遺伝子検出における金ナノ粒子表面の DNA の構造と密度の影響

【概要】

　金ナノ粒子がターゲット分子に依存した凝集を示す溶液色変化によって評価する簡便な分子検出が注目されています。特に、1 本鎖 DNA を修飾した金ナノ粒子を用いた DNA 検出は、遺伝子診断への応用が期待されます。これまでに、修飾 DNA 密度が低い金ナノ粒子ほど、より高感度にターゲット DNA を検出できることを示してきました（2023 年 10 月 20 日プレスリリース）。しかし、検出対象の DNA には様々な配列や構造が存在し、修飾条件の指標を立てる上では、さらに高次構造などの影響を明らかにする必要がありました。

　本研究では、ステムループなどの高次構造を形成しやすい1本鎖 DNA を修飾した金ナノ粒子を用いて、修飾 DNA 密度が DNA 検出感度に与える影響を調べました。その結果、修飾 DNA 密度が高い金ナノ粒子ほど、より高感度に標的 DNA を検出できることが示されました。驚くべきことに、これは高次構造をもたない修飾 DNA の場合と逆の結果でした。詳細に調べた結果、低密度修飾条件下では高次構造をとるため、ナノ粒子凝集に必要な相補鎖形成がされにくいためであることが示唆されました。これにより、DNA の取りうる構造を理解したうえで、修飾密度の最適化が必要なことが明らかとなりました。本研究の成果により、金ナノ粒子を用いた遺伝子診断において、様々なターゲット DNA における高感度化が期待されます。

　本研究に関する論文は、英国科学誌「Scientific Reports」に掲載され、オンライン版（オープンアクセス）で公開されました（2025 年 3 月 10 日（日本時間））。

【詳細】

直径が数～数十ナノメートルの金ナノ粒子の水溶液は、分散状態では赤色を呈しますが凝集状態では青紫色へと変色します。この特性を利用して、標的分子の存在下においてのみ金ナノ粒子の凝集体を形成させることにより、様々な分子の比色検出が行われてきました。特に、1本鎖 DNA を修飾した金ナノ粒子を用いた DNA 検出は、標的特異性・迅速性に優れるため様々な遺伝子診断に利用されています。

　我々はこれまでに、凍結法及び Ethylene glycol(EG)を用いることにより、金ナノ粒子表面に修飾された DNA の密度を制御する方法を確立しました。また、金ナノ粒子の非架橋型凝集を用いた標的 DNA 検出において、修飾 DNA 密度が低い金ナノ粒子ほど、より高感度に標的 DNA を検出できることを明らかにしました（例：プレスリリース 2023 年 10 月 20 日）。しかしながら、検出対象の DNA には様々な配列や構造が存在し、修飾条件の指標を立てる上では、高次構造などの影響を明らかにする必要がありました。そこで本研究では、高次構造をとりやすいと考えられる配列を有する DNA を修飾した金ナノ粒子(ssDNA–AuNP)の標的 DNA 検出感度に対する修飾 DNA 密度の影響を評価しました（図 1）。

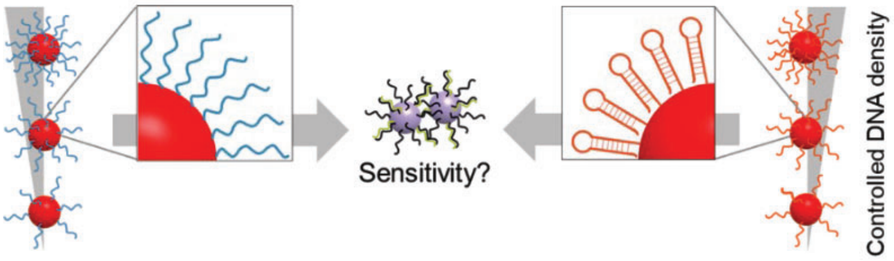


図 1 高次構造が異なる DNA を修飾した ssDNA-AuNPs による標的 DNA 検出における修飾 DNA 密度の影響

まず、2 種類の 1 本鎖 DNA を用いて、金ナノ粒子上の修飾密度制御を実施しました。一つは立体構造をとりにくい DNA(type−1)で、もう一つはステムループ構造を取りやすい DNA(type−2)です。ssDNA−AuNP を用いた標的 DNA の検出感度に及ぼす修飾 DNA 密度の影響を評価したところ、type−1 の標的 DNA の検出感度は固定化 DNA 密度が低いほど向上しました(図2(a))。これは過去の知見と一致します。それに対して、驚くべきことに、立体構造をとりやすい type−2 の検出感度は固定化 DNA 密度が高いほど向上しました(図 2(b))。

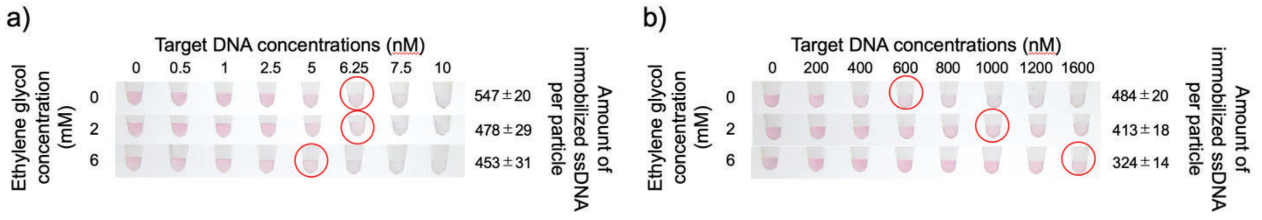


図２ ssDNA-AuNP を用いた標的 ssDNA の検出感度に及ぼす修飾 DNA 密度の影響評価。
[type-1 (a), type-2（ステムループ）(b)]

その原因を明らかにするため、修飾 DNA 密度の違いが ssDNA−AuNPs の二本鎖形成率に与える影響を調べました。その結果、type−2 では type−1 よりも二本鎖形成率が低く、特に低密度条件下(高 EG 濃度)では、二本鎖形成率は有意に低下することが分かりました(図 3)。これは、低密度化により type−2 上 ssDNA のステムループ構造の形成が促進されたため、低密度条件における stem−loop の二本鎖形成効率が減少したためだと考えられます。本研究により、DNA の取りうる構造を理解したうえで、修飾密度の最適化が必要なことが明らかとなりました。これにより、金ナノ粒子を用いた遺伝子診断において、様々なターゲット DNA における高感度化が期待されます。

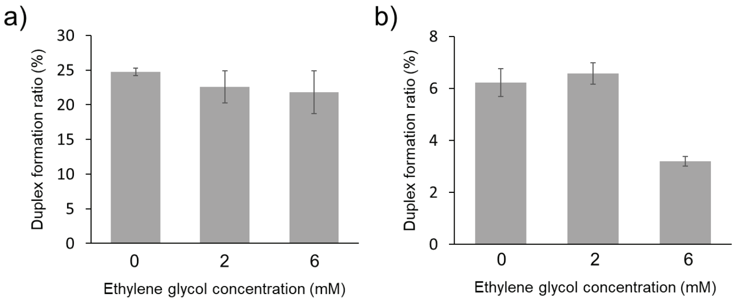


図 3 二本鎖形成に及ぼす DNA 修飾密度の影響評価
[type-1 (a), type-2（ステムループ）(b)]

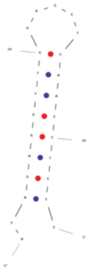
【用語解説】

<u>DNA 修飾金ナノ粒子の非架橋型凝集を用いた標的 DNA 検出</u>

１本鎖 DNA を修飾した金ナノ粒子は、塩存在下で修飾 DNA に対して完全相補的な標的１本鎖 DNA を加えると凝集体を形成する。一方、外側末端にミスマッチが生じるような１本鎖 DNA を加えても凝集体を形成しない。これは、比較的柔軟で運動性の高いミスマッチ部位近傍では、立体的な斥力が生じるためであると考えられている。それに対して、末端が相補的な場合、Van der waals 力が斥力に勝り、塩による粒子間の静電反発力低下と合わさって凝集体を形成する。

ステムループ構造

1 本鎖 DNA のうち、相補的部分が塩基対を形成し、二重らせん構造を有するステム構造を示す一方、残りでは塩基対を形成せず、ループとなっている構造を示す（右図）。



【研究体制と支援について】

本研究は、愛媛大学理学部を中心に、工学部、プロテオサイエンスセンター、理化学研究所との共同研究として行われました。また、研究の実施にあたっては、日本学術振興会(JSPS)科学研究費助成事業、愛媛大学リサーチユニット「先端ナノ・バイオ分析研究ユニット」の支援を受けました。

【論文タイトルと著者】

掲載誌：Scientific Reports
D O I : 10.1038/s41598-025-92474-y
題　名：Density and structure of DNA immobilised on gold nanoparticles affect sensitivity in nucleic acid detection
(和訳)金ナノ粒子に修飾した DNA の密度と構造は核酸検出感度に影響する
著　者：Nanami Fukuzumi, Gen Hirao, Atsushi Ogawa, Tsuyoshi Asahi, Mizuo Maeda, Tamotsu Zako*
責任著者：座古保（愛媛大学）

【本件に関する問い合わせ先】

愛媛大学大学院理工学研究科（理学部化学コース）
教授　座古　保（ざこ　たもつ）
Mail: zako.tamotsu.us@ehime-u.ac.jp