

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	DNA複合化分子認識材料の開発
Title(English)	
著者(和文)	菅原勇貴
Author(English)	Yuuki Sugawara
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9527号, 授与年月日:2014年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山口 猛央,小島 英理,西山 伸宏,上田 宏,田巻 孝敬
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9527号, Conferred date:2014/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

要約

博士論文

# DNA 複合化分子認識材料の開発

平成 26 年 2 月

東京工業大学  
大学院総合理工学研究科  
化学環境学専攻

菅原 勇貴

## 本研究の目的と論文の構成

我々の生活は科学技術によって生み出された様々な製品によって支えられている。それらの製品は多種多様な材料から構成され、化学は新規な材料・高機能の材料を開発することで科学技術を進歩させてきた。「刺激応答性材料」は、光・温度・分子などの外部からの刺激を感知することでアウトプットを発信する材料であり、ある単一の刺激にのみ応答する特異性を持つ刺激応答性材料は、体内の病原体や環境中の汚染物質を検知するセンサーなどへの応用が期待され研究が盛んに行われている。しかし、そのようなセンサーとしての材料には、簡便性と迅速性、さらに広範な目的物質に対して使用できるという汎用性が必要である。しかしそのような材料は未だ見出されていないのが現状である。

本研究は、汎用性を持つ簡便な刺激応答性材料の開発を目指し、DNA をセンサー部位とし感温性ポリマーをアクチュエーター部位とし、DNA の分子認識により感温性ポリマーが形態変化を起こす分子認識材料を創出する。材料の形態として、リニアポリマーおよび多孔質膜の細孔内のグラフトポリマーについて検討する。

まずリニアポリマーの系で、DNA が刺激を感知することによる感温性ポリマーの凝集挙動の変化を調査解明する。さらに DNA の標的分子認識によりポリマーの凝集挙動の変化を誘起させる。次に膜のグラフトポリマーの系において、DNA による標的分子認識により膜細孔が開閉し簡便に標的分子を検知できることを示す。

第 1 章では、既存の刺激応答性ポリマーを整理し、解決すべき課題を抽出する。また DNA を分子として見た場合の外部刺激による DNA の状態変化を概説する。さらに DNA の特異な性質を利用したポリマーの形態制御に関する既往の研究を挙げ、DNA をセンサー部位としポリマーをアクチュエーター部位とした汎用性の高い分子認識材料のコンセプトを示す。

第 2 章では、リニアな DNA 固定化ポリマーの合成を行う。そして DNA の荷電により DNA 固定化ポリマーの凝集を制御する。1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の持つ負電荷量の違いが凝集挙動に与える影響を調査する。さらに観察された凝集現象が DNA の持つ荷電の差によって制御されていることを証明する。

第 3 章では、DNA 固定化ポリマーの凝集現象の系統的な調査を行い、それぞれが DNA の荷電と自由度により制御される 2 つの凝集現象が発現する要因を明らかにする。また DNA の静電反発とエントロピー反発の制御により 2 つの凝集現象を切り替えることを試みる。

第 4 章では、第 2 章・第 3 章で得られた知見を用いて、DNA の分子認識により DNA 固定化ポリマーの凝集挙動を変化させ、凝集の観察により分子の検出を行う。認識させる分子としては、DNA と強く結合する色素化合物を用いる。また標的分子に特異的に結合する性質を持つ「DNA アプタマー」を用い、標的分子であるタンパク質の認識も行う。

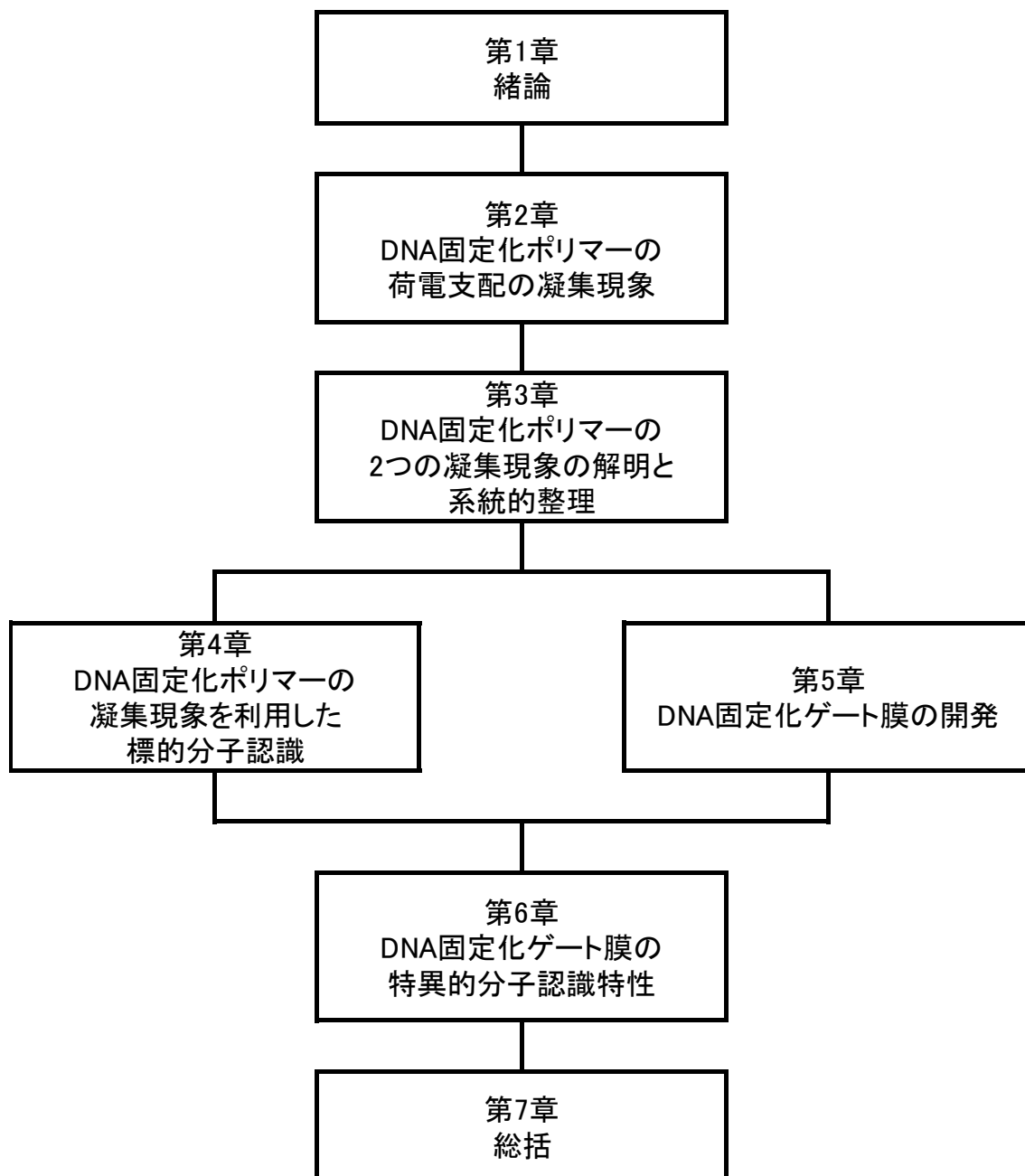
第 5 章では、DNA 固定化ポリマーを多孔質膜の細孔内にグラフトし「分子認識ゲート膜」を作製する。そして DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換によりグラフトポリマーが膜の細孔の開閉を制御できることを実証する。また、細孔内のグラフトポリマーの系と第 3 章で示したリニアポリマーの系での凝集挙動を比較する。

第 6 章では、第 5 章で開発した分子認識ゲート膜において特異的タンパク質の検出を行う。DNA アプタマーを持つ分子認識ゲート膜の細孔内で分子認識を試み、標的分子の有無による膜の透過性変化を評価する。

第 7 章では、本研究の総括および今後の展望を示す。

本論文の構成を次のページに示す。

## 本論文の構成



## 第1章 緒論

### 1.1 研究の背景

#### 1.1.1 生体の刺激応答性

生体は、外部刺激に対して特異的で素早い応答を示す。例えば、まぶしい光で瞳孔が閉じるのは光を感知する組織と瞳孔を動かす組織が協働している。他の例では、寒気を感じると鳥肌が立ち、また酸味のある物を食べると唾液が分泌される。このように生体は外部刺激に対して迅速に、また単一の刺激に対して特異的に応答する。上記の刺激応答は生体分子がその中核を担い、生体分子と外部刺激との特異的な相互作用・結合によって応答が発現する。生体分子である核酸、タンパク質、糖鎖などは数種類のヌクレオチド、アミノ酸、単糖などのモノマーの多様な組み合わせから成り、さらに上位階層である細胞・神経・筋肉を構成し、多様な刺激応答機能を生み出している。

#### 1.1.2 刺激応答性材料

このような生体の優れた性質を手本として開発された材料が「刺激応答性材料」である。刺激応答性材料は、光、温度、特定の分子などの外部刺激に応答して、形態が変化したり機械的運動を発現したりする材料である。刺激応答性材料は外部刺激を感知する「センサー部位」と運動を発現する「アクチュエーター部位」で構成されており、刺激に対する高い特異性を持つ刺激応答性材料は刺激の検出に使用可能で、臨床検査や環境測定などへの応用が期待される。材料として有機ポリマーを用いた場合、その化学構造を任意に制御可能であり、またセンサー部位となるレセプターを共有結合で安定に固定することが可能であるためアクチュエーター部位として有用性が高い。また、DNAやタンパク質などの生体分子は、特異的で親和性の高い分子認識機能を持つ。これら生体分子をセンサー部位とし、感知した刺激の情報をアクチュエーター部位であるポリマーの応答挙動に変換するシステムを持った、生体の刺激応答を模倣した高機能デバイスの開発が現在さかんに行われている。

そこで、以下に刺激応答性材料の中で有機ポリマーから成るものを概括し、その課題を

抽出する。さらに刺激応答性材料の構成成分として生体分子である DNA を用いその特異な性質を利用した研究を示し、本研究の狙いを明らかにする。

## 1.2 既往の研究

### 1.2.1 刺激応答性ポリマー

#### 1.2.1.1 分子認識ポリマー

刺激応答性ポリマーの中で分子を認識するものは、温度センサーなど物理的刺激を感知するものに比べ開発が遅れているが、様々なシステムを持つ分子認識ポリマーが研究されている。しかも単一の分子のみに応答する特異性を持つ材料はセンサーとして有用性が高いとされ、魅力的な研究分野である。

例えば、抗体と抗原の複合体から成り、特異的標的分子により膨潤するハイドロゲル<sup>[1]</sup>、酵素反応により膨潤するマイクロゲル<sup>[2]</sup>などが開発された。レセプターとターゲットの複合体を鋳型とし重合させ作製されるインプリントポリマーは、ポリマー内のレセプターが標的分子の結合部位と調度結合するように配置され、次に標的分子が添加された際に即座に選択的に認識することが可能である<sup>[3-4]</sup>。破断などの機械的破損が生じても自然に元の形状に戻る材料を、自己修復材料と呼ぶ。レセプターの分子認識を利用した自己修復ポリマーとして、例えばシクロデキストリンをレセプターに持ち超分子ホスト-ゲスト相互作用を用いて自己修復を行うゲルが開発されている<sup>[5-6]</sup>、

#### 1.2.1.2 感温性ポリマー

温度の変化により水溶液中でポリマー鎖のコイル/グロビュール相転移（体積相転移）を起こすポリマーを感温性ポリマー（Thermoresponsive polymer）と呼ぶ<sup>[7-8]</sup>。その相転移はある決まった温度で瞬時に起こり、その温度を相転移温度もしくは下限臨界共溶温度（Lower Critical Solution Temperature: LCST）という（Figure 1.1）。LCST 以下の温度ではポリマー鎖には水分子が多数吸着し、水に溶けてポリマー鎖は膨潤している。膨潤時のポリマー鎖のとり形態はランダムコイルである。温度を上げ LCST に達すると、ポリマーに吸着していた水分子が脱水和し、ポリマー分子内の疎水性基同士の疎水性相互作用が優勢となり、ポリマー鎖は収縮しグロビュールの形態をとり水に不溶となる。またポリマー鎖同士は疎水性相互作用によって凝集し溶液は白く濁る。ポリ N-イソプロピルアクリルアミド（poly(*N*-isopropylacrylamide): PNIPAM, 化学構造を Figure 1.1 に示す）は、相転移によってポリマー鎖の大きな体積変化を見せること、また LCST が 32 °C 付近と常温に近いために多くの研究がなされている。

感温性ポリマーの相転移においてはイソプロピル基に吸着する水が重要なファクターとなっている。これを利用して、ポリマー鎖近傍の水を制御することで感温性ポリマーの相転移挙動を変化させる研究が報告されている。例えば Irie らは、NIPAM と BCAM (benzo-18-crown-6-acrylamide) を共重合し、数種類のイオンを認識し膨潤/収縮するイオン応答ポリマーを開発した<sup>9)</sup>。著者らは、様々な金属イオンが存在する場合の PNIPAM-BCAM の LCST 変化を観測した。その結果、ポリマー鎖のクラウンエーテルがサイズの合うカリウムイオンを捕捉することでポリマー鎖がより親水的になり、LCST が高温側に移動することを示した。このように、感温性ポリマーの鎖の親疎水性を変化させ LCST を移動させることで、一定温度条件下でも感温性ポリマーの膨潤/収縮挙動を起こすことが可能である。そのためには上述のように、外部刺激を感知するレセプターを感温性ポリマーに固定し外部刺激を感知することによりポリマー鎖の親疎水性の変化が起こるように設計する。そうすることで温度以外の刺激に応答するポリマーを作製できる。

### 1.2.1.3 分子認識ゲート膜

分子認識ゲート膜 (Figure 1.2) は、目的分子の有無により膜細孔の開閉挙動を起こすことができる人工膜である。細孔の開閉は、細孔内のグラフトポリマーに固定されたレセプターが分子を捕捉しグラフトポリマーの膨潤/収縮挙動が生じることで誘起される。分子認識ゲート膜は、薄膜であり細孔表面の運動性の高いグラフトポリマーの形態変化を使うため応答時間が短く、着色物質の膜透過を目視することで簡便な検査が行え、また微小細孔内で分子を認識するため高感度である。以上の高速、簡便、高感度という利点を持つ分子認識ゲート膜は、有用なセンサー材料になると期待される。それは例えば、操作が簡単でかつ検査結果が一目でわかるような簡便性が求められる、在宅医療で使うバイオセンサーに適している。また細孔の開閉挙動を利用したドラッグデリバリーシステムやアフィニティメンブレンなど様々な応用が期待される。

本研究室の山口・伊藤らにより、イオンを認識して細孔の開閉挙動を起こす分子認識イオンゲート膜が開発された<sup>[10-14]</sup>。Figure 1.3 に示すように、分子認識イオンゲート膜は NIPAM と BCAM (benzo-18-crown-6-acrylamide) をラジカル共重合したポリマーが多孔質基材にグラフトされている。ポリマー内のクラウンエーテルに、そのクラウン環に合うサイズのイオンが捕捉されると、PNIPAM の LCST が高温側に移動しそれまで収縮していたグラフトポリマーは膨潤し細孔が閉鎖する。分子認識イオンゲート膜は、バリウムイオンの有無による膜の透過性の差が 100 倍以上となり、細孔の非常に大きな開閉挙動を示した (Figure 1.3)。

しかし、現在までに開発された分子認識ゲート膜は、個々のゲート膜がイオン・アビジン・グルコースなど単一の標的しか認識できず、同じシステムで多様な標的分子に適用できるような分子認識ゲート膜は開発されていない。医療に応用するセンサー材料は、様々な疾病に対して使用できるように広範な標的分子を検出できることが望ましい。そのため

には感温性ポリマーに固定するセンサー部位として、多様な標的分子を認識できるレセプターを用いる必要がある。

### 1.2.2 DNA の刺激認識

先にも述べたが、生体分子は特異的な分子認識機能を持ち、刺激応答性材料のセンサー部位に用いることで高機能デバイスが開発可能である。生体分子の中で DNA (デオキシリボ核酸) は低分子化合物、タンパク質、相補的 DNA 鎖といった広範囲の分子と強く結合できる<sup>[15-17]</sup>ため、DNA を使用することで用途の広い有用な刺激応答性材料になると考えられる。DNA は核酸塩基同士の配列特異的な結合により 2 本鎖 DNA (Double-stranded DNA: dsDNA) を形成する。対して 1 本のみで単独の DNA を 1 本鎖 DNA (Single-stranded DNA: ssDNA) と呼ぶ。DNA を刺激を感知するセンサー部位に用いる場合、刺激により DNA の物理化学的状态を変化させポリマーの形態や会合状態を制御するというストラテジーが考えられる。以下に、どのような刺激により DNA の状態がどう変化するかを概括する。

#### 1.2.2.1 DNA の荷電状態

DNA は分子内のリン酸基に由来する負電荷を持つが、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換により DNA の荷電状態は変化する。1 本鎖 DNA が 2 本鎖 DNA となることでリン酸基の数が増え DNA の持つ負電荷が増加する<sup>[18-20]</sup>。またそれにより DNA の静電反発が増大することが実験的に確かめられている<sup>[21]</sup>。そして溶液中の塩も DNA の荷電に影響することが知られており、溶液中の Na<sup>+</sup>イオンなどのカチオンが増加することで、リン酸基の負電荷が遮蔽され DNA の有効電荷が減少する<sup>[22]</sup>。

#### 1.2.2.2 DNA の鎖の自由度

DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換により DNA のコンフォメーションも変化する。また鎖の自由度が変化する<sup>[23-26]</sup>。1 本鎖 DNA は、鎖の取りうるコンフォメーションが多く鎖の自由度が高いランダムコイルの形態である。一方 2 本鎖 DNA は、鎖の取りうるコンフォメーションが制限され、棒状の二重らせん構造からの変化が小さい。ポリマーの自由度の指標となる持続長 (Persistence length) で比べると、1 本鎖 DNA がおよそ 1.3 nm<sup>[24]</sup>、2 本鎖 DNA がおよそ 50 nm<sup>[25]</sup>であり、そのコンフォメーションのエントロピーは大きく異なる。

#### 1.2.2.3 DNA アプタマー

DNA アプタマー (DNA aptamer) は、特異的標的分子に高い親和性で結合するように塩基配列が最適化された人工の短い 1 本鎖 DNA である。DNA アプタマーは特殊な三次元構

造に折りたたまれ標的分子と芳香環のスタッキング相互作用、水素結合、静電相互作用、分子間力などの相互作用で結合する<sup>[15]</sup>。DNA アプタマーとタンパク質の標的分子との一般的な解離定数  $K_d$  は  $10^{-8}$ – $10^{-10}$  程度で、抗原抗体結合の  $K_d$  が  $10^{-7}$ – $10^{-11}$  であるのと同等の結合力を有している。その高い特異性と結合親和性から、DNA アプタマーはタンパク質である抗体の DNA 版であると言え、しかも抗体に比べて変性しにくく高い安定性を有している<sup>[27-28]</sup>。

このような人工の特異的結合プローブである DNA アプタマーは、生体組織染色<sup>[29]</sup>、アフィニティクロマトグラフィ<sup>[30-31]</sup>、医薬品<sup>[32-35]</sup>、バイオセンサーなど様々な応用が期待され研究されている。これまでに行われた DNA アプタマーを用いたセンサーとして、例えば、電気化学測定<sup>[36]</sup>、蛍光<sup>[37]</sup>、酵素反応<sup>[38]</sup>。などを検出法に用いたデバイスが開発された。

### 1.2.3 DNA によるポリマーの形態制御

次に DNA の状態変化によりポリマーの形態を制御した研究を紹介する。DNA の変化により効率的にポリマーの形態を制御するためには、DNA はポリマーに共有結合で強く安定して固定することが求められる。

短い 1 本鎖核酸は人工合成可能で、その末端への化学修飾は容易である。従って一般的に、1 本鎖核酸末端に修飾された官能基とポリマー分子内の反応性官能基との反応により 1 本鎖核酸のポリマーへの固定化は行われる。固定化に使用する官能基としては、*N*-methacryloyloxysuccinimide<sup>[39-41]</sup>、*p*-nitrophenyl ester<sup>[42]</sup>、azide-alkyne<sup>[43-44]</sup>、pyridyl disulfide<sup>[45-46]</sup>、などが用いられる。

#### 1.2.3.1 DNA 固定化ゲル

DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換でポリマーの構造・形態を制御した研究がある。ポリマーはポリマー鎖間を架橋することでゲル化するが、この架橋に DNA を用いることで、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換によりゲルの分解や膨潤/収縮を起こすことが可能である。例えばポリマーに固定した DNA 同士で 2 本鎖 DNA を形成させることで、DNA が架橋部となりゲル化が起こる<sup>[47]</sup>。また DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換により硬さが変化するゲル<sup>[26]</sup>も知られている。さらに、架橋の DNA に DNA アプタマーを用い、標的分子で架橋を開裂させゲルを分解させている研究がある。Tan らは、相補的 DNA を固定したポリマーを DNA アプタマーで架橋しゲル化させ、標的分子の添加で架橋ゲルを分解させることに成功した研究もある<sup>[48]</sup>。

#### 1.2.3.2 DNA 固定化ミセル

また、ポリマーミセルの形態を DNA で制御した研究がある。疎水的なポリマーと 1 本鎖

DNA のブロックコポリマーは溶液中ではポリマーのコアと DNA のシェルを持つミセルを形成する。ここに複数の相補的配列の部分を持つ長い相補的 DNA を加えると、2 本鎖 DNA を形成すると同時にミセルは棒状の rod-like ミセルに形態を変化した<sup>[49]</sup>。また、ポリマーに固定した DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換によりポリマーの会合体の球状/棒状の形態変化を起こすことに成功した研究もある<sup>[50]</sup>。

### 1.2.3.3 DNA 固定化 PNIPAM

固定化した DNA によって PNIPAM の相転移挙動を制御する研究では、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換によって DNA のエントロピー反発が変化することを駆動力とし PNIPAM の凝集を制御している<sup>[51-56]</sup>。PNIPAM に 1 本鎖 DNA を固定したポリマーは、水溶液中で PNIPAM の LCST 以上の温度でも安定して分散し凝集しない。これは DNA のエントロピー反発により凝集が抑制されているためである。1 本鎖 DNA は取りうるコンフォメーションが多く、分子鎖の自由度が高い。つまりエントロピーが高い。この 1 本鎖 DNA が凝集した場合、取りうるコンフォメーションが制限されエントロピーが低下するので不利である。そのため凝集に対する反発力が発生する<sup>[57]</sup>。しかしここに相補的な DNA を加え完全相補 2 本鎖 DNA を形成させると即座にポリマーは凝集する。これは、2 本鎖 DNA は棒状の剛直な分子で、分子鎖の取りうるコンフォメーションが元々制限されており、凝集してもエントロピーの低下は少なく凝集に対する反発力が弱いためである。この凝集現象の発現は、ポリマー鎖から遠い方の DNA 末端が平滑である必要があり、片方の鎖がはみ出していたり末端が mismatch であったりすると PNIPAM は凝集しない<sup>[51, 53, 58]</sup>。よって DNA 鎖の、特に末端部分の自由度が PNIPAM の凝集に大きく効いていると言える。

## 1.3 本研究の目的

以上、ここまでに刺激応答性ポリマーの研究を概観し、現状の課題を示した。また生体分子である DNA を用いて、DNA が刺激を感知することでポリマーの形態を制御した例を示した。

本研究では、汎用性のあるレセプターとして DNA を用い、新規な分子認識材料を開発する。DNA はイオン、色素化合物、タンパク質、相補的 DNA に結合することができ、それらの結合により分子鎖の荷電状態と自由度が変化する。その DNA の変化により感温性ポリマーの形態を制御することを目指す。既往の研究では、DNA の自由度の変化を用いて DNA 固定化 PNIPAM の凝集を制御しているが、前述のイオン応答性ポリマーや pH 応答性ポリマーの例から、DNA の荷電の変化でも PNIPAM の凝集を制御することが可能であると考えられる。本研究では、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換による DNA の荷電の変化で PNIPAM の凝集を制御できることを実証し、また PNIPAM の凝集を DNA の荷電が制御する条件と

DNA の自由度が制御する条件を明らかにし、それら 2 つの凝集現象を任意に切り替えることを目指す。

さらに、DNA の分子認識により DNA の荷電状態と自由度を変化させ PNIPAM の凝集挙動を制御することを試みる。DNA に認識させる分子として、DNA に強く結合する色素化合物を用いる。また DNA アプタマーを用いて特異的で汎用性のある分子認識ポリマーの開発を目指す。DNA アプタマーをセンサー部位に用いた場合、検出対象の標的分子に合わせて DNA アプタマーを代えることで極めて多様な種類の標的分子に適用可能な分子認識材料を作製することが可能となる。

さらに上記の結果をふまえ、簡便な刺激応答性材料の開発を目指して DNA 固定化ポリマーをグラフトポリマーに持つ分子認識ゲート膜を作製する。そして膜のグラフトポリマーの系でもリニアポリマーと同様に DNA の状態の変化で形態を制御し、膜細孔の開閉挙動を起こせることを観察する。また分子認識ゲート膜において DNA アプタマーをセンサー部位とした分子認識を行い、汎用性の高い特異的なセンサー材料のコンセプトを実証する。

第 1 章 図表

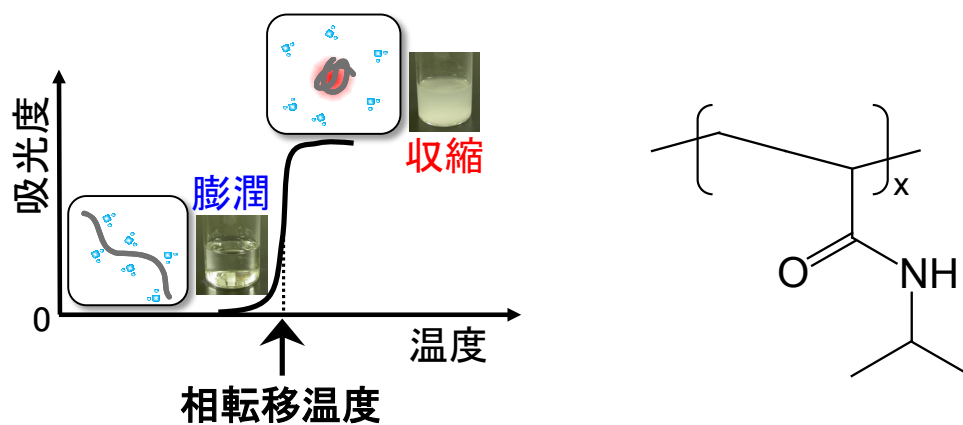


Figure 1.1 Coil-globule phase transition of thermoresponsive polymer and chemical structure of poly(*N*-isopropylacrylamide).

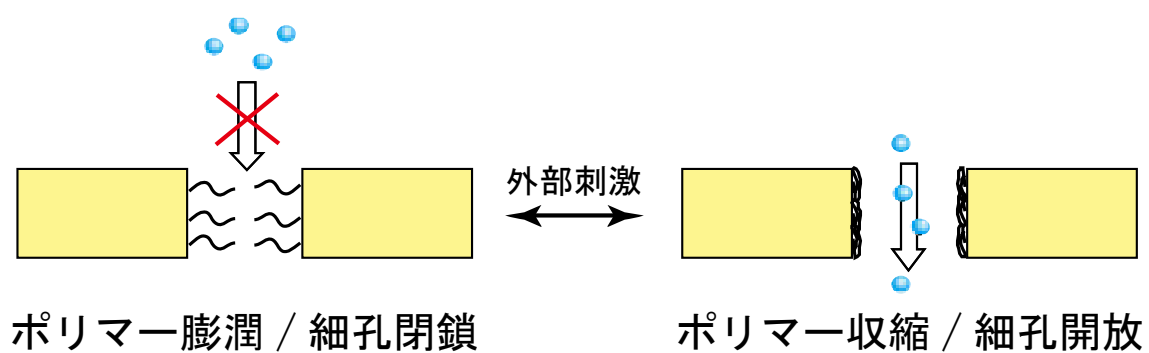


Figure 1.2 Schematic illustration of molecular recognition gating membrane.

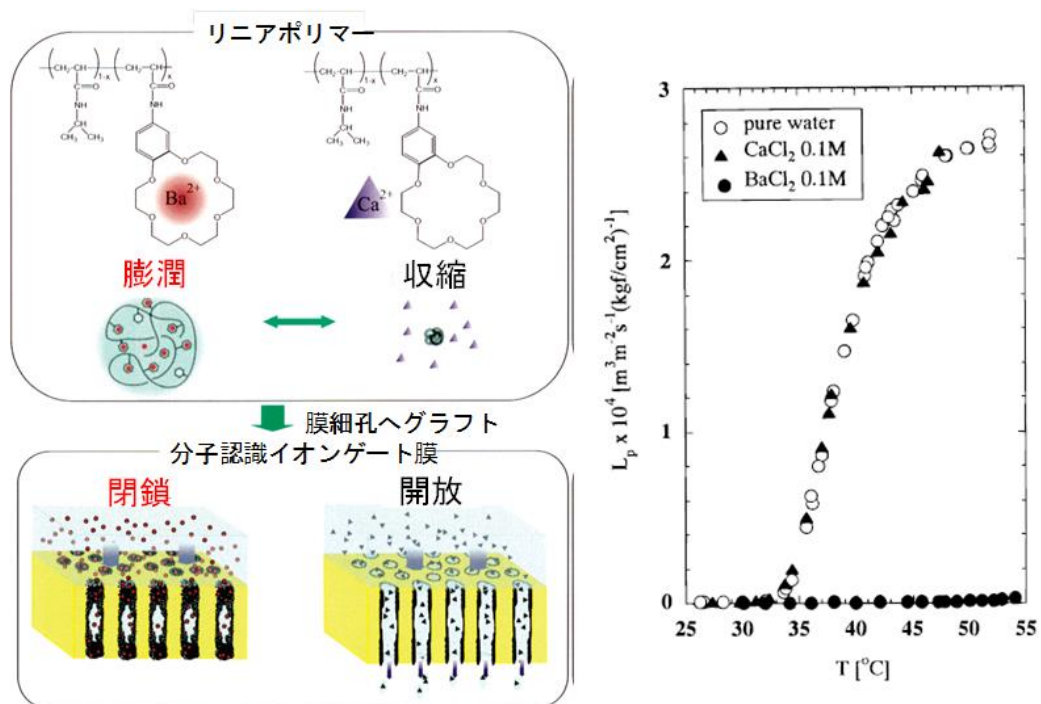


Figure 1.3 Illustration describing molecular recognition ion gating membrane: pores opening and closing caused by grafted polymer swelling and shrinking; and data of permeability of the membrane pores by the presence of  $Ba^{2+}$ . [33,35]

## 第 1 章 引用文献

- [1] T. Miyata, N. Asami and T. Uragami, *Nature* **1999**, *399*, 766-769.
- [2] P. D. Thornton, R. J. Mart and R. V. Ulijn, *Advanced Materials* **2007**, *19*, 1252-+.
- [3] K. Mosbach, *Trends in Biochemical Sciences* **1994**, *19*, 9-14.
- [4] K. Haupt and K. Mosbach, *Chemical Reviews* **2000**, *100*, 2495-2504.
- [5] M. Nakahata, Y. Takashima, H. Yamaguchi and A. Harada, *Nature Communications* **2011**, *2*.
- [6] T. Kakuta, Y. Takashima, M. Nakahata, M. Otsubo, H. Yamaguchi and A. Harada, *Advanced Materials* **2013**, *25*, 2849-2853.
- [7] H. G. Schild, *Progress in Polymer Science* **1992**, *17*, 163-249.
- [8] M. Heskins and J. E. Guillet, *Journal of macromolecular science. Pt. A, Chemistry* **1968**, *2*, 1441-1455.
- [9] M. Irie, Y. Misumi and T. Tanaka, *Polymer* **1993**, *34*, 4531-4535.
- [10] T. Yamaguchi, T. Ito, T. Sato, T. Shinbo and S. Nakao, *Journal of The American Chemical Society* **1999**, *121*, 4078-4079.
- [11] T. Ito, T. Hioki, T. Yamaguchi, T. Shinbo, S. Nakao and S. Kimura, *Journal of The American Chemical Society* **2002**, *124*, 7840-7846.
- [12] T. Ito, Y. Sato, T. Yamaguchi and S. Nakao, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3407-3414.
- [13] T. Ito and T. Yamaguchi, *Journal of The American Chemical Society* **2004**, *126*, 6202-6203.
- [14] T. Ito and T. Yamaguchi, *Angewandte Chemie-International Edition* **2006**, *45*, 5630-5633.
- [15] T. Hermann and D. J. Patal, *Science* **2000**, *287*, 820-825.
- [16] J. A. Subirana and M. Soler-Lopez, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **2003**, *32*, 27-45.
- [17] H. Ihmels and D. Otto, Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. In *Supramolecular Dye Chemistry*, Wurthner, F., Ed. Springer-Verlag Berlin: Berlin, 2005; Vol. 258, pp 161-204.
- [18] M. Rosa, R. Dias, M. D. Miguel and B. Lindman, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2164-2171.
- [19] J. H. Yang, K. S. Song, S. Kuga and H. Kawarada, *Japanese Journal of Applied Physics Part 2-Letters & Express Letters* **2006**, *45*, L1114-L1117.
- [20] S. Kuga, J. H. Yang, H. Takahashi, K. Hiirama, T. Iwasaki and H. Kawarada, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13251-13263.

- [21] J. Wang and A. J. Bard, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 2207-2212.
- [22] G. S. Manning, *Quarterly Reviews of Biophysics* **1978**, *11*, 179-246.
- [23] S. B. Smith, Y. J. Cui and C. Bustamante, *Science* **1996**, *271*, 795-799.
- [24] B. Tinland, A. Pluen, J. Sturm and G. Weill, *Macromolecules* **1997**, *30*, 5763-5765.
- [25] C. Bustamante, Z. Bryant and S. B. Smith, *Nature* **2003**, *421*, 423-427.
- [26] D. C. Lin, B. Yurke and N. A. Langrana, *Journal of Materials Research* **2005**, *20*, 1456-1464.
- [27] 宮川伸, 藤原将寿 and 中村義一, *蛋白質 核酸 酵素* **2006**, *51*, 2521-2535.
- [28] 中村義一, *RNA と創薬*, メディカルドゥ, 大阪, **2006**, p. 34.
- [29] M. Blank, t. Weinschenk, M. priemer and h. Schluesener, *The Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, 16464-16468.
- [30] J. A. Cruz-Aguado and G. Penner, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 10456-10461.
- [31] T. S. Romig, C. Bell and D. W. Drolet, *Journal of Chromatography B* **1999**, *731*, 275-284.
- [32] J. H. Lee, M. D. Canny, A. De Erkenez, D. Krilleke, Y. S. Ng, D. T. Shima, A. Pardi and F. Jucker, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 18902-18907.
- [33] A. A. Moshfeghi and C. A. Puliafito, *Expert Opinion on Investigational Drugs* **2005**, *14*, 671-682.
- [34] Y. Teng, A. C. Girvan, L. K. Casson, W. M. Pierce, N. Qian, S. D. Thomas and P. J. Bates, *Cancer Research* **2007**, *67*, 10491-10500.
- [35] S. Soundararajan, W. W. Chen, E. K. Spicer, N. Courtenay-Luck and D. J. Fernandes, *Cancer Research* **2008**, *68*, 2358-2365.
- [36] Y. Xiao, A. A. Lubin, A. J. Heeger and K. W. Plaxco, *Angewandte Chemie-International Edition* **2005**, *44*, 5456-5459.
- [37] N. Hamaguchi, A. Ellington and M. Stanton, *Analytical Biochemistry* **2001**, *294*, 126-131.
- [38] E. Baldrich, A. Restrepo and C. K. O'Sullivan, *Analytical Chemistry* **2004**, *76*, 7053-7063.
- [39] D. Umeno, T. Mori and M. Maeda, *Chemical Communications* **1998**, 1433-1434.
- [40] T. Mori and M. Maeda, *Polymer Journal* **2001**, *33*, 830-833.
- [41] T. Mori, D. Umeno and M. Maeda, *Biotechnology and Bioengineering* **2001**, *72*, 261-268.
- [42] N. Yang, Z. Ye, F. Li and R. Mahato, *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 213-221.
- [43] S. Averick, E. Paredes, W. W. Li, K. Matyjaszewski and S. R. Das, *Bioconjugate*

- Chemistry* **2011**, *22*, 2030-2037.
- [44] H. Takemoto, K. Miyata, T. Ishii, S. Hattori, S. Osawa, N. Nishiyama and K. Kataoka, *Bioconjugate Chemistry* **2012**, *23*, 1503-1506.
- [45] L. Wang, J. Kristensen and D. E. Ruffer, *Bioconjugate Chemistry* **1998**, *9*, 749-757.
- [46] M. Oishi, T. Hayama, Y. Akiyama, S. Takae, A. Harada, Y. Yamasaki, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki and K. Kataoka, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2449-2454.
- [47] S. Nagahara and T. Matsuda, *Polymer Gels and Networks* **1996**, *4*, 111-127.
- [48] H. Yang, H. Liu, H. Kang and W. Tan, *Journal of The American Chemical Society* **2008**, *130*, 6320-6321.
- [49] K. Ding, F. E. Alemendaroglu, M. Boersch, R. Berger and A. Herrmann, *Angewandte Chemie-International Edition* **2007**, *46*, 1172-1175.
- [50] M. P. Chien, A. M. Rush, M. P. Thompson and N. C. Gianneschi, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5076-5080.
- [51] T. Mori and M. Maeda, *Polymer Journal* **2002**, *34*, 624-628.
- [52] T. Mori and M. Maeda, *Langmuir* **2004**, *20*, 313-319.
- [53] M. Maeda, *Polymer Journal* **2006**, *38*, 1099-1104.
- [54] K. Isoda, N. Kanayama, D. Miyamoto, T. Takarada and M. Maeda, *Reactive & Functional Polymers* **2011**, *71*, 367-371.
- [55] W. Y. Ooi, M. Fujita, P. J. Pan, H. Y. Tang, K. Sudesh, K. Ito, N. Kanayama, T. Takarada and M. Maeda, *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, *374*, 315-320.
- [56] P. J. Pan, M. Fujita, W. Y. Ooi, K. Sudesh, T. Takarada, A. Goto and M. Maeda, *Langmuir* **2012**, *28*, 14347-14356.
- [57] E. J. Clayfield and E. C. Lumb, *Journal of Colloid and Interface Science* **1966**, *22*, 269-284.
- [58] N. Kanayama, T. Takarada and M. Maeda, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 2077-2079.

## 第2章 DNA 固定化ポリマーの荷電支配の凝集現象

### 2.1 緒言

本研究では分子認識による DNA の状態変化を用いてポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAM) の形態を制御し、新規な分子認識ゲート膜を開発する。研究対象である DNA 固定化 PNIPAM に関して、これまでに DNA 鎖の自由度による PNIPAM の凝集挙動制御が Maeda らにより報告されている。その既往の研究では、1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM に比べ 2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM が激しく凝集することが観察され<sup>[1-5]</sup>、このメカニズムとして、2 本鎖 DNA が 1 本鎖 DNA に比べ DNA 鎖の取りうるコンフォメーションが制限されており自由度が低いため凝集を抑制する反発力が弱く凝集すると考えられている。一方、本研究室の既往の研究で、クラウンエーテルをレセプターに持つ PNIPAM の凝集がイオンの捕捉により抑制されることが見られた<sup>[6-7]</sup>。このことから、DNA 固定化 PNIPAM でもポリマーの持つ荷電により凝集挙動が変化する可能性が考えられる。DNA はリン酸基に由来する負電荷を持ち、1 本鎖 DNA から 2 本鎖 DNA に変換されることでリン酸基は増加する。この負電荷の増加分により静電反発力が変化し PNIPAM の凝集に影響する可能性がある。

本章では、DNA の荷電により DNA 固定化ポリマーの凝集現象を制御することを目的とし、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の持つ負電荷量の違いによる静電反発力の大小で凝集を制御することを目指す。まず PNIPAM に 1 本鎖 DNA をペンダントに固定し、1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM を合成する。DNA の固定化法としては、DNA 末端のチオール (SH 基) と共重合 NIPAM の持つピリジルジスルフィドとの反応を用いる。ピリジルジスルフィドを用いることで、水溶液中で室温で短時間に生体分子とポリマーの結合を作ることができる<sup>[8]</sup>。次に相補的 DNA の添加で 2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM を作製し、凝集挙動を観察する。さらに観察された凝集現象が DNA の持つ荷電の違いによって誘起されることを証明する。

### 2.2 実験

#### 2.2.1 DNA 固定化ポリマーの作製

DNA 固定化ポリマーの作製は Figure 2.1 のスキームで行った。まずピリジルジスルフィ

ドを持つチオール活性化モノマーである *N*[2-(2-pyridyl disulfide)ethyl]acrylamide (PDSAm) を合成した。2,2'-dipyridyle disulfide と 2-mercaptoethylammonium chloride の反応で 2-(2-pyridyl disulfide)ethyl ammonium chloride (PDSACl) を得た。次に PDSACl と塩化アクリロイルの反応により PDSAm を得た。

次に合成した PDSAm をフリーラジカル法で共重合し poly(NIPAM-co-AAm-co-PDSAm) を合成した。NIPAM と PDSAm のみの重合では生成したポリマーの水溶性が低くポリマーの凝集の測定に支障があるため、アクリルアミド (AAm) も共重合して水溶性を上昇させた。

次に末端にチオールを持つ 1 本鎖 DNA をポリマーに固定した。DNA としては 11 塩基のものを用いた。ゲル濾過カラムと脱塩カラムにより DNA 固定化 PNIPAM を精製した。NIPAM モノマーユニットあたりの固定した DNA 鎖の本数を表す「DNA 固定率」を、精製後のポリマーを再溶解させた溶液の 260 nm の吸光度を測定して求めた。

### 2.2.2 DNA 固定化ポリマーの凝集の観察

1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM に相補的な DNA を添加することで 2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM (dsDNA-PNIPAM) を作製した。相補的 DNA として、11 塩基のものと 42 塩基のもの 2 種類を使用した。また塩基配列が 2 本鎖 DNA を形成できない mismatches のものを使用した場合も同様に測定を行った。測定したサンプル 4 種の DNA の塩基配列を Figure 2.2 にまとめた。

### 2.2.3 DNA の荷電の凝集に対する効果の証明

DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象のメカニズムの解明のため、IR により PNIPAM の相転移に伴うポリマー鎖からの脱水和を測定し、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の違いを評価した。PNIPAM は膨潤状態から収縮状態に変化すると isopropyl 基のピークの低波数シフトを起こすことが知られている。このシフトを観察することで 1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM と 2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM の収縮挙動の違いを観察できる。

また、DNA の持つ荷電が PNIPAM の凝集挙動を制御していることを証明するため、溶液中の塩濃度を上げて測定を行う。そして溶液中の塩として 1 価の Na<sup>+</sup> および K<sup>+</sup> に加え 2 価でより静電遮蔽の効果の高い Ca<sup>2+</sup> も使用する。

## 2.3 結果及び考察

### 2.3.1 DNA 固定化ポリマーの作製

NMR 測定と UV-vis 測定により、PDSACl, PDSAm, poly(NIPAM-co-AAm-co-PDSAm) の合成を確認した。DNA 固定化反応後に得られた UV-vis スペクトルでは、副生成物の吸収が見られ、反応の進行が示唆された。またゲルシフトアッセイでは、DNA をポリマーに固定することで分子量が増加しゲル移動度が減少したことが観察された。以上の結果から、ポリマーへの DNA の固定を確認した。

### 2.3.2 DNA 固定化ポリマーの凝集の観察

ポリマーに固定されている DNA が 1 本鎖の場合と 2 本鎖を形成している場合で凝集を比較した結果を Figure 2.3 に示す。1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM および mismatch DNA を 1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM に添加したサンプルでは、温度上昇によって吸光度が増加した。つまりポリマーは凝集した。一方 2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM の場合は吸光度の増加が小さく、PNIPAM の凝集が抑制されることが観察された。また添加した相補的 DNA の塩基数で比べると、11 塩基のものより 42 塩基のものがより凝集を抑制した。

以上のように本研究では、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換により PNIPAM の凝集挙動が変化することを観察した。

### 2.3.3 DNA の荷電の凝集に対する効果の証明

続いて、上述した DNA 固定化 PNIPAM の凝集挙動のメカニズムの解明のため行った IR 測定の結果、1 本鎖 DNA-PNIPAM、(11-11) 2 本鎖 DNA-PNIPAM、(11-42) 2 本鎖 DNA-PNIPAM の 3 つのサンプルは全て同様に温度上昇により脱水和が起こっていることが明らかとなった。このことから、DNA が 1 本鎖であっても 2 本鎖であってもポリマーは同様に収縮状態になり、DNA の変換による凝集挙動の違いの要因はポリマーの脱水和の違いではないことが判明した。

次に高塩濃度下での測定と塩の種類を変更して凝集を観察した結果、長い DNA の場合により高い塩濃度でないと凝集が起こらないこと、また 2 価のカチオンではより低塩濃度で凝集が起こることが判明した。以上の結果から、PNIPAM の凝集は DNA の荷電量が大きく影響し、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換による PNIPAM の凝集挙動の変化には DNA の持つ荷電量の増減が要因であると示された。

以上の実験によって明らかとなった DNA 固定化 PNIPAM の荷電支配の凝集現象のメカ

ニズムを Figure 2.4 に示した。1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM は DNA の持つ荷電が少ないため、温度上昇によるポリマーの凝集を DNA の静電反発では抑制できず凝集する。一方、2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM は DNA の持つ荷電量が大きく、DNA 間の強い静電反発によりポリマーの凝集を抑制する。このように、本研究では DNA 固定化 PNIPAM の荷電支配の凝集現象を発見した。

### 2.4 結言

本章では、DNA の荷電により DNA 固定化ポリマーの凝集現象を制御することを目的とし、DNA 固定化 PNIPAM を合成し、凝集挙動の観察と荷電が凝集現象を支配していることの証明を行った。本章により以下の結論を得た。

- (1) DNA 固定化 PNIPAM を合成した。
- (2) DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換により PNIPAM の凝集挙動が変化することを観察し、1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM に比べ、2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM はより凝集が抑制された。
- (3) DNA の塩基数が大きいほど、より DNA 固定化 PNIPAM の凝集は抑制された。
- (4) DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象は DNA の持つ荷電の静電反発により制御されていることが証明された。
- (5) 既往の研究で報告された自由度支配の凝集現象とは異なる凝集現象を発見した。

第 2 章 図表

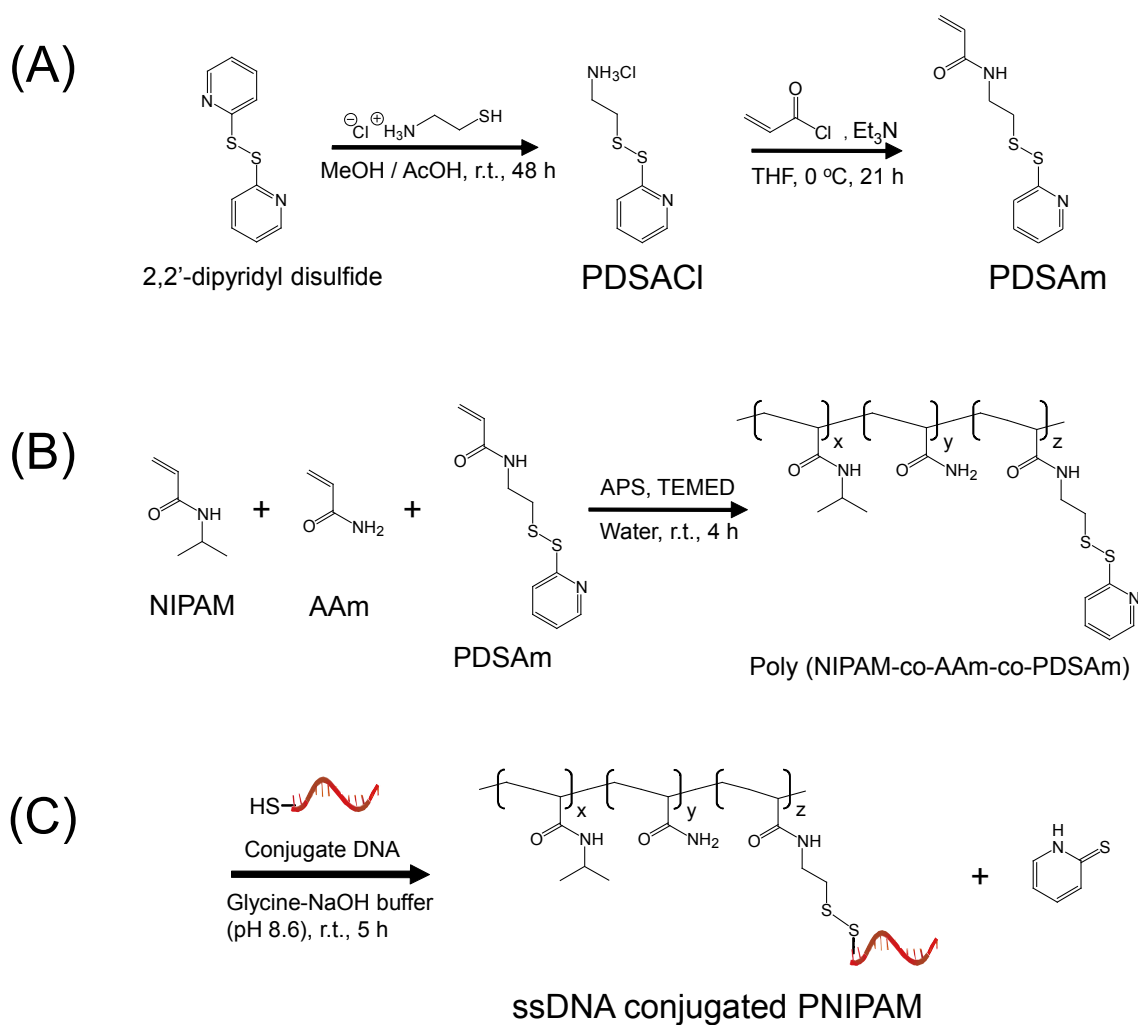


Figure 2.1 Synthetic scheme for (A) PDSAm, (B) poly(NIPAM-co-AAm-co-PDSAm) and (C) ssDNA-PNIPAM.

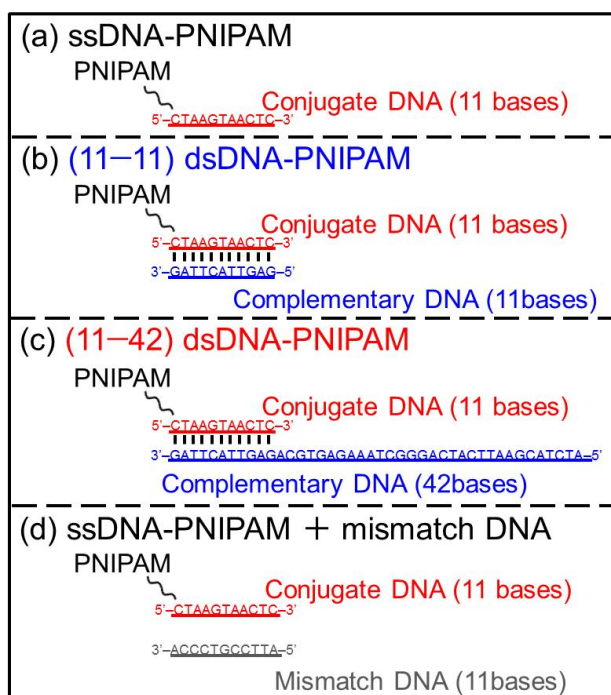


Figure 2.2 Illustration of the characterized DNA-PNIPAM: (A) ssDNA-PNIPAM, (B) (11-11) dsDNA-PNIPAM, (C) (11-42) dsDNA-PNIPAM, (D) ssDNA-PNIPAM + mismatch DNA.

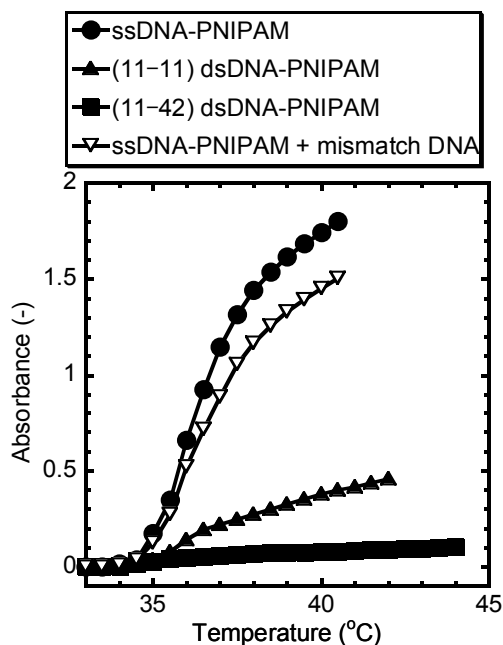


Figure 2.3 Absorbance change of the ssDNA-PNIPAM, the (11-11) and (11-42) dsDNA-PNIPAM and the ssDNA-PNIPAM mixed with mismatch DNA as a function of temperature. Polymer concentration: 0.1 w/v%, DNA fraction: 0.014 mol%, Na<sup>+</sup> concentration: 100 mM.

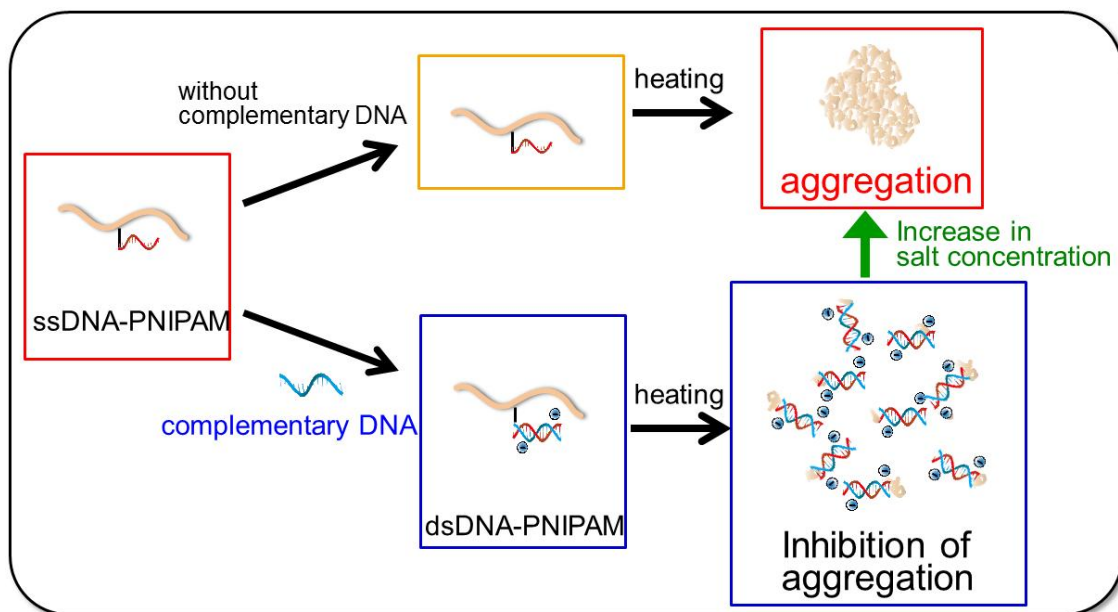


Figure 2.4 The proposed mechanism of the aggregation of DNA-PNIPAM controlled by charges of DNA.

第2章 引用文献

- [1] T. Mori and M. Maeda, *Polymer Journal* **2002**, *34*, 624-628.
- [2] M. Maeda, *Polymer Journal* **2006**, *38*, 1099-1104.
- [3] K. Isoda, N. Kanayama, D. Miyamoto, T. Takarada and M. Maeda, *Reactive & Functional Polymers* **2011**, *71*, 367-371.
- [4] W. Y. Ooi, M. Fujita, P. J. Pan, H. Y. Tang, K. Sudesh, K. Ito, N. Kanayama, T. Takarada and M. Maeda, *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, *374*, 315-320.
- [5] P. J. Pan, M. Fujita, W. Y. Ooi, K. Sudesh, T. Takarada, A. Goto and M. Maeda, *Langmuir* **2012**, *28*, 14347-14356.
- [6] T. Yamaguchi, T. Ito, T. Sato, T. Shinbo and S. Nakao, *Journal of The American Chemical Society* **1999**, *121*, 4078-4079.
- [7] T. Ito, T. Hioki, T. Yamaguchi, T. Shinbo, S. Nakao and S. Kimura, *Journal of The American Chemical Society* **2002**, *124*, 7840-7846.
- [8] M. H. Stenzel, *Acs Macro Letters* **2013**, *2*, 14-18.

## 第3章 DNA 固定化ポリマーの2つの凝集現象の解明と系統的整理

### 3.1 緒言

第2章ではDNA固定化ポリマーの荷電支配の凝集現象を発現させることに成功した。荷電支配の凝集現象は、1本鎖DNAの場合にポリマーが凝集する。しかし、既往の研究で観察されたDNAの自由度支配の凝集現象<sup>[1-5]</sup>では、2本鎖DNAのときにポリマーは凝集する。こちらの凝集現象は、DNAのエントロピー反発が凝集を制御している。1本鎖DNAは取りうるコンフォメーションが多く、分子鎖の自由度が高い。つまりエントロピーが高い。この1本鎖DNAが凝集した場合、DNA鎖が自由にコンフォメーションを取れなくなり、コンフォメーションが制限されエントロピーが低下するので不利である。そのため凝集に対する反発力が発生し、これはエントロピー反発 (**Entropic repulsion**) と呼ばれる<sup>[6-7]</sup>。これら2つの真逆の凝集現象の発現は何によって決定されているのか。もしこれら2つの凝集現象を制御することができ任意の現象を選択的に発現させることが可能になれば、DNAとポリマーを用いた複合化材料に関して、目的の材料に適した応答システムを持つものを設計することが可能になる。言い換えれば、1本鎖DNAで凝集するシステムに適した材料、例えば特定の塩基配列のDNAを捕捉することで膜の細孔が閉じ浸透圧を発生させる材料、および2本鎖DNAで凝集するシステムに適した材料、例えば特定の塩基配列のDNAを捕捉することでマイクロカプセルから薬剤を放出する材料などを目的に応じて作製できる。

本章では、DNAの荷電支配の凝集現象と自由度支配の凝集現象を決定している要因を明らかにし、またDNAの静電反発とエントロピー反発の制御により2つの凝集現象を切り替えることを試みる。具体的な方法としては、溶液中の塩濃度とPNIPAMに固定されたDNAの量 (DNA固定率) によって現象を切り替える。溶液中の塩は溶質の荷電を遮蔽することで静電的な分子間力に大きく影響する。またDNA固定率はPNIPAMの凝集に大きく影響することが報告されている<sup>[8]</sup>。これらの系統的な調査により、DNA固定化ポリマーの凝集現象を解明する。

## 3.2 実験

### 3.2.1 凝集現象の俯瞰

まずDNA固定化PNIPAMを作製した。ポリマーに固定するDNAは第2章と同様の配列の11塩基のものを用い、11塩基の相補的DNAを用いて第2章と同様の(11-11)<sub>2</sub>本鎖DNA固定化PNIPAMを作製した。DNA固定率は、DNA固定化反応の際に加えるDNA-SHの量を変えることで制御した。

次にDNA固定化PNIPAMの凝集の観察を行った。DNA固定率は0.015-0.57 mol%のものを使用し、溶液中の塩濃度は100-1000 mMとし、バッファーとして10 mM Tris-HCl (pH 7.4)を用いた。溶液の温度を上げながら分光光度計で吸光度を観測した。

### 3.2.2 DNAの自由度の凝集に対する効果の証明

ここでは、DNAの自由度がポリマーの凝集をコントロールしていることを証明するため、末端ミスマッチの2本鎖DNAを用いる。末端ミスマッチ2本鎖DNAは末端が塩基対を形成しておらず、「Fraying motion」と呼ばれるDNA鎖のブラウン運動を起こしており<sup>[9-12]</sup>コンフォメーションのエントロピーは大きい。そのため末端ミスマッチの存在により凝集は抑制されると期待される。まず末端ミスマッチの2本鎖DNAを持つDNA固定化ポリマーを作製し、凝集を観察した。

## 3.3 結果及び考察

### 3.3.1 凝集現象の俯瞰

まず荷電支配の現象と自由度支配の現象を並べたものをFigure 3.1に示す。Figure 3.1 Aは荷電支配であり、荷電の少ない1本鎖DNAに比べ、2本鎖の場合にポリマーの凝集がより抑制された。こちらの現象は塩濃度100 mM、DNA固定率0.015 mol%の条件で観察された。一方Figure 3.1 Bは自由度支配であり、分子のコンフォメーションがより制限されている2本鎖DNAに比べ、取りうるコンフォメーションの多い1本鎖DNAの場合にポリマーの凝集がより抑制された。こちらの現象は塩濃度700 mM、DNA固定率0.27 mol%の条件で観察された。

荷電支配の領域でDNA固定率を振って観察を行った結果、低いDNA固定率では1本鎖DNA固定化PNIPAMに比べ2本鎖DNA固定化PNIPAMでは凝集が抑制された。しかし

DNA固定率の増加により1本鎖DNA/2本鎖DNAの差が小さくなりどちらも凝集しなくなった。DNA固定率が低い場合、2本鎖DNAが1本鎖DNAよりも荷電が多く静電反発が強いため<sup>[13-15]</sup>、PNIPAMの凝集がより抑制されたと考えられる。しかし、DNA固定率が増加するとPNIPAM鎖あたりのDNAによる反発が増大し、1本鎖DNAであっても凝集抑制のための十分な静電反発力を持つようになり、1本鎖DNAと2本鎖DNAの差が見られなくなったと考えられる。

自由度支配の領域でDNA固定率を振って観察を行った結果、高DNA固定率では1本鎖DNAの場合でPNIPAMの凝集を抑制できている。自由度支配の凝集現象は、DNAのエントロピー反発が凝集を制御する。1本鎖DNAはランダムコイルであり分子鎖の自由度が高いためエントロピー反発が強い。一方、2本鎖DNAは2本のDNA鎖が結合しており、分子鎖の取りうるコンフォメーションが元々制限されているため凝集によるエントロピーの低下が小さく、2本鎖DNA同士のエントロピー反発は弱い。低塩濃度領域では静電反発が凝集を制御するため、DNAの自由度の差の効果は見えない。しかし高塩濃度下では塩による静電遮蔽効果でDNAの荷電の差が効かなくなり、代わって自由度の差が効くようになったと考えられる。しかしDNA固定率を低下させると、1本鎖DNAでも凝集を抑制することができなくなり、1本鎖DNAと2本鎖DNAのどちらも凝集した。

以上のように本研究では、DNAの1本鎖/2本鎖の変換によるPNIPAMの凝集挙動の変化について、荷電支配の現象と自由度支配の現象の両方を発現させることに成功した。

#### 3.3.2 DNAの自由度の凝集に対する効果の証明

末端ミスマッチの2本鎖DNA固定化PNIPAMの凝集を観察した結果、1本鎖DNAの場合と完全マッチ2本鎖DNAの場合と異なり、凝集が抑制された状態が続き、急激な凝集が観察されなかった。これはDNAの末端が塩基対を形成しておらず「Fraying motion」により取りうるコンフォメーションが多い状態であるため、2本鎖DNAを形成しても自由度は高く、また1本鎖DNAと比べて荷電も増加しているためにエントロピー反発と静電反発の両方で凝集が抑制されていると考えられる。以上の結果から、PNIPAMの凝集にはDNAの自由度が影響し、DNAの1本鎖/2本鎖の変換によるDNA鎖の自由度の増減がPNIPAMの凝集挙動を制御することが示された。

#### 3.3.3 ポジショニングマップの作成

DNA固定化PNIPAMの凝集現象を概観するため、様々な塩濃度とDNA固定率の条件下で測定を行い、Figure 3.2のポジショニングマップを作成した。このポジショニングマップはそれぞれの塩濃度とDNA固定率の条件でDNA固定化PNIPAMがどのような凝集現

象を示すかを表している。Figure 3.2 A は本研究での結果から作成したポジショニングマップである。また Figure 3.2 B は本研究での結果に既往の DNA-PNIPAM の研究における観察の結果<sup>[1, 4, 16-17]</sup>を加えて作成したポジショニングマップである。既往の研究と本研究では DNA の塩基数が異なるため、縦軸は DNA 固定率を PNIPAM モノマーユニットあたりの DNA の塩基対数で表している。このポジショニングマップより、DNA-PNIPAM には異なる4つの凝集現象があると判明した。(1)低塩濃度、高 DNA 固定率(白色の領域)では、1本鎖 DNA と 2本鎖 DNA の場合のどちらも DNA 固定化 PNIPAM は凝集が抑制され分散する。(2)高塩濃度、低 DNA 固定率(黒色の領域)では、1本鎖 DNA と 2本鎖 DNA の場合のどちらも DNA 固定化 PNIPAM は凝集する。そしてこれら2つの領域の間の狭い領域で DNA の1本鎖/2本鎖の変換による PNIPAM の凝集挙動変化が起こる。(3)低塩濃度、低 DNA 固定率(青色の領域)では、1本鎖 DNA の場合に DNA 固定化 PNIPAM は凝集する。この現象は DNA の荷電が凝集を司る。(4)高塩濃度、高 DNA 固定率(赤色の領域)では、2本鎖 DNA の場合に DNA 固定化 PNIPAM は凝集する。この現象は DNA の鎖の自由度が凝集を司る。

以上のように、塩濃度と DNA 固定率によって凝集現象は切り替え可能であり、1本鎖 DNA の場合に凝集する現象と 2本鎖 DNA の場合に凝集する現象を任意に発現させることに成功した。本研究と既往の研究で同一のマップ上にプロットできたことから、DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象を系統的に説明することができたとと言える。

Figure 3.3 には上述した DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象の機構をイラストで示した。

#### 3.4 結言

本章では、DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象の完全な解明を目的とし、2つの真逆の凝集現象を決定する要因を明らかにすること、また2つの凝集現象を切り替えることを試みた。本章により以下の結論を得た。

- (1) DNA 固定化 PNIPAM は4つの凝集現象を持ち、溶液中の塩濃度と DNA 固定率によってコントロール可能であることを明らかにした。荷電支配の凝集現象と自由度支配の凝集現象は溶液中の塩濃度と DNA 固定率によってコントロール可能であることを明らかにした。
- (2) DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象は、DNA 間に働く反発力(静電反発/エントロピー反発)のシフトで切り替わることが判明した。
- (3) 本研究により、1本鎖 DNA の場合に凝集する現象と 2本鎖 DNA の場合に凝集する現象を選択的に発現させ凝集の方向を任意に制御できるようになり、DNA とポリマーを融合させた材料の開発のための重要な設計指針が得られた。

第3章 図表

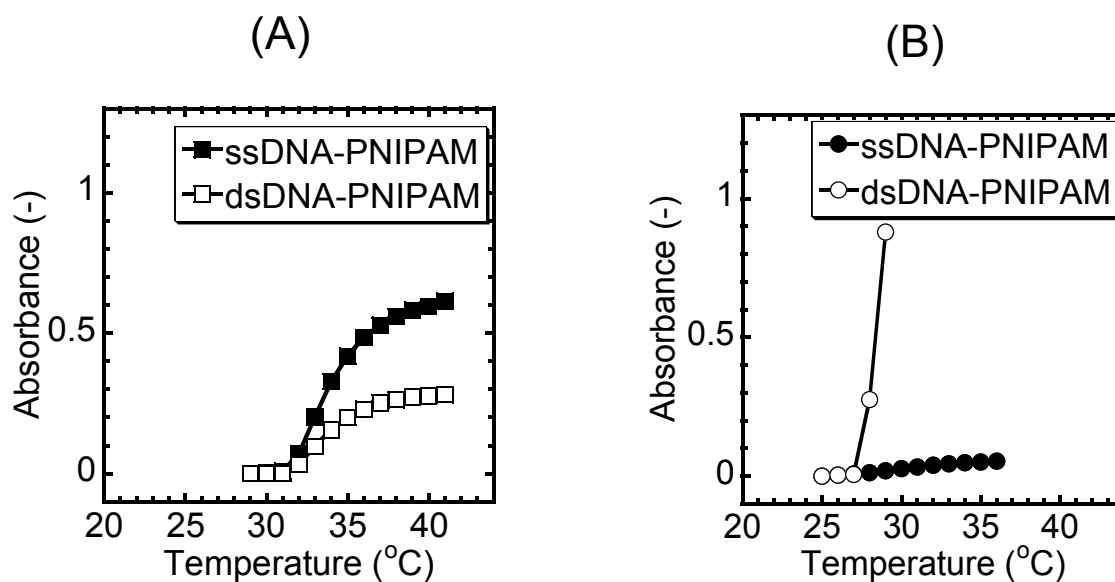


Figure 3.1 The aggregation phenomena driven by two different control factors: (A) electrostatic effect at 100 mM of Na<sup>+</sup> and 0.015 mol% of DNA fraction; (B) conformational-entropic effect at 700 mM of Na<sup>+</sup> and 0.27 mol% of DNA fraction.

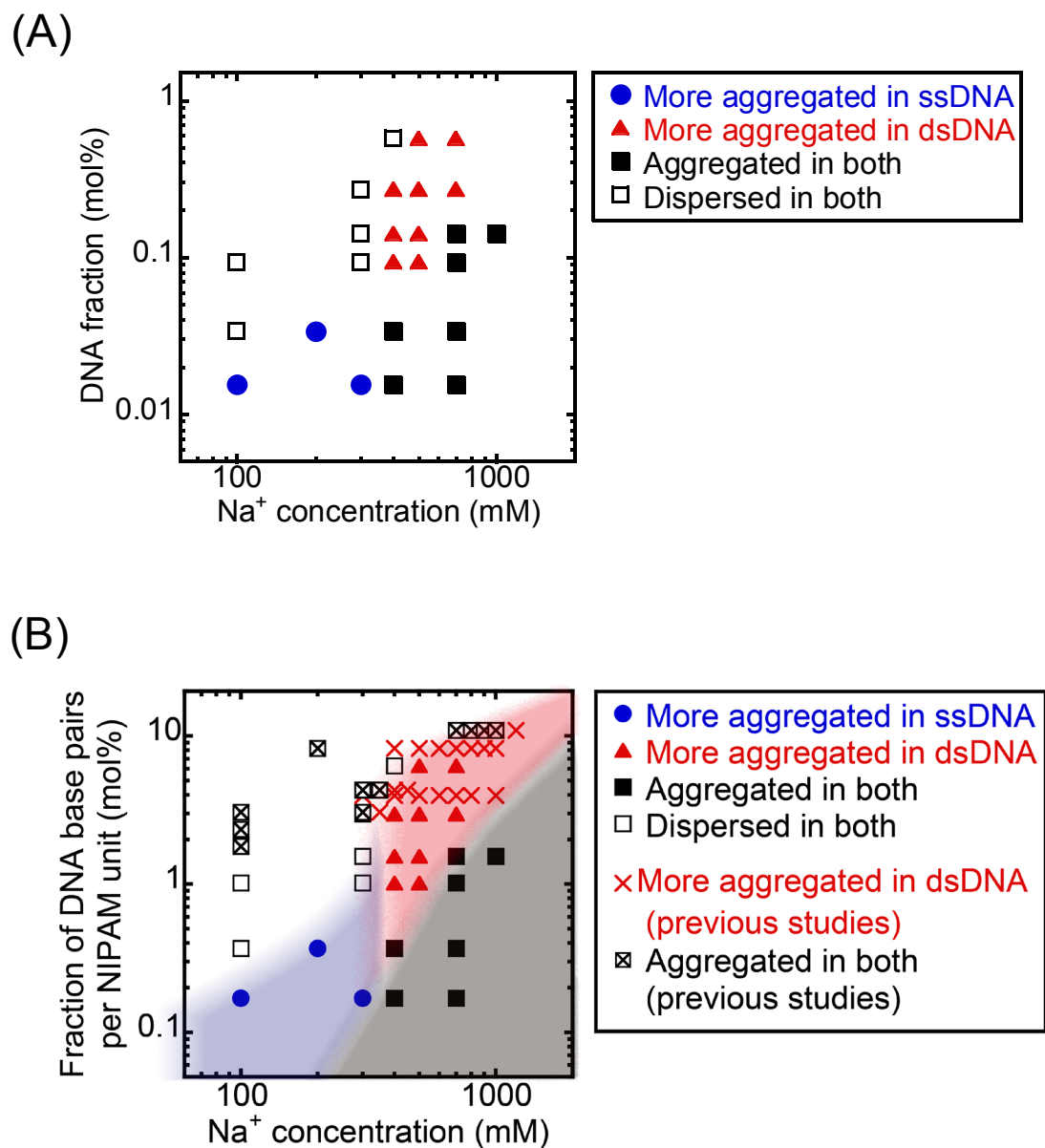


Figure 3.2 The positioning map prepared on the basis of the results of (A) this study and (B) containing previous studies.<sup>[1, 4, 16-17]</sup>

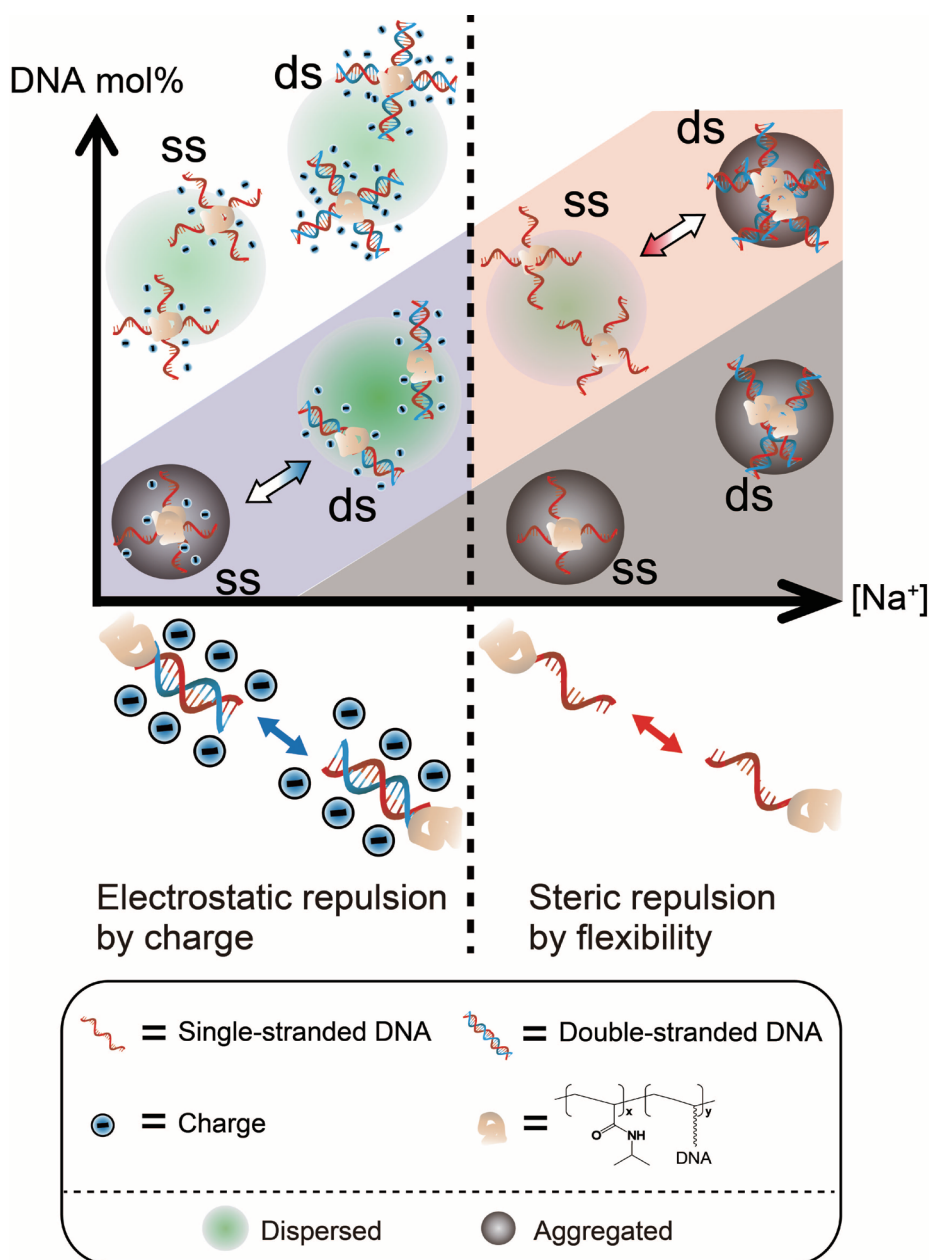


Figure 3.3 The proposed mechanism and behavior of the DNA-PNIPAM under each of the conditions (as described in the text), the colors of the areas correspond to those in Figure 3.2 B.

第3章 引用文献

- [1] T. Mori and M. Maeda, *Polymer Journal* **2002**, *34*, 624-628.
- [2] M. Maeda, *Polymer Journal* **2006**, *38*, 1099-1104.
- [3] K. Isoda, N. Kanayama, D. Miyamoto, T. Takarada and M. Maeda, *Reactive & Functional Polymers* **2011**, *71*, 367-371.
- [4] W. Y. Ooi, M. Fujita, P. J. Pan, H. Y. Tang, K. Sudesh, K. Ito, N. Kanayama, T. Takarada and M. Maeda, *Journal of Colloid and Interface Science* **2012**, *374*, 315-320.
- [5] P. J. Pan, M. Fujita, W. Y. Ooi, K. Sudesh, T. Takarada, A. Goto and M. Maeda, *Langmuir* **2012**, *28*, 14347-14356.
- [6] E. J. Clayfield and E. C. Lumb, *Journal of Colloid and Interface Science* **1966**, *22*, 269-284.
- [7] E. J. Clayfield and E. C. Lumb, *Macromolecules* **1968**, *1*, 133-138.
- [8] T. Mori and M. Maeda, *Langmuir* **2004**, *20*, 313-319.
- [9] J. L. Leroy, M. Kochoyan, T. Huynhdinh and M. Gueron, *Journal of Molecular Biology* **1988**, *200*, 223-238.
- [10] D. Andreatta, S. Sen, J. L. P. Lustres, S. A. Kovalenko, N. P. Ernsting, C. J. Murphy, R. S. Coleman and M. A. Berg, *Journal of The American Chemical Society* **2006**, *128*, 6885-6892.
- [11] N. Kanayama, T. Takarada and M. Maeda, *Chemical Communications* **2011**, *47*, 2077-2079.
- [12] N. Kanayama, T. Takarada, M. Fujita and M. Maeda, *Chemistry-a European Journal* **2013**, *19*, 10794-10798.
- [13] J. Wang and A. J. Bard, *Analytical Chemistry* **2001**, *73*, 2207-2212.
- [14] M. Rosa, R. Dias, M. D. Miguel and B. Lindman, *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 2164-2171.
- [15] S. Kuga, J. H. Yang, H. Takahashi, K. Hiirama, T. Iwasaki and H. Kawarada, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13251-13263.
- [16] Z. Tang, T. Takarada, Y. Sato and M. Maeda, *Chemistry Letters* **2004**, *33*, 1602-1603.
- [17] D. Miyamoto, Z. Tang, T. Takarada and M. Maeda, *Chemical Communication* **2007**, 4743-4745.

## 第4章 DNA 固定化ポリマーの凝集現象を利用した標的分子認識

### 4.1 緒言

第 2 章と第 3 章で DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象の解明を行い、DNA の荷電と自由度により支配される PNIPAM の凝集現象を任意に制御することに成功した。本研究では DNA 固定化 PNIPAM を用いた分子認識ゲート膜を開発することを目的としており、まずリニアポリマーの系で分子認識による DNA の状態の変化が PNIPAM の凝集挙動に影響を与えることを示す必要がある。

DNA に結合することで DNA の荷電状態と自由度に変化をもたらす物質として、芳香族色素化合物が挙げられる。インターカレーターとも呼ばれる色素化合物は、2 本鎖 DNA の塩基対間に挿入される性質があり、DNA との結合は核酸塩基とのスタッキング相互作用で安定化される<sup>[1]</sup>。色素化合物との結合による DNA の変化として、次の 2 つの効果が可能性として考えられる。(1)色素化合物の結合により 2 本鎖 DNA がカールして縮まる (curled and crumpling) ことが観察されている<sup>[2]</sup>。このことから色素化合物との結合により DNA 鎖のコンフォメーションが制限され、エントロピー反発が低下し DNA 固定化 PNIPAM はより凝集する。(2)色素化合物の持つ正電荷が DNA の負電荷を打ち消すことで DNA の静電反発が低下し、DNA 固定化 PNIPAM はより凝集する。以上の(1)・(2)の機構により色素化合物を PNIPAM の凝集の変化で検出できると考えられる。

さらに DNA アプタマーを用いることで極めて多様な分子の検出を行うことも可能である。DNA アプタマーは各標的分子に対して高い特異性を持つため、PNIPAM に固定する DNA に DNA アプタマーを用いることで、標的分子と DNA アプタマーの結合で DNA の状態を変化させ PNIPAM の凝集挙動に影響を与えることが可能と考えられる。

本章では、DNA の分子認識により DNA 固定化 PNIPAM の凝集挙動を変化させ、凝集の観察により分子の検出を行うことを目的とする。そのために下記の 2 通りの戦略を試みる。1 つは、分子認識により DNA の状態を変化させ固定化 PNIPAM の凝集現象をシフトさせる。つまり荷電支配の凝集現象と自由度支配の凝集現象を片方からもう片方へ分子認識で切り替える。そのためには、第 3 章の Figure 3.2 で示したポジショニングマップの凝集現象の境界付近で実験を行うのが適当だと考えられる。凝集現象の境界付近の条件では僅かな DNA の状態変化によって凝集現象がシフトし得ると期待される。DNA に認識させる分子としては色素化合物の 3,6-diaminoacridine hydrochloride (DAA)、ethidium

bromide (EtBr)、9-hydroxy-4-methoxyacridine (HMA) の3種類を用いる(化学構造を Figure 4.1 に示す)。もう1つの戦略は、分子認識により2本鎖DNAを解離させDNAの荷電量の減少でポリマーの凝集より激しくさせる。そのためには、ポジショニングマップの荷電支配の領域で実験を行う必要がある。そして分子認識プローブとしてDNAアプタマーを用い、その標的分子として、研究例が多く報告されているタンパク質のトロンビン(thrombin)を用いる。DNAアプタマーを用いた実験では、PNIPAMに固定したDNAとDNAアプタマーで2本鎖DNAを作製し、トロンビンの添加により2本鎖DNAが解離するシステムにする。当システムの概略を Figure 4.2 に示す。当システムがうまく機能するためにはトロンビンとDNAアプタマーの結合で2本鎖DNAが解離することが必要であるため、まず適した塩基対の位置と長さを持つ2本鎖DNAの配列を設計する。そして2本鎖DNA固定化PNIPAMにトロンビンを加えて凝集を観察する。

### 4.2 実験

#### 4.2.1 色素化合物の認識による凝集現象の切り替え

まずDNA固定化ポリマーを合成し、相補的DNAを用いて2本鎖DNA固定化PNIPAMを作製した。そしてDAAを加えDNAと結合させ、凝集を観察した。また2本鎖DNAに色素化合物が挿入されることで凝集に変化が生じていることを示すため、1本鎖DNA固定化PNIPAMにDAAを加えて同様に測定を行った。

次にDAAに比べてDNAとの結合親和性の低いHMAを用いて凝集の観察を行った。HMAの場合はDNAへの結合量が少ないためDAAの場合とは同じ量を添加しても凝集挙動が異なることが考えられる。そのために、まずDAAとHMAのDNAへの親和性の違いを評価した。評価には蛍光偏光法(Fluorescence anisotropy)を用いた。蛍光偏光法は偏光された励起光を試料に当て発せられた蛍光の偏光度を測定することで、蛍光分子の運動性の変化、言い換えると他の分子との結合形成をモニターすることができる。

続いて、DAA, EtBr, HMAの3種類をそれぞれ加えて2本鎖DNA固定化PNIPAMの凝集を観察した。

#### 4.2.2 DNAアプタマーを用いた標的分子認識による凝集の変化

トロンビン結合アプタマー(TBA)は Figure 4.3 のような特別な2次構造を形成しトロンビンと結合する<sup>[3-4]</sup>。TBAの2次構造の下の方に位置する「G四重鎖」とよばれる構造の部分がトロンビンと結合し(Figure 4.3)、上方の4塩基対の二重鎖が形成されることでG四重

鎖の構造が安定化されている。

まず適した塩基対長さを推測するため、2本鎖DNAの結合エネルギーの計算をNearest-Neighborモデルを用いて行い、適した塩基対長さの見通しを付けた。トロンビンの添加で2本鎖DNAが解離するためには、2本鎖DNA形成のエネルギーがトロンビンとTBAの結合のエネルギーより値が小さい必要がある。ただ、2本鎖DNA結合のエネルギーが弱すぎると温度を上げた際にトロンビンを加えずとも解離してしまう恐れがある。

次に、塩基対長さと塩基対形成位置をより詳しく検討するため、「アプタマービーコン」(Aptamer beacon)<sup>15)</sup>による測定を行った。アプタマービーコンは、標的分子の認識による2本鎖DNAの解離を蛍光によって検知する手法である。初期状態では蛍光標識したDNAアプタマーと消光剤標識した相補的DNAが結合し、観察される蛍光強度は低い。ここに標的分子を添加すると、DNAアプタマーが標的分子に結合し2本鎖DNAが解離する。それにより消光剤が蛍光色素から離れるため蛍光強度が増大する。よって発生した蛍光の強度が増加すれば2本鎖DNAが解離したと言える。今回、いくつかの塩基配列の2本鎖DNAを用いた。蛍光色素が末端に結合したTBA「F-TBA」と、消光剤が末端に結合した相補鎖「Q-cDNA」から成る2本鎖DNAを形成させ、トロンビン溶液と混合し、任意のトロンビン濃度になるように調製した。蛍光光度計内にセットし時間測定を行い、安定した蛍光強度を記録した。

次にTBAを含む2本鎖DNA固定化PNIPAMにトロンビンを添加して凝集を観察した。使用したポリマーは、TBAの相補鎖がPNIPAMに固定され、それとTBAが2本鎖DNAを形成している。まず低温で2本鎖DNA固定化PNIPAMとトロンビンを混合し、昇温させながら凝集を観察した。次に定温条件で測定を行った。光度計の温度を高温に設定し、空のセルに2本鎖DNA固定化PNIPAM溶液を入れた。3分後にセルの封を取りトロンビン溶液を加えた。そのまま攪拌させながら時間測定を行った。次に、トロンビン添加によるPNIPAMの凝集はTBAとトロンビンの組み合わせに特異的なものであることを証明するため、TBAではない同じ塩基数のDNAを用いて実験を行った。この場合、DNAはG四重鎖を形成せず、トロンビンと特異的に強く結合することはないと期待される。

### 4.3 結果及び考察

#### 4.3.1 色素化合物の認識による凝集現象の切り替え

2本鎖DNA固定化PNIPAMにDAAを加えて凝集挙動を観察した結果、高温域で吸光度が急激に増加し激しく凝集した。またDAAの添加量を増加させると、より低温で凝集が激しくなった。一方DAAを加えない場合、吸光度の増加は緩やかで、その凝集は高温領域まで抑制された状態であった。これは2本鎖DNAの静電反発が凝集を抑えている。1本鎖

DNA固定化PNIPAMにDAAを加えた場合、DAAの添加による凝集挙動の変化は2本鎖DNA固定化PNIPAMに比べて非常に小さかった。このことから、DAAの添加による凝集挙動の変化はDAAが2本鎖DNAに結合することで誘起されることが確認された。

DAAに比べ荷電の少ないHMAとDAAの親和性の違いを蛍光偏光法で評価した結果、HMAのDNAへの結合親和性がより低いことが示された。そしてDAA、DAAと同等の結合親和性を持つEtBr<sup>[6]</sup>、HMAを添加して2本鎖DNA固定化PNIPAMの凝集挙動を観察した結果、DAAとEtBrではPNIPAMの凝集は同じ挙動を示した。一方HMAの場合は凝集が激しくなる温度が他2つの色素化合物よりも高かった。

観察された凝集挙動の変化は、凝集現象のシフトに由来すると考えられ、エンタルピー駆動の静電反発<sup>[7-8]</sup>が制御する現象からエントロピー反発が制御する現象に切り替わったと言える。これには2つの要因が考えられる。1つは、2本鎖DNAの塩基対間への色素化合物の挿入により2本鎖DNAのコンフォメーションのエントロピーが低下し、1本鎖DNAと2本鎖DNAのエントロピーの差が拡大したことである。もう一つは、色素化合物の正電荷が2本鎖DNAの負電荷を打ち消し、1本鎖DNAと2本鎖DNAの荷電の差が減少したことである。また温度が上昇するとエントロピーの寄与が増大する<sup>[9-10]</sup>ため、低温では自由度支配の凝集現象へのシフトは起こらなくても高温では起こり得る。そしてDNAに結合する色素化合物の量が増加するほど効果的に駆動力のシフトが起こり、多量の色素化合物を加えた場合や親和性の高い色素化合物を用いた場合に、より低温で凝集現象がエンタルピー駆動のものからエントロピー駆動のものへ切り替わったと考えられる。

以上のように、色素化合物と2本鎖DNAの結合でDNA固定化PNIPAMの凝集現象が切り替わり凝集挙動を大きく変えることに成功した。

### 4.3.2 DNAアプタマーを用いた標的分子認識による凝集の変化

アプタマービーコンの結果、いくつかの種類配列から、トロンビンの添加で2本鎖DNAが最も解離する配列を選択することができた。

温度を昇温させながら測定を行ったところ、トロンビンを加えた場合、吸光度の増加が見られPNIPAMがより凝集した。これは添加したトロンビンとDNAアプタマーが結合すると同時に2本鎖DNAが解離し1本鎖DNAとなりDNAの持つ荷電が減少したためだと考えられる。また、トロンビンの代わりにコントロールとしてタンパク質であるトランスフェリンを加えた結合、吸光度の上昇は見られず、今回の系のトロンビンに対する特異性が確認された。

次に定温での測定を行ったところ、トロンビンを加えたサンプルでは、吸光度が増加した。一方、トランスフェリンを加えた場合、吸光度は増加しなかった。この結果から、温度を高温で一定にしてもトロンビンの添加により2本鎖DNAが解離することが確認された。温度一定で行えることは簡便性の観点から有用である。

TBA でない DNA を用いた結果、トロンビンの有無による吸光度の違いは見られず、その後の吸光度はトロンビンを添加した場合でも低い状態であった。この結果は TBA を用いた場合とは大きく異なっており、吸光度が増加するのはトロンビンに特異的な TBA を用いた場合のみだと判明した。

以上の結果から、TBA の特異的なトロンビンとの結合により 2 本鎖 DNA を解離させ PNIPAM の凝集を変化させることに成功した。DNA アプタマーをセンサー部位として用いることで極めて広範な種類の分子を標的分子として検出可能であるため、当 DNA 固定化 PNIPAM は医療などへの応用のために重要な、目的分子に対する汎用性を得ることができたとと言える。

### 4.4 結言

本章では、分子認識により DNA 固定化 PNIPAM の凝集挙動の変化を起こすことで標的分子の検出を行うことを目的とした。認識させる分子としては DNA に強く結合する色素化合物と DNA アプタマーの標的分子であるタンパク質のトロンビンを選択した。本章により以下の結論を得た。

- (1) 少量の色素化合物の添加により DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象を荷電支配のものから自由度支配のものに切り替えることに成功した。
- (2) 色素化合物の結合により 2 本鎖 DNA のコンフォメーションのエントロピーが低下すること、もしくは色素化合物の正電荷が DNA の負電荷を打ち消すことが要因となり PNIPAM の凝集を制御する駆動力が切り替わった。
- (3) DNA アプタマー (TBA) から成る 2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM にトロンビンを加えたところ、TBA のトロンビン認識に伴い 2 本鎖 DNA が解離することで 1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM に変換され、PNIPAM の凝集はより激しくなった。
- (4) 以上より、本研究で開発した DNA 結合 PNIPAM は分子認識により凝集挙動が変化し、目的分子の検出を行うセンサー材料として応用が可能であることが実証された。

第 4 章 図表

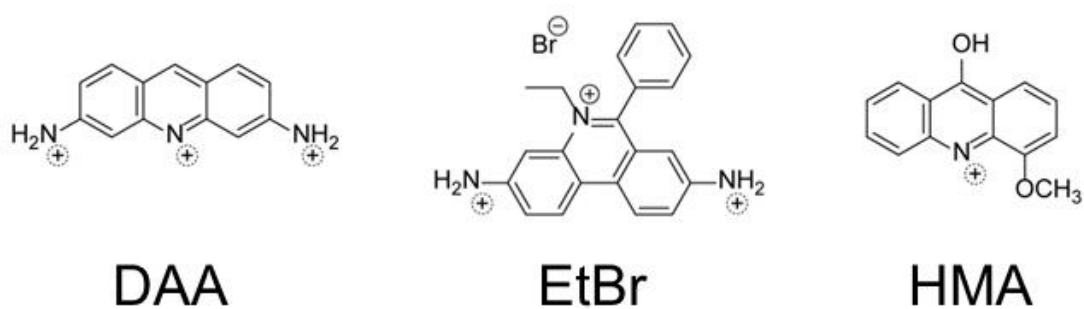


Figure 4.1 Chemical structures of DAA, EtBr and HMA.

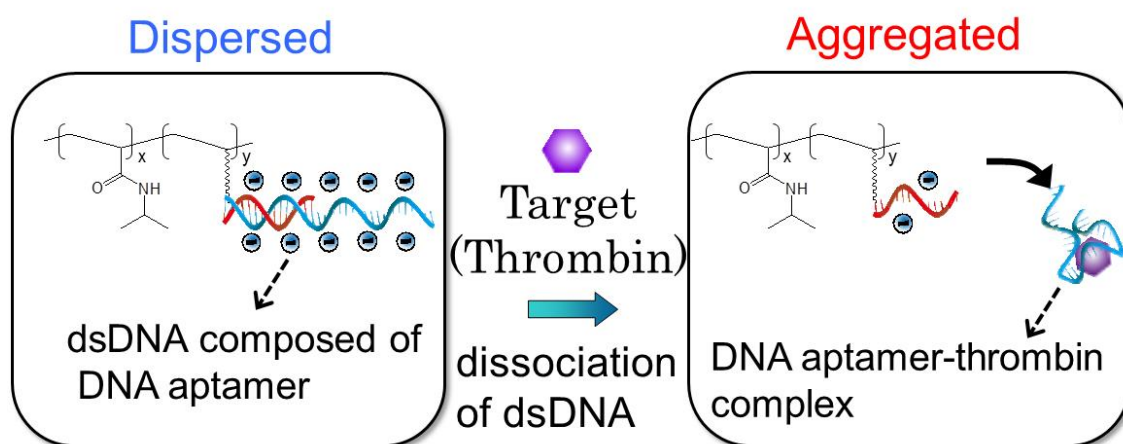


Figure 4.2 Schematic representation of molecular recognition system using DNA-PNIPAM and DNA aptamer.

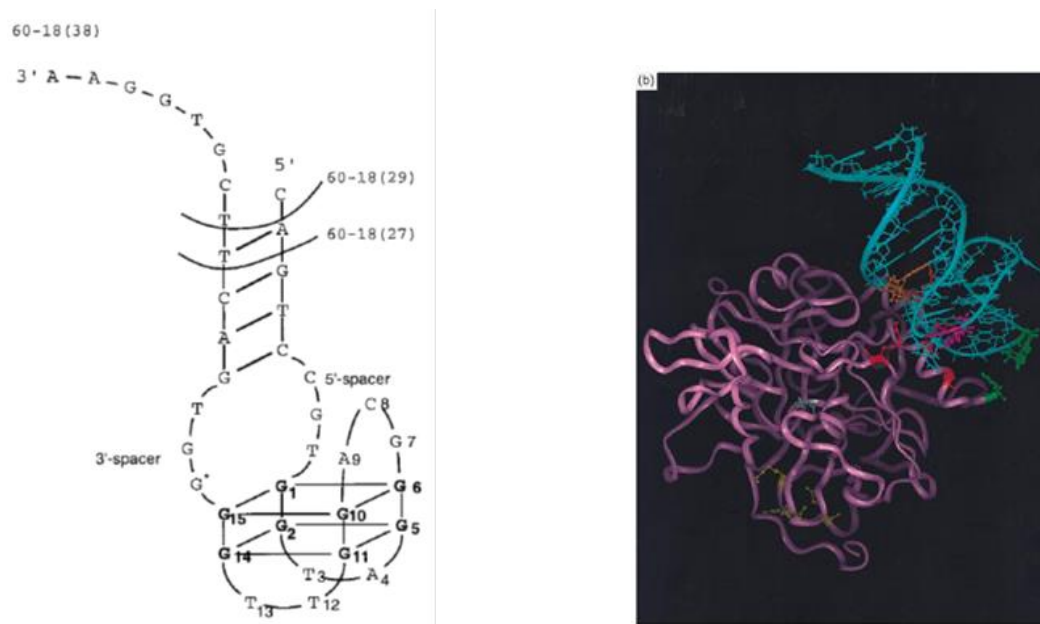


Figure 4.3 Secondary structure of TBA (Left) and crystalline structure of TBA-thrombin complex (Right).<sup>[8]</sup>

第 4 章 引用文献

- [1] H. Ihmels and D. Otto, Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA general principles and recent developments. In *Supramolecular Dye Chemistry*, Wurthner, F., Ed. Springer-Verlag Berlin: Berlin, 2005; Vol. 258, pp 161-204.
- [2] A. Mihailovic, L. Vladescu, M. McCauley, E. Ly, M. C. Williams, E. M. Spain and M. E. Nunez, *Langmuir* **2006**, *22*, 4699-4709.
- [3] D. M. Tasset, M. F. Kubik and W. Steiner, *Journal of Molecular Biology* **1997**, *272*, 688-698.
- [4] D. P. Zhang, M. L. Lu and H. L. Wang, *Journal of The American Chemical Society* **2011**, *133*, 9188-9191.
- [5] B. Hall, S. Cater, M. Levy and A. D. Ellington, *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, *103*, 1049-1059.
- [6] X. G. Qu and J. B. Chaires, *Journal of The American Chemical Society* **2001**, *123*, 1-7.
- [7] M. D. Lad, V. M. Ledger, B. Briggs, R. J. Green and R. A. Frazier, *Langmuir* **2003**, *19*, 5098-5103.
- [8] S. L. Turgeon, M. Beaulieu, C. Schmitt and C. Sanchez, *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **2003**, *8*, 401-414.
- [9] H. J. Butt, M. Kappl, H. Mueller, R. Raiteri, W. Meyer and J. Ruhe, *Langmuir* **1999**, *15*, 2559-2565.
- [10] X. B. Wang, J. Yang and L. S. Wang, *Journal of Physical Chemistry A* **2008**, *112*, 172-175.

## 第5章 DNA 固定化ゲート膜の開発

### 5.1 緒言

第 4 章までで、リニアポリマーの系で DNA 固定化 PNIPAM の作製と凝集現象の解明および分子認識による DNA 固定化 PNIPAM の凝集挙動の制御に成功した。この成果を、刺激応答性材料としてより有用性の高い分子認識ゲート膜に展開させることが、次の目標となる。分子認識ゲート膜は固体材料であるため取扱いが容易で、微小な細孔内のポリマーの形態変化により膜の水透過性を制御するためわずかなポリマーの形態変化を検出することが可能である。またグラフトポリマーとして相転移挙動による膨潤/収縮を示す PNIPAM を用いることで、細孔の透過性の違いを大きく明確にできる。例えば、グラフトポリマーとしてアクリル酸を持つ pH 応答性透過膜では膜の透過性の差 4-10 倍であるが<sup>[1]</sup>、PNIPAM を用いた本研究グループのゲート膜は、100 倍の透過性の差を出している<sup>[2]</sup>。また膜の厚みがわずか 10  $\mu\text{m}$  オーダーの薄膜であるため、透過性の変化が迅速に起こる<sup>[3]</sup>。以上の利点を持つ分子認識ゲート膜は、バイオセンサー、ドラッグデリバリーシステムなどへの応用が可能な刺激応答性材料であると期待される。

分子認識ゲート膜の作製法として、プラズマグラフト重合により膜にポリマーをグラフトする方法が用いられる<sup>[4-9]</sup>。プラズマグラフト重合は、膜基材にプラズマを照射し基材表面にラジカルを発生させ、そこからラジカル重合にてポリマーを重合する方法である。プラズマグラフト重合の利点として、放射線重合などと異なり、基材の表面のみを改質し材料のバルクには影響を及ぼさない。そのため膜基材の性状、例えば機械的強度などを変えずにポリマーのグラフトが行える。

本章では、DNA 固定化 PNIPAM をグラフトポリマーに持つ分子認識ゲート膜を開発し、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換による膜の細孔の開閉挙動を評価する。膜基材へのポリマーのグラフトはプラズマグラフト重合を用い、リニアポリマーの系と同様のモノマーを用いてグラフトを行う。その際にグラフト実験の溶液中のモノマー濃度や反応温度の最適化を行う。次にグラフトポリマーに DNA を固定し、1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜を作製する。次いで 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜を作製し、1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜と 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の水透過性を比較し DNA の変換によるグラフトポリマーの形態制御を評価する。またリニアポリマーと同様、塩濃度と DNA 固定率を振って透過性の測定を行う。

## 5.2 実験

### 5.2.1 DNA固定化ゲート膜の作製

まずプラズマグラフト重合によりリニアポリマーの系と同様の NIPAM、AAm、PDSAm の 3 種のモノマーを膜にグラフトした。高密度ポリエチレン製基材をガラス瓶に入れ、アルゴンプラズマ照射と酸素暴露を行った。モノマー溶液をガラス瓶に入れ膜を浸し、所定温度で所定時間反応させ重合を行った。重合後の膜を洗浄し、真空乾燥機で膜を乾燥させ、重量を測定し細孔容積のうちどの程度ポリマーが詰まっているかを表す「細孔充填率」を算出した。

次に膜のグラフトポリマーに DNA を固定した。固定化反応はリニアポリマーの系と同様、ポリマー内のピリジルジスルフィドと DNA 末端のチオールとの反応で行う。重合後の膜に所定量の DNA を加え、温度を制御しながら振とうし DNA を固定した。反応終了後の DNA 溶液の UV-vis スペクトルを測定し、また DNA 染色剤で膜を染色することで DNA の固定を確認した。

### 5.2.2 膜細孔の開閉の評価

次に DNA 固定化ゲート膜の細孔の開閉を DNA が 1 本鎖の場合と 2 本鎖の場合で観察し、膜のグラフトポリマーの系においても DNA の荷電と自由度でポリマーの形態を制御可能か調査した。評価実験として、デッドエンド濾過法により一定流速で溶液が膜を透過する際の膜にかかる圧力を測定し、そこから膜の水透過性を算出した。膜の透過性が低ければ細孔が膨潤状態のグラフトポリマーにより閉鎖していることになり、透過性が高ければグラフトポリマーはより収縮して細孔は開放していると言える。本研究で用いた透過試験装置では、シリンジポンプによりシリンジから一定速度で押し出されたフィード溶液が膜を透過する時の膜の手前側にかかる圧力を測定できる仕組みになっている。実験では、作製した 1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜を用いて透過実験を行った。

次に 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜でも測定を行うため、まず 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の作製を行った。1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜をセットし、透過装置を組んだ。膜のグラフトポリマーに固定した DNA に相補的 DNA を含むフィード溶液を用いてシリンジポンプで膜に溶液を温度制御下で透過させた。膜を透過してきた溶液を回収し、UV-vis スペクトル測定を行った。作製した 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の透過実験を行った。

### 5.3 結果及び考察

#### 5.3.1 DNA固定化ゲート膜の作製

本研究でグラフトしたモノマーのうち PDSAm は、疎水性が強くプラズマグラフト重合で重合しにくい。そのためモノマー溶液中のモノマー濃度を高くする必要があると考えられる。モノマーを高濃度にすることで三元系でのグラフトに成功した。次に、透過実験に丁度良い充填率の膜を作製するために諸条件の最適化を行い、PDSAm 仕込み比、温度、重合時間の制御により、目標の充填率の膜を作製するための諸条件を明らかにした。

DNA を固定化反応後の DNA 溶液の UV-vis スペクトルでは、反応後の DNA 溶液には反応の副生成物の吸収が観測された。よって固定化反応の進行が確認された。また、DNA 染色剤を用いて膜のグラフトポリマーに固定した DNA を染色し、膜から発生する蛍光を観察したところ、末端チオール DNA を用いて作製した膜のみで染色剤由来の蛍光の発生が観察された。従って DNA が膜のグラフトポリマーに固定されたことが確認された。

#### 5.3.2 膜細孔の開閉の評価

DNA が 1 本鎖 DNA の場合と 2 本鎖 DNA の場合で膜の透過性を比較した。低 DNA 固定率の膜の結果、低塩濃度のフィード溶液を用いた場合、1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜に比べ 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜では細孔が開かず透過性が小さかった。しかし高塩濃度の場合、1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜と 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の違いはほとんどなく、どちらも細孔は高温で開放した。これは、低塩濃度では 2 本鎖 DNA の形成で DNA の荷電が増加し静電反発によりグラフトポリマーの収縮が抑制され細孔が開きにくくなったためと考えられ、高塩濃度では静電遮蔽で 2 本鎖 DNA 形成による荷電の増加が効かなかったことが理由だと考えられる。以上の結果より、膜のグラフトポリマーの系でも 1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA の荷電状態の違いによりポリマーの形態が変化することが判明し、それにより膜の透過性を制御することが可能であることが示された。DNA 固定化 PNIPAM をグラフトポリマーとしたゲート膜の概念図を Figure 5.1 に示す。

次に、自由度支配の現象による細孔の開閉を観察する目的で、DNA 固定率が高い膜において高塩濃度で透過実験を行ったところ、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA で透過性に差が見られなかった。つまり膜の系での実験では、DNA 鎖のエントロピーにより制御され 2 本鎖 DNA でより細孔が開く現象は観察できなかった。リニアポリマーの系では DNA の自由度支配の凝集現象の場合に 1 本鎖 DNA/2 本鎖 DNA の凝集の違いが大きいため、膜の系でも自由度支配の現象を使用することが望まれる。荷電支配の連続転移化と自由度支配の相転移温度のシフトという 2 つの現象を見せるゲート膜を作製できれば刺激応答性材料として

有用である。

#### 5.4 結言

本章では、DNA 固定化 PNIPAM をグラフトポリマーに持つゲート膜の開発を目的とし、プラズマグラフト重合による膜の作製と、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換による膜の細孔の開閉挙動の評価を行った。本章により以下の結論を得た。

- (1) NIPAM, AAm, PDSAm の 3 つのモノマーを共重合グラフトしたゲート膜を作製した。また、適切な充填率を持つ膜の作製のための実験条件を明らかにした。
- (2) 作製した膜のグラフトポリマーに DNA を固定し、DNA 固定化ゲート膜を作製した。
- (3) 透過実験により、1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜と 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の水透過性が異なることを観察し、リニアポリマーの系と同様に膜のグラフトポリマーの系でも DNA の荷電によりポリマーの形態を制御することが可能であることを示した。

第 5 章 図表

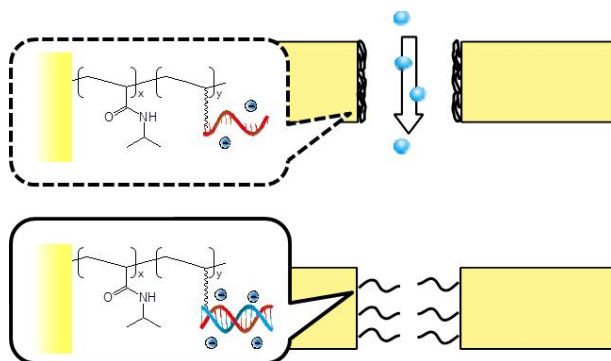


Figure 5.1 Schematic illustration of the gating membrane opening and closing its pores by DNA transformation of the grafted DNA-PNIPAM.

## 第 5 章 引用文献

- [1] M. S. Oak, T. Kobayashi, H. Y. Wang, T. Fukaya and N. Fujii, *Journal of Membrane Science* **1997**, *123*, 185-195.
- [2] T. Yamaguchi, T. Ito, T. Sato, T. Shinbo and S. Nakao, *Journal of The American Chemical Society* **1999**, *121*, 4078-4079.
- [3] T. Ito, T. Hioki, T. Yamaguchi, T. Shinbo, S. Nakao and S. Kimura, *Journal of The American Chemical Society* **2002**, *124*, 7840-7846.
- [4] T. Yamaguchi, S. Nakao and S. Kimura, *Macromolecules* **1991**, *24*, 5522-5527.
- [5] T. Yamaguchi, S. Nakao and S. Kimura, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1992**, *31*, 1914-1919.
- [6] T. Yamaguchi, S. Nakao and S. Kimura, *Industrial & Engineering Chemistry Research* **1993**, *32*, 848-853.
- [7] T. Yamaguchi, S. Yamahara, S. Nakao and S. J. Kimura, *Journal of Membrane Science* **1994**, *95*, 39-49.
- [8] T. Yamaguchi, S. I. Nakao and S. Kimura, *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry* **1996**, *34*, 1203-1208.
- [9] T. Yamaguchi, A. Tominaga, S. Nakao and S. Kimura, *Aiche Journal* **1996**, *42*, 892-895.

## 第6章 DNA 固定化ゲート膜の特異的分子認識特性

### 6.1 緒言

第 5 章で DNA 固定化ポリマーをグラフトポリマーに持つゲート膜の開発を行い、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換によりグラフトポリマーの膨潤/収縮挙動を起こすことで膜透過性の制御が可能であることを示した。既存の分子認識ゲート膜はイオン<sup>[1-2]</sup>、グルコース<sup>[3]</sup>、アビジン<sup>[4]</sup>など単一の分子しか認識できなかった。同じ材料システムを用いて多様な標的分子を特異的に検出可能であれば、センサー材料としてより有用である。

そこで、第 4 章でも用いた DNA アプタマーを DNA 固定化ゲート膜のセンサー部位として使用する。DNA アプタマーを用いることで、分子認識ゲート膜は広範な種類の分子の検出に適用可能な汎用性を獲得できる。

本章では DNA アプタマーをセンサー部位として持つ分子認識ゲート膜を用いて特異的タンパク質であるトロンビンを認識させ、膜の透過性の制御を行う。当システムの概略を Figure 6.1 に示す。膜細孔内のグラフトポリマーにはトロンビン結合アプタマー (TBA) に相補的な DNA が固定されており、TBA がハイブリダイゼーションして 2 本鎖 DNA を形成している。この段階ではポリマーに固定された DNA が多量の荷電を持つためポリマーは膨潤して細孔を塞いでおり、膜の透過性は低い。そこに標的分子であるトロンビンが添加されると、TBA がトロンビンと結合すると同時に 2 本鎖 DNA が解離する。それによってポリマーに固定された DNA は 1 本鎖となり荷電が減少するため、ポリマーは収縮し細孔は開放する。本章では上記のような DNA 固定化分子認識ゲート膜を用いた分子認識システムを実証する。

### 6.2 実験

#### 6.2.1 DNA アプタマー固定化ゲート膜の作製

まず 1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の作製を行い、次に膜内の固定 DNA と TBA をハイブリダイゼーションさせることで 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜を作製した。それから 1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜と TBA から成る 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の場合で透過実験を行

った。

### 6.2.2 標的分子の認識

標的タンパク質であるトロンビンをゲート膜に認識させ、トロンビンの有無による膜透過性変化を観察した。透過実験装置に膜をセットし、低温から高温に上げながら測定を行い、再び温度を下げ、再び昇温しながら透過性の測定を行った。

### 6.2.3 標的分子認識と 2 本鎖 DNA の再生による透過性の切り替え

ここでは、トロンビンによる 2 本鎖 DNA の解離と TBA の添加による 2 本鎖 DNA の再生を繰り返すことで膜透過性の連続的な切り替えが行えることを示す実験を行った。

## 6.3 結果及び考察

### 6.3.1 標的分子の認識

1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜と TBA から成る 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の場合で透過性を比較した結果、2 本鎖 DNA の場合に膜透過性はより低くなった。よってトロンビンの添加により TBA が 2 本鎖 DNA から解離しグラフトポリマーに固定された DNA が 1 本鎖となることで膜の透過性が上昇すると期待された。

2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜にトロンビンを加えると、膜透過性が上昇した。これは 2 本鎖 DNA を構成している TBA がトロンビンを認識し結合すると同時に 2 本鎖 DNA が解離し、グラフトした PNIPAM に固定される DNA の荷電が減少し静電反発が弱まり細孔内で PNIPAM がより収縮したためだと考えられる。

次に温度一定の条件でトロンビンの認識を行った。温度を変化させる必要がなく目的分子の検出が行えれば、より簡便でありセンサー材料として有用である。実験の結果、トロンビンを加えた場合に透過性が増加したことが観察された。

### 6.3.2 透過性の切り替え

次にトロンビンの認識と 2 本鎖 DNA の再生による膜透過性の連続的な切り替えを試みた。最初に TBA から成る 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜にバッファーのみを透過させた。次にト

ロンビンを含む溶液の透過により透過性が上昇した。続けて TBA を含む溶液を透過させ 2 本鎖 DNA を再生させた。その後バッファーのみを透過させると透過性が減少した。さらに再度トロンビンの透過により透過性が増加し、2 本鎖 DNA を再生させることで透過性が減少した。以上のようにトロンビンの認識と 2 本鎖 DNA の再生により透過性が増減した。この結果から、本研究で開発したゲート膜では、膜透過性の連続的な切り替えが行える可能性が示唆された。

### 6.4 結言

本章では、DNA アプタマー固定化分子認識ゲート膜を用いて標的タンパク質のトロンビンの認識を試みた。本章により以下の結論を得た。

- (1) トロンビンに特異的な DNA アプタマーを持つ 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜はトロンビンの添加により透過性が減少した。
- (2) トロンビンの認識は 10 分程度の短時間で行えた。
- (3) 本研究で開発した DNA 固定化分子認識ゲート膜では、膜透過性の連続的な切り替えが行える可能性がある。

第6章 図表

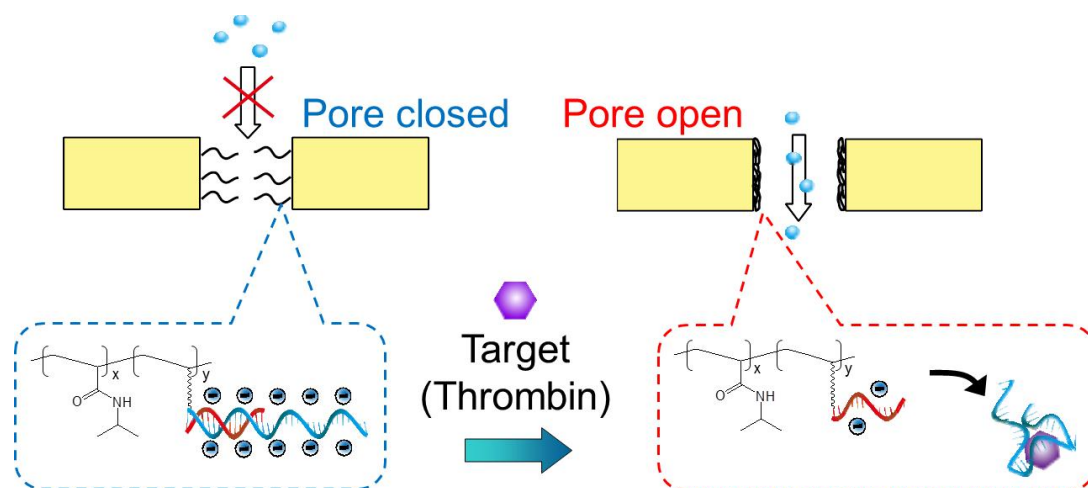


Figure 6.1 Schematic representation of molecular recognition gating membrane using DNA aptamer.

第 6 章 引用文献

- [1] T. Yamaguchi, T. Ito, T. Sato, T. Shinbo and S. Nakao, *Journal of The American Chemical Society* **1999**, *121*, 4078-4079.
- [2] T. Ito, T. Hioki, T. Yamaguchi, T. Shinbo, S. Nakao and S. Kimura, *Journal of The American Chemical Society* **2002**, *124*, 7840-7846.
- [3] K. Akamatsu and T. Yamaguchi, *Journal of Photopolymer Science and Technology* **2005**, *18*, 229-232.
- [4] H. Kuroki, T. Ito, H. Ohashi, T. Tamaki and T. Yamaguchi, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 9226-9229.

## 第7章 総括及び今後の展望

### 7.1 総括

本論文では、汎用性を持つ簡便な分子認識材料の開発を目指し、DNA をセンサー部位とし、感温性ポリマーをアクチュエーター部位とした複合化材料について研究を行った。DNA の荷電状態と自由度の変化により感温性ポリマーの形態を制御し、さらに DNA の分子認識により PNIPAM の凝集挙動を変化させることを試みた。そして簡便な刺激応答性材料への応用を目指し、DNA 固定化ポリマーを細孔内に持つ分子認識ゲート膜を作製し、分子認識特性を評価し、汎用性の高い特異的な刺激応答性材料のコンセプトの実証を試みた。

本研究により以下の結論が得られた。

第 1 章では、既存の刺激応答性ポリマーを整理し、解決すべき課題を抽出した。また DNA を分子として見た場合の外部刺激による DNA の状態変化を概説した。さらに DNA の特異な性質を利用したポリマーの形態制御に関する既往の研究を挙げ、DNA をセンサー部位としポリマーをアクチュエーター部位とした汎用性の高い分子認識材料のコンセプトを示した。

第 2 章では、DNA 固定化 PNIPAM を合成し、凝集挙動を観察した。その結果、1 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM に比べ、2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM はより凝集が抑制された。また DNA の塩基数が大きいほど DNA 固定化 PNIPAM の凝集が抑制されることが示された。分光学的調査により、1 本鎖 DNA の場合も 2 本鎖 DNA の場合もポリマー自体は昇温で脱水し疎水的になっており違いはないことが判明し、また塩濃度と塩の種類を替えて行った凝集の観察により、今回観察された DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象は DNA の持つ荷電に由来する静電反発により制御されていることが証明された。

第 3 章では、DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象の完全な解明を目的とし、DNA の荷電と自由度に支配される 2 つの真逆の凝集現象を決定する要因を明らかにすること、および 2 つの凝集現象を任意に切り替えることを試みた。その結果、DNA 固定化 PNIPAM は 4 つの凝集現象を持ち、荷電支配の凝集現象と自由度支配の凝集現象は溶液中の塩濃度と DNA

固定率によってコントロール可能であることを明らかにした。また、末端ミスマッチの 2 本鎖 DNA を用いたことで、DNA の自由度の増減に起因するエントロピー反発により PNIPAM の凝集が制御されていることが証明された。本章での成果により、1 本鎖 DNA の場合に凝集する現象と 2 本鎖 DNA の場合に凝集する現象の選択的な発現が可能になり、DNA とポリマーから成る複合化材料の開発のための重要な設計指針が得られた。

第4章では、第2章・第3章の成果を活用し、DNA の分子認識により DNA 固定化ポリマーの凝集挙動を変化させ、分子の検出を行うセンサー材料としてのコンセプトを示すことを目指した。その結果、少量の色素化合物の添加により DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象を荷電支配のものから自由度支配のものに切り替えることに成功した。また、トロンビン結合アプタマーから成る 2 本鎖 DNA を持つ 2 本鎖 DNA 固定化 PNIPAM に特異的標的分子であるトロンビンを加えたところ、トロンビン結合アプタマーがトロンビンを認識すると同時に 2 本鎖 DNA が解離し PNIPAM の凝集はより激しくなった。よって DNA 固定化 PNIPAM は分子認識により凝集挙動が変化する特性により、目的分子の検出を行うセンサーとして応用が可能であることが実証された。

第5章では、DNA 固定化ポリマーを多孔質膜の細孔内にグラフトし「分子認識ゲート膜」を作製し、DNA の 1 本鎖/2 本鎖の変換によりグラフトポリマーが膜の細孔の開閉を制御できることの実証を目指した。適切なポリマー重合条件と DNA 固定化条件の探索により、細孔内へのポリマーのグラフトおよびグラフトポリマーへの DNA の固定化に成功し、DNA 固定化ゲート膜を作製した。作製した膜の透過実験により、1 本鎖 DNA 固定化ゲート膜と 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜の水透過性が異なることを観察し、リニアポリマーとの系と同様に膜のグラフトポリマーの系でも DNA の荷電によりポリマーの形態を制御することが可能だと明らかにした。

第6章では、第5章で開発した DNA 固定化分子認識ゲート膜において特異的タンパク質の検出を行った。トロンビン結合アプタマーを持つ 2 本鎖 DNA 固定化ゲート膜はトロンビンの添加によりその透過性が減少しトロンビンの検出が行えた。さらに標的分子認識と 2 本鎖 DNA の再生を繰り返すことで連続的な透過性の切り替えが行える可能性が示唆された。以上のことから、汎用性の高い刺激応答性材料のコンセプトを実証した。

以上のように本論文では、DNA と感温性ポリマーの複合化材料において、DNA の状態変化に起因する DNA 固定化ポリマーの凝集現象の解明を行い、また標的分子との結合による DNA の状態変化に起因するポリマーの形態変化を用いて分子の検出が可能であることを示した。さらに、取扱いが簡便で有用な認識材料である分子認識ゲート膜に DNA 固定化ポリマーを展開し、標的分子のシグナルを膜の透過性に変換し検出できる材料を開発した。

本研究で開発した分子認識材料は、多様な分子と特異的に強く結合する性質を持つ DNA アプタマーを用いることで、あらゆる分子を特異的に認識することが可能であり、同じシステムで広範な検出対象に適用することができるため、刺激応答性材料として有用である。また分子認識ゲート膜は固体材料であるため持ち運びに適し、測定は膜の水透過性を観察する操作のみで、専門的知識が不要、迅速に操作が終わる、持ち運びに適するという利点を持つ。したがって将来的には医療分野、環境分野での簡易測定への応用が期待される材料である。

## 7.2 今後の展望

今後の展望として、本研究により得られた成果から、以下の提案を行う。

第6章では、開発した DNA 固定化ゲート膜において分子の検出が可能であることを示したが、これを応用したデバイスの実現に関して、現状では以下の問題点が残っている。膜の活性の持続時間・耐久性が不明であること、感度の検討がされていないこと、検体溶液中の夾雑物の影響が不明であること、などである。

高感度化はバイオセンサーにおいて重要であり、分子認識ゲート膜でもさらなる高感度化が求められる。感度の改善のためには、膜の構造設計の検討を行う必要がある。それについては下記の事項が挙げられる。(1)用いるポリマーの化学構造のより詳細な検討、例えば DNA とポリマーの間のスペーサー長さ、(2)細孔内ポリマーのグラフト密度・分子量、(3)DNA 固定率の最適化。また、(4)デバイスに応答信号を増幅するような仕組みを組み込むことが感度の上昇に有効である。

本研究では膜の細孔の開閉を透過装置を用いた透過性測定で評価した。もし細孔の開閉状態を色の変化を目で確認することで判断できれば、透過装置も不要になりさらなる簡便性が実現できる。本研究室の既往の研究で、ゲート膜の細孔の開閉を発色粒子の透過を目視することで視覚的に検出することに成功している<sup>[1-2]</sup>。ゲート膜としては、ビオチンが固定された PNIPAM をグラフトポリマーに持ち、タンパク質のアビジンを捕捉することで架橋が形成し細孔が閉鎖するものを用いている。発色粒子としては表面を PEG 修飾した金ナノ粒子を用いている。Figure 7.1 に示すように、アビジンが存在せず細孔が開放しているときは金ナノ粒子が細孔を透過し透過液は呈色するが、閉鎖しているときは金ナノ粒子が細孔を透過できず呈色しないことが観察された。このように発色粒子を用いる方法により目視で特異的分子の有無を判別でき、透過性測定装置を必要とせずフィルターホルダーとシリッジがあれば測定が行えるため、非常に簡便である。

今回は DNA アプタマーの分子認識による 2 本鎖 DNA の解離が、PNIPAM の凝集挙動に影響を与え分子の検出を可能にした。一方で、2 本鎖 DNA を用いずに 1 本の DNA 鎖のみでも凝集挙動を制御できる可能性も考えられる。Figure 7.2 にその概念図を示す。PNIPAM に DNA アプタマーを固定し、標的分子を捕捉することで DNA の荷電状態と自由度が変化することで PNIPAM の凝集挙動に影響を与えると期待される。例えば、標的分子が低分子化合物の場合、DNA アプタマーが分子を捕捉する際に形成する特別な 2 次構造はランダムコイル構造に比べ自由度が大きく低下していると考えられ、PNIPAM の凝集をエントロピー反発の違いで制御できる可能性がある。その場合、DNA アプタマーによる標的分子の認識で PNIPAM はより凝集する。また、標的分子がタンパク質である場合、DNA アプタマーの捕捉によりタンパク質の持つ多量の荷電が PNIPAM の凝集を静電反発で抑制し、低分子化合物とは逆の挙動になる可能性が考えられる。以上のように、DNA アプタマーを固定した PNIPAM では、2 本鎖 DNA の形成を必要としない簡便に作製できる材料で凝集促進と凝集抑制の両方の現象を起こせる可能性が期待される。

第7章 図表

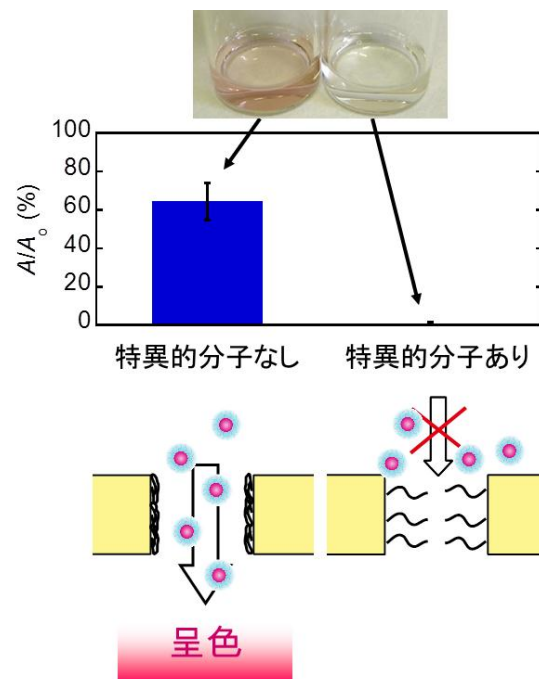


Figure 7.1 Schematic illustration of a visual test of specific molecules based on permeation of colored nanoparticles through a gating membrane.<sup>[2]</sup>

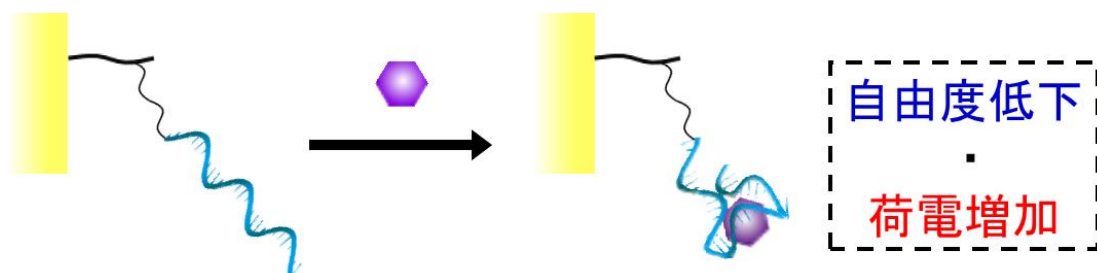


Figure 7.2 Schematic illustration of molecular recognition polymer using only ssDNA.

第 7 章 引用文献

- [1] H. Kuroki, T. Ito, H. Ohashi, T. Tamaki and T. Yamaguchi, *Analytical Chemistry* **2011**, *83*, 9226-9229.
- [2] Y. Sugawara, H. Kuroki, T. Tamaki, H. Ohashi, T. Ito and T. Yamaguchi, *Analytical Methods* **2012**, *4*, 2635-2637.

## 参考

### <投稿論文>

- (1) Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, *Soft Matter*, 9, (12), 3331–3340, 2013  
"Control of the poly(*N*-isopropylacrylamide) phase transition via a single strand-double strand transformation of conjugated DNA"
- (2) Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi, *Chemistry Letters*, 42, (12), 1568–1570, 2013  
"Switchable aggregation phenomena of DNA-conjugated poly(*N*-isopropylacrylamide) driven by transformation between ssDNA and dsDNA with control of DNA charges and flexibility"
- (3) Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Takeo Yamaguchi, submitted,  
"DNA molecular recognition affects aggregation of thermoresponsive polymer to detect intercalators"

### <その他の投稿論文>

- (1) Yuuki Sugawara, Hidenori Kuroki, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi, *Analytical Methods*, 4, (9), 2635–2637, 2012  
"Conversion of a molecular signal into a visual color based on the permeation of nanoparticles through a biomolecule-recognition gating membrane"

<国際学会>

- (1) Yuuki Sugawara, Hidenori Kuroki, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi,  
"New Antigen-responsive System Amplified by Water Shell around Gold Nanoparticle"  
The 5th Conference of Aseanian Membrane Society, Kobe Portopia Hotel, Kobe, Japan, (July 2009)
- (2) Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi,  
"Biomolecular recognition polymer using aptamer and dissociation of dsDNA for gating membrane"  
International Congress on Membranes and Membrane Processes, RAI Convention Centre, Amsterdam, The Netherlands, (July 2011)
- (3) Yuuki Sugawara, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Takeo Yamaguchi,  
"Multi-Stimulus-Responsive DNA/Polymer Conjugate: Control of Aggregation Phenomenon and Detection of Target Molecules"  
5th Gratama Workshop, Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan, (May-June 2013)

<国内学会>

- (1) 菅原勇貴・黒木秀記・大橋秀伯・伊藤大知・山口猛央  
「抗体固定 PEG 修飾金ナノ粒子を用いた新規抗原認識システムの開発」  
日本膜学会 第 31 年会、東京理科大学 森戸記念館, 東京、2009 年 5 月
- (2) 菅原勇貴・黒木秀記・大橋秀伯・田巻孝敬・伊藤大知・山口猛央  
「生体分子認識ゲート膜を用いた高速イムノクロマト法の開発」  
平成 21 年度つくば学生研究交流会、独立行政法人産業技術総合研究所つくば中央, 茨城、2010 年 3 月
- (3) 菅原勇貴・黒木秀記・大橋秀伯・田巻孝敬・伊藤大知・山口猛央  
「生体分子認識ゲート膜における金ナノ粒子透過性の評価」  
日本膜学会 第 32 年会、産業技術総合研究所, 東京、2010 年 5 月

- (4) 菅原勇貴・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
「アプタマー/ポリマーコンジュゲートによる新規生体分子認識材料の開発」  
化学工学会 第 42 回秋季大会、同志社大学, 京都、2010 年 9 月
- (5) 菅原勇貴・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
「アプタマーを用いた新規特異的分子認識材料の開発」  
化学工学会 第 76 年会、東京農工大学, 東京、2011 年 3 月
- (6) 菅原勇貴・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
「DNA アプタマーと感温性ポリマーを用いた分子認識ゲート膜の開発」  
第 60 回高分子学会年次大会、大阪国際会議場, 大阪、2011 年 5 月
- (7) 菅原勇貴・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
「DNA アプタマー修飾感温性ポリマーに関する相転移挙動の解析」  
化学工学会 第 77 年会、工学院大学, 東京、2012 年 3 月
- (8) 菅原勇貴・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
「DNA アプタマー修飾相転移ポリマーを用いた新規分子認識材料」  
平成 24 年度 化学工学会 横浜大会、横浜国立大学, 神奈川、2012 年 8 月
- (9) 菅原勇貴・田巻孝敬・大橋秀伯・山口猛央  
「DNA 固定化ゲート膜の開発」  
化学工学会 第 78 年会、大阪大学, 大阪、2013 年 3 月
- (10) 菅原勇貴・田巻孝敬・山口猛央  
「DNA コンジュゲート感温性ポリマーを用いた分子認識材料の開発」  
第 62 回高分子討論会、金沢大学, 石川、2013 年 9 月
- (11) 菅原勇貴・田巻孝敬・山口猛央  
「DNA 固定化感温性ポリマーを用いた分子認識膜の開発」  
第 3 回 CSJ 化学フェスタ 2013、タワーホール船堀, 東京、2013 年 10 月
- (12) 菅原勇貴・田巻孝敬・山口猛央  
「DNA 固定化 PNIPAM の凝集現象の解明と分子認識ゲート膜の開発」  
理研セミナー、理化学研究所, 埼玉、2014 年 2 月

(13) 菅原勇貴・田卷孝敬・山口猛央

「DNA 複合化分子認識ゲート膜の開発」

化学工学会 第 79 年会、岐阜大学、岐阜、2014 年 3 月、講演申込受理

<その他の国際学会>

(1) Takanori Tamaki, Yuuki Sugawara, Takeo Yamaguchi,

"Molecular Recognition Material based on DNA-conjugated Thermoresponsive Polymer"

23rd Annual Meeting of MRS-J, Yokohama Port Opening Plaza, Yokohama, Japan, (December 2013)

(2) Takanori Tamaki, Yuuki Sugawara, Takeo Yamaguchi,

"Molecular Recognition Gating Membrane Composed of DNA-conjugated Thermoresponsive Polymer"

ICOM2014, Suzhou Taihu International Conference Center, Suzhou, China, (July 2014)、講演申込受理

(3) Takanori Tamaki, Yuuki Sugawara, Takeo Yamaguchi,

"Molecular Recognition Gating Membrane Using DNA-conjugated Thermoresponsive Polymer"

IUMRS-ICA 2014, Fukuoka University, Fukuoka, Japan, (August 2014)、講演申込受理

## 謝辞

本研究は 2011 年度-2013 年度の 3 年間、東京工業大学資源化学研究所山口・田巻研究室において博士論文研究として行ったものです。研究を進めるにあたり、多くの方にご指導・ご支援をいただきました。この場をお借りして心から御礼申し上げます。

山口猛央教授には指導教員として 6 年間にわたり研究のご指導を頂きました。ディスカッションを通じて研究を的確な方向に導いて下さり、また研究を楽しむ気持ちを持ってやっていく姿勢など多くを参考にさせていただきました。また私の進路についても多くのご支援をいただきました。ここに厚く御礼申し上げます。

ご多忙にも関わらず本論文の審査をお引き受けてくださった、小島英理教授、上田宏教授、西山伸宏教授に感謝致します。

東京工業大学の田巻孝敬講師には、実験のことから発表のことまで頻繁にディスカッションをしていただきました。また研究者としての様々な事柄を学ばせていただきました。心から感謝致します。

東京工業大学の大橋秀伯助教には、懇切丁寧に本研究についてご指導を頂きました。また研究がうまくいくように適切に導いて頂きました。心から感謝致します。

東京工業大学の宮西将史特任助教は、合成の専門家として多くを教えてくださいました。また、様々なことで相談に乗って頂きました。心から感謝致します。

東京工業大学の大柴雄平助教は、私が D2 の時までは先輩学生として、最後の 1 年間はスタッフとして大変お世話になりました。実験室で色々と話したことが思い出深いです。ありがとうございました。

山口・田巻研究室秘書の鈴木絹恵さん、大森のり江さん、大沼昌子さん、岡田雅子さんには財務・事務手続きなどで研究を支えていただきました。本当にありがとうございました。

本研究室卒業生で現在 KAST 研究員の黒木秀記さんには、私が四年生の時の卒業研究でお世話になり、また本研究でも様々なご助言を頂きました。非常に感謝しております。

東京大学疾患生命工学センターの伊藤大知准教授には私が四年生のときに卒業研究でお世話になり、修士課程以降も多くの助言や励ましをいただきました。心から感謝致します。

本研究室に在籍した 6 年間、多くの先輩、後輩の皆さんにお世話になりました。博士研究員の李柱明さん、Bhachandra Kakade さん、曾楚怡さん、田畑洋さん、Sailaja Gopalakri さん、Arumugam Balamurugan さん、片柳雄大さん、KAST 研究員の安藤伸治さん、Sourov Gohsh さん、三浦弓恵さん、時盛ひとみさん、先輩学生の方原伸生さん、Limjeerajarus Nuttapol さん、平出篤志さん、豊田将平さん、藤井啓太郎さん、中島達哉さん、張涵さん、丁香美さん、菊地佑磨さん、渡辺麻衣子さん、岩元望さん、佐藤謙さんからは、研究や生活その他諸々の事に関してお世話して頂きました。本当に充実した楽しい研究生生活を送れました。ありがとうございました。

博士課程の同期の小川敬也君、杉山朋晴君とは、励まし合い競い合いながら共に 5 年間がんばってきたことで、非常に貴重な研究室生活を送れました。ありがとうございました。

本研究室卒業生で同輩の阿部友昭君、後輩の Faizly Asmat 君、青沼堯君、有坂拓君、谷川祐司君、中西信三君、藤本治貴君、坂下繭子さん、蝦名紗衣さん、長谷川旭君、皆川貴彦君、現在在籍中で後輩の池雪琴さん、汪海林君、天宮清一君、有馬大介君、飯島敦史君、小倉俊君、武井俊樹君、溝江昌洋君、奥田龍太郎君、甘利俊太郎君、井上智晴君、大前佑貴君、樋浦純矢君、森田直樹君、山田祐介君、Ittitanakam Apisada さん、入澤仁美さん、鈴木悠人君には色々と迷惑をかけたことが多かったと思います。それぞれの頑張りには見習うことが多くあり、私も研究のモチベーションを上げられました。ありがとうございました。

東京工業大学総合理工学研究科博士複合創造領域の Dan Ricinski 特任准教授は、英語のプレゼンテーションとライティングの授業にて非常に熱心に指導してくださいました。そればかりでなく、多忙でありながら私の論文や国際学会のスライドの添削、各種申請書の英文の校正を快く行っていただき、また様々な助言をいただきました。本当にありがとうございました。I am strongly grateful for your help.

研究室外の友人・知人の皆様からは、色々な交際を通じてとても楽しい思いをさせていただきました。この場をお借りして御礼申し上げます。

最後に、私を精神的に支え、研究に励めるように優しく見守ってくれた家族に感謝いたします。

平成 26 年 2 月 菅原勇貴