

「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)

「自己生成する高分子ナノ秩序体：高次構造制御と機能発現」

1. 研究実施の概要

生体内では、生体高分子の高次構造と機能が化学反応等を通して密接に結びつき、動的な秩序状態が形成されている。つまり、生体は自ら境界条件を作りかえながら、時空間秩序を創出・展開する分子複合体である。このような生命に見られる巧妙な機能は、自己発現する分子複合系、換言すれば、ナノ秩序体が機能発現する“場”を構築するために、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高分子であるDNA分子の高次構造転移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”という研究分野を新たに切り拓くこと、さらにDNAを中心とするnm~ μm スケールの高分子複合系を構築し、解析することで、時空間秩序の創出・発展のメカニズムを解明することを目的としている。

当研究の開始以降現在に至るまでに、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（単一高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）、DNAの高次構造制御による、転写反応のON/OFFスイッチング、光による非平衡場上での単一高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）、巨大二重鎖DNA高次構造の階層性、光ピンセットによる遺伝子導入、レーザーを用いた非平衡場でのリズム現象、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高次構造制御など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。

2. 研究実施内容

平成15年度も、それまでの研究成果を受け、更に発展させることにより、興味深い研究成果が多数得られた。以下に主要な研究成果を報告する。

1. 凝縮剤の性質によるDNA分子鎖の高次構造転移の制御
2. 細胞モデルーリポソーム内での転写・発現反応
3. 光ピンセットを用いた分子複合系の制御

4. 高分子鎖の高次構造と機能発現の関係
5. 生命現象へのアプローチ：分子複合系における非線形ダイナミクスの解明
6. 化学反応による化学／機械エネルギー変換、自発的な運動
7. 生物が行う情報処理のメカニズム解明－化学反応場の形状を利用した演算
8. 分子複合系に機能を付与する新規化合物の創成
9. 脂質膜の環境変化による構造転移のメカニズム

以下に、本年度の研究成果の中から、代表的なものをとりあげ、具体的に紹介する。

1. 凝縮剤の性質によるDNA分子鎖の高次構造転移の制御

生物はキラルなアミノ酸を骨格にもつようなタンパク質を活用することにより、キラリティを持つDNA分子と相互作用し、DNA分子の活性を制御していると考えられている。従来、DNAのキラリティの認識は、特異的な三次元構造を持つ高分子でなければ不可能であるとされてきたが、われわれのグループによる研究によって、3個の塩基性アミノ酸のオリゴマーを用いると、DNAの折り畳み構造について

ほぼ100%のキラリティの識別能を示すことを明らかにした。従来は高々数%の選択性が報告されていたに過ぎず、今回このような高い選択性が実現されたことの意義を大きい。(図1参照)

また、これまでに、スペルミン、スペルミジンなどの多価カチオンを用いると長鎖DNA分子はコイル状態からコンパクトに折り畳まれた凝縮状態へと不連続に折り畳まれる一次相転移を示すことを明らかにしてきたが、生理的条件下ではアニオンであるアスコルビン酸(ビタミンC)を加えると、一分子内で、折り畳まれた領域と長く伸びた領域が共存する、分子内相分離状態(Pearling構造)が出現することを見出した。(図2参照)こ

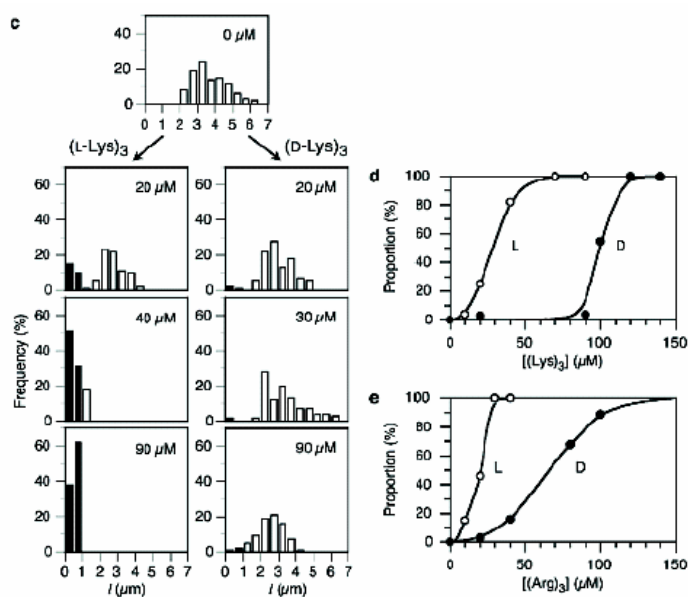


図1：凝縮剤としてLys₃のL体とD体を用いた時のDNA凝縮転移の違い。(J. Am. Chem. Soc., 2003より)



図2：アスコルビン酸を凝縮剤として用いた時のDNA分子内相分離状態の蛍光顕微鏡像。(Eur. J. Biochem., 2003より)

れは、*Eur. J. Biochem.* 誌の表紙を飾る論文となるなど、多方面から注目を集めている。

2. 細胞モデルーリポソーム内での転写・発現反応

生命の基本単位である細胞は、リン脂質2分子膜による閉鎖空間を固有の反応場としており、それがゆえに多様でかつ特異な機能を創り出していると考えられる。この構造は、脂質と溶液との相互作用により自発的に形成されるものであることが統計力学的に議論されている。実際、われわれのグループでは、リン脂質を用いて細胞サイズのベシクルを作製することに成功しており（細胞サイズリポソーム）、そのリポソームを用いて、細胞の謎に迫る研究を進めている。その結果、DNAを含む転写反応溶液をリン脂質の多層膜と接触させると、反応液を取り込んだ細胞サイズのリポソームが自発的に形成されることを

見出している。今回、細胞サイズリポソーム内では、タンパク質翻訳反応が促進されることを見出し、細胞がマイクロメートルスケールであることの重要性の一端を明らかにした。

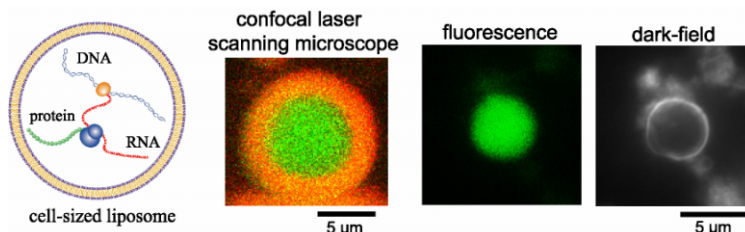


図3：リポソーム内でのタンパク質合成（遺伝子発現）反応。（*ChemBioChem*, 2003より）

3. 光ピンセットを用いた分子複合系の制御

集光したレーザーは、その焦点に誘電体を引き寄せることが知られている。一般に、レーザートラップでは、多数のコロイド粒子などをトラップした場合、焦点付近に大きな球状の凝集体を形成するだけに終わることが多かった。われわれは、粒子の性質および環境を工夫することにより、凝集されるコロイド粒子が直鎖状に連なる実験結果を得た。

実験には、DNA分子を凝縮剤でコロイド粒子にする際に、凝縮剤に疎水基を入れることで、水溶液中で接触相互作用が強い引力となる粒子を作成し、レーザーを集光させることにより、焦点からDNAコロイド粒子が連なるマイクロメートルサイズの構造体を形成することのできる手法を確立した。実際に、ガラス基板の上にDNAコロイド粒子で文字を書くことに成功した。（図4参照）

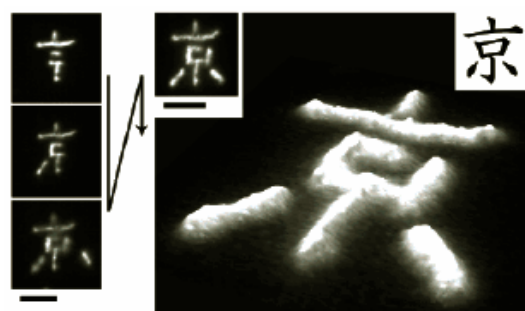


図4：光ピンセットを用いてDNAコロイド粒子で描いた「京」の文字。スケールバーは10 μm 。（*Langmuir*, 2003より）

3. 研究実施体制

ナノ秩序体構造・機能制御グループ

- ① 研究分担グループ長：眞山 博幸 (CREST研究員)
- ② 研究項目： DNA単一分子鎖の高次構造の制御

ナノ秩序体理論構築グループ

- ① 研究分担グループ長：小穴 英廣 (京都大学大学院理学研究科、助手)
- ② 研究項目： ナノ秩序体の高次構造形成の理論構築

高分子秩序体分子設計グループ

- ① 研究分担グループ長：村田 静昭 (名古屋大学環境学研究科、教授)
- ② 研究項目： 合成的手法を用いたナノ秩序体の合成

ナノ秩序体理論構築グループ

- ① 研究分担グループ長：秋田谷 龍男 (CREST研究員)
- ② 研究項目： 非平衡分子系における時空間構造の形成

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- N. Magome, M. I. Kohira, E. Hayata, S. Mukai and K. Yoshikawa, "Optical Trapping of a Growing Water Droplet in Air", *J. Phys. Chem. B*, **107**, 3988-3990 (2003).
- K. Tsumoto, L. Francois and K. Yoshikawa, "Giant DNA molecules exhibit on/off switching of transcriptional activity through conformational transition.", *Biophys. Chem.* **106**, 23-29 (2003).
- M. Ichikawa, Y. Matsuzawa, Y. Koyama and K. Yoshikawa, "Molecular fabrication: Aligning DNA molecules as building blocks", *Langmuir* **19**, 5444-5447 (2003).
- Y. Yoshikawa, M. Suzuki, N. Chen, A. Zinchenko, S. Murata, T. Kanbe, T. Nakai, H. Oana and K. Yoshikawa, "Ascorbic acid induces a marked conformational change in long duplex DNA", *Eur. J. Biochem.* **270**, 3101-3106 (2003).
- L. Zherenkova, P. Khalatur and K. Yoshikawa, "Self-Consistent Integral Equation Theory for Semiflexible Polyelectrolytes in Poor Solvent", *Macromol. Theory Simul.* **12**, 339-353 (2003).
- S-i. M. Nomura, K. Tsumoto, T. Hamada, K. Akiyoshi, Y. Nakatani and K. Yoshikawa, "Gene Expression Within Cell-Sized Lipid Vesicles", *ChemBioChem*

- 4, 1172-1175 (2003).
- Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka and K. Yoshikawa, "PEG-PLL Block Copolymers Induce Reversible Large Discrete Coil-Globule Transition in a Single DNA Molecule through Cooperative Complex Formation", *Macromolecules*, **36**, 6276-6279 (2003).
 - T. Akitaya, K. Tsumoto, A. Yamada, N. Makita, K. Kubo and K. Yoshikawa, "NTP Concentration Switches Transcriptional Activity by Changing the Large-Scale Structure of DNA", *Biomacromolecules*, **4**, 1121-1125 (2003).
 - K. Kubo, M. Ichikawa, and K. Yoshikawa, "Optically driven transport into a living cell", *Appl. Phys. Lett.*, **83**, 2468-2470, (2003).
 - Sada-Atsu Mukai, Nobuyuki Magome, Hiroyuki Kitahata, and Kenichi Yoshikawa, "Liquid/liquid dynamic phase separation induced by a focused laser", *Appl. Phys. Lett.*, **83**, 2557-2559 (2003).
 - T. Iwaki and K. Yoshikawa, "Competition between interchain and intrachain phase segregation", *Phys. Rev. E*, **68**, 031902 (2003).
 - Y. Sato, S-I M Nomura and K. Yoshikawa, "Enhanced uptake of giant DNA in cell-sized liposomes", *Chem. Phys. Lett.* **380**, 279-285 (2003).
 - M. Itou, A. Sakakura, N. Miyazawa, S. Murata, and K. Yoshikawa, "Nonspecificity Induces Chiral Specificity in the Folding Transition of Giant DNA", *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12714-12715 (2003).
 - C. H. Suresh, P. S. Vijayalakshmi, S.-i. Iwamatsu, S. Murata and N. Koga, "Rearrangement of the Cyclohexadiene Derivatives of C₆₀ to Bis(fulleroid) and Bis(methano)fullerene: Structure, Stability and Mechanism.", *J. Org. Chem.*, **68**, 3522-3531 (2003).
 - S.-i. Iwamatsu, F. Ono and S. Murata, "A Novel Migrative Addition Reaction of Hydrazines to the Diketone Derivative of C₆₀." *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **2003**, 1268-1269 (2003).
 - S.-i. Iwamatsu, F. Ono and S. Murata, "A Novel Ring Expansion of the Holey Ketolactam Derivative of C₆₀.", *Chem. Lett.*, **32**, 614-615 (2003).
 - M. Nagao, H. Seto, M. Shibayama, and N. L. Yamada, "Small-angle neutron scattering study of droplet density dependence of the water-in-oil droplet structure in a ternary microemulsion" *J. Appl. Cryst.*, **36**, 602-606 (2003).
 - H. Seto, H. Nobutou, N. Yamada, T. Takeda, D. Ihara, M. Nagao, and K. Inoue, "A swollen gel phase of DPPC aqueous solution with small amount of ethanol observed at moderate pressure and temperature" *J. Appl. Cryst.*, **36**, 607-611 (2003).
 - K. Funayama, T. Imae, H. Seto, K. Aoi, K. Tsutsumiuchi, M. Okada, M. Nagao,

- and M. Furusaka, "Fast and Slow Dynamics of Water-Soluble Dendrimers Consisting of Amido-Amine Repeating Units by Neutron Spin Echo." *J. Phys. Chem. B* **107**, 1353-1359 (2003).
- T. Takeda, N. L. Yamada, H. Seto, and Y. Kawabata, "Development of spin flippers with steady current for the TOF-NSE spectrometer" *Physica B* **335**, 211 - 214 (2003).
 - M. Imai, K. Nakaya, T. Kawakatsu, and H. Seto, "Dynamical nature of least stable fluctuation modes of lamellar structure observed in a nonionic surfactant / water system" *J. Chem. Phys.*, **119**, 8103 (2003).
 - T. Iwataki, S. Kidoaki, T. Sakaue, and K. Yoshikawa, "Competition between compaction of single-chains and bundling of multiple", *J. Chem. Phys.*, **120**, 4004-4011 (2004).
 - M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, and Y. Baba, "Nanospheres for DNA separation chips", *Nature Biotech.*, **22**, 337-340 (2004).
 - I. Rychkov and K. Yoshikawa, "Nonlinear rheological behavior associated with structural transitions in block copolymer solutions via nonequilibrium molecular dynamics", *J. Chem. Phys.*, **120**, 3482-3488 (2004).
 - A. A. Zinchenko, V. G. Sergeev, K. Yamabe, S. Murata, and K. Yoshikawa, "DNA Compaction by Divalent Cations: Structural Specificity Revealed by the Potentiality of Designed Quaternary Diammonium Salts", *ChemBioChem*, **5**, 360-368, (2004).
 - I. Rychkov and K. Yoshikawa, "Structural Changes in Block Copolymer Solutions under Shear Flow as Determined by Non-Equilibrium Molecular Dynamics", *Macromol. Theory Simul.*, **13**, 257-264 (2004).
 - S.-i. Iwamatsu, T. Uozaki, K. Kobayashi, S. Re, S. Nagase and S. Murata, "A Bowl-Shaped Fullerene Encapsulates a Water into the Cage.", *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 2268-2269 (2004).
 - T. Harada and K. Yoshikawa, "Fluctuation-response relation in a rocking ratchet", *Phys. Rev. E*, **69**, 031113 (2004).
 - Y. Kawabata, M. Nagao, H. Seto, S. Komura, T. Takeda, D. Schwahn, N. L. Yamada, and H. Nobutou, "Temperature and pressure effects on the bending modulus of monolayers in a ternary microemulsion" *Phys. Rev. Lett.*, **92**, 056103 (2004).
 - M. Ichikawa, N. Magome and K. Yoshikawa, "Rhythmic growth and collapse of a micro water droplet.", *Europhys. Lett*, **66**, 545-551 (2004).

- A. A. Zinchenko, V. G. Sergeyev, V. A. Kabanov, S. Murata, and K. Yoshikawa, "Stereoisomeric Discrimination in DNA Compaction", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **43**, 2377-2381 (2004).
- T. Sakaue, "Emergence of multiple tori structure in a single polyelectrolyte chain", *J. Chem. Phys.*, **120**, 6299-6305 (2004)

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：5件（CREST研究期間累積件数：7件）