

「分子複合系の構築と機能」  
平成 11 年度採択研究代表者

吉川 研一

(京都大学大学院理学研究科 教授)

## 「自己生成するナノ秩序体:高次構造制御と機能発現」

### 1. 研究実施の概要

様々な生体分子からなる生体内では生体高分子の高次構造と機能性が密接に結びつきあいつつ、生体高分子を中心に無数の化学反応が有機的に結びついたネットワークが形成されている。つまり、生体は自ら境界条件を作り替えながら時空間秩を創出・展開する分子複合系と看做すことができる。このような生体内で行われている現象は自己発展する分子複合系を構築する上で極めて重要な示唆を与えている。

本研究では典型的な生体分子である DNA 分子の高次構造のスイッチングとそれによる秩序構造の生成の研究を発展させ、そこで得たエッセンスを他の天然・合成高分子系に応用し、“単一分子鎖によるナノ秩序体の自己生成”といった分野を新たに切り拓くこと、さらに DNA を中心とする  $\mu$  m スケールの高分子複合系を構築し、時空間秩序の創出・発展のメカニズムの解明することを目的とする。

これまでの研究期間を通じ、ランダムコイル状態-凝縮状態間で一次相転移を示す DNA (堅い高分子鎖) の高次構造の制御を溶液組成や温度によって任意に変化させる方法論の確立 (単一分子鎖の高次構造の制御)、DNA の高次構造変化の様式の制御 (一次相転移・緩慢転移を任意に選択する技術)、光による非平衡場上での単一分子鎖の高次構造制御 (非平衡場における周期的な高次構造変化)、巨大二重らせん DNA 高次構造の階層性、フラーレンをベースとした  $\pi$ - $\pi$  相互作用によるナノ秩序体の形成、凝縮剤のカイラリティーに基づく DNA 高次構造制御等の研究課題について、世界に先駆けた成果が得られてきている。

今後は、高次構造制御の研究をすすめると共に、時間発展する自己秩序システムの構築に向け、研究を推進してゆく予定である。

### 2. 研究実施内容

今年度も興味深い研究成果が多数得られてきているが、以下に主要な研究成果を報告したい。

#### 2-1 レーザー場における単一分子鎖の高次構造制御:ダイナミクスの解明

当チームは将来の技術開発に直結する、単一分子鎖の高次構造・機能発現制御の確立を目指し、研究を行ってきている。これまでの我々は、溶液中において DNA 単分子鎖 (硬い単一分子鎖) が、広がった状態 (ランダムコイル状態) と凝縮状態の二状態間で不連続な高次構造変化を

示すこと(折り畳み相転移)、光エネルギーによる非平衡場において、周期的な DNA 単分子鎖の高次構造を誘起することに成功している[1]。今年度では、その詳細なプロセスを解明したので、詳細な以下に報告する[2]。

溶液組成のデザインにより、温度上昇と共に DNA 高次構造を凝縮状態からランダムコイル状態に変化させることができる[3]。一方、光ピンセット(収束 cw Nd:YAG レーザ(波長 1064nm))の光エネルギーにより、水溶液中に局所的に温度の高い領域を創り出せること、同時に凝縮状態の DNA を容易に捕そくすることができる。これらの2点に着目し、水溶液中で構築したレーザー場(200~1000mW、非平衡場(局所加熱))を構築し、DNA の高次構造が秒の周期で伸びる現象(高分子鎖の自励振動)を観測してきている。今回、我々は詳細な単分子観察を行い、DNA 単分子鎖の自

励振動の際に1次相転移のキネティクス(核形成・結晶成長、結晶融解)を観察した(図1参照)。これは、生体分子から運動が作り出される際には生体分子に1次相転移(不連続な2状態変化)を起こす性質が内在していなければならないこと、熱力学的開放条件が必須であることを示している。

今回得られた研究成果を通じ、DNA の遺伝子発現の制御といった、高次構造と機能発現が密接に結びついた機能性高分子の物性(高次構造・機能発現)の制御を  $\mu\text{m}$  スケールの局所場で行うことが可能となる。

#### 参考文献

1. H. Mayama et al., *Chem. Phys. Lett.*, **330**, 361 (2000).
2. H. Mayama and K. Yoshikawa, *Faraday Discussion*, **120**, 67 (2001).
3. H. Mayama et al., *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 113 (2000).

#### 2-2 ヌクレオソームの物理モデル

全長 mm~cm にもなる真核生物の DNA は、生体内ではヒストン蛋白質との複合体として  $\mu\text{m}$  サイズの核内にコンパクトに折り畳まれて存在している。この複雑な折り畳みの初期段階で、DNA はヒストンに巻き付きヌクレオソームとして知られる複合体を形成する。このヌクレオソームの安定性や動的な性質は、遺伝子の活性と密接に関連していると考えられる。我々はこの問題に対して、簡単なヌクレオソームの物理モデル(図2左参照)を構築し、コンピュータシミュレーションにより解析をおこなった。

まず、ヌクレオソーム形成において、DNA、ヒストン間の“適度”な相互作用の重要性を示した。こ

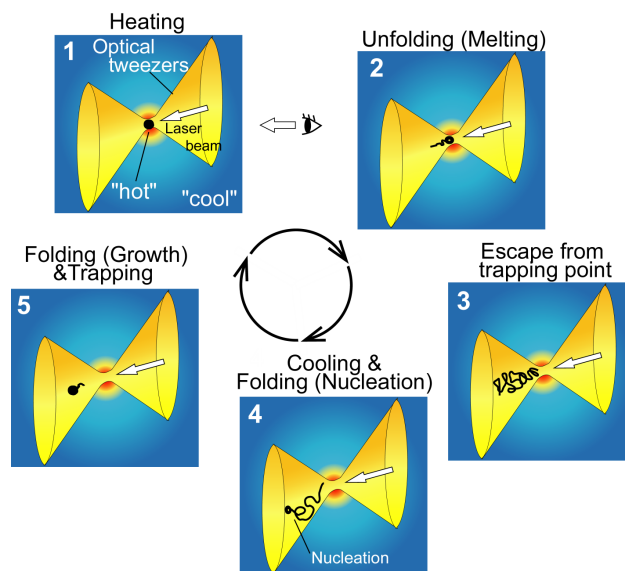


図1 DNA 単分子鎖の自励振動のダイナミクス(模式図) 結晶融解、核形成・結晶成長のプロセスを経て自励振動が発現する。

これは、経験的に知られてきた再構成実験のプロトコルに対応する。線状の DNA 上では、ヒストンは端に存在しやすいことを見出し、原子間力顕微鏡による観察と良い一致を得た(図2右参照)。また、DNA 鎖に沿ってヒストンが示す滑り運動について解析し、ヌクレオソームのような複合体において、このような自由度が一般的なものであることを示した。

参考文献

1. T. Sakaue, K. Yoshikawa, S. H. Yoshimura and K. Takeyasu, "Histone Core Slips along DNA and Prefers Positioning at the Chain End", *Phys. Rev. Lett.*, **87**, 078105,1-4 (2001).

### 2-3 リポソームによる微小カプセルの構築

リン脂質2分子膜からなる細胞膜により外界と仕切られている細胞内では、様々な生体分子が関与した複雑な化学反応ネットワークが形成されており、細胞は微小反応場ととらえることができる。もし、微小カプセルを作り出すことができれば、微小空間での化学反応をデザインすることができ、現在の科学技術に大きな波及効果を与えると予想される。さらに、系に含まれる分子数はアボガドロ数よりも遥かに少ないことや微小空間といったユニークな要素が顕在化するため、マクロな反応場と質的に異なる現象が観測されることも理論的に予想される。我々はこれらの問題に取り組むための前段階の研究として、従来作製困難であった細胞サイズ(直径 $\sim 10 \mu\text{m}$ )の巨大リポソーム作製に成功し、既にそのノウハウを確立してきている。今回我々は、巨大リポソームを微小カプセルとして用いることを目指し、研究を行ってきた[1]。

適当なイオン環境の下で巨大リポソームが形成される。我々はこのDNAとRNAを介在させることで、まずDNAとRNAが巨大リポソームの内外に存在する状態を作り出した。さらに、リポソームの外にRNA分解酵素を加えることで、リポソームのカプセルとしての性能を評価した。その結果、リポソーム中のRNAは保護されることが明らかになった(図3)。

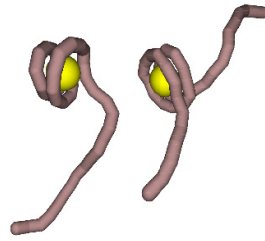


図2 ヌクレオソームの物理モデル  
左:ヌクレオソームモデルのスナップショット。

右:ヌクレオソームの原子間力顕微鏡図(上)。ヒストン(明るいスポット)はDNAの端に存在しやすいことがわかる。シミュレーション、理論によるDNA上のヒストンの存在位置の確率分布(下)。

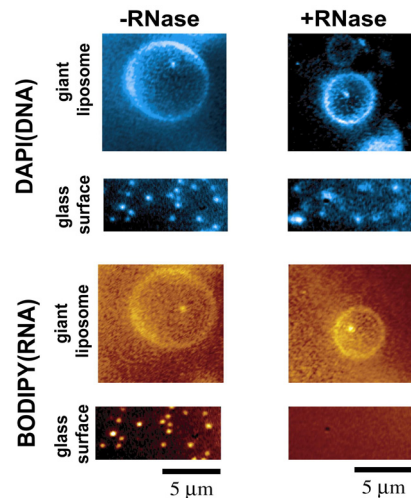
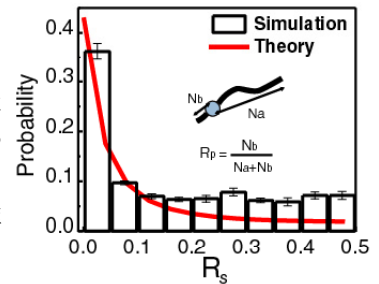
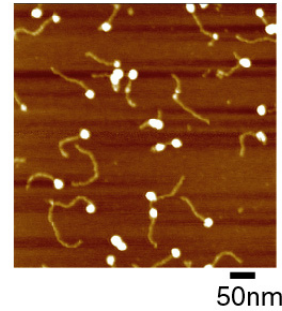


図3 リポソームによる微小カプセルの構築。DNAとRNAを異なる蛍光色素(DAPI, BODIPY)で染色し、蛍光観測した。RNA分解酵素の添加前(左列)と添加後(右列)でリポソーム外のRNAが大きく変化するが、リポソーム内のRNAが保護されていることに注目。

今回得られた研究成果により、リポソームを反応物のカプセルとし、光ピンセットにより、リポソームの融合、搬送といった一連の操作が可能となることに注目していただきたい。

参考文献

1. K. Tsumoto et al., *Langmuir*, **17**, 7225 (2001).

#### 2-4 キラルなポリアミンによる DNA 折り畳み相転移

DNA はキラルな分子であることから、凝縮剤のキラリティーが折りたたみ転移に重要な影響を与えることが期待される。これまでの DNA 折り畳み相転移の研究は、硬い単一高分子鎖の一般論といった観点で展開されてきたが、今回凝縮剤のキラリティーについて注目し、DNA の折り畳み相転移に及ぼす影響について調べた。

具体的には、L 及び D-リシン3量体、L 及び D-アルギニン3量体を凝縮剤として用いた実験を行った。その結果、DNA 折り畳み相転移が起きる凝縮剤の転移濃度に大きな差異が認められた(図4参照)。これは、巨大キラル分子の転移に低分子キラリティーが大きく影響していることを示しており、キラルな分子が構造認識能を有することを顕著に示している。

得られた研究成果は、硬い高分子鎖と低分子の各々のキラリティー、或いは分子複合系を構成する分子のキラリティーをデザインすることで高分子鎖の高次構造制御を行うことができることを示している。

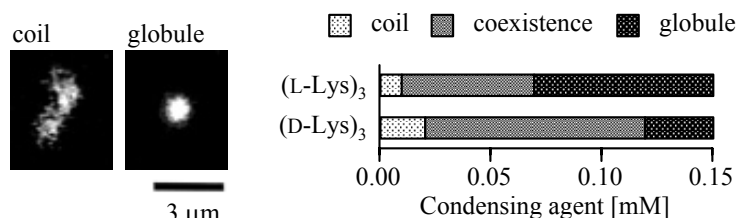


図4 L 及び D-リシン3量体による DNA 折り畳み相転移

#### 2-5 高分子ナノ秩序体の光化学反応による構築と機能制御 (H13 年度 CREST 新規計画において採択された研究課題)

本課題では、高分子のナノ秩序構造制御の基礎技術の一つとして光化学を利用した方法論を確立することを目的とし、光感受性合成高分子の光応答荷電状態転換を用いた巨大 DNA の凝縮構造制御の研究を行った。

今回、光感受性合成高分子として、光感受性モノマー・ビニル化マラカイトグリーンロイコ体 (vinyl malachite green leucohydroxide: VMGL) と親水性モノマー・アクリルアミド (AAm) とのブロック共重合体を用いた。この共重合体は水溶性であるため水溶液中で DNA 分子と共存させることができ、かつ 290-410 nm の光を照射することによりマラカイトグリーンロイコ体の光解離が起こり、(1) 共重合体のポリカチ

オン化・荷電状態転換、(2) OH<sup>-</sup>イオンの放出による系の pH 上昇、の溶液環境変化を、新たな添加物等なしに非接触で

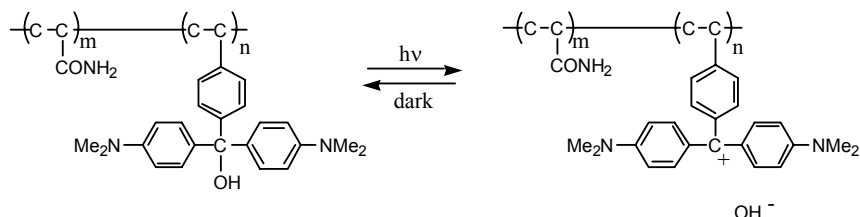


図5 block-copoly(AAm/VMGL)の光解離

行わせることができる(図 5)。

この block-copoly(AAm/VMGL)は、巨大 DNA 鎖を蛍光顕微鏡法によって観察する際の励起光自体によって光解離することが予想されるため、DNA の高次構造の観察を行いながら同時にその光解離による溶液環境変化がもたらす DNA のナノ構造変化を検出できることが期待された。本課題では、このような戦略によって、DNA のナノ構造制御を試みた。

DNA の蛍光顕微鏡観察の際の励起光照射による block-copoly(AAm/VMGL)の光解離の評価は、顕微分光法による吸光定量によって行った。block-copoly(AAm/VMGL)は光解離すると、620 nm の光を吸収することがわかっているため、その波長の吸光度の時間変化を調べたところ、励起光が照射されているときに block-copoly(AAm/VMGL)の光解離が起きていることが確認された(図 6)。

顕微鏡観察ステージ上での block-copoly(AAm/VMGL)の光解離を確認した上で、スペルミジン(3価のカチオン)存在下において、光照射(OH<sup>-</sup>イオン放出)前後で DNA 折り畳み転移の誘起される濃度領域を調べた(図 7)。その結果、DNA 折り畳み転移を起こすスペルミジン濃度が、光照射によってより高濃度にシフトすることが明らかとなった。この結果は、スペルミジン濃度一定の条件下では凝縮した DNA を光照射によってときほぐすことが可能であることを示唆している。この現象は、block-copoly(AAm/VMGL)の光解離によって、系の pH が上昇した結果、正に帯電したスペルミジンの実効濃度が減少し、凝縮剤としての能力が制限されたことに起因するものと考えられる。

まとめると、今回得られた結果は、光による非接触操作により荷電高分子ナノ秩序体の高次構造制御、折り畳み一解きほぐし転換、が可能であることを示唆するものである。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 吉川グループ

##### ① 研究者名(所属、役職)

吉川研一

(京都大学大学院理学研究科・教授)

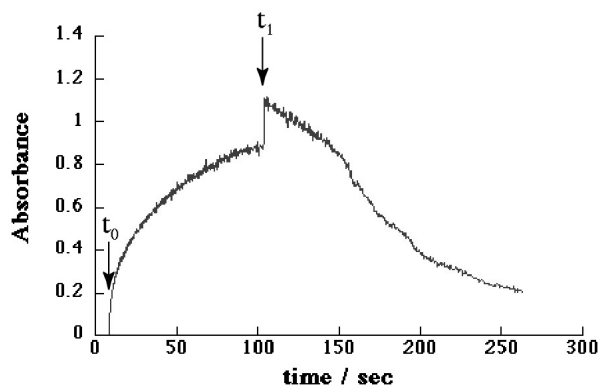


図6 block-copoly(AAm/VMGL)の光解離の経時変化。620 nm の吸光度変化を測定。t<sub>0</sub>にて 365 nm の光照射開始、t<sub>1</sub>にて照射停止。

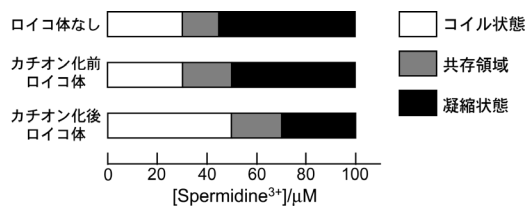


図 7 光照射前後での DNA 折り畳み条件

## ② 研究項目

### ナノ秩序体構造・機能制御

次の三点を主な目的として段階的に研究を行っている:①DNA単一分子鎖の高次構造制御の方法論の確立、②その構造制御法に基づくDNAの機能制御法の探索、および③DNA系で得られた構造・機能調節法の合成高分子系への応用。

### ナノ秩序体理論構築

DNA高次構造制御についての実験と平行して、モンテカルロ計算によるシミュレーションと統計力学に基づく凝集に関する理論の構築を行ない、より有用性の高い高分子理論の構築を行っている。

### 自己発展型非平衡分子複合系の構築

分子複合系における時空間秩序形成について、理論・実験の両面から研究を行う。単一高分子鎖のリミットサイクル・微小空間(リポソーム)に関する研究を通じ、人口細胞系(非平衡型分子複合系、秩序の自己創出)の構築を目指し研究を行っている。

## (2) 村田グループ

### ① 研究者名(所属、役職)

村田静昭 (名古屋大学大学院人間情報学研究科・教授)

### ② 研究項目

#### ナノ秩序体分子設計

ナノ秩序体構築に必要な分子認識・自己組織化能をもった分子をデザインし、機能性高分子を開発するための基礎的知見を得る。具体的には、フラーレンをベースとする新しい $\pi-\pi$ 相互作用、ヘテロ原子有機化合物に基づく電磁気学的機能、新蛍光物質を用いるレーザーナノテクノロジーの応用、キラリティー相互作用に基づくDNAの折り畳み構造制御を目指し研究を行っている。

## 4. 研究成果の発表

### (1) 論文発表

- S. Takagi, K. Tsumoto and K. Yoshikawa, "Intra-Molecular Phase Segregation in a Single Polyelectrolyte Chain", *J. Chem. Phys.*, **114**, 6942-6949 (2001).
- S. M. Nomura, Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, O. Dannenmuller, S. Chasserot-Golaz, G. Ourisson and Y. Nakatani, "Towards Proto-Cells: "Primitive" Liquid Vesicles Encapsulating Giant DNA and Its Histone Complex", *ChemBioChem*, **6**, 457-459 (2001).
- Y. Yoshikawa, Y. S. Velichko, Y. Ichiba and K. Yoshikawa, "Self-Assembled Pearling Structure of Long Duplex DNA with Histone H1", *Eur. J. Biochem*, **268**, 2593-2599 (2001).
- Y. Yamasaki, Y. Teramoto and K. Yoshikawa, "Disappearance of the Negative Charge in Giant DNA with a Folding Transition", *Biophys. J.*, **80**, 2823-2832 (2001).
- S. S. Abramchuk, A. R. Khokhlov, T. Iwataki, H. Oana and K. Yoshikawa, "Direct

Observation of DNA Molecules in a Convection Flow of a Drying Droplet”, *Europhys. Lett.*, **55**, 294–300 (2001).

- N. Yoshinaga, T. Akitaya and K. Yoshikawa, “Intercalating Fluorescence Dye YOYO-1 Prevents the Folding Transition in Giant Duplex DNA”, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **286**, 264–267 (2001).
- T. Sakaue, K. Yoshikawa, S. H. Yoshimura and K. Takeyasu, “Histone Core Slips along DNA and Prefers Positioning at the Chain End”, *Phys. Rev. Lett.*, **87**, 078105,1–4 (2001).
- R. Aihara and K. Yoshikawa, “Size-Dependent Switching of the Spatiotemporal Structure Between a Traveling Wave and Global Rhythm”, *J. Phys. Chem. A*, **105**, 8445–8448 (2001).
- Toth, D. Horvath and K. Yoshikawa, “Unidirectional Wave Propagation in One Spatial Dimension”, *Chem. Phys. Lett.*, **345**, 471–474 (2001).
- T. Akitaya, N. Magome, S. M. Nomura, H. Mayama and K. Yoshikawa, “Sustained Rhythm and Directed Self-Locomotion under Thermodynamically Open System”, *Int. J. Chaos Theo. Appl.*, **6**, 19–28 (2001).
- K. Tsumoto, S. M. Nomura, Y. Nakatani and K. Yoshikawa, “Giant Liposome as a Biochemical Reactor: Transcription of DNA and Transportation by Laser Tweezers”, *Langmuir*, **17**, 7225–7228 (2001).
- M. Ichikawa and K. Yoshikawa, “Optical Transport of a Single Cell-Sized Liposome”, *Appl. Phys. Lett.*, **79**, 4598–4600 (2001).
- K. Yoshikawa, “Controlling the Higher-Order Structure of Giant DNA Molecules”, *Adv. Dru. Del. Rev.* **52**, 235–244 (2001).
- H. Mayama and K. Yoshikawa, “Self-Oscillating Polymer Chain in a Laser Field”, *Faraday Discussion*, **120**, 67–84 (2001).
- K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa and T. Kanbe, “All-or-None Folding Transition in Giant Mammalian DNA”, *Chem. Phys. Lett.*, **354**, 354–359 (2002).
- S. M. Nomura, T. Harada and K. Yoshikawa, “Autonomous Swinging of a Lipid Tubule Under Stationary Irradiation by a Nd<sup>3+</sup>:YAG Laser”, *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 093903–1–4 (2002).
- T. Sugimoto, K. Ikemoto, S. Murata, M. Tazawa, T. Nomura, Y. Hagino, H. Ichinose and T. Nagatsu, “Identification of (6*R*)-5,6,7,8-Tetrahydro-D-monapterin (=6*R*)-2-Amino-5,6,7,8-tetrahydro-6-[(1*R*,2*R*)-123-trihydroxypropyl]-pteridine-4(3*H*)-one) as the Native Pteridine in *Tetrahymena pyriformis*”, *Helvetica Chimica Acta* **84**, 918–927 (2001).
- S. Iwamatsu, P. S. Vijayalakshmi, M. Hamajima, C. H. Suresh, N. Koga, S. Murata, “A Novel Photorearrangement of a Cyclohexadiene Derivative of C<sub>60</sub>”, *Organic Lett.*, **4**, 1217–1220 (2002).

(2) 特許出願件数(H13年度):1件