DNA 単分子鎖の折りたたみと自励振動

—高分子単分子鎖がつくりだす時空間構造—

生き物に見られる多様な現象をつくりだしている DNA 単分子鎖。本稿ではそのヒントとなる DNA 単分子鎖の ON/OFF 型の高次構造変化（折りたたみ相転移）と熱力学的開放条件下で発現する自励振動（自発的に起こる周期的な構造変化）を紹介するとともに、その一般性を論じ、他の高分子単分子鎖においても DNA 単分子鎖と同様な現象が起きることを指摘したい。

眞山 博幸

1. はじめに

高分子鎖自体の中に機能が繰り込まれている場合には、1 本の高分子鎖の高次構造に依存して機能がスイッチングであろうことは容易に想像できる。その典型例は遺伝情報が組み込まれている二重らせん DNA（以下、DNA）であろう¹⁾。たった 1 個の受精卵から細胞分裂を繰り返す際にさまざまな機能をもつ細胞に分化し、それらが有機的に組織されて多細胞生物が形成され、外界からエネルギーと物質のやり取り（熱力学的開放条件）をしながら、さまざまなリズム現象のもとで生命活動が営まれている。これらの多様な現象はすべて細胞の大きさ約 10 マイクロメートル程度の細胞中に存在する DNA の設計図が元になっている。46 本の染色体を解いてつなぎ合わせると全長約 2 m の DNA になる。DNA 単分子鎖を巨大なモデル高分子鎖ととらえて、その振舞いを調べていくことで、1 本の高分子鎖の高次構造と機能を制御し、高分子の新しい側面を開くことができるのではないかと考えられる。以下、DNA の折りたたみ相転移による高次構造変化とそれを発展させた非平衡条件下での DNA の自励振動（周期的な高次構造変化）を簡単に紹介し、高分子単分子鎖でも同様の現象が起きる可能性を考えたい。

2. DNA の折りたたみの実験

まず、DNA の折りたたみをイメージしやすくするために、最初に DNA の折りたたみの実験を簡単に紹介する。まず、塩基対数が数十キロ以上の線状の DNA（λDNA や

T4DNA）を十分希薄な濃度で水溶液に分散させる。次に DNA を高感度カメラで単分子観測するために蛍光色素（DAPI や YOYO-1）を DNA 水溶液に加えて DNA を蛍光標識する。その後、DNA を折りたたむための凝縮剤を適当な濃度で加える。ここで凝縮剤としては、ポリエチレングリコール (PEG) などの中性高分子^{2)~4)}、ポリアミン^{5)~8)} や金属イオン⁹⁾などの多価カチオン、多価アニオン（RNA、ATP など）^{10)~12)} を用いる。DNA 水溶液をカバーガラス上に展開し、高感度カメラを装備した倒立型顕微鏡で観測する。このようにすると DNA 単分子鎖は夜空に星が光って見えるように観察される。蛍光顕微鏡観察像をビデオに録画し、画像解析から DNA の長軸長の変化を求める。図 1 は DNA の典型的な蛍光観察像である⁵⁾。(a) に示されているようにコイル状態と凝縮状態の蛍光像は明らかに異なる。高次構造の変化を DNA 長軸長で見ると、図 2 のように折りたたみ相転移（不連続な高次構造変化）を示す⁵⁾。単分子鎖レベルでは長軸長が不連続に変化する（集団平均では連続的になる）。さらにカバーガラス上に付着した DNA 単分子鎖を原子間力顕微鏡で観測したり¹³⁾、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察用に試料作製し、TEM 観察を行ったりすることができる^{14), 15)}。このような実験を行うことで、核形成・結晶成長¹⁶⁾の過程（図 3）や折りたたみ構造を観察することができる。水溶液中でブラウン運動しているコイル状態と凝縮状態の DNA の流体力学的半径から求めた

Hiroyuki MAYAMA 北海道大学電子科学研究所附属ナノテクノロジー研究センター（001-0021 札幌市北区北 21 条西 10 丁目北大創成棟内）・助教、博士(工学)、1999 年北海道大学大学院工学研究科博士課程修。専門はフラクタル科学、非線形高分子物理、生命物理学。

図 1 DNA の単分子鎖のコイル状態と凝縮状態の蛍光顕微鏡像 (a) とそれぞれに対応する模式図 (b) ここで長軸長 L と蛍光像のにじみ a を示した。文献 5 より改変。

図2 (a) 凝縮剤としてスぺルミジン三塩酸塩 (SPD) を用いたときのさまざまな濃度での DNA 長軸長 L のヒストグラム. (b) 長軸長 L の変化. 黒丸と実線は DNA 単分子鎖の結果で不連続構造転移, 白丸と点線は集団平均で連続的な変化となる. 灰色の領域は共存領域. 文献 5 より改変.

図3 DNA 単分子鎖の折りたたみ相転移における核形成・結晶成長 (模式図)
DNA 鎖は末端に形成された核 ((a)→(b)) がコイル部分を巻き取っていき (結晶成長) ((b)→(c)), 折りたたまれる ((d)).

DNA 鎖のサイズ比は $\sim 10^2$ 倍 (体積変化では $10^5 \sim 10^6$ 倍) に及ぶ^{9), 17)}.

3. DNA 鎖の折りたたまれ方: 簡単な考察

以上を踏まえながら, 大きさ約 $10 \mu\text{m}$ の細胞にどのようにして長さが約 2 m にも及ぶ高分子のひもが収められているのかを考えていこう. 高分子鎖の広がりの方の大きさを程度を表す尺度を考えながら半定量的に議論しよう. まず, 1 本の高分子鎖をマッチ棒で連結したモデルで考える. ここで 1 本あたりのマッチ棒の長さは Kuhn 長 l_K (DNA で 100 nm 程度, 通常の高分子鎖ではせいぜい 1 nm 程度), マッチ棒の本数は Kuhn セグメント数 N に相当する. l_K と N を用いると乱雑なコイル状に広がっているときのサイズ R_c とコンパクトに凝縮しているときのサイズ R_g はそれぞれ $l_K N^{3/5}$, $l_K N^{1/3}$ となるので¹⁸⁾, コイル状態に対するコンパクトな状態のサイズの比 R_g/R_c は $N^{-4/15}$ であり, 非常に長い高分子鎖 ($N \gg 1$) が凝縮するとサイズが非常に小さくなるのがわかる. しかし, 以上の議論からは, どのような形態をとって高分子鎖が凝縮するのか, その際の構造変化が連続的か不連続的なのかはわからない.

高分子鎖の直径や硬さに注目すると折りたたまれ方が直感的にわかる. 二重らせん DNA は直径 2 nm で, 通常の

高分子鎖の太さ (数オングストローム程度) よりも格段に太く, DNA が普通の高分子鎖に比べて曲がりづらい (硬い). 硬さについては持続長 (鎖上で 2 点の接線ベクトルをとり, 二つのベクトル間の角度相関 $r(0) \cdot r(s) \approx e^{-s/l_p}$ が $1/e$ になる接線上の距離 l_p のこと. s は接線上の距離. DNA では 50 nm . Kuhn 長は持続長の 2 倍の長さ) と鎖の直径の比で判断できる. 通常の高分子は 1 程度であるが, DNA では比が 25 であり, 硬いことがわかる. DNA は Kuhn 長程度の大きさで見れば剛直な棒であるが, 塩基対数が数千以上の十分な長さがあれば, Kuhn 長以上のスケールでは曲がることのできるセミフレキシブルな高分子鎖となる. それでは硬さの異なる高分子鎖ではどのように折りたたまれ方が異なるのだろうか? 硬さの異なる風呂場のホースと木綿糸を片付けるときを思い浮かべて欲しい. 硬いホースはドーナツ状に束ねるのに対し, 柔らかい糸は巻き取りの芯がないとからみ合ってしまう. このことは高分子鎖でも同様である. 硬い DNA 単分子鎖は核形成・結晶成長 (図 3) を経て一種の結晶に相当するドーナツ状の構造を形成する¹⁵⁾. また, コイル状態から折りたたみ状態への変化が一次相転移に相当するので, 図 2 のように不連続な高次構造変化を示すことも理解できる. 高分子鎖の硬さが異なると折りたたまれ方が異なることも理論からもわかっている^{19), 20)}. 以上より, 折りたたみ構造をする高分子を設計するには適度に長く硬い高分子鎖をデザインすればよいことがわかる.

4. 荷電高分子鎖の折りたたみのメカニズム

DNA 単分子鎖がきれいに折りたたむことはわかったが, どのようなメカニズムで起きるのだろうか? ここではビリアル展開による記述^{21)~23)}ではなく, 凝縮剤がどのように折りたたみ転移に関与しているかを考えることでメカニズムをイメージしてゆこう. 高分子鎖と溶媒分子の混合エネルギー F_{mix} , 対イオンの並進運動の寄与 F_{trans} , 鎖上の電荷間のクーロンエネルギー F_{elec} を考慮すると, 高分子鎖の自由エネルギー F は次のように記述できるのである⁵⁾.

$$F \approx F_{\text{ela}} + F_{\text{mix}} + F_{\text{trans}} + F_{\text{elec}} \quad (1)$$

ここで折りたたみ転移の議論をエネルギーの次元ではなく, 後述するようにエントロピーの次元で行ったほうが議論の見通しが良くなる. すると (1) 式は

$$-F/kT \approx S_{\text{ela}} + S_{\text{mix}} + S_{\text{trans}} + S_{\text{elec}} \quad (2)$$

S_{mix} は Flory-Huggins の混合エントロピー, S_{trans} は対イオンの並進エントロピー, S_{elec} は電荷からの寄与である. S_{trans} は気体分子と同様に

$$S_{\text{trans}} \approx N_{\text{counter}} \ln(V/N_{\text{counter}}) \quad (3)$$

である. ここで N_{counter} は対イオン数, V は体積である.

さて, コイル状態と凝縮状態の 2 状態をとることがわ

図4 多価カチオン (3 価カチオン) による DNA 折りたたみの模式図.

図5 PEG による DNA 折りたたみの模式図.

かっている高分子鎖の折りたたみのメカニズムを (1) 式をもとにして議論しよう。まず、3 価カチオンを凝縮剤として用いた場合を考えていこう^{5)~7)}。凝縮剤添加前の DNA の対イオンは H^+ である。転移濃度までは DNA はコイル状態であるが、転移濃度を超えると DNA は不連続な高次構造変化を示す。転移のとき、DNA の対イオンは H^+ から 3 価カチオンにイオン交換して 3 価カチオンがリン酸の負電荷を中和すること ($S_{elec} \sim 0$) で DNA 折りたたみが起こる (図 4)。このとき、DNA 鎖の弾性エントロピーが失われる代わりに、イオン交換により H^+ が放出されて S_{trans} が増大し、結果的に系の自由エネルギーが下がる。PEG を凝縮剤として用いる場合は、メカニズムが多価カチオンの場合と異なる^{2), 3)}。DNA が太く硬い高分子鎖であるのに対し、PEG は細くフレキシブルな高分子鎖であるため、両者は混合しづらく、もともと相分離しやすい状態にある。 Na^+ などの 1 価カチオン濃度を一定にして PEG を加えてゆき、ある濃度を超えると両者は相分離する (図 5)。このとき、DNA 鎖は 1 価カチオンを取り込んで電荷を中和して ($S_{elec} \sim 0$) 折りたたみ、DNA が凝縮した分だけの自由空間が生じ、混合エントロピーが増大して、結果として系全体の自由エネルギーは減少する。

さらに DNA 折りたたみ相転移の温度依存性を考えたとき、折りたたみのメカニズムをエントロピーの次元で考えなければならないことが明確に理解できる。多価カチオン存在下では、温度上昇によりコイル状態から凝縮状態へ変化する^{6), 7)}。これはエントロピーを増大させるために DNA 鎖が 3 価カチオンを取り込んで折りたたむとともに、周囲へ 1 価カチオンを放出させるためである。これに対し、PEG 系では凝縮状態からコイル状態へと変化する^{2), 3)}。こ

れはエントロピーを増大させるためには 1 価カチオンを放出させねばならないためである。このように DNA 折りたたみ相転移は、エネルギーの次元でのセグメント間の相互作用では説明できず、エントロピーを考えなければならないことがわかる。

ここでは DNA 鎖全体が ON/OFF 型にスイッチする例を説明したが、折りたたみには凝縮剤分子のキラリティーも影響してくることや²⁴⁾、凝縮剤を選択することで単分子鎖の中に折りたたまれた部分がコイルで連結されたネックレス状の構造 (分子内相分離) が形成されることが見いだされている^{25)~29)}。

5. 単分子鎖のリズム運動

さて、もう一度細胞中の DNA を振り返ってみよう。エネルギーと物質の出入りのある熱力学的開放条件下の細胞中では折りたたんでいる DNA 鎖が部分的に解け、遺伝情報がアウトプットされている。おおまかには DNA 鎖の周りの環境が変化して、折りたたみ状態とコイル状態の間で行き来して遺伝情報の発現が調節されているといっていよう。折りたたんだ DNA 鎖を解くのは RNA などの酵素である^{10), 11)}。これを凝縮剤濃度として置き換えると、DNA の周りだけ濃度が異なることになる。つまり、局所的に化学ポテンシャルの勾配があることに相当する。これは自由エネルギー的には温度勾配と等しいので、実験的には DNA を局所的加熱場に配置しても、同じような周期的な高次構造変化が再現できるのではないかと予想される。DNA 鎖を光ピンセット¹⁾の局所温度勾配下に配置するとそのような状況を容易につくりだすことができる。高密度の凝縮 DNA は cw Nd:YAG レーザ (波長 $\lambda = 1,064 \text{ nm}$) の収束レーザビーム焦点で容易に捕捉される (低密度のコイル DNA は散乱力のみ受ける)^{30), 31)}。一方、cw Nd:YAG レーザの 3 倍波は H_2O の O-H 伸縮振動のエネルギーに相当するため、一定のレーザ出力以上の焦点部分で局所加熱場をつくりだすことができる。焦点から離れたところでは温度は低く、局所的に温度勾配が形成されている。このようなとき、凝縮 DNA が捕捉された焦点で加熱され、DNA 鎖が解けて焦点領域から外れると鎖は温度の低い領域に入り込んでしまい、折りたたむ。凝縮 DNA に再び引力が作用して焦点で捕捉される。こうして DNA は光ピンセット下では凝縮状態とコイル状態の間を行ったりきたりすることになり、自励振動 (周期的な高次構造変化) することになる^{32)~37)}。PEG 存在下では凝縮 DNA は温度上昇によりほどこけてコイル DNA になるため、このような温度依存性を容易に実現できる。図 6 は PEG 存在下で実験をおこなった際の DNA の自励振動の実験結果である³³⁾。凝縮状態とコイル状態の間で高次構造が周期的に変化している様子が蛍光観察像の変化 (図 6(a)) と像の明るさ変化 (図 6(c)) に

図6 (a) DNA 鎖の自励振動の観察像と (b) その模式図. (c) 実験結果

上段: 蛍光観察像の明るさの変化 (左) と周波数分布 (右). 下段: DNA 鎖の重心位置の変化 (左) と周波数分布 (右) 文献 33 より掲載.

より示されている。このようなリズム運動は折りたたみ相転移を示す高分子鎖に一般的に成り立つことを理論的に明らかにしているので、関心のある方は文献 33) を参照されたい。一方、分子モーターの研究から分子内の一部分が order-disorder 転移 (1 次相転移) を示すことが明らかになってきており^{38)~40)}、上記で紹介した DNA 鎖の自励振動と分子モーターの動作原理とは密接に関連していると筆者は考えている^{33), 35), 41)}

6. ま と め

DNA 単分子鎖の折りたたみの実際とメカニズムのエッセンス、さらに非平衡条件下では DNA 鎖から自発的にリズム運動が発現することを簡単に紹介した。一方で DNA 鎖の高次構造と機能性 (遺伝子活性) の関係についても関心がもたれるが、これまでに明らかな相関があることがわかってきている。詳しくは文献 22), 23) を参照されたい。以上のように DNA 単分子鎖にまつわる現象を俯瞰すると、機能が構造に繰り込まれている高分子鎖に適当な場 (凝縮剤などに相当する分子や非平衡条件) を与えると 1 本の高分子鎖が場と相互作用し、生命現象の理解につながる生き生きとした現象が見いだされることが期待される。

- 1) J. D. Watson: "The Double Helix: A Personal Account of the Discovery of the Structure of DNA," Atheneum, New York, 1968
- 2) H. Mayama, T. Iwataki, K. Yoshikawa: *Chem. Phys. Lett.*, **318**, 113 (2000)
- 3) H. Mayama, K. Yoshikawa: *Macromol. Symp.*, **160**, 55 (2000)
- 4) V. V. Vasilevskaya, A. R. Khokhlov, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa: *J. Chem. Phys.*, **102**, 6595 (1995)
- 5) K. Yoshikawa, M. Takahashi, V. V. Vasilevskaya, A. R. Khokhlov: *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 3029 (1996)
- 6) T. Saito, T. Iwaki, K. Yoshikawa: *Europhys. Lett.*, **71**, 304 (2005)
- 7) H. Murayama, K. Yoshikawa: *J. Phys. Chem. B*, **103**, 10517 (1999)
- 8) M. Takahashi, K. Yoshikawa, V. V. Vasilevskaya, A. R. Khokhlov: *J. Phys. Chem. B*, **101**, 9396 (1997)
- 9) Y. Yamasaki, K. Yoshikawa: *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 10573 (1997)
- 10) K. Tsumoto, K. Yoshikawa: *Biophys. Chem.*, **82**, 1 (1999)
- 11) N. Makita, K. Yoshikawa: *FEBS Lett.*, **460**, 333 (1999)
- 12) Y. Ichiba, K. Yoshikawa: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **242**, 441 (1998)
- 13) N. Yoshinaga, K. Yoshikawa, S. Kidoaki: *J. Chem. Phys.*, **116**, 9026 (2002)
- 14) Y. Yoshikawa, K. Yoshikawa, T. Kanbe: *Langmuir*, **15**, 4085 (1999)
- 15) N. V. Hud, K. H. Downing: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14925 (2001)
- 16) K. Yoshikawa, Y. Matsuzawa: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 929 (1996)
- 17) K. Yoshikawa, Y. Matsuzawa: *Physica D*, **84**, 220 (1995)
- 18) A. Yu Grosberg, A. R. Khokhlov, "Statistical Physics of Macromolecules," American Institute of Physics, New York, 1994
- 19) H. Noguchi, S. Saito, S. Kidoaki, K. Yoshikawa: *Chem. Phys. Lett.*, **261**, 527 (1996)
- 20) H. Noguchi, K. Yoshikawa: *J. Chem. Phys.*, **109**, 5070 (1998)
- 21) a) 吉川研一: 数理科学, No. 468, 5 (2002); b) 高木清二: 数理科学, No. 468, 44 (2002); c) 坂上貴洋: 数理科学, No. 468, 51 (2002)
- 22) 小穴英廣, 湊元幹太, 吉川研一: バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 196 (2003)
- 23) 吉川祐子, 湊元幹太, 吉川研一: 生物物理, **42**, 179 (2002)
- 24) M. Ito, A. Sakakura, N. Miyazawa, S. Murata, K. Yoshikawa: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 12714 (2003)
- 25) N. Miyazawa, T. Sakaue, K. Yoshikawa: *J. Chem. Phys.*, **122**, 044902 (2005)
- 26) N. Chen, A. A. Zinchenko, S. Murata, K. Yoshikawa: *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 10910 (2005)
- 27) A. A. Zinchenko, V. G. Sergeyev, S. Murata, K. Yoshikawa: *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4414 (2003)
- 28) Y. Yoshikawa, M. Suzuki, N. Chen, A. A. Zinchenko, S. Murata, T. Kanbe, T. Nakai, H. Oana, K. Yoshikawa: *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3101 (2003)
- 29) S. Takagi, K. Tsumoto, K. Yoshikawa: *J. Chem. Phys.*, **114**, 6942-6949 (2001)
- 30) 小原 實, 神成文彦, 佐藤俊一: レーザー応用光学, 共立出版, 1998
- 31) S. Katsura, K. Hirano, Y. Matsuzawa, K. Yoshikawa, A. Mizuno: *Nucl. Acid. Res.*, **26**, 4943 (1998)
- 32) 北畑裕之, 吉川研一: "化学・生物の世界のリズム, リズム現

- 象の世界” (非線形・非平衡現象の数理①), 蔵元由紀編, 三村昌康監修, 東京大学出版会, 2005
- 33) H. Kitahata, H. Mayama, K. Yoshikawa: *Phys. Rev. E*, **70**, 021910 (2004)
- 34) H. Mayama, K. Yoshikawa: *Faraday Disc.*, **120**, 67 (2001)
- 35) H. Mayama, S. M. Nomura, H. Oana, K. Yoshikawa: *Chem. Phys. Lett.*, **330**, 361 (2000)
- 36) 眞山博幸, 吉川研一: 高分子, **51**, 936 (2002)
- 37) 眞山博幸, 吉川研一: 電気学会誌, **121**, 238 (2001)
- 38) 小椋 光, 吉田賢右編: 特集 エネルギー変換装置 ATPase の作動原理, タンパク質・核酸・酵素, **47**(9), 1169 (2002)
- 39) P. Boyer: *Biochim. Biophys. Acta, Bioenergetics*, **1458**, 252 (2000)
- 40) S. Y. Bershitsky, *et al.*: *Nature*, **388**, 186 (1997)
- 41) K. Yoshikawa, H. Noguchi: *Chem. Phys. Lett.*, **303**, 10 (1999)

Exotic Properties of a Single DNA Chain

Hiroyuki MAYAMA

Nanotechnology Research Center, Research Institute for Electronic Science, Hokkaido University

E-mail: mayama@es.hokudai.ac.jp

Abstract: Individual giant DNA chains show a discrete conformational change, the folding phase transition, between an elongated coil state and a folded compact state under existence of multivalent cations, polymer chains, multivalent anions, and alcohols on the level of a single molecular chain. The stiffness of a polymer chain is essential for the transition. The single DNA chain also expresses a rhythmic conformational change between the coil and folded states under a thermodynamically open condition such as a local temperature gradient generated by optical tweezers. The coupling between the folding phase transition and the thermodynamically open condition is essential. These will be common for semiflexible polymer chains.

Keywords: Semiflexible Polymer Chain/Discrete Conformational Change/Folding Phase Transition/Optical Tweezers/Thermodynamically Open Condition/Rhythmic Conformational Change