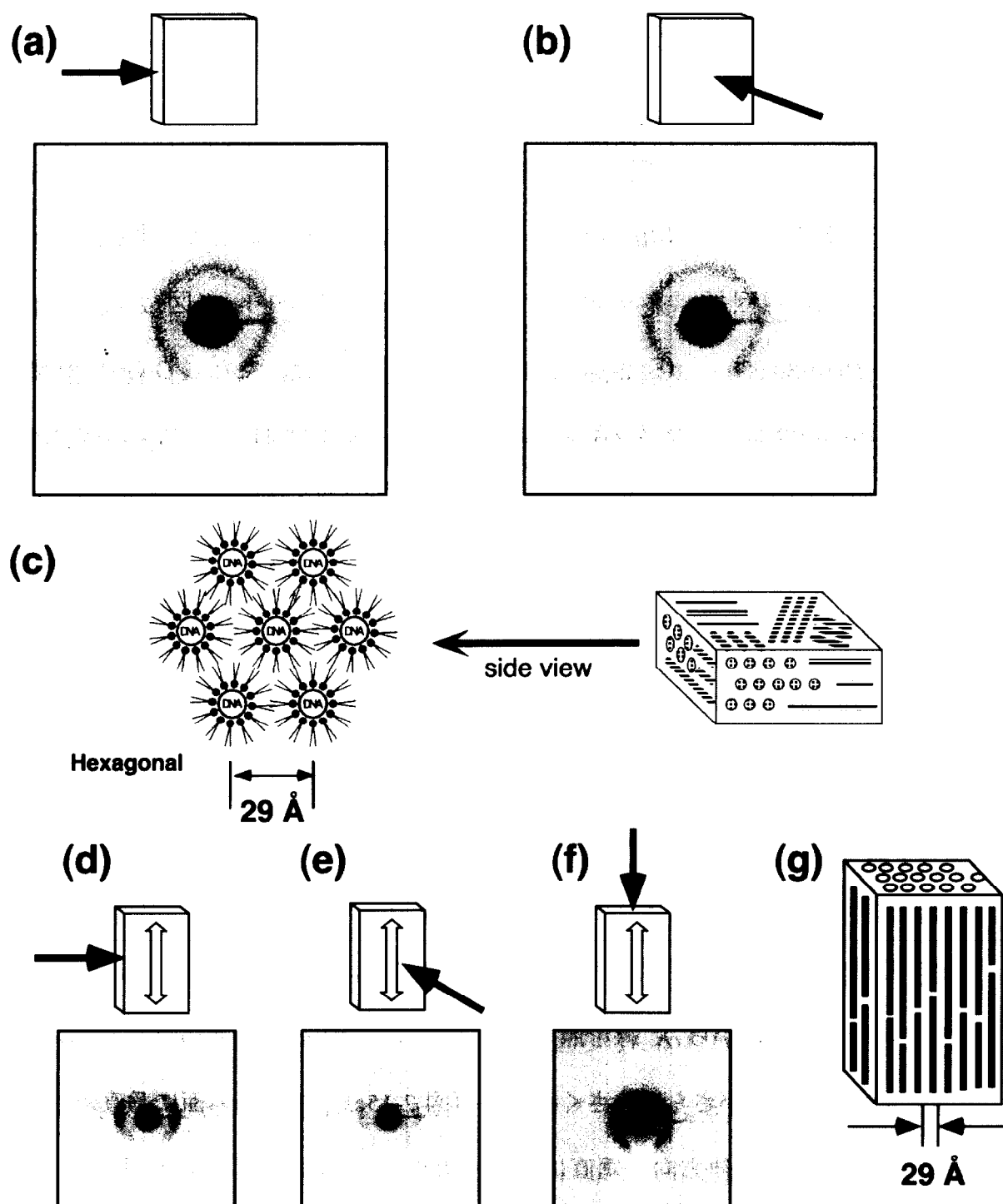


図 2-14. $2C_{12}-N^+-2C_1/30,000$ bp キャストフィルムのX線回折パターン.

(a,b)未延伸フィルム (d-f)延伸、 (c,g) それぞれの構造.

$CuK\alpha$, 40 kV, 100 mA, カメラ長 100 mm

$2C_{12}-N^+2C_1/DNA$ 30,000 bp 延伸フィルム内でも DNA 鎖が配向したロッド状構造をとることがわかった。

脂質としてフィトール型脂質 $Phy-N^+$ 、一本鎖の 4 級アンモニウム塩 $C_{12}-N^+-3C_1$ 、二本鎖の 4 級アンモニウム塩 $2C_{10}-N^+-2C_1$ を用いた未延伸、または延伸したキャストフィルムの X 線回折パターンは $C_{10}-4G-N^+/DNA$ 30,000 bp (図 2-12、2-13)、 $2C_{12}-N^+2C_1/DNA$ 30,000 bp (図 2-14) と同様の結果になった。ただし DNA-脂質複合体のロッドのヘキサゴナルなパッキングの距離は $Phy-N^+$ では 41 Å、 $C_{12}-N^+-3C_1$ では 28 Å、 $2C_{10}-N^+-2C_1$ では 24 Å となった。

図 2-15 に脂質として $C_{16}-N^+-3C_1$ を用いた時のキャストフィルムの X 線回折パターンを示した。未延伸でキャストフィルムの側面から X 線を照射したところ、フィルム膜厚方向に 33 Å の層状構造を示す回折ピークが現れた (図 2-15a)。フィルム面に垂直に X 線を照射すると脂質のアルキル鎖間の距離を示す 4 Å の回折が円周上に現れた (図 2-15b)。この結果は、キャストフィルムの膜厚方向にラメラ層が積み重なった構造をあらわしている。このフィルムは柔軟性があり、水蒸気下にさらすことで延伸することができた。延伸したフィルムを用いて延伸方向を子午線方向にとりフィルムの側面から X 線を照射したところ、延伸前にもあった 33 Å のラメラ層間を表すスポットがさらに小さくなった (図 2-15c)。フィルム面に垂直に X 線を照射した場合にも延伸方向と垂直にロッド間距離を示すスポットが現れた (図 2-15d)。また延伸方向に平行な X 線の照射に対しては 33 Å の距離に円形の回折が得られた (図 2-15e)。

以上のように $C_{16}-N^+-3C_1$ のフィルムは未延伸のときは膜厚方向でラメラ構造をとるが、延伸することにより DNA-脂質複合体はランダムに配向しているが、延伸することにより DNA 鎖が配向したロッド状構造に変化することがわかった。この脂質は常温で

固体であることからアルキル鎖の結晶性を考えると常温で液晶状態であるアルキル鎖の短い $C_{12}-N^+-3C_1$ やアルキル鎖が柔らかい $C_{10}-4G-N^+$ 、 $Phy-N^+$ 、 $2C_{10,12}-N^+-2C_1$ より会合性が強い。したがって $C_{16}-N^+-3C_1$ のフィルムの内部構造は図 2-15c に示すような二分子膜構造とヘキサゴナル構造が混在した構造になっていると考えられる。

脂質として $C_{18}-N^+-3C_1$ や二本鎖の $2C_{14}-N^+-2C_1$ を用いた時も同様の回折パターンが得られた。ただしラメラ層間の距離はそれぞれ 40 Å、33 Å となった。

図 2-16 に脂質として $2C_{18}-N^+-2C_1$ を用いた時のキャストフィルムの X 線回折パターンを示した。キャストフィルムの側面から X 線を照射したところ、フィルム膜厚方向に層状構造を示す 37 Å の層間距離の回折ピークが 2 次まで現れた (図 2-16a)。フィルム面に垂直に X 線を照射するとアルキル鎖のパッキングを示す 3.7 Å の回折が円周上に現れた (図 2-16b)。この結果は、キャストフィルムの膜厚方向に層が積み重なったラメラ構造を表している。脂質の結晶性が非常に良いため、このフィルムは自己支持性とは言い難いうろこ状のフィルムになり、延伸できなかった。また回折パターンがはっきりしていることからこのラメラ構造は非常に規則正しく層状に形成していることがわかる。しかし、DNA 二重らせんから放射状にのびたジアルキル型脂質のアルキル鎖は密にパッキングしてラメラ層になることはできない。したがってこのキャストフィルムの構造は図 2-16c に示すように脂質がラメラ層を形成するために一部 DNA から離れていると考えられる。

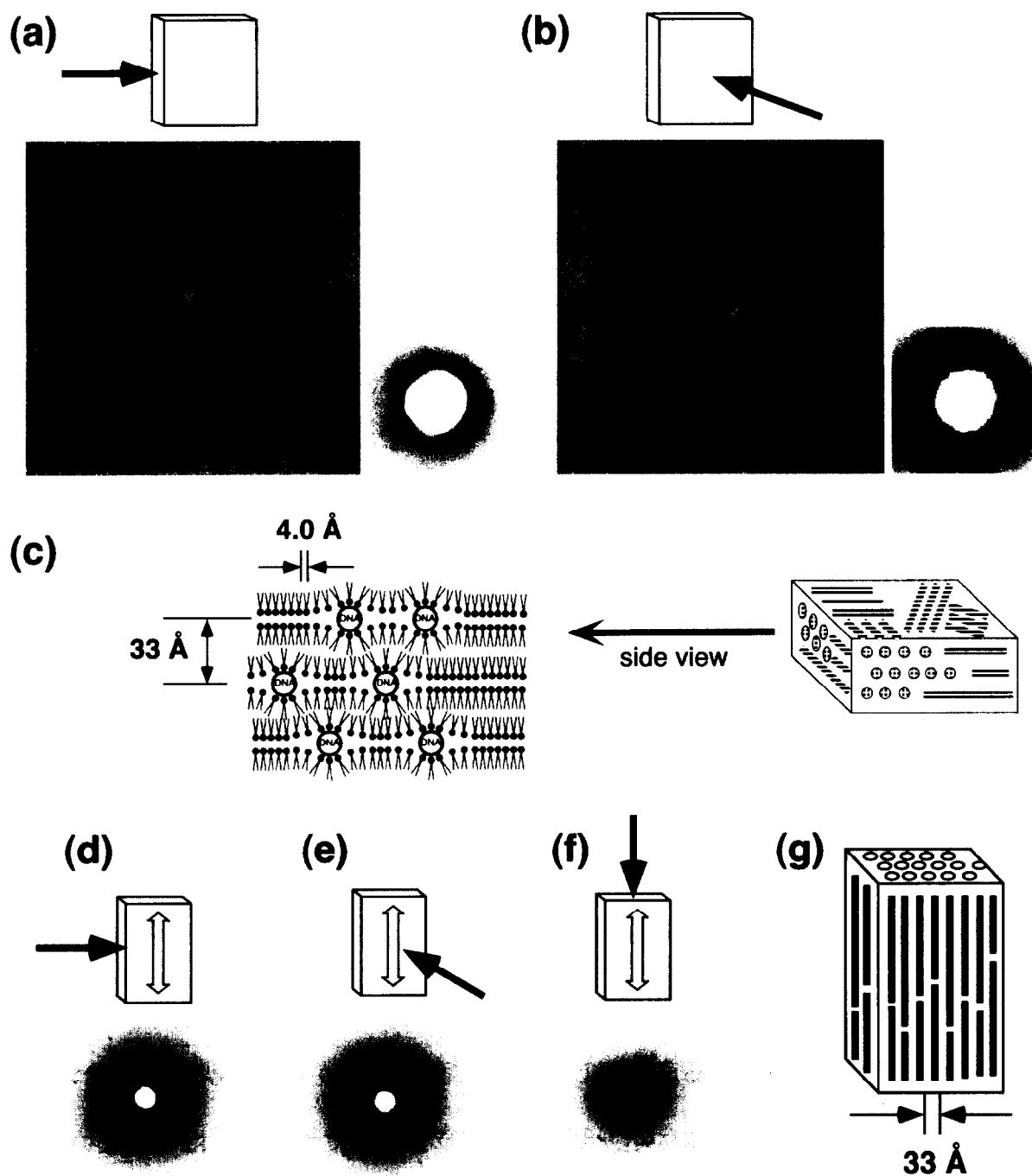


図 2-15. $C_{16}-N^+-3C_1$ / DNA 30,000 bp キャストフィルムのX線回折パターン

(a, b) 未延伸フィルム、(d-f) 延伸フィルム、(c, g) それぞれの構造。
 (a), (b) の小さな写真はそれぞれの中心部の拡大図。CuK α , 40 kV, 100 mA, カメラ長 100 mm, (a) キャストフィルム側面から、(b) キャストフィルム面に垂直、(d) キャストフィルム側面から延伸方向に垂直、(e) 延伸方向を子午線上にとりキャストフィルム面に垂直、(f) 延伸方向に平行にX線を入射した。

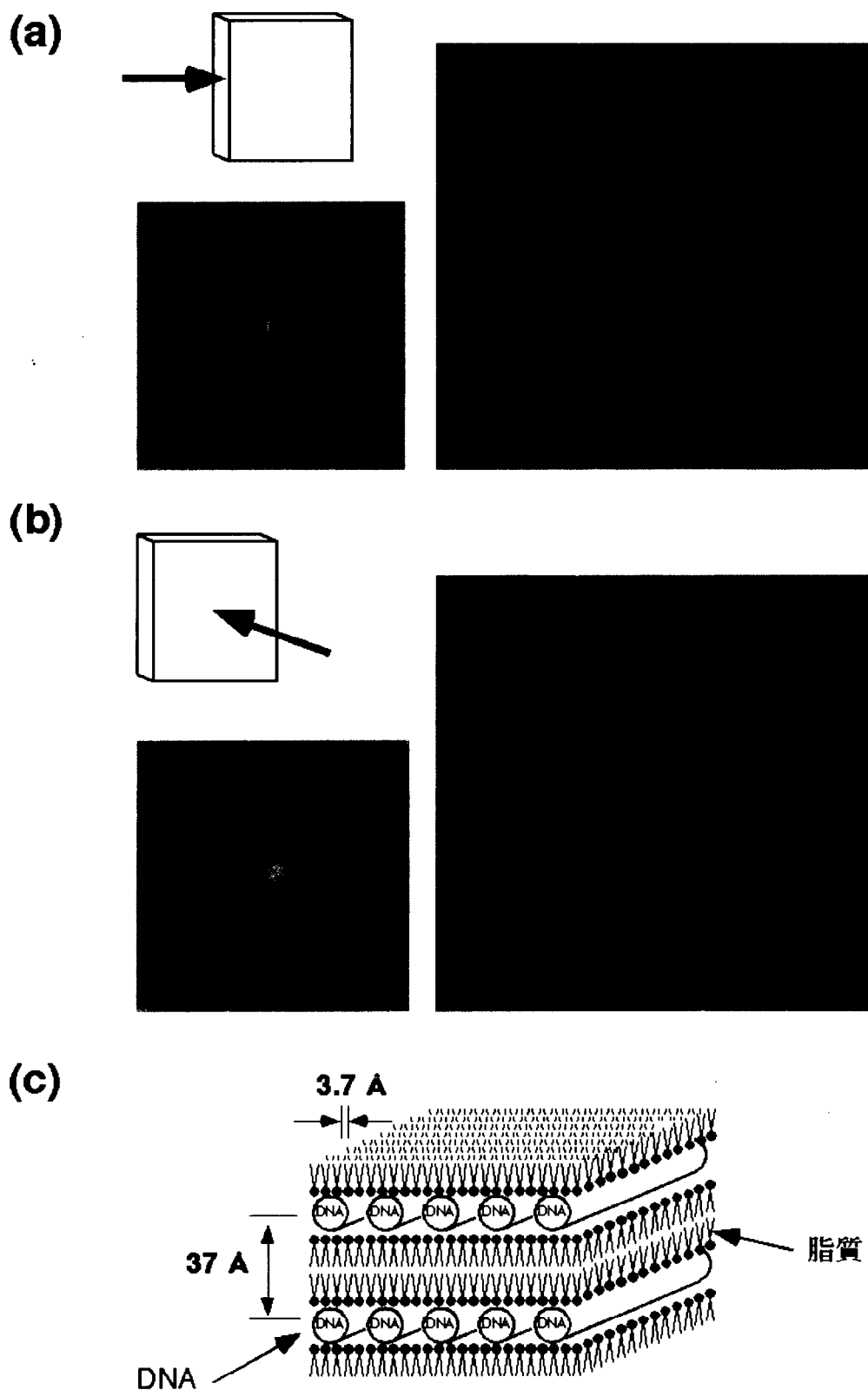


図 2-16. $2C_{18}-N^+-2C_1$ / DNA 30,000 bp キャストフィルムのエックス線回折パターン (a, b)とその構造 (c)

小さな写真は (a), (b)それぞれの中心部の拡大図。Cuk α , 40 kV, 100 mA, カメラ長 100 mm,
(a)キャストフィルム側面から, (b)キャストフィルム面に垂直にX線を入射した。

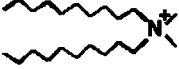
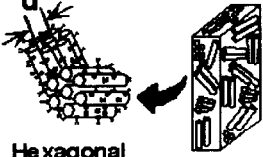
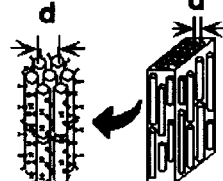
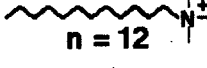
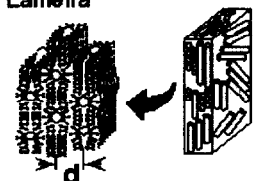
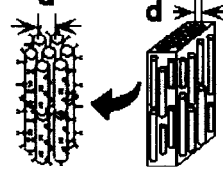
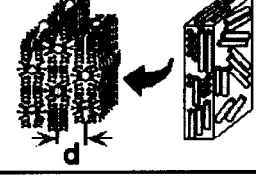
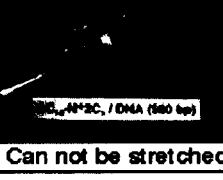
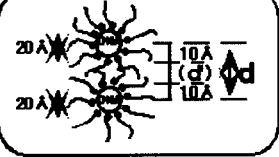
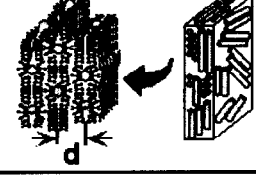
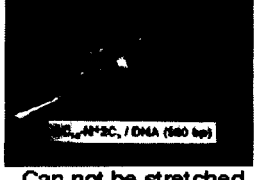
表 2-3 に X 線回折から得られた内部構造をまとめた。脂質の違いによるフィルム内の構造は大きく 3 つに大別できる。

一本鎖のエーテル型脂質 $C_{10}\text{-4G-N}^+$ 、フィトール型脂質 Phy-N^+ といった柔らかい脂質や、アルキル鎖の短い一本鎖脂質 $C_{12}\text{-N}^+\text{-3C}_1$ 、二本鎖の 4 級アンモニウム塩型脂質 $2C_{10,12}\text{-N}^+\text{-2C}_1$ を用いてコンプレックスを作製したときは柔軟な自己支持性のキャストフィルムが得られた。その内部ではロッド状の DNA 二重らせんがヘキサゴナルにパッキングしてランダムに配向していることがわかった。これを延伸するとロッド状の DNA 鎖を延伸方向に配向できることがわかった。これらのフィルムはどれも非常に扱いやすかった。

アルキル鎖が少し長い一本鎖型脂質 $C_{16,18}\text{-N}^+\text{-3C}_1$ や二本鎖型脂質 $2C_{14}\text{-N}^+\text{-2C}_1$ を用いて作製したフィルムは自己支持性だが、内部構造は膜厚方向には層状に配向し、フィルム面方向ではランダムに配向しているラメラ構造になることがわかった。これを延伸すると柔軟な脂質の場合と同様に DNA 鎖がヘキサゴナル状に配向した構造になった。

アルキル鎖がもっと長い $2C_{18}\text{-N}^+\text{-2C}_1$ を用いたときはフィルムはラメラ構造で自己支持性のフィルムにはならないということがわかった。

表 2-3. 様々な脂質を用いた DNA-脂質複合体キャストフィルムの構造

Lipids	d / Å	As Cast Film	Stretched Film
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{O}\text{---}\text{N}^+$  41 (21)	 n = 10 24 (4)	 Hexagonal	
 n = 12 28 (8)	n = 12 29 (9)	 Lamella	
n = 16 33 (13)	n = 14 33 (13)	 Lamella	
 n = 18 40 (20)	n = 18 37 (17)	 Lamella	 Can not be stretched

一本鎖、二本鎖の脂質について、アルキル鎖長を変えた場合の DNA-脂質複合体ロッド間の距離を表 2-4 にまとめた。X線回折から得られた DNA-脂質複合体のロッド間の距離と DNA の直径が 20 Åであることを考えて内部構造を示した。

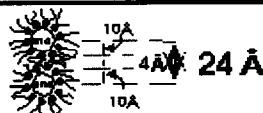
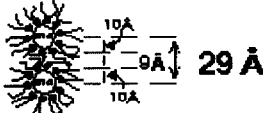
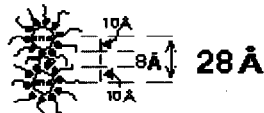
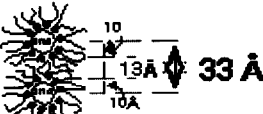
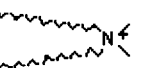
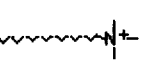
X線回折から得られた DNA-脂質複合体のロッド間の距離はアルキル鎖が多いほど増加した。また一本鎖でも二本鎖でもアルキル鎖長の同じ脂質についてはほぼ同じ DNA ロッド間距離が得られた。すなわち脂質の長さと DNA ロッド間の距離には良い相関関係があることがわかった。

DNA-脂質複合体のロッド間の距離から DNA の太さ (半径 $10\text{Å} \times 2$) を引いた距離はそれぞれ炭素数 10 で 4 Å、炭素数 12 で 8-9 Å、炭素数 14 で 13 Å、炭素数 16 で 13 Å、炭素数 18 で 17-22 Åとなった。炭素-炭素結合の距離を 1.25 Å、脂質のアルキル鎖が完全に伸びきった状態と仮定してそれぞれの脂質のアルキル鎖の長さを概算すると、炭素数 10 で 12.5 Å、炭素数 12 で 15 Å、炭素数 14 で 17.5 Å、炭

素数 16 で 20 Å、炭素数 18 で 22.5 Åとなる。したがって DNA 間で脂質はインターデジテートし、折りたたまれて存在していることがわかった。アルキル鎖の短い脂質の方が実際の距離が計算値よりもより小さいので、短い脂質ほど折りたたまれやすい傾向があった。一般的な脂質膜でも $C_{14} \sim C_{16}$ を境に結晶化がすすみやすいので、アルキル鎖の短い脂質の方が自由度が大きいというのは妥当である。

また一本鎖でも二本鎖でもアルキル鎖長の同じ脂質についてはほぼ同じ DNA ロッド間距離が得られたことから、アルキル鎖が一本多い二本鎖脂質のフィルムの方がフィルム内の密度は高いことになる。X 線回折パターンから、二本鎖脂質のフィルムの方が一本鎖脂質のフィルムより DNA の配向性が良いことがわかるが、これはフィルム中の密度が高い方が DNA 鎖を配向させやすいためだと考えられる。

表 2-4. DNA-脂質複合体フィルムの断面積の模式図

Lipids (Dialkyl)	Structures (Dialkyl)	Structures (Monoalkyl)	Lipids (Monoalkyl)
 $2C_{10}N+2C_1$	 24 Å		
 $2C_{12}N+2C_1$	 29 Å	 28 Å	 $C_{12}N+3C_1$
 $2C_{14}N+2C_1$	 33 Å	 33 Å	 $C_{16}N+3C_1$
 $2C_{18}N+2C_1$	 37 Å	 40 Å	 $C_{18}N+3C_1$

2-3-3. 偏光顕微鏡観察によるフィルムの配向度の定量化

作製した様々なフィルムを延伸してその複屈折の値 ($n_2 - n_1$) を計算した。複屈折の値は一般にポリマー鎖の配向を定量的に評価するのに用いられ、この時 n_2 および n_1 は、それぞれポリマー鎖の配向方向に平行および垂直な偏波を有する光線の屈折率である。延伸度と配向度の関係をグラフにした。延伸度は $\varepsilon = \Delta L / L_0$ として横軸とし、配向度に対応する値として複屈折の値 ($n_2 - n_1$) を縦軸とした。

まずそれぞれのフィルムについての生データを図 2-17 に示した。Run が同じものは同じサンプルからとった値であることを示す。実験の性質上、全く同じ延伸度を何度も作り出すことは難しいので、何度か行った Run が同じ曲線上にのることで再現性を取った。なお、生データからそれぞれの Run を結んだ曲線を描き、一本鎖脂質、二本鎖脂質の代表的なデータとして $C_{10}\text{-4G-N}^+ / 30,000\text{bp}$ 、 $2C_{12}\text{-N}^+ - 2C_1 / 30,000\text{bp}$ のデータを図 2-18 に示した。

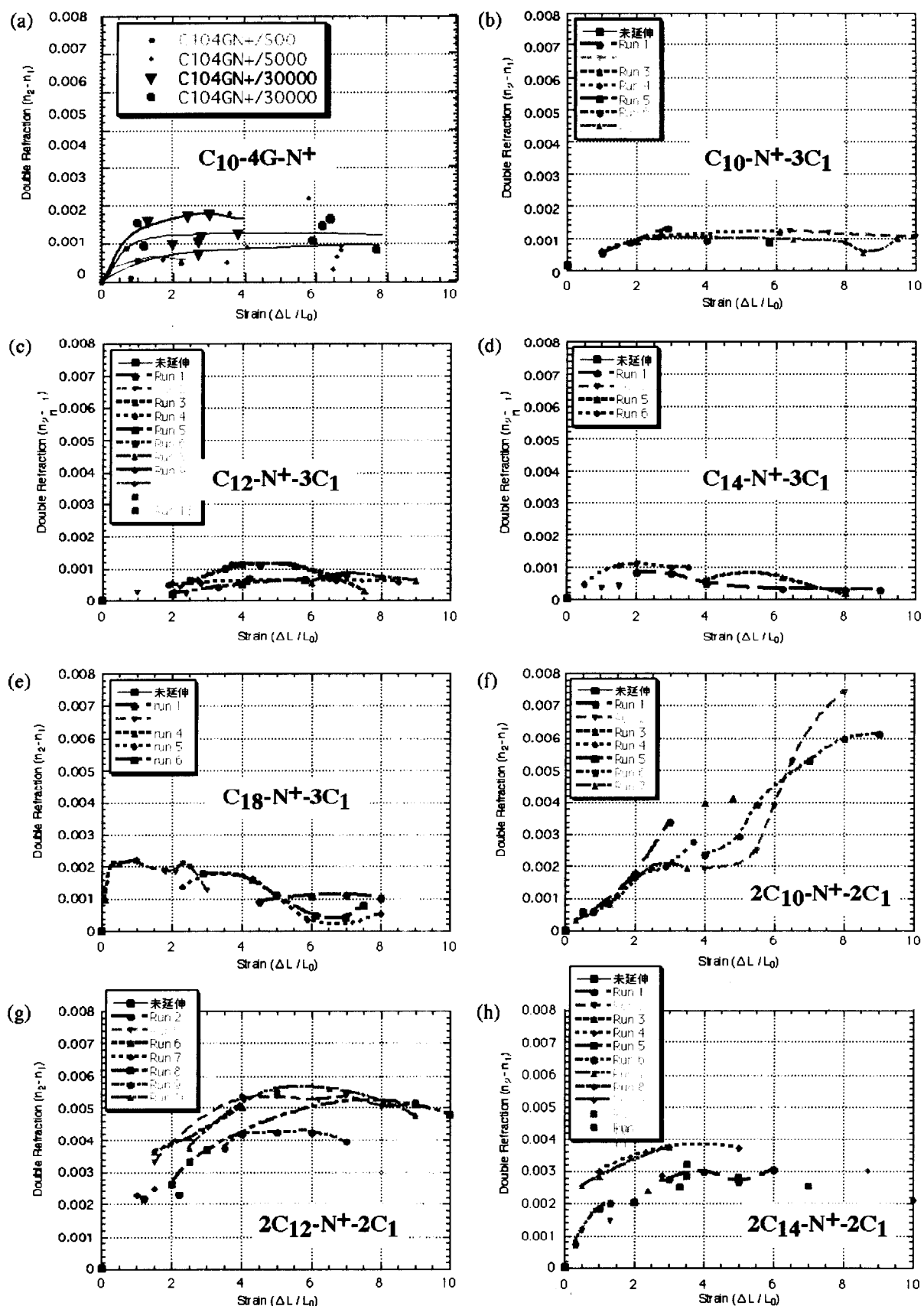


図 2-17. DNA 配向化フィルムの異方性の生データ. DNA 30,000 bp.

(a) $C_{10}-4G-N^+$, (b) $C_{10}-N^+-3C_1$, (c) $C_{12}-N^+-3C_1$, (d) $C_{14}-N^+-3C_1$, (e) $C_{18}-N^+-3C_1$,
(f) $2C_{10}-N^+-2C_1$, (g) $2C_{12}-N^+-2C_1$, (h) $2C_{14}-N^+-2C_1$.

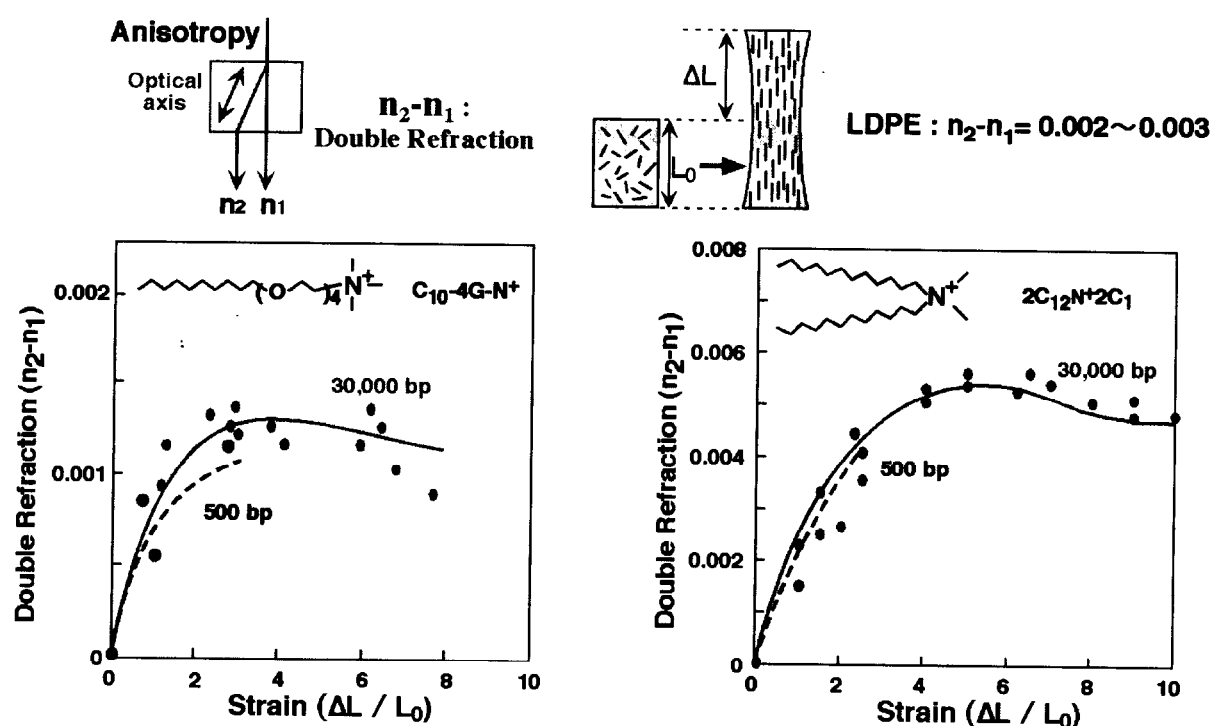


図 2-18. 配向化 DNA フィルムの異方性. DNA 30,000 bp.
(左) C₁₀-4G-N⁺, (右) 2C₁₂-N⁺-2C₁

図 2-18 より、C₁₀-4G-N⁺ / 30,000 bp、2C₁₂-N⁺-2C₁ / 30,000 bp どちらのフィルムの場合でも延伸度（以下 ϵ と呼ぶ） $\epsilon = 4$ 以上にフィルムを延伸すると、その複屈折の値がそれ以上大きくならないことがわかった。以上より $\epsilon = 4$ 以上ではフィルム中の DNA は十分に配向しており、今後 DNA を配向化して電導度を測定する際にはこの $\epsilon = 4$ 以上であれば十分であることがわかった。

脂質の種類による違いを見てみると、一本鎖エーテル型脂質 C₁₀-4G-N⁺と二本鎖直鎖型脂質 2C₁₂-N⁺-3C₁ では明らかに二本鎖脂質の方が複屈折の値（配向度）が大きい。これは一般に一本鎖型脂質よりも二本鎖型脂質の方が配向性が良い、という X 線回折の結果を支持している。

また低分子量 DNA (500 bp) のフィルムについて行った同様のプロットと比較したところ、DNA の長さが違うものであっても、脂質が同じであれば同じ曲線にのることがわかった。ただし低分子量 DNA のフィルムはほとんど延伸できないため延伸度 $\varepsilon=2$ までの値しかなく、プロット数が少ないため曲線のはじめの方しかカバーできない。今回用いた高分子量 30,000bp の DNA のフィルムは 10 倍以上延伸できたこととあわせると、延伸度と配向度の関係には DNA の分子量ではなく脂質の種類のみが影響を与え、DNA の分子量はフィルムの力学的性質にのみ影響を与えていると考えることができる。

また汎用ポリマーの値と比較して、延伸したポリエチレンで複屈折の値が 0.002～0.003 となっており、この値は DNA フィルムのものと同様である。

2-3-4. 引っ張り試験によるフィルムの強度解析

DNA-脂質複合体フィルムの力学的な強度を引っ張り試験により求めた。

試験の結果は引っ張り応力-歪み曲線をもとにして計算される。すなわち、小さな外力から破壊するまでの広い範囲にわたる引っ張り外力に対する材料の力学的応答性を、外力を縦軸に、変形量の伸びを横軸として表示した関係を荷重-伸び曲線 (load-elongation curve) という。また、これを換算して縦軸に応力を取り、同じく伸びを歪みに換算して横軸にとった関係曲線を応力-歪み曲線 (stress-strain curve) という。高分子の引っ張り外力に対する応力-歪み曲線の型を大きく類別すると、図 2-19 に示す 3 種の型に分類できる。すなわち、図 2-19 に示す(a)型は伸び率が 0.5～2 %、大きくとも 5 %程度以内で一般的に小さく、破壊の直前を除けばほとんど直線的な型を示す。次に (c)型は、降伏点までは直線的であるが、降伏後にほぼ一定外力の下で 100～

1,000 %以上の大きい伸びが生じ、破壊の少し前で引っ張り抵抗が少し増し、破壊する。第三の型は(b)型で、(a)型と(c)型の間中型と考えられるものである。すなわち、応力が途中で降下しないで、単に変曲するだけの降伏点を示し、その後破壊するもので、この型の伸び率は一般に(a)型より大きく、(c)型より小さい。

同じ材料でも温度や引張り速度が異なると異なった型を示すことも多いが、室温における引張り速度毎分 100 mm 以下の条件で、各種高分子の応力-歪み曲線を類別すると次のようになる⁷⁾。

- (a)型 フェノール、不飽和ポリエステル、エポキシ、ポリスチレンなど
- (b)型 ABS 樹脂、ポリアセタール、ポリ塩化ビニルなど
- (c)型 ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリカーボナート、ナイロンなど

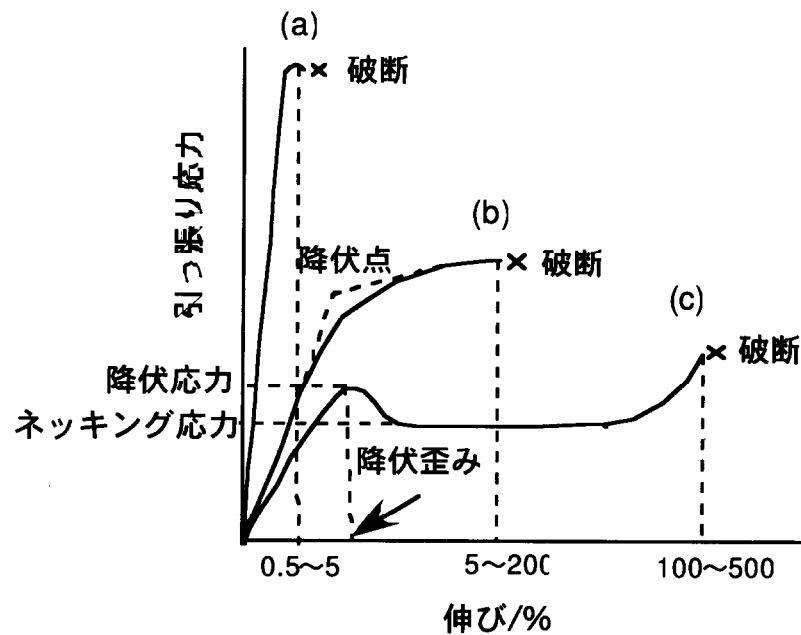


図 2-19 応力-歪み曲線の型

DNA 分子量の異なる各フィルムサンプル C_{10} -4G-N⁺/DNA 30,000 bp, 5,000 bp, 2,000-500 bp (鎖長に分布のあるもの), 500 bp の結果を図 2-20(a)に示した。降伏点の強度は分子量によって差がないが、分子量が高いほどよく延びることがわかつ

た。

脂質の異なる各フィルムサンプル C_{10} -4G- N^+ , $2C_{12}$ - N^+ - $2C_1$, Phy - N^+ , C_{10} - N^+ - $3C_1$ /DNA 30,000 bp について引張り試験を行った結果を図 2-20 (b)に示した。 Phy - N^+ , C_{16} - N^+ - $3C_1$ /DNA 30,000 bp のフィルムは強度が強いが伸びにくいのに対し、 C_{10} -4G- N^+ , $2C_{12}$ - N^+ - $2C_1$ /DNA 30,000 bp は良く伸びるということがわかった。脂質の柔らかさがフィルムの強度ともある程度相関している。

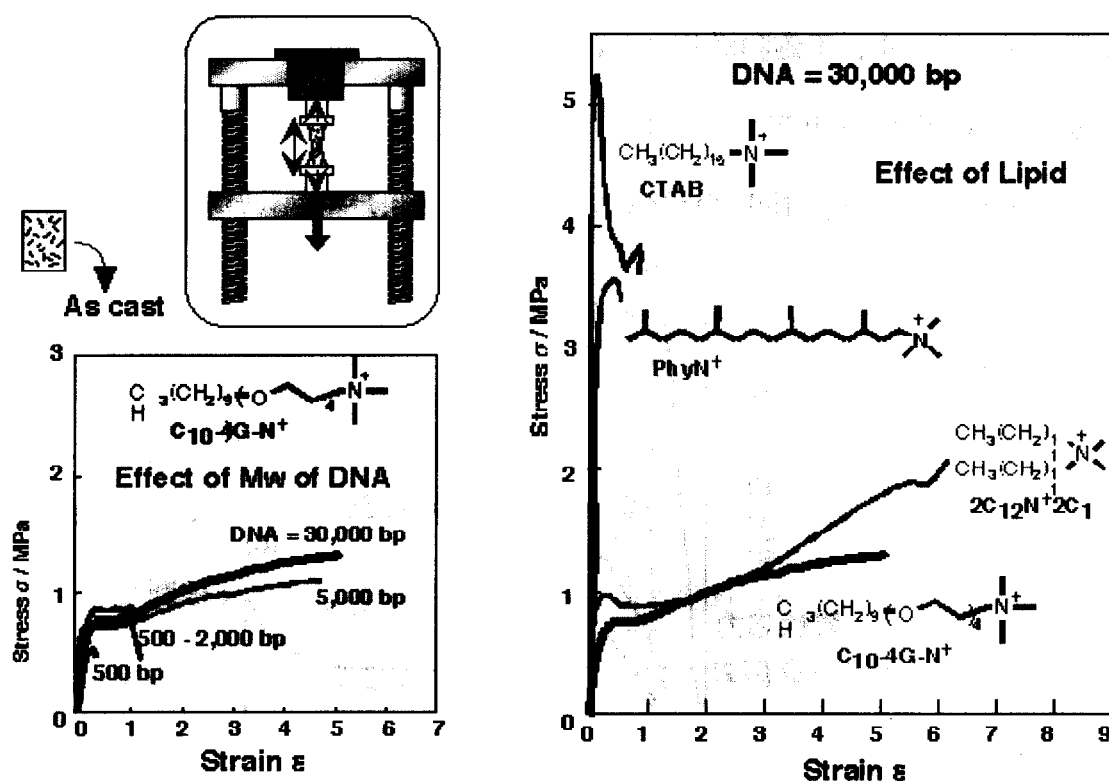


図 2-20. DNA-脂質複合体フィルムの応力-歪み曲線

(a) 分子量の効果、(b) 脂質の効果

次に、 $2C_{12}$ - N^+ - $2C_1$ / DNA 30,000 bp フィルムの延伸、湿度による効果と汎用ポリマーとの比較を図 2-21 に示す。延伸によってフィルムの強度は上がった (5 倍延伸フィルム)。しかし伸びに関してはあまり有意な差は見られなかった。

高湿度の条件で測定を行ったところ、フィルムの強度は低下したが非常に良く伸びるようになった。通常延伸フィルムを作製するときにはキャストフィルムをお湯の入った容器上で飽和水蒸気にさらし、数秒から数十秒間エージングした後に延伸すると良いことが示されているので、この結果は妥当だといえる。しかしこの結果より、DNA-脂質複合体フィルムは湿度の影響を非常に受けやすく、湿度によってその性質が大きく変わることが示された。実際にフィルムを材料として扱う際にはこの点が課題になるだろう。

DNA-脂質複合体フィルムと汎用ポリマーである低密度ポリエチレン (LDPE) とポリスチレン (PS) の stress-strain curve を比較すると、DNA フィルムはポリエチレンと同等もしくはそれ以上の強度があることがわかった。これは材料化に当たって非常に有利な点になると考えられる。

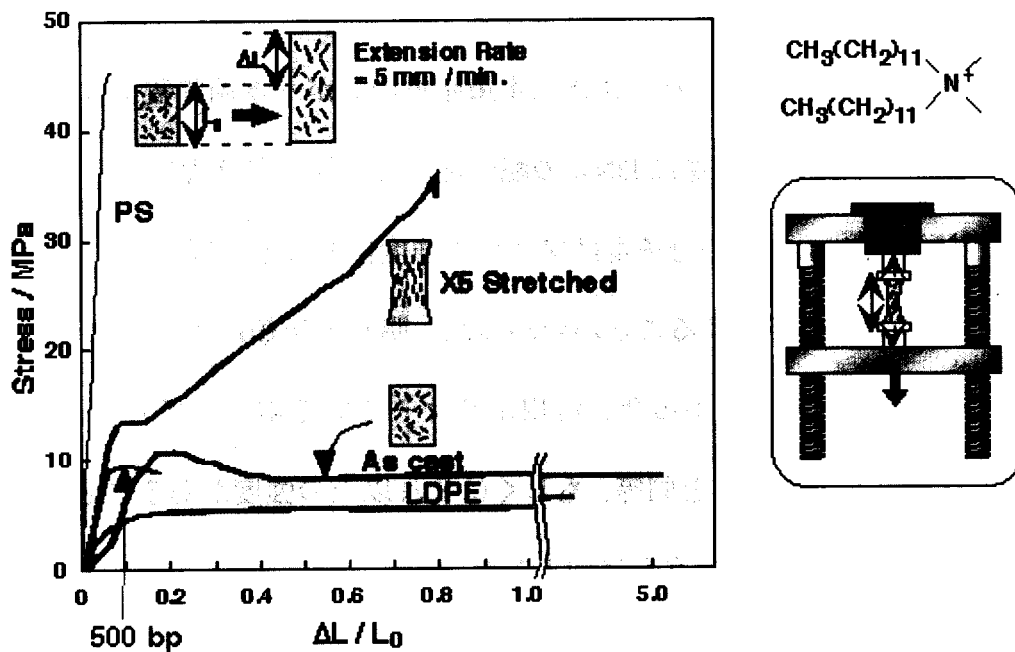


図 2-21. $2C_{12}\text{-N}^+\text{-}2C_1$ / DNA 30,000 bp の Stress-Strain Curve. 延伸・湿度の効果、汎用ポリマーとの比較

2-4. 総括

DNA の機能材料化を図るために DNA 配向化フィルムを作製し、その内部構造について解析し、力学的強度を評価した。

様々な脂質を用いて DNA-脂質複合体フィルムを作製したが、4 級アンモニウム塩を頭部に持ち、アルキル鎖がある程度の疎水性をもち、かつ会合しにくい C_{10} - C_{16} のものやエーテル結合や枝分かれ構造を持つ柔らかいものがフィルム作製に適していることがわかった。

X 線構造解析より、柔らかいアルキル鎖を持つ脂質を用いることでフィルム中の DNA-脂質複合体がヘキサゴナルにパッキングして一方向に配向した構造をもつ DNA 配向化フィルムが作れることがわかった。フィルム中の DNA ロッド間の距離と脂質のアルキル鎖の長さには相関関係があることがわかった。

偏光顕微鏡観察により、フィルムの延伸度 $\varepsilon = 4$ 以上で DNA の配向度は一定値になり十分であることがわかった。また二本鎖脂質の方が一本鎖脂質より DNA を配向しやすいこと、DNA の分子量は DNA の配向性には影響を与えないことがわかった。

引張り試験より、DNA の分子量はフィルム強度にあまり影響しないが、高分子量 DNA のフィルムの方が延びることがわかった。脂質の種類によってフィルムの強度に差がでるということもわかった。汎用ポリマーであるポリエチレンと比較しても DNA 配向化フィルムはそれと同等、もしくはそれ以上の強度があることがわかった。また延伸によってその強度はさらに向上した。

以降の章では、本章で透明で安定なフィルムを得ることができた一本鎖エーテル型脂質 C_{10} -4G- N^+ 、枝分かれのあるフィトール型脂質 Phy- N^+ 、一本鎖直鎖型 C_{16} - N^+ -3C₁、二本鎖直鎖型 2C₁₂- N^+ -2C₁ を用いて議論を進める。

第2章 参考文献

- 1) K. Ijiro and Y. Okahata, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1339 (1992)
- 2) K. Tanaka and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10679 (1996)
- 3) 田中健太郎, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
- 4) 小林琢也, 修士論文, 東京工業大学 (1997)
- 5) 中山元, 修士論文, 東京工業大学 (1999)
- 6) "偏光顕微鏡基本解説書", オリンパス光学工業株式会社編
- 7) "新高分子実験学 8, 高分子の物性 (1) 熱的・力学的性質", 高分子学会編, 共立出版 (1997)

第3章 DNA 配向化フィルムの導電性測定

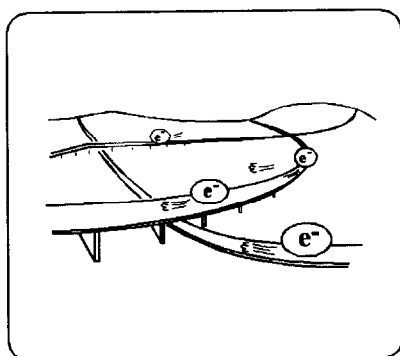
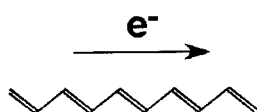
3-1. 緒言

現在高分子は様々な分野で利用されている。それは高分子が大きな分子量や直鎖状の構造などの特徴を持ち、物性面ではほかの材料では得難い性質を持つからである。従来の高分子の利用法としては物性面での特徴すなわち高分子性を生かした繊維や樹脂などの利用がほとんどであった。しかし合成技術の進歩により高分子に新たな官能基を加えることで、高分子本来の性質のほかに新たな機能を付加することが可能になった。高分子機能の1つの例として、白川による導電性高分子の発見が挙げられる。高分子は絶縁体の代表として扱われていたが、白川はポリアセチレンのフィルム化とドーピングによる絶縁体-金属転移を発見し^{1,2)}、分子設計や電子論の発展に伴い導電性を示す高分子を開発し導電性高分子という新しい領域を開拓し、2000年度のノーベル化学賞に輝いた。この様に高分子に新たな機能を付加し機能材料として用いることが現在の高分子研究の一つの流れとなっている。

第2章で述べたようにDNA-配向化フィルムは、機能としてはDNAの特性を維持しており、材料としてみても十分な力学的性質を有していることがわかった。また、薄膜内でDNAを配向化する技術も確立していることから、本章では機能材料としての可能性を検討する。第1章「序論」で述べたようにDNAの導電性は現在非常にホットなトピックであるが、手に持てる大きさの材料としてDNAの導電性を評価した研究は本研究が唯一のものであり、本研究によってDNAを導電性機能材料として用いるための突破口となる。

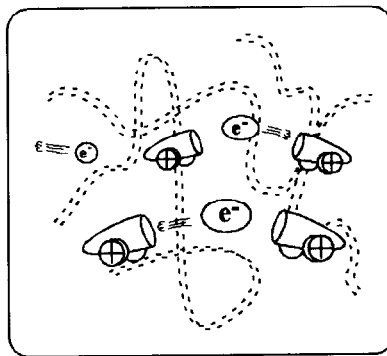
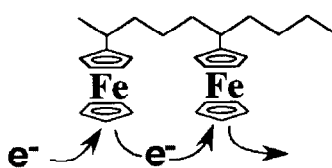
本章では、延伸によって一軸方向に DNA が配向した DNA-配向化フィルムの導電特性を評価した。具体的には、DNA の配向方向、DNA 鎖長、DNA を複合疎水化する脂質の構造などの違いがフィルムの導電性にどのように影響するか検討した。また DNA-脂質複合体フィルムの導電性が電子伝導かイオン伝導かのメカニズムについての検討を行った。導電性高分子における導電機構には一般に(a)電子伝導、(b)レドックス伝導、(c)イオン伝導の 3 つのメカニズムが知られている³⁾ (図 3-1)。本章では DNA-脂質複合体フィルムが導電性高分子としてどのような導電性メカニズムを示すかを解析する。

Electron Conduction



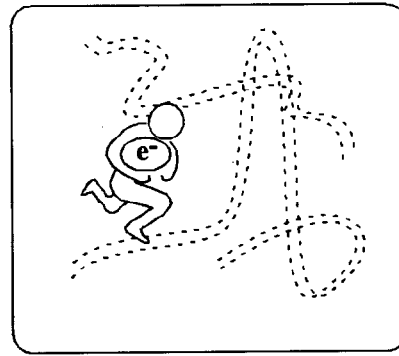
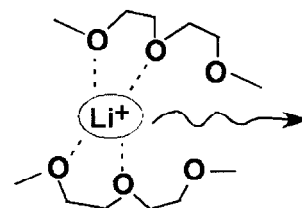
(a)

Redox Conduction



(b)

Ionic Conduction



(c)

図 3-1³⁾. 高分子における導電メカニズム。(a)電子伝導、(b)レドックス伝導、(c)イオン伝導

3-2. 実験方法

3-2-1. 電導度の算出方法とセル補正

電導度 σ は導電試料の抵抗値 R の逆数である。電導度の算出は電極に固定したフィルムに電圧を印加した際の応答電流値からフィルムの抵抗値をもとめて算出した。試料の抵抗は長さ d が増加すると増加し、断面積 A が増加すると減少する。従って、

$$R = \rho \times (d/A) \quad (1)$$

比例定数 ρ を試料の抵抗率という。電導度 σ は抵抗率の逆数なので、

$$\sigma = d/RA \quad (2)$$

σ の単位は $S\ cm^{-1}$ ($1\ S = 1\ \Omega^{-1}$) である。

電導度を直接セルのサイズ d と A から直接計算するのは、電流分布が複雑なため、信頼できない。そこで既知の伝導率を持つ試料 ($\sigma^* = 0.001408\ S/cm$, $0.01\ M\ KCl$ 水溶液⁴⁾) を使ってセルを補正し、(2)式の d/A をセル定数 C として、

$$0.001408 = C/R^* \quad (3)$$

から決定する。 R^* は KCl 水溶液の抵抗である。 C の単位は cm^{-1} である。同じセルで試料の抵抗が R ならば、電導度は

$$\sigma = C/R \quad (4)$$

となる。

本研究で用いた電極間隔 $300\ \mu m$ の電極ではこの方法でセル補正をおこなった。 $0.01\ M\ KCl$ 水溶液は $\sigma = 0.001408\ S\ cm^{-1}$ ($25\ ^\circ C$) が既知なのでこの値からセル定数を算出した。ブランク測定した電極に $0.01\ M\ KCl\ aq$ を数滴のせ、ガラスをかぶせてクリップに挟んだ。これを密封容器にセットし、常圧でポテンションスタットに接続した。定電圧を印加し、定常電流を測定した。電圧は $-100 \sim 100\ mV$ の範囲で 10 点前後とり、

I - V 直線をプロットし、直線の傾き $1/R$ からセル定数を算出した。セル定数 C は 2500 cm^{-1} ~ 10000 cm^{-1} の範囲になった。

電極間隔 $5\text{ }\mu\text{m}$ の電極では電極間隔が非常に狭くいため、 0.01 M KCl 溶液によって即座に電極間が導通してしまいセル補正が困難であった。そこでこの電極では(3), (4)式を用いてのセル補正をせず、金電極間隔 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、くしの幅が 2 mm 、金の高さが $1\text{ }\mu\text{m}$ 、くしが 65 対なのでフィルムが $65 \times 2 - 1 = 129$ 個の部分に密着しているとして以下の式より計算した。

$$\begin{aligned}\sigma &= (\text{応答電流値} / \text{印加電圧}) \times (\text{電極の断面積} / \text{くしの対の個数}) \\ &= (\text{応答電流値} / \text{印加電圧}) \times (5\text{ }\mu\text{m} \times 2\text{ mm} \times 1\text{ }\mu\text{m} / 129) \quad (5)\end{aligned}$$

3-2-2. DNA-脂質複合体キャストフィルムの櫛形電極上への固定化

DNA-脂質複合体フィルムの電氣的な性質を測定するために電導度の測定を行った。電導度の測定には第2章で述べたようにフィルム中のDNA-脂質複合体をもっとも安定にヘキサゴナル構造にする脂質である $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+$ 、 $2\text{C}_{12}\text{-N}^+\text{-2C}_1$ 、 Phy-N^+ 、 $\text{C}_{16}\text{-N}^+\text{-3C}_1$ を用い、DNA には分子量が大きい繊維状の $30,000\text{ bp}$ (長さおよそ $10\text{ }\mu\text{m}$) および粉末状の短い 500 bp (長さおよそ $0.17\text{ }\mu\text{m}$) を用いた。

本研究で電導度の測定に用いたくし形電極の写真を図3-2に示した。電極は金で、ガラスに蒸着されている複数本のくしがかみ合うようにして電極面積を稼いでいるため、シグナルを拾いやすい。電極間隔 $5\text{ }\mu\text{m}$ のくし形電極 (ビー・エー・エス社製) または電極間距離 $300\text{ }\mu\text{m}$ (東京農工大・大野研から頂いた) の2種類を用いた。

くし形電極は電極表面をメタノールでよく洗浄し、電極表面をピランハ溶液 (濃硫酸 : 過酸化水素 = 1 : 3, V/V) で5分間洗浄した後ミリポア水で洗い流す操作を2回

繰り返した。その後そのまま水をマウントして電極表面が空気にさらさないようにした。その後メタノール、クロロホルムの順に電極表面を洗浄し、電極表面がクロロホルムで濡れているうちにクロロホルム蒸気で飽和にした小シャーレ内でキャストフィルムを張り付けた。このキャストフィルムは未延伸のもの、3~4 倍延伸して十分に DNA を配向化させてフィルムをカットし、くし形電極くしを配向した DNA が垂直にまたいで橋渡しする方向 (⊥) およびくしと DNA が平行になる方向 (//)、未延伸のまま、の 3 種類を作成した。その後電極を半日デシケータ内で真空乾燥し、ホコリなどが付着しないようにシャーレ中で保存して電導度測定に用いた。測定の際にはカバー用のガラスをフィルムの上からかぶせてクリップで圧着固定してフィルムが電極に圧着されるようにして電導度測定に用いた。なお、くし形電極は光学顕微鏡で傷や汚れがないことをよく確かめ、キャストフィルムの固定化状態も観察した。

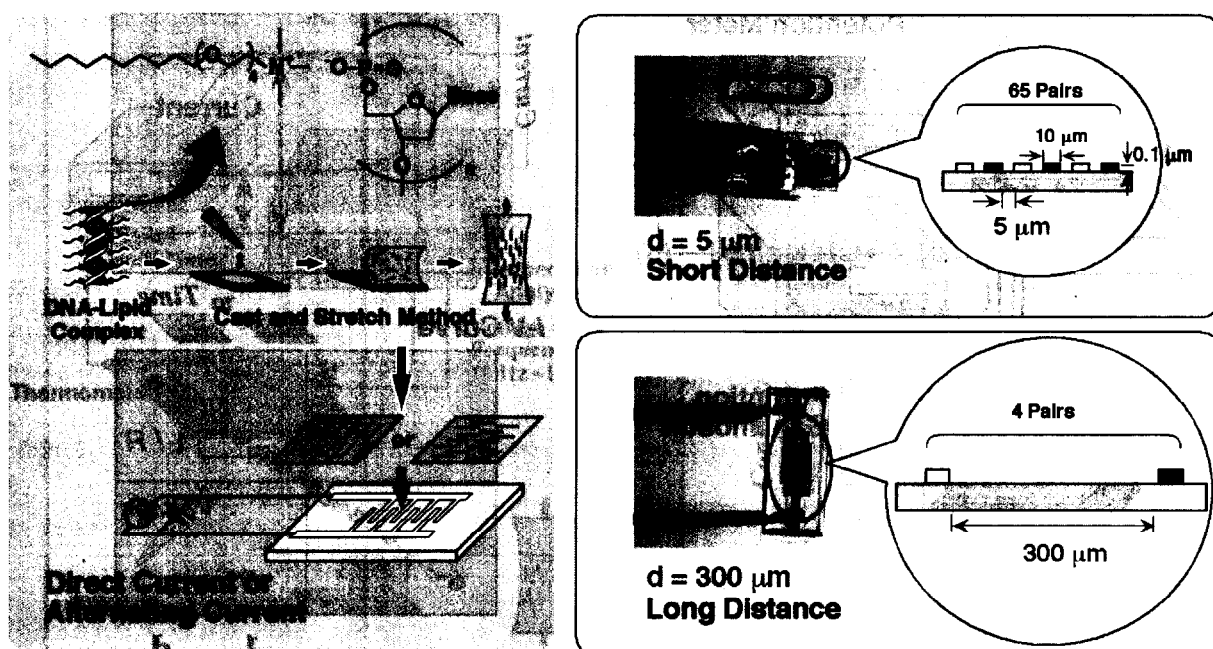


図 3-2. DNA-脂質複合体フィルムの電極への固定化

3-2-3. 直流法によるフィルムの電導度測定

電気伝導度測定の装置概略を図 3-3a に示した。3-2-1 節で作製したくし形電極の 2 端子をポテンションガルバノスタット（日厚計測社製 NPGFZ-2501-A）に接続し、印加電圧を変化させた際の応答電流の値を X-Y レコーダ（GRAPHTECH 社製 WX1100）に記録した。応答電流の時間変化を追跡し、定常電流が得られる場合、減衰電流が得られる場合いずれも一定値に達した時を電流値とした（図 3-3b）。電圧を変えた際の応答電流を I-V 曲線として記録し、傾きから抵抗値 R の逆数を得て、3-2-1 節の式(4)または(5)から電導度を求めた（図 3-3c）。すべての測定でくし形電極はピランハ洗浄後、フィルムを固定化していない状態であらかじめブランク測定し、電流が流れないことを確認した。またフィルムを固定化したくし形電極の電流測定の後、フィルムをクロロホルムで洗い流し、ピランハ溶液での洗浄によって再び電極のブランク測定を行い、電流が流れないことを確認した。

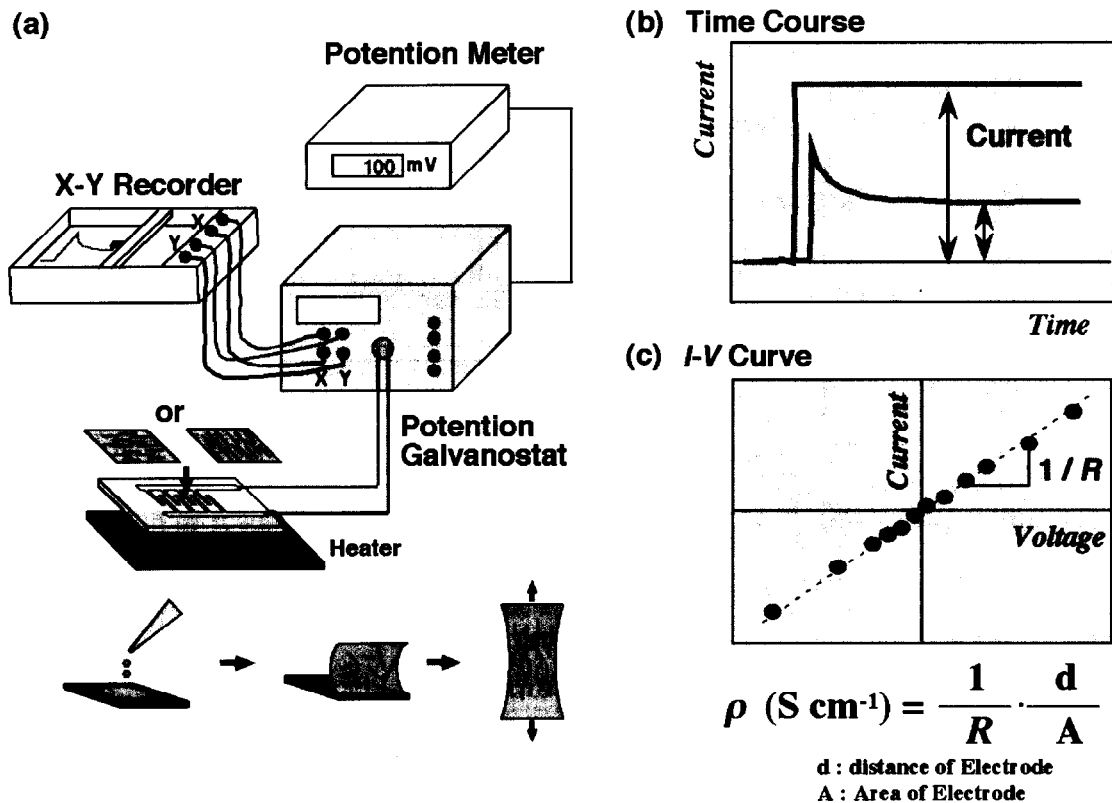


図 3-3. 直流測定の実験装置概略(a), 応答電流の時間変化(b), 電圧変化に対する応答電流値 (I-V 曲線)(c)

3-2-4. 交流法によるフィルムの電導度測定

交流測定ではインピーダンスアナライザーで印加する交流周波数を変え、電荷が見かけ上移動しなくなる抵抗値を測定する。イオン伝導のように大きな電子種が移動するメカニズムを持つ試料に有効な手法である。図 3-4a に示すようにインピーダンスアナライザー（Schlumberger 社製 SI 1260）を用いて印加電圧 1V、交流周波数を 10Hz~10MHz まで変化させた際のインピーダンスの大きさを実軸、虚軸平面上のベクトルとしてコール・コールプロットを描き、その際の半円の虚数成分がゼロになる点から抵抗値を求めた⁵⁾（図 3-4b）。この抵抗値を温度に対してプロットすると、通常のイオン伝導では電子種の振動が温度に依存するため直線に傾きが見られる（図 3-4c）。一方電子伝導のように電子種が温度に依存しない挙動を示す試料では傾きのない直線が得られる。電極は温度コントローラに接続し、25℃~60℃で測定した。

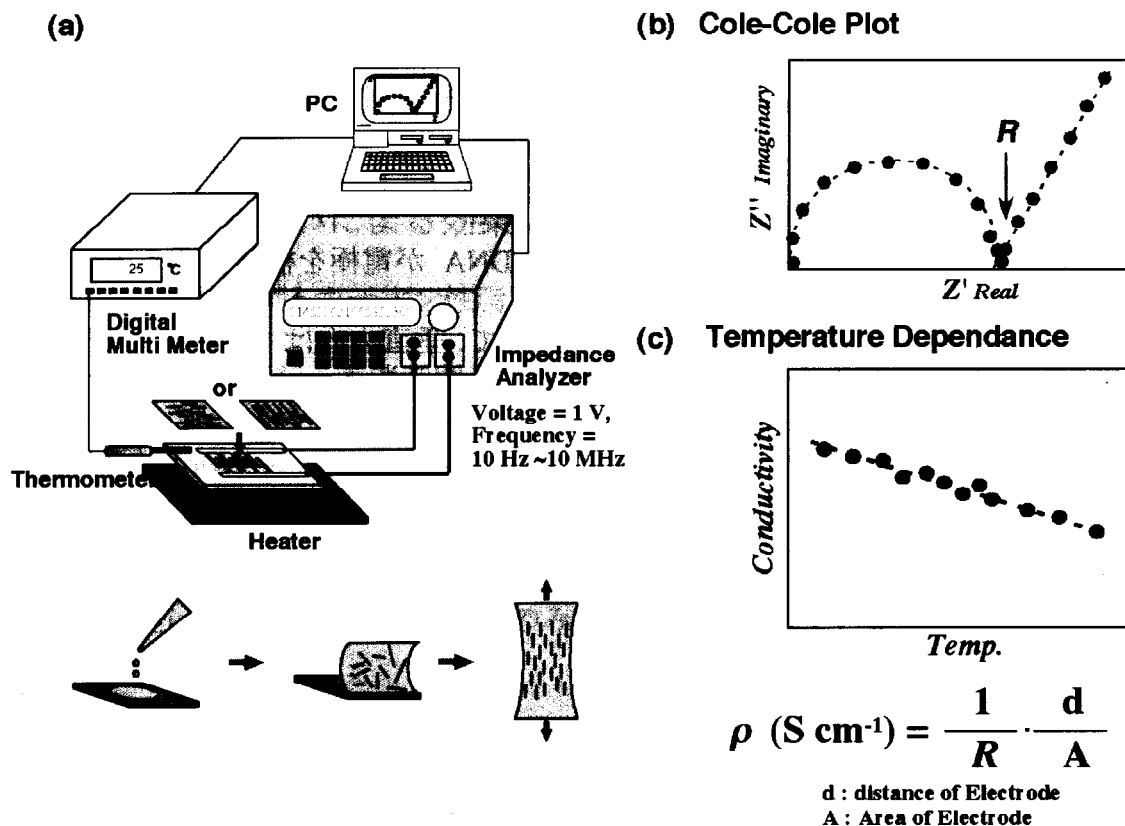


図 3-4. 交流測定の実験装置概略図(a), インピーダンスの Cole-Cole プロット(b), 温度変化に対する電導度の対数プロット（アレニウスプロット）(c)

3-3. 結果と考察

3-3-1. 延伸の効果

電極間隔 5 μm の電極に直流を印加した際の結果を図 3-5 に示した。この電極間隔では 30,000 bp の DNA がまっすぐになるとおよそ 10 μm あるので、5 μm の電極間を直接橋渡しできる距離になっている。

常温 25 $^{\circ}\text{C}$ で DNA 鎖が電極を垂直に橋渡しする方向 ($\perp$) に配向させた場合、50 mV の直流印可に対して mA オーダーの定常電流が流れた。DNA 鎖が電極を橋渡ししない平行方向 ($\parallel$) にはほとんど電流が流れなかった。イオン伝導のように電極間で電子種の飽和がおこっていれば時間的には減衰するが、この時間的に一定の電流が流れる挙動は常に電子種が供給されていること、すなわち電子移動の挙動であると考えられる。

印加電圧を 5 mV から 100 mV まで変えると、得られる電流値は電圧に比例するオーミックな挙動となった。この傾きから抵抗値の逆数 $1/R$ をもとめ、これより電極間距離と電極面積で補正して電導度をもとめた。DNA が電極を橋渡しする方向では $5.4 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ と大きな電導度を得られたのに対して、垂直方向は $10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ 以下と、500 倍以上の異方性が得られた。

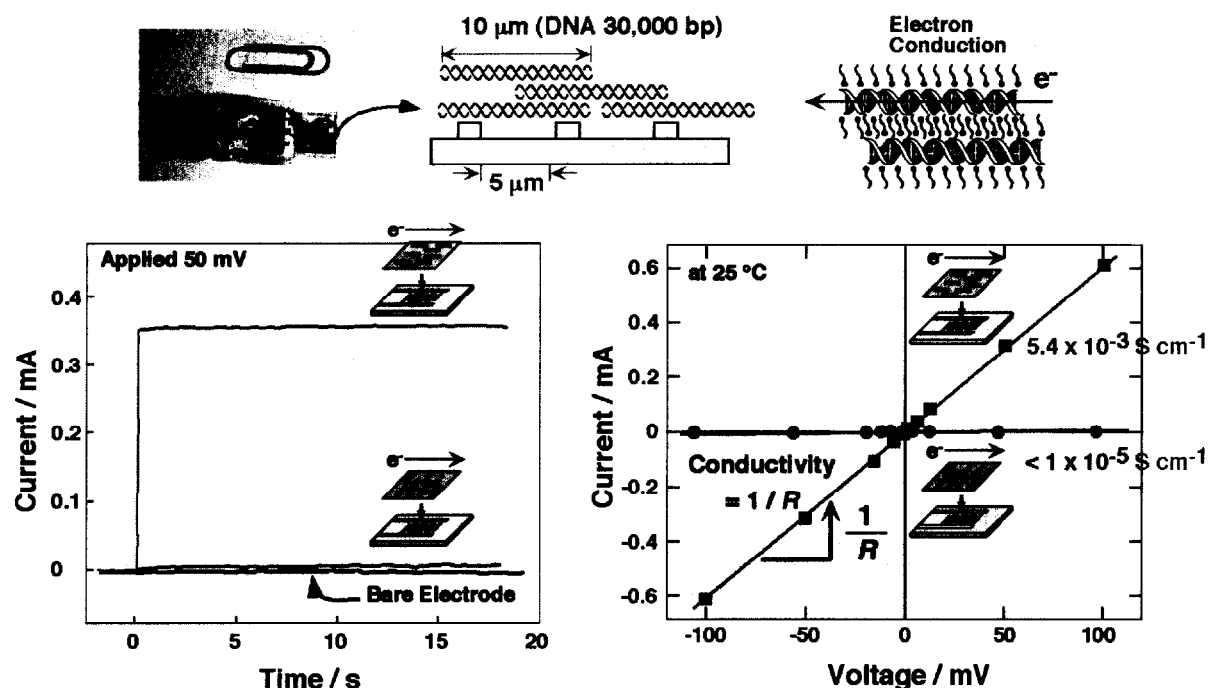


図 3-5. 5 μm くし形電極を用いた際の $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+ / 30,000 \text{ bp}$ 配向化フィルムに直流電圧を印加した際の電導挙動

3-3-2. 脂質の違いによる効果

DNA を疎水化するカチオン性脂質を変えた場合について検討した結果を図 3-6 に示した。脂質構造を一本鎖脂質、二本鎖脂質、枝分かれのある脂質、と変えた場合でも 3-3-1 と同じように減衰しない大きな定常電流が流れた。それぞれの電導度はいずれも $4 \sim 7 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ とほぼ同程度の値となったことから、脂質構造の違いによる電導度の差はなく、電導度は DNA のみによって決まっていると考えられる。

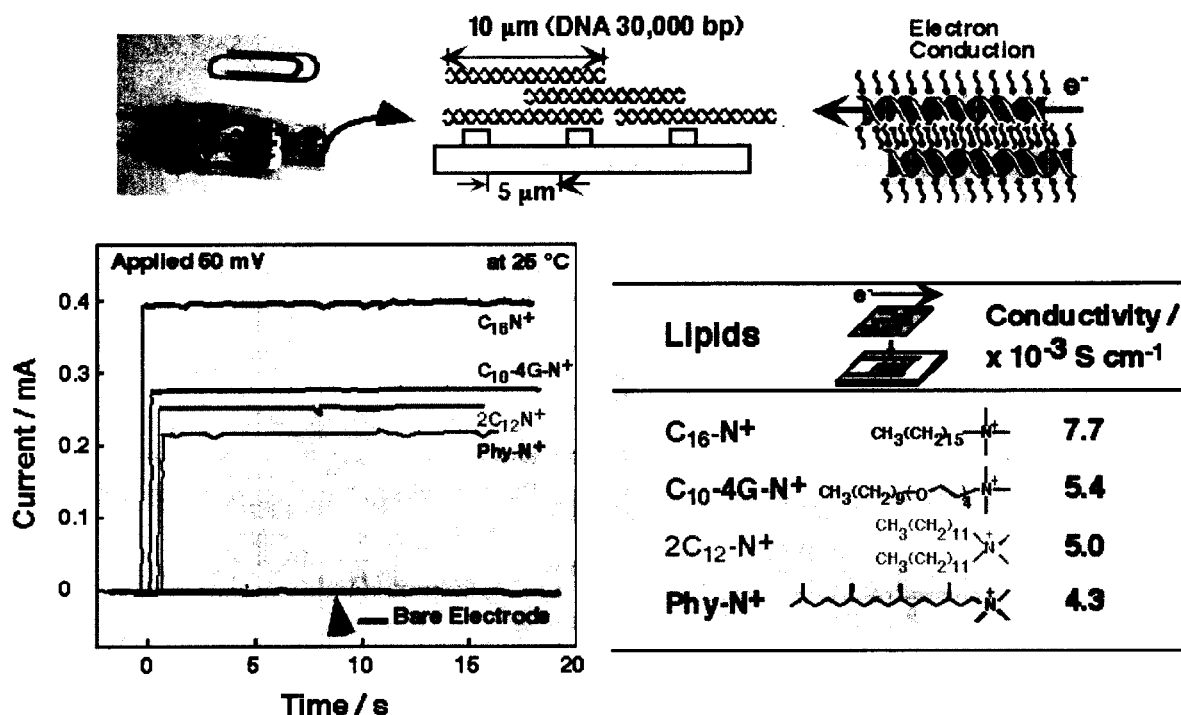


図 3-6. 30,000 bp DNA-配向化フィルムに直流電圧を印加した際の脂質の違いによる効果. 5 μm の電極を用いた.

3-3-3. 電極間隔の効果

電極間隔 300 μm の電極に直流を印可した際の結果を図 3-7 に示した。この電極は DNA1 分子がおよそ 10 μm あるにも関わらず、300 μm の電極間を橋渡しできない距離になっている。

500 mV の直流を印加すると非常に小さい nA の電流が流れ、わずか数秒で減衰した。これは短時間のうちに電極間で電子種の移動が終わっていることを示している。この挙動はおそらく DNA のリン酸に付加したカチオン性脂質やごく少量残った Na イオンなどを介したイオン伝導であると考えられる。印加する電圧を 100, 200, 300 mV と変えると、得られる電流値は電圧に比例するオーミックな挙動となったが、得られた電導度をもとめると $2.9 \times 10^{-7} \text{ S cm}^{-1}$ となり、3-3-1 の 5 μm の電極の場合と比べて約 10^4 低下する非常に小さい電導度しか得られないことがわかった。

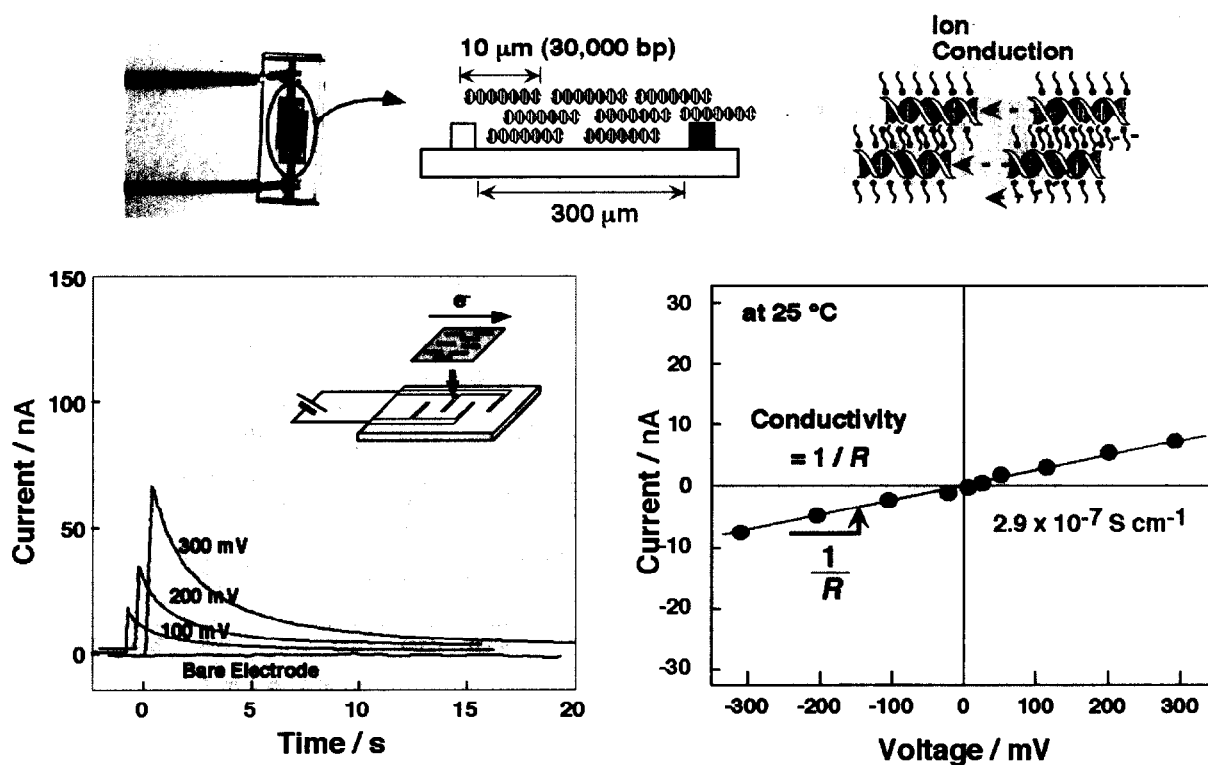


図 3-7. 電極間隔の大きい 300 μm のくし形電極を用いた効果. C_{10} -4G- N^+ /30,000 bp DNA-配向化フィルムに直流電圧を印加した際の電導挙動.

3-3-4. DNA 鎖長の効果

次に DNA の分子量が 500 bp と短いものを用いた際の結果を図 3-8 に示した。この低分子量 DNA が最大限まっすぐに伸びてもおよそ 0.17 μm で、5 μm の電極間を直接橋渡しすることはできない。300 mV の直流を印加すると、3-3-1 の高分子量の実験では mA オーダー大きな定常電流が流れたのとは対照的に、非常に小さい μA の電流が流れ、わずか数秒で減衰した。これは短時間のうちに電極間で電子種の移動がおわっていることを示している。この挙動は 3-3-3 と同様に DNA のリン酸に付加したごく少量残った Na^+ イオンなどを介したイオン伝導であると考えられる。印加電圧を変えて、得られた電導度をもとめると、 $4.1 \times 10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ となり、3-3-1 の高分子量 DNA の場合と比べて 10^3 も小さくなった。

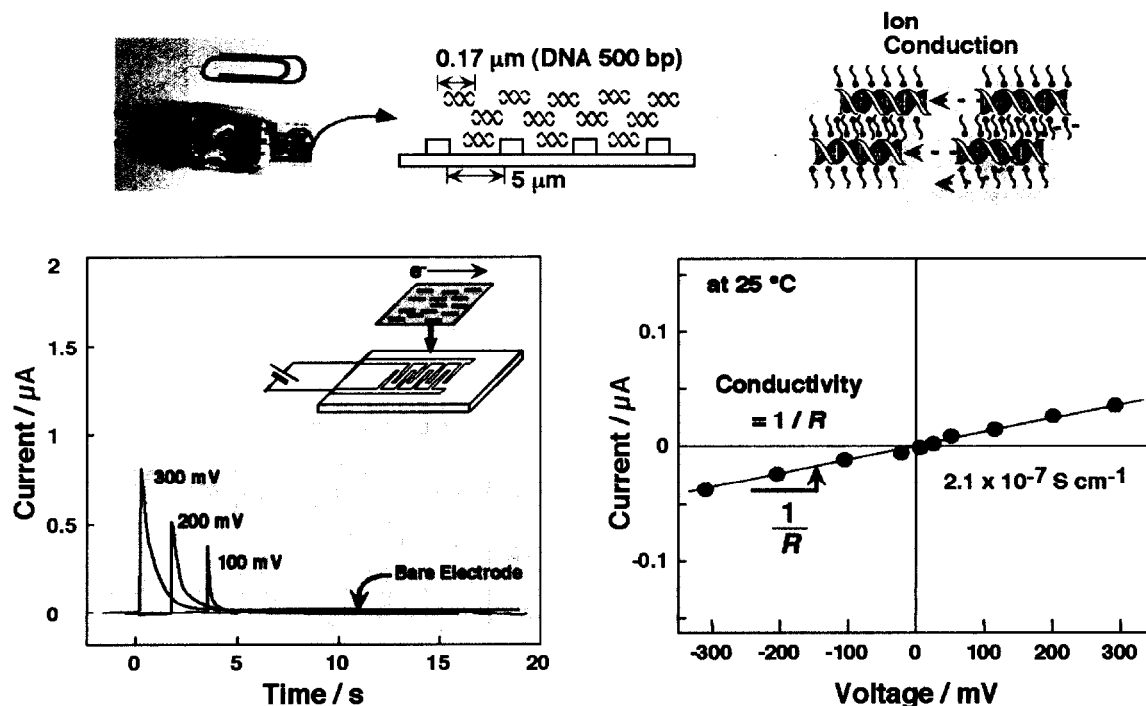


図 3-8. DNA 分子量の効果. C_{10} -4G- N^+ / 500 bp 配向化フィルムに直流電圧を印加した際の電導挙動. DNA 500 bp は分子鎖長約 $0.17 \mu\text{m}$ 、くし形電極は $5 \mu\text{m}$ のものを用いた.

3-3-5. 交流法による測定結果

1) 電極間隔 $5 \mu\text{m}$ での測定

電極間隔 $5 \mu\text{m}$ の電極に交流を印加した際のインピーダンス測定の結果を図 3-9 に示した。インピーダンスアナライザーで振幅電圧 1V の交流を印可し、周波数を 10Hz から 10MHz まで変えた。各温度でコール・コールプロットを描き、ある周波数でインピーダンスの虚数成分が 0 になる点での実数値を抵抗値 R とした。

30,000 bp の長い DNA が電極間を橋渡しする方向にフィルムを固定した場合は、コール・コールプロットは虚数成分をほとんど持たず、実数成分のほぼ一点に収束する挙動となった。これよりこのインピーダンスはコイルやコンデンサのような振動成分をほとんど持たず、金属的な抵抗体であることを示す。この時の抵抗値は $10^2 \Omega$ となり、 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ と温度変化しても全く変化が見られなかった。

一方 DNA 鎖が電極を橋渡ししない垂直方向では典型的なコールコールプロットが描け、この挙動はイオン伝導特有のコンデンサと抵抗体が並列の回路に帰属できた。この時の抵抗値は $10^2 \text{ k}\Omega$ と非常に大きく、温度上昇とともに抵抗値が減少するという温度依存性が見られた。

抵抗値 R の逆数から電導度を算出し、温度に対して対数プロットしたグラフより、DNA が電極を橋渡しする方向の電導度は、 $20 \sim 60^\circ \text{C}$ の温度領域で全く温度依存性がなかった。この電導度は $1.4 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ となり、3-3-1 の直流測定で得られた電導度とも良く一致した。一方垂直方向では 25°C で $1.9 \times 10^{-7} \text{ S cm}^{-1}$ 以下となり、数 1000 倍の異方性を得られた。

DNA が配向した方向のみで温度に依存しない大きな電導度を得られたことから、ここでも DNA 鎖内での電子伝導の挙動が見られたものと考えられる。

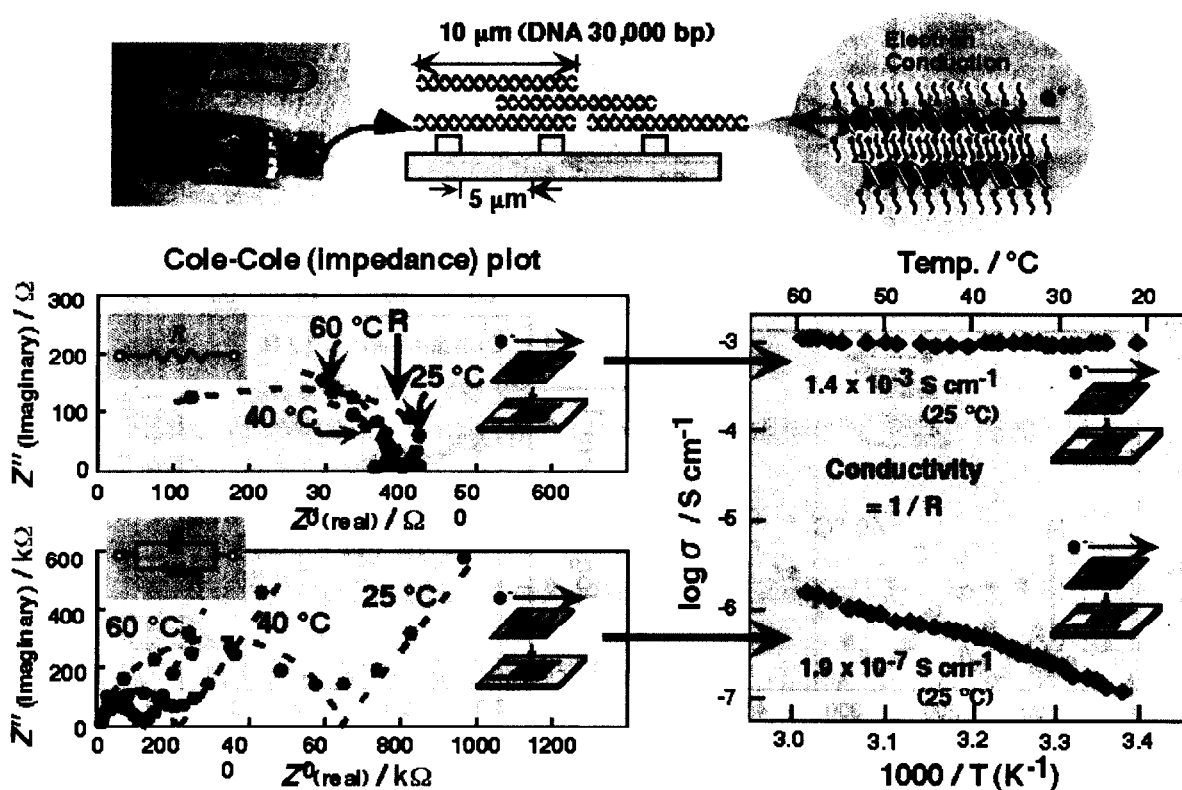


図 3-9. $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+ / 30,000 \text{ bp}$ 配向化フィルムに交流電圧を印加した際の電導挙動。くし形電極は $5 \mu\text{m}$ のものを用いた。

2) 電極間隔 300 μm での測定

電極間隔 300 μm の電極に交流を印可した際の結果を図 3-10 に示した。この電極は DNA1 分子では電極間を橋渡しできない距離になっている。

コール・コールプロットから、25 $^{\circ}\text{C}$ 、40 $^{\circ}\text{C}$ 、50 $^{\circ}\text{C}$ と温度を変えると抵抗値が減少する、すなわち電導度が上昇するという温度依存性が見られた。

電導度を温度に対して対数プロットすると、DNA が電極を橋渡しする方向、垂直方向ともに伝導度は $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ オーダーであり異方性がほとんど見られなかった。またこの値は直流測定で得られた伝導度ともほぼ一致した。

DNA の配向に関係なく温度に依存した小さな電導度が得られたことから、DNA 鎖内ではなく DNA 鎖間を飛ぶイオン伝導がおこっており、高温になると電導度が大きくなるのはイオンの振動が大きくなっているためと考えられる。

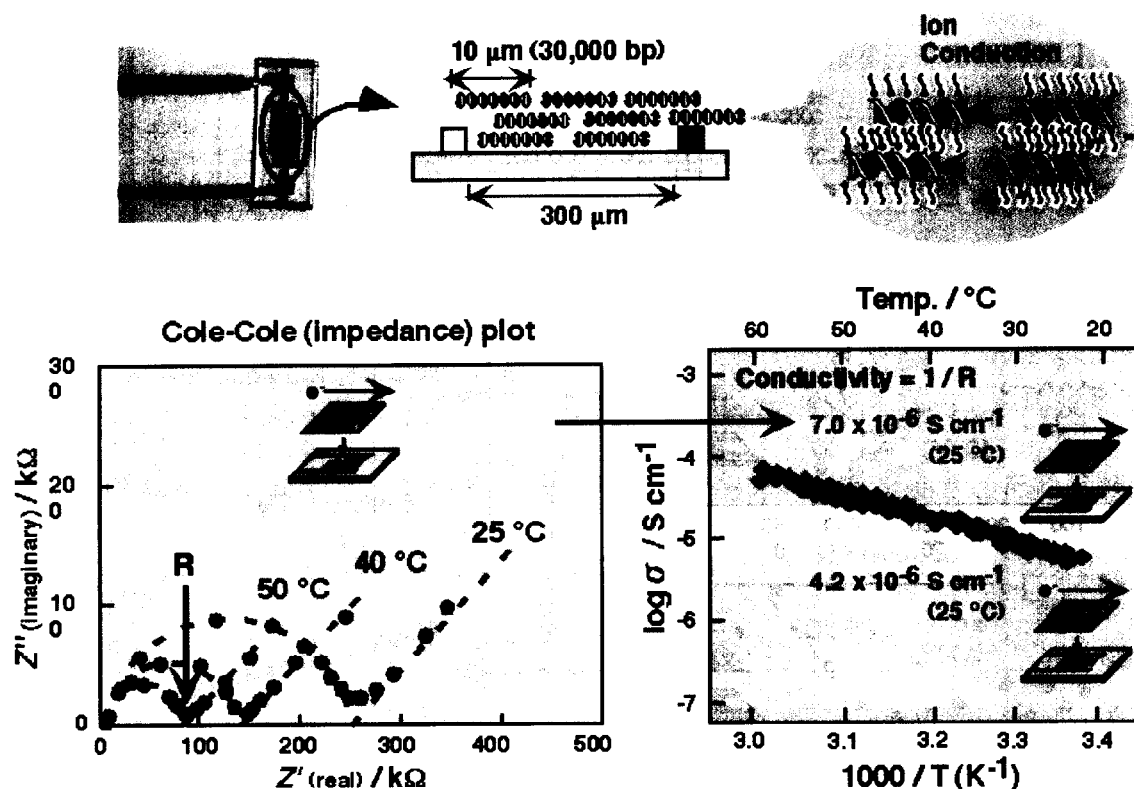
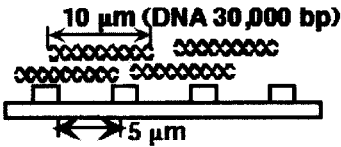
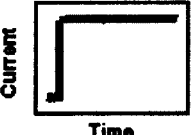
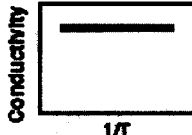
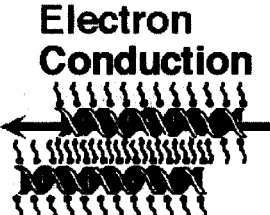
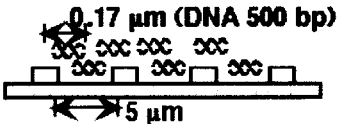
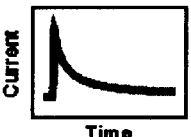
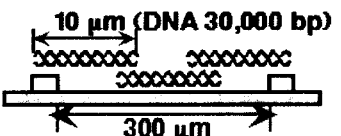


図 3-10 $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+$ / 30,000 bp 配向化フィルムに交流電圧を印加した際の電導挙動。
くし形電極は 300 μm のものを用いた。

3-4. 総括

本章で得られた結果を表 3-1 にまとめた。

表 3-1 DNA 配向化フィルムの電導メカニズム. 30,000 bp DNA = 約 10 μm 、500 bp DNA = 約 0.17 μm .

Electrode Distance	Conductivity / S cm^{-1}		
	Direct	Alternating	
	10^{-3} 	10^{-3} 	Electron Conduction 
	10^{-7} 	10^{-6} 	Ion Conduction 
			

電極間隔 5 μm の電極に 30,000 bp の長い DNA が電極間を垂直に橋渡しする方向にフィルムを固定した場合、直流印加に対しては大きな定常電流が流れ、交流を印加すると温度依存性がなく、DNA の配向方向のみに電導度が見られた。以上よりこの挙動は DNA 鎖 1 分子内での電子移動であると考えられる。

一方、500 bp の短い DNA を用いた場合、DNA をくしと平行に配向させた場合、300 μm の大きい電極を用いた場合においては、DNA 分子が電極間を橋渡しできなくなって、直流を印加すると減衰してゆく微小電流が流れ、交流を印加すると温度に依

存して電導度が上昇することから、イオン伝導の挙動が観察できた。

以上のように、本章では電極間隔を大きくしたり小さくすることによって DNA 分子内での電子伝導挙動を $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ と決定し、DNA 分子間のイオン伝導挙動を $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ と決定した。分子内、分子間における電導度の大きさと導電性メカニズムをそれぞれ区別して議論することができた。

第3章 参考文献

- 1) H. Shirakawa, E. J. Louis, A. G. MacDiarmid, C. K. Chiang, and A. J. Heeger, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 578 (1977)
- 2) 白川 英樹, “季刊 化学総説”, **42**, 120 (1983)
- 3) 青木, 微小電極を用いる電気化学測定法, 電子情報通信学会
- 4) 伊藤 香織, 学位論文, 東京農工大学 (1997)
- 5) 緒方 直哉, 導電性高分子, 講談社サイエンティフィック (1990)

第4章 DNA 配向化フィルムの熱物性と電導度の温度依存性

4-1. 緒言

第3章で述べたように、DNA 配向化フィルムは常温から 60° C までの範囲で DNA 分子内では温度依存性のない電子伝導挙動（電極 5 μm の結果）を示し、DNA 分子間では温度と共に増加するイオン伝導挙動（電極 300 μm の結果）を示した。この DNA 配向化フィルム導電性の温度特性は、常温から 60° C までの温度範囲では導電性材料として応用できる可能性を示した。しかし材料としての評価では、より高温、または常温よりも低温側での電導性の測定およびフィルムそのものの安定性が求められる。第2章で述べたように DNA 配向化フィルムは常温では材料として応用するに十分な力学的強度を持っているが実用的な材料化を進めるにあたって熱的な安定性も求められる。本章では、DNA 配向化フィルムの熱物性の評価と電導度の温度依存性を調べた。

これまで田中により DNA-脂質複合体を有機溶媒に溶解して UV スペクトルの温度依存性が調べられている¹⁾。DNA-脂質複合体は Native DNA よりも高い温度で濃色効果を示したことから複合体にすることにより二重鎖が安定になることが確認された。また小林によってキャストフィルムの温度をかけた際の力学的評価として動的粘弾性が調べられた²⁾。この測定により未延伸のフィルムよりも延伸して DNA が配向したフィルムの方が安定であることがわかった。

本章では電導度の温度依存性を調べるため、より詳細なフィルムの熱的な物性を

調べた。具体的には、導電度に大きく影響すると思われる DNA の配向がどの程度安定かを定量的に検討した。

まず DNA-脂質複合体の延伸フィルム中の DNA 鎖の配向の熱的な安定性について調べた。フィルムをホットステージの上に置き、偏光顕微鏡と組み合わせて異方性の温度依存性を調べた。つぎに材料の熱的な物性の解析の基礎である DSC 測定を行った。また、フィルムに熱をかけながら UV スペクトルの測定を行うことによって、DNA 二重鎖の安定性について追跡することにした。最後に、フィルムの熱的および力学的な性質を合わせて調べるため、フィルムの動的粘弾性についても評価した。

これらの熱的な物性の結果を踏まえて、常温よりも高温側、低温側の DNA 配向化フィルムの電導度を測定し、物性が電導度にどのように影響するかを調べた。

4-2. 実験方法

4-2-1. 偏光顕微鏡による配向度の温度依存性の測定

フィルム中の DNA 配向度の温度変化を調べた。フィルムを延伸度 $\varepsilon = 5$ （もしくは延伸できる最大のところ）まで延伸し、その状態でスライドガラスに固定した。ホットステージ（メトラー・トレド社製）を用いてサンプルの温度を $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ で上げていき、 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ごとに偏光顕微鏡でその複屈折の値を調べた（図 4-1）。

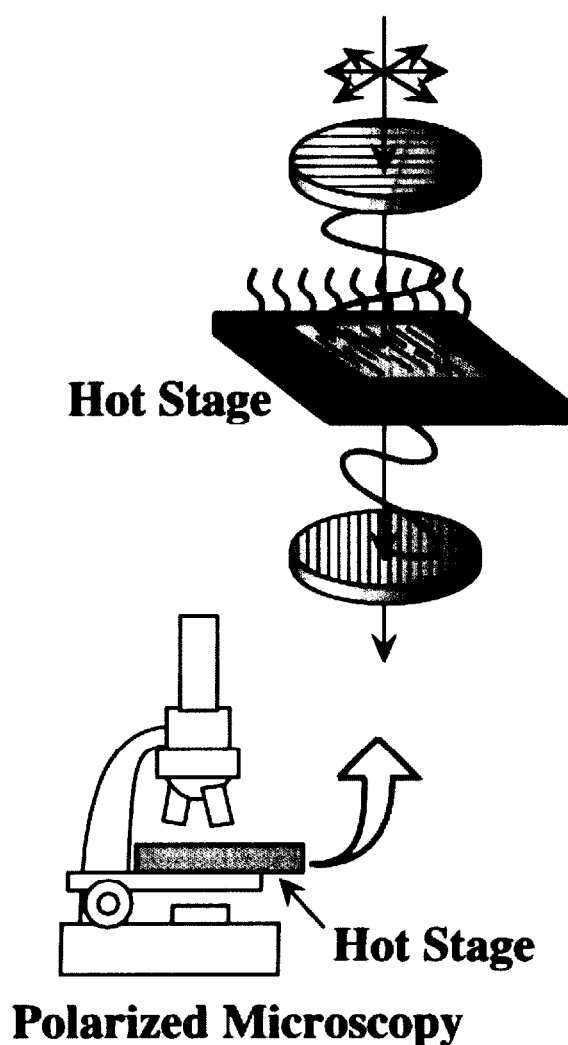


図 4-1. 偏光顕微鏡とホットステージを組み合わせた実験装置

4-2-2. DSC 測定

DSC 測定は DSC-120 示差熱走査熱量計（セイコー電子製）を用いて行った。サンプルの封入には専用のアルミパン AL15-CAPSULE（セイコー電子製）を用い、サンプルの密着のためにコンプレックス溶液を直接アルミパンにキャストし、脱水による効果をのぞくためにアルミパンごと数時間真空乾燥した。何も封入していないアルミパンをリファレンスとした（図 4-2）。測定の温度条件は 5～210 °C で昇温速度は 5.0 °C/min. とした。

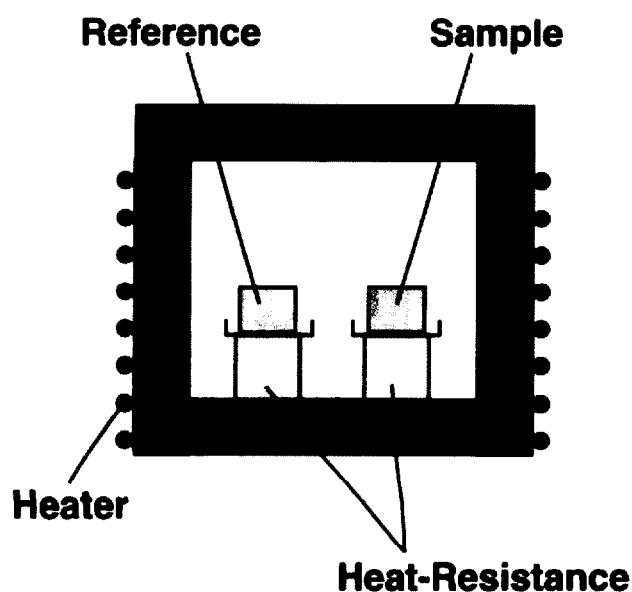


図 4-2. DSC 測定装置

4-2-3. スペクトル測定

UV スペクトル測定は Photol IMUC-7000（大塚電子製）を用いて行った。石英板（1 × 4 cm）にコンプレックス溶液を直接キャストし、ホットステージを用いてサンプルの温度を上げながら、10 °C ごとに 200～400 nm の吸光度を測定した。また DNA を水溶液から石英板にキャストし、同様の測定を行うことによってリファレンスとした。

4-2-4. 粘弾性測定

力学的な性質を調べる一般的な方法として、測定したい物質に外部から力を加え、その変形の度合いがどうなるかを調べる方法がある³⁾。例えばゴムやバネのような物質に応力を加えるとフックの法則が成立する。

$$S = E \gamma \quad (1)$$

すなわち変形の度合い（バネならばバネの伸び） γ は応力 S に比例する。またこの比例定数 E を弾性率と呼ぶ。ここで使った弾性率とは一般的には物質の変形のしにくさを表す量である。理想的な弾性体であれば応力を加えると変形が瞬間的に起こり、なくなると瞬間的に変形が消失することになる。

また粘性の高い液体について、応力をかけると流動を起こし、応力をのぞいても回復が起きない。高分子溶液のような粘性体では以下の式が成立する。

$$S = \eta \frac{d\gamma}{dt} \quad (2)$$

応力によって系に蓄えられたエネルギーが総て力学的エネルギーとなって放出できる弾性体と比べて、粘性体では加えたエネルギーは熱エネルギーとなって散逸する。

以上挙げた式は、両者とも理想的な挙動を示す物質についてであり、実際の高分子はもっと複雑な挙動を示す。例えばボールを地面に落としたときの例を考えると、ボールは地面に当たって跳ね返り（弾性体としての挙動）、完全には元の高さには戻らずやがて制止する（粘性体としての挙動）。従って通常物質であれば弾性体と粘性体の両方の挙動を示し、これを粘弾性体と呼ぶ。このような高分子の実際の粘弾

性挙動を説明するためにいくつかのモデルが考え出されてきた。その中でも一般的でよく研究されているモデルとして Maxwell モデルが挙げられる。ここであげた Maxwell モデルはあまり大きくない変形について成立する。Maxwell モデルでは弾性要素を表すバネと、粘性要素を表すダッシュポットが直列に連結されている（図 4-3）。

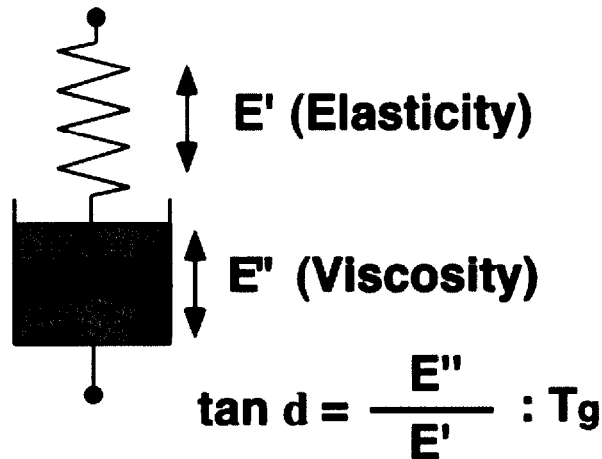


図 4-3. Maxwell モデル

Maxwell モデルで近似できる物質の粘弾性挙動は、全変形量が弾性変形と粘性流動との和になる。

ここである物質に正弦的に変化する応力 $S = S_0 e^{i\omega t}$ を与えることを考える。理想的弾性体であれば変形 γ と変形速度は以下の式で与えられる。

$$\gamma = \frac{S_0}{E} e^{i\omega t} \quad \frac{d\gamma}{dt} = i\omega \frac{S_0}{E} e^{i\omega t} \quad (3)$$

変形の挙動は応力と同位相で変形速度は 90° 進んだ位相を持つ。

また理想的粘性体（例えばニュートンの粘性法則 $\frac{d\gamma}{dt} = \frac{S}{\eta}$ が成立するようなニュートン液体）に正弦的応力を与えると変形と変形速度は以下ようになる。

$$\gamma = -i \frac{S_0}{\eta\omega} e^{i\omega t} \quad \frac{d\gamma}{dt} = \frac{S_0}{\eta} e^{i\omega t} \quad (4)$$

この場合変形速度が応力と同じ位相を持ち、変形挙動は応力より 90° 遅れる。

次に Maxwell モデルで近似した場合、この物質に正弦的な変形 $\gamma = \gamma_0 e^{i\omega t}$ を与えると応力は以下の式のようにになる。

$$S = E \frac{\omega^2 \tau^2 + i\omega\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \gamma = S' + iS'' \quad \left(\tau = \frac{\eta}{E} \right) \quad (5)$$

これは応力が変形に対して同じ位相を持った実数部 S' と、位相が 90° 進んだ虚数部 S'' とからなり全体としては変形よりも δ だけ位相が進む。ただし δ は以下の式で定義する。

$$\tan \delta = \frac{S''}{S'} = \frac{1}{\omega\tau} \quad (6)$$

応力と変形の比として弾性率を定義すると、この場合の弾性率は複素数となり角周波数 ω の関数である。

実際の粘弾性測定は、フィルム型のサンプルの時はフィルムがたるまない程度にひっぱりをあらかじめ与えておき、ここに強制的に周波数 ω 、最大振幅 γ_0 の正弦振動ひずみを与えることで行う（強制振動法）。応答として得られる応力は Maxwell モデルの応力とひずみの関係から

$$S = \gamma_0 \{E' \sin(\omega\tau) + E'' \cos(\omega\tau)\} \quad (7)$$

$$E' = \frac{\omega^2 \tau^2}{1 + \omega^2 \tau^2} E, \quad E'' = \frac{\omega \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} E$$

と表される。実際に得られる値は E' と E'' であるがそれぞれを貯蔵弾性率、損失弾性率と呼ぶ。定性的には貯蔵弾性率 E' は硬さを表し、損失弾性率 E'' は軟らかさを表す。すなわち固いフィルムでは E' が大きくなり、柔らかいフィルムは E'' が大きくなる。また損失弾性率 E'' と貯蔵弾性率 E' との比を損失正接と呼び、前出の δ と以下のような関係がある。 $\tan \delta$ は定性的には両者のバランスを表し、DSC 測定での T_g に相当する。

$$\tan \delta = E'' / E' \quad (8)$$

実際の粘弾性測定は大日本インキ株式会社総合研究所にて Solids Analyser RSAII (Rheometrics 製) を用いて測定した。図 4-4 に装置の概略図を示す。フィルムのサンプルは 0.5×4 cm の大きさに切って測定装置にとりつけた。図のようにフィルムをたるまないように固定し、片側のチャックに強制的に振動（正弦的に変化する応力）を与えて、その応力がもう一方にどのように伝わるかを測定し記録した。なお測定周波数は 1 Hz で昇温速度は $4^\circ\text{C} / \text{min.}$ で測定した。未延伸フィルムと延伸フィルムについて測定を行い、延伸フィルムとしては 3 倍延伸のものを用了。

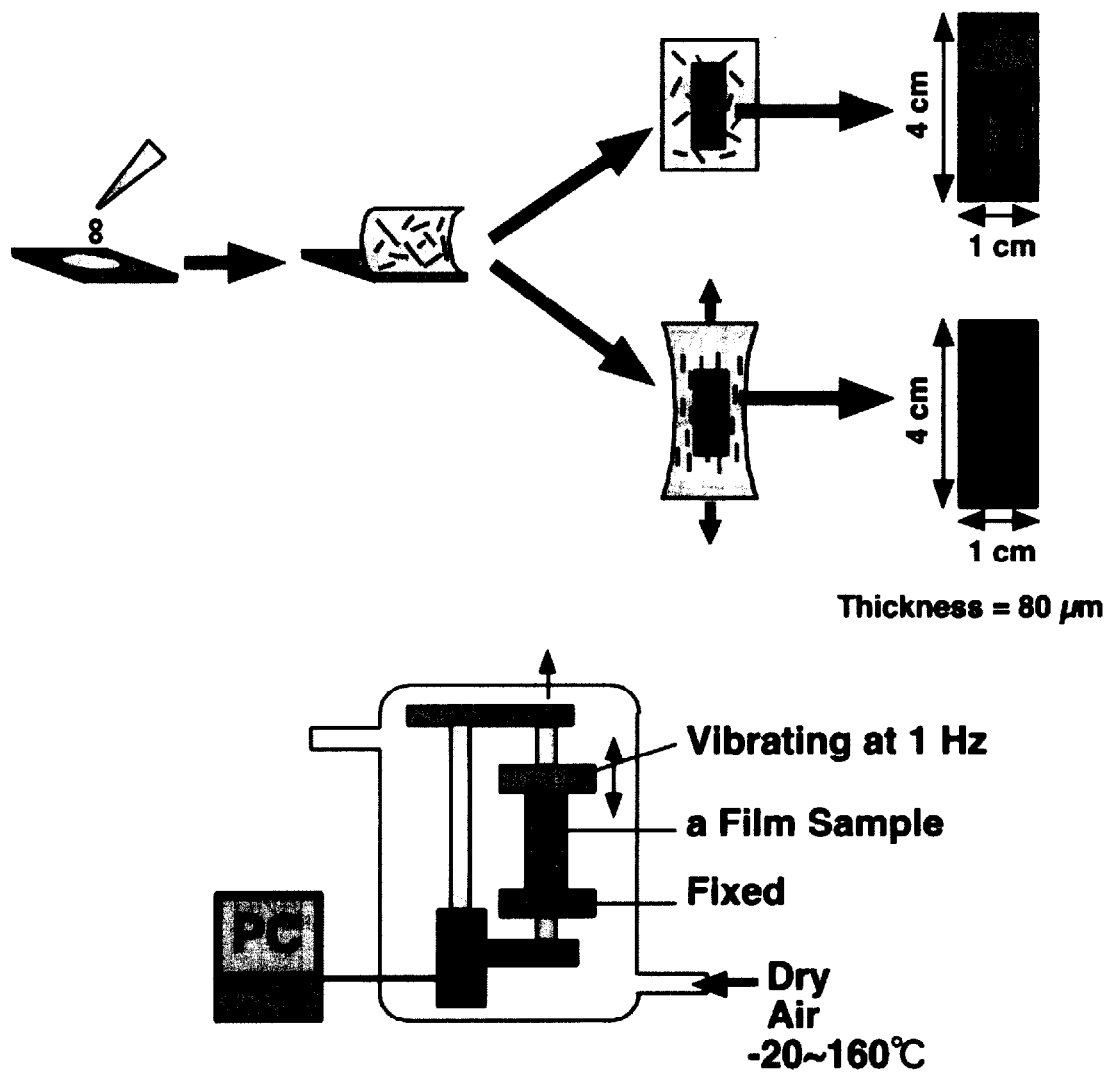


図 4-4. 粘弾性測定装置

4-2-5. 電導度の温度依存性

第3章では常温 25 °C から 60 °C までの温度領域では温度依存性のない分子内の電子電導が見られた。より広い温度領域での DNA 配向化フィルムの導電性を調べるため、高温側と低温側で電導度を測定した。

実験装置の概略を図 4-5 に示した。高温側の測定は延伸したフィルムを 5 μm の電極にのせ、この電極をホットステージに固定して常温から 160 °C まで 5°C/分で昇温していき各温度で直流測定を行った。低温側の測定は 5 μm の電極にフィルムをのせた後カバー用ガラスの上からエポキシで電極を固定し、-50 °C まで測定可能な熱電対を直接電極にテフロンテープで巻き付けて電極と一体化し、液体窒素にゆっくり入れて常温から -100 °C 付近まで 5-15 °C / min. の速度で冷やしながら各温度で直流測定を行った。

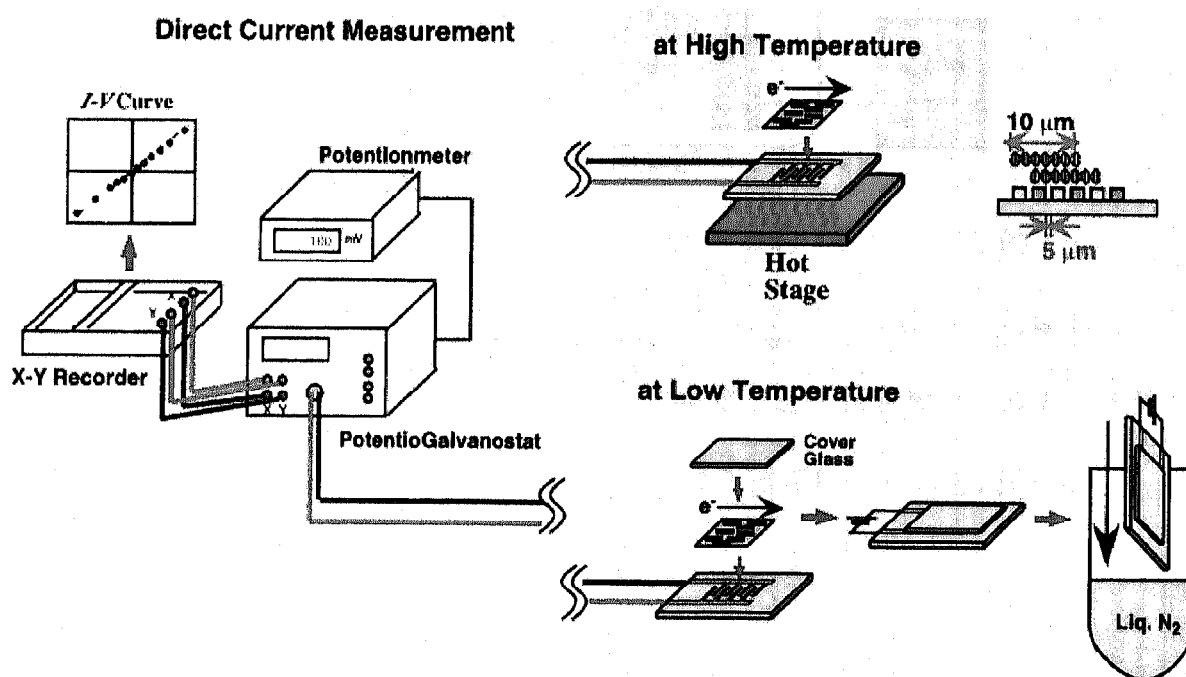


図 4-5. 電導度の温度依存性を調べる実験装置.

4-3. 結果と考察

4-3-1. フィルムの配向の温度変化

延伸によって得られた配向度は熱的にどれだけ安定なのかを調べるため、配向したフィルムに熱をかけて配向度の温度依存性を調べた。

代表的な脂質として一本鎖のエーテル型脂質の配向化フィルム $C_{10}\text{-}4G\text{-}N^+$ / DNA (30,000 bp, 500 bp) および二本鎖脂質の配向化フィルム $2C_{12}\text{-}N^+\text{-}2C_1$ / DNA (30,000 bp, 500 bp) のフィルムについての結果を図 4-6 に示す。

$C_{10}\text{-}4G\text{-}N^+$ と $2C_{12}\text{-}N^+\text{-}2C_1$ の脂質の違いはあったが、どのフィルムも 120～150 °C の範囲で複屈折の値が急激に下がり、フィルムの異方性がなくなった。延伸によって得られた DNA 鎖の配向はこの温度でくずれてしまうものと思われる。

低分子量 DNA (500 bp) のフィルムについても同じ傾向を示し、分子量の効果は見られなかった。DNA の分子量は配向の熱的な安定性には影響を与えていないと考えられる。

温度をさらに上げても、フィルムは 160 °C 以下の範囲では見た目の変色などはおこらないことがわかった。しかし 160 °C をこえて長時間キープするとだんだんとフィルムは褐色に変性した。このことから、フィルムは熱的に 160 °C までは分解していないと言える。

以上の結果は他の脂質を用いたフィルムでも同様の結果が得られた。

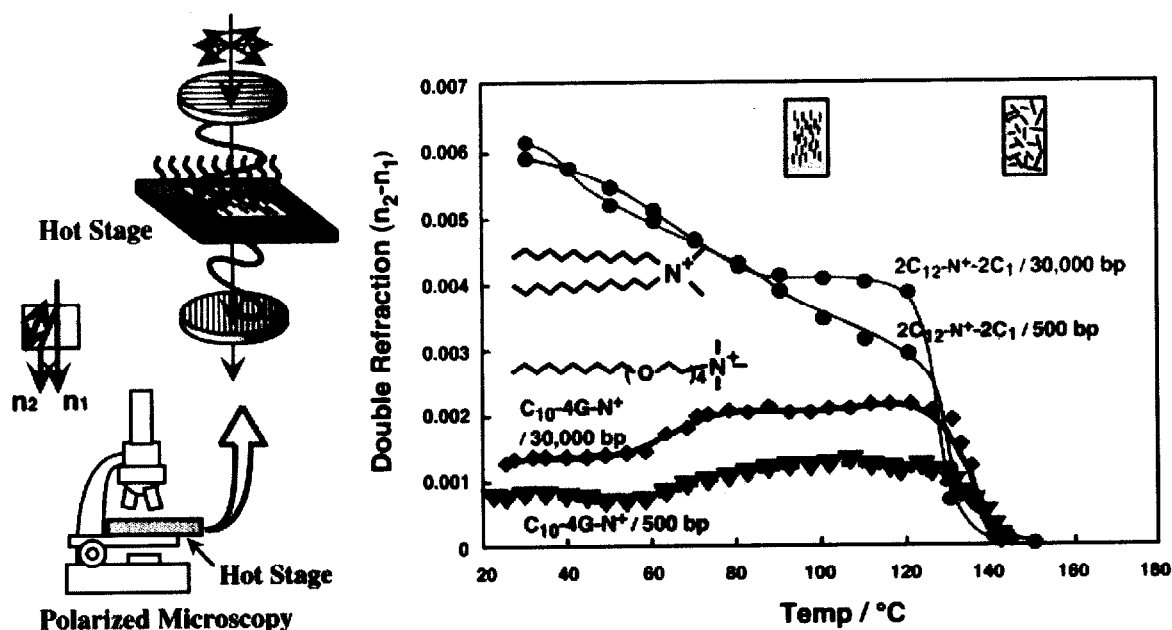


図 4-6. 配向化フィルムの異方性の温度変化

4-3-2. DSC 測定によるフィルムの熱的挙動

DNA フィルムの熱的安定性を DSC 測定により求めた。代表的なデータとして、 $C_{10}-4G-N^+$, $2C_{12}N^+2C_1$ /DNA 30,000 bp のキャストフィルムを 5 °C から 210 °C まで昇温した時の DSC 曲線を図 4-7 に示した。

どちらのフィルムでも、測定が始まってすぐに吸熱が始まり、90 °C 前後でピークに達し、その後 160 °C 前後で曲線が発熱側に向かう傾向があった。このゆるやかな吸熱のピークは、温度を上げていくにつれて側鎖アルキル鎖の融解もしくは DNA 主鎖のスライディングがおこっているためではないかと考えられる。また 160 °C 前後では発熱ピークが見られた。偏光顕微鏡による配向度のデータから 160 °C まではフィルムは分解していないことを確かめているので、この 160 °C においてフィルムの

分解がおこっていると考えられる。

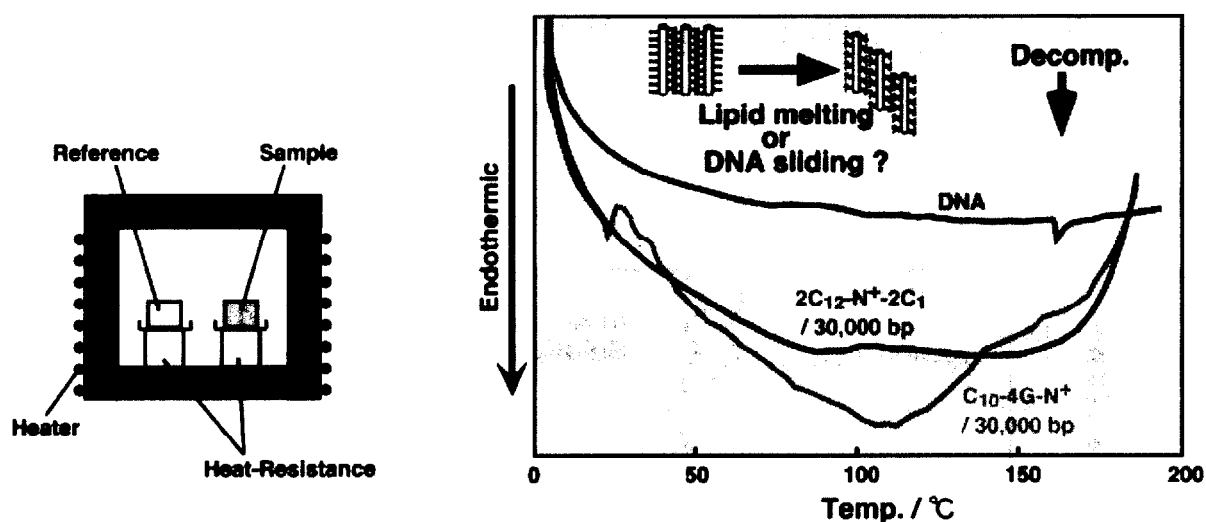


図 4-7. DNA-脂質複合体フィルムの DSC 曲線

4-3-3. フィルムの UV スペクトル

温度をかけた状態でフィルム中の DNA が二重鎖のままかどうかを調べるため、熱をかけての UV スペクトルの測定を行った。同じ分子量のサケ精子 DNA の水溶液について温度を上昇させた場合には、88 °C 前後で 260 nm の吸光度は濃色効果を示し、二重鎖の融解が認められる⁴⁾。代表的なデータとして脂質が $C_{18}-N^+-3C_1$ 、 $2C_{10}-N^+-2C_1$ の結果を図 4-8 に示す。DNA を水溶液からキャストしたり、DNA-脂質複合体を有機溶媒からキャストした場合には、吸光度は上昇せず、DNA 二重鎖の融解はおこっていないことがわかった。Native DNA のキャストフィルムでも DNA 二重鎖の融解はおこっていなかったことより、DNA は水分のない状態では熱をかけても融解しないと考えられる。

また、DNA-脂質複合体のキャストフィルムでは、160 °C 前後で DNA による波長 260 nm の吸収がなくなった。よってこの付近でフィルム中の DNA の分解がおこっていると考えられる。これは DSC 測定、偏光顕微鏡観察の結果とあわせても妥当である。

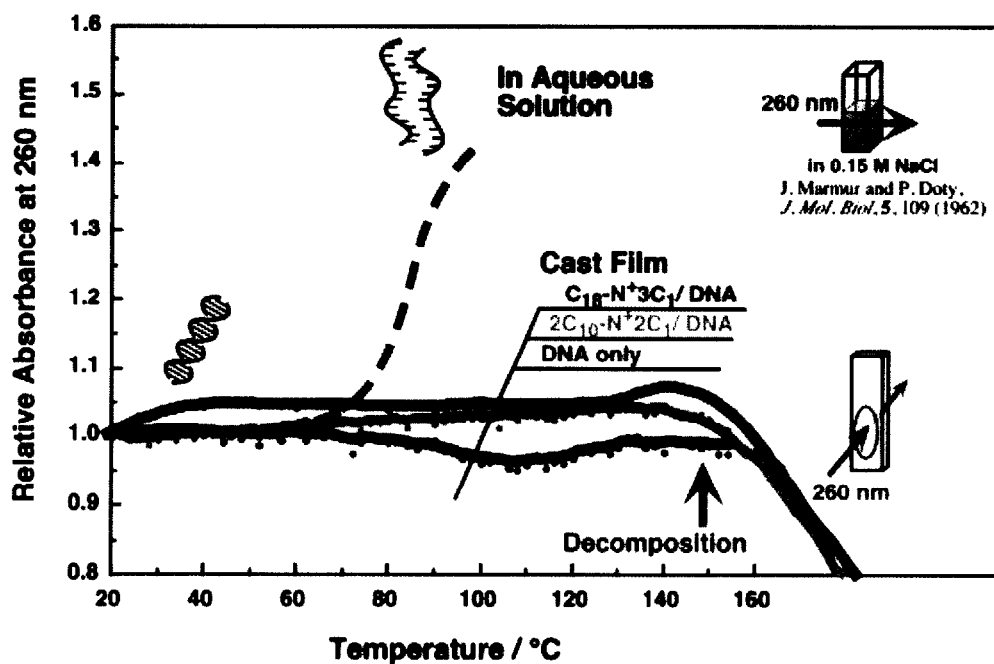


図 4-8. DNA-脂質複合体フィルムの UV スペクトル

4-3-4. フィルムの動的粘弾性測定

1) 汎用性ポリマーとの比較

DNA-脂質複合体フィルムと汎用ポリマーであるポリスチレンやポリエチレンの弾性を比較した。

図 4-9 に汎用ポリマーであるポリエチレン、ポリスチレンおよび DNA-脂質複合体

フィルムの動的粘弾性測定の結果を示した。実際のチャートでは、横軸の温度をあげていったさいの縦軸の値が弾性をあらわし、この値が高いほどフィルムの強度が強いことになる。温度が上昇するにつれてある温度で弾性が低下するが、これはポリマーの主鎖が融解してフィルムが伸び、強度が低下することをあらわす。

結晶構造のポリエチレンは温度を上げて行くに従い、弾性が減少しており加熱によりフィルムが柔らかくなっていくことを示している。それに対して DNA / 脂質複合体フィルムやアモルファス構造であるポリスチレンの弾性は加熱しても 100 °C 程度までは減少しないことが分かった。

以上のことから DNA / 脂質複合体フィルムは力学的に汎用ポリマーと比較して十分な粘弾性を持っており、加熱しても 100 °C 程度までは弾性が減少しない優れた性質を持つことが分かった。

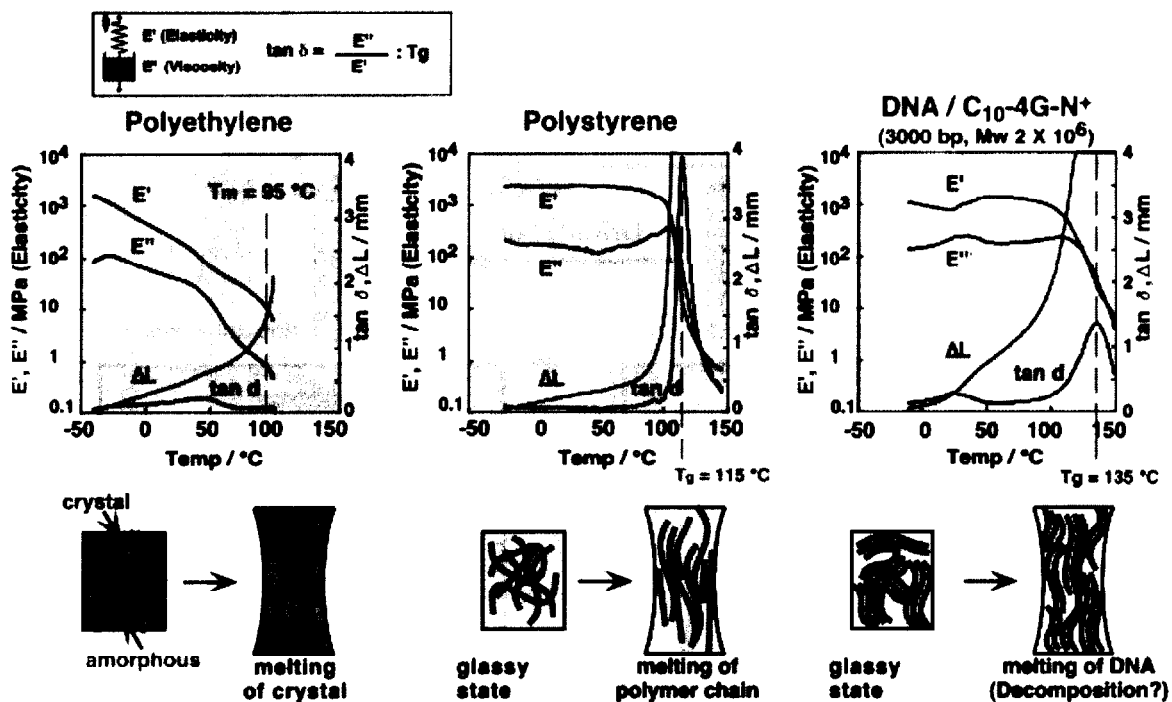


図 4-9. C₁₀-4G-N⁺ / 30,000 bp フィルムの動的粘弾性と汎用ポリマーとの比較

2) DNA の分子量の効果

図 4-10 に DNA-脂質複合体フィルムの DNA の分子量を変えた際の粘弾性測定の結果を示した。脂質としてエーテル型脂質 $C_{10}\text{-4G-N}^+$ / DNA 500 bp, 30,000 bp の未延伸フィルムと延伸フィルムを用いた。まず未延伸のフィルムでは、最も高分子量の 30,000bp のものは 100 °C 以上まで弾性が保たれているのに対して、他の短い DNA のフィルムは X 印の温度でフィルムが切れてしまった。このことから分子量の大きい DNA を用いた方がフィルムが強いということがわかった。

次に延伸したフィルムでは、全体としてどのフィルムも弾性が上昇し、100 °C 以上まで切れずに測定できた。また延伸した際にはどの分子量の DNA でも大きな差はないことがわかった。

フィルムを延伸することでロッド状の DNA 鎖が延伸方向に沿って密に配向することから、フィルム内での複合体同士の隙間が無くなりロッド間の緩和がおきにくくなる³⁾ためにフィルムが強くなったと考えられる。

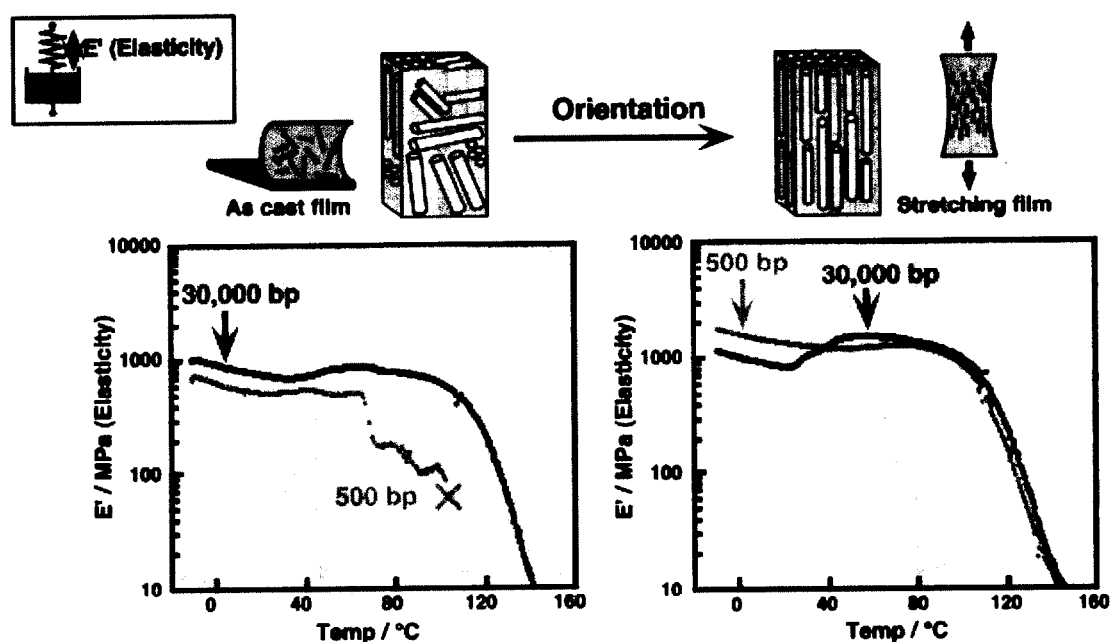


図 4-10 $C_{10}\text{-4G-N}^+$ / DNA フィルムの動的粘弾性. 分子量の効果.

3) 脂質の効果

図 4-11 にフィルムの脂質を変えた際の粘弾性測定の結果を示した。脂質としてエーテル型脂質 C_{10} -4G- N^+ 、フィトール型脂質 Phy - N^+ 、二本鎖直鎖型 $2C_{12}$ - N^+ - $2C_1$ 、一本鎖直鎖型 C_{16} - N^+ - $3C_1$ を用いた。DNA としては高分子量の 30,000 bp のもので統一した。

まず未延伸のフィルムでは、それぞれの弾性の絶対値は低温では差がないが、温度が上昇すると脂質の種類によって弾性が低下する温度が異なることがわかった。延伸したフィルムでは、全体としてどのフィルムも弾性が上昇し 100 °C 近くまで切れずに測定できた。未延伸のフィルム、延伸したフィルムとも脂質によって弾性に差があったが、これは脂質同士の相互作用の強さの度合いが効いているものと思われる。

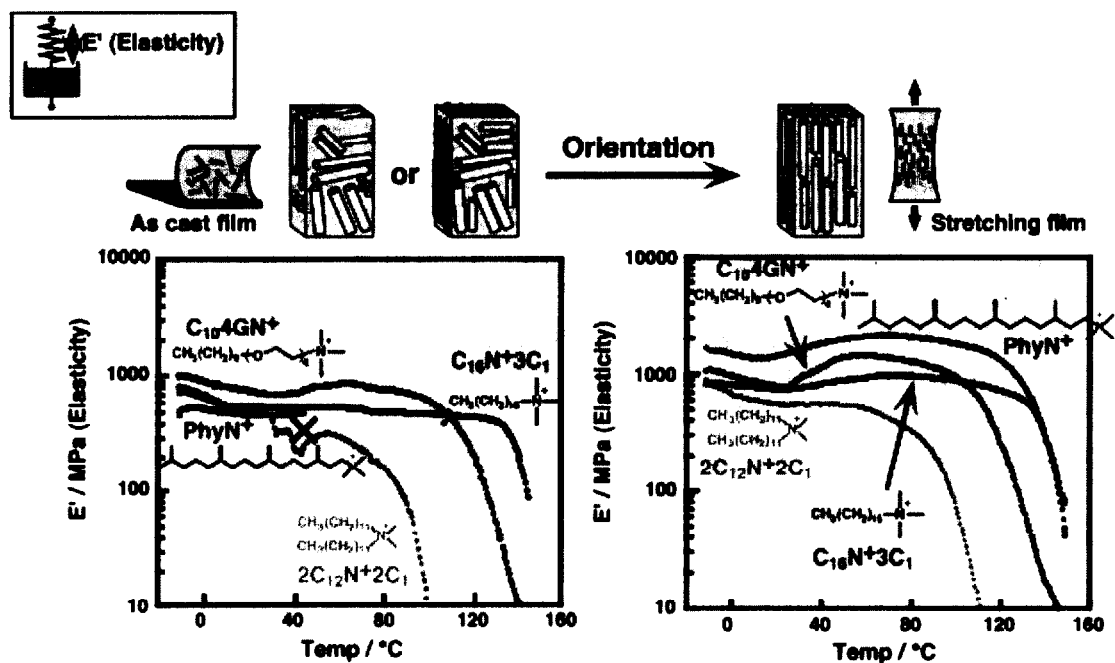


図 4-11. DNA (30,000 bp)-脂質フィルムの動的粘弾性. 脂質の違いの効果.

全体として、どのフィルムも 100 °C 手前を境に貯蔵弾性率 E' の値が減少し始めた。偏光顕微鏡観察により、この温度ではまだフィルム中の DNA 鎖の配向はくずれていないことがわかっている。従って E' の値の減少の理由としては、DNA-脂質複合体の側鎖部分の融解によってフィルム中の DNA 鎖のスライディングがおこり、配向がくずれない範囲でフィルムが軟化したのではないかと考えられる。DSC 測定においてもこの温度にピークがあり、この考察を支持している。

4-3-5. 常温よりも高温側での導電性

高温側の電導度の測定結果を図 4-12 に示した。

電導度は常温から温度を上げてても $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ で一定の値を保つが、およそ 90 °C で一気に電導度が $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ から $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ へ 10^3 低下した。複数回の実験でいずれも低下してすぐに温度を下げたが電導度はもとに戻らなかった。これまで 4-2 節で述べたように、DNA 配向化フィルムの熱物性（偏光顕微鏡観察、DSC、UV 測定）によってこの温度で DNA-脂質複合体のスライディングがおこっていることが確かめられている。偏光顕微鏡にて DNA の配向性は 140 °C 付近まで保たれていることを確認しているので、DNA 分子内で核酸塩基が傾くなど揺らぐことによって効率の良い導電性パスが消失したためと考えられる。

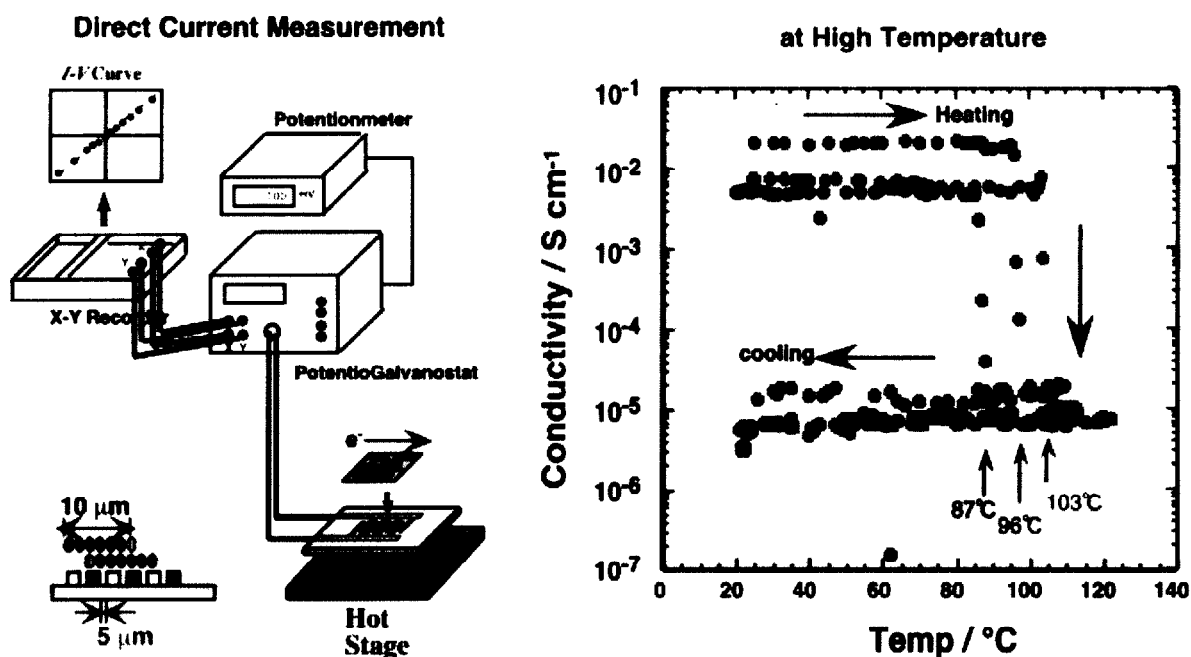


図 4-12. 電導度の温度依存性. 常温よりも高温側.

4-3-3. 常温よりも低温側での導電性

低温側の測定結果を図 4-13 に示した。低温側では電導度の絶対値にばらつきがあるものの、温度を下げていくと-53 °C 以下の温度で電導度が 1 ケタ低下し、再び温度を上げてても元に戻らないという挙動が観察できた。熱伝対の温度表示が測定上-50 °C 以下の温度が特定できないため極低温で超電導を示すかどうかはわからなかった。しかし液体窒素内の温度およそ-100 °C でも電導度を持っていることは確かめることができた。

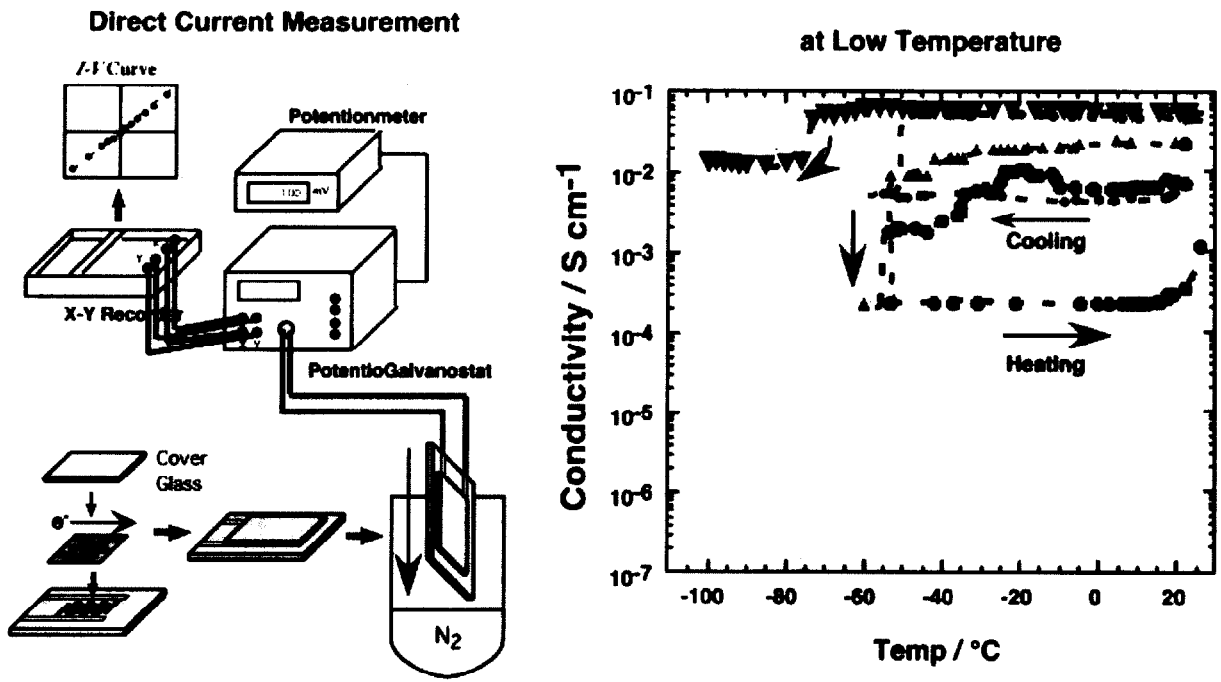


図 4-13. 電導度の温度依存性. 常温よりも低温側.

4-4. 総括

偏光顕微鏡観察、DSC 測定、動的粘弾性測定、UV スペクトル測定により、DNA-脂質複合体フィルムの熱的な物性について評価した（図 4-14）。熱をかけていくと、まず 100 °C までに脂質のメルティングとそれに伴う DNA 鎖のスライディングがおこり、配向がくずれない範囲でフィルムが軟化した。120～150 °C の範囲で延伸によって得られた DNA 鎖の配向がくずれた。160 °C 前後でフィルム中の DNA の分解がおこった。また UV スペクトル測定より、この間フィルム中の DNA 二重鎖は融解していないことを確かめた。

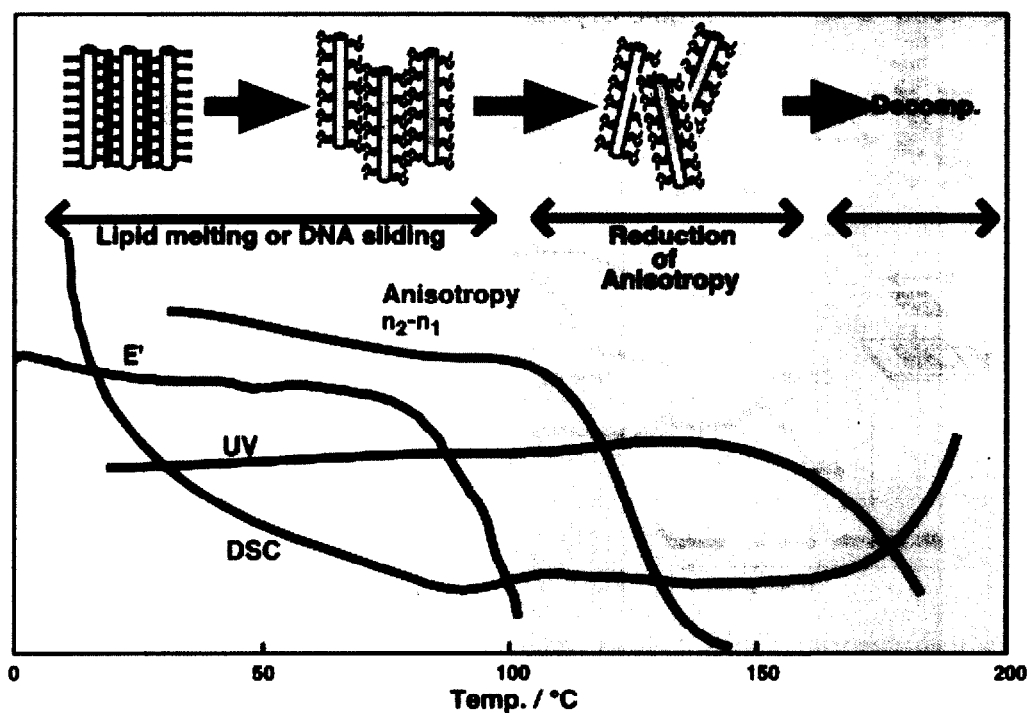


図 4-14. DNA-脂質複合体キャストフィルムの熱的物性のまとめ

DNA-脂質複合体のキャストフィルムの電導度の温度依存性を熱物性ととも図 4-15 にまとめた。

DNA-脂質複合体のキャストフィルム加熱した際の電子伝導を調べると、常温から 90 °C までは DNA は一方向に配向した液晶状態であり、電子移動の挙動を保つが DNA 鎖の揺らぎまたは DNA 核酸塩基の傾きによって DNA 鎖内で断線がおこり、電導度が一気に 10^3 低下した。この断線は可逆的に元に戻せず、140 °C 付近まで加熱するとフィルムが熱で溶けて DNA 鎖の配向が失われるためにその後温度を冷やしても電導度が元に戻ることはなかった。一方低温側での電子伝導は、-50 °C 以下の温度で脂質の結晶化と共にフィルムが固体状態となり、電導度が一気に 1 ケタ低下して再び温度を上げて元に戻らないということがわかった。

以上により、DNA 配向化フィルムは -50 °C から 90 °C までの広い温度領域で電子伝導の挙動を示す導電性材料として用いる事が可能であることがわかった。

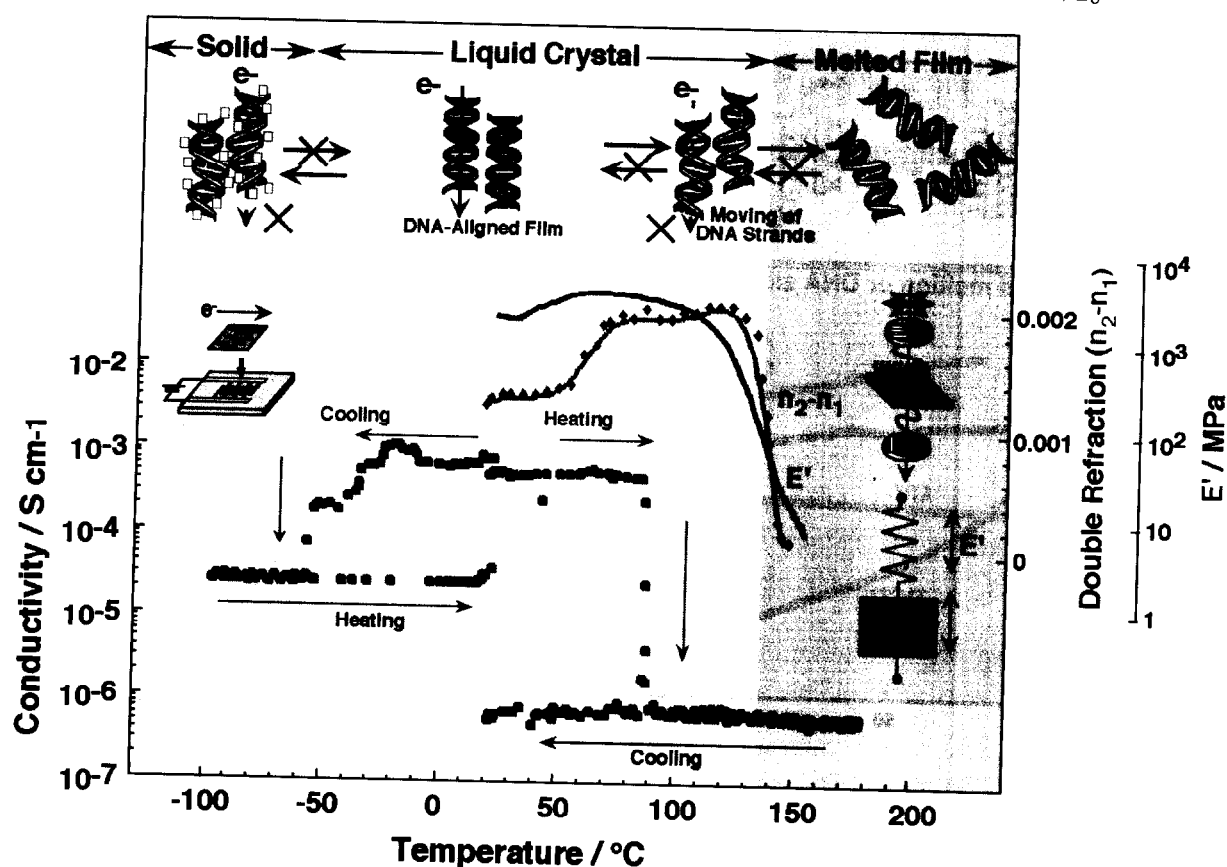


図 4-15. 電導度の温度依存性まとめ

第4章 参考文献

- 1) 田中 健太郎, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
- 2) 小林 琢也, 修士論文, 東京工業大学 (1997)
- 3) 神原周編, “力学的性質, 高分子実験学第8巻”, 共立出版 (1982)
- 4) J. Marmur and P. Doty, *J. Mol. Biol.*, **5**, 109-118 (1962)
- 5) 神原周編, “高分子の固体構造 I, 高分子実験学第16巻”, 共立出版 (1984)

第 5 章 DNA・RNA-脂質複合体キャスト フィルムの導電性測定

5-1. 緒言

これまで第2章、第3章、第4章で述べたように DNA-脂質複合体フィルムは DNA の配向した方向に導電性を持ち、物理的・熱的に安定な材料として応用が期待できる。しかしながらその電導度は導電性高分子というには十分なものではない。そこでさらに電導度を上げるためには、DNA 分子内あるいは分子間でよりよい電導パスを与える必要がある。30,000 bp の高分子量 DNA はおよそ 10 μm の分子長を持っており、この1分子が 5 μm の電極間を橋渡ししたときにのみ大きな電導度 $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ の電子伝導性挙動、橋渡しできない 300 μm の電極では $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ のイオン性挙動を示すことは第3章で述べた。しかし全ての DNA 分子がくし形電極上で橋渡しをしているわけではない。そこで DNA 分子同士を橋渡しするような新たな分子の添加を考えた。その一つとして一本鎖の RNA 分子が挙げられる。RNA をブレンドした DNA-脂質複合体フィルムでは DNA と DNA が架橋されてより大きな導電性を示す可能性があると考えた (図 5-1)。RNA 分子は DNA とほとんど同じ化学組成を持っているものの、その立体構造は DNA 二重らせんよりも非常にフレキシブルな多岐の構造をとりうる。

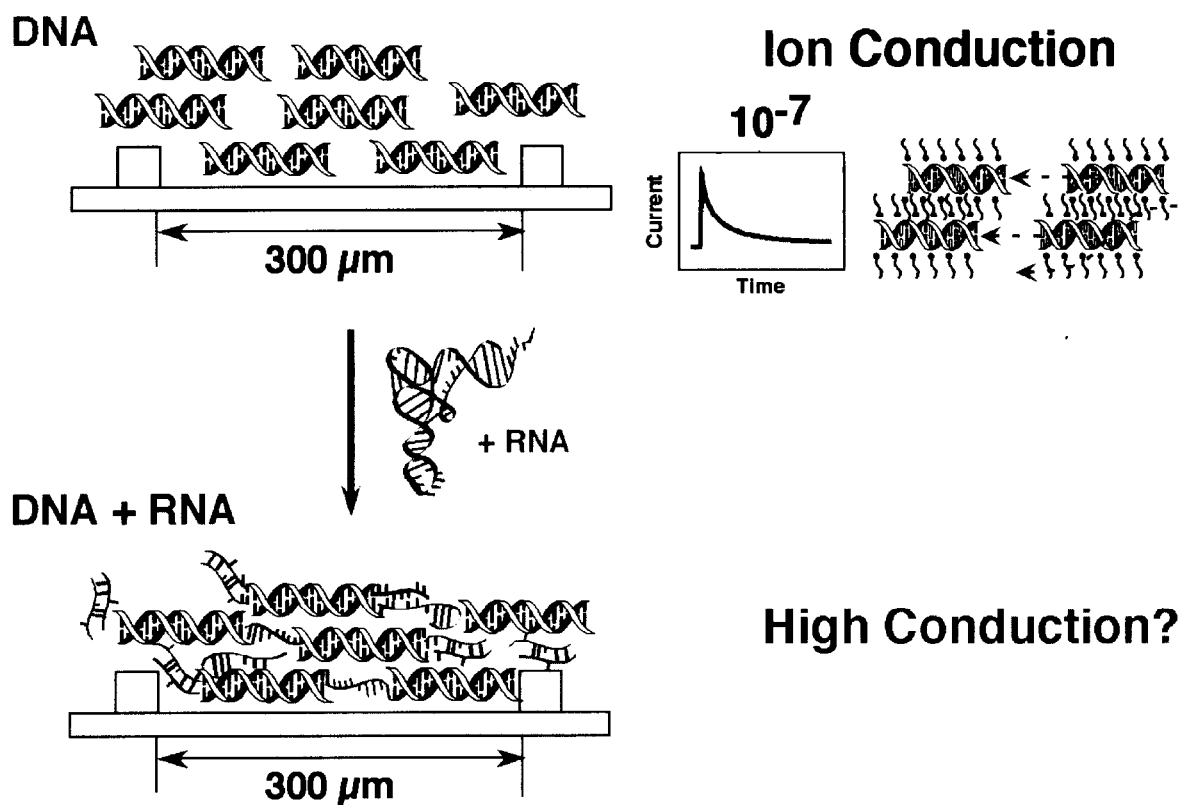


図 5-1. DNA に RNA を混合して高分子量化をはかり、導電性の向上を目指す

本章では DNA の代わりに RNA を用いても RNA-脂質複合体フィルムが作製できることを述べ、RNA 分子を DNA に混合した DNA・RNA-脂質複合体のフィルムが高分子量の DNA をさらに長い分子としてより大きい導電性を示すことを期待した。

5-1-1. RNA の構造的特徴

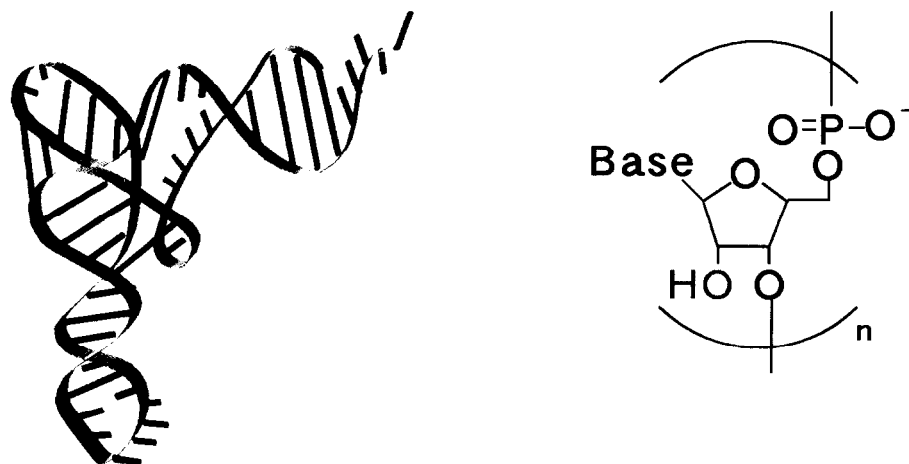
1958 年に Crick は「DNA は自己複製すると共に RNA の転写を指令し、RNA はタンパク質合成を指令する」といういわゆるセントラルドグマを提唱した^{1-a)}。その後 mRNA が同定され、RNA はすべてのタンパク発現に関与する重要な物質であることが証明された^{1-b)}。また rRNA や tRNA は非ワトソンクリック型の塩基対を形成することにより DNA とは違った独特の高次構造を形成し、複製に関与する事が知られている。さらに 1980 年代はじめ、原生動物のテトラヒメナ rRNA のグループ I イントロンのスプライシングにおいて、Cech らは自己スプライシングという非常に興味深い現象を発見した^{2-a)}。このことにより RNAの中にはリボザイムと呼ばれるような酵素活性を有するものが存在することもわかっている^{2-b)}。

このように RNA は本来様々な生体機能を担う物質であるが、その構造に注目してみると非常に特徴的な高分子と見なすことができ、材料として応用できる可能性がある。図 5-2 に例として tRNA の構造と、RNA を材料として応用する上での構造的特徴を示す。

RNA の構造的な特徴を以下に挙げる。まず第一に、RNA はその生体機能を発現するためにそれぞれ特徴的な高次構造をとる。例えば tRNA はアミノ酸の数に対応して約 20 種類の配列を持つにも関わらず、同一の生体機能を発現するため全て図 5-2 に示したような高次構造をとることが知られている。そしてその独特の構造を維持するために RNA は DNA には存在しないような非ワトソンクリック型の塩基対を形成する。またモノマーユニット中の塩基は 260 nm 付近にコットン効果を示し、リン酸アニオンはイオン結合能を有する。

一方 RNA は弱塩基や少量の RNase の混入により容易に加水分解される事が知られており、この化学的な不安定さが材料の性質に大きく影響することが考えられる。

以上のことより、RNA の特徴的な高分子構造をうまく利用すれば、あらたな機能材料を生み出せる可能性がある。



- 特徴的な高次構造
- 非ワトソンクリック型を含む様々な塩基対
- UV吸収能
- イオン結合能
- 円偏光二色性

図 5-2. RNA の構造

5-1-2. 木材資源から大量にとれる RNA の有効利用

RNA を単に遺伝物質としてとらえてきたこれまでの生化学的手法の研究では、RNA を水溶液中でマイクログラム微量スケールで扱えば良かった。ところが前節 5-1-1 で述べたように RNA を機能性材料として用いるにはグラムスケールの量が必要になる。このような大量の RNA は化学合成やディッシュスケールでの細胞抽出では取りだすことは困難だが、実は製紙産業で紙の原料となるパルプの廃液から大量の RNA が生産されている (図 5-3)。

我々が普段用いている紙は木材のパルプから作られるが、この過程においてヘミセルロースなどの糖分を含んだ廃液が大量に発生する。この廃液はヘドロ公害のような環境問題を引き起こすため環境に排出することができない。そこで現在ではこの糖を含む廃液を資源として有効利用して年間 2000 トンの酵母が培養され、その中から 200 トンもの RNA が工業的に生産されている。この RNA は加水分解によりモノマー化された後、塩基ごとに分離され、グアニル酸は椎茸の旨み成分として、アデニル酸は脱アミノ化してイノシン酸とすることにより鰹節の旨み成分として利用されている。一方 RNA を加水分解することなくポリマーという形で機能材料として扱った例はこれまでにない。この RNA を材料として用いることができれば、資源の有効活用も期待できる。

そこで本章ではポリマーとしての RNA に注目し、DNA フィルムの導電性を上げるため添加物としてだけではなく、RNA を新たな機能材料として応用することをも視野に入れて RNA-脂質複合体を作製することにした。

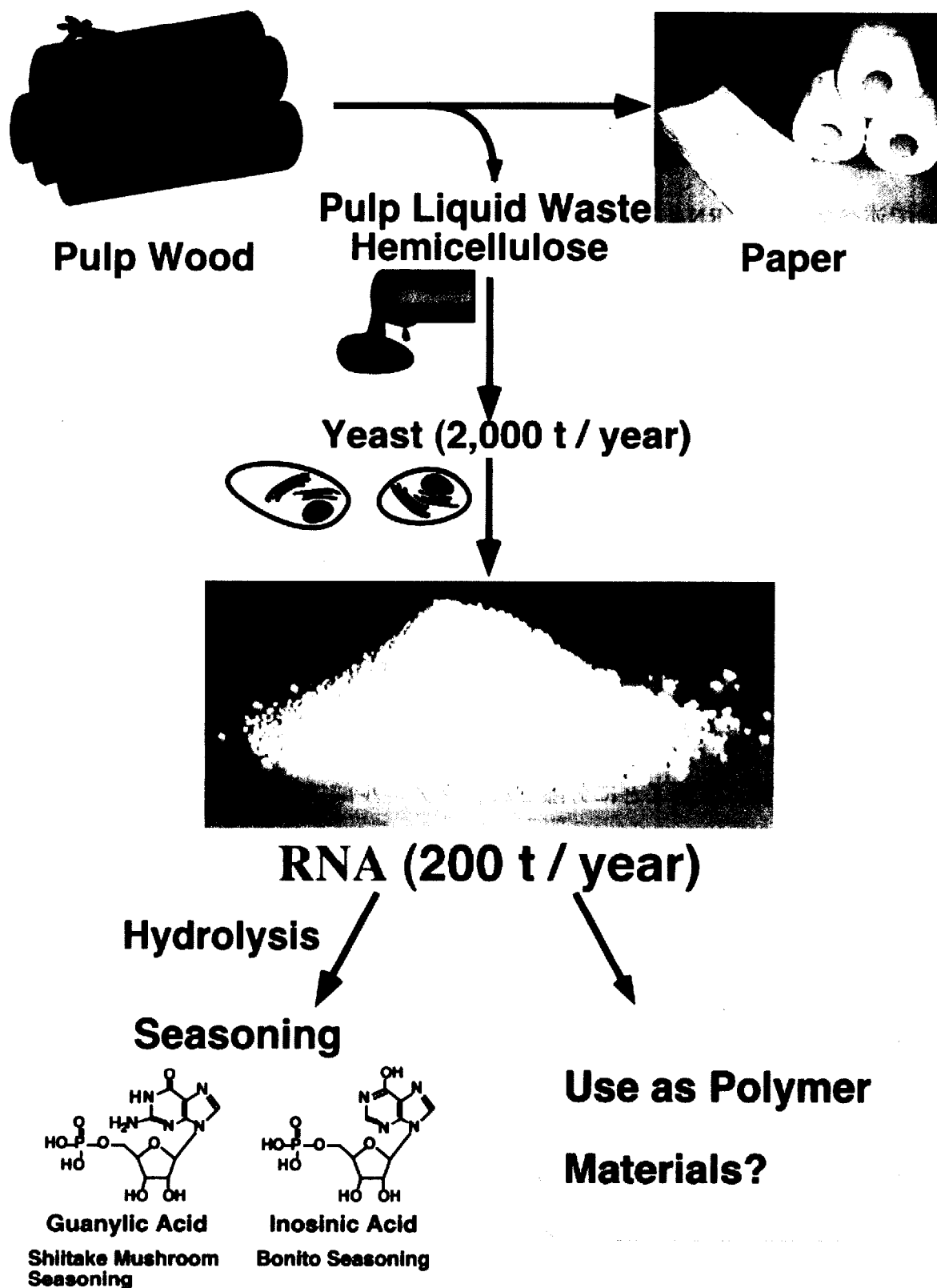


図 5-3. 木材資源からの RNA の生産

5-1-3. RNA の機能性材料としての応用

これまでに述べたように RNA の高分子材料としての応用はまだほとんど行われておらず、RNA を実際の形をもった高分子機能材料として応用する研究は全くされていない。その理由としては、まず RNA は化学的に不安定で、容易に加水分解されてしまうことが挙げられる。また RNA は水溶性で有機溶媒に不溶であるため、成形性に欠けることも挙げられる。RNA を高分子機能性材料として利用する上ではこれらの弱点を克服しなければならない。

第2章以降で述べたように、本研究では DNA の主鎖のリン酸基に静電的に疎水的カチオン性脂質を 1:1 で結合し、得られた DNA-脂質複合体がクロロホルムなどの有機溶媒にのみ可溶化する事を見いだした³⁾。また田中らは DNA-脂質複合体の有機溶媒中でのスペクトルについて検討し、DNA のコンフォメーションや二重らせんの安定性は、溶媒組成や水含量など、溶媒環境によって大きく変化することを報告している⁴⁾。

RNA は DNA のデオキシリボース環をリボース環に、チミンをウラシルに換えただけでその構造はとてもよく似ている。従って DNA と同様の手法で RNA も RNA-脂質複合体として材料化できることが期待される。

5-2. RNA-脂質複合体フィルムの作製とキャラクタリゼーション

5-2-1. RNA の抽出・精製および評価

RNA は化学的に非常に不安定であり弱アルカリ性条件や少量の RNase の混入により容易に加水分解されることが知られている。そのため RNA を高分子材料として応用した研究例はなく、RNA を高分子量のままグラムスケールで抽出、精製し評価する方法は確立されていない。

本節ではまず酵母由来の RNA を塩酸沈殿法で抽出、精製した。塩酸沈殿法は酵母中の RNA を食塩水に抽出し、塩酸酸性条件にして核酸のみを沈殿させる方法であり、エタノール沈殿法に比べ低コストで大量の RNA を精製できると期待される。SDS 法は高分子量 DNA を精製するときに用いられており、高分子量 RNA が精製できると期待される。一方でエタノール沈殿法を用いるためコストがかかりすぎるという欠点がある。次に精製した RNA の純度および分子量分布を評価した。実験の概略図を図 5-4 に示す。

1) 生酵母から乾燥酵母の取り出し

日本製紙株式会社より頂いた生酵母 1 Kg (粘土状) に缶出しエタノール 1 L を加え、2 L ビーカー中で 24 時間攪拌した後、吸引濾過して沈殿を回収した。これに缶出しエタノール 500 mL を加えて 2 時間攪拌し、吸引濾過して沈殿を回収した。再び缶出しエタノール 1 L を加えて 2 時間還流し、冷却後吸引濾過して沈殿を回収した。これをシャーレ上に薄く広げて乾燥後、デシケーター中で減圧乾燥し“きな粉”状の乾燥酵母を得た。

収量	211.3 g	収率	21 %
----	---------	----	------

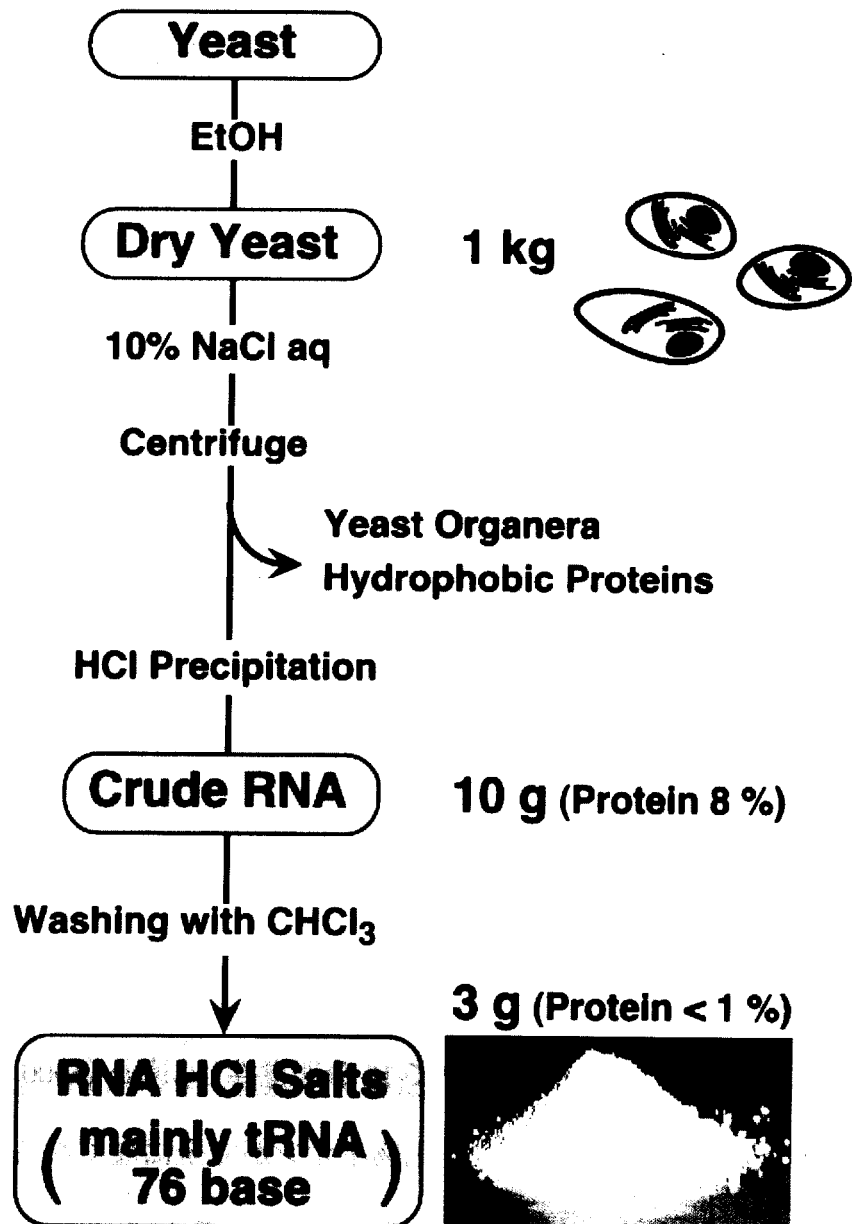


図 5-4. RNA の精製方法概略図

2) 乾燥酵母から抽出 RNA の取り出し

2 L 三角フラスコ中で乾燥酵母 100 g に 10 %NaCl 水溶液 1 L を加え、60 ℃ の恒温槽で 4 日間攪拌し、冷却後遠心分離 (4000 rpm, 15 min) して上澄み (黄色透明) を回収した。攪拌しながら希塩酸を加えて pH 2 として、10 分間攪拌した。遠心分離

(4800rpm, 10 min) して沈殿（白色）を回収した。塩化物イオンが完全になくなるまで（硝酸銀水溶液で滴定）繰り返し水：エタノール＝1：1で洗浄した。沈殿を缶出しエタノールに1晩浸し、無水エタノール及びジエチルエーテルで1回ずつ洗浄し真空乾燥して抽出 RNA（白色沈殿）を得た。

収量 0.922 g 収率 0.922%

3) 抽出 RNA の精製

抽出 RNA 0.5 g を 10 mL の蒸留水に懸濁し (pH 3) 希アンモニア水溶液を加えて pH 7 とし RNA を溶解（茶色溶液）させた。不溶物を遠心分離（4000 rpm, 10 min）で除去しあらかじめよく水洗したクロロホルム 5 mL と n-ペンタノール 0.5 mL を加えて 30 mL 分液漏斗で 15 分間激しく振とうした。白濁均一溶液を遠心（4000 rpm, 5 min）すると上層（透明）、中間層（白色）、下層（透明）に層分離した。上層が RNA 水溶液、中間層が変性タンパク質、下層がクロロホルム層であると考え、上層をパスツールピペットで回収した。13 回この操作を繰り返した後中間層が減ってきたので精製を止めた。ここに希塩酸を加え、pH 2 として 10 分間攪拌し、遠心（5000 rpm, 10 min）して沈殿を回収した。50 %エタノールで塩化物イオンが完全になくなるまで（硝酸銀水溶液で滴定）洗浄し、無水エタノール、ジエチルエーテルで 1 回ずつ洗浄後減圧乾燥して精製 RNA（白色粉末）を得た。洗浄後は全て遠心（5000 rpm, 10 min）により沈殿を回収した。

収量 0.158 g 収率 31.6 %

4) RNA 中のタンパク含量の測定

タンパク含量測定は Bio-Rad DC Protein Assay (based on Lowry method) を用いて、

定法に従って行った。検量線は BSA standard (2.0 mg / mL in a 0.9 % aqueous NaCl solution, Albumin Standard, Code. 23209, Pierce) を用いた。試料の希釈系列は粗精製 RNA を TE buffer に溶解して調整した。吸光度は 96 Well ASSAY PLATE (Iwaki 製) 上でプレートリーダーで測定した。

5) RNA の分子量分布の測定

urea 変性 10 %ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分子量分布を測定した。分子量マーカーは鋳型となる DNA から T7RNA ポリメラーゼを用いて転写した 78 mer と 22 mer の RNA を用いた。

〈分子量マーカーRNA の調整〉

例として 78 mer の RNA マーカーの合成方法を示す。

ssDNA の PCR : エッペンドルフチューブに以下の組成で溶液を調製し、94℃で 5 min 加熱後、94 °C 30 sec → 60 °C 30 sec → 72 °C 30 sec というサイクルを 10 回繰り返す、T7 promoter のついた dsDNA を得た。

Template 40 (20 nM)	5.0 μ L
T7 promoter-41 (20 μ M)	5.0 μ L
Primer 42 (20 μ M)	5.0 μ L
10× Buffer	10.0 μ L
dNTP	8.0 μ L
DEPC 処理水	up to 100.0 μ L
Taq DNA Polymerase	0.5 μ L

用いた DNA の配列を以下に示す。

Template 40 5' - TGGCA CACTT ACAGC AGGAC CTCG – N₃₀ – CGAG

CCCAT TCCAT CCAGT TTCCC – 3'

T7 promoter-41 5' - **TCTA ATACG ACTCA CTATA** GGGAA ACTGG ATGGA

ATGGG – 3'

Primer 42 5' - TGGCA CACTT ACAGC AGGAC – 3'

転写：エッペンドルフチューブに以下の組成で溶液を調製し、37 °C で 60 min インキュベートした後、4 °C にして反応を止めた。

10×Buffer	10.0 μL
10×DTT	10.0 μL
Template DNA(PCR 溶液)	8.0 μL
NTP	4.0 μL
DEPC 処理水	up to 100.0 μL
T7 RNA Polymerase	1.0 μL

〈電気泳動ゲルの調整〉

アクリルアミドモノマー58 g と N、N-メチレンビスアクリルアミド 2 g に DEPC 処理水を加えて 200 ml として 30 %アクリルアミド溶液を調整し、-4 °C 下で遮光して保存した。以下の組成で 10 %アクリルアミドゲルを調整した。

30 %アクリルアミド溶液 6.67 mL

10×TBEbuffer (Tris 89 mM、ホウ酸 55 g、EDTA・2Na 2 mM、DEPC 処理
水 up to 1 L) 2 mL

尿素 (7 M) 8.408 g (未変性 PAGE では除く)

DEPC 処理水 up to 20 mL

APS (10 %) 200 μ L

TEMED 10 μ L

泳動槽はミニスラブ電気泳動装置 BE-210 型 ((株) バイオクラフト) を用いた。泳動 buffer は TBEbuffer を使い、定電圧 200 V で 30 分間プレランした。

〈サンプルの調製〉

以下の組成でアプライする溶液を調製した。

サンプル 1.5 μ g in 1.5 μ L DEPC 処理水またはマーカー溶液 1.5 μ L

5×2 %BPB 溶液、2 % XC 溶液 3 μ L

10×TBE buffer 1.5 μ L

ホルムアミド 9.0 μ L

これを 65 $^{\circ}$ C で 15 分間変性後氷水につけて急冷した。DNA マーカーについてはプロトコールに加熱禁止と書いてあったので加熱しないものもアプライした。

〈泳動および染色〉

定電圧 200 V で 50 分泳動し染色は SYBR Green で 30 分間おこなった。撮影はデジタルカメラで行った。

〈結果と考察〉

精製した RNA のゲル電気泳動の結果を図 5-5 に示す。またタンパク含量の結果と分子量分布の結果をまとめて表 5-1 に示す。なおアミノ酸定量法によるタンパク含量の測定は日本製紙株式会社にお問い合わせした。

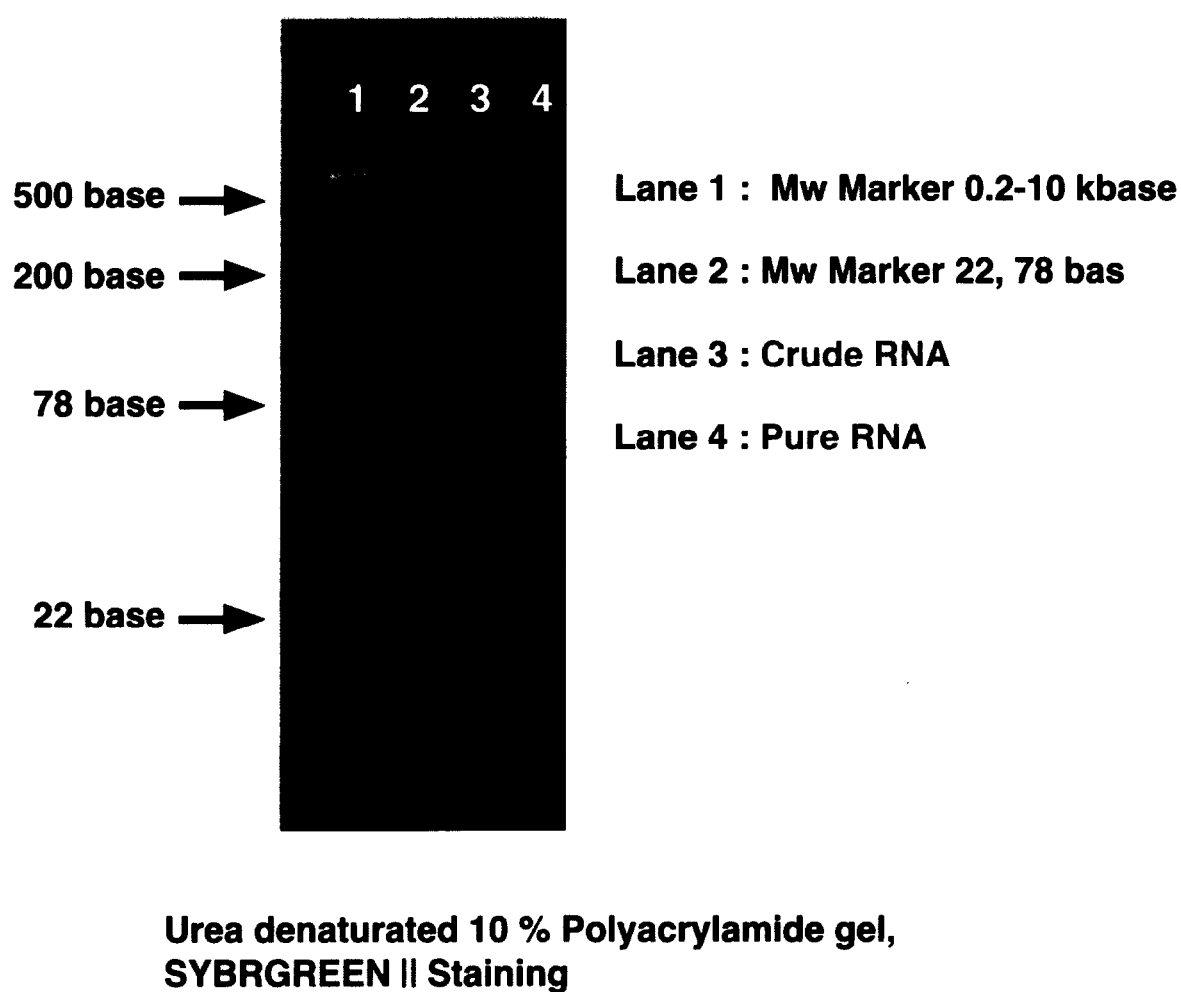


図 5-5. RNA の電気泳動の結果

表 5-1. タンパク含量および分子量の分析結果のまとめ

	タンパク含量 (重量%)		分子量分布
	Bio-Rad DC Protein Assay	アミノ酸定量法	
抽出RNA	7.8	8.4	狭い
精製RNA	6.7	6.6	狭い

ゲル電気泳動の結果から tRNA (理論分子量 76 mer) が選択的に抽出されてきていることがわかった。rRNA はリボソームタンパク質と複合体を形成したまま食塩抽出の際に沈殿として取り除かれたと考えられる。mRNA はもともと量が少ない上に RNase により切断されたため抽出されなかったのかもしれない。結果的に tRNA 由来の RNA が選択的に精製されたが図 5-5 の lane3 と 4 を比べると精製にかかった時間や工程数に比例して分子量の分布は広がっていることがわかる。時間の都合上これ以上精製方法について検討することはしなかった。

5-2-2. RNA-脂質複合体の作製

RNA と疎水的カチオン性脂質を静電的に結合させることにより有機溶媒に可溶となることが期待される RNA-脂質複合体の作製を行った。実験の概略図を図 5-6 に示す。

RNA 100 mg を DEPC 処理水 5 ml に溶解した (今回用いた RNA は塩酸塩であるため水に難溶である。そのため NaOH 水溶液を数滴加え、pH を 7 にして溶解させた)。この RNA 水溶液を氷冷溶搅拌下、RNA 1 塩基あたり 1.1 当量になるように計算した

脂質 $C_{10}-4G-N^+$ または $2C_{12}-N^+-2C_1$ 水溶液 10 ml に滴下した。生じた沈殿を遠心分離 (4000 rpm、10 min) により分取し、DEPC 処理水で 3 回洗浄した後、1 晩凍結乾燥した。エーテルで洗浄後、デシケーターで乾燥させ RNA-脂質複合体の粉末を得た。RNA : 脂質の比は元素分析の結果より算出した。

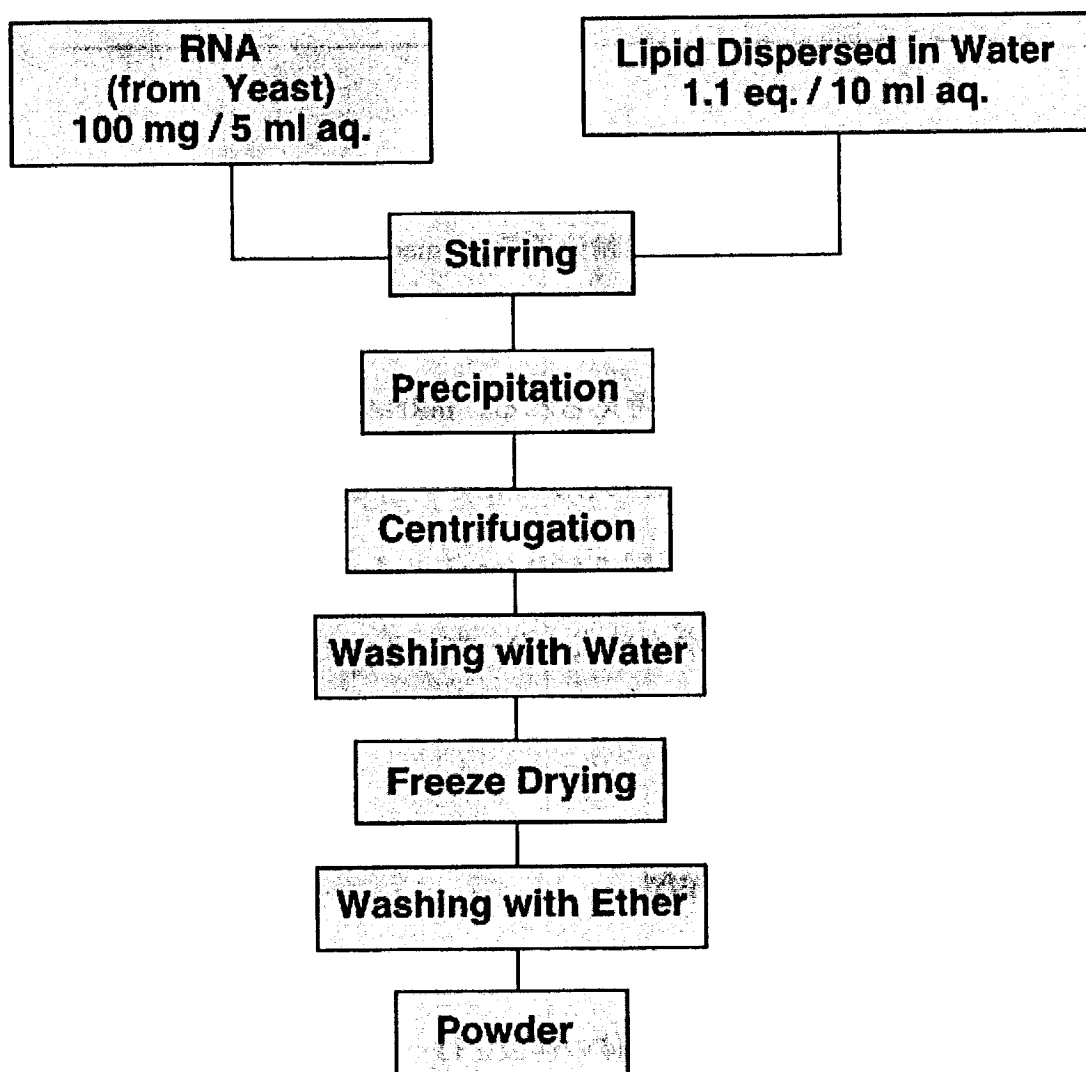


図 5-6. RNA-脂質複合体の作成方法

5-2-3. RNA-脂質複合体の有機溶媒中での性質

得られた RNA-脂質複合体を有機溶媒に溶解したときの RNA の構造や挙動について、水中に溶解した Native RNA とスペクトルを比較検討した。

1) UV スペクトル測定

装置は、UV-240（島津製作所）を用いた。サンプルは日本製紙 RNA（native RNA）または日本製紙 RNA / $2C_{12}-N^+-2C_1$ （RNA-脂質複合体）を用い、溶媒は、native RNA については TE buffer、RNA complex についてはナカライのスペクトル用特製試薬エタノールまたはナカライのスペクトル用クロロホルムをそのままを用いた。温度は池田理科の恒温槽 CCM-2 で制御した。

Native RNA と RNA / $2C_{12}-N^+-2C_1$ の 260 nm の吸収の温度依存性を図 5-7 に示す。10℃ における Native RNA のモル吸光度を 100 とした。

Native RNA は 20℃ から 70℃ にかけて濃色効果を示した。このことから Native RNA は常温で高次構造を形成するが昇温と共に融解し 70℃ 以上では完全な一本鎖構造となることがわかった。

一方 RNA-脂質複合体は昇温しても濃色効果を示さなかった。このことから RNA-脂質複合体は有機溶媒中で昇温しても一本鎖構造か二本鎖構造のどちらかを形成し続ける事がわかった。どちらの構造をとるのかを調べるために CD スペクトルの測定を行った。

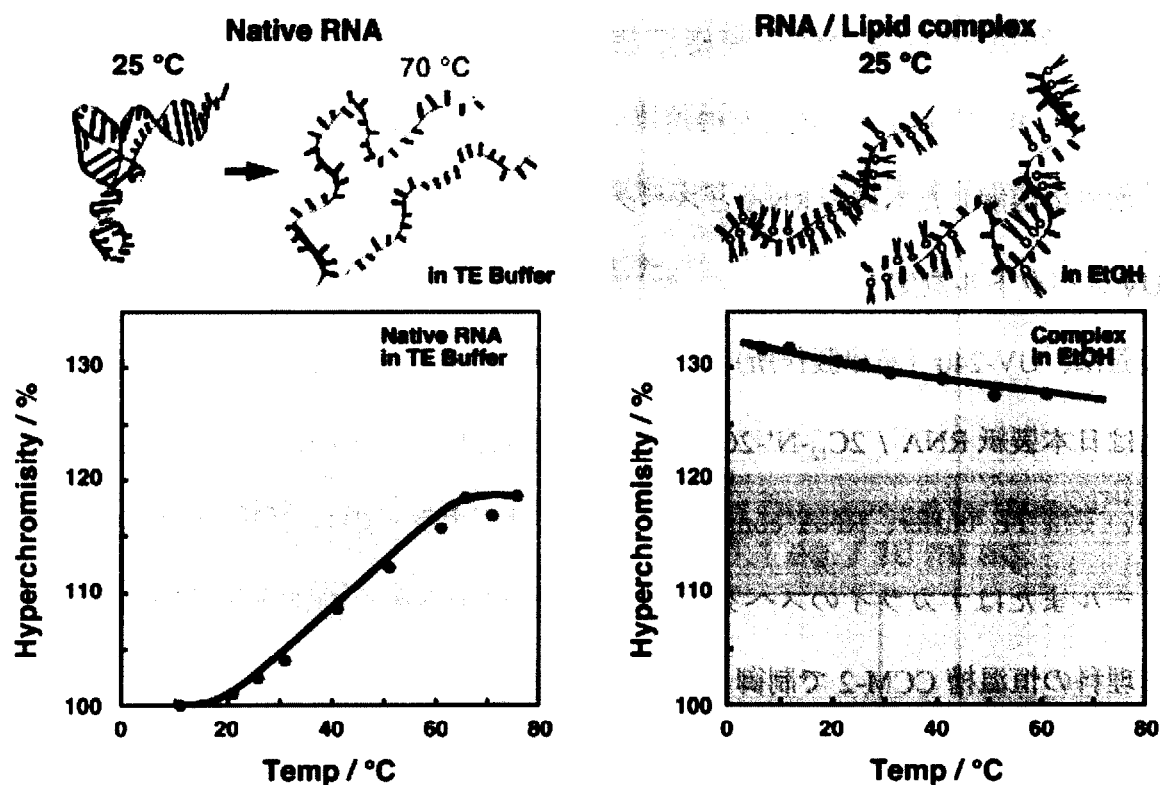


図 5-7. Native RNA (左)、RNA-脂質複合体 (右) の 260nm の吸収の温度依存性

2) CD スペクトル測定

装置は J-720 Spectropolarimeter (日本分光製) を用いた。サンプルおよび溶媒は UV スペクトルと同じ RNA / $2C_{12}-N^+-2C_1$ を用いた。温度の制御はセル温度コントローラー PTC-348WT (JASCO) により行い、所定温度に達してから 10 分間保温した後測定を開始した。Native RNA および RNA-脂質複合体の 25 °C における CD スペクトルを図 5-8 に示す。

Native RNA は 25 °C において 260 nm に正のコットン効果を持つ A 型の 2 重らせんに特徴的な CD スペクトルを示した。25 °C から 70 °C に温度を上げていくと 260 nm 付近の正のコットン効果が減少し、さらに 70 °C から 90 °C に温度をあげたとき

はスペクトルの変化はなかった。このことから水溶液中で A 型の 2 重らせん構造であった Native RNA は昇温と共に融解し 70 °C 以上では完全な一本鎖構造となっておりと考えられ、UV の結果とよく一致した。

RNA-脂質複合体は Native RNA が一本鎖構造をとる 70 °C よりさらに小さなコットン効果しか示さなかった。このことから RNA-脂質複合体有機溶媒中では一本鎖構造をとると考えられる。

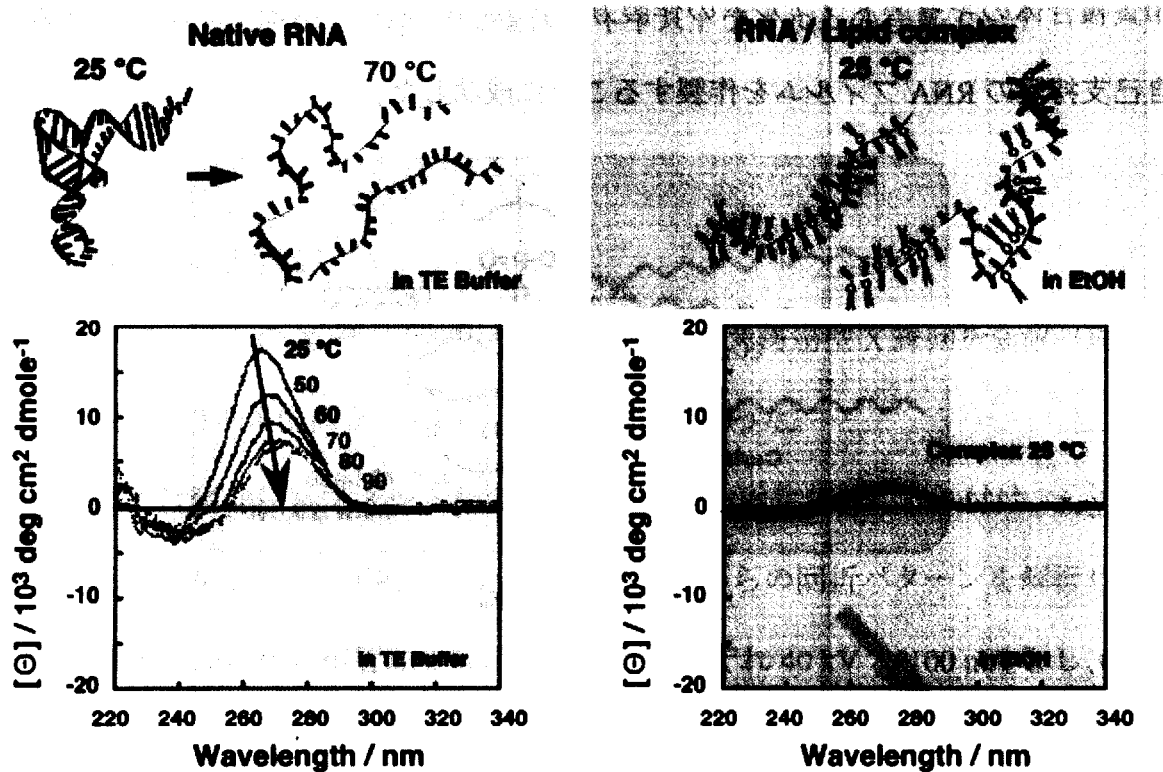


図 5-8. Native RNA (左)、RNA-脂質複合体 (右) の CD スペクトルの温度依存性。
エタノール中、25 °C.

5-2-4. RNA-脂質複合体キャストフィルムの作製

RNA-脂質複合体キャストフィルムの作製法を図 5-9 に示す。

5-2-2 節で作製した RNA-脂質複合体 25 mg をクロロホルム / エタノール (4 : 1, vol./vol) 1 mL に完全に溶解した。この溶液をテフロンプレート (3×1.5 cm) 2 枚に滴下し、ガラスシャーレ中で溶媒飽和蒸気下に静置し室温でゆっくりと溶媒を蒸発させた。乾燥後テフロンプレートからはがし、無色透明の RNA-脂質複合体のキャストフィルムを得た。キャストフィルムを水またはお湯の入った容器中で飽和水蒸気にさらし、数秒～数十秒間エージングした後、フィルムを延伸した。図 5-10 に RNA-脂質複合体のキャストフィルムの作製方法と実物のフィルムを示した。無色透明の自己支持製の RNA フィルムを作製することに成功した。

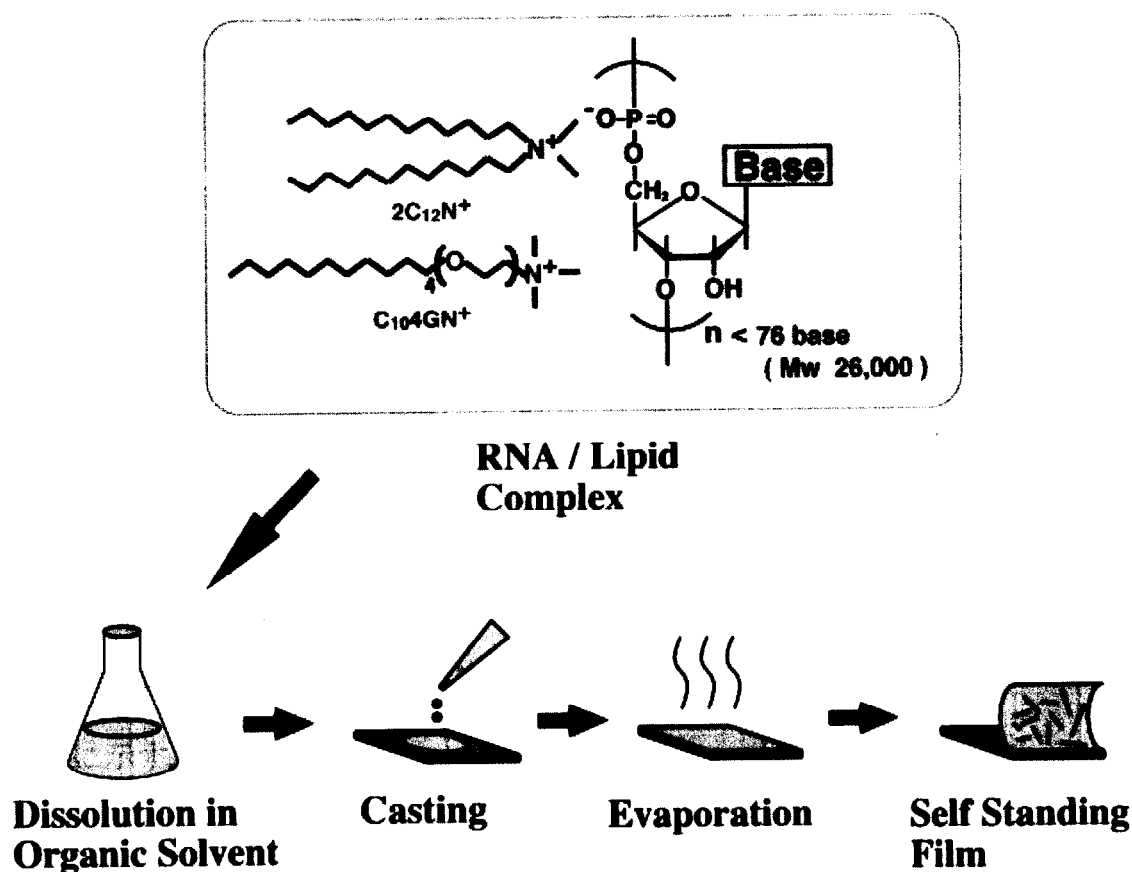


図 5-9. RNA-脂質複合体キャストフィルムの作製法

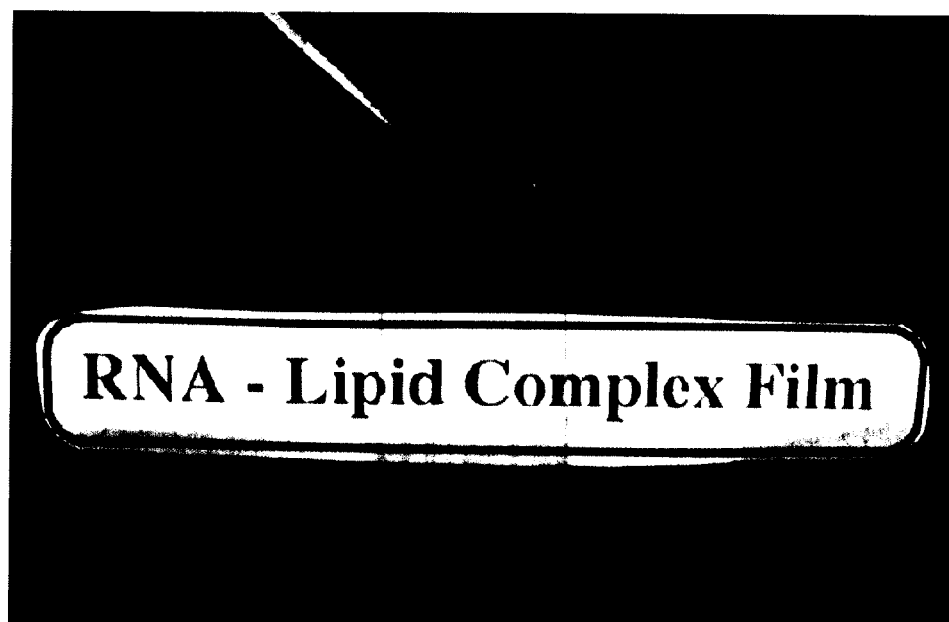


図 5-10. RNA-脂質複合体キャストフィルムの写真

5-2-5. X 線回折測定

キャストフィルムの X 線回折測定は、R-AXIS 4 広角透過型 X 線回折装置（理学電機製）を用いて DNA 配向化フィルムと同様にして行った。

未延伸または延伸したフィルムを自作したフィルム固定装置に取り付け、x, y, z の 3 方向から X 線ビームを照射してそれぞれの角度からの回折パターンを解析した。カメラ長は 150 mm で X 線管球の電圧と電流はそれぞれ 40 kV と 100 mA とし、CuK α 線を用いて測定した。X 線の照射時間は 3 分間とした。

脂質として一本鎖エーテル型の C₁₀-4G-N⁺および二本鎖型の 2C₁₂-N⁺・2C₁を用いたときの未延伸および延伸フィルムの X 線回折の結果を図 5-11 および図 5-12 に示す。キャストしたままの未延伸のフィルムについては同心円周上の回折パターンが二本鎖型脂質を用いたときは 33 Å、一本鎖エーテル型脂質を用いたときは 40 Å の距離に得られた。延伸したフィルムについてはフィルムの側面および正面から X 線を照射

したときは同心円周上の回折パターンは消え、赤道上に強い回折がそれぞれ $33\text{ \AA}$ の距離と $40\text{ \AA}$ の距離に現れた。これらの回折パターンは DNA について同じ脂質を用いたときの回折パターンととてもよく似ている (表 5-2)。

第 2 章で述べたように、DNA-脂質複合体は有機溶媒中で二重らせん構造をとり、DNA フィルム中においてもその二重らせん構造は維持されたまま DNA-脂質複合体のロッドを形成する。また用いる脂質のアルキル鎖の長さに依存して、DNA フィルム内の DNA-脂質複合体のロッド間距離が変わることがわかっている^{5,6)}。このようなことを踏まえると、RNA フィルム中で RNA-脂質複合体は模式図に示したように未延伸フィルム内では RNA 同士が水素結合して RNA-脂質複合体のロッドを形成し、このロッドがそれぞれ $33\text{ \AA}$ あるいは $40\text{ \AA}$ の間隔で密にパッキングして、フィルム内で三次元的に様々な方向を向いていると考えられる。また延伸フィルム内では RNA-脂質複合体のロッドが延伸方向に配向していると考えられる。

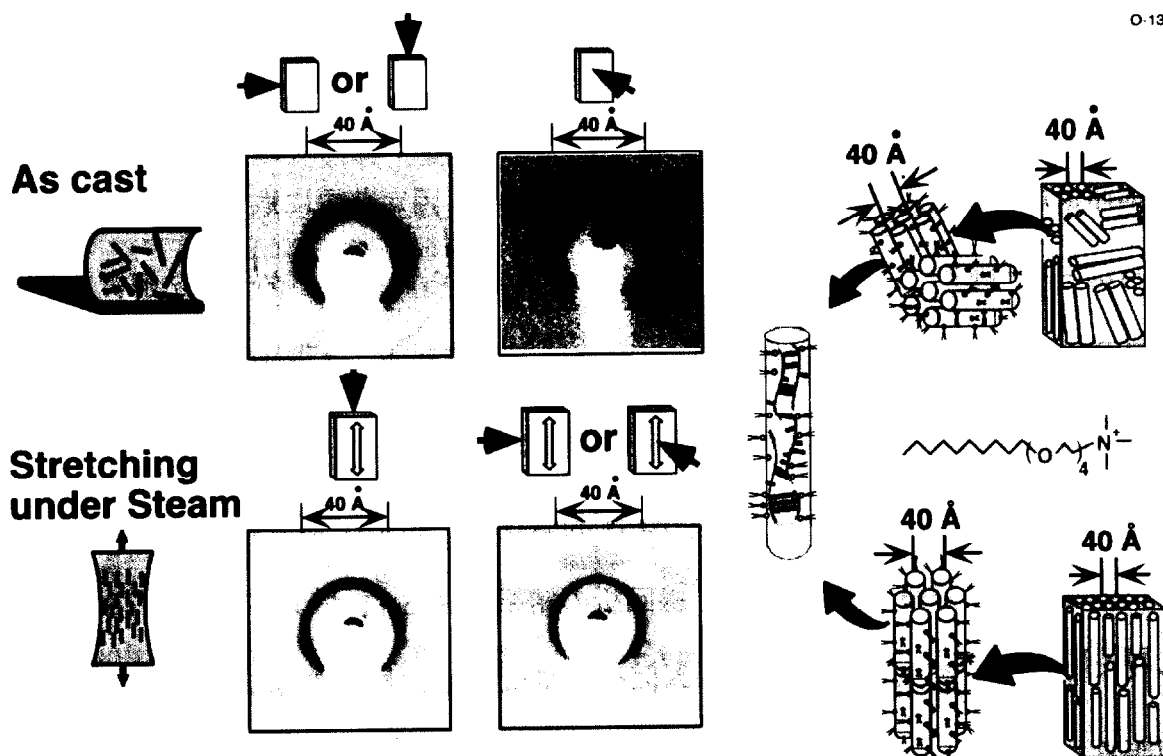


図 5-11. RNA / C₁₀-4G-N⁺の未延伸フィルム (上) と延伸フィルム (下) のX線回折像とその模式図

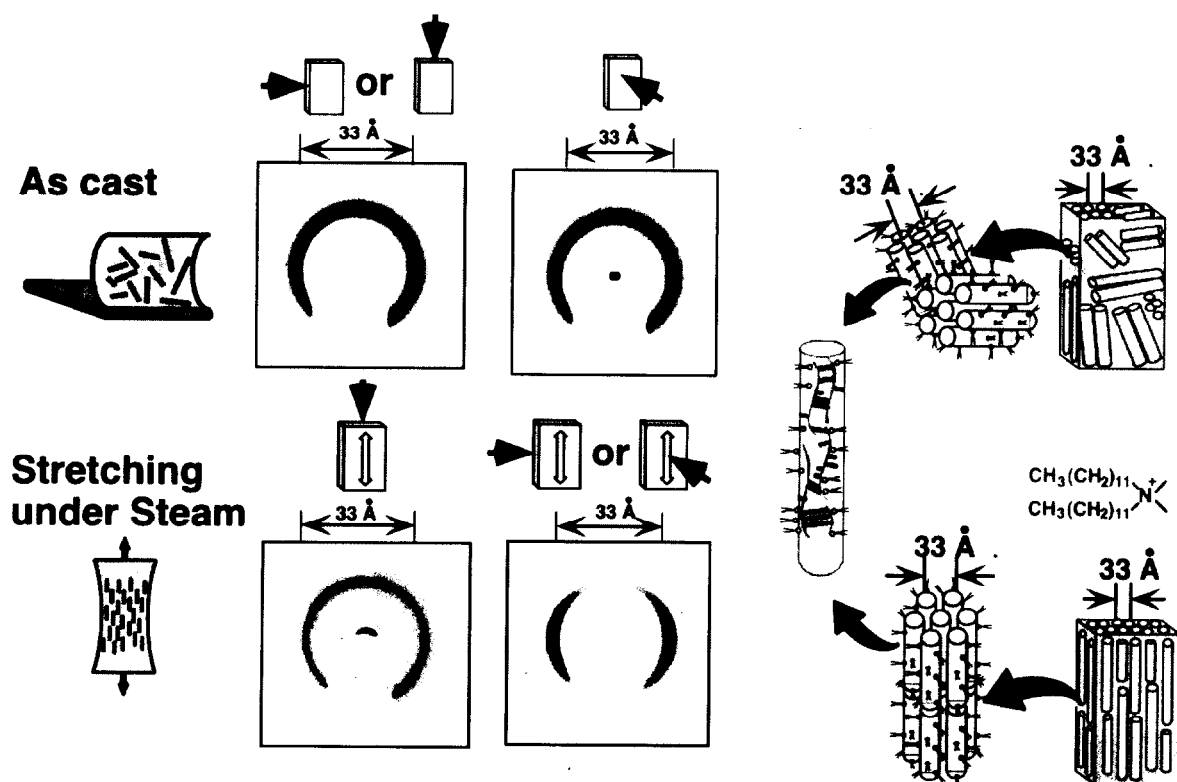
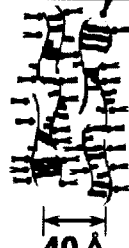


図 5-12. RNA / $2C_{12}\text{-N}^+\text{-}2C_1$ の未延伸フィルム（上）と延伸フィルム（下）のX線回折像とその模式図

表 5-2. RNA-脂質複合体フィルム、DNA-脂質複合体フィルムの内部構造

	RNA (A-form)	DNA (B-form)
		
	Mw : 26,000 < 76 base	Mw : 20×10^7 < 30,000 bp
$C_{10}\text{-}4Q\text{-N}^+$	 40 Å	 41 Å
$2C_{12}\text{N}^+\text{-}2C_1$	 33 Å	 29 Å

5-2-6. 偏光顕微鏡を用いた配光度の定量化

60℃ 飽和水蒸気下で延伸したフィルムの偏光顕微鏡写真を図 5-13 に示す。45 度回転させるごとに明暗が反転した。このことから延伸したフィルム内で RNA 鎖が延伸方向に配向していると考えられる。

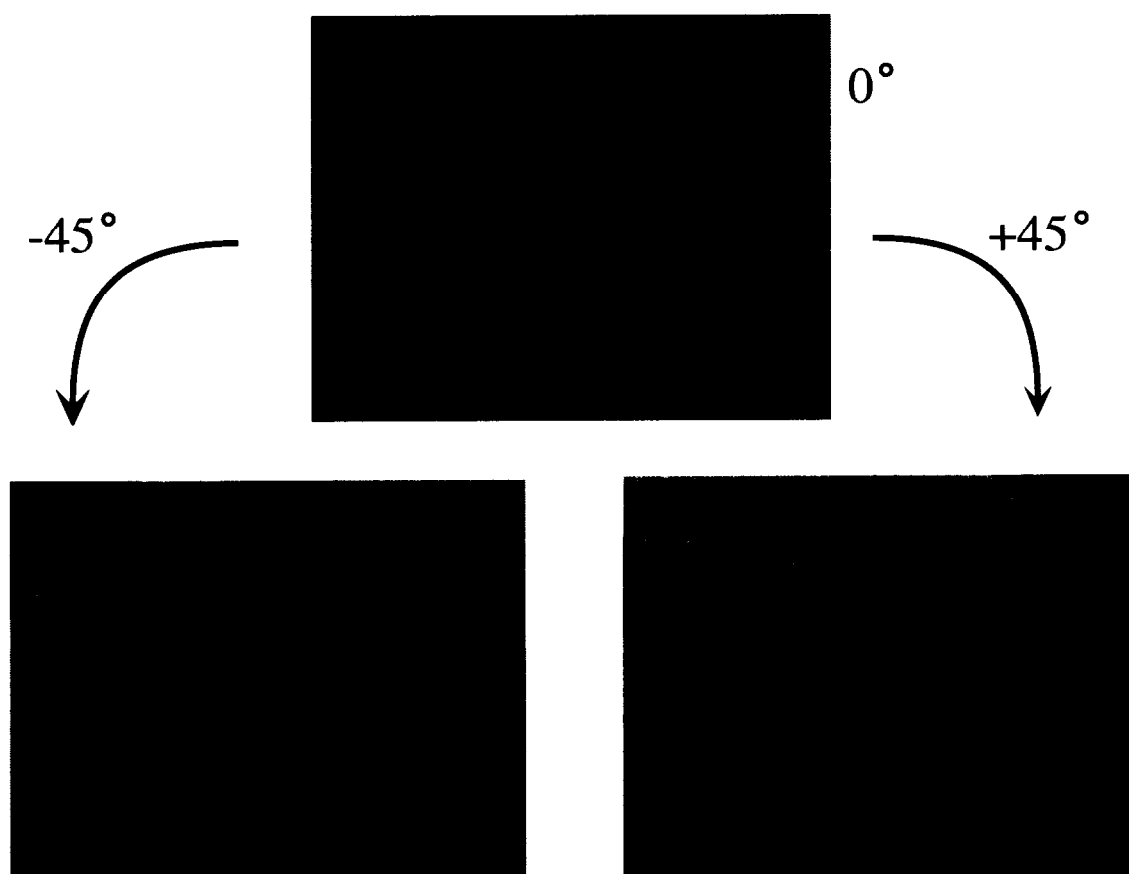


図 5-13. 延伸した RNA-脂質複合体フィルムの異方性

より配向度を定量化するために延伸度依存性を調べた。結果を図 5-14 に示す。RNA のフィルムは一本鎖エーテル型脂質、二本鎖アルキル型脂質共に DNA フィルムより延伸に限界があり、4 倍以上延伸することができなかった。しかし延伸できる範囲内においては DNA フィルムと同等の配向性を示した。X線構造解析の結果同様、このことから RNA フィルムの内部構造が DNA フィルムと似ているのではないかと考えられる。

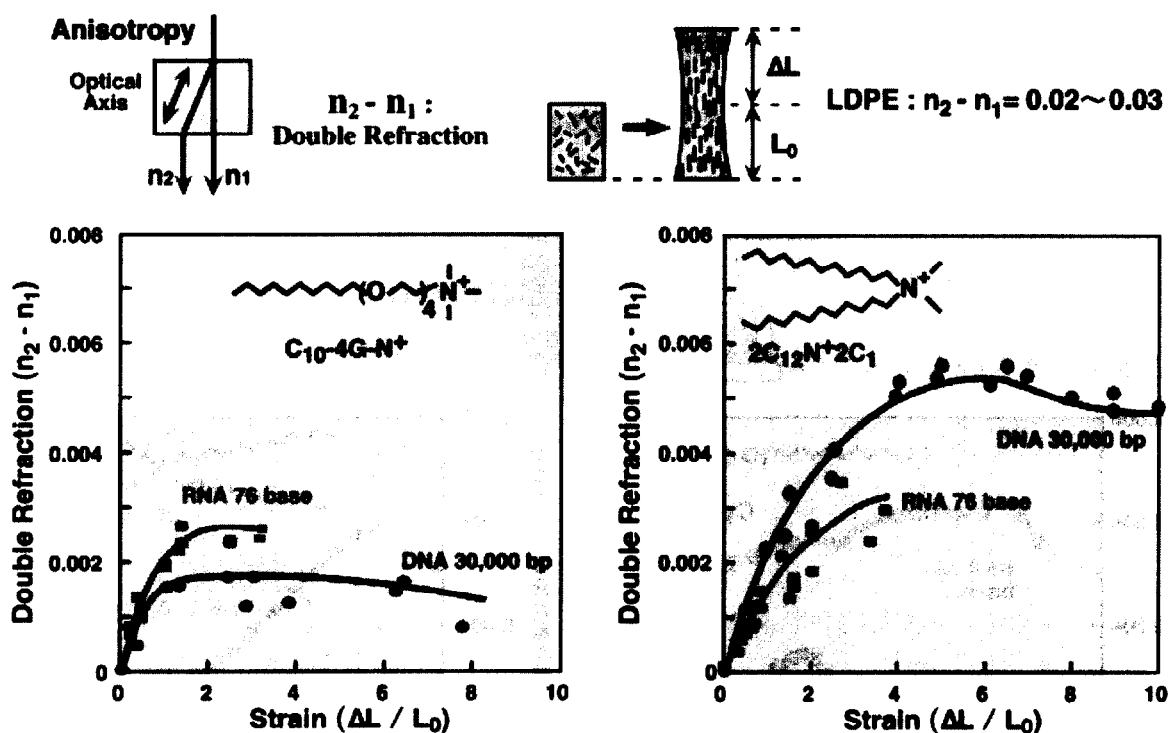


図 5-14. RNA / C_{10} -4G- N^+ フィルム (左)、RNA / $2C_{12}$ - N^+ - $2C_1$ フィルム (右) の配向度の延伸度依存性

5-2-7. フィルムの配向性の温度変化

配向度の温度変化を調べるために以下の実験を行った。DNA のフィルムを延伸できる最大のところまで延伸し、その状態でスライドガラス上に固定した。ホットステージを用いてサンプルの温度を $5\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min.}$ で上げていき、 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ごとに偏光顕微鏡でその複屈折の値を調べた。

配向度の温度依存性の結果を図 5-15 に示す。一本鎖エーテル型脂質を用いた時は DNA フィルムが $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近で完全に等方的になったが RNA フィルムは $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 付近で完全に等方的になった。二本鎖型脂質を用いた時は DNA と同じように $130\sim 140\text{ }^{\circ}\text{C}$ で配向度が急激に低下し、 $156\text{ }^{\circ}\text{C}$ では完全に等方的になった。この時にフィルムは完全に融解していることを目視により確認した。

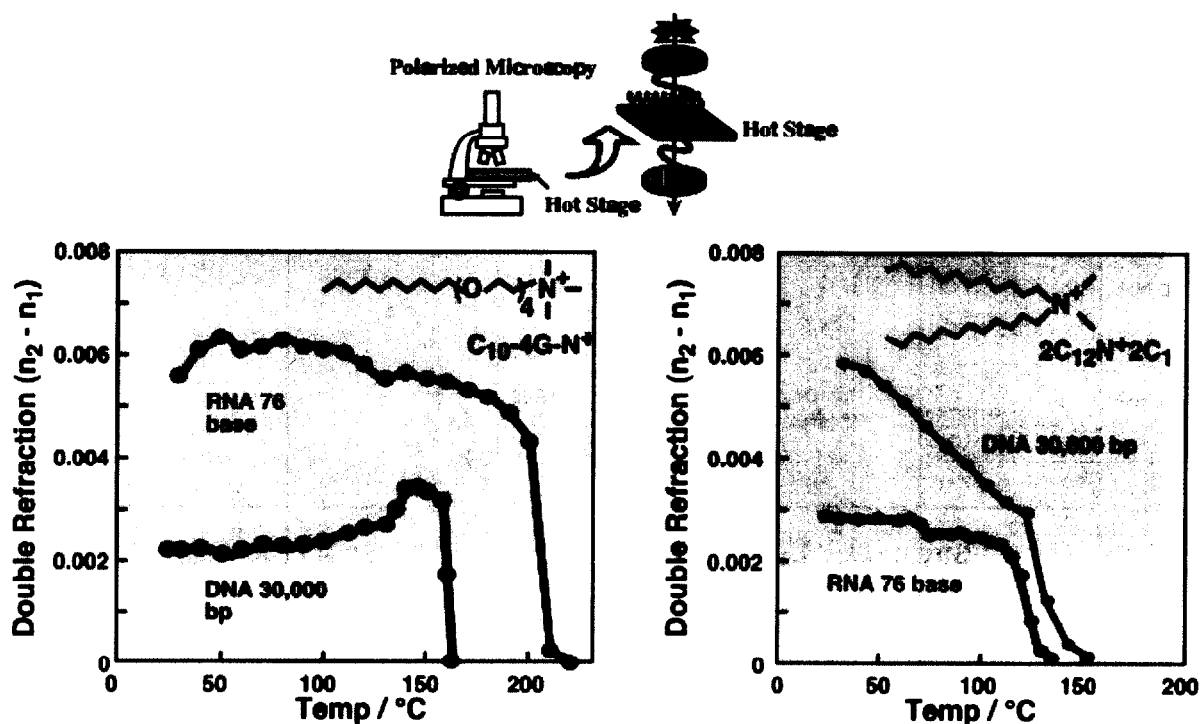


図 5-15. RNA / $\text{C}_{10}\text{-4G-N}^+$ フィルム (左)、RNA / $2\text{C}_{12}\text{-N}^+\text{-}2\text{C}_1$ フィルム (右) の配向度の温度依存性

5-2-8. RNA フィルムの引っ張り試験

引っ張り強度試験は力学試験機 TEMSILON UTM-4L (ORIENTEC CORPORATION 製) もしくは TEMSILON RTM-25 (ORIENTEC CORPORATION 製) を用いて行った。装置、実験方法は第2章で用いたものと同様である。0.5×4 cm に切り出したフィルムの膜厚を測り、25 mm の間隔でクリップに固定した。引っ張りの速度は 5 mm/min. とし、フィルムにかかる力とフィルムの伸びをプロッタに記録した。ただしフィルムの伸びは $\epsilon = (L-L_0)/L_0$ で表した。

測定は全て気温が 20 °C から 25 °C の間で行った。RNA のキャストフィルムについて引っ張り試験を行ったところ、湿度が 30%未満の時はフィルムがパリパリになってしまい測定することができなかった。よって測定は湿度約 40%において行った。またこのことから RNA フィルムは湿度の影響を受けやすいことがわかった。

図 5-16 に一本鎖エーテル型脂質および二本鎖型脂質を用いたフィルムの応力-歪み曲線を示す。一本鎖エーテル型脂質、二本鎖型脂質を用いたとき共に RNA フィルムと DNA フィルムはほぼ同じ強度をもっていたが、DNA フィルムの方がよく延びる事がわかった。

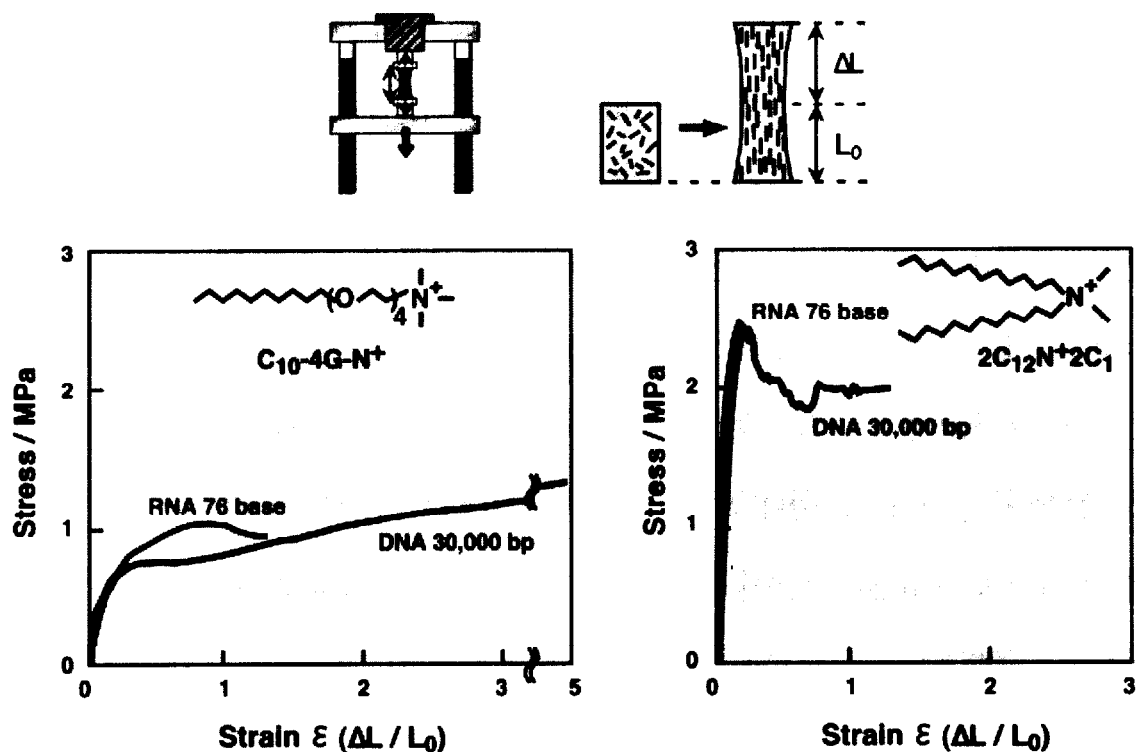


図 5-16. RNA / C10-4G-N⁺フィルム (左)、RNA / 2C12-N⁺+2C1 フィルム (右) の応力-歪み曲線

5-2-9. 動的粘弾性測定

RNA フィルムの動的粘弾性の測定を試みたが、二本鎖型脂質を用いた場合、一本鎖エーテル型脂質を用いた場合共に測定することができなかった。これはサンプルが乾燥空気条件下で非常にもろく測定開始後すぐに切れてしまったためである。このことから RNA フィルムの強度を保つために適度な水分が必要であることがわかる。

5-2-10. エチジウムブロマイド水溶液による RNA フィルムの染色実験

DNA フィルムはフィルム内で DNA 鎖がらせん構造を維持し、塩基対同士がスタッキングしているためエチジウムブロマイド水溶液により赤く染色されることがわかっている⁴⁾。RNA フィルムもエチジウムブロマイドによって染色すればフィルム内で塩基同士がスタッキングしているかどうかを定性的に判断できるかもしれない。そこで RNA フィルムをエチジウムブロマイド水溶液で染色してみた。

エチジウムブロマイド水溶液で RNA フィルムおよび DNA フィルムを染色した結果を図 5-17 に示す。DNA フィルムはエチジウムブロマイドのインターカレーションにより赤く染色されたが、RNA フィルムはあまり赤く染色されなかった。このことから RNA フィルム内にエチジウムブロマイド水溶液はインターカレートすることなく静電的相互作用などで吸着しただけだと考えられる。よって RNA フィルム内でとなりあう塩基同士はスタッキングしていないと考えられる。

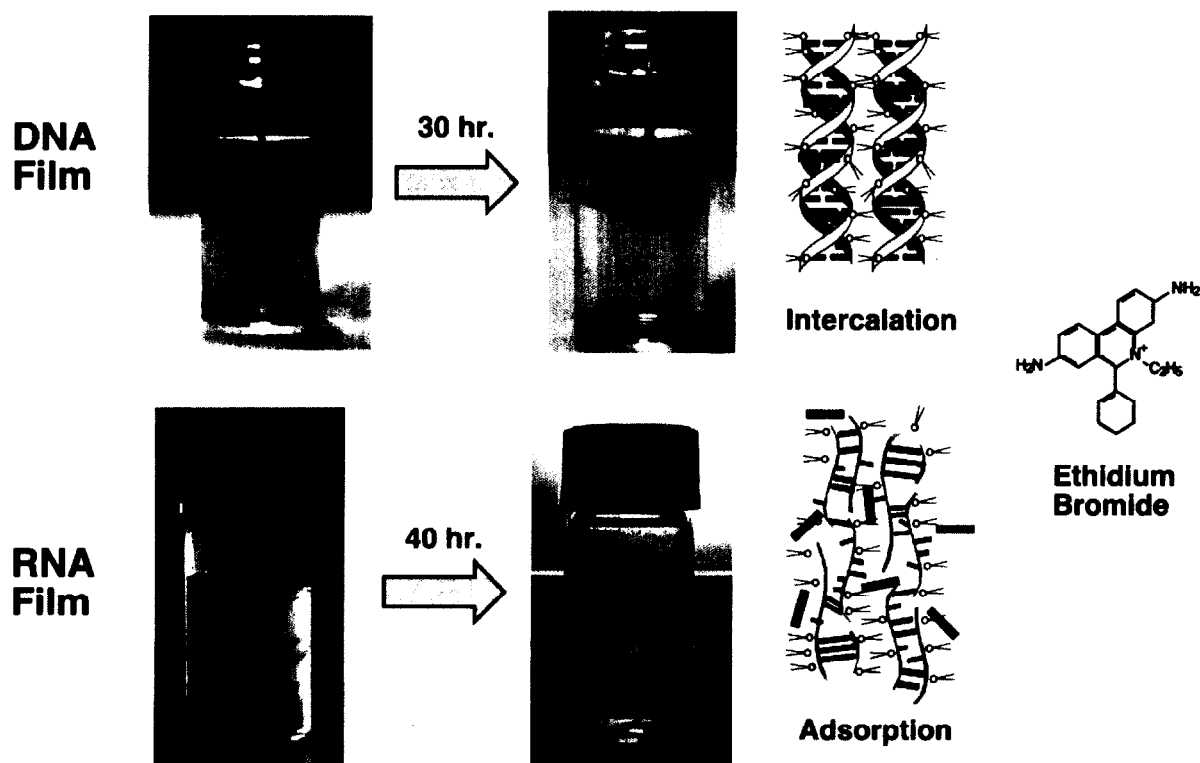


図 5-17. エチジウムブロマイドによる RNA フィルム (上) および DNA フィルム (下) の染色結果と結合様式の予想模式図

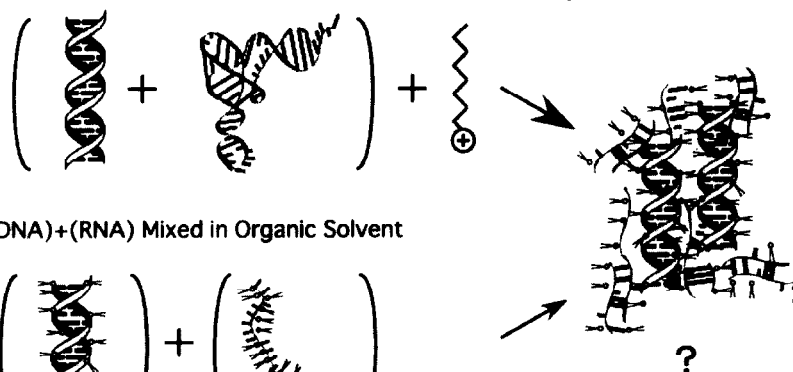
5-3. DNA・RNA-脂質複合体フィルムの導電性測定

5-2.で述べたように RNA は DNA に比べて非常に分子量が小さい (76 base) にも関わらず RNA-脂質複合体から自己支持性のフィルムができた。これは RNA-脂質複合体が分子間で水素結合によって架橋して高分子量化しているためと考えられる。この、「RNA-脂質複合体が分子間で架橋していること」を有効に用いれば、DNA と RNA を混合したときに DNA-脂質複合体フィルムでは DNA と DNA が架橋されてより大きな導電性を示す可能性があると考えた。

5-3-1. 実験方法

DNA・RNA 混合フィルムには 1) 水溶液中で DNA と RNA を 1:1 混合してから脂質とコンプレックスにしたもの、2) DNA-脂質複合体と RNA-脂質複合体を有機溶媒中で 1:1 混合したもの、3) RNA だけのコンプレックス、の3種類を作製した (図 5-18)。

1) (DNA+RNA) Mixed in Water



3) (RNA)-Lipid Complex

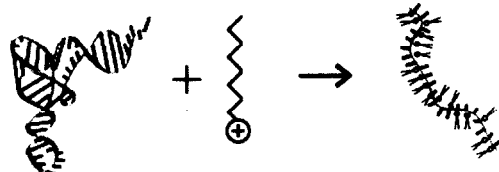


図 5-18. DNA・RNA-脂質複合体の作製

1) DNA / RNA 混合水溶液からの脂質複合体の作製

DNA や RNA の水溶液調整、水での洗いなどの操作には DEPC 水 (RNase を不活性化) を用いた。DNA (サケ白子由来, シグマ, 30,000bp) の水溶液は 50 mg / 20 ml (3.8 mM bp⁻¹)、RNA-塩酸塩 (酵母由来, 日本製紙, 76base) は 0.1M NaOH を約 10 滴添加して中和しながら溶解し、50 mg / 3 ml (7.6 mM base⁻¹) に調整しそれぞれ冷蔵庫中で一晩かけて溶解した。これらを混合した後に冷蔵庫でさらに一晩おいた。この水溶液に 1.1 当量の脂質水溶液 C₁₀-4G-N⁺ (151.6 mg / 6mL) を加えて沈澱を遠心分離 (3000rpm, 5min.) して回収、水及びエーテルで 2 回ずつ洗い、凍結乾燥を繰り返した。RNA-脂質複合体は RNA100mg、脂質 C₁₀-4G-N⁺ 151.6 mg を用いて同様に作製した。

2) DNA / RNA-混合脂質複合体フィルムの作製

上で述べたようにして作製したコンプレックスを用いて、1) DNA / RNA-脂質複合体、2) DNA-脂質複合体と RNA-脂質複合体を有機溶媒中で 1 : 1 混合、3) RNA-脂質複合体、の 3 種類のフィルムを作製した。それぞれのコンプレックス 25mg に 2ml のクロロホルム/エタノール=4 : 1 を加え、軽く攪拌しながら 2 時間かけて完全に溶解した。溶液を 1ml まで蒸発させてから 1.5×3 cm のテフロン板 2 枚にシャーレ中飽和蒸気下でキャストして一晩放置した。

3) キャストフィルムの延伸と電極への固定化

得られたキャストフィルムを 10 mm×5 mm にカットして両端を固定して熱湯蒸気の上で引っ張り 3-4 倍延伸した。電極は間隔 5 μm のくし形電極または 300μm の 2 種類を用いた。電極表面にクロロホルムを一滴落とし、3 mm×3 mm にカットした延伸フィルムを張り付けた。固定化方向は全てくし形電極のくしの間を配向した DNA / RNA が橋渡しする方向 (⊥) のみとした。その後電極を半日デシケータ内で真空乾燥し、ホコリなどが付着しないようにシャーレ中で保存して電導度測定に用いた。

5-3-2. 結果と考察

5 μm の電極の直流測定の結果を図 5-19 に、300 μm の電極の結果を図 5-20 に、すべての結果を表 5-3 に示した。

5 μm の電極の結果より、電導度はいずれも DNA だけのフィルムと同じ $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ オーダーであり、RNA を混合した事による差はなかった。RNA のみのフィルムはほとんど電導度が得られなかったことから 5 μm の電極を橋渡しするほどの高分子量化はしていない。間隔の大きな 300 μm の電極ではいずれも DNA だけのフィルムと同じ $10^{-6} \sim 10^{-7} \text{ S cm}^{-1}$ オーダーであり、RNA を混合した事による差はなかった。RNA は DNA に比べて分子量が小さいにも関わらずフィルムの力学的な物性は DNA フィルムと同等であることから優れているが、電気的な物性では当初期待したような電導度の上昇は見られなかった。

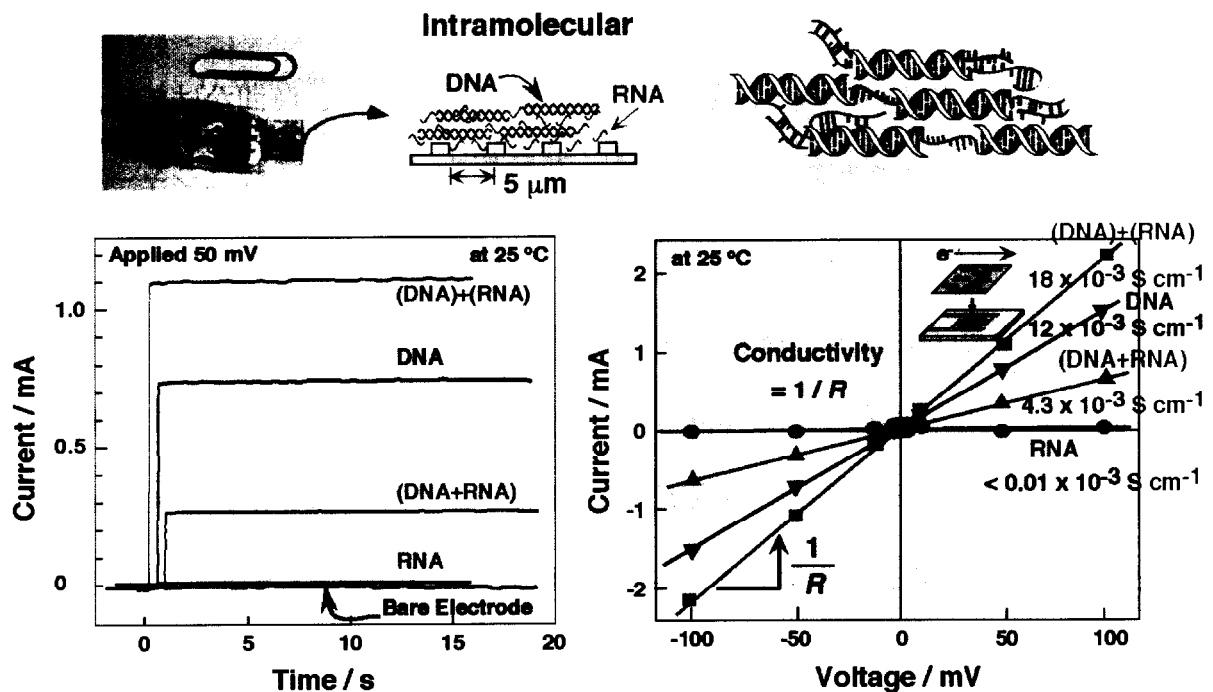


図 5-19. 5 μm の電極 (DNA 分子内) での DNA・RNA-脂質複合体フィルムの直流測定の結果

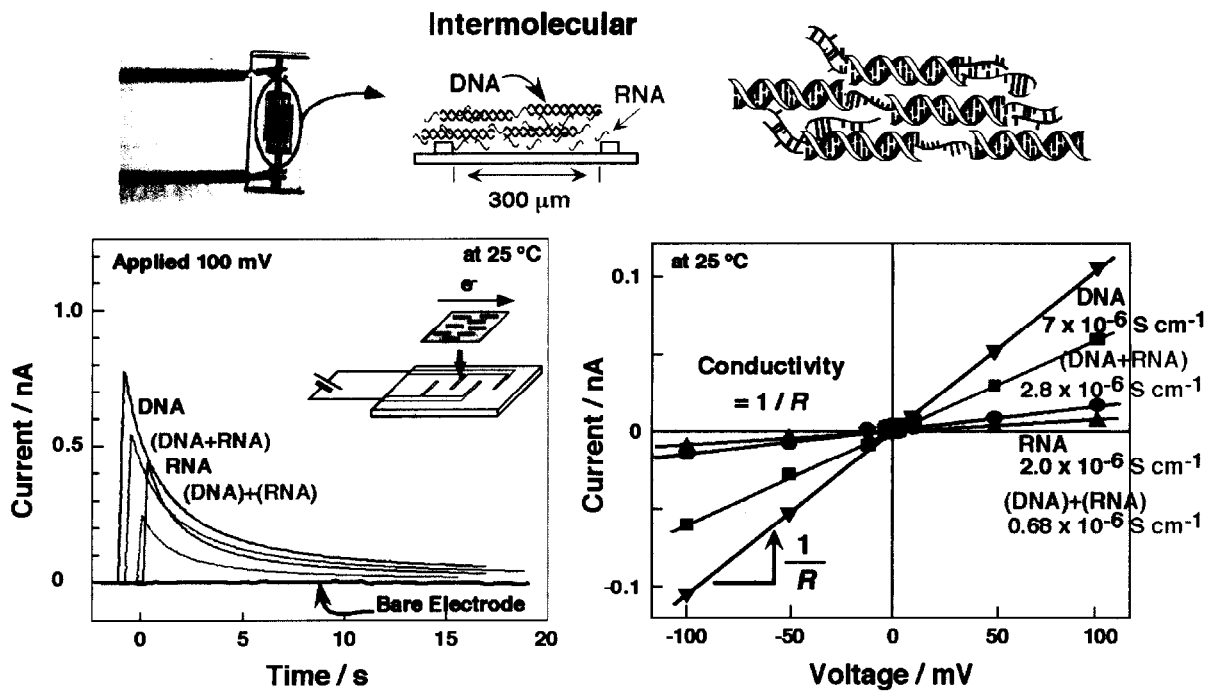


図 5-19. 300 μm の電極（DNA 分子内）での DNA・RNA-脂質複合体フィルムの直流測定の結果

表 5-3. RNA 混合フィルムの電導度

Sample	Conductivity	
	$d = 5 \mu\text{m}$ ($10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$)	$d = 300 \mu\text{m}$ ($10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$)
 DNA Film	12 	7.0
 (DNA+RNA) Film	4.3 	2.8
 (DNA) + (RNA) Film	18 	0.68
 RNA Film	< 0.01 	2.0

5-4. 総括

本章では RNA を添加して DNA 分子間を架橋して DNA フィルムの導電性を上げることを試みた。また RNA を材料化するため RNA-脂質複合体フィルムの作製と物性評価を行った。RNA と DNA の特徴を表 5-4 にまとめた。

RNA-脂質複合体は分子量が 76 base 程度と小さいにも関わらず DNA-脂質複合体（分子量 30,000 bp）と同じようにキャスト法により自己支持性のフィルムが得られることがわかった。また引っ張り試験により RNA キャストフィルムは DNA フィルムと同等の強度をもつことがわかった。

DNA-脂質複合体は有機溶媒中で二重らせん構造を維持しキャストフィルムにしても隣り合う塩基対同士がスタッキングした 2 重らせん構造を維持し続けることが田中らにより明らかにされている。一方 RNA-脂質複合体は有機溶媒中で完全なランダム構造をとるが RNA フィルム内では RNA-脂質複合体は RNA 同士が水素結合して RNA-脂質複合体のロッドを形成しフィルム内で三次元的に様々な方向を向いているということが X 線回折測定からわかった。また RNA フィルムを延伸すると RNA-脂質複合体のロッドは延伸方向に配向することがわかった。偏光顕微鏡を用いて配向度を定量化した結果 RNA フィルム内の RNA 鎖は DNA フィルム内の DNA 鎖と同様の配向性を示すことがわかった。また温度を上げてゆくと脂質の種類に依存してある温度でフィルムが融解し配向度が急激に低下することがわかった。

表 5-4. RNA と DNA の特徴のまとめ

	DNA 30,000 bp	RNA <76 base	
Native			● Native RNAは高次構造
in Org. Solv.			● RNA / Lipid Complexはランダム構造
in Film			● 分子量が小さいのにフィルムになる ● 配向度はDNAフィルムと同じ ● 強いが切れやすく湿度の影響を受ける ● 生分解性が高い

DNA・RNA-脂質複合体の電導度を測定したが、DNA と RNA を混合フィルムは DNA だけのフィルムと同じ 10^{-3}Scm^{-1} オーダーであり、RNA を混合した事による差はなかった。RNA のみのフィルムはほとんど電導度が得られなかった。以上から RNA-脂質複合体フィルムは、高分子量化していると言っても $5 \mu\text{m}$ の電極を橋渡しするほどの高分子量化はしていない。RNA を材料として用いる場合、導電性の材料としてではなく、生分解性の材料や薬物の徐放担体などへの利用の方が有効と思われる。

第5章 参考文献

- 1) (a) Crick, F., *Nature*, **227**, 561-563 (1970)
(b) Brenner, S., Jacob, F., and Meselson, M., *Nature*, **190**, 576-581 (1960)
- 2) (a) Cech, T. R., *Annu. Rev. Biochem.*, **59**, 543-568 (1990)
(b) Cech, T. R., *Sci. Am.* **255**(5): 64-75 (1986)
- 3) K. Tanaka and Y. Okahata, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 10679 (1996)
- 4) 田中健太郎, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
- 5) 中山元, 修士論文, 東京工業大学 (1998)
- 6) 石井沙知, 卒業論文, 東京工業大学 (2000)

第6章 DNA 配向化フィルムの導電性におよぼすドーピングの効果

6-1. 緒言

第5章ではRNAをDNAフィルムに混合して電導度を上げようと試みたがうまくいかなかった。DNAフィルムの導電性をより大きくするため直接的なドーピングを考えた。この考え方はポリアセチレンなどの導電性高分子などで広く行われてきた¹⁾。一般に導電性高分子は主鎖方向に共役系の伸びた構造をしており、 π 電子が豊富に含まれる。この電子が豊富な状態にドーパントとしてヨウ素、臭素などのハロゲンや SiO_3 などの電子吸引剤を混入させると局所的に電子が疎な $+$ 状態ができ（P型の半導体）、その $+$ を埋めようとして電子が主鎖に沿って次々に動くために高分子中を電子が流れる²⁾（図6-1）。

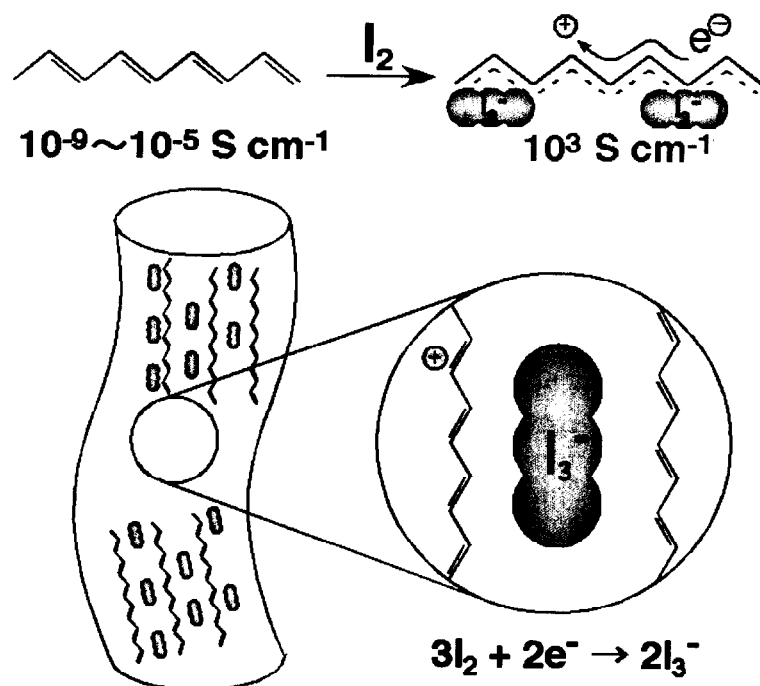


図 6-1. ポリアセチレンへのヨウ素のドーピング

図 6-2 に DNA 分子内で予想される電子移動のメカニズムを示した。DNA では 4 つの核酸塩基の中で G 塩基が最も酸化還元電位が低い³⁾ (図 6-2a)。この G 塩基から電子が引き抜かれた $G^{\cdot+}$ ラジカルに電子が分子内をホッピングして行くメカニズムが Giese らによって提唱されている⁴⁾ (図 6-2b)。DNA は核酸塩基の芳香環 π 電子が豊富であることから、ヨウ素によって共役系導電性高分子と同様に電子を一部引き抜いてやれば電子が流れやすくなる可能性がある。第 3 章で得た、DNA 分子内での $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ 、DNA 分子間での $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ の電導度の向上を期待した (図 6-2c)。

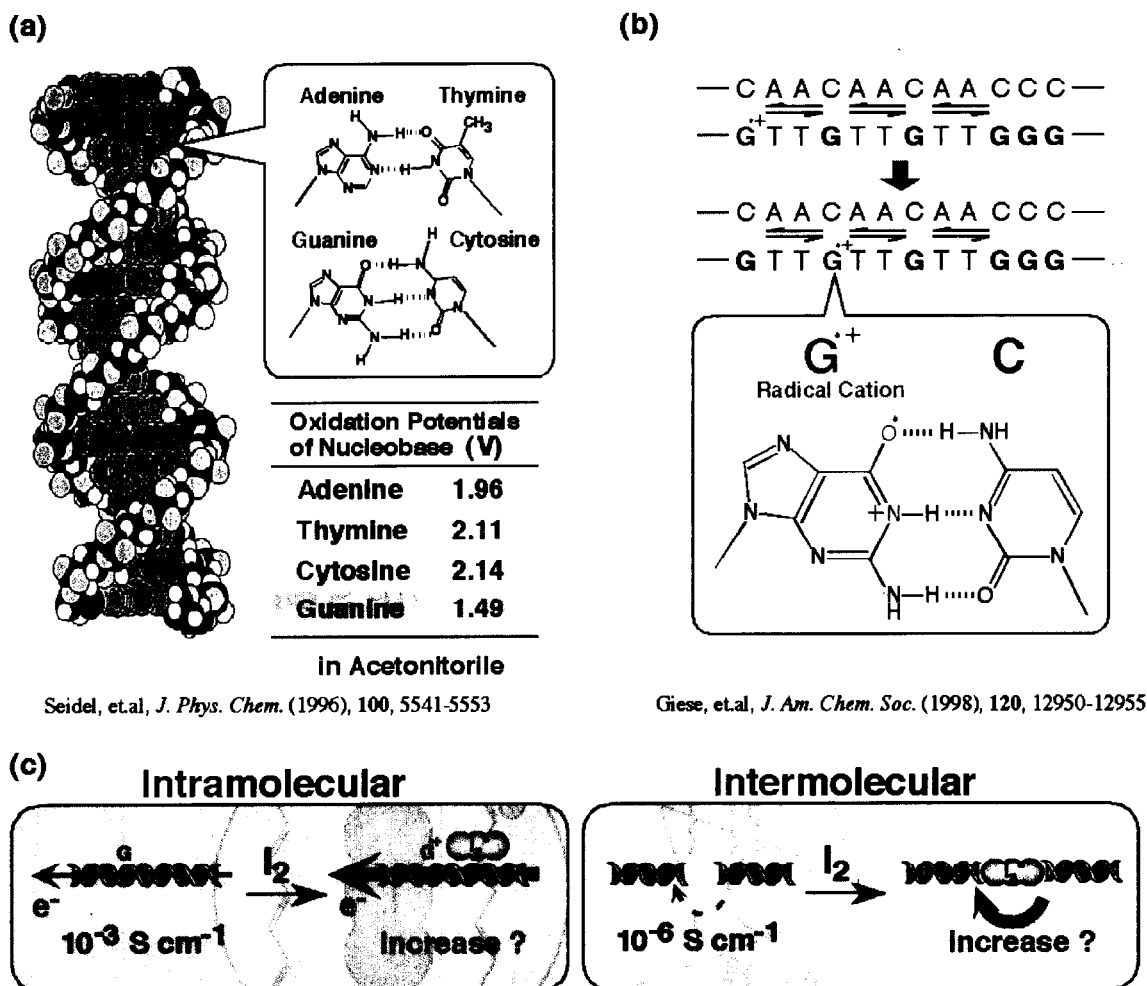


図 6-2. DNA 分子内での電子移動のメカニズム.

(a) 核酸塩基の酸化還元電位. (b) $G^{\cdot+}$ ラジカルを介した電子移動メカニズム. (c) 分子内, 分子間へのドーピング効果

また DNA の核酸塩基間には平面状の色素化合物がインターカレートすることが知られている。DNA の二重らせんでは塩基対の平面がらせんの軸とほぼ垂直に配向し、隣の塩基対はその上下に 3.4 Å の間隔で積み重なっている。平面状の色素化合物はこの塩基対間に挿入されて安定な構造になる⁵⁾ (図 6-3)。生体内では DNA に色素化合物がインターカレートすることで遺伝子の発現や転写が阻害されるために、これらの色素化合物は一般に発ガン性物質である⁶⁾。生化学の実験では DNA の検出マーカーとしてこれらの色素インターカレーターが用いられており、エチジウムブロマイド、アクリジンオレンジなどはその代表的なものである。本章ではこれらの色素分子が DNA にインターカレートすることによって DNA 分子内の電子状態が変わり、より大きな電導度を得られることを期待した。

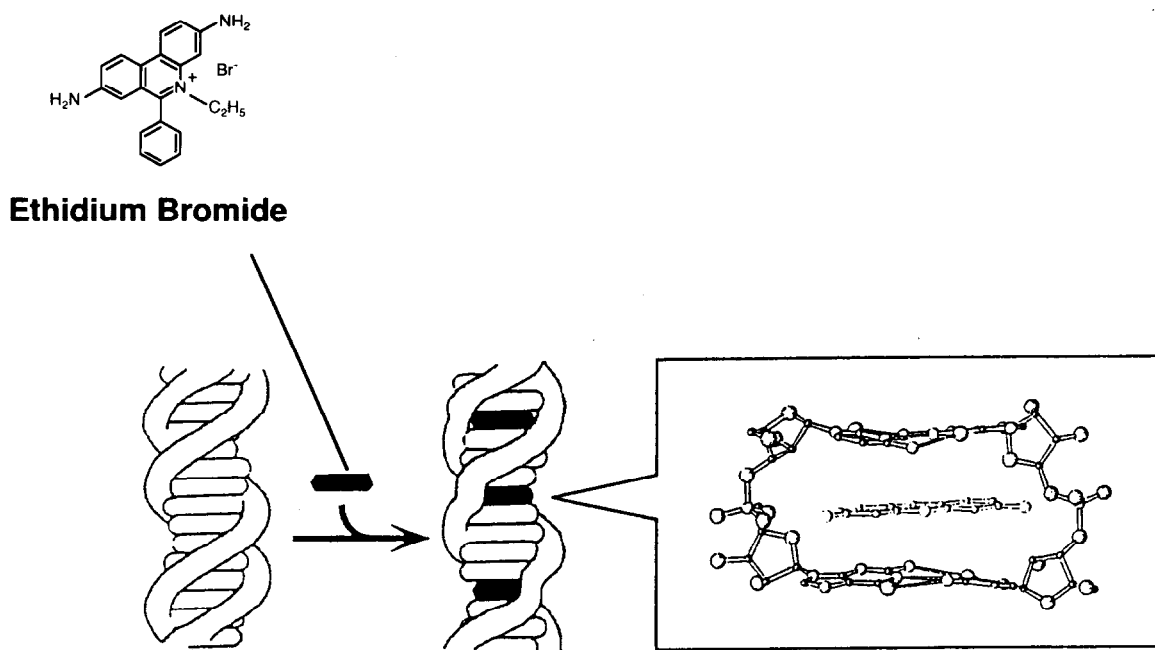


図 6-3. DNA 二重らせんに対する平面状色素分子のインターカレーション

6-2. 実験方法

6-2-1. DNA-脂質複合体フィルムへのヨウ素のドーピング

光になるべく当たらないようにしてヨウ素の粉末スパチュラー杯を褐色瓶に取り、 C_{10} -4G- N^+ / DNA30,000 bp フィルムを固定したテフロン板を約 10 分間瓶に入れてヨウ素蒸気にあてた (図 6-4)。フィルムは十分にヨウ素が吸着されて茶褐色になった。ヨウ素は腐食性が強いので注意して扱い、瓶を開ける操作は全てドラフト中で行った。

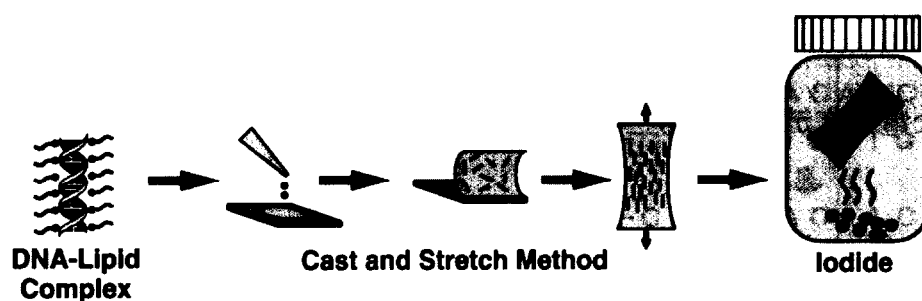


図 6-4. ヨウ素ドーピングした DNA-脂質複合体キャストフィルムの作製

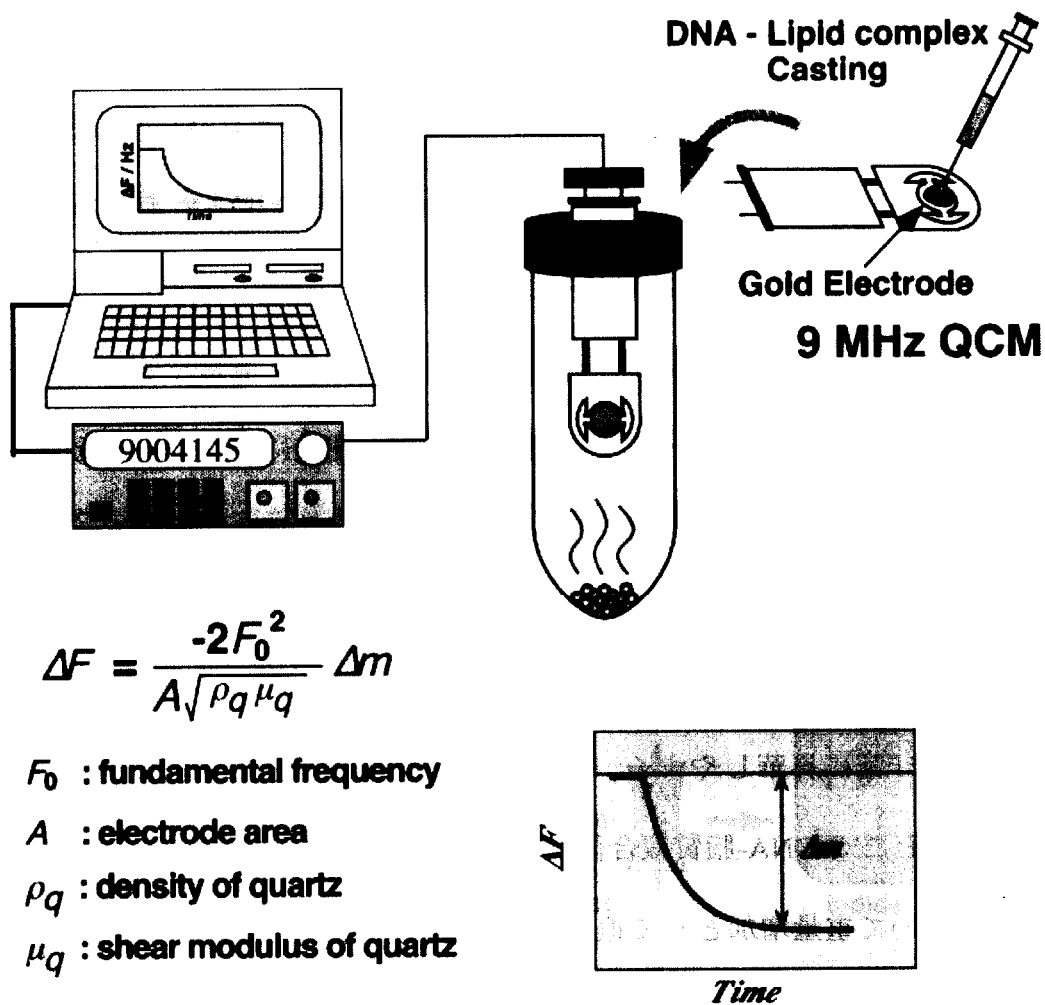
6-2-2. 水晶発振子によるヨウ素の吸着量の定量

6-2-1 でヨウ素が DNA フィルムにドーピングできることがわかったので、フィルムに吸着するヨウ素の量を定量化するため 9 MHz 水晶発振子を用いることにした。

水晶発振子 (Quartz Crystal Microbalance = QCM) は薄い水晶板の両面に金を蒸着したデバイスで、両側の金に電圧印可すると規則正しく発振する。水晶発振子の共振振動数はその電極部分に物質が付着するとその質量に比例して振動数が減少することが知られている⁷⁾。本節で用いた 9 MHz 水晶発振子は金電極の 1 cm²あたり 6.2 ng の重量が増加すると振動数が 1 Hz 減少することから、ng オーダーの質量変化を検出できるナノ天秤である。

ヨウ素は非常に昇華しやすく、気化したヨウ素は物質に吸着しやすい性質を持っている⁸⁾。そこで DNA-脂質複合体フィルムにドーピングするヨウ素の吸着量を水晶発振子を用いて重量増加として追跡することを考えた。装置の概略を図 6-5 に示した。

C₁₀-4G-N⁺ / 30.000 bp の 0.5 mg / mL クロロホルム/エタノール (4/1) 溶液 3 μ L を 9 MHz 水晶発振子の金電極にキャストした。この DNA フィルム固定化水晶発振子を所定量のヨウ素粉末を取った 15mL のプラスチックチューブ内に入れた。この直後から DNA フィルムに吸着するヨウ素の重量を振動数変化をとして測定した。プラスチックチューブは密閉した状態で水晶発振子のコネクタに接続した。



$$1 \text{ Hz} = 6.2 \text{ ng cm}^{-2}$$

図 6-5. 9 MHz 水晶発振子によるヨウ素の吸着量測定の実験概略図

6-2-3. ヨウ素のドーピング量を追跡しながらの電導度測定

9 MHz 水晶発振子でヨウ素のドーピングを少量ずつ段階的に行い、吸着量をモニタリングしながら電導度の測定を行った。実験装置の概略を図 6-6 に示した。水晶発振子および電導度測定用の 300 μm の電極を入れた 250 mL 吸引瓶に入れて口をゴム栓で密閉した。この吸引瓶の側部に、ヨウ素のエーテル溶液（濃度 10 mg / mL）入りの 5mL 注射器を接続した。この注射器の先にシリンジを接続して一滴ずつヨウ素溶液を吸引瓶に落としてヨウ素を昇華させた。6-2-1、6-2-2 では固体粉末のヨウ素を昇華させてその蒸気にフィルムをあててドーピングしたが、本節の実験では大きなガラス瓶に水晶発振子とフィルム固定化電極を入れているために粉末のヨウ素が昇華した蒸気が直接フィルムにあたるまでにタイムラグが生じてしまうのでエーテルに溶解したヨウ素溶液からの昇華でより早く吸着させるようにした。電極は 5 μm または 300 μm のくし形電極を用い、DNA がくしを垂直に橋渡しする方向（ $\perp$ ）、平行方向（ $\parallel$ ）、未延伸の 3 種類のフィルムを固定した。電極は全てあらかじめブランク確認をした。また電極にフィルムをのせずに直接ヨウ素蒸気だけをあてた際には全く電導度が見られないことを確認した（データは示さない）。これらの電極を用いてこれまでと同様に直流の電導度測定を行った。

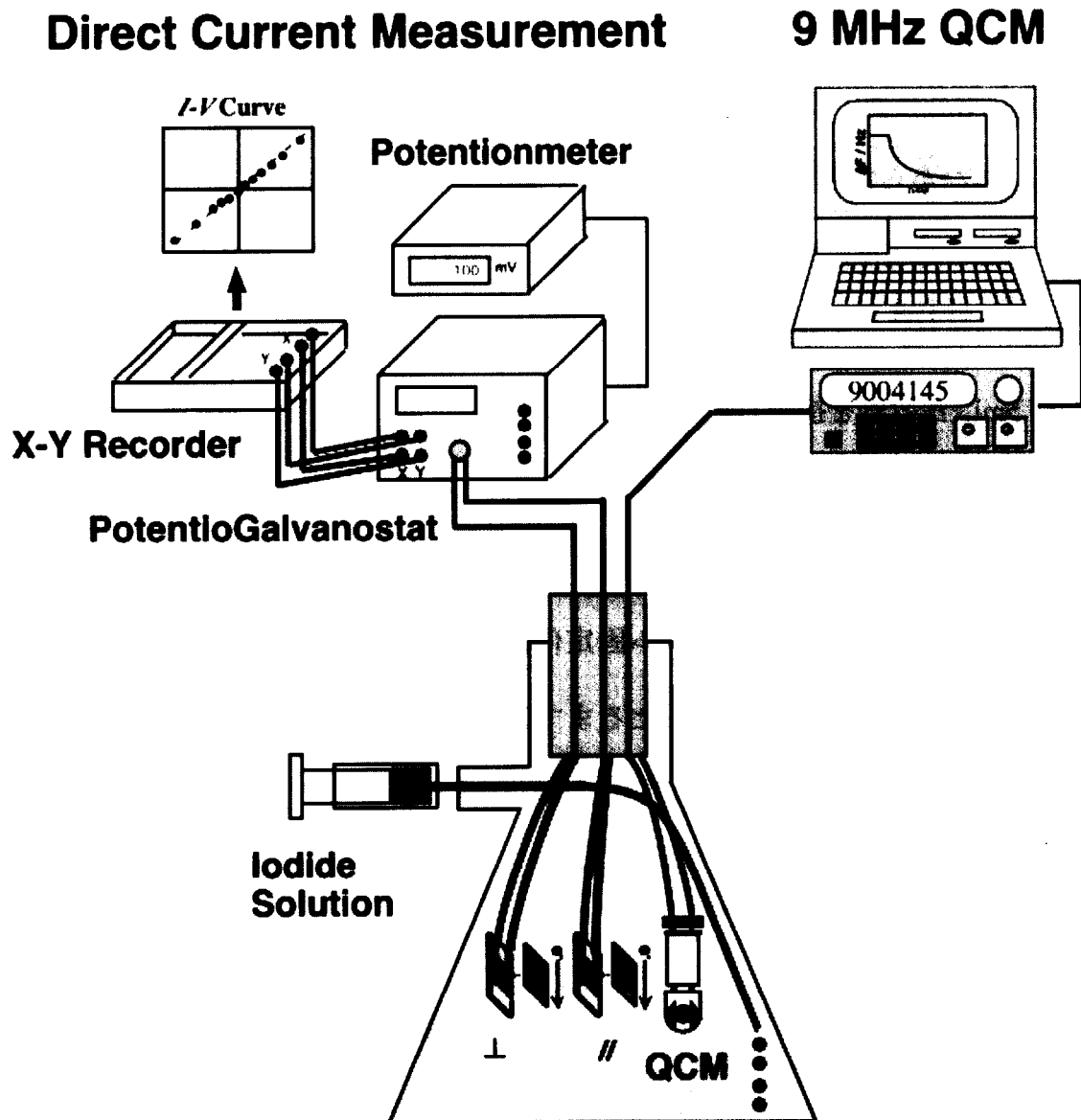


図 6-6. 水晶発振子でヨウ素の吸着量をモニタリングしながら電導度を測定する装置の概略図

6-2-4. 色素をドーブした DNA-脂質複合体フィルムの作製

DNA の核酸塩基は規則正しく π スタックして積み重なっているが、この間に平面状の色素分子が挿入（インターカレート）することが知られている。本節では、DNA にインターカレートして結合することが知られている色素をドーピングしてフィルムの電導度が上がることを期待した。

図 6-7 に本章でドーピングに用いた色素化合物の構造を示した。エチジウムブロマイド、アクリジンオレンジは一般 DNA を染色するのに用いられる色素であり、試薬として購入してそのまま用いた。 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ は G 塩基と近い酸化還元電位をもち、Barton らによって電子移動のドナーとアクセプターとして用いられている⁹⁾。これらは当研究室で合成されたものを用いた。

$\text{C}_{10}\text{4GN}^+$ / 30,000 bp のコンプレックス 25 mg を 25 ml のクロロホルム/エタノール =4/1 に溶解し、この溶液に各色素のエタノール溶液をそれぞれ 1 dye / 200 bp, 1 dye / 10bp (DNA bp に対する色素の分子数) となるように混合し、溶液を 1 時間静置した後キャストした。Ru 錯体、Rh 錯体は当量混合したものも調製した。得られたキャストフィルムを 5 倍延伸して真空乾燥してから電極間隔 5 μm のくし形電極のくしを DNA が橋渡しする方向に固定して直流測定を行った。

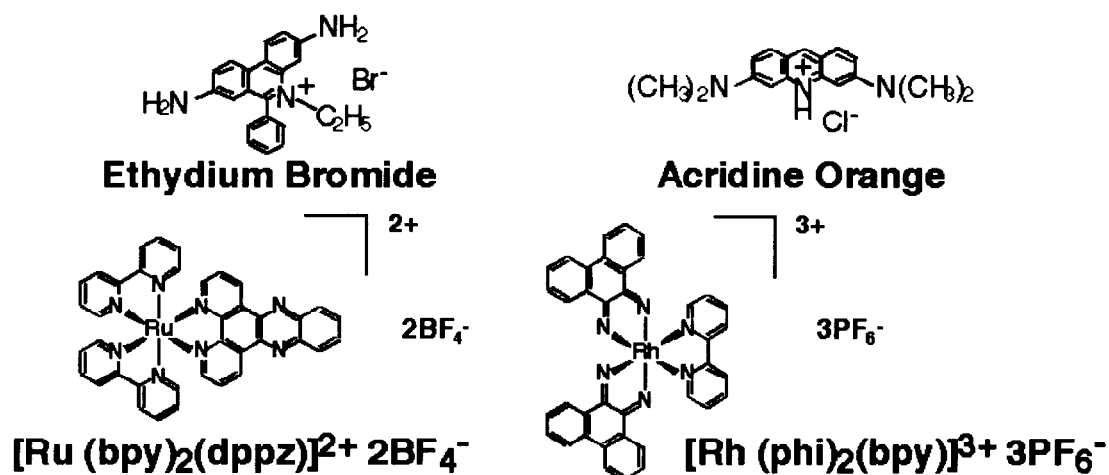


図 6-7. ドーピングに用いた色素化合物の構造

6-3. 結果と考察

6-3-1. 水晶発振子によるヨウ素吸着量の定量

DNA フィルムへのヨウ素の吸着量を 9 MHz 水晶発振子で定量した。図 6-8 および表 6-1 に DNA フィルムをキャストした水晶発振子に対するヨウ素の吸着による振動数の変化を示した。

図 6-8、表 6-12 より、ヨウ素の飽和吸着量はおよそ 1500 Hz、ドーピング率（重量）として 75%（w/w）と見積もれた。これは DNA 1 塩基対に 4 個のヨウ素分子 I₂（2.7 個の I₃）がついていることになる。以下ではドーピング率はこの、DNA 1 塩基対に何個のヨウ素が付いているか（単位は mol / DNA bp）で議論する。容器内のヨウ素粉末が 0.3 mg 以下の量すなわちフィルムへの吸着が 600 Hz 以下であれば飽和に達する前に吸着量を段階的に制御できると考えられる。

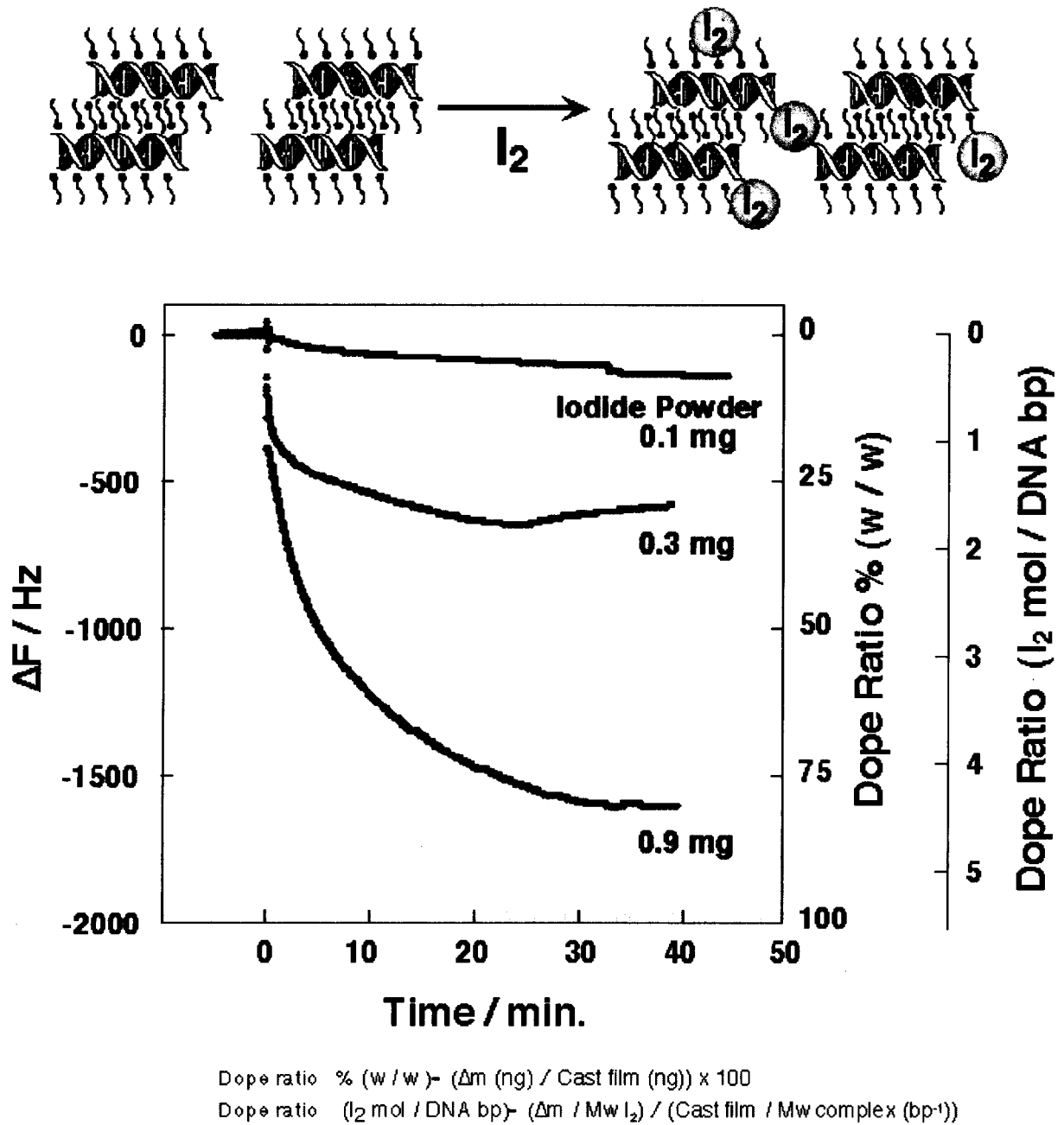


図 6-8. DNA フィルムをキャストした水晶発振子へのヨウ素の吸着挙動

表 6-1. DNA フィルムへのヨウ素の吸着量

チューブに入れた ヨウ素量 (mg)	Cast film (ng)	ヨウ素の 結合量 Δm (ng)	Dope ratio % (w / w)	Dope ratio (I ₂ mol / DNA bp)
0.1	1988	139	7	0.37
0.3	2010	556	28	1.5
0.9	2000	1521	76	4.2
1.6	2727	1448	53	3.0
1.9	2003	1168	58	3.2

Dope ratio % (w / w) = $(\Delta m_{\max} \text{ (ng)} / \text{Cast film (ng)}) \times 100$

Dope ratio (I₂ mol / DNA bp) = $(\Delta m / M_w I_2) / (\text{Cast film} / M_w \text{ complex (bp}^{-1}\text{)})$

6-3-2. ヨウ素ドーピングの濃度効果

6-3-1 の結果をもとに、水晶発振子の振動数変化 (ΔF) が一度に 600 Hz を越えないよう段階的に制御しながら電導度を測定した。図 6-9 にヨウ素溶液を一滴ずつ滴下していった際の発振子振動数の時間変化を示した。ヨウ素のエーテル溶液を段階的に滴下してゆく方法でうまくドーピング率が制御できた。振動数変化 (ΔF) が約 1200 Hz までで飽和に達し、6-3-1 の結果と一致した。振動数変化 (ΔF) が 0, 314, 552, 915 Hz (ドーピング率はそれぞれ 0.087, 1.5, 2.6 mol / DNA bp) のとき (図 6-9 の①-④) に測定した電流応答を図 6-10 に示した。

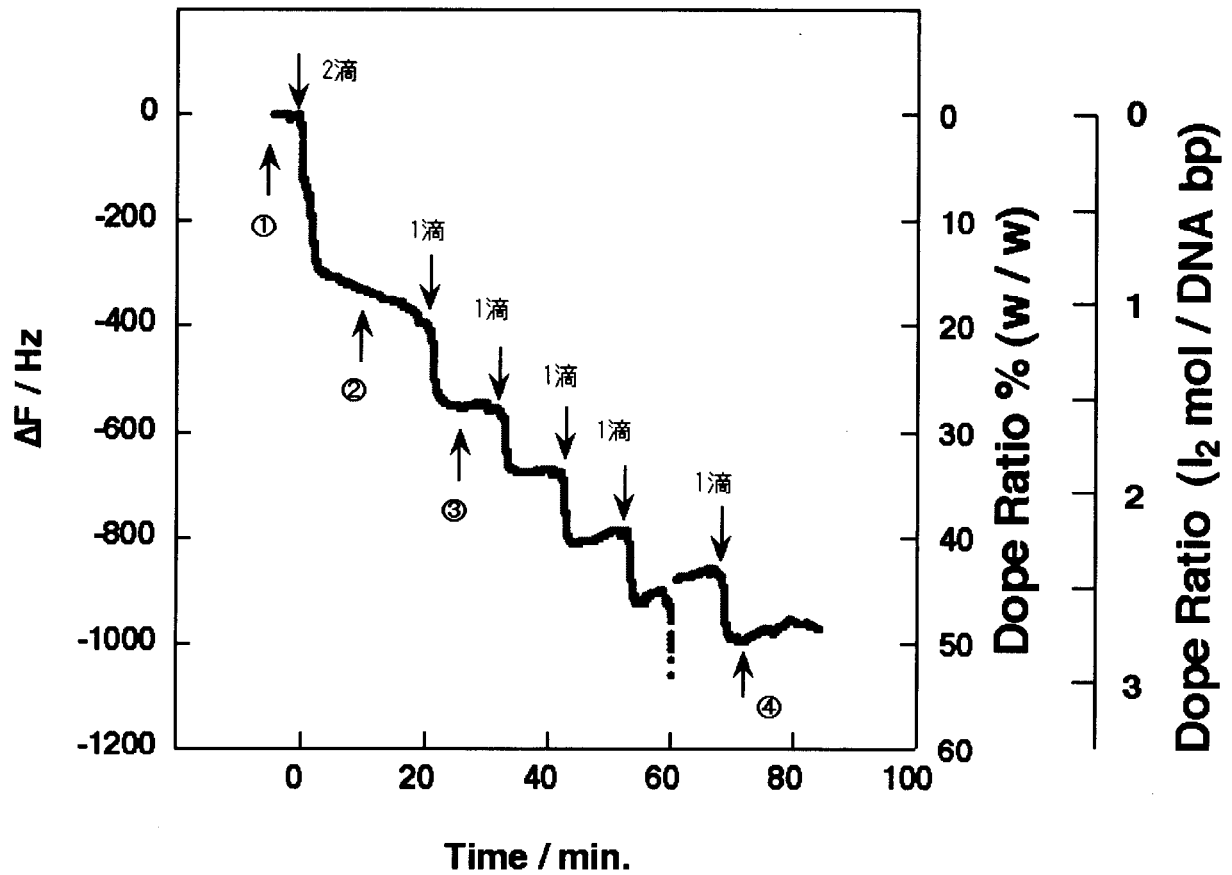


図 6-9. DNA フィルムをキャストした水晶発振子へのヨウ素の吸着挙動.

↓でヨウ素溶液を滴下、↑①-④での電導度の値を測定した (図 6-10)

図 6-10 に振動数変化 ΔF 、すなわちヨウ素のドーピング率 (mol / DNA bp) を段階的に増加させた際の直流応答電流の変化を示した。ヨウ素のドーピング量を増加させても $5\ \mu\text{m}$ の電極では応答電流が変化しなかった。一方 $300\ \mu\text{m}$ の電極ではドーピング率とともに応答電流が増加した。

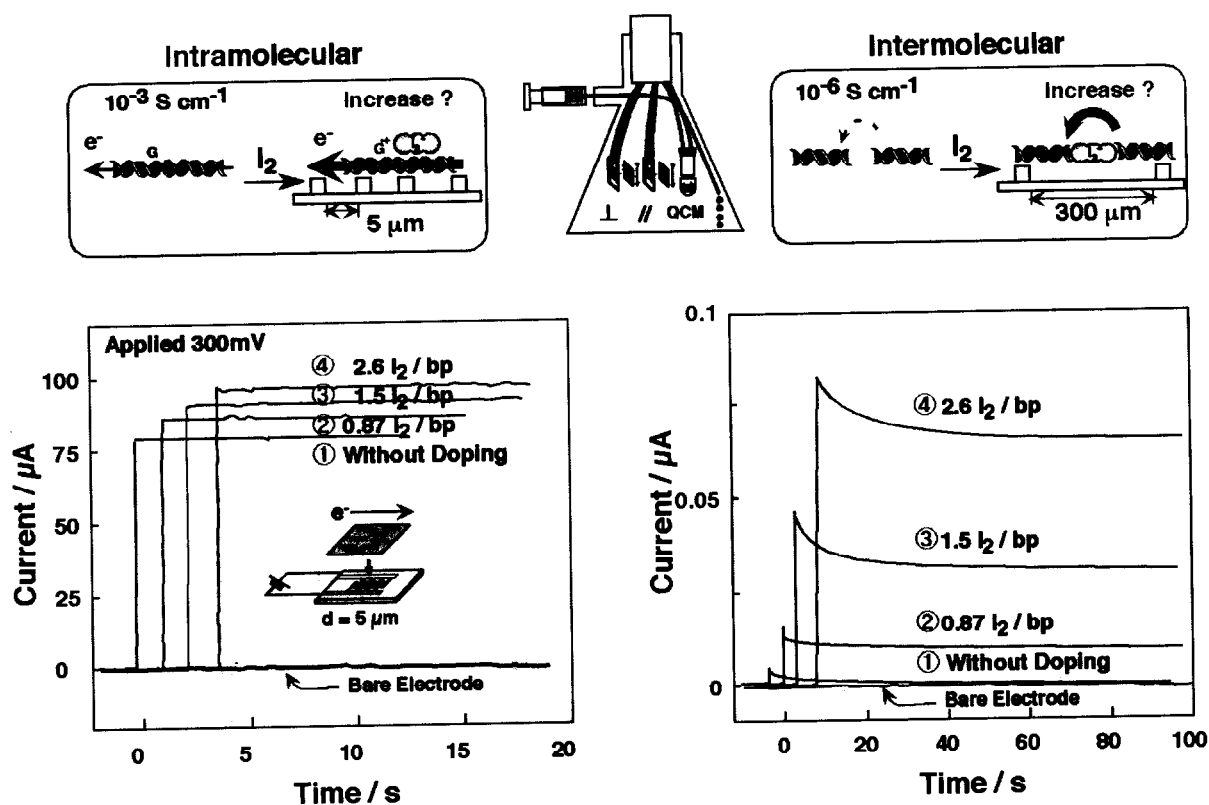


図 6-10. ヨウ素の吸着量に対する直流応答電流の変化.

$5 \mu\text{m}$ の電極の結果 (左) $300 \mu\text{m}$ の電極の結果 (右). いずれも印加電圧は 300 mV 、フィルムは DNA がくしを橋渡しする方向.

図 6-10 で得られた応答電流から電導度をもとめ、ヨウ素のドーピング率と電導度の関係を図 6-11 に示した。 $5 \mu\text{m}$ の電極ではドーピング率に関係なく電導度は $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ のオーダーで変化しなかった。一方 $300 \mu\text{m}$ の電極ではドーピング率とともに電導度は上昇し、振動数変化が約 700 Hz すなわちドーピング率が 1.9 mol / DNA bp のときに DNA がくしを橋渡しする方向 ($\perp$) の電導度が $10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ のオーダーから $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ のオーダーに 60 倍上昇した。一方平行方向 ($\parallel$) では電導度はおよそ 1.2 倍上昇しただけだった。この時の電導度の異方性比 ($\perp : \parallel$) は 50 倍となった。振動数変化が約 1000 Hz すなわちドーピング率 2.8 mol / DNA bp のときは橋渡しする方向 ($\perp$) の電導度は 110 倍まで上昇した。一方平行方向 ($\parallel$) ではおよそ 7 倍上昇し、

ドーピング率が上がると平行方向 ($//$) にもドーピングの効果が出始めた。さらにドーピング率が上げると平行方向 ($//$) の電導度は橋渡し方向 ($\perp$) に追いついた。

以上のように、ヨウ素のドーピングによって DNA 配向化フィルム of 電導度は $5\text{ }\mu\text{m}$ の電極では 10^{-3} S cm^{-1} で変化せず、 $300\text{ }\mu\text{m}$ の電極では 10^{-5} S cm^{-1} から 10^{-3} S cm^{-1} まで上昇した。このことはヨウ素のドーピングが DNA 分子内には効果がなく、DNA 分子間に効いていることを示す。ドーピング率が飽和に達していない領域では橋渡し方向 ($\perp$) の方が効果的である。よってこの領域ではヨウ素による電導度の増加は DNA の配向が効いており、ヨウ素は DNA の主鎖に沿った電子移動を補助する役目をしている。

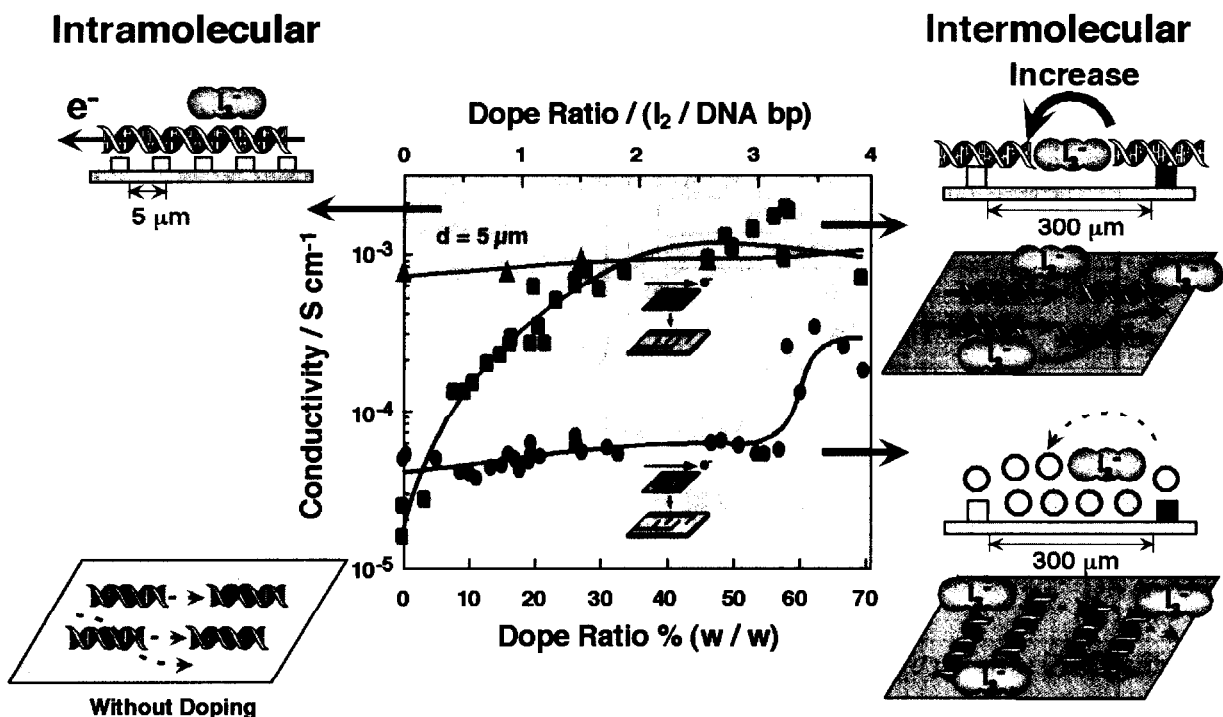


図 6-11. ヨウ素の吸着量と電導度の関係

図 6-12 にヨウ素のドーピング率が 4 mol / DNA bp 以上のほぼ飽和まで十分にドーピングした場合の橋渡し方向 ($\perp$)、平行方向 ($\parallel$) の電導度測定の結果を示した。分子間を見るために $300 \mu\text{m}$ の大きな電極を用いた。 2.6 mol / DNA bp までは異方性に大きな差が見られるが、十分にドーピングさせた 4 mol / DNA bp 以上ではどちらの方向でも電導度は上昇し、異方性の差はなくなった。

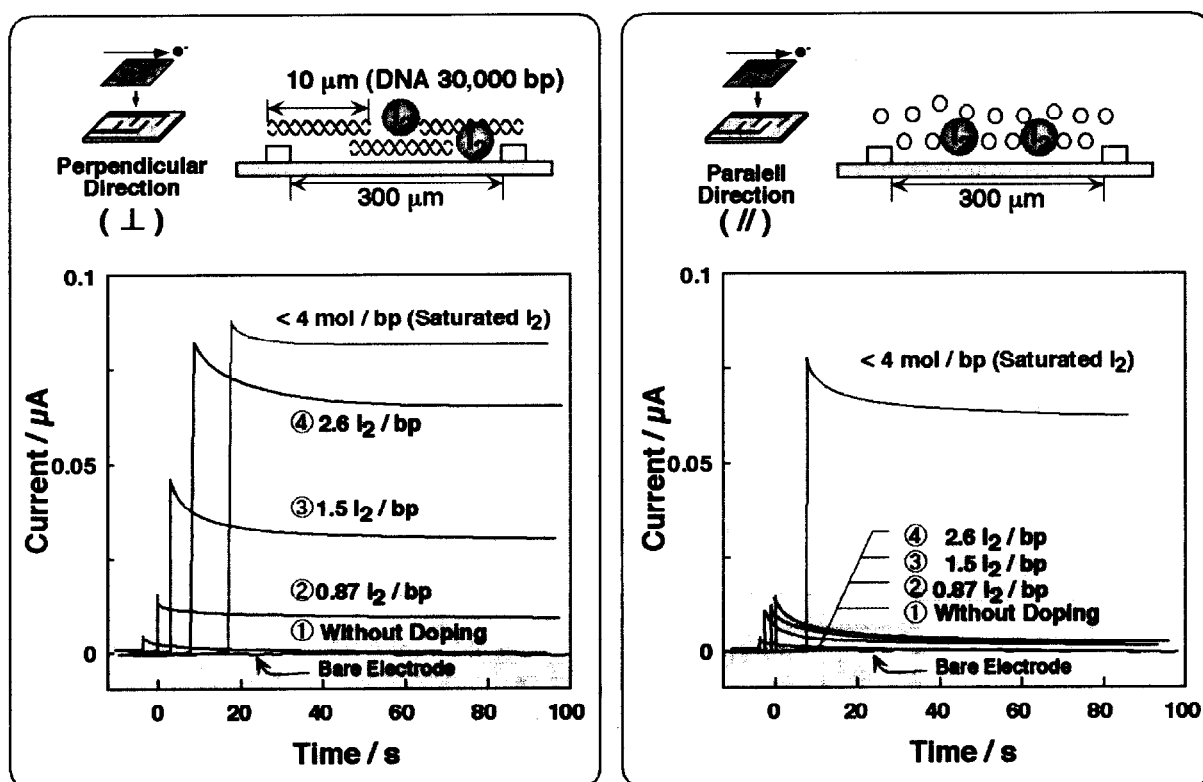
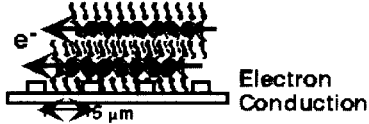
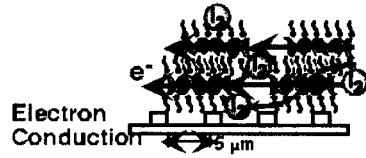
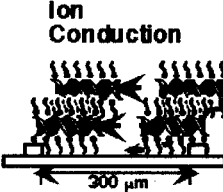
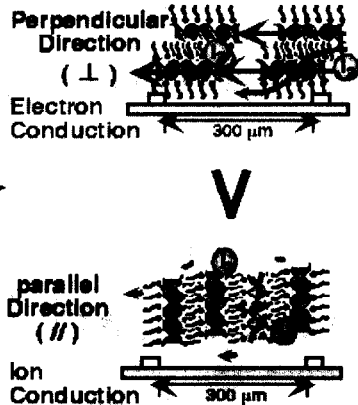
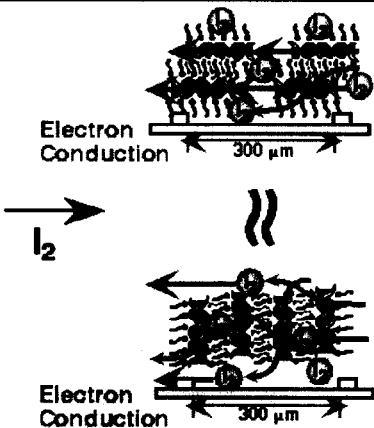


図 6-12. 飽和まで十分にヨウ素をドーピングした DNA フィルムの電導度

図 6-10、図 6-11、図 6-12 の結果から DNA 配向化フィルムに対するヨウ素ドーピングの効果を表 6-2 にまとめた。

表 6-2. DNA 配向化フィルムに対するヨウ素ドーピングの効果

Without Doping 0 (I_2 mol / DNA bp)	Low Dope Ratio 1 ~ 3 (I_2 mol / DNA bp)	High Dope Ratio < 4 (I_2 mol / DNA bp)
Intra-molecular		
		
Inter-molecular		
		

ヨウ素ドーピングしても 5 μm の電極で DNA 分子内の電導度をあげる効果がなかったことから、DNA 配向化フィルムが電極を橋渡ししていれば電子は電極から供給され、ドーピングなしの電子電導の挙動と変わらないことがわかった。6-1 で述べたようにヨウ素をが G 塩基から電子を引き抜いて $G^{\cdot+}$ をつくり、周囲の G 塩基が次々と電子を渡して行くメカニズムによる電導度の上昇は DNA 配向化フィルムではみられなかった。

300 μm の電極ではドーピングの効果があったことから、フィルム内で DNA 分子間がヨウ素によって"つながれた"状態になり、ドーピングなしのイオン伝導挙動から電子伝導の $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ の大きな電導度をもつことがわかった。また十分飽和までドーピングすると異方性がなくなったことから、この DNA 分子間の"橋渡し"は DNA の配向方向に関係ないほど大きくなっていることが分かった。

6-3-3. 色素ドーピングの効果

代表的なインターカレーターとしてエチジウムブロマイドとアクリジンオレンジをインターカレートさせたフィルムの直流測定の結果を図 6-13 に示した。

アクリジンオレンジでは色素を加えていないフィルムと同様の $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ の電子伝導の挙動を示したが、電導度はドーピング前と変わらずドーピングの効果は出なかった。エチジウムでは電圧印加後すぐに減衰するイオン電導の挙動のみが見られ、逆にドーピングは逆効果になった。電導度は $8 \times 10^{-5} \text{ S cm}^{-1}$ 以下となった。DNA の核酸塩基がスタッキングした導電パスを、エチジウムがインターカレートすることによって断線している可能性がある。 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_2(\text{dppz})]^{2+}$ 、これらを当量混合したものについてはエチジウムよりもさらに小さな電導度になった。

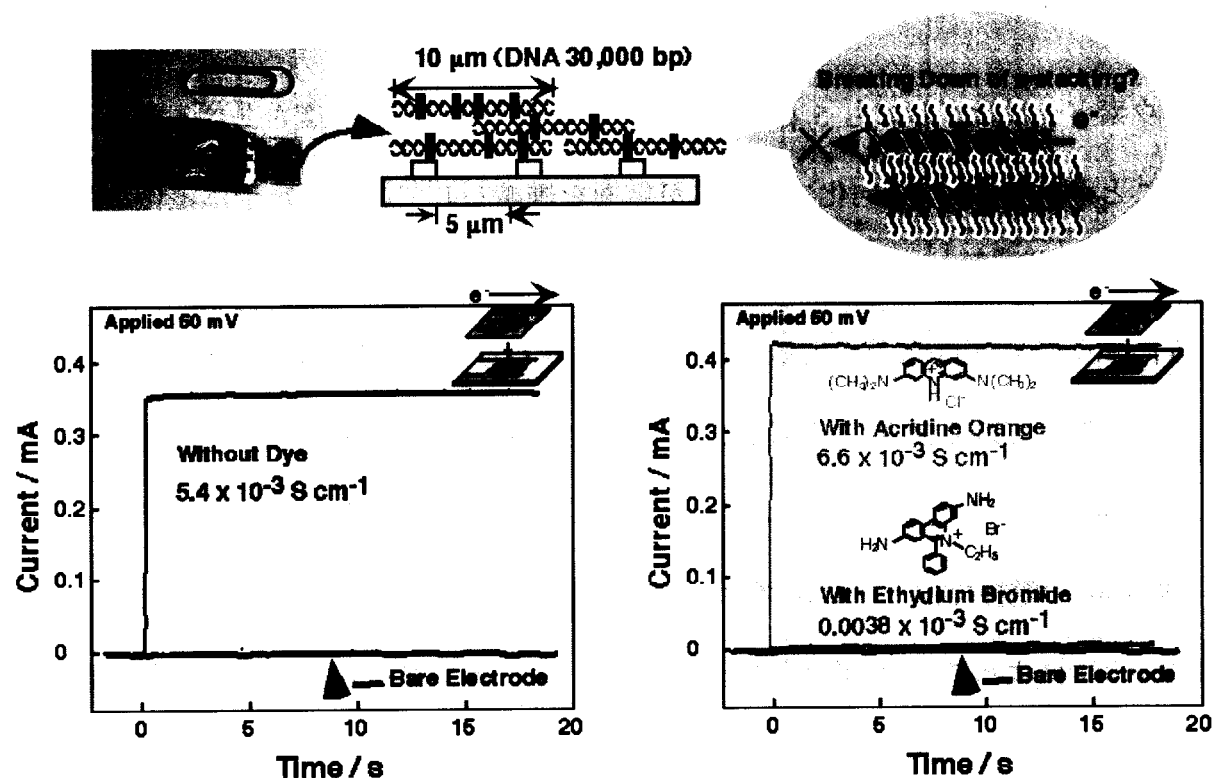


図 6-13. 色素インターカレーターの効果

図 6-14 に色素の濃度に対して電導度をプロットした結果を示す。1 dye / 200 bp, 1 dye / 10 bp の濃い濃度で色素を入れると DNA の核酸塩基の π スタッキングの導電パスを断線している可能性がある。もともと 30,000 bp と長い DNA を 1 dye / 200 bp, 1 dye / 10 bp と色素をインターカレートさせることによってそれぞれ 200 bp、10 bp の短い DNA に切断している効果ではないかと考えている。これらの濃度よりも低濃度で色素をインターカレートさせた場合は DNA が断線される箇所が少なくなって電導度は低下しない可能性がある。今後低濃度でのデータを加えて議論する必要がある。

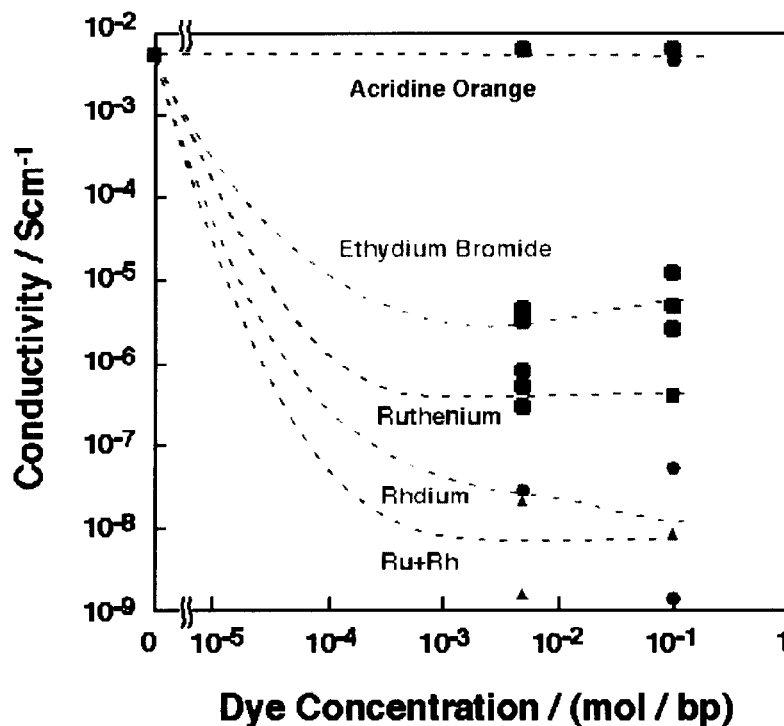
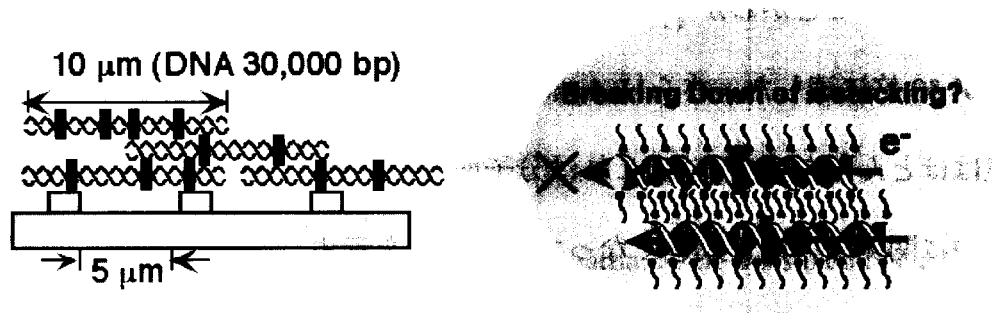


図 6-14. 色素インターカレーターの濃度効果

6-4. 総括

DNA-脂質複合体フィルムの電導度を上げるためにドーピングを行った。水晶発振子にキャストした DNA フィルムへのヨウ素の吸着量を追跡することで、ヨウ素のドーピング率を定量的に議論できた。フィルムへのヨウ素のドーピング率は 4 mol / DNA bp (DNA 1 塩基対に 4 個のヨウ素) が飽和であることがわかった。

ヨウ素をおよそ 2 mol / DNA bp (DNA 1 塩基対に 2 個のヨウ素) ドーピングすると DNA 分子内の電導度は $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ のままだが、分子間の電導度は $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ から $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ へ上昇することがわかった。このときに DNA が配向した方向とその垂直方向の異方性が 50 倍に達した。さらに 4 mol / DNA bp 以上、十分にドーピングすると異方性の差はほとんどなくなった。これは分子間に効くヨウ素のドーピング効果が DNA の配向方向に関係ないほど大きくなっていることを示す。

色素をインターカレートさせて DNA 分子内での電導度を上昇させることはできなかった。期待していたドーピングの効果は出ず、電導度はそのままか逆にイオン伝導以下に低下した。DNA の核酸塩基がスタッキングした導電パスを、色素がインターカレートすることによって断線して電導度が落ちている可能性がある。インターカレートする色素が低濃度ではそれがおこりにくい可能性があり、今後くわしく追試する必要がある。

第6章 参考文献

- 1) 田中 一義, 高分子の電子論, 共立出版 (1994)
- 2) 吉野 勝美, 導電性高分子の基礎と応用, アイピーシー (1987)
- 3) C. A. M. Seidel, A. Schulz, and H. M. Sauer, *J. Phys. Chem.*, **100**, 5541-5553, (1996)
- 4) E. Meggers, M. E. Michel-Beyerle, and B. Giese, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12950-12955 (1998)
- 5) W. ゼンガー, 核酸構造, シュプリンガー・フェアラーク東京, (1987)
- 6) M. J. Waring, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 159-192 (1981)
- 7) G. Sauerbrey, *Z. Physik.*, **155** (1959)
- 8) 化学大事典, 東京化学同人 (1989)
- 9) C. J. Murphy, M. R. Arkin, Y. Jenkins, N. D. Ghatlia, S. H. Bossmann, N. J. Turro, and J. K. Barton, *Science*, **262**, 1025 (1993)

第7章 DNA メゾスコピック細線および DNA ナノワイヤの作製とその導電性測定

7-1. 緒言

第3章で述べたように、延伸によってキャストフィルム内で DNA 鎖を配向化させることで秩序だった構造中で DNA 鎖に沿った電氣的性質を調べることができた。このことは材料として導電性フィルムが作製できたという点で重要である。一方でよりミクロな分子レベルで DNA 鎖の電氣的性質を調べることが望まれる。このサイズオーダーでの物質の電氣的挙動は半導体の最先端研究と密接に関係しており、分子エレクトロニクスとしてナノテクノロジーのホットな領域の1つとなっている。

本章ではキャストフィルムよりもよりミクロな構造中で電導度を調べるため、DNA マイクロワイヤ（メゾスコピック細線）および DNA ナノワイヤ（DNA 配向化単分子膜）を作製し、これらの電導度を調べた（図 7-1）。

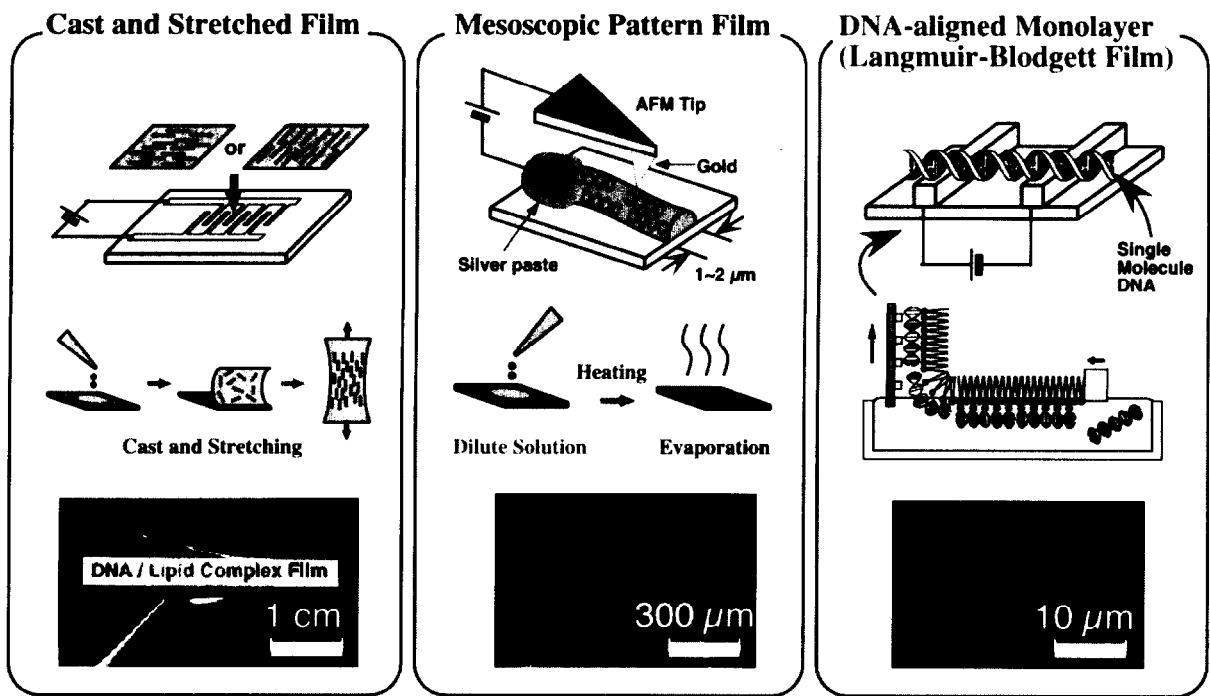


図 7-1. マクロ、メゾ、ナノレベルでの DNA の導電性測定

7-1-1. ナノテクノロジーにおける分子エレクトロニクス

現在の半導体材料であるシリコンのリソグラフィ（露光技術）による微細加工技術は $0.1 \mu\text{m}$ までの加工が限界で、いずれサイズに見合う演算能力の飛躍的向上が頭打ちになると考えられている。また、より微細な加工ができたとしてもそれに伴う設備投資が増大するため、供給できる半導体材料と製品価格とのバランスに限界が来ると考えられている。そこで単一の分子を合成したり組み立てたりするナノテクノロジーによってより小さい素子を開発しようとする試みが分子エレクトロニクスデバイスの基礎になっている¹⁾。すなわち木を削って微細で精密な彫刻をほろうとする技術（bottom-down）ではなく、微小な粘土細工によって彫刻を作り上げる考え方（bottom-up）である。この分子デバイスを用いた分子エレクトロニクスが実現すれば、現在のシステムの $1/1000$ 以下の資源で 1000 倍の高度情報処理が可能だと試算されている²⁾。

実際に単一分子のデバイスとして、光を当てると電流が流れる素子、「単一分子フォトダイオード」の動作を藤平らが初めて証明したのは 1976 年にさかのぼる³⁾。この後、1980 年代に入って分子デバイスは一時的にブームになったが、半導体技術の進歩や単一分子の特定の実証の困難さからブームは去った。その後 90 年代後半に入って走査トンネル顕微鏡 STM の発明⁴⁾によって原子・分子操作技術の進展し、半導体技術の限界が見えてきた⁵⁾こともあって再び分子エレクトロニクスデバイスが盛り上がってきた。ここ 2、3 年はフラーレン、カーボンナノチューブなどのナノ材料の構造や物性が非常に良く研究され^{6,9)}、これらナノ材料を用いた分子のデバイスを作る試みが盛んになってきた。

7-1-2. 単一分子測定の実例

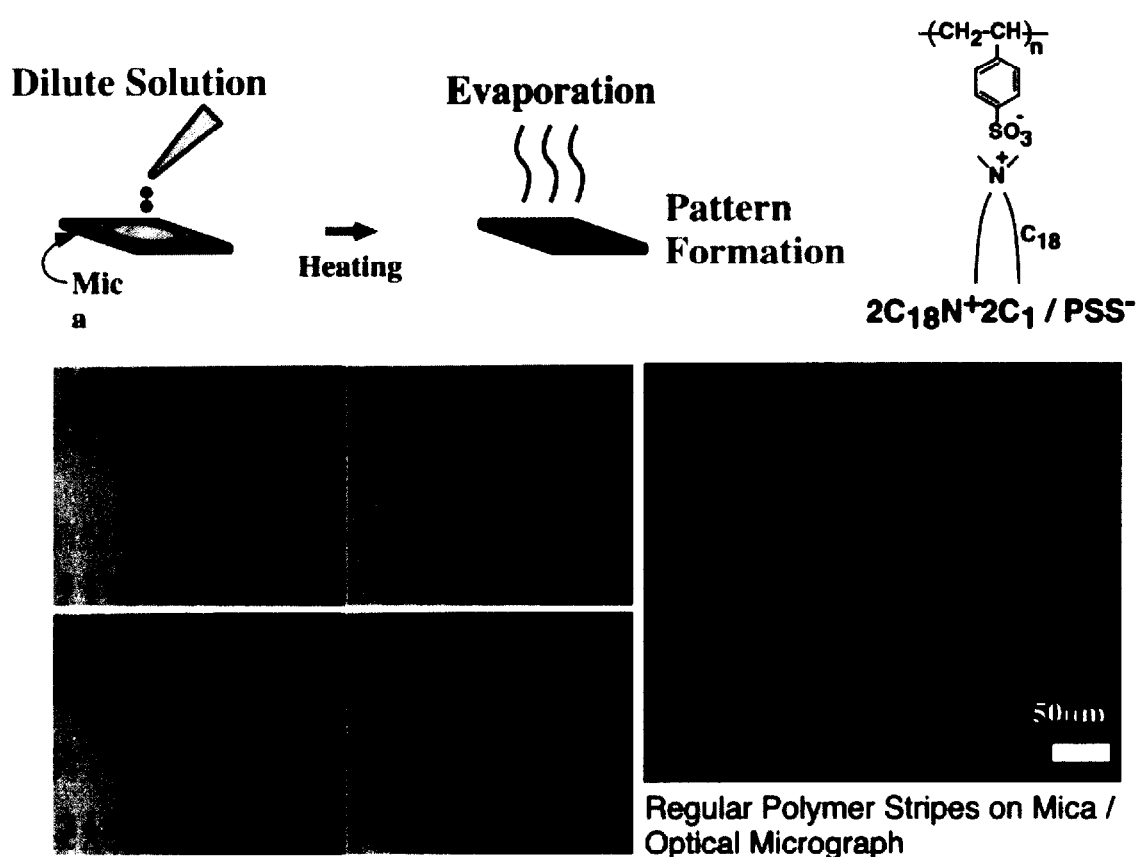
分子で作ったデバイスの設計を目標とすると、クリアしなければならない問題として次の 4 つの段階がある。

1. 単一分子の抵抗特性の測定法、測定技術の確立
2. 分子で電子部品（スイッチ、トランジスタ、メモリーなどの素子）を作ること
3. それぞれの分子素子を接続すること
4. 素子の集積化技術の実証

の 4 点がある。現在のナノテクノロジーの現状は最初の 1. 単一分子の抵抗測定についての厳密な測定である。この報告例としては、単分子膜が用いられた例^{10,11)}や特に注目される例としては孤立した単一分子でかつ一本のワイヤとして、カーボンナノチューブが挙げられる¹²⁾。Dekker らはカーボンナノチューブを 250 nm の電極間に橋渡しさせて測ったところ、抵抗値が 110 k Ω （およそ $3 \times 10^4 \text{ S cm}^{-1}$ ）と非常に小さい金属的な導電性挙動を示した。また電導度はほとんど温度依存性が見られなかった。

7-1-3. 高分子のメゾスコピック細線

下村らはポリスチレンや両親媒性のポリイオンコンプレックスのクロロホルム溶液を親水性基板上にキャストすることにより規則的なドット、ハニカム、ストライプなどの構造を有するメゾスコピックパターンが形成されることを見いだしてきた (図 7-2¹³⁾)。なかでも DNA のパターンニングを目指した DNA とジアルキルアンモニウム脂質 2C18N⁺ とのコンプレックスにおいては幅 500 nm、高さ 2-5 nm の規則的なストライプパターンができることを見いだされた。この規則構造を持つ DNA 細線での電子移動について Conducting AFM を用いて検討されている¹⁴⁾。



M. Shimomura et. al, *Thin. Solid. Films.*, **854**, 327 (1998)

図 7-2. 高分子のメゾスコピックパターンの形成

本章では DNA-脂質複合体の新しい形態としてメゾスコピック細線を選び、キャストフィルムよりもマイクロなレベルでの細線を作って一本の細線中の DNA の電子移動を調べれば、よりマイクロな構造中で DNA の電気的性質を調べることが期待できる。また、DNA からなるメゾスコピック細線の作成とその電気的特性の測定は超分子構造や分子デバイスの観点からも興味深い。

7-1-4. DNA ナノワイヤの作製

一方 DNA を薄膜内で配向化する別の手段として Langmuir-Blodgett 法による配向化がある。Langmuir-Blodgett 法は水面上に作製した単分子膜を固体の基板上に 1 層ずつ累積し、有機超薄膜を作製する方法である¹⁵⁻¹⁸⁾。単分子膜レベルでの膜厚の制御が可能であり、しかも常温・常圧の穏和な条件で膜の累積ができる¹⁹⁾ことから DNA の配向制御に適した方法である。LB 膜の累積方向としては通常垂直浸漬法が用いられる。この方法は累積基板を水面単分子膜に対して垂直に上下させることにより単分子膜を写し取る方法である (図 7-3)。DNA を溶解した水相上にカチオン性脂質を水面上に展開すると、静電相互作用により水面上に DNA-脂質複合体を形成し、垂直浸漬法による累積によって DNA が配向した LB 膜を作製できる²⁰⁾。すなわちこの方法によって単一分子の DNA を一方向に配向し、基板側に DNA が直接固定化された基板を作製できる。

この DNA の配向化技術を用いて DNA の電子移動と組み合わせれば、異方性を持つ電子移動場として利用できる可能性がある。DNA 分子配向化膜で DNA を流動配向させて直径 2 nm の DNA ナノワイヤを作製し、直接電導度の測定をすることが現在もっとも現実的な DNA を用いたナノテクノロジーである。

DNA-aligned Monolayer (Langmuir-Blodgett Film)

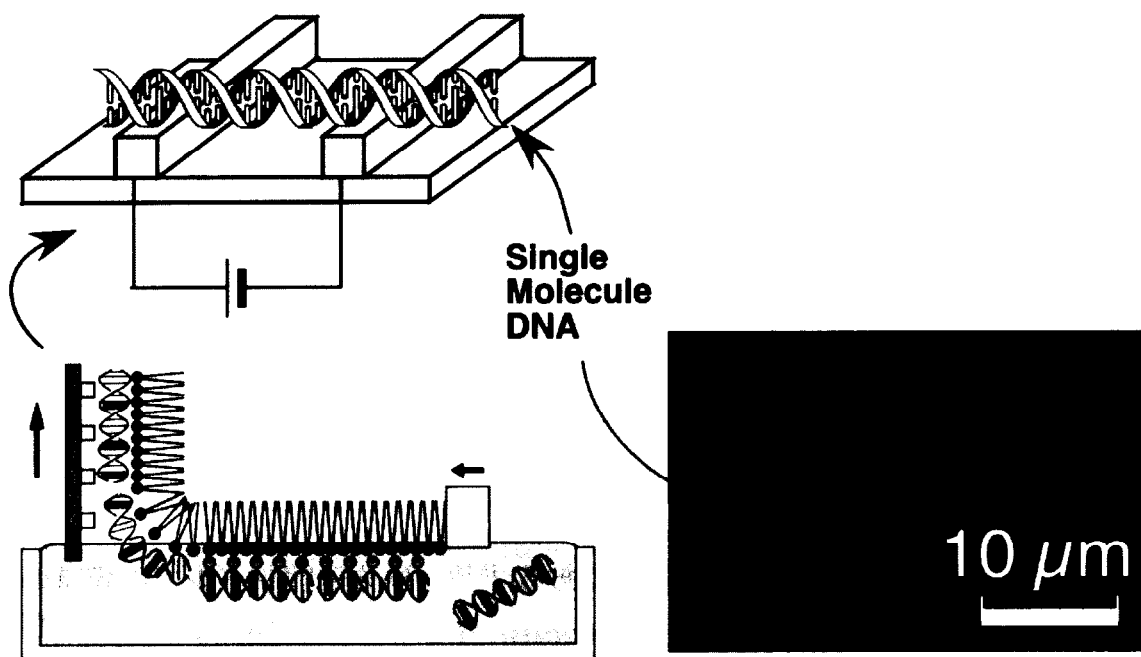


図 7-3. DNA 配向化単分子膜からの DNA ナノワイヤの作製

7-2. 実験方法

7-2-1. DNA マイクロワイヤの作製と観察

実験操作は北海道大学電子科学研究所の下村研究室にて指導していただいた。

DNA はサケ精子由来の DNA 30,000bp (シグマ)、これを超音波処理した DNA 5,000 bp、および短い 60 bp の合成オリゴマー (サワディーテクノロジー) の 3 種類を用いて、DNA の分子量の違いによって細線パターンに違いが出るかどうか検討した。

この際には脂質は $C_{10}\text{-4G-N}^+$ で統一した。また脂質として $C_{10}\text{-4G-N}^+$ のほかに Phy-N^+ 、

$C_{16}-N^+-3C_1$ 、 $2C_{12}-N^+-2C_1$ を用いて脂質による細線パターンの違いが出るかどうか検討した。この際には DNA は DNA 5,000 bp で統一した。DNA-脂質複合体をクロロホルム/エタノール混合溶媒に溶かし、500～1000 mg / L のストック溶液を調整した。このとき蛍光プローブとして Acridine Orange を 10^{-5} M の濃度で加えた。このストック溶液を希釈して 10～1000 mg / L の濃度の溶液を調整し、常温もしくは温度制御可能なホットプレート上で十分に加熱して所定温度にしたマイカ表面にシリンジで約 8 μ l キャストし、溶媒を蒸発させた。その後マイカ表面を蛍光顕微鏡で観察し、規則的なストライプパターンができる条件をさがした。

規則パターンの生成には、1) サンプルの種類、2) 溶液濃度、3) 溶媒組成、4) 溶媒を蒸発させる温度、5) 室内の気温と湿度、6) シリンジでの基板への滴下量、7) 基板の種類というように多くの要素があるが、5) ～7) の条件を一定にして 1) ～4) の条件を変化させた。5) ～7) の条件は、5) 気温 21～23 $^{\circ}$ C, 湿度 29～31 %, 6) 8 μ L で一定、7) 基板はマイカ、とした。この条件で作製したマイカ上のストライプパターンを蛍光顕微鏡観察、AFM 観察にそのまま用いた。

蛍光顕微鏡観察には BH-2-UMA (OLYMPUS 社製) を用いた。写真撮影には蛍光プローブであるアクリジンオレンジを励起するため B 励起光用のフィルターを用いて蛍光写真を撮影した。AFM 測定には原子間力顕微鏡 (セイコー電子社製) を用い、Tapping Mode で測定した。

7-2-2. Conducting AFM による電導度測定

電気伝導度の測定は Conducting AFM の装置 (図 7-4) で行った。測定装置の原理を以下に述べる。通常の Contact mode AFM のチップに金を蒸着して電極にし、このチップをサンプルの細線に当てて、もう一方の電極はサンプルを隔てて銀ペース

トをつける。電圧を印可して AFM のチップが導電性サンプルに当たると電流が流れ、これを微小電流計 R8340A (ADVANTEST 社製) で検出し、この電流値の大きさを AFM の高さの情報として検出器に伝える。

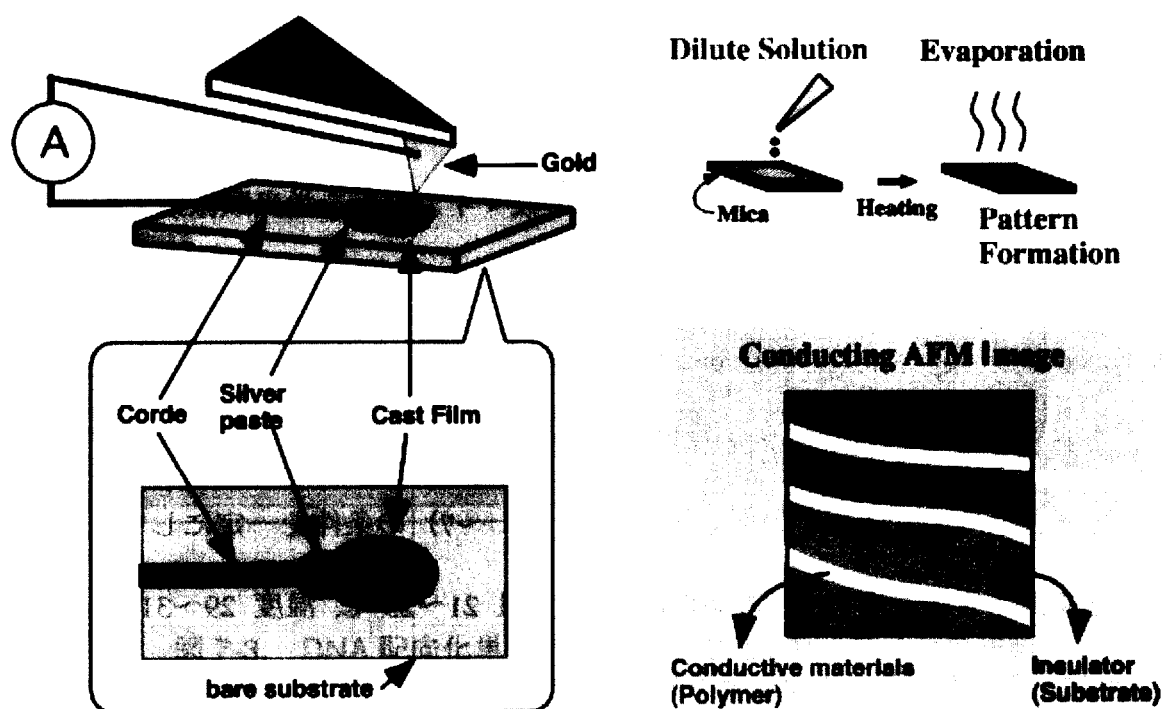


図 7-4. Conducting AFM 装置

7-2-3. DNA ナノワイヤの作製と観察

水相上に単分子膜を形成するための脂質としてジアルキル型脂質 $2C_{18}-N^+-2C_1$ を用いた。下水相に用いる DNA はサケ白子由来 DNA (30,000 bp、長さ約 10 μm) を用い、約 5 mg を TE buffer + 10mM NaCl に溶解して 0.2 mg / ml のストック溶液とした。このストック溶液を 6×10^{-8} M になるように TE buffer で希釈して 200 mL にメスアップし、これに蛍光プローブ YOYO-1 (Molecular Probes) を 1 dye / 10 DNA bp の濃度となるように加えて 6 時間放置した。

単分子膜の作製に用いるトラフの装置概略を図 7-5a に示した。単分子膜の形成にはラングミュア型トラフ (サンエス計測社製) および PRESSURE AMPRIFTER FSD-22 (サンエス計測社製)、PC286 パーソナルコンピュータ (EPSON 社製) で制御した FILM BALANCE CONTROLLER FSD-20 (サンエス計測社製) を用いた。トラフの水槽面積は 100 mm×166 mm でありトラフ及びアッシュュクリアはすべてテフロンコーティングされている。DNA の水溶液をトラフに注ぎ、20 °C で 10 分ほど安定させてから脂質 $2C_{18}-N^+-2C_1$ の 9.5 mg / 10 mL のクロロホルム溶液 12 μ L を展開し、5 分間溶媒の蒸発を待ってからバリアの速度 0.1 mm / sec. で表面圧 5 mN / m まで圧縮した。なお脂質の展開から単分子膜の累積まで 20 ± 0.5 °C の温度で行った。

累積は蛍光観察用には良く洗浄した極薄のスライドガラス (2.5×3 cm) 2 枚を重ねたもの、電導度測定には 5 μ m のくし形電極基板を用いた。この累積基板を垂直に立てて下水相にスライドガラスは 1.5 cm、電極は 0.5 cm ほど水面下に浸して固定した。単分子膜の表面圧が 5 mN / m になったところで 100 mm / min. の速度でガラスを垂直に引き上げて膜を累積した。展開した単分子膜はフィルムバランスシステムの等圧圧縮モードを用いて圧縮し、表面圧を 5 ± 0.2 mN/m に維持した。図 7-5b に $2C_{18}-N^+-2C_1$ 単分子膜の π -A 曲線を示した。下水相が Milli-Q 水の場合に比べ、TE バッファーのときは膜が膨張したがほぼ同じ曲線になった。

DNA 配向化単分子膜を累積したスライドガラスのうちバリア側の一枚をサンプルとし、Ar 488 nm (青) で励起して 509 nm (緑) の蛍光を顕微鏡下 10×100 倍で観察した。

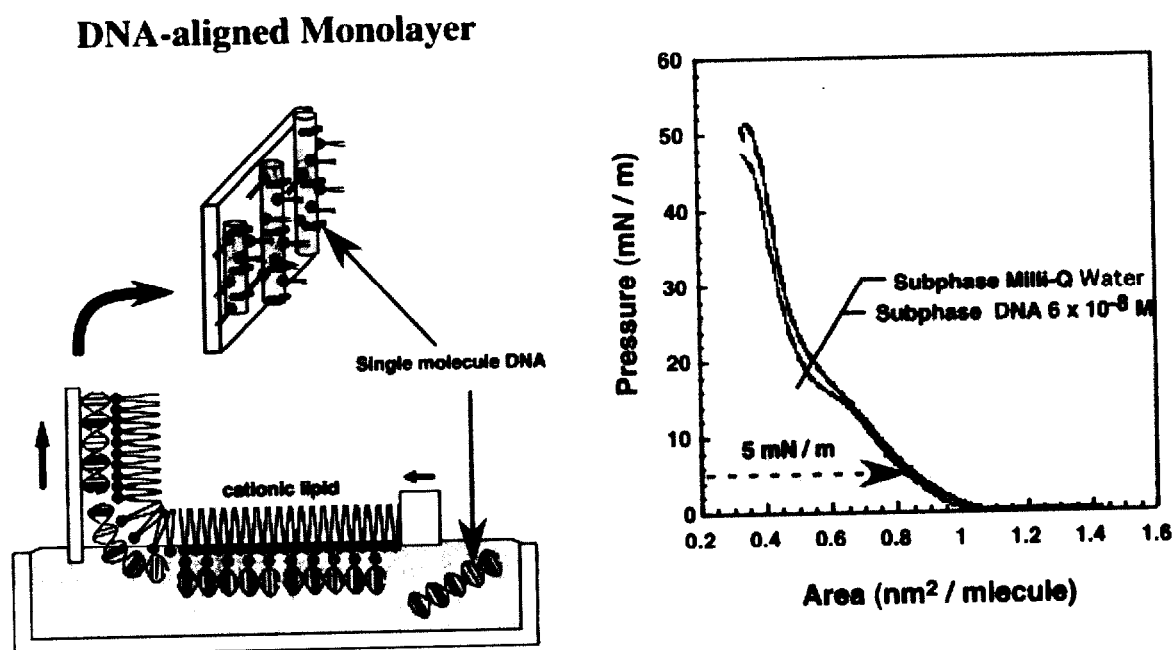


図 7-5. (a) DNA 配向化単分子膜の作製と(b) $2C_{18}-N^+-2C_1$ の π -A 曲線

7-2-4. DNA ナノワイヤの電導度測定

電極間隔 5 μm のくし形電極に累積した DNA 配向化単分子膜を一日自然乾燥した後、直流測定装置に取り付けて電圧を印加してその際の応答電流を記録した。

電極表面はあらかじめピランハ溶液で 5 分間洗浄する操作を 2 回行って清浄な環境で保存しておき、表面を Digital Instruments 社製 Nanoscope IIIa AFM で観察して清浄であることを確認してから用いた。測定は空气中、タッピングモードで行った。またくし形電極は累積前にブランク測定して電流値が得られないことも確認した。

7-3. 結果と考察

7-3-1. DNA マイクロワイヤの観察

1) サンプルの種類

DNA の長さを 30,000, 5,000, オリゴ 60 bp と変えたところパターンのでき方に効果が見られた (図 7-6)。結果として、DNA 30,000bp / C₁₀-4G-N⁺のものが一番よいストライプができた。一方、脂質の違いによるパターンの違いは見られなかった (図 7-7)。

2) 溶液濃度

ポリイオンコンプレックスの細線パターンを作るにはおおよその目安として 10～1000 mg / L の濃度でうまくいくことがわかっているが¹⁴⁾、ストライプができる濃度範囲が広いものもあればほんのわずかな濃度の違いでパターンができないものもあった。DNA-脂質複合体のサンプルでは、50～100 mg / L の濃度の時だけうまくパターンができ、それより薄いとラインが不連続になり、濃すぎるとラインとラインの間にさらに枝分かれが生じ、葉脈模様のようなパターンになってしまうことがわかった (図 7-8)。

3) 溶媒組成

細線パターンを作るにはコンプレックスが完全によく溶けていることが大前提なので、溶けにくいものは2日間かけてよく溶かした。DNA-脂質複合体のサンプルは、フィルムをキャストするために用いているクロロホルム / エタノール = 4 / 1 (v/v) の溶媒を基準に、クロロホルム / エタノール = 100 / 0, 96 / 4, 80 / 20, 50 / 50, 25 / 75, 16 / 84 (v/v) を試した。どの化合物も 50 / 50 のときにうまく細線パターンができた。これよりもクロロホルムが多いと、おそらく溶け方が不完全なためにラインがあまり成長せずに中心部で濃くなってその部分が葉脈状になった。逆にエタノール

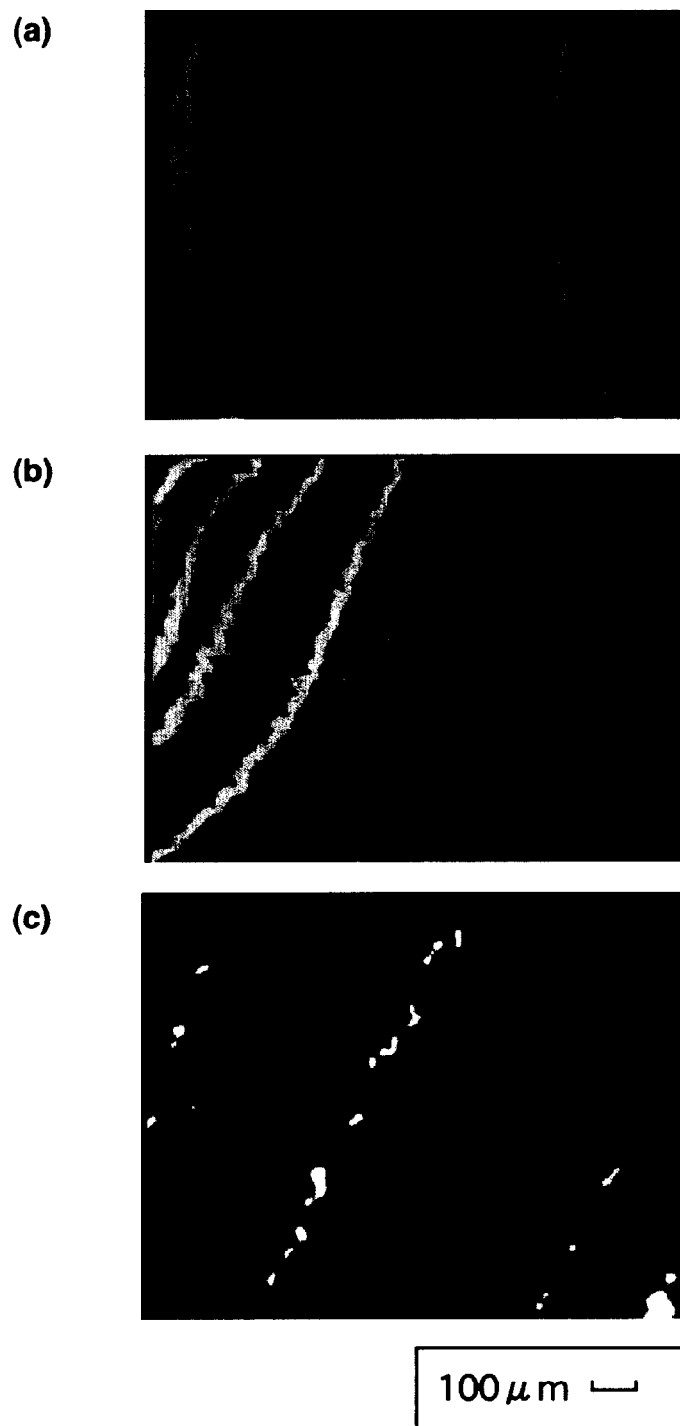


図 7-6. DNA 鎖長を変えたときのメゾスコピックパターンの違い。脂質は C_{10} -4G- N^+ に統一した。(a)DNA 30,000 bp, (b)DNA 5,000 bp, (c)オリゴ 60 bp,

が多いとラインは比較的多くできるが、完全に isolate されたものは少なく、周辺のラインとの間にネットワークを形成してしまう傾向があった。

4) 溶媒を気化させる温度

溶媒を気化させるためには素早く一定温度にできるメトラー社製のホットステージ (0.1 °C 刻みで温度コントロールできる) 上でマイカ基板を加熱して行った。温度は 40 °C ~100 °C の範囲で 10 °C 刻みで条件をさがした。40 °C 程度では溶媒が気化するのが遅くて中心部に凝集してラインはできなかった。60 °C ~80 °C の範囲でラインができやすいことがわかったので、60 °C を最適条件とした。

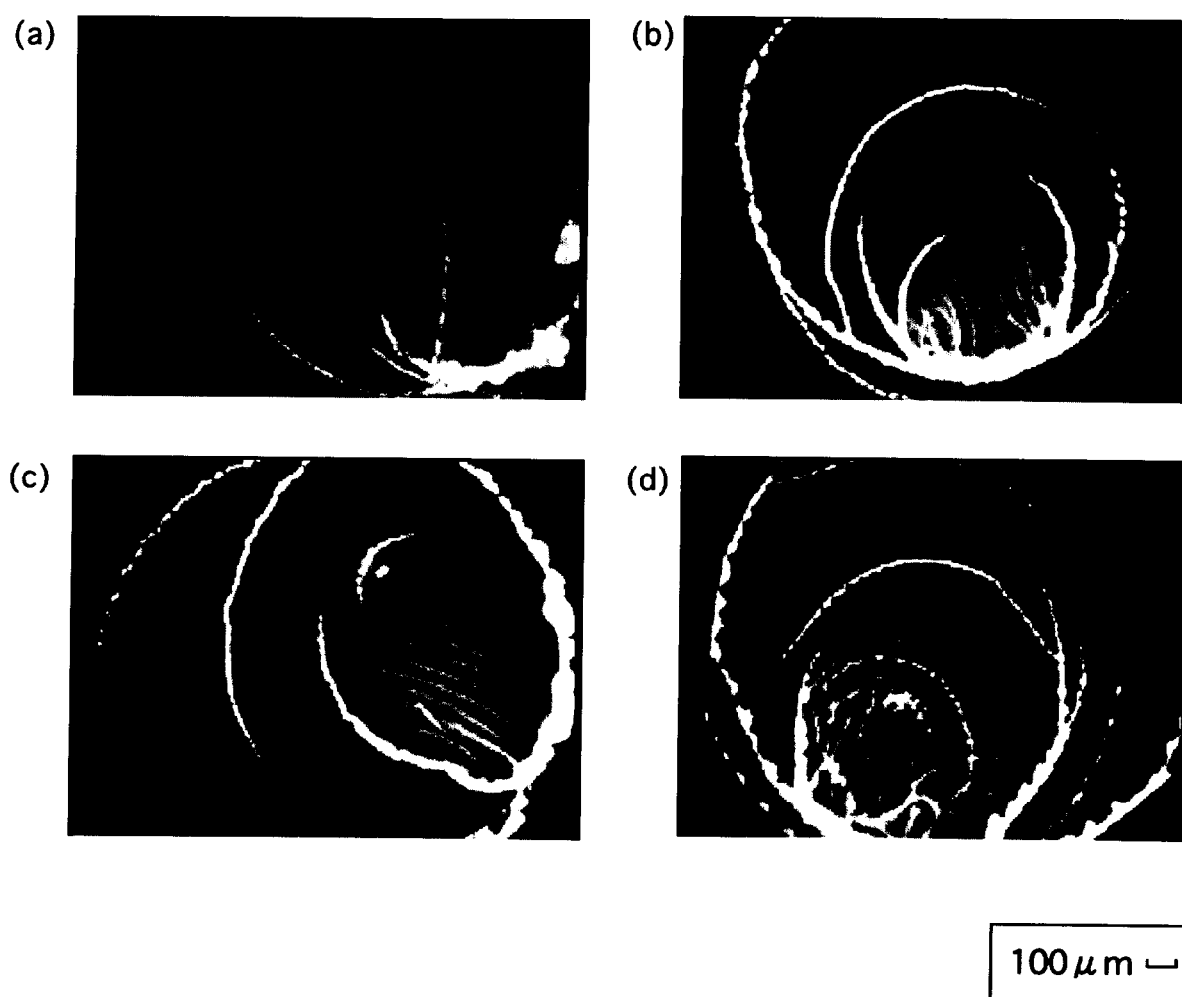


図 7-7. 脂質を変えたときの細線パターンの違い. DNA はいずれも DNA 5,000 bp に統一した. (a) C_{10} -4G- N^+ , (b) Phy- N^+ , (c) C_{16} - N^+ -3 C_1 , (d) 2 C_{12} - N^+ -2 C_1

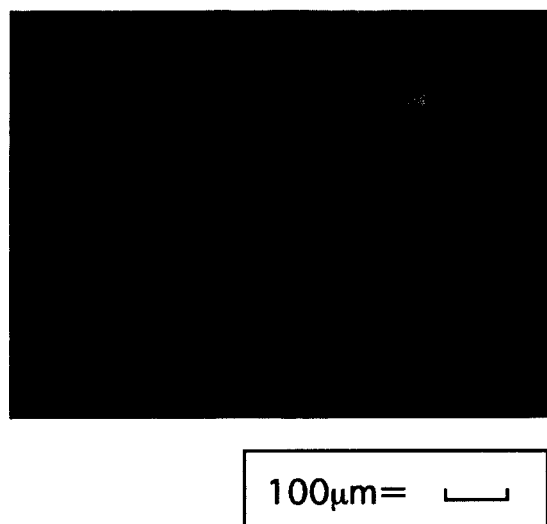


図 7-8. 溶液濃度が濃いときのパターン

5) DNA マイクロワイヤの AFM 観察

C_{10} -4G- N^+ / DNA 30,000 bp を用いてもっともうまく細線パターンができたもの (図 7-6) を、AFM (Tapping mode) で観察した (図 7-9)。これより、間隔が約 $13\ \mu\text{m}$ で一本の太さが $1\sim 2\ \mu\text{m}$ のラインができていることがわかる。DNA-脂質複合体の直径はX線構造解析の結果から $4\ \text{nm}$ であることからこのラインは一本の DNA-脂質複合体ではなく DNA-脂質複合体が大きな団子状のドメインを形成してライン方向に引きずられている状態である。またライン状になってはいるが、完全につながっているわけではない。完全に isolate されてはおらず、周囲にもコンプレックスがあるということがわかる。

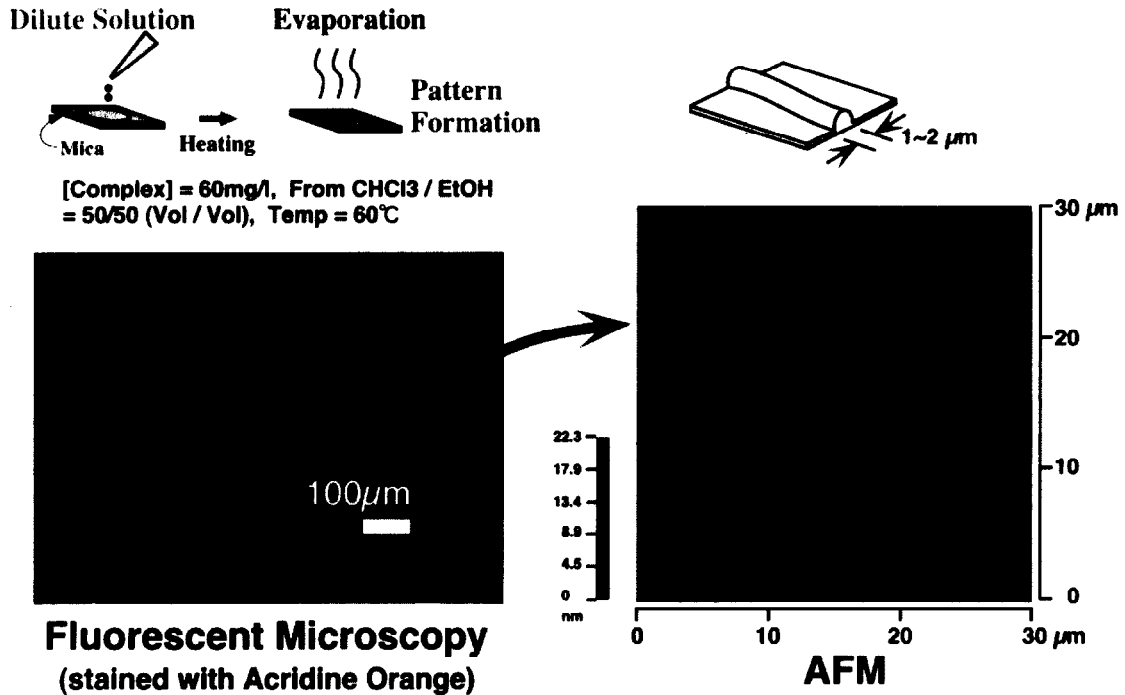


図 7-9. 細線パターンの AFM 像 (30 μm × 30 μm) .タッピングモード, 空气中

7-3-2. Conducting AFM による電導度測定

図 7-10 に Conducting AFM の結果を示す。図 7-10a では Topography (高さ情報) を表しており、通常の Contact mode AFM 像、すなわちサンプル表面の凹凸の情報を表している。図 7-10b には Conducting AFM で得られた伝導度の像を示した。図 7-10b では図 7-10a でラインが見えるところが明るくなっている。すなわちこの部分に伝導度が現れた。電流の値としては非常に大きな値が流れた。この結果には再現性があった。しかし問題点として第一に、ラインが太くて Topography がはっきり見えるところでは電流値が大きすぎて周囲も明るくなってしまい、コントラストが現れなかった。第二に、逆に電流値にコントラストが現れる場合はラインが細くて Topography が見えなかった。これらの原因はライン以外のところにはコンプレックスがないような isolate されたストライプができなかったことにある。

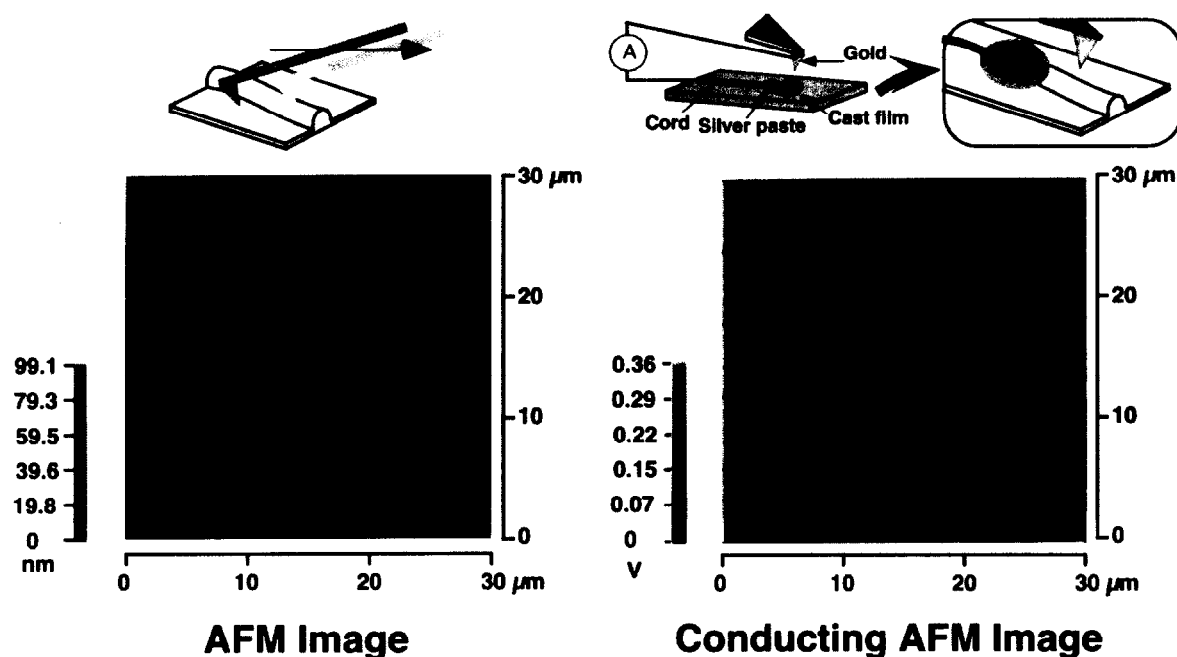


図 7-10. $C_{10}\text{-}4\text{G-N}^+ / 30,000 \text{ bp}$ の Conducting AFM イメージ. (a) AFM イメージ（高さ情報）, (b) Conducting AFM イメージ（電流値）

7-3-3. DNA ナノワイヤの観察

あらかじめ基板を水中に入れておき、 $2C_{18}\text{-N}^+\text{-}2C_1$ の単分子膜を垂直浸漬法で累積したときに同時に引き上げられる DNA の写真を図 7-11 に示す。ほぼ水面では DNA は伸びきっておらず固まり状になっている（図 7-11a）。水面から 0.5 cm ほど下がる密度が薄くなって DNA がやや伸びていることがわかる（図 7-11b）。水面から 1.5 cm ほど下で DNA が薄い領域で伸びきって配向している様子が見られた（図 7-11c）。これと同様の観察を 50 枚ほど写真に撮影し、伸びきった 30,000 bp の DNA の長さをヒストグラムとして図 7-12 にまとめた。DNA 鎖長の平均値は $7.3 \mu\text{m}$ となり、予想していたほぼ $10 \mu\text{m}$ に一致した。

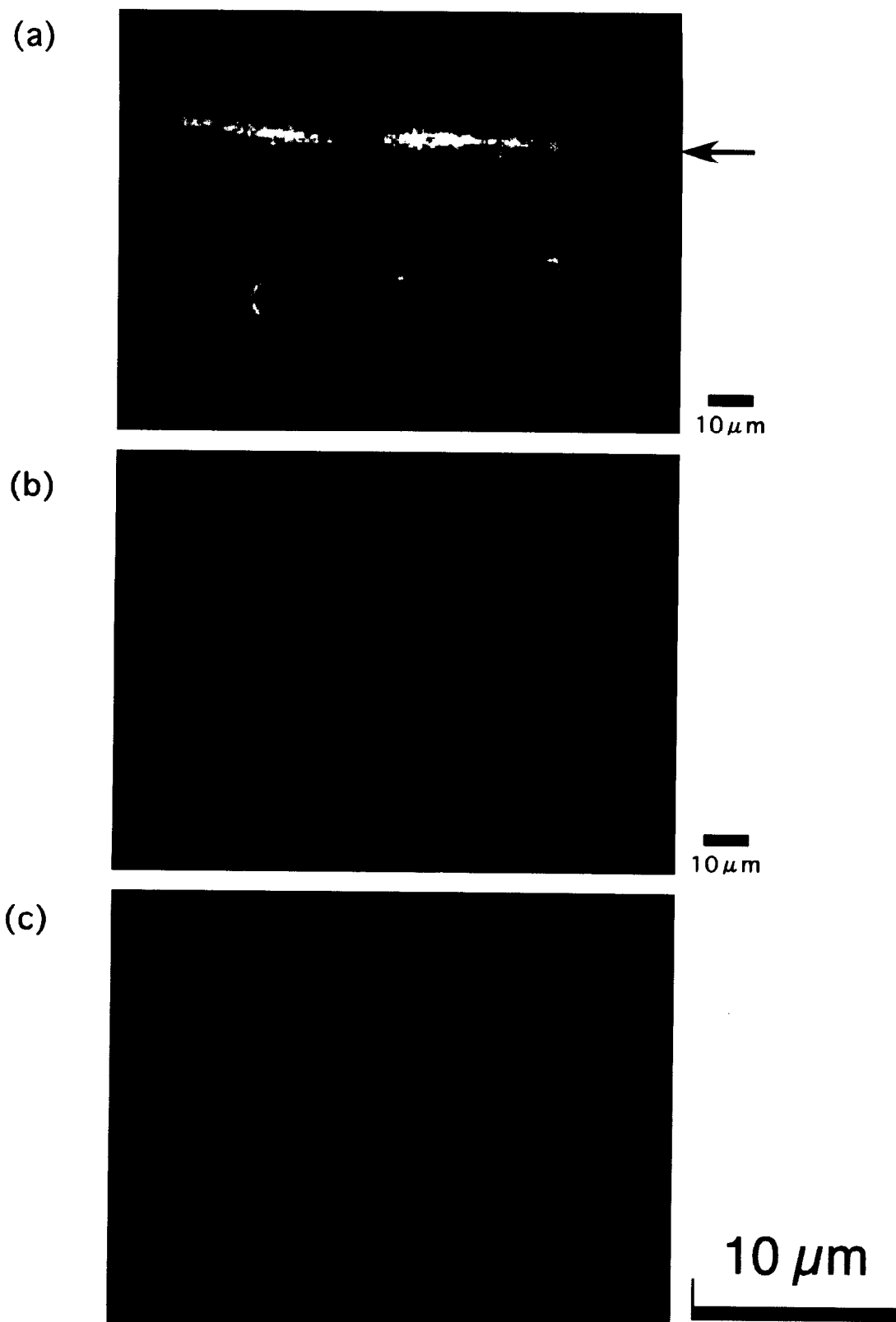


図 7-11. 累積膜の蛍光写真。10×100 倍. (a) ←は水面を示す. (b) 水面から下 0.5 cm, (c) 水面から下 1.5 cm

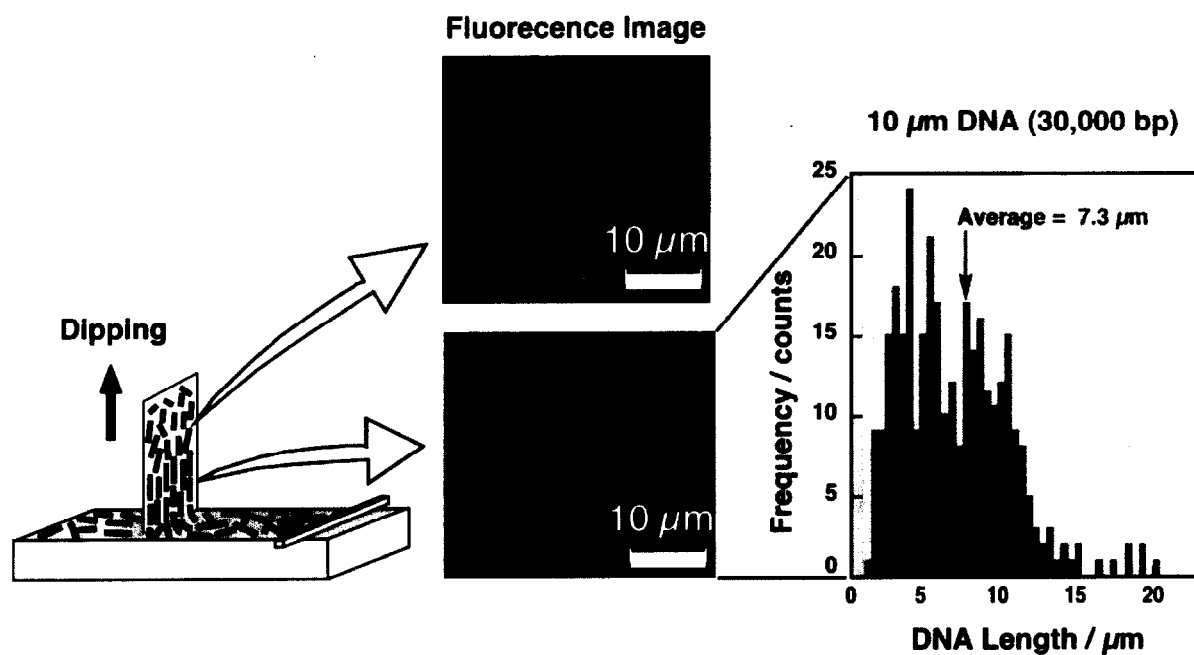


図 7-12. 累積膜の蛍光写真と DNA 鎖長のヒストグラム

7-3-4. DNA ナノワイヤの電導度測定

電極に DNA を累積する前に、ミクロなレベルでの電極のフラットさ、清浄さを確かめた。図 7-13 に電極の写真と AFM 像を示した。図 7-13b に表面の像、図 7-14c に高さ方向の情報を示した。蒸着された金はほぼフラットであり、またピランハ洗浄 5 分を二回という洗浄条件も問題ないことがわかった。金の高さは約 $0.1 \mu\text{m}$ ということも確かめた。DNA 30,000 bp は 1 分子でおよそ $10 \mu\text{m}$ あることから、金の間隔が $5 \mu\text{m}$ 、金の厚さが $0.1 \mu\text{m}$ でも 1 分子で橋渡しできると考えられる。

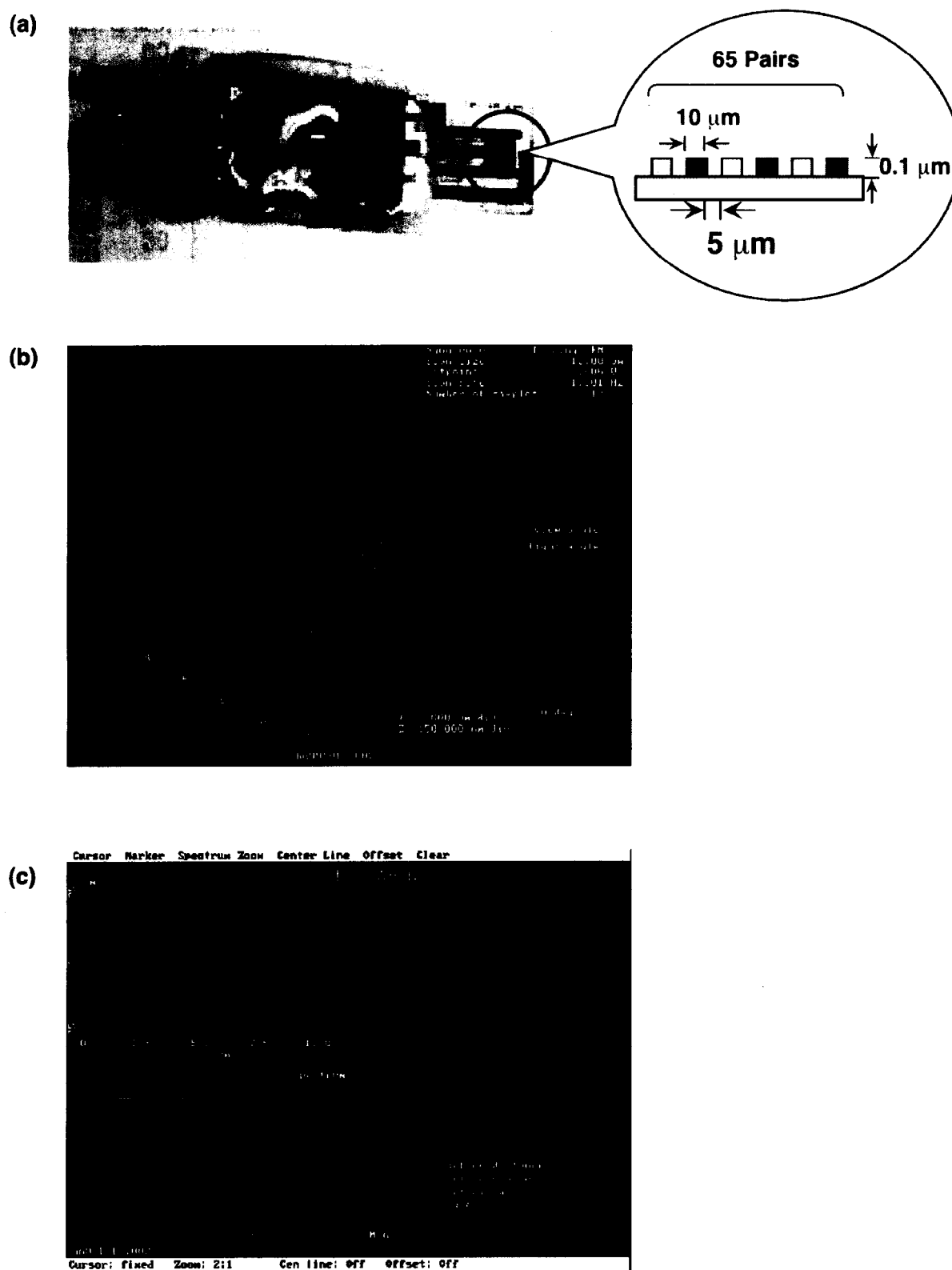


図 7-13. (a) 電極間隔 $5\ \mu\text{m}$ のくし形電極の写真, (b) AFM 像, (c) 高さ方向の断面図

配向した DNA ナノワイヤを累積固定化したくし形電極に直流を印加した際の応答電流の時間変化を図 7-14 に、電圧を変化させた際の電流プロット (I - V 曲線) を図 7-15 に示した。図 7-14 より、0.01 V の電圧印加でおよそ 16 nA、0.1 V の電圧印加でおよそ 50 nA の有意な応答電流が得られた。電圧を大きく印加すると応答も大きくなり、ブランクと比較してもノイズより大きなレベルであることから有意な電流値である。図 7-15 より、電圧に対して応答電流は一定の増大を示すが、完全に直線的なオーミックな挙動にはならず、およそ ± 1.5 V に変曲点をもつカーブになり、電圧に対して整流作用があることがわかった。

電極の上を線上になった DNA 分子が完全に覆っていないので、この I - V 曲線の傾きから正確に電導度を算出することはできないが、おおよその見積もりをすると、図 7-11 (c) の蛍光写真中にある DNA 分子を数えると、 $100 \mu\text{m}^2$ の面積の中に 111 個の DNA 分子があり、うち 74 本が電極間隔の $5 \mu\text{m}$ 以上の長さに伸びていた。くし形電極の $5 \mu\text{m}$ の電極間の面積ではこの伸びた DNA 分子は 92.5 本と見積もれる。少し強引であるが、DNA 分子を単純に直径 2 nm のワイヤと考えると、断面積 A は、全ての電極間 (65 対のくし $\times 2 - 1 = 129$ 個) を考えると、

$$A = (1 \times 10^{-7})^2 [\text{cm}^2] \times \pi \times 92.5 \times 129 = 3.75 \times 10^{-10} [\text{cm}^2]$$

となる。よってセル定数 C は、

$$C = d / A = 1.33 \times 10^6 [\text{cm}]$$

と概算できた。このセル定数を全て基板の電導度算出に用いた。図 7-15 の I - V 曲線の直線部 (低電圧領域) の傾きより抵抗値 R を決定し、この DNA ナノワイヤの電導度を、

$$\rho = d / A (1 / R) = C / R = 0.76 [\text{S cm}^{-1}]$$

と決定した。

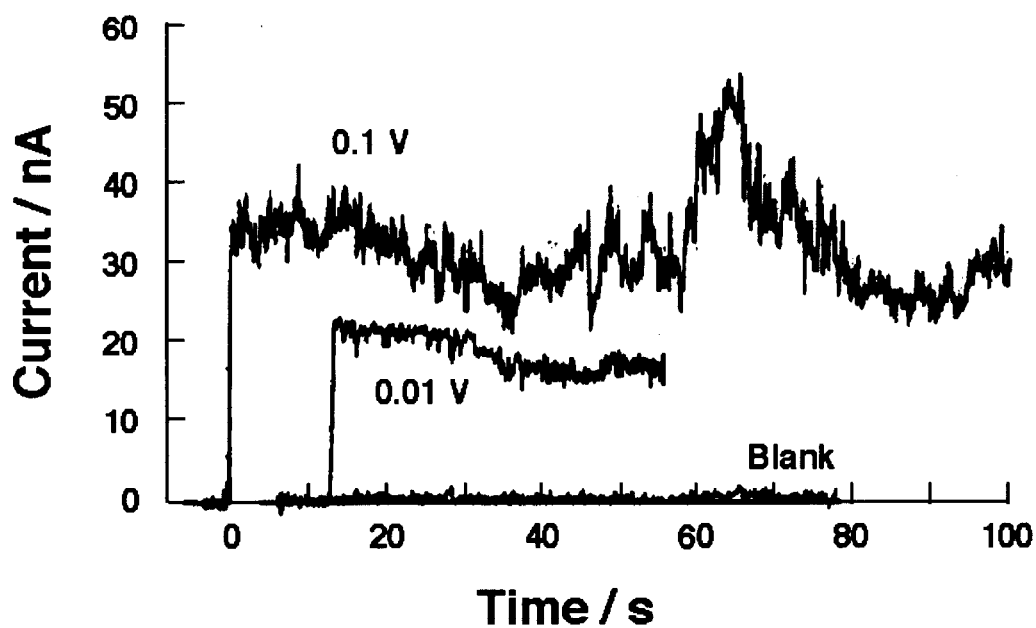


図 7-14. DNA ナノワイヤを累積した電極の直流電圧に対する応答電流の時間変化

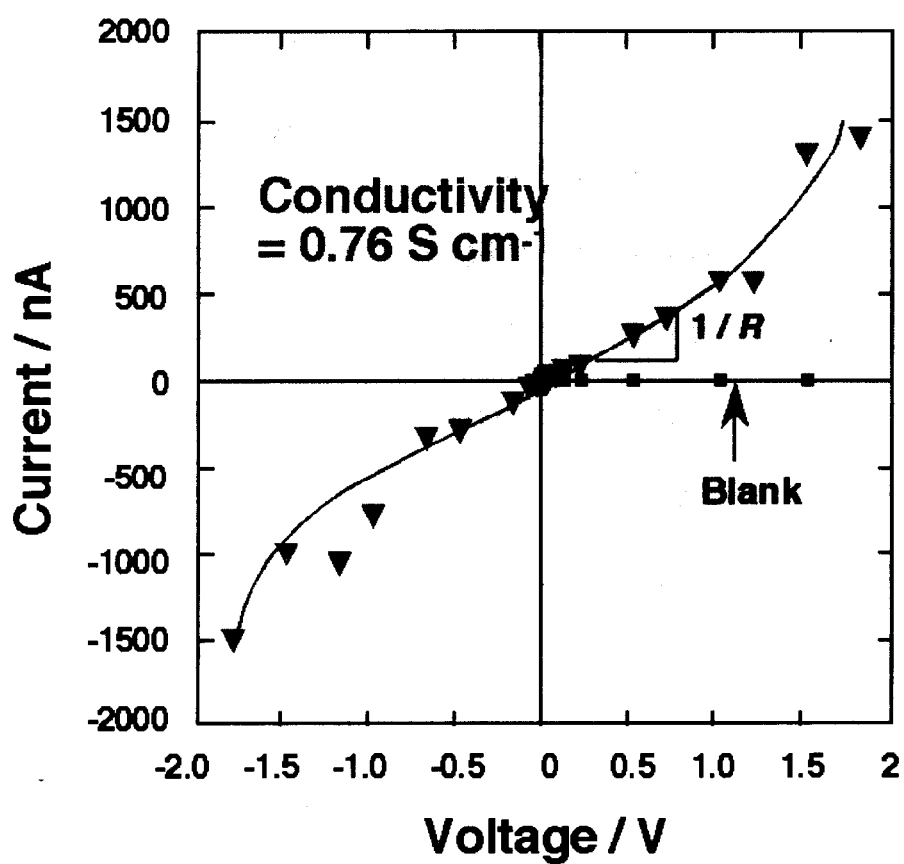


図 7-15. DNA ナノワイヤの電導性 (I - V 曲線)

実験条件が異なるため一概には比較できないが、本節で得た電導度 0.76 S cm^{-1} ($10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$ オーダー) であるという結果は、DNA 単分子レベルで測定された Fink や Dekker らの実験結果 (表 7-1^{21,22)}) と比べても妥当な値である。

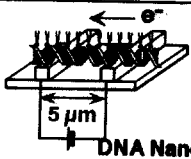
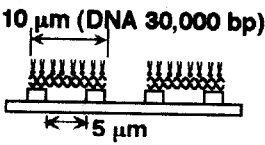
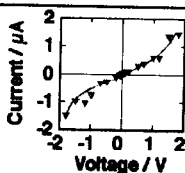
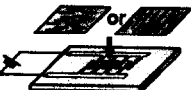
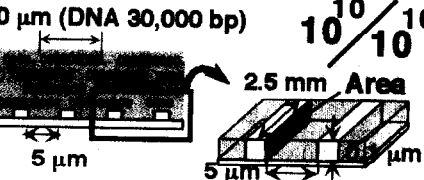
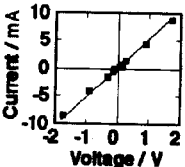
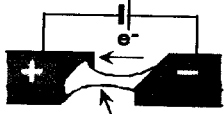
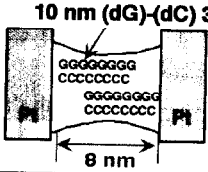
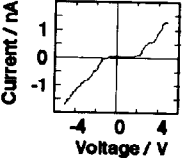
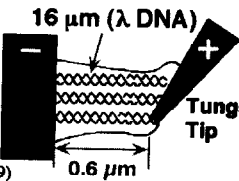
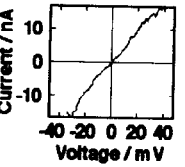
DNA ナノワイヤは一本一本独立した DNA が単一分子で電極の上で橋渡ししているという点で他の測定方法よりも、秩序だった、より単一 DNA 分子の測定に近いと考えられる。DNA ナノワイヤでは、蛍光顕微鏡観察 (図 7-11, 12) で直接見ることができ、電極上には約 100 本の DNA があると見積もって電導度を $10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$ と算出した。

Dekker や Fink の実験系では DNA を一本一本独立しておらず、束になった DNA 分子が電極間でワイヤになっており、DNA の本数を見積もることができない。あえて論文にあるワイヤの太さから推測し、Dekker の実験では 10 本、Fink の実験では 1000 本の束であると仮定して彼らの I - V 曲線から電導度を見積もると、電導度はそれぞれ $10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$ 、 10^0 S cm^{-1} と算出できた。従って本節の結果も含めていずれも DNA の電導度はほぼ同等で、 $10^{-1} \text{ S cm}^{-1} \sim 10^0 \text{ S cm}^{-1}$ と考えられる。

また第 3 章で得たキャストフィルムの電導度についても考察すると、まず電極部分の拡大を見ると、本研究で用いたくし形電極と Dekker や Fink の微小電極とは大きく異なる。くし形電極は 65 対のくしがあるため得られる電流値が大きく増幅されて検出される。そのため本研究の I - V 曲線ではミリアンペア～マイクロアンペアの大きな電流値を得ることができた。しかし DNA 配向化フィルムの系での電導度は $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ とこれらの中では最も小さい。キャストフィルムでは分厚いフィルムを非常に微小な $5 \mu\text{m}$ のくし形電極にフィルムを圧着して測定しており、電極との接触が大きな課題である。 $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ という電導度は、金のくしとくしの間に完全にフィルムが密に入り込んでいると仮定して算出したが、実際には完全にフィルムが入り込んで

はいないことから、実際の電導度はさらに一桁から二桁大きくなり、DNA ナノワイヤで得られた電導度や Dekker, Fink らの実験系と同程度になると考えられる。

表 7-1. DNA の電導度の比較.

Method	Magnification of Electrode	DNA / Electrode Area	I-V Curve	Conductivity / S cm ⁻¹
 DNA Nanowire	 10 μm (DNA 30,000 bp) 5 μm	$10^2 / 10^2 \text{ nm}^2$		10 ⁻¹
 Cast and Stretched Film Y. Okahata, et al., <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 120, 6165 (1998)	 10 μm (DNA 30,000 bp) 5 μm 2.5 mm Area	$10^{10} / 10^{10} \text{ nm}^2$		10 ⁻³
 (dG)-(dC) 30 bp fiber C. Dekker, et al., <i>Nature</i> , 403, 635 (2000)	 10 nm (dG)-(dC) 30 bp 8 nm	$(10 / 10 \text{ nm}^2)$		(10 ⁻¹)
 λ DNA fiber H-W. Fink, et al., <i>Nature</i> , 398, 407 (1999)	 16 μm (λ DNA) 0.6 μm Tungsten Tip	$(10^3 / 10^3 \text{ nm}^2)$		(10 ⁰)

7-4. 総括

DNA-脂質複合体を用いてメゾスコピック細線パターンおよび DNA ナノワイヤを作製した。

DNA-脂質複合体を用いてメゾスコピック細線パターンを蛍光顕微鏡で観察したところ DNA の長さによって DNA-脂質複合体の細線パターンは異なり、DNA が長いものほど細くて長いラインとなった。AFM による観察ではこの細線パターンは DNA-脂質複合体が団子状のドメインとなって線上に引きずられた構造になっていることがわかった。Conducting AFM を用いてこの細線パターンの電導度を調べたところ十分な電導度が見られた。しかし一本のラインが完全に isolate されておらず、電導度の絶対値の評価については議論できなかった。

DNA ワイヤを作るもう一つの手法として単分子膜に吸着させて引き上げる方法を用いた。この方法で作成した DNA ナノワイヤを一本一本独立した DNA 分子を直接蛍光顕微鏡観察することに成功した。この DNA ナノワイヤをくし形電極に固定して直流による電導度を測定した。測定装置の感度から考えても十分に大きな電流値が得られ、蛍光観察の結果から DNA の密度を見積もって電導度の絶対値を概算したところ、これまでに報告されている DNA のワイヤの電導度と比較して妥当な値が得られた。

図 7-16 に示したように、これまで DNA-脂質複合体は溶液中で構造変化を起こしうることやキャストフィルムという形態で材料化を図ってきた²³⁻²⁶⁾。本章では DNA-脂質複合体を材料として応用する上で DNA からなるメゾスコピック細線と DNA ナノワイヤという新しい 2 つの形態を作製できた点で有意義である。また実際にこれらの電気的特性の測定をしたことから、超分子構造や分子デバイスの観点からも興

味深い。今後はより精度の高い手法によってDNA 単分子の測定が求められるだろう。DNA 細線を作製する工夫、電導度を測定する工夫が今後進展し、分子エレクトロニクスの材料としてDNA が用いられる可能性に期待したい。DNA 特有の超高分子量で非常に長いこと、二重らせん鎖の配列特異的な結合、といったメリットを考えると、材料としての魅力は十分にあると思われる。

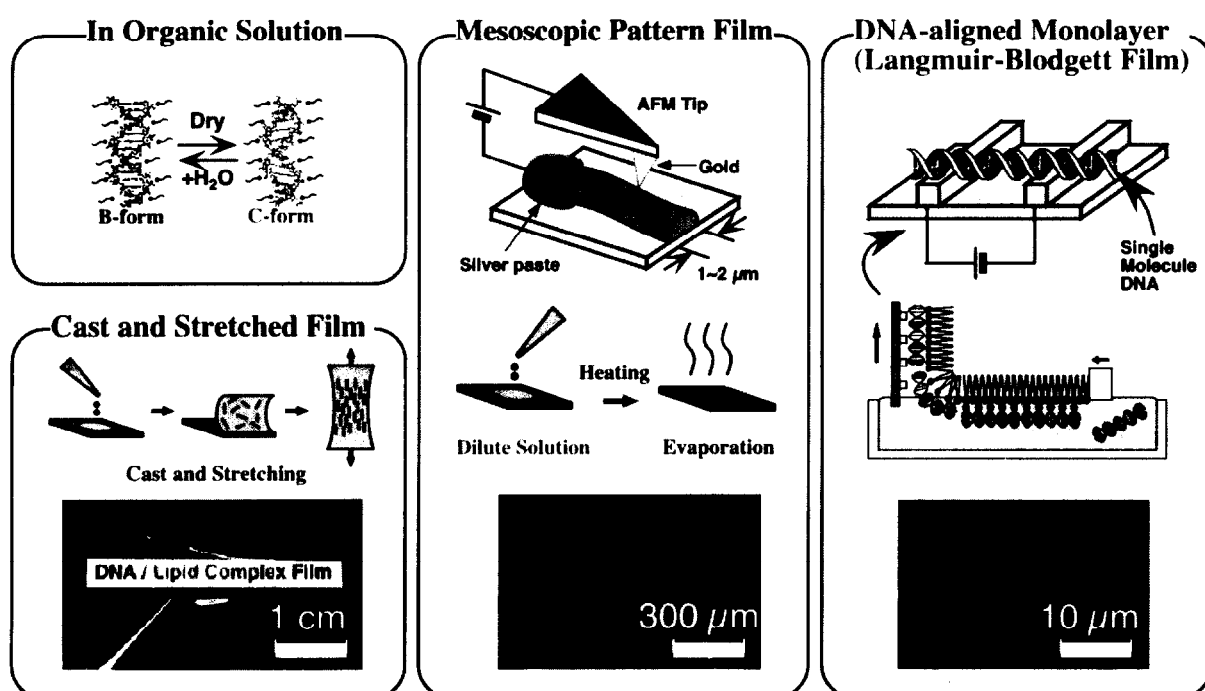


図 7-16. DNA-脂質複合体の 4 つの材料化の形態

第7章 参考文献

- 1) 日経サイエンス, 熱を帯びる分子コンピューター開発, **10**, 8, 52 (2000)
- 2) 化学, 未来を担う分子エレクトロニクス, **55**, 26, (2000)
- 3) T. Osa and M. Fujihira, *Nature*, **264**, 349 (1976)
- 4) A. Kobayashi, F. Grey, R.S. Williams, M. Aono, *Science*, **259**, 1724, (1993)
- 5) R. W. Keyes, *Physics Today*, **45**, 42, (1992)
- 6) J. Cumings and A. Zettl, *Science*, **289**, 602-604 (2000)
- 7) T. W. Tombler, C. Zhou, L. Alexseyev, J. Kong, H. Dai, L. Liu, C. S. Jayanthi, M. Tang, and Shi-Yu Wu, *Nature*, **405**, 769-772 (2000)
- 8) C. Zhou, J. Kong, E. Yenilmez, H. Dai, *Science*, **290**, 1552-1555 (2000)
- 9) T. Rueckes, K. Kim, E. Joselevich, G. Y. Tseng, C-L. Cheung, C. M. Lieber, *Science*, **289**, 94-97, (2000)
- 10) L. A. Bumm, J. J. Arnold, M. T. Cygan, T. D. Dunbar, T. P. Burgin, L. Jones II, D. L. Allara, J. M. Tour, P. S. Weiss, *Science*, **271**, 1705, (1996)
- 11) M. T. Cygan, T. D. Dunbar, J. J. Arnold, N. F. Shedlock, L. A. Bumm, T. P. Burgin, L. Jones II, D. L. Allara, J. M. Tour, P. S. Weiss, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2721 (1998)
- 12) Z. Yao, H. W. Ch. Postma, L. Balents, C. Dekker, *Nature*, **402**, 273, (1999)
- 13) M. Shimomura, O. Karthaus, N. Maruyama, K. Iijiro, T. Sawadaishi, S. Tokura and N. Nishi, *Reports on Progress in Polymer Physics in Japan*, **40**, 523-524 (1997)
- 14) *Polymer Preprints, Japan* **47**, 3412-34143 (1998)
- 15) K. B. Blodgett, *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 1007 (1935)
- 16) K. B. Blodgett and I. Langmuir, *Phys. Chem.*, **51**, 964 (1937)

- 17) 入山啓治, "LB 膜の分子デザイン", 共立出版 (1988)
- 18) 石井淑夫, "よい LB 膜を作る実践的技術", 共立出版 (1989)
- 19) 川端康治郎, 中村貴義, 化学, **42**, 46 (1987)
- 20) Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka, *Langmuir*, **12**, 1326 (1996)
- 21) H-W. Fink and C. Schonenberger, *Nature*, **398**, 407-410 (1999)
- 22) D. Porath, A. Bezryadin, S. de Vries, and C. Dekker, *Nature*, **403**, 635 (2000)
- 23) Y. Okahata and K. Ijro, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1392 (1988)
- 24) 田中健太郎, 学位論文, 東京工業大学 (1995)
- 25) 小林琢也, 修士論文, 東京工業大学 (1997)
- 26) 中山元, 修士論文, 東京工業大学 (1999)

第8章 結論

DNA の構造に注目してみると非常に特徴的な分子と見なすことができ、単なる遺伝物質としてではなく、材料として応用できる可能性がある。本研究では DNA を導電性の機能性材料として応用すること検討した。DNA を材料化するにあたって DNA のリン酸アニオンにカチオン性脂質を静電的に相互作用させ DNA-脂質複合体を作製した。本来 DNA は水溶性だが DNA-脂質複合体は水に溶けずにクロロホルムなどの疎水的な有機溶媒に可溶となり、キャストフィルムとして成形した。このキャストフィルムを延伸して DNA を一方向に配向化できた。この DNA 配向化フィルムの詳しい構造と物性を評価し、電導性機能を検討した。

DNA-脂質複合体は、本来ならば材料として扱うことが難しい DNA をキャストフィルムという手に持てる大きさの材料として扱うことを可能にし、DNA を一方向に並べるための極めて優れた独自の手法といえる。したがって本研究は手に持てる大きさの材料として DNA の導電性を扱ったはじめての例である。

「第2章」では、DNA の機能材料化を図るために DNA-脂質複合体のキャストフィルムを作製し、その内部構造について解析し、力学的強度を評価した。DNA 配向化フィルムの X 線構造解析により DNA 鎖が延伸方向に向き、ヘキサゴナルにパックしていることがわかった。またこの DNA 配向化フィルムの力学的強度は汎用のポリマーフィルムと同等であることもわかった。

「第3章」では、DNA 配向化フィルムの電導度を測定し、導電性メカニズムを解析した。10 μm の DNA 分子内では $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ の電子伝導挙動、分子間では $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$

のイオン伝導挙動を示すことがわかった。

「第4章」では、DNA 配向化フィルムの電導度の温度依存性を検討し、同時に熱的な物性を評価した。電導度は常温から 60 °C まで $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ の一定の電子伝導の挙動を保つが、約 90 °C で DNA の配向は保たれているが DNA 鎖内で断線がおこり、 $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ に低下した。この断線は不可逆的で、140 °C 付近まで加熱すると DNA 鎖の配向が失われるためにその後温度を冷やしても電導度は戻らなかった。その後 160 °C 前後ではフィルム中の DNA は分解した。一方低温側での電子電導は -50 °C 以下で一気に 1 ケタ低下し、再び温度を上げてても元に戻らないということがわかった。

「第5章」では、RNA を混合して DNA 分子間を架橋し、DNA 配向化フィルムの導電性を上げることを試みた。また RNA を材料化するため RNA-脂質複合体フィルムの作製と物性評価を行った。RNA フィルムは DNA フィルムと同様の構造と強度を持っていたが、RNA の混合によって DNA 配向化フィルムの電導度を上昇させることはできなかった。

「第6章」では、DNA 配向化フィルムにヨウ素をドーピングすることで DNA 分子間の $10^{-6} \text{ S cm}^{-1}$ の電導度を $10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ まで上昇させることができた。これは DNA 分子内での電導度に相当し、ヨウ素によって DNA 分子間がつながれて大きな電導度を示すことがわかった。

「第7章」では、分子レベルでの DNA の導電性について議論するため、DNA メゾスコピック細線および DNA ナノワイヤを作製し電導性を評価した。太さ 1-2 μm の DNA メゾスコピック細線を作製し、この細線に沿って電導性があることが Conducting AFM からわかった。DNA を単分子膜に吸着させて引き上げる方法により作成した DNA ナノワイヤを一本一本独立した状態で蛍光顕微鏡観察することに成功した。この DNA ナノワイヤをくし形電極に固定して電導性を確認した。

以上のように、本研究では本来ならば材料として扱うことが難しい DNA を手に持てる大きさの材料として扱うことを可能にし、DNA を一方向に配向させる極めて優れた手法を確立できた。言い換えれば、手に持てる大きさの材料として DNA の導電性を議論したはじめての研究成果である。また分子レベルのミクロな大きさにおいても、DNA を電導性のある機能性材料として応用するための評価をおこなった。

しかし DNA を導電性材料として応用するためにはさらなる導電性の向上が必要である。このためには (a) フィルムにドーパントを施す、(b) DNA 分子間を導電性材料でつなぐ方法、(c) DNA 分子そのものの電子状態を変える、の 3 つの手法が考えられる。(a) の方法としてヨウ素イオンをあらかじめ分子内に持ちかつ DNA に結合するカチオンも併せ持つ、双頭型カチオン性脂質で DNA フィルムを作成する方法が考えられる (図 8-1a)。(b) の方法としては高い導電性を持つカーボンナノチューブを DNA フィルムに混合して DNA 分子間を架橋できる可能性がある (図 8-1b)。(c) の方法としてはレドックス性の色素分子を DNA 特異的にインターカレートさせ、光化学的に酸化還元電位をコントロールする方法が考えられる (図 8-1c)。

また本研究では DNA フィルムの材料化だけでなく、メゾスコピック細線や DNA 配向化単分子膜という新たな形態を作製し、より広い材料形態の可能性を示すことができた。さらに新たな材料形態として、熱溶融によるフィルム成形や繊維化が考えられる。第4章の熱物性評価の際、高温では DNA-脂質複合体が熱溶融することがわかった。したがって溶媒を使うキャストフィルムではなく、熱溶融フィルムや繊維化ができるであろう。また特定温度で溶融することからサーモトロピック液晶になる可能性もある。Native DNA は水溶液中からライオトロピック液晶になるが、DNA-脂質複合体では脂質部分の構造を適当に設計できるので、溶媒を用いずに高分子のサーモトロピック液晶を作り出せる可能性がある (図 8-2)。

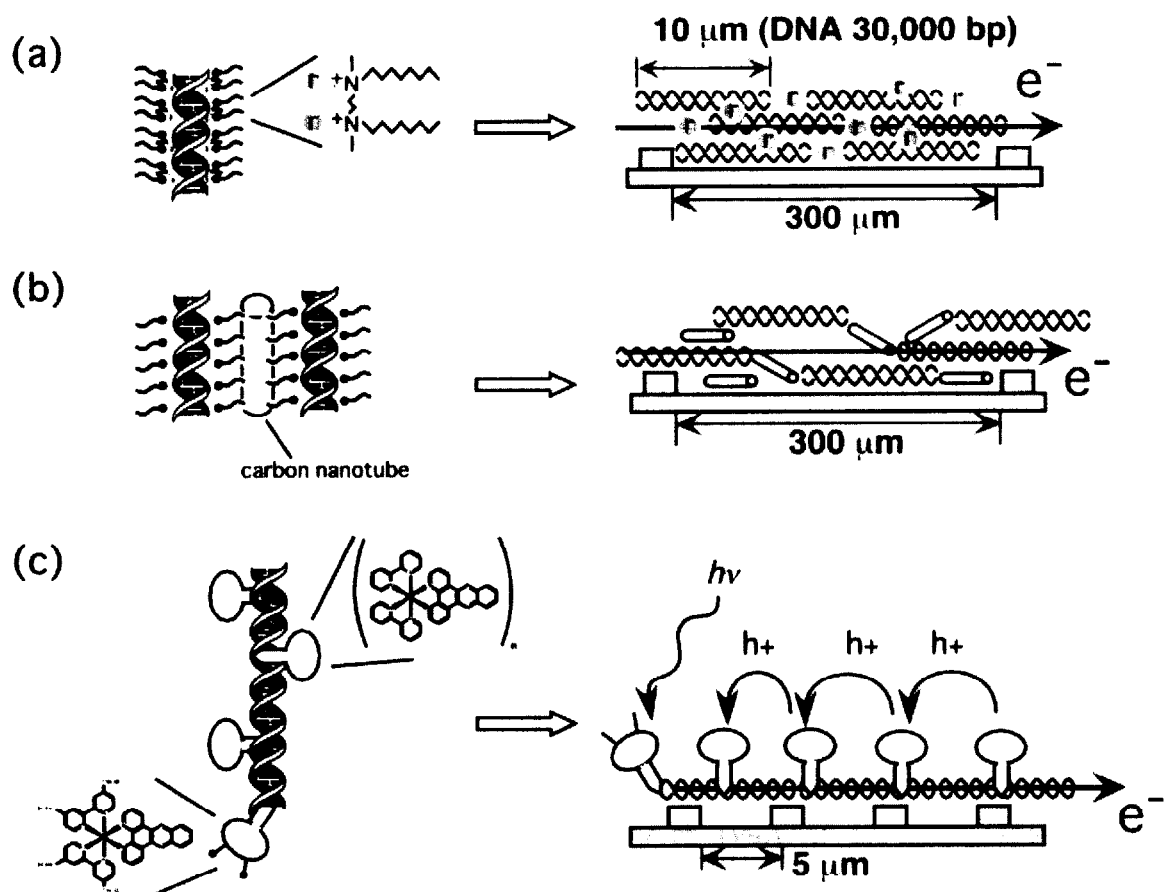


図 8-1. DNA 配向化フィルムの導電性向上の方法.

(a) ヨウ素を分子内に持つ双頭型脂質を用いる方法, (b) カーボンナノチューブで DNA 分子間を架橋する方法, (c) レドックス色素で DNA の電子状態をコントロールする方法

本研究では本来の役割とは異なる視点から生体高分子の機能をとらえる一例として DNA を扱ったが、DNA に限らず他にもこのような視点から扱える生体高分子はたくさんあるはずである。生体高分子の高度な規則構造や機能はその本来の役割の他に、多くの機能を化学的手法によって引き出せる可能性が秘められている。このような考えで人工の合成高分子にはない生体高分子の構造や機能を Material として応用する研究が今後ますます発展することを期待する。

Thermotropic liquid crystals

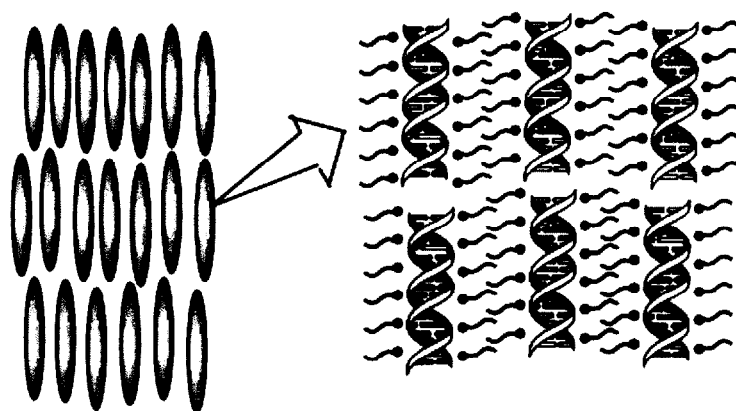


図 8-2. DNA-脂質複合体のサーモトロピック液晶

本論文に関する発表論文

- (1) H. Nakayama, Hiroyuki Ohno, and Y. Okahata
Intramolecular Electron Conduction along DNA Strands and their Temperature Dependency in a DNA-aligned Cast Film
Chem. Commun., 2300-2301 (2001)
- (2) Y. Hoshino, S. Tajima, H. Nakayama, and Y. Okahata
A RNA-aligned Film Prepared from a RNA-Lipid Complex
Chem. Commun., in press
- (3) Y. Okahata and H. Nakayama
Preparations of DNA-aligned Thin Films by Cast and LB Methods and Their Anisotropic Electric Conductivity along DNA Strands in the Film
Proc. Japan Acad., 76 Ser. B, No. 9, 145-150 (2000)
- (4) Y. Okahata, T. Kobayashi, H. Nakayama, and K. Tanaka
DNA-aligned cast film and its anisotropic electron conductivity
Supramol. Science, 5, 317-320 (1998)

その他の論文

- (5) Y. Okahata, T. Kobayashi, K. Tanaka, and H. Nakayama
DNA-Lipid Complexes in Organic Solution, and DNA-aligned Cast and LB Films
Supramolecular Chemistry of Biological Relevance, ed. T. Kunitake, John Willey & Sons, Ltd., (2000)
- (6) Y. Hoshino, S. Tajima, H. Nakayama, and Y. Okahata
Preparations of a RNA-Lipid Complex Film and its physical properties
Nucleic Acids Research Supplement, No. 1, 61-62 (2001)

学会での口頭発表

- (1) 中山 元 (学部 4 年)・江原 靖人 (助手)・岡畑 恵雄 (教授)・佐々木 茂貴 (九大薬学部助教授)・前田 聡 (九大薬学部教授)
水晶発振子をデバイスとする DNA 二重鎖に対する薬物の相互作用の検出
日本化学会第 72 春季年会 (立教大学)、1997 年 3 月 27-30 日
- (2) 中山 元 (修士 1 年)・江原 靖人 (助手)・岡畑 恵雄 (教授)
水晶発振子上に固定化した DNA 二本鎖への薬物の結合挙動の解析
第 46 回高分子討論会 (名古屋工業大学)、1997 年 10 月 1-3 日
- (3) Y. Okahata (教授) and H. Nakayama (学生)
Anisotropic Electroconductivity of Aligned DNA Films
International Symposium on Electrochemistry of Ordered Interfaces, (Sapporo) , 1998 年 9 月 11, 12 日
- (4) 舟崎 真理子 (修士 1 年)・中山 元 (博士 1 年)・古澤 宏幸 (博士 3 年)・岡畑 恵雄 (教授)
水晶発振子を用いた DNA 二重鎖への抗生物質の結合挙動の解析
日本化学会第 77 秋季年会、北海道大学(札幌)、1999 年 9 月 23-26 日
- (5) 中山 元 (博士 1 年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA 配向化フィルムの物性評価
第 48 回高分子討論会 (新潟大学)、1999 年 10 月 6-8 日
- (6) 石井 沙知 (修士 1 年)・中山 元 (博士 2 年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA-脂質複合体フィルムの物性評価
第 49 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場)、2000 年 5 月 29-31 日
- (7) 中山 元 (博士 2 年)・岡畑 恵雄 (教授)・秋田 香織 (博士研究員)・大野 弘幸 (東京農工大教授)
DNA-脂質複合体フィルムの導電特性
第 49 回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場)、2000 年 5 月 29-31 日
- (8) 中山 元 (博士 2 年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA 配向化フィルムの電子伝導性
第 49 回高分子討論会 (東北大学)、2000 年 9 月 27-29 日

- (9) 田嶋 祥子 (修士1年)・中山 元 (博士2年)・岡畑 恵雄 (教授)
電子伝導性材料として用いる DNA 配向化フィルムの作製
第49回高分子討論会 (東北大学)、2000年9月27-29日
- (10) Y. Okahata (教授) and H. Nakayama (学生)
Preparation and Function of DNA-aligned Cast Film
PACIFICHEM 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii), 2000年12月14-19日
- (11) 中山 元 (博士2年)・岡畑 恵雄 (教授)
配向化 DNA フィルムの電子伝導性
東北高分子ミニフォーラム 2001 (東北大学)、2001年3月9日
- (12) 中山 元 (博士3年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA-脂質複合体フィルムの導電特性
第50回高分子学会年次大会 (大阪国際会議場)、2001年5月23-25日
- (13) 田嶋 祥子 (修士2年)・中山 元 (博士3年)・岡畑 恵雄 (教授)
熱プレス法による DNA 配向化フィルムの物性と機能評価
第50回高分子学会年次大会 (大阪国際会議場)、2001年5月23-25日
- (14) 星野 友 (修士1年)・中山 元 (博士3年)・岡畑 恵雄 (教授)
RNA-脂質複合体のフィルム化
第50回高分子学会年次大会 (大阪国際会議場)、2001年5月23-25日
- (15) 中山 元 (博士3年)・田嶋 祥子・星野 友・岡畑 恵雄 (教授)
DNA や RNA を配向化させたフィルムの作製と機能化
第50回高分子討論会 (早稲田大学)、2001年9月12-14日
- (16) 中山 元 (博士3年)・星野 友 (修士1年)
DNA を材料とする機能性バイオフィルムの実用化
東京工業大学ベンチャービジネスラボラトリー公開シンポジウム、2001年12月18日
- (17) 中山 元 (博士3年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA 配向化フィルムの導電性に及ぼすドーパントの効果
日本化学会第81春季年会 (早稲田大学)、2001年3月26-29、発表予定

- (18) 田嶋 祥子 (修士 2 年)・中山 元 (博士 3 年)・岡畑 恵雄 (教授)
熱プレス法による DNA 配向化フィルムの作製と液晶性
日本化学会第 81 春季年会 (早稲田大学)、2001 年 3 月 26-29、発表予定
- (19) 片田 順一 (学部 4 年) 中山 元 (博士 3 年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA 配向化単分子膜の導電性評価
日本化学会第 81 春季年会 (早稲田大学)、2001 年 3 月 26-29、発表予定

学会でのポスター発表

- (1) 中山 元 (博士 1 年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA-脂質複合体キャストフィルムの物性評価
第 48 回高分子学会年次大会 (京都国際会議場)、1999 年 5 月 27-30 日
- (2) 中山 元 (博士 1 年)・岡畑 恵雄 (教授)
DNA-脂質複合体キャストフィルムの物性評価
第 14 回生体機能関連化学シンポジウム 若手フォーラム (北海道大学) 1999 年 9 月 22 日
- (3) Y. Okahata (教授) and H. Nakayama (学生)
A DNA-aligned Cast Film and its Electron Conductivity
XIth International Symposium on Supramolecular Chemistry (ISSC XI) (Fukuoka), 2000 年 7 月 30 日-8 月 4 日
- (4) H. Nakayama (学生), S. Ishii (学生) and Y. Okahata (教授)
Preparation of DNA-aligned Cast Film and its Physical Properties
XIth International Symposium on Supramolecular Chemistry (ISSC XI) (Fukuoka), 2000 年 7 月 30 日-8 月 4 日
- (5) 岡畑 恵雄 (教授)・中山 元 (博士 2 年)
DNA 配向化フィルムの作製と電子導電性
第 15 回生体機能関連化学シンポジウム (奈良女子大学)、2000 年 9 月 23, 24 日
- (6) H. Nakayama (学生), K. I. Akita (博士研究員), Y. Okahata (教授) and, H. Ohno (教授)
Electron conductivity of DNA-lipid complex films
PACIFICHEM 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii), 2000 年 12 月 14-19 日

- (7) Y. Hoshino, S. Tajima, H. Nakayama, and Y. Okahata
Preparations of a RNA-Lipid Complex Film and its physical properties
Nucleic Acids Research Supplement, (甲南大学) 2001 年 11 月 7-9 日

紀要等

- (1) 岡畑 恵雄 (教授)・中山 元 (博士 1 年)
ハイテクうらばなし いのちの情報 第 15 回 DNA をフィルム化する
日刊工業新聞、1999 年 10 月 5 日
- (2) 岡畑 恵雄 (教授)・中山 元 (博士 1 年)
DNA を素材にするバイオフィルム
コンバーテック、No. 3, 2-4 (2000)
- (3) 岡畑 恵雄 (教授)・中山 元 (博士 2 年)
環境ホルモンを除去する DNA がいっぱい サケの白子に脚光
朝日新聞、2000 年 6 月 2 日
- (4) 岡畑 恵雄 (教授)・中山 元 (博士 3 年)
超への挑戦 DNA を工業材料に
日本工業新聞、2001 年 8 月 2 日

受賞歴

- (1) 国際学会でのポスター賞受賞 (Student Poster Award)
Electron conductivity of DNA-lipid complex films
PACIFICHEM 2000 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Honolulu, Hawaii), 2000 年 12 月 14-19 日
- (2) ベンチャービジネス推進研究コンテストに採用される (賞金 100 万円)
中山 元 (博士 3 年)・星野 友 (修士 1 年)
DNA を材料とする機能性バイオフィルムの実用化
平成 13 年度 東京工業大学ベンチャービジネス推進研究, 2001 年 8 月 9 日

謝辞

本研究を進めるにあたり、論文指導教官として常に熱意あふれるご指導を頂きました東京工業大学生命理工学研究科岡畑恵雄教授、ならびに森俊明助教授に心から感謝いたします。

論文審査にあたられ、ご指導、ご助言をいただきました東京工業大学佐藤史衛教授、藤平正道教授、赤池敏宏教授、大谷弘文助教授に深くお礼申し上げます。

電導度測定に関して多大なるご指導をいただき、実験装置・器具全般のお世話をしていただきました、東京農工大学工学部大野弘幸教授、秋田香織博士ならびに吉澤正博博士に心より感謝いたします。

共同研究者としてマイクロワイヤの作製、AFM 測定を中心に測定機器を快くお貸しくださった、北海道大学電子科学研究所下村政嗣教授、居城邦治助教授、沢田石哲郎博士ならびに下村研究室の皆様は心より深く感謝致します。

実験上多くの有益なアドバイスをいただいた DNA-脂質複合体研究の先輩、東京大学助手田中健太郎博士ならびに小林琢也氏に深くお礼申し上げます。

X 線回折装置を心よくお貸し頂いた、東京工業大学生命理工学部田中信夫教授並びに竹中章郎助教授に心よりお礼申し上げます。

動的粘弾性測定に関してお世話になりました、大日本インキ化学工業（株）の江波戸博博士、松木桂子さん、研究所の皆様は感謝いたします。

DNA・RNA の試料を提供いただきました（株）ニチロ、北海道水産試験所、日本製紙（株）の各位に感謝いたします。

研究を進めるにあたり様々なご助言を頂きました川崎剛美博士、古澤宏幸博士に深く感謝致します。また公私にわたって常に適切なご助言をいただいた岸原靖展博士に感謝いたします。

6 年間の研究室生活を共にした同期の福所しのぶ博士、松野寿生博士に深く感謝いたします。また本研究の実験を共に行い、重要なデータを提供いただいた田嶋祥子さん、石井沙知さん、星野友君、五味研二君、片田順一君に深く感謝いたします。

最後に私の進路選択、生活の支えとなってくれた祖父母、両親、妻の両親に、そして最大の理解者である妻に心より感謝いたします。

2002 年 2 月

中山 元