「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

多種多様な分子からなる生体内では、生体高分子の高次構造と機能が密接に結びつき、かつ生体高分子を中心に無数の化学反応が機能的に結びついたネットワークが形成されて、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をみなすことができる。これらの生体内現象は、自己発展する分子複合系、換言すれば、ナノ秩序体が機能発現する“場”を構築する上でも、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ｎｍ～μｍ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、フラーレンをベースとしたπ－π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

今年度も興味深い研究成果が多数得られてきており、以下に主要な研究成果を報告する。研究を効率的に推進するための戦略として、研究テーマを以下の各項目に分けて、研究目標の明確化を計った。それと同時に、テーマ間の横断的連携を密にすることで、研究の方法論や実験技術・理論解析の手法などを活用し、研究の飛躍的発展を期した。

１．高分子鎖の高次構造

２．高分子鎖の高次構造と機能発現
３．細胞モデルー*de novo* Cell へのアプローチ
４．生命現象へのアプローチー分子複合系における非線形ダイナミクスの解明
５．光ピンセットを用いた新たな研究手法の開発
６．光ピンセットを用いた分子複合系の非線形ダイナミクス
７．レーザートラップによる空中実験へのアプローチ
８．化学反応による化学／機械エネルギー変換
９．自然があみだした計算原理－化学反応場の形状を利用した演算
10．分子複合系に機能を付与する新規化合物の創成

従って、研究の進展にともない、各研究サブグループ間の相互協力による研究成果が数多く得られてきている。以下に平成１４年度の研究成果を、研究テーマの各項目毎に解説する。各研究成果毎に担当研究メンバーおよび担当研究サブグループを示す。

2-1．高分子鎖の高次構造

哺乳動物細胞由来長鎖DNAの all-or-none折り畳み転移[19]

（研究メンバー：吉川祐子ら、名古屋大学医学部病態制御研究施設 神戸俊夫講師との共同研究／研究サブグループ：A）

水溶液中でDNA分子は、ポリアミンをはじめとする種々の凝縮剤を作用させると、ランダムなコイル状態から二重らせん構造を保ったままコンパクトな凝縮状態へと変化する。このような*in vitro*での分子内相転移現象は、生体中においてDNAの高次構造がどのように制御されているかを理解する上でも非常に重要である。本研究では、ブタ肝臓から20μm程度の長さのDNAを抽出し、溶液中での折り畳み凝縮転移を直接蛍光顕微鏡で観察し、さらに詳細な凝縮構造を電子顕微鏡で観察することによって、以前に報告したT４ファージDNAの結果と比較検討した。

結果として、

１．ブタ肝DNAは、T4ファージDNAと同様、ポリアミンによってall-or-noneの凝縮転移をすることが明らかとなった。
２．電子顕微鏡による微細な凝縮構造の観察から、T4ファージDNAで観察されたのと同様、トロイドやロッド状の凝縮高次構造が観察された。
３．以上から、DNA複合体の高次構造は、DNAの種類よりもむしろ凝縮剤の種類が決定要因となっていることが示唆された。

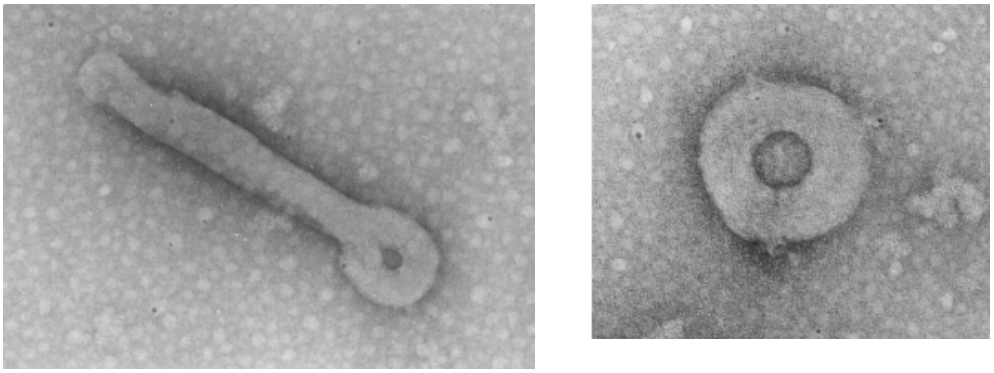


図1. スペルミジンによって凝縮させたブタ肝抽出DNAの透過型電子顕微鏡像

長鎖DNAの蛍光・原子間力顕微鏡像とそのスケーリング解析[3]

（研究メンバー：義永、木戸秋ら／研究サブグループ：A）

T4 DNAのような長鎖DNAは蛍光標識色素を用いることにより可視化することができ、単一高分子鎖として粗視化した構造をリアルタイムで計測することができる。この方法は単分子レベルの不均一性を観測するために有効な実験法であるが、光のにじみの効果のため数百nm以下のスケールでの構造は観察することはできなかった。一方、原子間力顕微鏡(AFM)を用いると、nmスケールの分子の微細構造を測定できるが、AFMを用いるにはサンプルを表面に吸着させる必要があり、溶液中での構造と同一であるかを確認するのは困難であった。

本研究ではこれらの装置を組み合わせて相補的に用いることにより同一分子の粗視化された構造とミクロな構造の画像をはじめて得ることができた。この方法により、溶液中でのDNAのダイナミクスを観測した後、同一分子のより微細な構造を可視化することができる。

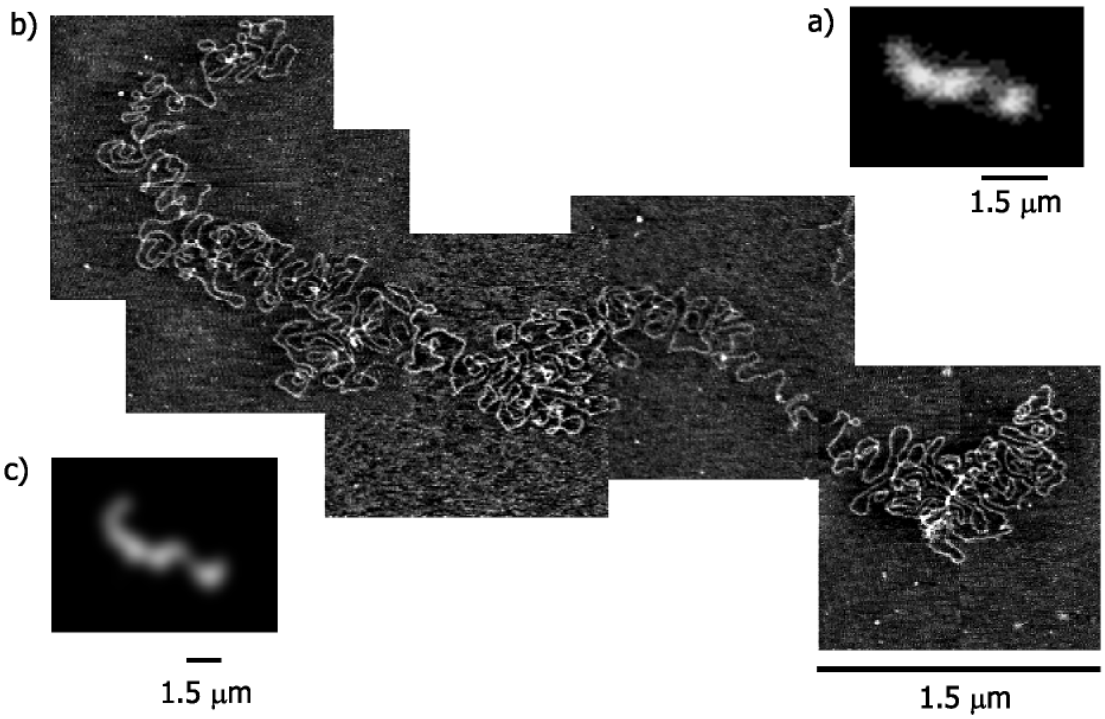


図２．長鎖DNAの蛍光顕微鏡像(a)とその同一分子の原子間力顕微鏡像(b).(c)は(b)のひもに沿った座標データから再構築した粗視化像である。

得られた画像を解析することにより、蛍光画像での輝度分布がミクロな高分子セグメント密度揺らぎに相当し、端点間距離Rと鎖に沿った長さLとの間のスケーリング指数 ν（$R \sim L^{\nu}$）が$\nu \sim 0.50$となる通常の排除体積鎖に比べて密な領域がこの粗視化したスケールで存在することを明らかにした。

本研究の方法を用いることで、今後DNAの様々な凝縮構造（トロイドやロッド、あるいは分子内相分離状態など）の微視的様子が得られることが期待できる。

pH変化によるDNA高次構造のスイッチング[9]

（研究メンバー：牧田ら／研究サブグループ：A）

DNAの高次構造変化によって遺伝子発現の調節が可能になる長さ、すなわち数十ー数百kbpの遺伝子群単位の長さのDNAの高次構造変化（凝縮／脱凝縮転移）を、細胞内環境に近い溶液条件で制御し、その様式、要因を解明することは重要な研究課題となっている。本研究では、その最も基本的な因子の一つであるプロトン（H^+）の影響を検討した。ゲノムDNAは通常ヒストンなどの塩基性タンパク質と結合して折り畳まれて存在しているため、DNA単独に対しての効果をみるのではなく、細胞内でDNAの折り畳みに関与している物質との相関も含めて、pHが及ぼすDNA高次構造への影響を、蛍光顕微鏡を用いた単分子観察法によって明らかにした。

DNAの折り畳みには、4価の陽イオンとして原核・真核細胞内に普遍的に存在するスペルミンを用いた。溶液のpHを一定（pH 7.0）にした場合、スペルミンの添加によって長鎖

DNA分子は膨潤した状態から折り畳まれて高密度に凝縮した状態へと、中間の状態を経ることなく不連続に高次構造が変化した。また、スペルミン濃度を一定（7.5 μM）にし、溶液のpHを変化させた場合、弱酸性側では完全に凝縮状態、弱塩基性側では完全に膨潤した状態というように、中性付近のpHにおいてDNA分子は不連続な凝縮／脱凝縮転移を生じた。スペルミンが持つ４つの酸解離定数から、pH変化に伴う各価数のスペルミンイオンの存在比を計算した結果、pH上昇によって4価のスペルミンの存在比が急激に減少するpH領域とDNAの高次構造転移が生じるpH領域はほぼ一致し、pH変化に伴うDNA分子の高次構造変化の主要因は、４価のスペルミン濃度であると推測した。

また、スペルミン濃度もしくはpHによるDNAの高次構造変化を比較するために、解きほぐれた状態と折り畳まれた状態が共存するようなスペルミンの濃度領域、もしくはpH領域において、各状態のDNA分子の存在比を精密に調べて解析を行った。そして、DNA凝縮に必要なスペルミン分子の個数を概算した。この結果と、対イオンによるDNA凝縮理論や実験研究、さらに最近報告されたDNA凝縮体形成時の中和度の結果を基に、長鎖DNAとスペルミンは２段階の結合様式を経て凝縮転移を生じるという仮説に至った。

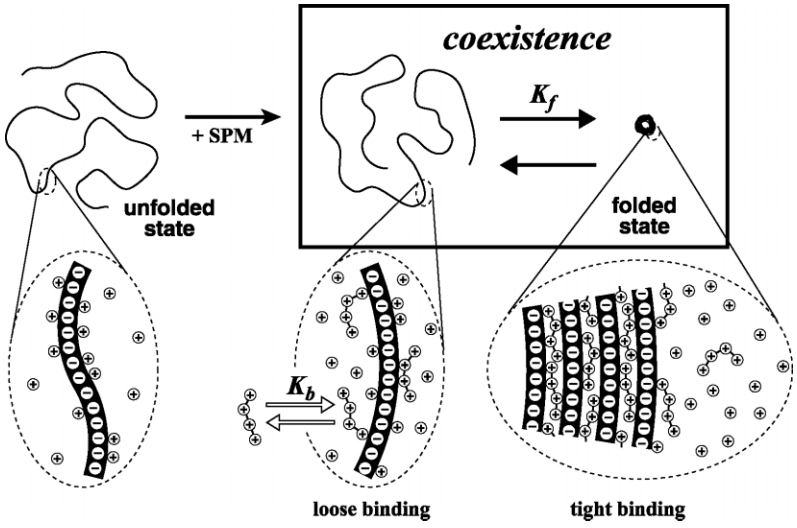


図３．スペルミンとＤＮＡとの２段階の結合様式の模式図

<u>カチオン性ゲルを用いた巨大二重鎖DNAの高次構造・集合パターン制御[23]</u>

（研究メンバー：木戸秋ら、モスクワ大Starodoubtsev教授との共同研究／研究サブブループ：A）

本研究では、電解質高分子鎖のナノ秩序構造制御の方法論の拡充を目的とし、巨大二重鎖DNA（ポリアニオン）のpoly(diallyldimethylammonium chloride)ハイドロゲル（PDADMAカチオン性ゲル）上での高次構造および集合パターンの特性解析を行った。互いに反対電荷を有するポリマーとゲルマトリックスとの相互作用系は、種々の生体材料の作製やその使用の際などにもよく見られる系であるが、その際のポリマーの高次構造挙動とその制御方法についての知見は限られている。この課題に対して特に本研究では巨大二重鎖T4ファージDNAをモデル高分子電解質として活用し、蛍光顕微鏡を用いたDNA分子の直接観察法により、上記PDADMAカチオン性ゲル上でのT4 DNAの単分子凝縮と多分子凝集体の形成について調べた結果、次の4種の特徴的な構造形成が見られることがわかった（図４）。（a）の単分子凝縮構造はDNA塩基濃度20 μM溶液をゲル表面上に滴下することにより形成

された。（b）の波状多分子集合体および（c）のネットワーク状多分子集合体構造は低膨潤状態のゲル上にそれぞれDNA塩基濃度60、20 μM溶液を滴下した際のゲルのエッジ領域に形成される。（d）のファイバー状多分子集合体構造はDNA塩基濃度20 ・M溶液をゲルに予め作製した流路に沿って強制的に一定の流速で流す際のその流れの効果により形成された。

これらの各構造はポリアニオンDNA分子とカチオン性ゲルとの間で形成されるポリイオンコンプレックスの高次構造および集合体構造の多様性を示す。また、このような構造の多様性は、電解質高分子鎖のナノ・メゾスコピック構造の制御における、反対荷電ゲルマトリックス表面という場の活用の有効性を示唆するものであり、その活用は電解質高分子鎖の高次構造・集合パターン制御の基礎技術の一つとなり得るものと期待される。

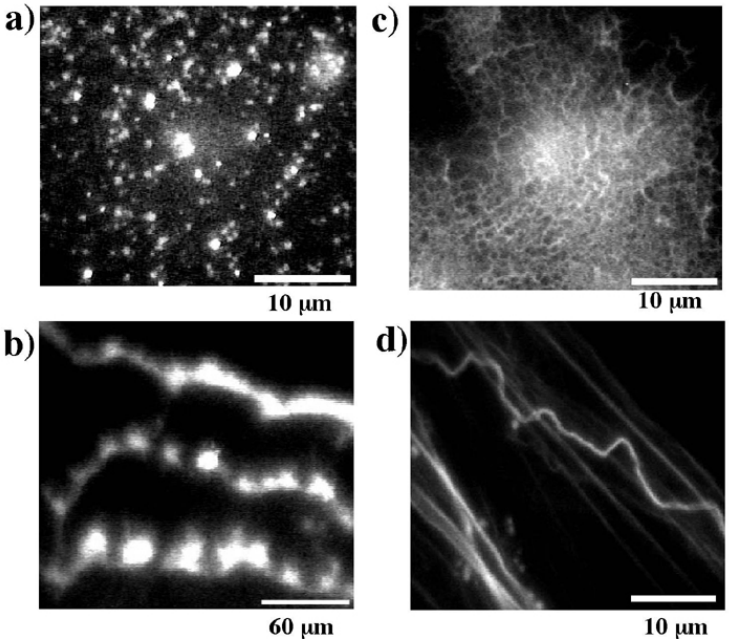


図４．PDDMA上におけるT4 DNAの高次構造制御。a）単分子凝縮体。b）波状多分子集合体。c）ネットワーク状多分子集合体。d）ファイバー状多分子集合体。

わずかに架橋したカチオン性ヒドロゲルによるDNA二次構造の認識[6]

（研究メンバー：Zinchenkoら、モスクワ大Kabanov教授との共同研究／
研究サブグループ：Ａ、Ｃ）

ポリカチオン性線状高分子はDNAのアニオン部と相互作用して二本鎖あるいは一本鎖DNAの凝縮を引き起こすことがわかっている。今回、わずかに架橋したカチオン性ヒドロゲルは二本鎖DNAと一本鎖DNAを容易に識別できることがわかった。二本鎖DNAはヒドロゲル表面上に吸着して捕捉される（図５）。コイル状態のT4 DNA分子はゲル表面の方へ拡散し（a）、コイルの一部がゲルに付着しすると（b）、数秒後には凝状態になった（c）。最終的にゲル表面全体は非常に高い蛍光強度の連続的な層で覆われた（d）。それに対して、一本鎖DNAはヒドロゲル内部に入り込む。

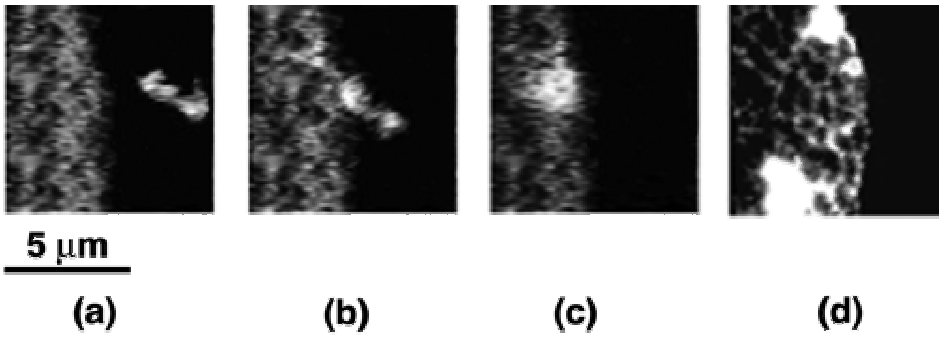
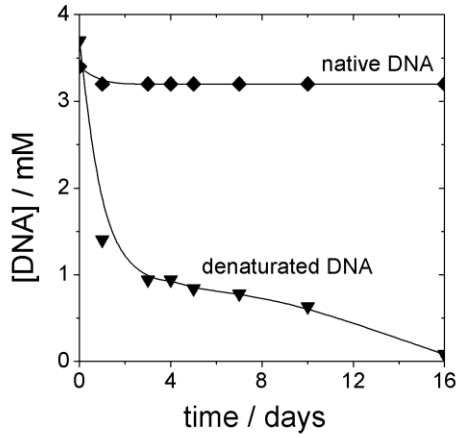


図５．蛍光顕微鏡による二重鎖DNAがヒドロゲル表面上に吸着される様子（２秒間隔）。

時間変化におけるヒドロゲル上のDNAの吸着量を図６に示す。



単一分子鎖の折り畳み転移のカイネティクス[5]

（研究メンバー：坂上ら／研究サブグループ：Ｂ）

長鎖DNAの示す重要な現象として、溶液環境の変化により空間的に広がったコイル状態から密に凝縮した状態への折り畳み転移が挙げられる。我々はこれまで、長鎖DNAの折り畳み転移は単一分子鎖レベルでは大きな密度変化を伴う不連続転移であることを蛍光顕微鏡を用いた単一分子観察による実験から明らかにしてきた。また、一般にDNAのような堅い高分子鎖の折り畳み転移は不連続転移になることを理論的に示してきた。今年度は、この堅い高分子鎖の折り畳み転移の速度過程をBrownian dynamics simulationにより解析した。モデルとしては、バネ・ビーズ型のモデルに曲げ弾性エネルギーを付加することにより、堅さの効果を取り入れ計算機シミュレーションを行った。

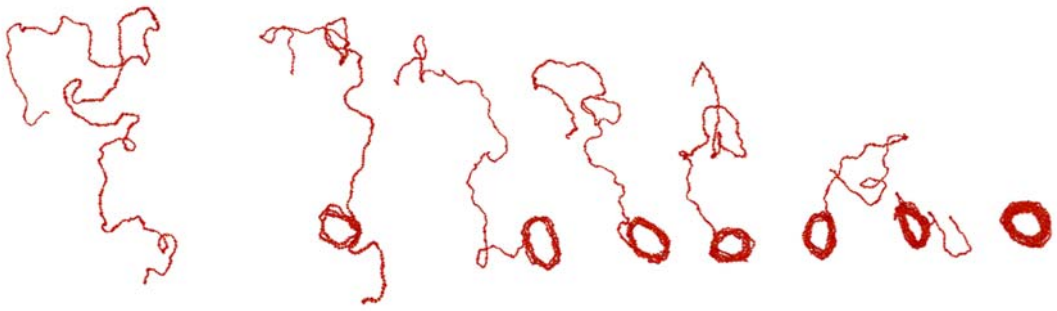


図７．Brownian dynamics simulationによるモデル高分子鎖の折り畳み過程

その結果、堅い高分子鎖は溶媒環境が貧溶媒化した後も、その急冷の度合いが適当であれば有限時間準安定状態のコイル状態として存在し得ること、その後、鎖上のある部分に臨界核が形成され、それが残りの部分を巻き取って成長していくというものが堅い高分子鎖の折り畳みの典型的なプロセスであることが分かった。すなわち、堅い高分子の折り畳み転移では、単一分子レベルでnucleation-growth過程により秩序構造が形成されることを明らかにした。

図７にシミュレーションの典型的なスナップショットを示す。ここで、臨界核が残りの部分を巻き取っていく結晶成長過程は、高分子という一次元性を反映して、ほぼ一定速度で境界が進行する等速度過程であることも分かった。

多分子凝縮体形成のメカニズム

（研究メンバー：坂上ら／研究サブグループ：Ａ，Ｂ）

DNAの折り畳み転移はこれまで膨大な研究が為されてきているが、単一分子鎖でおこる凝縮と複数のDNA鎖で凝縮構造を形成する場合との区別が明瞭ではなかった。溶液中のDNA濃度が高い条件下ではDNA分子間の相関が重要になってくるためDNA濃度が低い場合とは本質的に異なった凝縮転移の起こる事が予想される。我々は、これまでに得られてきたDNA単一分子鎖レベルでの折り畳み転移の知見を基に、DNA多分子の凝集転移のメカニズム、その単一分子折り畳みとの類似点、相違点を明らかにするために実験的、理論的研究を行った。DNAが希薄な場合（[DNA]= 0.1μM）、凝縮剤非存在下ではコイル状態のDNA分子が観察される（図８，a）。ここに凝縮剤として3価のカチオンであるスペルミジンを150μM加えると、凝縮したDNA分子とコイル状のDNA分子とが共存した状態が観察された（図８，ｂ）。DNA濃度が高い場合（[DNA]=10μM）、凝縮剤非存在下ではDNAはコイル状態をとり、分子同士が重なり合う程度の濃度となっている（図９，a）。ここにスペルミジンを150μM加えると、単一分子での凝縮体、多分子からなるバンドル構造、コイル状態のDNAの3状態が共存している様子が観察された（図９，ｂ）。

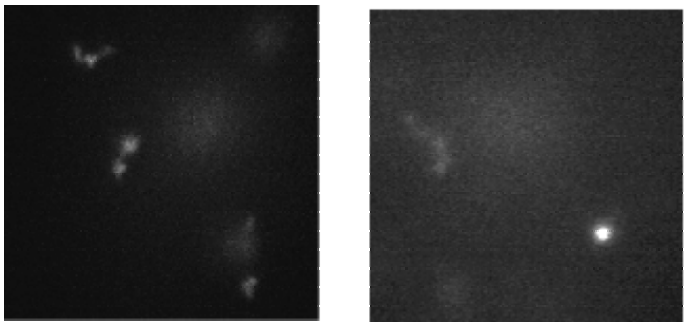


図８．DNA濃度が低い条件下、[DNA]=0.1μMでのDNA蛍光顕微鏡像。（a）[SPD(3+)]=0μM。（b）[SPD(3+)]=150μM。コイルと単分子凝縮体（明るい球状に見えるもの）が共存している。

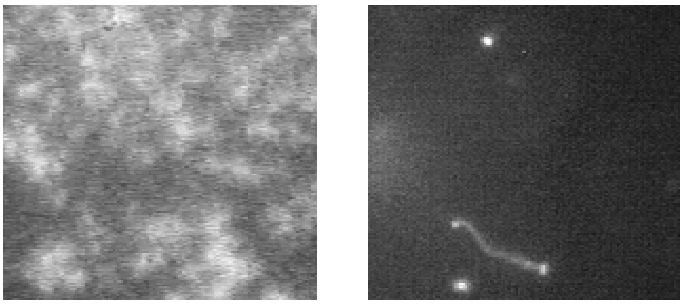


図９．DNA濃度が高い条件下、[DNA]=10μMでのDNA蛍光顕微鏡像。（a）[SPD(3+)]=0μM。DNA分子は全てコイル状態である。（b）[SPD(3+)]=150μM。コイル状態、単分子凝縮体、多分子からなるバンドルの3状態が共存している。

このようなDNA凝縮転移の多様性について、簡単なモデルを用いた分子シミュレーションにより検討を行った。図10にMonte Carlo simulationによるスナップショットを示す。比較的分子鎖の濃度が高いときには、半屈曲鎖は凝縮状態として鎖が配向したバンドル構造が形成された。バンドル以外にも多分子からなるトロイド構造が得られた。このような多分子鎖から形成される構造と、単分子鎖の凝縮体とが共存するのは、速度論的な効果が大きく寄与していることが明らかになった。

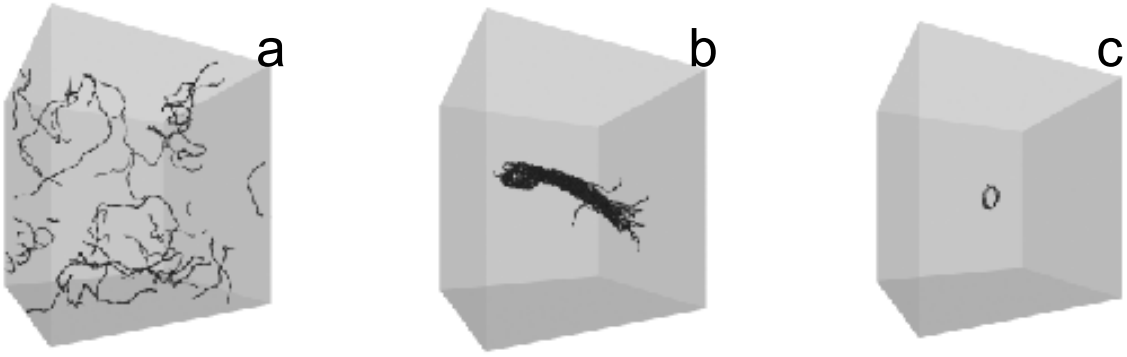


図10. Monte Carlo simulationによる多分子の半屈曲鎖からのバンドル形成（a, b）。単分子の半屈曲鎖から形成されるトロイド状の凝縮構造（c）。

DNAによるカーボンナノチューブの水溶液への可溶化[30]

（研究メンバー：中井ら、長崎大中嶋教授らとの共同研究／研究サブグループ：A）

カーボンナノチューブは化学的に安定であり水にも溶解しないので、用途は限定されていた。我々は、単層カーボンナノチューブ（直径0.8～1.2 nm、長さ1～10 μm）とサケ精

子DNA水溶液を混合し、超音波の振動を1時間与えることでナノチューブを溶液中に分散させることに成功した（図11）。ナノチューブ溶液の吸収スペクトル測定を行なったところ、DNA、ナノチューブ双方に由来するスペクトルのデータが得られた。

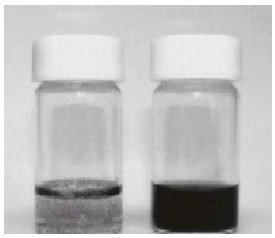


図11．左：水とカーボンナノチューブを混合したもの。ナノチューブは分散せず、水面に固まって浮いている。右：DNA水溶液とナノチューブを混合し、超音波処理を施したもの。ナノチューブは一様に分散し、溶液は黒色透明である。

また、水溶液中でのナノチューブの構造をTEMとAFMで観察した（図12）。ナノチューブは１本ずつ分散しているものの他に、若干束になっているものが見られたが、溶液中に一様に分散しているのが明確に観察された。

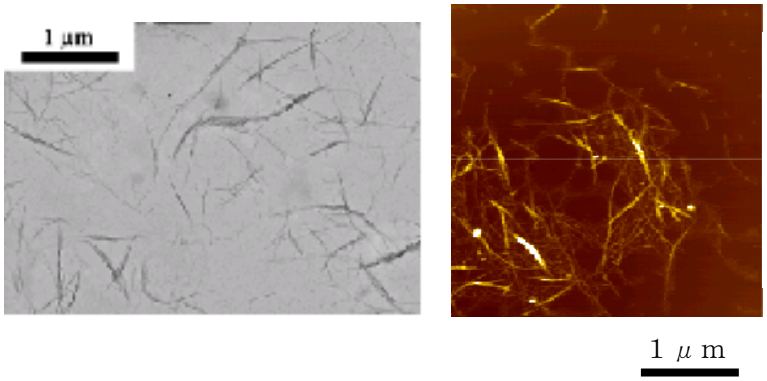


図12．水溶液中に分散したカーボンナノチューブ。左はＴＥＭ像，右はＡＦＭ像。分散しきれず束になっているものも見られる。

可溶化のメカニズムに関するDNAとナノチューブ間の相互作用については、今後の研究課題であるが、明らかとなった現象から推察すると、ナノチューブのπ-π結合と超音波処理により二重らせんのほどけたDNAが相互作用しているものと考えられる。本研究において、ナノチューブが水溶液中に分散しうる条件を明らかにしたことは、医学、生物学、化学等の分野における幅広い応用が期待できる成果である。

2-2．高分子鎖の高次構造と機能発現

DNAの高次構造転移と生化学活性の相関[13]

（研究メンバー：小穴、湊元、吉川祐子ら／研究サブグループ：Ａ，Ｂ，Ｄ）

これまでに我々の研究グループでは、ポリアミン等の凝縮剤の添加によって個々のDNA分子がランダムコイル状態からコンパクトな凝縮状態へ不連続に形態変化する事を蛍光顕微鏡法による長鎖DNA単一分子観察を通して明らかにしてきている。今回、凝縮剤 として4価のポリアミンであるスペルミンを用い、スペルミンの添加によって引き起こされるDNA高次構造変化とDNA切断酵素に対する感受性の相関を単分子観察を通して調べた。蛍光顕微鏡法によるDNA単分子観察より、スペルミン濃度が80μMを超えると個々のDNAは急激に凝縮し、非常にコンパクトに折り畳まれた形態を取ることが分かった（図13）。また、同じ条件のDNAにDNA切断酵素を加えて切断反応を行ったところ、DNAが高次構造転移を起こ

すスペルミン濃度（80-90μM）を境に、酵素によるDNA切断が急激に阻害されることが分かった（図14）。

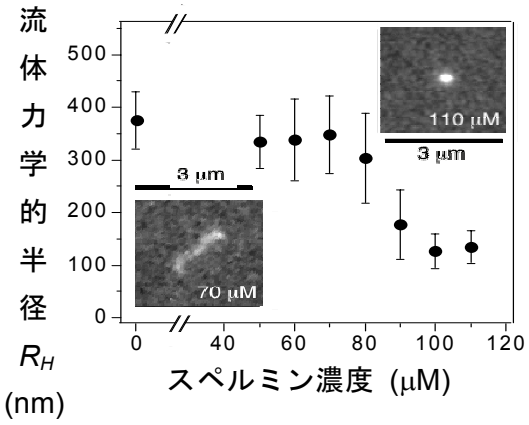


図13．DNA(全長約16μm，48.5kbp)の流体力学的半径（DNA分子の広がりを表す）の凝縮剤濃度依存性。挿入図はガラス基盤に吸着したランダムコイル状態のDNA(スペルミン：70μM)と凝縮状態のDNA(スペルミン：

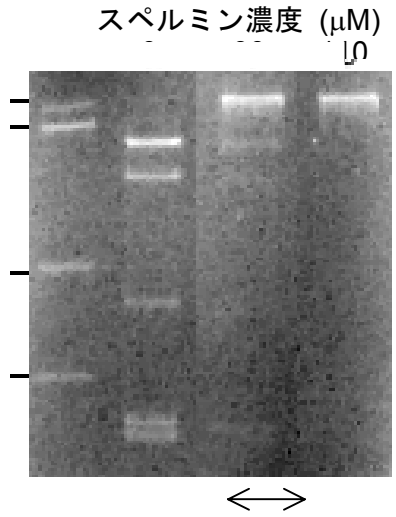


図14．酵素によるDNA（全長約16μm，48.5kbp）切断反応の凝縮剤濃度依存性。左端は分子量マーカー。

以上、DNAの生化学的性質が高次構造変化によって制御されていることを単分子レベルで初めて明らかにした。理論グループの研究から、一般に半屈曲性高分子鎖は、このような高次構造転移を起こすことが示されており、今回のDNAを用いた実験は、高次構造制御による高分子機能制御のモデル実験となるものである。

DNAの高次構造変化による転写活性のＯＮ／ＯＦＦスイッチ

（研究メンバー：湊元、Luckelら／研究サブグループ：Ａ，Ｄ）

高分子鎖の高次構造と機能発現の関連性を明らかにすることを目指し、これまで我々は、凝縮剤の種類・濃度、温度変化、pH変化等による単一高分子鎖（巨大DNA単分子鎖）の高次構造の制御方法を確立してきているが、今回、世界に先駆けてDNA単分子鎖の高次構造と遺伝子発現の関係を明らかにした。

水溶液中のDNA単分子鎖は周りの環境の変化（イオン強度、温度等）により、解けた状態（ランダムコイル状態）と高度の折り畳まれた状態（ドーナツ状に折り畳まれた秩序構造等をとる。凝縮状態）の２状態間で不連続な高次構造変化を示す。DNA２重らせん中の塩基配列から遺伝情報を読み出すためには一度２重らせんが解けなければならず、このため、DNA高次構造は遺伝子発現と密接に関係していると考えられてきたが、直接的な証拠が得られておらず、未解明のままであった。我々は、従来の遺伝子発現実験の手法にDNA単分子鎖観察を組み合わせた実験を行うことで、DNA高次構造と遺伝子発現の関係を直接的に解明した。具体的には、凝縮剤として、４価のカチオンであるスペルミンとポリエチレングリコールをそれぞれ用い、DNAの高次構造を制御しながら遺伝子発現実験を行った。

図15に得られた結果を示す。コイル状態のときはDNAから遺伝情報が読み出されているが、一方の凝縮状態では読み出されていないことが明確に示されている。

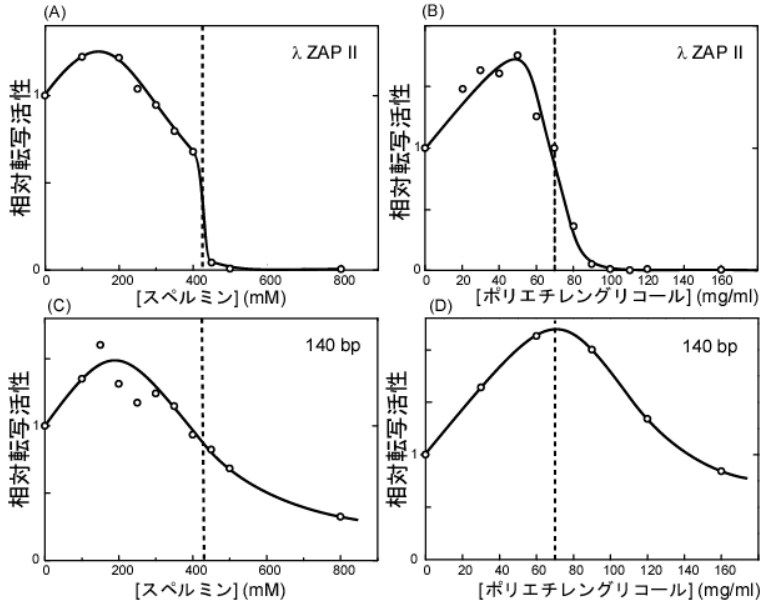


図15．DNAの高次構造変化における遺伝子転写活性の変化．　λＺＡＰⅡＤＮＡ((A),(B))および１４０塩基対のＤＮＡ断片((C),(D))を鋳型として転写反応を実施したときの、相対転写活性のスペルミン四塩酸塩濃度依存性((A),(C))およびポリエチレングリコール濃度依存性((B),(D))．

エネルギー状態でＯＮ／ＯＦＦスイッチされる転写活性

（研究メンバー：秋田谷、湊元、久保、牧田、山田ら／研究サブグループ：Ａ：Ｄ）

転写活性が核内DNAやクロマチンの大規模な高次構造変化に対応して、ＯＮ／ＯＦＦ的に調節されていることは良く知られている。またこれらの現象が、細胞内のエネルギー状態などの環境因子によって調節されることが近年明らかにされ、転写活性調節機構とDNA高次構造との関係を探ることは興味深い。一方、転写の分子機構については現在まで多くの分子生物学的知見が得られているが、その殆どは転写調節タンパクとDNAとの“鍵と鍵穴”的相互作用に注目した、“局所”DNA構造の解析に集中しており、DNAの高次構造変化やＯＮ／ＯＦＦ的な活性調節との関連は未だ不明な点が多い。これまで我々の研究グループでは、長鎖DNAが、ときほぐれたコイル状態と凝縮状態間で不連続転移（折り畳み転移）、すなわちＯＮ／ＯＦＦスイッチングを起こすことを明らかにしてきている。また、DNAの折り畳み転移がエネルギー状態の変化によっても引き起こされることを明らかにしている。本研究では、長鎖DNAの高次構造変化を顕微鏡観察することにより、ＮＴＰ(ヌクレオチド三リン酸)や多価カチオンなどの環境因子によって誘起されるDNAの高次構造変化と転写活性との関係を解析した。

T7 RNA polymerase による転写活性を、長鎖DNA（40 kbp）と持続長相当の短鎖DNA（140 bp）を鋳型として比較した。長鎖DNAとしてT7 promoter 配列を含むλZAPII、短鎖DNAはλZAPII上、T7 promoterを挟んで増幅したPCR productを用いた。転写産物ＲＮＡをRiboGreenで蛍光標識して定量し、相対転写活性とした。同一条件下でＤＡＰＩ染色したDNAを蛍光顕微鏡観察し、高次構造変化と転写活性とを比較した。

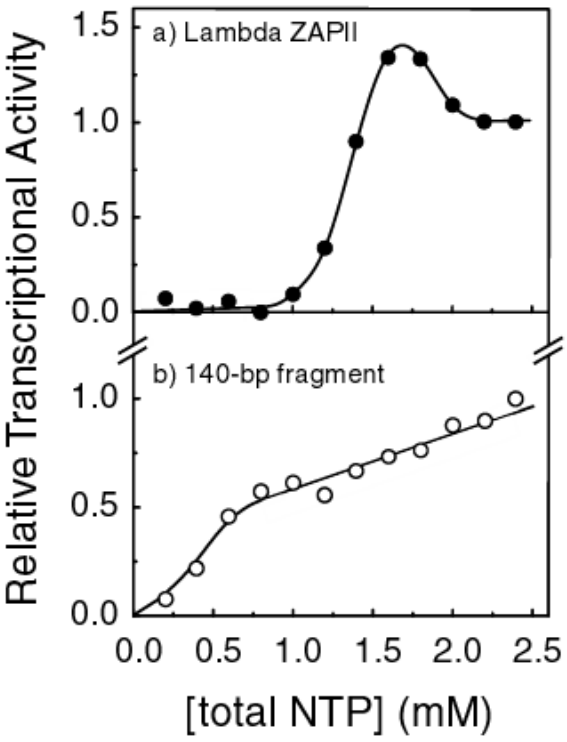


図16．相対転写活性の総ＮＴＰ濃度依存性．鋳型ＤＮＡ：a) λZAPII DNA, b) 140-mer断片．[NTP] = 2.4 mMにおける転写活性を１とした相対値．

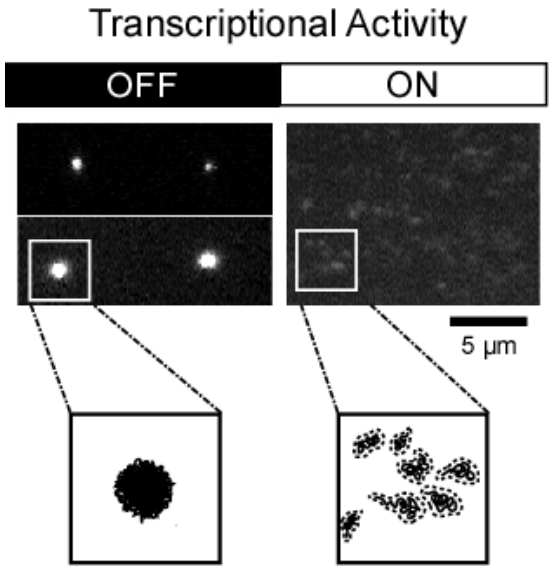


図17．転写の抑制(OFF)状態と活性化(ON)状態でのλZAPII DNAの構造．（OFF状態： [NTP]=0.2 mM. ON状態：[NTP]=2.4 mM.）上図はガラススライド表面に吸着したDNAのDAPI染色蛍光顕微鏡像．下図は構造の模式図．

転写活性のＮＴＰ濃度依存性を図16に示す。40 kbpのλZAPII において、ＮＴＰ濃度の狭い範囲で転写活性が急激に変化した。また0.1 mM 以下で転写活性がほぼ完全に抑制された。転写活性のＯＮ／ＯＦＦ状態で、鋳型DNAの蛍光顕微鏡像を観察した（図17）。転写活性が完全に抑制される条件(OFF状態：[NTP = 0.2 mM])では 、λZAPII DNA は単分子、あるいは多分子で凝縮しているのに対し、活性が高い条件(ON状態：[NTP = 2.4 mM])では、ときほぐれたコイル状態に転移していることが明らかとなった。転写活性が、大規模なDNA高次構造変化を通して、ＮＴＰ濃度という環境因子によってＯＮ／ＯＦＦスイッチされることが示された。本研究により、DNAの大規模な高次構造変化を通した、細胞環境因子による転写因子非依存性の転写機構が存在し、転写因子依存性の局所的な転写機構とは異なる階層として機能し得ることが明確に示された。

2-3. 細胞モデル－*de novo* Cell へのアプローチ

細胞サイズリポソームに内包した長鎖DNAのダウノマイシンによる切断と膜の小胞化[7]

（研究メンバー：吉川祐子ら、名古屋大学医学部病態制御研究施設 神戸俊夫講師との共同研究／研究サブグループ：Ａ，Ｄ）

ダウノマイシンはアントラサイクリン系の抗生物質で急性白血病の治療薬として知られており、その制ガン作用はアポトーシスに基づくものとして考えられている。これまでに

分子レベルの作用としては、２重鎖DNAにインターカレートすることによるDNAの複製や転写活性の阻害、フリーラジカル発生によるDNAの切断や、膜脂質の過酸化、トポイソメラーゼIIの阻害作用等が報告されている。しかし、細胞死を引き起こすシナリオについては、未だ不明な点が多く残されている。有力的な説としては、核内DNAが生体側の主たる標的であるとの考えがある。一方、膜に対しての直接的な作用が、薬物活性に密接に関わっているとの報告もある。しかしながら、実際の細胞において、DNAや膜にのどのように作用するのかといった点についてはいまだ議論が多い。

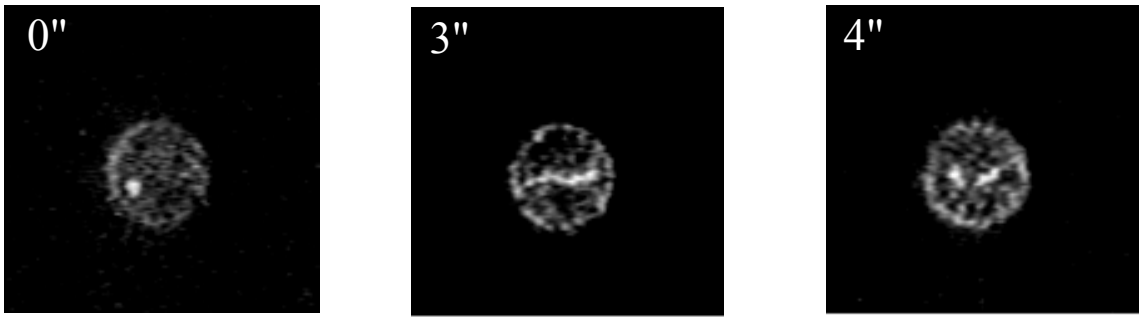


図18. ダウノマイシンによる細胞サイズリポソームに内包した長鎖DNAの引き伸ばしと切断

本研究では、蛍光顕微鏡による単分子観察法を用いて、細胞モデル系に対するダウノマイシンの作用を調べた。
結果として、ダウノマイシンは、膜に作用して、小胞化、断片化等の顕著な形態変化をひきおこし、リポソーム内のDNAに対しては、切断反応を引き起こすことが明らかとなった。

デンドリティックポリリジン／DNA複合体の時間依存的成長および複合体サイズ－遺伝子導入効率の相関[28]

（研究メンバー：木戸秋ら、長崎大学工学部青柳東彦教授、新留琢郎助手との共同研究／研究サブグループ：Ａ，Ｄ）

遺伝子治療の実用化には、より安全で高効率な遺伝子導入システムの開発が必須であり、安全面を考慮した非ウィルス性核酸キャリアーの研究・開発が期待されている。これまでに我々は、非ウィルス性核酸キャリアーとしてリジン残基を枝分かれ単位としてもつデンドリティックポリリジンを合成し、その第6世代（KG6）が培養細胞に対して非常に高い遺伝子導入能を示しかつ細胞毒性が低いことを明らかにしてきた。一方で新規核酸キャリアーの開発や遺伝子導入能の向上を目的とした研究が盛んに行われている中、その詳細な導入メカニズムについてはあまり明らかにされていない。そこで今回、KG6を用いた遺伝子導入について、KG6/DNA複合体の形状およびサイズの時間変化と遺伝子導入効率との相関についての検討を行った。

KG6/DNA複合体の形状およびサイズの時間変化は蛍光顕微鏡、原子間力顕微鏡による観察と動的光散乱によって調べた。また、遺伝子導入効率との相関についてはKG6/DNA複合

体形成のための時間（プレインキュベーション時間）およびKG6/DNA複合体が細胞と接している時間（トランスフェクション時間）を変化させてチャイニーズハムスター卵巣由来の培養細胞（CHO細胞）に対して遺伝子導入を行い、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼの活性で評価した。

KG6/DNA複合体の顕微鏡による観察の結果、KG6とDNAを混合後15分では数百ナノメートルと数マイクロメートル程度の複合体が混在していたのに対し、混合後2時間程では数マイクロメートルの大きさのもののみが観察された。この結果は動的光散乱による粒径分布の解析結果と一致しており、KG6とDNAは混合後数分のうちにまず数百ナノメートルの小さな複合体を形成した後、それらが時間依存的に凝集し、2時間程で数マイクロメートル程の大きさに成長することを示している。プレインキュベーション時間およびトランスフェクション時間を種々に変化させた遺伝子導入の結果、トランスフェクション時間が1時間までの場合、プレインキュベーション時間依存的に遺伝子発現は高くなったのに対し、トランスフェクション時間が2時間以上の場合はプレインキュベーション時間依存性がほとんど無く、遺伝子発現は高かった。これらの結果より遺伝子キャリアーとしてKG6を用いた*in vitro*での遺伝子導入では直径1-2 μm程の大きさの複合体が細胞に取り込まれやすいものと考えられる。

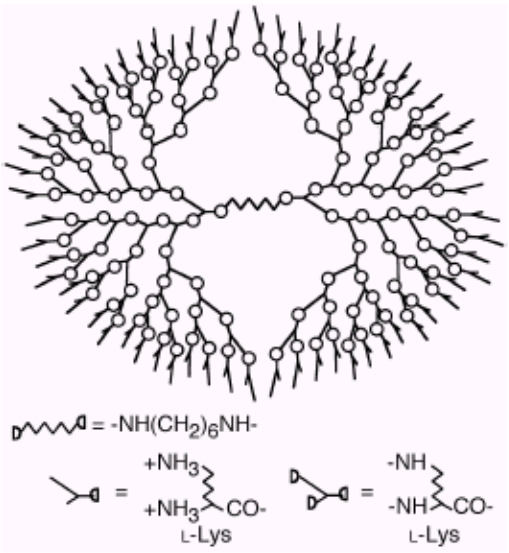


図19. デンドリティックポリリジンの構造

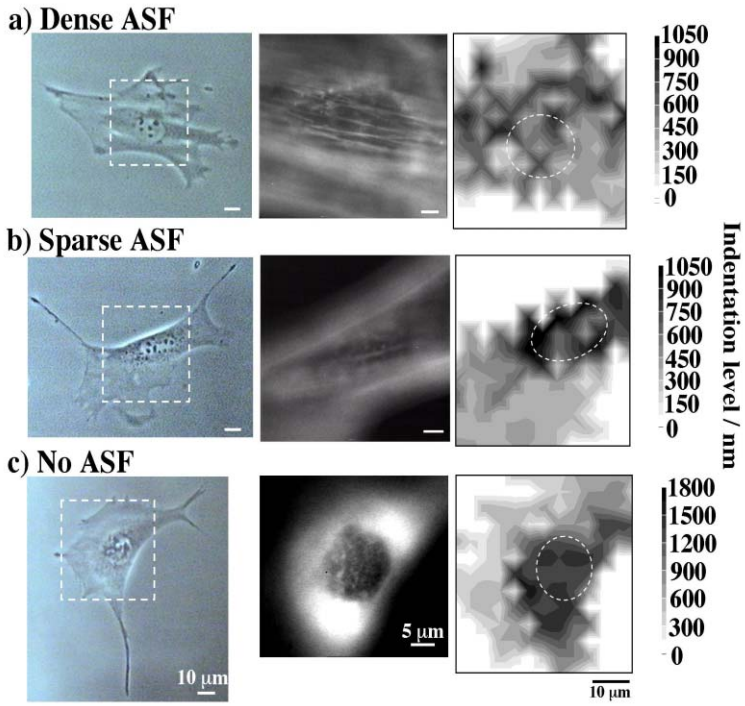
<u>蛍光・原子間力顕微鏡法による細胞骨格分布と膜弾性分布の相関解析</u>

（研究メンバー：木戸秋ら／研究サブグループ：A，D）

細胞の形態は、その増殖・分化等の機能発現に重要な影響を与えることが知られている。細胞機能調節に密接な関係を持つ細胞形態の決定メカニズムを理解することは、細胞を種々の材料表面上や三次元マトリックス中に培養して用いる再生医工学の基礎拡充において重要である。形態決定のメカニズムは現在、細胞内生化学過程と細胞の力学的特性の両面から研究されているが、特にナノレベルでの力学特性および生化学-力学間の協調機構については未だあまりよく理解されていない。我々はこの課題に対し、細胞形態決定の主要力学的三要因（細胞骨格構造・膜粘弾性・接着界面特性）間の連携・協調機構の研究を進めている。今回は、培養繊維芽細胞において観察されたアクチンフィラメントの空間分布の特徴と膜弾性分布の相関について報告する。

アクチンフィラメントの細胞内空間分布と細胞膜弾性分布の相関は、超微弱光観測用CCDカメラおよび原子間力顕微鏡の両者を組み合わせた落射蛍光顕微鏡システムを用いて調べた。マウス繊維芽細胞株（3T3-Swiss albino）をガラスベースディッシュ（底厚:100

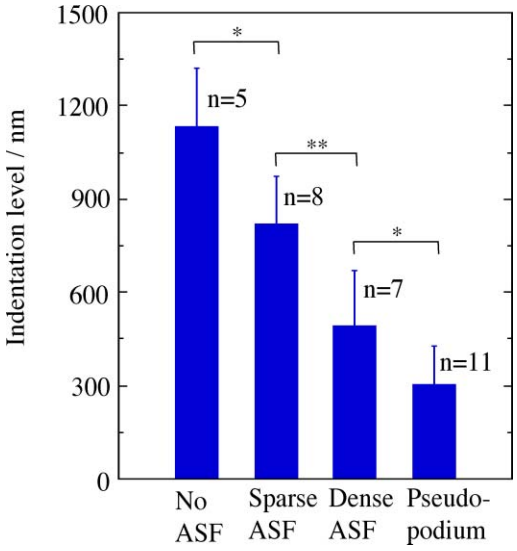
μm）に播種（1×10^3 cells/cm^2）して24ー48時間後、培養状態を維持しつつ、（1）選んだ一つの細胞上の48×48μm範囲内4μm間隔の169格子点について、原子間力顕微鏡によって等荷重下（1.5 nN）での圧入距離の連続測定（Indentation Depth under Equal Limit: IDEL 測定）にて膜弾性分布を観測後、（2）細胞を固定してアクチンをローダミンファロイジン染色し、IDEL測定を行った同じ細胞に対して油浸100倍対物レンズによるZ方向1μmきざみの輪切り観察を行ってアクチンフィラメントの空間分布を観察した。20体の細胞について頂面膜のIDEL レベル（等荷重下での圧入距離）の平均値と、頂面膜直下のアクチンフィラメント分布様式の間の対応を調べ、それらの相関を統計的に解析した。アクチン分布の特性解析については二次元フーリエ解析によるストレスファイバーの配向度の定量も行った。



1）アクチンフィラメントの細胞内空間分布：細胞骨格構造が細胞膜の弾性特性に与える影響を調べる際には、細胞骨格の細胞内立体分布を把握し、膜弾性に直接寄与する骨格成分の局在を識別することが必要である。焦点深度200 nmの油浸100倍対物レンズを用いた高Z軸分解能焦点面輪切り観察によって、ガラス表面と細胞の接着面近傍、核の周囲、および核上部・頂面膜直下のアクチン分布様式を多数の細胞について調べたところ、膜弾性の決定に直接寄与する頂面膜直下のアクチン骨格の分布様式において、ストレスファイバー（Apical Stress Fiber: ASF）の発達の度合いの異なる細胞が同一培養皿中で共存していることがわかった（図18中）。

2）膜弾性分布：　細胞上面膜の弾性分布特性を調べるために、1.5 nNの等荷重下、AFMチップにより細胞膜が受ける圧入深さを測定し、等高線プロットした（IDEL map：図18右）。膜上の異なる位置での等荷重下の圧入深さの比はヤング率の比を反映し、膜の堅さ・柔らかさの相対分布の情報を与える。IDEL測定を行った20体の細胞すべてについて、核上部膜は仮足上部膜より顕著に柔らかい傾向が認められたが、これは膜の曲率差および張力差に

起因するものと考えられる。また、核上部膜の平均IDELレベルを異なる細胞間で比較すると、核上部の堅い細胞、柔らかい細胞の顕著な分布を認めた。



3）頂面膜直下アクチンフィラメント分布様式と頂面膜弾性の相関：　20体の細胞をASFの発達度の異なる3群に分けて、その頂面膜の平均IDELレベルの比較を行ったところ（図19）、ASFの発達に伴いIDELレベルの顕著な減少が見られ、膜が堅くなる傾向が認められた。今回のIDEL測定は低分解能で行っているため、得られた平均IDELレベルは、圧入試験を行った膜位置の直下にASFが存在せずその曲げ弾性の寄与のない場合も含めた平均値となっている。そのような性質の平均IDELレベル値がASFの発達度と強い相関を有するという今回の結果は、ASFの発達が頂面膜そのものの弾性の強化に寄与する可能性を示唆するものである。

また、今回認められた、同一の培養条件下におけるASFの発達度・頂面膜弾性特性の異なる細胞の共存は、細胞の移動過程のステージの違い等を反映した細胞のアンサンブルを捉えたものと考えられる。

ガングリオシドとリン脂質の協同効果による神経様チューブとリポソームネットワークの誘導[22]

（研究メンバー：野村、小野ら、東京医歯大秋吉教授との共同研究／研究サブグループ：A）

生体において長距離の情報伝達を司る神経細胞は，チューブ状に長く伸びた構造を基本に，分岐等の多様な構造的特徴を示す。その神経細胞の細胞膜に特に多量（リン脂質比で十数%）に存在する分子であるガングリオシド(図20左上)は，糖鎖部分にシアル酸を含む糖脂質で，脳や神経細胞の分化，軸索・突起形成，シナプス形成，記憶，シナプスの老化などに深く関わっていることが知られている。また，神経細胞の分化，形態変化の過程におけるガングリオシドの糖鎖構造の変化や，ガングリオシドの外部からの添加により，神経細胞の突起形成が誘起されることが報告されている．　我々は神経細胞の特異な形態形成における生体膜中でのガングリオシドの物理化学的な構造制御因子としての機能に着目し，リン脂質とガングリオシドの協同的構造形成について検討した。細胞モデルとして，リン脂質DOPCから形成された細胞サイズリポソームにガングリオシドGM3溶液を外部から添加し，光学（蛍光，微分干渉）顕微鏡による観察を行なった。GM3のみでは大きな会合体は観察されなかったが，リポソームとGM3の混合直後に，リポソーム間がチューブ状構造体(直径～数μm)によりつながったネットワーク構造が形成された(図１右)．これまで

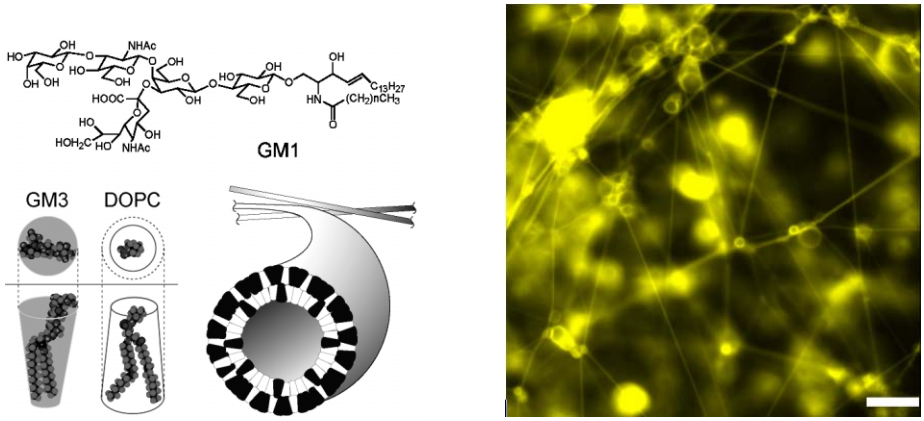


図22．左：ガングリオシドの構造と，脂質分子との協同作用によるチューブ構造の模式図．右：ＤＯＰＣ
リポソームとガングリオシドGM3（染色）との混合実験の蛍光顕微鏡像．スケールバーは10μm.

にもリポソームを力学的な手法によりチューブで連結したとの報告がなされているが，本法ではネットワーク構造が自発的に形成し，一度に多数のリポソームを連結するという新規な手法である。さらに、ガングリオシドの種類，リン脂質の種類やそれぞれの比率・添加方法により，ネットワーク形成を制御し得ることが分かった．チューブ構造は異方性のある軸比の大きな構造体であり，その形成にはミセルを形成しやすい親水部の大きなガングリオシド(曲率大)と二分子膜を形成するリン脂質(曲率小)との協同的な作用が重要であることが物理モデルから示唆された。ガングリオシドは親水基部分が分岐構造をもつことから，分子構造がチューブの直行する2つの曲率を安定化し得る構造的特徴を有していると考えられる． 以上より，神経構造にガングリオシドの多い理由として，その生化学的なシグナルとしての役割のみならず，神経細胞に見られるような特異な形態を構築するための物理化学的な構造因子としてガングリオシドが用いられうることが示唆された。

2-4．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

培養細胞系におけるHes1遺伝子の周期的発現とそのメカニズム[10]

（研究メンバー：原田ら、京大医ウィルス研影山教授との共同研究／研究サブグループ：Ｄ）

近年ニワトリやマウスなどの発生における発生・分化過程において、様々な遺伝子の発現量がリズミックに増減しており、それが体節形成のプロセスに関係していることが分かって来た（図21A）。そして最近当グループの共同研究者である京大ウイルス研の影山らはこれらの遺伝子の一つであるHes1が培養細胞系においても２時間周期で振動的に発現していることを見いだした（図21 B）。それを受けて当グループでは振動のメカニズムを理論的に考察した。Hes1タンパクは２量体を形成して自らの転写を抑制するので*hes1* mRNAとの間に負のフィードバックループを形成する。そこに何らかの形で正のフィードバック機構が入れば安定なリミットサイクル振動が維持されることをシミュレーションによって

示した（図21C）が、そこに関与する物質、あるいは隠れた第３の変数を明らかにすることは今後の課題となっている。またそもそも細胞内に遺伝子は２コピーしかなく、発現の過程自体が常に激しい揺らぎにさらされている。こうした状況で安定なリズムを刻むためには、従来の遺伝子ネットワーク的な考え方を越える何らかのメカニズムが必要になるかも知れない。私たちはDNAの高次構造転移が、遺伝子発現の制御に直接関与しているとの仮説を考えている。その当否を明らかにすることは重要な研究課題である。

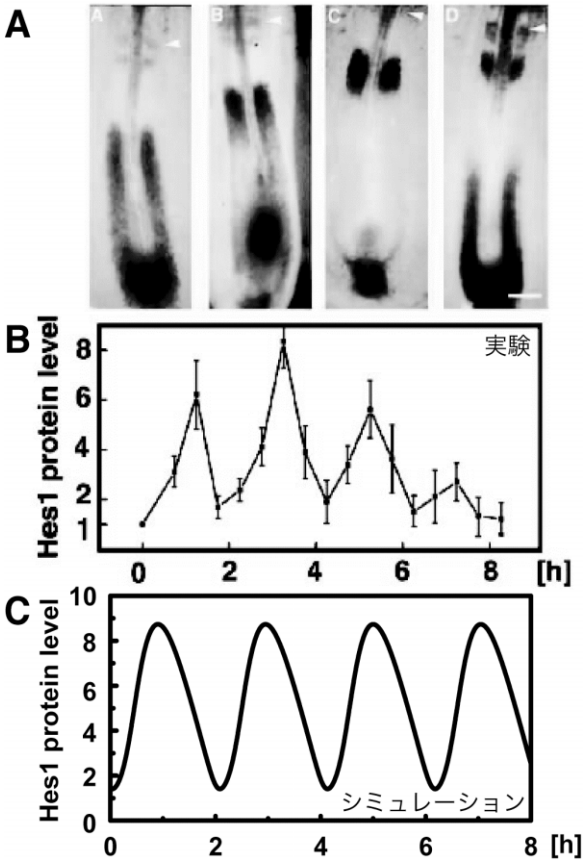


図23．(A) ニワトリ胚体節形成期における*c-hairy2* mRNA量の振動と波の伝播．c-hairy2の発現部位が波として伝播していくのが見られる．スケールバーは110μm．C. Jouve, I. Palmeirim, D. Henrique, J. Beckers, A. Gossler, D. Ish-Horowicz and O. Pourquie, Development, 127, 1421 (2000) より許可を得て転載．(B) 培養細胞系におけるHes1タンパクの発現振動．２時間周期の振動がみられる．(C) Hes1発現振動モデルのシミュレーション． 実験で見られた発現振動はHes1のフィードバックループを考慮した簡単なモデル

2-5. 光ピンセットを用いた新たな研究手法の開発

レーザー光ピンセットによるDNA分子の幾何学的マニピュレーション[8]

（研究メンバー：市川ら、豊橋技大水野教授、松澤助手らとの共同研究／研究サブグループ：A）

近年、DNA分子を部品として微細な電線やトランジスタなどのデバイスを作製しようとする試みがある。これらの研究では、基板上に多数作製したDNAの中から、良好に観察できるものを選んで観察・測定していることから非常に効率が悪い。当研究グループでは、基板上に自在にDNAを貼り付け、デザインする手法を初めて確立した。

本研究ではマニピュレーションのツールとして、閉鎖空間での三次元操作が可能な、光ピンセット（レーザートラップ）を使用した。また、粒子は接着しやすい条件下にあるので非接触的に操作できる利点が生かせる。光ピンセットでの操作を可能にするためにDNA

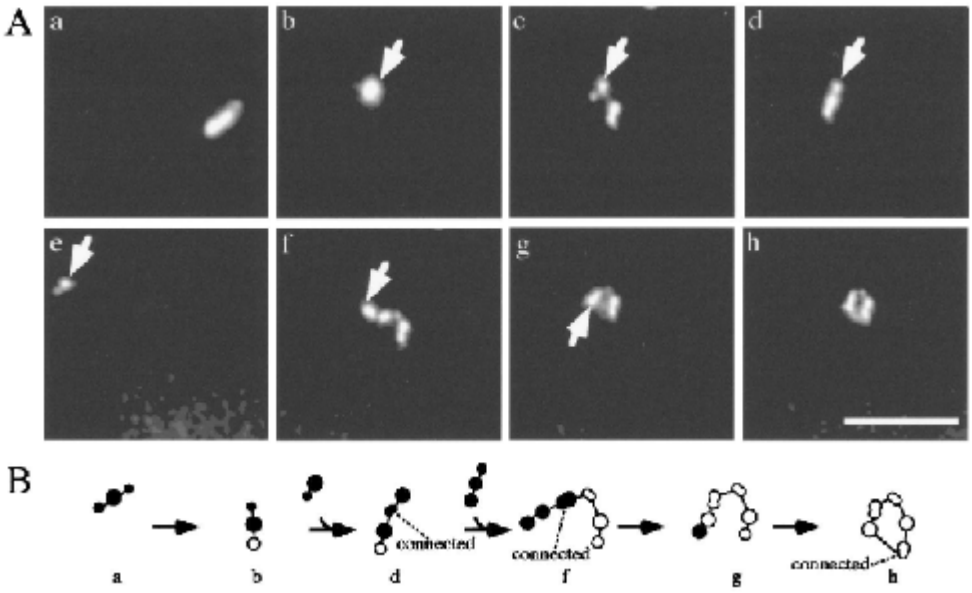


図24．組み立てのスライド写真。aからhまで順番に追ってある。白矢印は光ピンセットのトラップ点を示している。ＤＮＡ粒子同士の接触相互作用が引力的になっているので、光ピンセットによる押し付けで互いに接着される。スケールバーは１０μｍ。

をグロビュール化させると共に、グロビュール間相互作用が弱い引力になる様な条件で実験を行った。図はその結果である。DNAは時間と共に自己集合して数個のグロビュールが連なった棒が溶液中に見られるようになる。それを光ピンセットによって基板上に集積し円状のものを作製した。

この研究によって、DNAグロビュールを基板上に自在に配置し、任意のパターンを作成できることが示された。

集光レーザートラップ場を用いたDNA分子assembling

（研究メンバー：市川ら、豊橋技大松澤助手、大妻女子大小山教授との共同研究／研究サブグループ：A）

近年、微小粒子、或いは分子の自己組織化を用いることでナノ或いは分子レベルでのordered structure（規則的な構造体)を作り出す事を目的とした研究が増えてきている。しかし意外にも、自己組織化を外力によってコントロールするという視点は盲点となっていた。当研究チームでは、集光レーザーによる強力なトラップ場においてDNA粒子が直線状に assembling していくことを可能にした。DNA分子の相転移現象を利用すると、ある条件では表面が互いに非常に接着しやすくなった状態の粒子の分散溶液が得られる。このコロイド粒子の分散溶液に光ピンセットを入れると、粒子が焦点に集められる。通常、自由拡散する粒子が互いに接着すると、格子状かDLA（diffusion limited aggregation ）patternの様な構造が出来るが、この実験では図23Ａにある様に数珠の様に見える直線状の構造物が作られる。これは、レーザートラップの異方的な引力と一方向の光の散乱力、そして粒子同士の衝突と接着をそのまま記憶するstickyさ（接着しやすさ）が理由である

ことを、図23Ｂのシミュレーションによる実験の再現によって確認した。この現象を利用して作製した構造物を使ったデモンストレーションを図Ｃに示した。この棒状の DNA assembly を多数作製して、レーザートラップによりガラス基板上に運搬し、貼り付けた。この数珠は熱揺らぎに対しては堅い棒として振舞うので、基板上でそれらを組みあわせて自在にパターンを作ることが出来る。この研究によって、自己組織化を用いたナノ構造体の作製に対して新たなアプローチが示された。

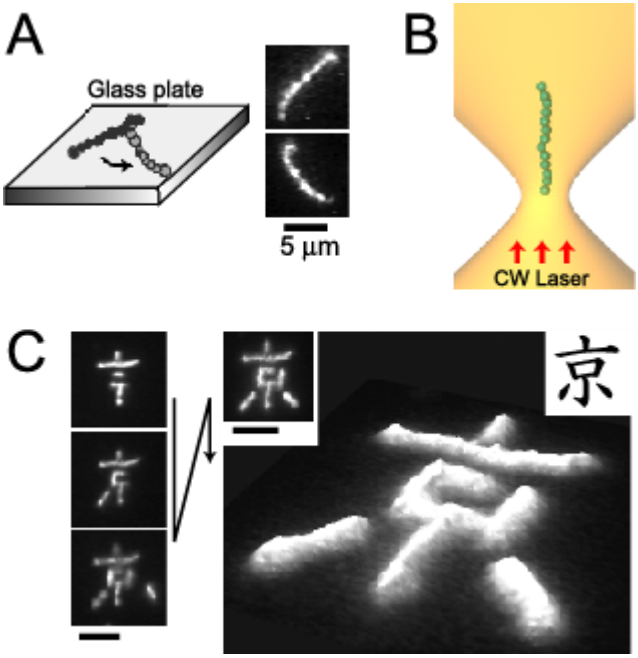


図 25. 実験により得られたＤＮＡ粒子の数珠状集合体と、シミュレーションによる再現。基板上での組み立てのデモンストレーション。A. レーザートラップの焦点において得られた数珠状の構造体。ガラス基板に貼り付けて画像を取得した。基板に片端を付けた後、もう片端をレーザートラップで引っ張ることで一本の弾性棒になっている事を確認した。B. シミュレーションで得られた集合体。実験を再現する条件でブラウン運動シミュレーションを行った。レーザー焦点において、粒子同士の衝突と結合によって直線状の集合体が成長している事が確認された。C. 基板上に作製されたパターン。上記の実験で得られた棒を多数用意し、それらをレーザートラップで運ぶことで組み立てた。スケールバーは５μｍ。

光ピンセットを用いた細胞へのデリバリーシステム

（研究メンバー：久保、市川ら、大妻女子大小山教授、長崎大工新留助手との共同研究／研究サブグループ：Ａ，Ｄ）

DDS(Drug Delivery System)に関する研究は、近年注目度も高く盛んに研究されているが、既存の手法は少なからずウィークポイントを持っている。そこで当研究チームでは、従来法に例を見ない光学的手法によるデリバリーシステムの開発を検討した。Nd:YAGレーザー(1064nm)を倒立顕微鏡の対物レンズを通してステージ上で焦点を結ばせ、操作と観察が同時に行える光ピンセットシステムを構築し、T4DNA凝縮体やゼオライト等のナノ粒子を、単分子で３次元的に輸送できる

表１．光ピンセットによるサブマイクロメーターサイズ粒子のトラップ効率

	Trapping efficiency Q (10^{-3})**
Compact T4DNA*	0.075±0.025
Fluorescent bead	0.80±0.10
Zeolite particle	2.80±0.10

＊ DNA凝縮にはスペルミジンを使用した

** 光学系における減衰率を0.5と仮定して求めた

ことを確認した（表１）。

さらにエンドサイトーシスを持たない植物細胞をモデルとして、細胞内への輸送を試みた。T4 DNA凝縮体、ゼオライト及びT4 DNA･PEG-A･ゼオライト複合体において、細胞壁の有無を問わず細胞内への輸送に成功した(図24）。次に、fura-2･PEG-A･ゼオライト複合体を細胞内へ輸送して細胞内反応を調べたところ、細胞内カルシウムとfura-2の結合による蛍光が確認され、細胞内で複合体から目的の物質がリリースされることが明らかとなった（図25）。細胞内へ単分子のDNAを輸送できるのみならず、ナノ粒子のキャリアーを用いることによって、多くの物質を輸送できる可能性が広がった。光学的な非接触マニピュレーションは、捕捉する物質への物理的ダメージが極めて少ない事が推察されるとともに、輸送時に細胞へ与えるダメージも軽減できることが予想される。ナノ・マイクロスケールの光学的なマニピュレーションシステムを利用した新規のデリバリーシステムとして、広範囲での応用が期待できると同時に、単分子操作による新たな遺伝子研究のツールとしても重要不可欠なシステムである。

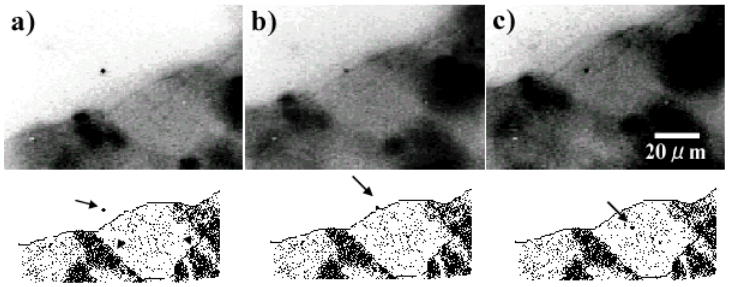


図26．光ピンセットを用いたイチョウ表皮細胞内への１分子DNAの輸送（上側写真は白黒反転像）
(a) PEG-Aで凝縮させた単分子T4 DNAのトラップ
(b) 細胞表面への接触
(c) 細胞質内への輸送

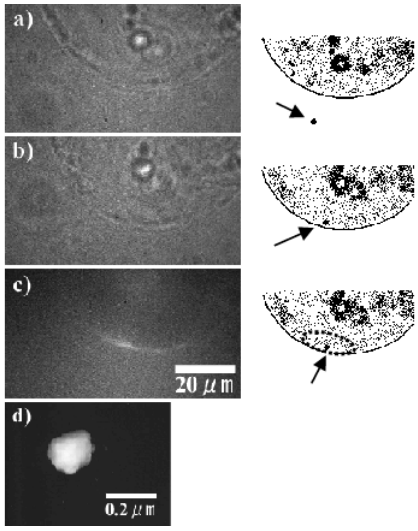


図27．キャベツプロトプラストへの
(a) ゼオライト･fura-2複合体の輸送,
(b) キャベツプロトプラスト内への輸送における明視野顕微鏡像
(c) 細胞内カルシウムとfura-2の結合による蛍光像
(d) 使用したゼオライトの透過型電子顕微鏡像

2-6．光ピンセットを用いた分子複合系の非線形ダイナミクス

Nd^{3+}:YAGレーザー定常照射下での脂質チューブの自発的振動[21]

（研究メンバー：野村、原田ら／研究サブグループ：A、D）

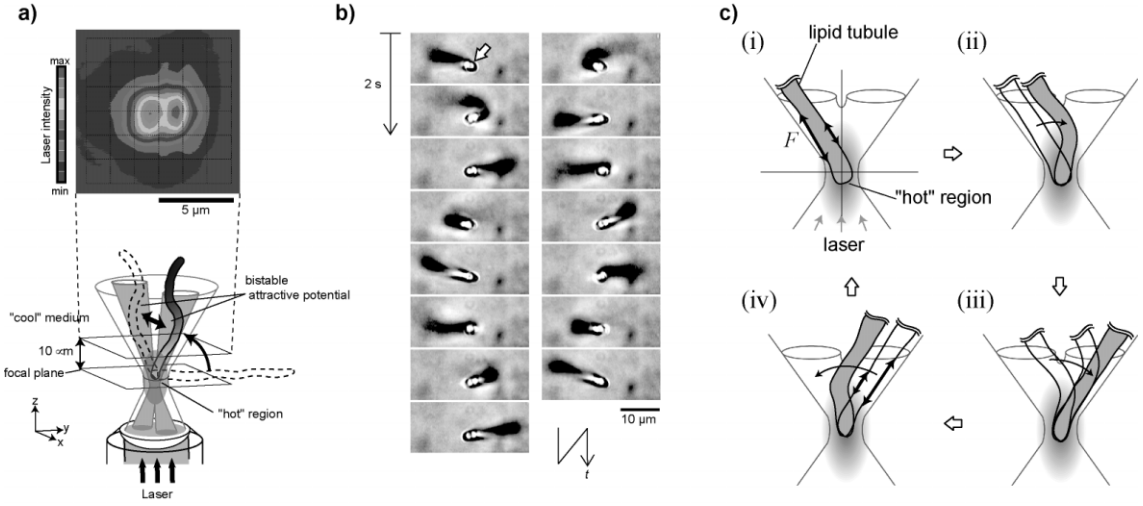


図28．a)チューブ振動子実験系の模式図．チューブはレーザ強度の高い２つの領域を双安定点として振動する．b）レーザ出力が50 mWのときの脂質チューブ振動の連続画像．c）レーザトラップされた脂質チューブの振動運動の模式図．　（i）まず，脂質チューブは二つの引力ポテンシャルのいずれかに沿って捕捉される．チューブ近傍の温度分布にしたがって，チューブの光軸側部分の脂質二分子膜の張力*F*が減少する．（ii-iii）チューブの光軸側と外側との膜張力の非対称性によって変形したチューブは，双安定なポテンシャルの他の一方へと動く．　動いた後，チューブの外側は冷却され(iv)，ふたたび(i)からのサイクルが繰り返される．

マイクロメートルスケールの脂質チューブ構造が，Nd^{3+}:YAGレーザー（λ=1064 nm ）の一定強度での連続照射条件下において，持続的な揺動運動を示すことが明らかになった．対物レンズを経由し，ある適切な光路を通過したレーザーは，焦点より下流方向においてデュアルビームに分割され得る(図26，a)．この環境において，脂質チューブはレーザーが形成する双安定なポテンシャルに晒され，そのいずれか一方向へと配向して捕捉される．一方，水分子の光子吸収がもたらすレーザー焦点近傍の局所的な温度勾配によって，捕捉された脂質チューブは二つの配向状態間を遷移する形で揺動運動を起こす（図26b，c）．この揺動現象は，熱力学的開放条件下における時間並進対象性の破れを示していると考えられる．

集光レーザーにより駆動される微小回転体の運動モードスイッチング[12]

（研究メンバー：原田ら／研究サブグループ：A，D）

集光したレーザービームの焦点にトラップされた誘電体は、その形状にカイラリティがあると光の散乱のために回転運動を行う。これまである特定の形状をした物体はある一つ

の方向にしか回転しないと考えられていたが、当グループでは同一の物体に対しても両方向の回転を誘起できることを実験的に示した。物体をトラップする部位を変更することよって、はたらくトルクを制御することが可能になる。

実験では回転体として、全長約２０μｍで一巻きのらせん形をしたアフリカツメガエルの精子染色体を用いた。染色体の任意の部位に直径２μｍのポリスチレンビーズを付着させ、ビーズをトラップすると、らせん形染色体は光の散乱によってビーズのまわりで回転運動を行う。ビーズがらせんの端部分に取り付けられた場合、染色体はビーズの位置がらせんの内側ならば右回り、外側ならば左回りに回転した（図27 A、B）。また他にも、らせんの中央部にビーズを取り付けた場合は左回りの回転運動を行い、染色体を無修飾でトラップした場合、らせんはその中心部のまわりに右回りの回転を行った。（図27 C、D）。

以上のように、物体をトラップする部位を制御し、回転中心の位置を変えることによって同一の回転体に対しても両方向の回転運動をさせられることが実験的に示された。また、こうしたスイッチング機構の理論的考察も行った。その結果、下図A、Bの場合に回転方向が逆転するのは、らせんの端に取り付けられたビーズの位置が、その周りでらせんに働いている光散乱力と垂直の方向に横切ることが原因である事が分かった。

本研究で示したような、同一形状の微小回転体の回転向きを、回転中心の位置を変えることで制御できるという実験的研究結果はこれまでにないものである。近年、集光レーザーを動力源として働くマイクロメートルスケールの回転モーターを設計しようという研究の動きが国内外で起こっているが、本研究はそうした研究の流れに新しい視点を提供し、新奇なメカニズムで運動制御される微小モーターの構築を可能にするものである。

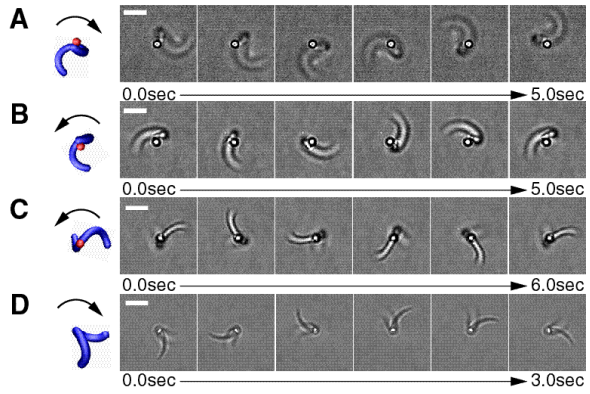


図29．精子染色体の回転運動．スケールバーは５μｍ．(A) ビーズがらせんの内側端に付いた場合．(B) 外側端に付いた場合．(C) 中央に付いた場合．(D) ビーズがついていない場合．

マイクロビーズクラスターの周期的な崩壊現象[1]

(研究メンバー：馬籠、北畑、市川、野村ら／研究サブグループ：A，D)

定常的なレーザー照射により、様々な運動モードを作り出すことが可能であることをこれまでに明らかにしてきている。このようなレーザーによる非平衡系の構築に関して、マイクロビーズのクラスターが崩壊と形成を周期的に繰り返す振動挙動が観察された。

集光レーザーをマイクロビーズの分散液に照射すると、レーザートラップの原理に従ってビーズが焦点に集められ、クラスターが形成される。ここで、照射するレーザー径を細

くして集光角を小さくした場合、形成したクラスターがある大きさに達した後に一瞬でクラスターが崩壊し、その後また新たにクラスターが形成されるという挙動を繰り返す振動現象が見られることが分かった。これは、集光角を変えることでトラップ力を小さくし、レーザーによる散乱力を相対的に大きくしたために、クラスターが不安定化したためである。また、この振動周期やクラスターのサイズは照射するレーザー出力に依存し、出力が大きくなると、周期は早く、サイズは大きくなることを明らかに。簡単なモデルによる数値計算の結果、実験を定性的に再現できることを示した。

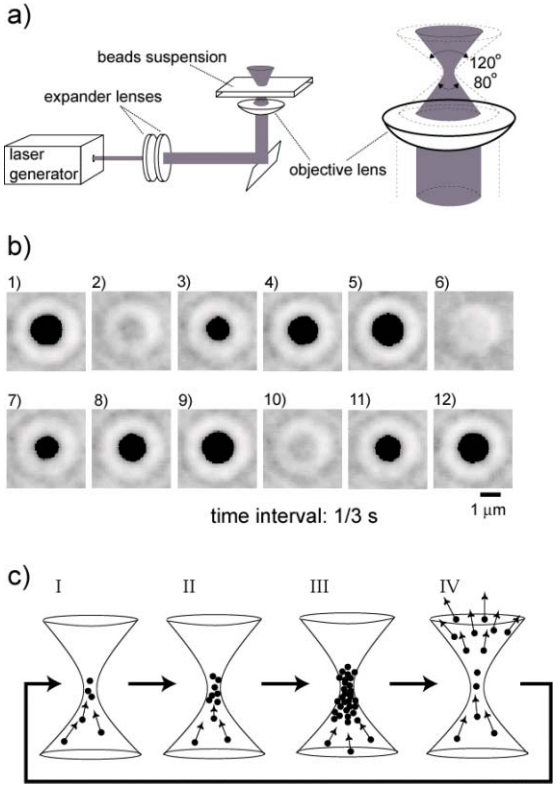


図30．(a)実験装置の模式図、(b)得られた顕微鏡観察像、(c)バースティングの模式図、をそれぞれ示す。

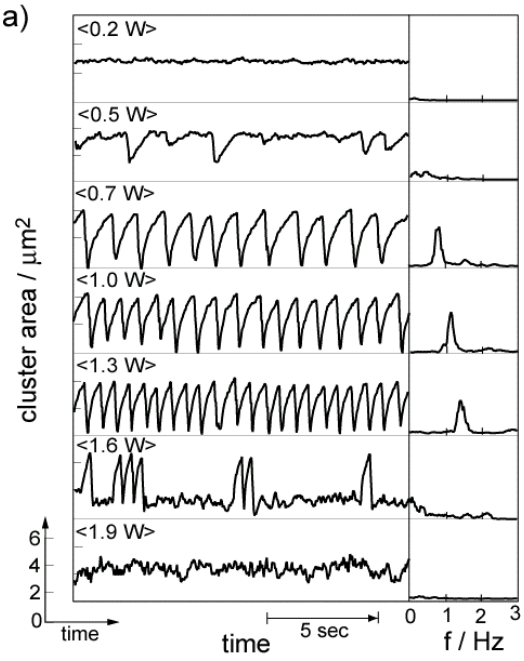


図31．レーザー出力に依存したクラスターサイズの経時変化

2-7．レーザートラップによる空中実験へのアプローチ

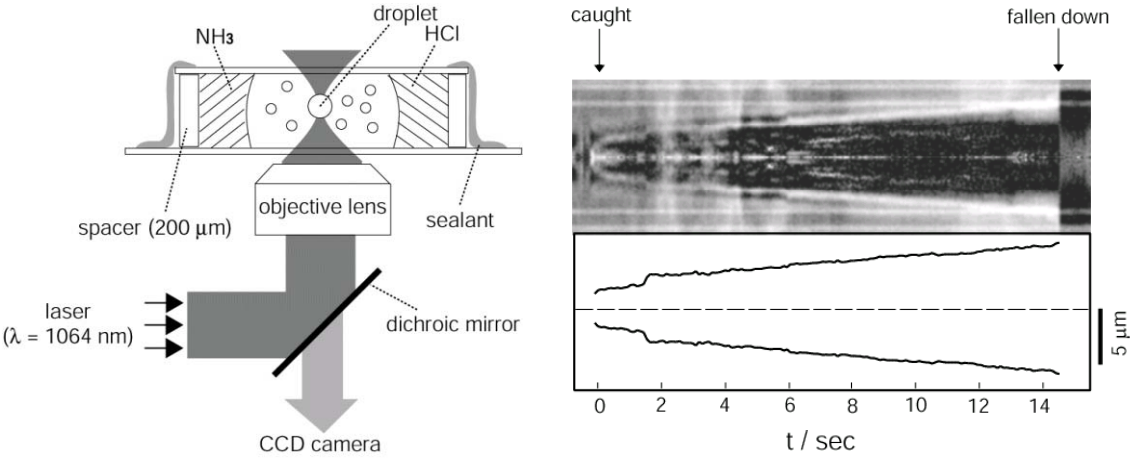
気相中での液滴光トラップ

（研究メンバー：馬籠、北畑、向井ら／研究サブグループ：D）

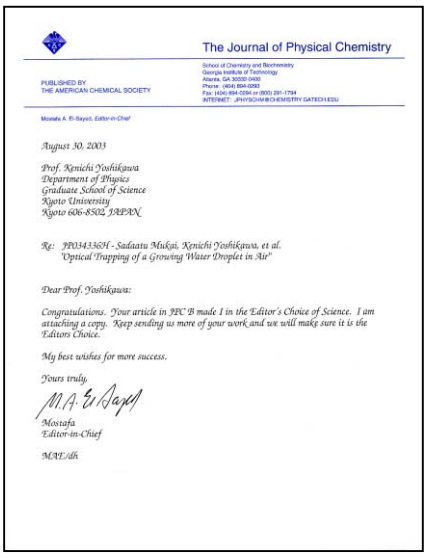
気相中において液滴を非接触で保持することは、無容器化学反応系を構築する上で極めて重要である。平成14年度においては、レーザートラップの原理を用い、気相中でμmサイズの微小水滴のトラップを行った。さらに、この水滴を飽和水蒸気中で成長させることでトラップ効率が従来のそれと比較すると一桁大きい値となることを示した。なお、この論文は、*Science*誌のEditor’s Choice として紹介される予定である（図32参照）。

実験概要は以下の通りである(図30)。２枚のカバーガラスを200μmの間隔になるよう

固定し、その隙間に塩酸とアンモニア水を接触しないように配置して全体を密閉した。そして、これらの溶液の中間領域に生成した塩化アンモニウムエアロゾルを核とする微小水滴を、対物レンズで集光した5 mWのYAGレーザーでトラップし、液滴の成長過程を観察した。



結果を図31に示す。トラップした水滴サイズは時間経過に対して線形的な成長を示し、半径約6μmになった時点で落下した。過去に報告されている気相中での水滴保持に関する実験結果においては、トラップ効率は0.05前後である。従って、過去の研究結果と比較すると、一桁大きい効率が得られたことになる。これは、集光角を大きくし、また、水滴の形成にスプレーを用いないなど、光学系や水滴の形成方法などが従来の方法と全く異なるためであると考えている。また、液滴の成長過程については、液滴表面への水蒸気の流束が一定であると仮定することで定性的な説明が可能である。


The Journal of Physical Chemistry

PUBLISHED BY
THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY

August 30, 2003

Prof. Kenichi Yoshikawa
Department of Physics
Graduate School of Science
Kyoto University
Kyoto 606-8502, JAPAN

Re: JP034336H - Sadaatu Mukai, Kenichi Yoshikawa, et al.
"Optical Trapping of a Growing Water Droplet in Air"

Dear Prof. Yoshikawa:

Congratulations. Your article in JPC B made 1 in the Editor's Choice of Science. I am attaching a copy. Keep sending us more of your work and we will make sure it is the Editors Choice.

My best wishes for more success.

Yours truly,

Mostafa
Editor-in-Chief

MAE:dh

図34. *Science*誌のEditor's Choice として紹介されることを伝える、J. Phys. Chem. B誌Editor-in-chiefからの手紙.

2-8．化学反応による化学／機械エネルギー変換

化学的振動反応に伴う液滴の動き[20]

（研究メンバー：北畑、相原、馬籠ら／研究サブグループ：D）

当研究グループでは、化学的振動反応として知られているBZ反応系において、用いる鉄触媒の価数変化（$Fe^{2+}⇔Fe^{3+}$）に対応して表面張力が振動することを過去に明らかにしている。今回は、この現象を利用し、局所的な界面張力変化に伴ってマランゴニ対流が生じること、ならびに、BZ反応水溶液をオレイン酸に浮かべ、化学反応によって誘起された対流によって水滴がオレイン酸上を動くことを、実験・理論両面から示した。この現象は、等温系で化学エネルギーから運動を生み出すモデル系として興味深く、スケールを小さくした点が本質的に効いていると考えられる。

まず、化学波が引き起こすマランゴニ対流についての実験を行った。２枚のガラス板をスペーサーを挟んで固定し、その隙間に水相としてBZ反応溶液と、油相としてオレイン酸を、双方が接触するように流し込んだ。界面付近を顕微鏡で観察したところ、化学波が界面に接する部分に向かって対流が生じていることが観察された（図33）。一方、油相に反応の阻害剤であるヨウ素を添加した系においては、化学波が界面まで到達せず、この場合には対流が生じない。従って、化学波が界面と接している領域（鉄が三価の状態）においては、他の部分（鉄が二価の状態）と比較して界面張力が大きく、この局所的な張力差で対流が生じていると結論付けられる。

次に、この対流現象を用いて、BZ反応液滴が振動反応に同期して油相表面上を移動する系を構築した。オレイン酸に1μlのBZ反応溶液を浮かべて観察したところ、液滴内部で発生した化学波が界面に到達した時に液滴が動き出すことや、動きの方向が化学波の位置によって変化することを明らかにした。

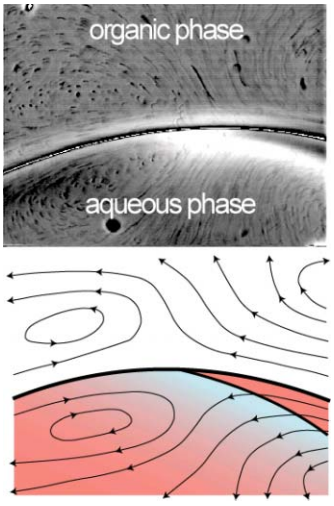


図35．BZ反応に起因する対流現象
（上）実験結果と、（下）その模式図

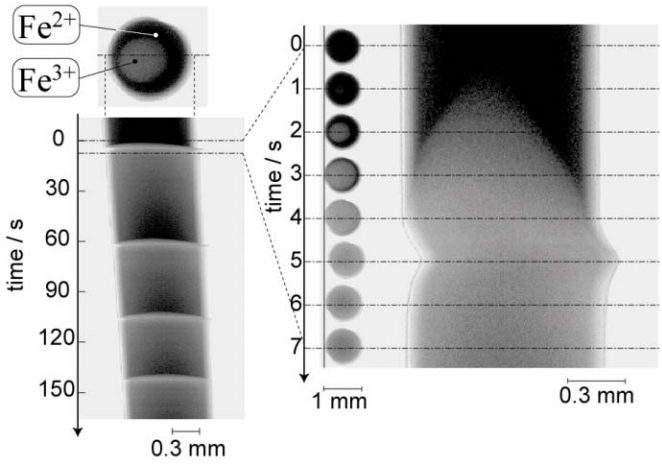


図36．BZ反応液滴の自発的運動

2-9. 自然があみだした計算原理：化学反応場の形状を利用した演算

興奮場上での演算（１）－単一回路上での異なる演算[29]

（研究メンバー：一野、五十嵐、元池ら／研究サブグループ：D）

我々は生物が普遍的に有する興奮特性と要素間の非対称な結合に着目した演算、“場による演算（Field Computation）”というコンセプトを提唱してきている。そして、これまでに興奮場上を伝播する興奮波を信号とし、興奮場の形状により、興奮波伝播の一方向制御（ダイオード特性）、基本的な論理演算素子回路（AND回路、OR回路、NOT回路、XOR回路）、メモリ、時間情報演算である時間差検出回路などをコンピュータ・シミュレーション及び、実験の双方で実現してきている。今回、外部環境を変化させることにより、単一回路で異なる演算が行えることを実現した。実験系として、光感受性を有するBelousov-Zhabotinsky（BZ）反応を用いた。光感受性BZ反応において、光照射により反応を阻害できる。また、反応を阻害する大きさは、光強度に依存している。図35に光感受性BZ反応によるダイオード特性を示す。このダイオード特性を実現する興奮場の形状において、光強度を変更することにより、興奮波伝播を(a) 双方向性、(b) 一方向性(ダイオード特性)、(c) どちらにも伝播しないという結果が得られる(図36)。また、時間差を検出する回路においても、通常は図37(a) のように、興奮波が一つの場合はどこにも出力は得られないが、光強度を低くすることにより、図37(b) のように興奮波が一つの場合でもすべての検出部に出力が得られるようになる。

以上のように、外部環境である光強度に依存して、単一回路で異なる演算が行えることを実現した。今回、全体の光強度を変化させているが、局所的に光強度を変更することも可能であるので、より複雑な回路形状を用いれば、全体的な及び局所的な光強度に依存して、様々な演算を行うことが可能であるといえる。

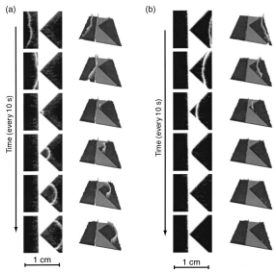


図37. 光感受性BZ反応によるダイオード特性。白い部分の光強度は、3.32×10^4 lxである。黒い部分と白い部分はそれぞれ興奮領域と抑制領域に対応する。(a) 興奮波が左側から右側へと伝播している。(b) 興奮波は右側から左側へと伝播できない。(a) と(b) の左側の絵はビデオ画像であり、右側の絵は擬似三次元映像である。

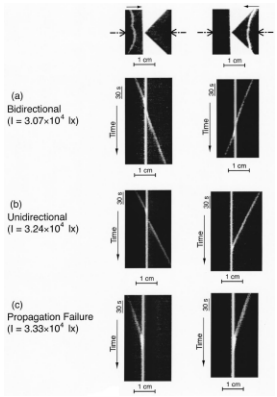


図38. 光強度に依存した興奮波伝播の振る舞いの時空間プロット。図の上部にダイオード特性の形状が示してある。(a) 双方向伝播。(b) 一方向伝播(ダイオード特性)。(c) 興奮波伝播の失敗。

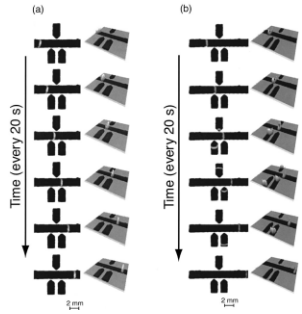


図39. 一つの入力に対する異なる演算。(a) 光強度が高い場合（3.53×10^4 lx）。出力は得られない。(b) 光強度が低い場合（2.48×10^4 lx）。すべての検出部に出力が得られる。

興奮場上での演算（２）－信号の数を計測する化学反応系[24]

（研究メンバー：五十嵐ら、ポーランド科学アカデミーGorecki助教授との共同研究／研究サブグループ：D）

我々は生物が普遍的に有する興奮特性と要素間の非対称な結合に着目した演算、“場による演算（Field Computation）”というコンセプトを提唱してきている。そして、これまでに興奮場上を伝播する興奮波を信号とし、興奮場の形状により、興奮波伝播の一方向制御（ダイオード特性）、基本的な論理演算素子回路（AND回路、OR回路、NOT回路、XOR回路）、メモリ、時間情報演算である時間差検出回路などをコンピュータ・シミュレーション及び、実験の双方で実現してきている。今回、信号の数を計測する回路を考案し、その主要な素子であるT字型の同期検出回路をコンピュータ・シミュレーション及び実験で実現した。興奮特性を持つ場として、Belousov-Zhabotinsky（BZ）反応を用いた。その反応モデルであるRovinsky-Zhabotinskyモデルを用いてコンピュータ・シミュレーションを行った。実験には光感受性を持つように改良したBZ反応を用いた。図１にコンピュータ・シミュレーションによる結果を、図２には実験によるT字型同期検出回路を示す。二つの興奮波がT字の―の部分で衝突することにより、T字部分へと興奮波がギャップを超えて伝播する（図38，図39）。興奮波が一つの場合には、T字部分には伝播しない（図40）。このT字型同期検出回路とダイオード特性、メモリを組み合わせることにより、図４に示すような信号数計測回路を考えることができる。

以上のように、興奮場の形状をT字型にした信号の同期検出回路を実現した。そして、T字型同期検出回路とダイオード特性、メモリを組み合わせ、信号数計測回路を提案した。これらの素子はBZ反応のような化学反応を基にしているので、すぐにでも実現できると考えている。

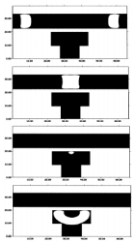


図40．コンピュータ・シミュレーションによるT字型同期検出回路。黒い部分が興奮場あり、白い部分は拡散場である。

図41．光感受性BZ反応によるT字型同期検出回路。黒い部分が興奮場であり、白い部分は抑制場である。

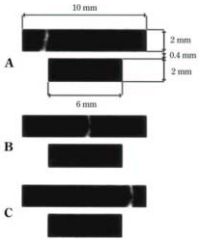


図42．興奮波が1つの場合のT字型同期検出回路。出力が得られていない。

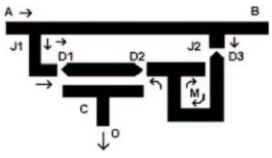


図43．信号数計測回路の模式図

2-10．分子複合系に機能を付与する新規化合物の創成

DNA折り畳み構造転移を制御するためのポリアミン系凝縮剤の分子設計

（研究メンバー：村田、岩松、伊藤ら／研究サブグループ：A，C）

従来の研究ではDNA折り畳み構造変化を起こさないと考えられてきたα，ω-ジアミンを4級ジアンモニウム塩とすることで、窒素原子上に正電荷を固定させ、そのことにより特異的なDNA折り畳みを起こさせることに成功した。このような分子修飾によって生み出された$R(CH_3)_2N^+(CH_2)_nN^+(CH_3)_2R$型凝縮剤を用いると、RおよびnをDNA折り畳み転移における電荷間の空間的位置関係、立体的な嵩高さ、疎水性／親水性などの役割が評価できるようになった。例えば、従来の研究ではα，ω-ジアミンのDNA折り畳み活性の大きさはアミノ基間のCH_2基の数nの偶奇性で交互に変化する程度の極めて曖昧なことしか判らなかったが、nを変化させた4級ジアンモニウム塩を用いてDNA二重らせん構造中のリン酸基の空間的配置と正電荷間の位置関係から、DNA折り畳み活性の違いを明解に説明することができた。さらに、Rとして長鎖アルキル基を有する界面活性剤としての性質をもったものから短鎖アルキル基の親水性のものまで、様々なアルキル鎖長の4級ジアンモニウム塩のDNA折り畳み活性を調べ、疎水性の大きなもの程大きな活性を示すことを見出した。一方、スペルミジンなどの生体由来のポリアミンでは顕著でなかった分子内相分離状態を安定な形で計測することができた。特に重要な結果としてRの疎水性を変化させることによって分子内相分離状態で形成される部分的折り畳みの個数を制御できることを見出している。ここで観察された部分的折り畳みの形状は全てドーナツ形であった。この結果は、研究が進み始めた分子内相分離に関する物理化学・理論化学的研究に大いに貢献するものである。

DNAのような巨大分子は、低分子量のキラル分子との間でのキラリティー相互作用をあまり顕著に示さないと考えられていた。細胞内でのDNA折り畳みによるクロマチン形成に関わるヒストンタンパクに多く含まれている、塩基性アミノ酸リシンとアルギニンのL体D体それぞれの３量体を用いてDNA折り畳み活性を調べた結果、いずれの場合にも顕著にタンパク構成のL体の方がD体より活性が大きいことが明らかになった。従来、酵素などのタンパクがDNAの特定塩基配列を認識する際にも用いられる特異的結合サイトによる鍵―鍵穴式の相互作用によって選択的な分子認識が行われているとするのが常識であった。これに対して本研究では、まったく新しいタイプの生体内不斉認識メカニズムを発見したものと考えられる。これらトリペプチドで折り畳まれたDNAには、クロマチンに類似したナノメートルサイズの構造体が形成されていることも見出した。

分子複合体に機能を与えるためのフラーレンおよびプテリジン誘導体合成

（研究メンバー：村田、岩松、伊藤ら／研究サブグループ：C）

ポリアミン系DNA凝縮剤の分子設計を発展させるために、特異な物理化学的性質を有する有機化学グループを導入したDNA凝縮剤の合成を行っている。フラーレンを基にした有機化学誘導を進め、酸素や窒素などのヘテロ原子官能基をフラーレン表面上に導入することに成功しただけでなく、フラーレンのサッカーボール構造を形作っているC―C二重結合

をヘテロ原子の付加を使って部分的に切断していくことにも成功した。強い蛍光特性やグアノシンとの類似構造を有する代謝におけるDNAの仲間であるプテリジンを、ポリアミン系凝縮剤に結合させたプテリジン―ポリアミン複合体を合成し、DNAの凝縮活性を調べ、母核としたポリアミンより大きな活性をもつものや、ポリアミンの導入位置が凝縮活性に影響を及ぼす知見を得ている。

3.研究実施体制

Ａ．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：

1) 凝縮剤濃度、温度変化、pH変化等による高分子鎖の高次構造の制御方法の確立

2) 高分子鎖の高次構造と機能発現の関連性の解明

3) 新たな実験技術の開発

Ｂ．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：

1) ナノ秩序体の高次構造形成の理論

2) 高分子ナノ秩序構造デザインを目指した、高分子ナノ秩序構造制御の統一的な理論構築

Ｃ．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　(名古屋大学大学院環境学研究科　教授)

② 研究項目：DNA折り畳み構造転位を制御するためのポリアミン系凝縮剤の分子設計

Ｄ．自己発展型非平衡分子システムグループ

① 研究分担グループ長：秋田谷龍男　(CREST研究員)

② 研究項目：

1) 化学的振動反応における反応場の制御

2) 等温非平衡系で働く分子機械の創成

3) 光ピンセットによる非平衡場の創出

4) 非平衡開放条件下で自己創成するモデル細胞の構築

4.主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

○ N. Magome, H. Kitahata, M. Ichikawa, S. M. Nomura and K. Yoshikawa, “Rhythmic Bursting in a Cluster of Microbeads Driven by a Continuous-Wave Laser Beam”, *Phys. Rev. E*, **65**, 045202, 1-4 (2002).

○ K. Yoshikawa, “Field Hypothesis on the Self-regulation of Gene Expression”, *J. Biol. Phys.*, **28**, 701-712 (2002).

○ N. Yoshinaga, K. Yoshikawa and S. Kidoaki, “Multiscaling in a Long Semiflexible Polymer Chain in Two Dimensions”, *J. Chem. Phys.*, **116**, 9926-9929 (2002).
○ Y. S. Velichko, K. Yoshikawa and A. R. Khokhlov, “Monte Carlo Simulation of Circular Double-Stranded Polymers”, *Comp. Phys. Commun.*, **146**, 122-124 (2002).
○ T. Sakaue and K. Yoshikawa, “Folding/Unfolding Kinetics on a Semiflexible Polymer Chain”, *J. Chem. Phys.*, **117**(13), 6323-6330 (2002).
○ V. G Sergeyev, O. A. Novoskoltseva, O. A. Pyshkina, A. A. Zinchenko, V. B. Rogacheva, A. B. Zazin, K. Yoshikawa and V. A. Kabanov, “Secondary Structure of DNA is Recognizeed by Slightly Cross-Linked Cationic Hydrogel”, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 11324-11333 (2002).
○ Y. Yoshikawa, T. Kanbe and K. Yoshikawa, “Daunomycin Triggers Membrane Blebbing and Breakage of Giant DNA Encapsulated in a Cell-Sized Liposome”, *Chem. Phys. Lett.*, **366**, 305-310 (2002).
○ Y. Matsuzawa, K. Hirano, A. Mizuno, M. Ichikawa and K. Yoshikawa, “Geonetric Manipulation of DNA Molecules with a Laser”, *Appl. Phys. Lett.*, **81**, 3494-3496 (2002).
○ N. Makita and K. Yoshikawa, “Proton Concentration (pH) Switches the Higher-Order Structure of DNA in the Presence of Spermine”, *Biophys. Chem.*, **99**, 43-53 (2002).
○ H. Hirata, S. Yoshiura, T. Ohtsuka, Y. Bessho, T. Harada, K. Yoshikawa and R. Kageyama, “Oscillatory Expression of the bHLH Factor Hes1 Regulated by a Negative Feedback Loop”, *Science*, **25**, 840-843 (2002).
○ Y. S. Velichko, I. V. Rychkov and K. Yoshikawa, “Folding Transition and Conformational Behavior of DNA”, *Recent Res. Devel. Phys. Chem.*, **6**, 425-435 (2002).
○ T. Harada and K Yoshikawa, “Mode Switching of an Optical Motor”, *Appl. Phys. Lett.*, **81**, 4850-4852 (2002).
○ H. Oana, K. Tsumoto, Y. Yoshikawa and K. Yoshikawa, “Folding Transition of Large DNA Completely Inhibits the Action of a Restriction Endonuclease as Revealed by Single-Chain Observation”, *FEBS Letter*, **530**, 143-146 (2002).
○ N. Chen, K. Ikemoto, T. Sugimoto, S. Murata, H. Ichinose, and T. Nagatsu, “A Highly Sensitive and Specific FDCD Method for Chirality Analysis of Naturally Occurring Pteridines”, *Heterocycles*, **56,** 387- 392 (2002).
○ K. Ikemoto, T. Sugimoto, S. Murata, M. Tazawa, T. Nomura, Y. Hagino, H. Ichinose, and T. Nagatsu , “(6*R*)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-monapterin from

Escherichia coli, a Novel Natural Unconjugated Tetrahydropterin.”, *Biol. Chem.*, **383,** 325- 330 (2002).

○ S. Iwamatsu, P. S. Vijayalakshmi, M. Hamajima, C. H. Suresh, N. Koga, T. Suzuki, and S. Murata, “A Novel Photorearrangement of a Cyclohexadiene Derivative of C_{60}”, *Organic Letters*, 1217- 1220 (2002).

○ S. Iwamatsu, P. S. Vijayalakshmi, Y. Kitamura, M. Hamajima, I. Koike, and S. Murata, “Photochemical and Thermal Rearrangement of Cyclohexadiene Derivatives of C_{60}: Formation and Characterization of Novel Compounds Relating to Bis(fulleroid)”, *Physics of the Solid State*, **44,** 1153- 1154 (2002).

○ M. Kujime, K. Kudoh, and S. Murata, “Regioselective Preparation of Pterin 6-Triflate and its Application to 6-Substituted Pterin Synthesis”, *Heterocycles*, **57**, 1841- 1850 (2002).

○ K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa and T. Kanbe, “All-or-None Folding Transition in Giant Mammalian DNA”, *Chem. Phys. Lett.*, **354**, 354-359 (2002).

○ H. Kitahata, R. Aihara, N. Magome and K. Yoshikawa, “Convective and Periodic Motion Driven by a Chemical Wave”, *J. Chem. Phys.*, **116**, 5666-5672 (2002).

○ S. M. Nomura, T. Harada and K. Yoshikawa, “Autonomous Swinging of a Lipid Tubule Under Stationary Irradiation by a Nd^{3+}:YAG Laser”, *Phys. Rev. Lett.*, **88**, 093903, 1-4 (2002).

○ K. Akiyoshi, A. Itaya, S. M. Nomura, N. Ono and K. Yoshikawa, “Induction of Neuron-Like Tubes and Liposome Networks by Cooperative Effect of Gangliosides and Phospholipids”, *FEBS Lett.*, 534, 33-38 (2003).

○ S. G. Starodoubtsev, S. Kidoaki and K. Yoshikawa, “Interaction of Double-Stranded T4 DNA with Cationic Gel of Poly(diallyldimethylammonium chloride)”, *Biomacromolecules*, **4**, 32-37 (2003).

○ J. Gorecki, K. Yoshikawa, Y. Igarashi, “On Chemical Reactors That Can Count”, *J. Phys. Chem. A*, **107**, 1664-1669 (2003).

○ A. Zinchenko, V. G. Sergeyev, S. Murata and K. Yoshikawa, “Controlling the intrachain segregation on a single DNA molecule”, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4414-4415 (2003).

○ S. M. Nomura, H. Mayama and K. Yoshikawa, “Nonlinear Dynamics in a Laser Field: Spontaneous Oscillation of Mesoscopic Soft Matter”, *Chaos Solitons & Fractals*, **17**, 419-423 (2003).

○ N. Motoike and K. Yoshikawa, “Information Operations with Multiple Pulses on an Excitable Field”, *Chaos Solitons & Fractals*, **17**, 455-461 (2003).

○ T. Okuda, S. Kidoaki, M. Ohsaki, Y. Koyama, K. Yoshikawa, T. Niidome and H. Aoyagi, “Time-Dependent Complex Formation of Dendritic Poly(L-lysine) with Plasmid DNA and Correlation with *in vitro* Transfection Efficiencies”, *Org. Biomol. Chem.*, 1, 1270-1273 (2003).

○ T. Ichino, Y. Igarashi, I. N. Motoike and K. Yoshikawa, “Different Operations on a Single Circuit Field Computation on an Excitable Chemical System”, *J. Chem. Phys.*, 118, 8185-8190 (2003).

○ N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai, K. Yoshikawa, “DNA Dissolves Single-walled Carbon Nanotubes in Water”, *Chem. Lett.*, 32, 456-457, (2003).

(2) 特許出願

H14年度特許出願手続開始件数：２件（研究期間累積件数：４件）