

## 8. 高分子時空構造の自己制御：スイッチング・リズム・時間発展

研究代表者 吉川 研一

### 1. 生命の叡智に学ぶ

近代科学は、ビルや橋梁等の巨大な構造物、飛行機や自動車などの輸送手段、肥料や農薬を活用する食物生産方式、高品質・高耐久性の化学製品など、豊かな現代生活に欠かせないものを造りあげてきた。それらは、巨大さ、速さ、丈夫さ、効率などの点で、すでに生物の能力を凌駕したものとなっている。しかしながら、21世紀を迎え、“自然を征服”する科学技術から、“自然と調和”した科学技術へと、その発展方向を転換させることの必然性が明かとなりつつある。一方で、地球上の生物には、数十億年の長きに渡る進化のなかで獲得してきた叡智が刻み込まれている。生命の叡智を学ぶことにより、人類はその未来を切り開いていかなければならない由縁である。

近年の分子生物学の著しい発展に伴い、生命体を構成する数多くの分子の構造が明らかになりつつある。さらに、「構造生物学」の名のもと、蛋白質などの“生命の部品”の巧妙な機能が、分子の構造論により解き明かされようとして来ている。しかしながら、生命の謎を、数々の部品に関する知識の単純な集積からは明らかにすることは不可能である。部品である生体分子がどのようにして自発的に組織化され、そして動的な機能の発現へとつながるのか、といった視点が不可欠である<sup>1,2</sup>。各々の分子にはない機能や特質を“分子複合系”で実現する。このような、研究の潮流を作りだすことが求められている。

本研究では、生命の巧妙な機能の中でも、心臓の拍動、神経発火、等温系での運動機関など、時間軸上の現象に注目し、それらの現実空間上のモデルを分子複合系で創り出すことを主な目的としている。換言すると、熱力学的な開放条件下、分子集団が自ら時間的、空間的構造を形成し、そして時間発展する、そのような実験系について研究を進めた。このような研究は、生命の本質的な理解に役立つのみならず、“自然と調和”した科学技術の創造に貢献するものと期待される。

### 2. 高次構造のスイッチング：弱いものほど大きな変化をひきおこす

私達のグループは、長鎖 DNA の高次構造に関する研究を系統的に進めてきている。そこでは、以下のようなことが既に明らかになってきている<sup>3,4</sup>。(1) 百塩基対(100bp)程度の長さの二本鎖 DNA (オリゴマー) は、硬い棒のような性質があり、簡単には折れ曲がらない。それに対して、一万塩基対(10kbp)以上のサイズの長鎖 DNA は、くねくねと折り曲がる紐としての性質を示すようになる。(2) 長鎖 DNA は膨潤したコイル状態か高密度に折り畳まれた状態の二つの形態をとり、その間の変化は on/off 型の不連続な転移となる。(3) DNA に限らず、一般的に単一分子鎖は、核形成と結晶成長 (nucleation-growth) をへて、棒状、ドーナツ状、球状などの形態のナノ構造体を自発的に形成する。ナノ構造体の形態は、分子鎖の堅さ(stiffness)とセグメント間の引力に依存する。(4) 凝縮剤が多価カチオンの場合と、水溶性の高分子とでは、DNA の折り畳み転移に対する 1 価カチオンの効果は逆転し、前者は阻害し、後者は促進する。

本研究では、このような折り畳み転移に関する研究を更に進展させている。レーザーによる DNA の高次構造制御および搬送<sup>5,7</sup>、ATP<sup>8</sup>や RNA<sup>9</sup>とのクロストークによる DNA 高次構造のスイッチングなどの論文を発表してきている。ここでは、そのような研究成果の中でも分子内相分離の話題を紹介したい。

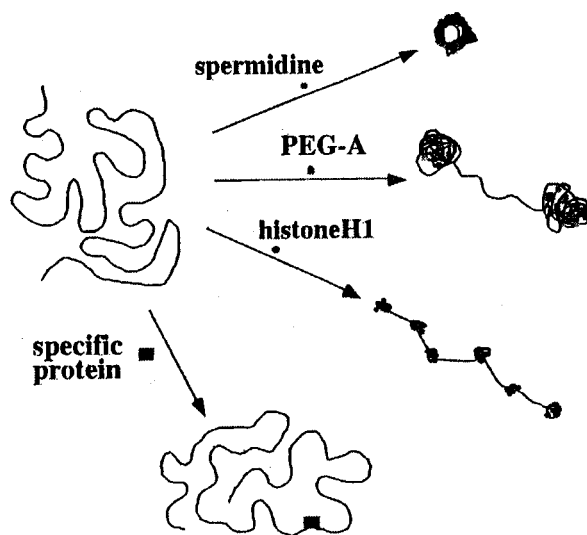


図1 DNAの折り畳み転移の様相  
制限酵素のような特異的な結合は高次構造を変化させず、非特異的で弱い結合ほど、より大きなスケールの変化を引き起こす。

DNAは高度に負電荷を有するので、陽イオン性の物質を加えることにより、その高次構造が変化する<sup>10</sup>。高次構造変化の様式は、図1の様にまとめられることを、私達は明らかにした。スペルミジン(3+)やスペルミン(4+)などのポリアミン、Co(III)、Fe(III)などの多価カチオンは、長鎖DNA分子全体にわたってon/off的な折り畳み転移を引き起こす。これらの多価カチオンは、DNAに対して非特異的に結合し、結合力も弱い。それにとは対照的に、制限酵素のように特定の塩基配列に強く結合する場合には、結合部位の局所的な変形は引き起こすが、長鎖DNAの高次構造には影響を与えない。結合力が、これらの中にあるカチオンの場合には、分子鎖内に相分離が生じ、部分凝縮構造が形成される。アミノ基を修飾したポリエチレングリコール(PEG-A)<sup>11</sup>とヒストンH1<sup>12</sup>(陽イオン性蛋白質)とでは、前者の方が結合力が弱く、部分凝縮構造が相対的により大きなスケールをとっている。後者では部分凝縮の構造単位がより小さくなり、その結果、首飾り(pearling)の形態をとる。

このように、DNAに対するリガンドの結合能を調節することにより、その高次構造を制御できることが明らかにされた<sup>13,14</sup>。DNA以外の荷電高分子についても、同様なシナリオにより、多様なナノ構造体を生成させることが可能であると考えられる<sup>15</sup>。その方向の研究は現在進行中である。また、このようなDNAの部分凝縮構造の生成や、異なる構造間のon/offスイッチングなどの、新たに見い出された現象は、生物学的にも大きな意味があるものと期待される。実際、細胞中で遺伝子発現が活発な部位は、DNAの折り畳みが弛んでいることが知られている。DNAの高次構造スイッチングは、遺伝子発現のon/off型の制御機構に密接に関連している可能性が高い<sup>16</sup>。

### 3. リズム運動：分子複合系は軽やかなリズムがお好き

“生命とは何か？”といった問いを、大上段からふりかざしてみても、“哲学的”な論争の枠内に留まってしまいそうである。もっと現実的に、生命の特徴を考えてみよう。心臓の拍動、呼吸、神経興奮、細胞周期など、生物には色々なレベルの、自発的なリズムを見出すことができる(分岐現象)。これらの生命現象のリズムには、1)リズムのある状態と無い状態との間の変化が不連続である。2)リズムの周期や振幅には安定性があり、摂動を与えてももとのリズムに自然に戻ってしまう(自己修復)。3)複数のリズムは相互に同調して、新たな時空間の秩序を作り出す(引き込み同調)。4)定常的なリズムは、エネルギーの流れにより駆動されている(散逸構造)。

本研究の中で、私達は上記の1)~4)のような特質(非線形ダイナミクス)を有するような、分子複合系を設計・創出して来ている。ここでは、それらの中でも、リズム的な運動に関する実験系について述べる。

### 3-1, 光エネルギー駆動型のリズム運動

レーザー光の焦点を絞ると、物体を掴んだり、運んだりすることができる（レーザーピンセット）。一方、レーザー光は、制御の可能なエネルギーの流れの場を与えてくれる。すなわち、レーザーを用い熱力学的な開放条件を作り出すと、そこに捉えた物質系に、上記のような非線形ダイナミクスを引き起こすことができるものと、期待される。私達は、レーザーを用い、いくつかの異なる実験系で、自発的なリズム運動を発現させることに成功した。

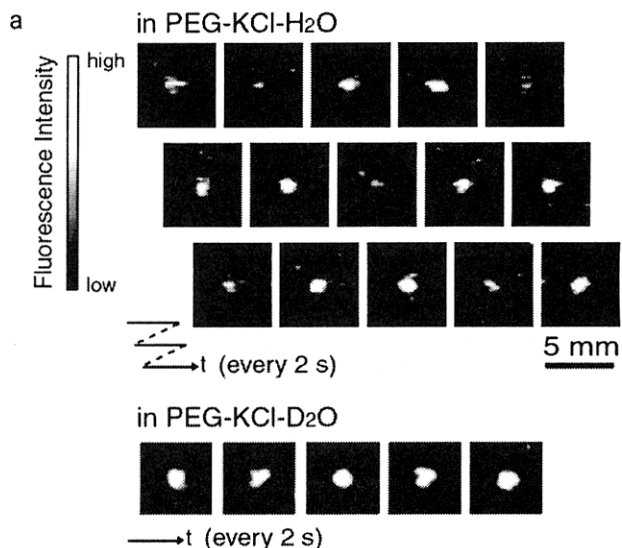


図 2 レーザー場によって引き起こされた DNA 分子の構造転移のリズム<sup>17</sup>  
 a) T4 DNA 分子の蛍光顕微鏡像 b) 模式図

図 2 には、長鎖 DNA 分子について、定常的なレーザー(1064nm)照射下、引き延ばされたコイル状態と、コンパクトな凝縮状態との間の、リズム的な運動の実験例を示した<sup>17</sup>。レーザーを照射している時には、DNA 分子はこのような、安定な繰り返し運動をおこなう。

表 1 は、私達の研究室でこれ迄に見い出してきた、レーザー駆動型のリズム運動の実験系をまとめたものである。

表 1 レーザーに駆動された自発的なリズム運動

実験系	リズム現象	周期	メカニズム
ビーズの集団	クラスターの成長と爆発	1~2 秒	レーザーの誘電引力と散乱斥力の競争
長鎖 DNA	高次構造のスイッチング	3~6 秒	レーザーによる局所的な温度勾配と、DNA の相転移
脂質チューブ	振り子運動	1~25 秒	光軸のスプリットによる、誘電場と温度場の特異性
水滴	水滴の成長と消失	1~3 秒	過飽和水蒸気下の成長と、界面張力による水源への吸収・消失

### 3-2, 化学エネルギー駆動型

生物は、ATP 等の化学エネルギーを、等温条件下、効率良くベクトル的な仕事に変換している。生物の分子機械は、カルノーサイクルに代表されるような熱機関とは、その動作原理が全く異なることは明らかである。私達は、化学反応により直接ベクトル的な運動を取り出すことを目指している。ここでは、そのような研究の流れの中でも、液滴の周期的な運動の実験結果について説明したい。

図3は、Belousov-Zhabotinsky(BZ 反応)の液滴中、化学波により対流運動が引き起こされているところを可視化したものである。界面に化学波が到着すると、界面近傍ではその部分に向かっての流れが生じ、同時にバルクの中に沈み込む流れを引き起こしていることがわかる。等温条件下、化学反応から直接、流体の運動を引き起こした実験例となっている。このような運動は、BZ 反応の触媒のフェロインが、2 価から3 価に変化すると、界面張力が増大し、これが界面にそっての運動につながる、といったメカニズムで説明される。

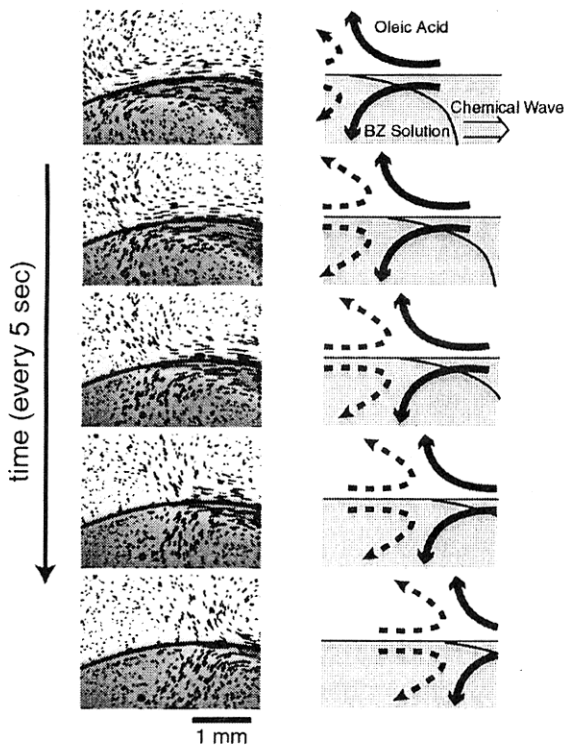


図3 BZ 化学反応によって誘起された流体の運動。  
化学波の進行に伴い、対流が生じている。(北畑ら)

BZ 反応のような非線形の化学反応系では、適当な場所に刺激(trigger)を与えることにより、方向性を制御した化学波を作り出すことができる。しかしながら、化学波に方向性があっても、均質な反応溶液中では何の運動も引き起こさない。このことは、既に良く知られた事実であった。本研究では、界面といった、空間的に異方的な場では、方向性のある運動が生じることを明らかにした。化学波による流体の運動は、図3のように実験系のサイズが小さくなり、mm あるいはそれ以下のスケールで重要になる。細胞は、まさに mm 以下のスケールで、化学エネルギーを仕事に変換していることを、思い起こすと、今回の実験の意味がより鮮明になるものと思われる。また、図3に示した流体運動の速度は、細胞中、分子機械が引き起こしている運動の特徴的な速度に匹敵、あるいはそれ以上の大きさであることにも注目したい。

### 4. 時間発展：成りゆきにまかせてみる

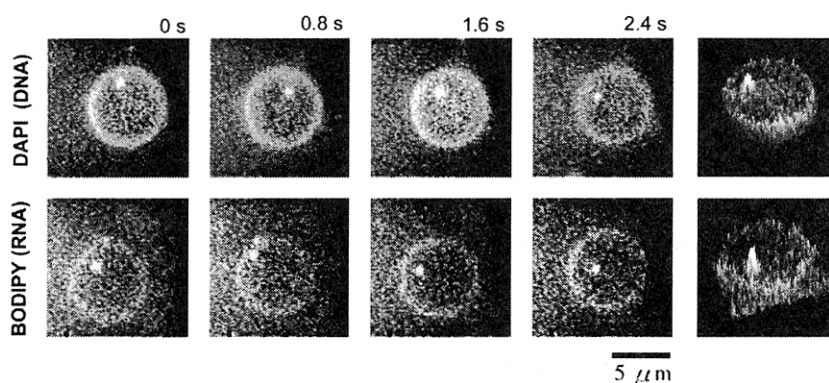
化学の言葉で生命を語る時には、“鍵と鍵穴”の関係を考えることが基本になっているように思われる。確かに、これ迄に多数の“鍵と鍵穴”が見つけれられてきており、生物がその関係を巧妙に利用していることには、疑いの余地が無い。しかしながら、ヒトをみても、そ

の遺伝子の総数3万個に、対して3万個の特異的な相互作用を考えることでもって、細胞のシステムが上手く働くことを説明しようとしても困難である。近代的な工場のベルトコンベアーからなるシステムとは異なり、細胞の中には数多くの化学物質、あるいは“鍵と鍵穴”が、複雑に入り混じって存在している。多数の“鍵と鍵穴”からなる極めて複雑なネットワークのダイナミクスを考えるだけでは、生命の巧妙さは理解できないであろう。細胞内外の環境（非平衡開放条件の場合）を考え、そこで働く自律的な分子システムとして、生き物を捉える視点が必要である。

私達は、リン脂質多重膜（マルチラメラ）に、DNAを含む溶液で膨潤させると、効率良くDNAを取り込んだ細胞サイズ( $\mu\text{m}$  オーダ)のリン脂質小胞が、自発的に生成することを見出した<sup>18</sup>。これは、リン脂質膜の膨潤の速度過程を物理化学的に考察することにより、実験系を設計し、得られた成果である。このように生成した小胞は、一週間程度放置しておいても安定であり、破壊や融合などの現象は見られない。本方法で、酵素や基質を含む様々な反応溶液をそのまま小胞に取り込ませる可能であることも明らかになってきている。図4は、小胞中でT7DNAの転写反応が起っていることを示したものである<sup>19</sup>。ここで、小胞内で合成されたRNAは蛍光色素でラベルしたリボヌクレオチドを取り込ませることにより可視化している。

図4 細胞サイズ小胞内での転写反応<sup>19</sup>

上段はDNA、下段はRNAを可視化。左側4コマは小胞内のブラウン運動、右端は蛍光強度分布を示している。



このように、リン脂質小胞を用いることにより、細胞サイズのマイクロ反応系を構築することが可能である。近年、化学や生化学では、実験系のダウンサイジングの試みが、先を競うようにして進められて来ている。確かに、数十 $\mu\text{m}$ のオーダまでは、“シリコンテクノロジー”が有用であるようである。しかし、もう一桁実験系が小さくなると、表面への不可逆吸着や変性が、マイクロなラボの実現に大きな困難をもたらす。その点、細胞が活用しているリン脂質二分子膜系は、マイクロな反応容器として理想的な場を提供する。レーザーによる無接触搬送の技術<sup>5,7</sup>などと、組み合わせることにより、生化学や分子生物学に、“細胞サイズ”のスケールの実験が日常的な手法となるような日も、そう遠く無いのではと期待される。

#### [ 謝辞 ]

本稿で紹介した研究は、CRESTの全面的な支援のもと行ったものである。研究統括の櫻井先生ならびに、CREST事務局のバックアップ無くしては、今日の成果を得ることは不可能であった。心よりの謝意を表すものである。研究成果の多くは、次のような方々との共同研究によっている。村田教授(名大環境)、Khokhlov教授(Moscow)、Kabanov教授(Moscow)、中谷教授(Strasbourg)、竹安教授(京大生命)、前田教授(九大工)、吉川博士(名古屋文理短)、松澤博士、水野教授(豊橋技科)、中田聡博士(奈良教)、神戸博士(名大医)および、それらの研究室に所属される研究者の方々にお礼の言葉を述べたい。また、京都大学理学部の私共の研究室に所属する小穴博士および博士研究員ならびに、研究室の出身者、山崎、相原両君博士(理研)、野口博士(分子研)、高木博士(Nice)、岩瀧博士、Mikailenko博士、大学院生、研究協力の方々の奮闘に感謝する。

## References

1. 吉川研一, 秋田谷龍男, “非線形非平衡系としての生命”, 数理科学, **441**, 21 (2000).
2. 眞山博幸, 吉川研一, “時空間秩序の自己生成と生命現象”, 電気学会誌, **121**, 238 (2001).
3. 木戸秋悟, 吉川研一, “長鎖 DNA 構造を見る”, 高分子, **46**, 252 (1997).
4. 吉川研一, “もつれずに分子の糸を巻く: DNA の折り畳み転移”, パリティ, **13** (12), 77 (1998).
5. Y. Matsuzawa, K. Hirano, K. Mori, S. Katsura, K. Yoshikawa and A. Mizuno, "Laser Trapping of an Individual DNA Molecule Folded Using Various Condensing Agents", *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 11581 (1999).
6. Y. Matsuzawa, Y. Koyama, K. Hirano, T. Kanbe, S. Katsura, A. Mizuno and K. Yoshikawa, "Visualization and Optical Trapping of an Individual Submicrometer-Sized Assembly in Aqueous Solution: Aminated Polyethylene Glycol (PEG-A) Complexed with Palmitic Acid and DNA in Poly(ethylene glycol) (PEG) Solution", *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 2200 (2000).
7. Y. Yoshikawa, S. M. Nomura, T. Kanbe and K. Yoshikawa, "Controlling the Folding/Unfolding Transition of the DNA-Histone H1 Complex by Direct Optical Manipulation", *Chem. Phys. Lett.*, **330**, 77 (2000).
8. N. Makita and K. Yoshikawa, "ATP/ADP Switches the Higher-Order Structure of DNA in the Presence of Spermidine", *FEBS Lett.*, **460**, 333 (1999).
9. K. Tsumoto, and K. Yoshikawa, "RNA Switches the Higher-Order Structure of DNA", *Biophys. Chem.*, **82**, 1 (1999).
10. Y. Yamasaki, Y. Teramoto and K. Yoshikawa, "Disappearance of the Negative Charge in Giant DNA with a Folding Transition", *Biophys. J.*, **80**, 2823 (2001).
11. K. Yoshikawa, Y. Yoshikawa, and Toshio Kanbe, "Highly Effective Compaction of Long Duplex DNA Polyethylene Glycol with Pendant Amino Groups", *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6473 (1997).
12. 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 (2001).
13. T. Iwataki, K. Yoshikawa, S. Kidoaki, D. Umeno, M. Kiji and M. Maeda, "Cooperativity vs. Phase Transition in a Giant Single DNA Molecule", *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9891 (2000).
14. S. Takagi, K. Tsumoto and K. Yoshikawa, "Intra-Molecular Phase Segregation in a Single Polyelectrolyte Chain", *J. Chem. Phys.*, **114**, 6942 (2001).
15. H. Noguchi and K. Yoshikawa, "Folding Path in a Semiflexible Homopolymer Chain: A Brownian Dynamics Simulation", *J. Chem. Phys.*, **113**, 854 (2000).
16. 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 (2001).
17. H. Mayama, S. M. Nomura, H. Oana and K. Yoshikawa, "Self-Oscillating Polymer Chain", *Chem. Phys. Lett.*, **330**, 361 (2000).
18. 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 (2001).
19. 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*, in press.