

# 単一高分子鎖の自励振動

CREST (JST)、京都大学大学院理学研究科 眞山 博幸

熱力学的開放条件下で1次相転移（凝縮状態とランダムコイル状態の2状態間の高次構造変化）を示すT4DNA単分子鎖が、周期的に高次構造変化を示す現象（単一高分子鎖の自励振動）について報告する。具体的には、メゾスコピックな1次相転移系の外場応答性と局所的な非平衡条件を競合させることで、自励振動が発現すると予測し、次のような実験を行った：cw Nd:YAG レーザー（波長 1064 nm）の光ピンセットを用い、レーザー焦点に局所的に熱力学的開放条件を構築して非平衡度（局所加熱による温度勾配）を設けると同時に、そこにDNA凝縮体を捕そくした（予め局所加熱により凝縮状態のDNAが解けるように折り畳み相転移の温度依存性をデザインした）。その結果、自励振動（周期～秒）が観測され、理論的には熱力学的開放条件下に配置されたメゾスコピックな1次相転移系から発現するリミットサイクル振動として記述されることが明らかにされた。

## 1 緒言

生体中には、数多くの生体分子機械（筋肉、チャンネルタンパク質、酵素）が存在しており、生命活動の維持の上で重要な役割を果たしている。その中で、筋肉の基本要素であるアクチン-ミオシン系に代表される、ATP加水分解により一方向性の運動を作り出すタンパク質（分子モーター）について、研究が精力的に進められてきている[1]。我々が日常的に仕事を取り出すために用いている熱機関の動作環境に対し、生体分子機械は等温条件・激しい熱揺らぎの下で仕事を作り出しており、熱機関とは異なる動作原理に大変関心がもたれている。この問題に関連し、我々は非平衡開放条件下にあるメゾスコピックな1次相転移系（1次相転移を示す高分子単分子鎖）が適当なフィードバック条件の下、その高次構造の自励振動を引き起こすことを理論的に予想しており[2]、分子モーターの動作原理になっていると予想している。本研究では、単一高分子鎖の自励振動を実験的に検証し、高分子単分子鎖の自励振動の一般論を構築することを目指した。実験を行った結果、光ピンセットを用いることにより熱力学的開放条件下に配置したDNA単分子鎖から周期的な高次構造変化が発現する現象（単一高分子鎖の自励振動）が観測された。ここでは簡単に内容を紹介する（詳細は文献[3]を参照）。

## 2 実験

**試料作製** 試料溶液は最終濃度が以下のようにになるように作製した：Tris-HCl 緩衝溶液 10 mM (pH 7.8)、蛍光色素 DAPI 0.3  $\mu\text{M}$  (Molecular Probes 社)、ポリエチレングリコール (PEG) 0 - 150  $\text{mg ml}^{-1}$  (平均分子量  $2 \times 10^4$ 、キシダ化学)、T4DNA 0.1  $\mu\text{M}$ -塩基対 (ニッポンジーン)、塩化カリウム 0.3 M (和光純薬)。単分子観測前に室温 22  $^{\circ}\text{C}$  で 30 分間静置した。

**単分子観測** 単分子観測には、光ピンセット用に改造を施した Nikon TE-300、高感度カメラ Hamamatsu Photonics 社製 SIT カメラ、光ピンセット用のレーザー光源に Spectron 社製 SL902T (cw Nd:YAG レーザー、波長 1064 nm) を用いた。得られた画像はビデオテープに録画し、その後、画像解析ソフト Cosmos32 (ライブラリー社) を用いて画像解析を行った。

## 3 結果および考察

最近、巨大 DNA 単分子鎖 (荷電高分子鎖) が、中性高分子 (PEG)、多価カチオン (金属イオン、ポリアミン)、カチオン性界面活性剤等 (凝縮剤) の添加あるいは温度変化により、折り畳み相転移が引き起こされ、ランダムコイル状態 (水溶液中にひろがった状態。以下、コイル状態) と凝縮状態 (一種の結晶状態) の 2 状態間で高次構造変化 (体積変化は  $10^4 \sim 10^5$  倍) が引き起こされる明らかとなっている。さらに、このとき DNA 鎖近傍に分布している対イオンの並進エントロピーが折り畳み相転移の機構に重要な寄与をしており、系のエントロピーを増大させる方向に作用する結果、DNA の高次構造変化が引き起こされる[4-6]。実験では、折り畳み相転移 (1 次相転移) の温度依存性をデザインし、局所的に熱力学的開放条件下 (温度勾配) に配置することにより、DNA 自身が非平衡度を感じて 2 状態間で周期的に高次構造変化が発現する現象を作り出すことを目指した。実験的には光ピンセットを水溶液中に収束させることでレーザー焦点で局所加熱 (非平衡度) を誘起し、 $\mu\text{m}$  スケールの領域に 10  $^{\circ}\text{C}$  以上の温度勾配を作ることができる[7,8]。また、PEG を凝縮剤として用いることで、温度上昇と共に凝縮状態からコイル状態に変化させることができる[4]。コイル条件での DNA のサイズが局所加熱場のサイズよりも大きければ、DNA 自身が温度勾配を感じ、2 状態間で周期的な高次構造変化を発現することが予想される (自励振動)。

まず、折り畳み相転移の条件とそのときの温度依存性をデザインすることが重要となる。そこで鋭敏な温度依存性を示す相転移領域を探索した。図 1 に PEG を用いた折り畳み相転移の結果を示した。DNA 単分子鎖は凝縮剤の低濃度領域ではコイル状態、高濃度領域では凝縮状態をとり、中間領域に有限幅の共存領域が存在していることが確認された。

次に温度勾配を利用して自励振動を発現させるため、共存領域における DNA 単分子鎖の温度応答性を調べた。PEG = 73 mg ml<sup>-1</sup> の試料を用いて温度応答性を調べた結果を図 2 に示した。図 2 は異なる温度での DNA 単分子鎖の長軸長  $L$  の分布図である。凝縮状態とコイル状態に相当する 2 つのピークが存在しているが、低温側では凝縮状態、高温側ではコイル状態がより安定であることが示された[3]。

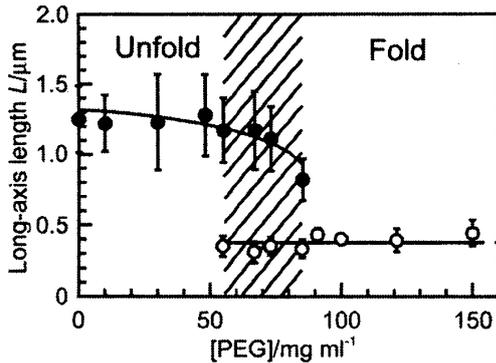


図 1 DNA 単分子鎖の長軸長  $L$  の PEG 濃度依存性. 文献[3]より改変.

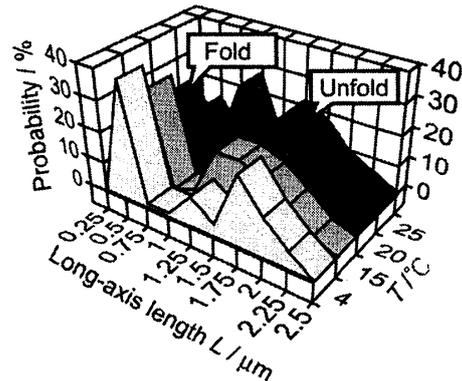


図 2 異なる温度での DNA 単分子鎖の長軸長  $L$  の分布依存性. 文献[3]より改変.

このように、折り畳み転移の条件とその温度依存性が確認された。さらに、図 1-2 より、凝縮状態の長軸長が 0.5  $\mu\text{m}$  程度であるのに対し、コイル状態の長軸長が 1.5  $\mu\text{m}$  程度のサイズであることがわかる。一方、局所加熱場のサイズはレーザー波長の 1  $\mu\text{m}$  程度であるため、DNA 自身が非平衡度（温度勾配）を感じる事が可能となる（環境との対話）。

以上の実験結果を踏まえ、DNA 単分子鎖の自励振動の実験をおこなった。具体的には、水溶液中の DNA 凝縮体を光ピンセットで捕そくし、その蛍光観察像の変化を詳細に観測した。その結果、図 3 のようなサイクルが観測された：(1) 凝縮体が局所加熱により解け始め、完全にコイル状態になる過程（融解、1  $\rightarrow$  2  $\rightarrow$  3）、(2) 冷たい領域に入り込んだ部分で核形成が起こり、結晶成長し、再び完全な凝縮体になる（核形成 & 結晶成長、3  $\rightarrow$  4  $\rightarrow$  1）。すなわち、1次相転移の kinetics が観測された。ここで、核形成 & 結晶成長の過程はレーザー焦点近傍で起きるため、凝縮部分が形成されると直ちにトラップ力が働き、レーザー焦点に引き戻され、再び DNA が温度勾配下に配置される。局所加熱の寄与を調べるため、波長 1064 nm の光子を吸収しない D<sub>2</sub>O を用いて同様の実験を行ったが、振動現象は観測されなかった。このことから、局所加熱が確かに存在しており、自励振動に必須な寄与であることが明らかとなった。図 4 に DNA 単分子鎖の自励振動の基本波の周波数のレーザー出力依存性を示した。レーザー出力に有限の閾値が存在していること、閾値以上の領域では、振動周波数にレーザー出力依存性があり、本実験で観測された振動現象がリミットサイクル振動であることが示されている。また、振動の周期は秒のオーダーであり、コイル-凝縮状態間の遷移に要する特徴的な時間と等しい[9]。

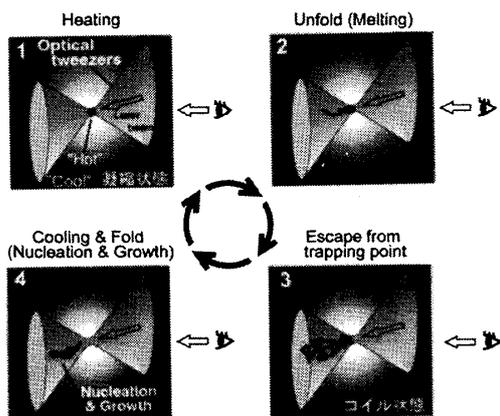


図3 DNA単分子鎖の自励振動の模式図. 文献[3]より改変.

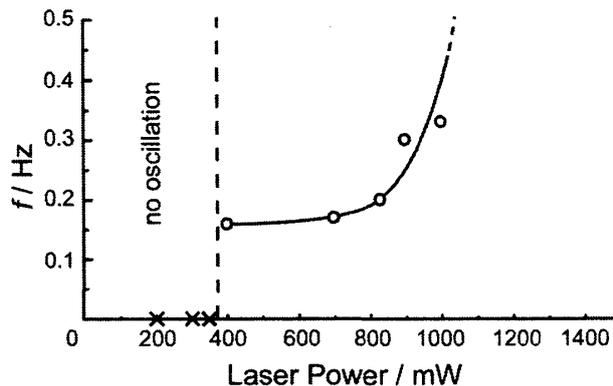


図4 振動周期(基本波)のレーザー出力依存性. 文献[3]より改変.

以上のように観測された DNA 単分子鎖の自励振動は、環境との間にフィードバックの関係を持つメゾスコピック系の1次相転移の描像から導出される。秩序変数 $\eta$ が0から+1まで変化するとしたとき、非平衡条件下に置かれた1次相転移系からは、次の2式で表されるリミットサイクル振動が発現する[3]。

$$\varepsilon \frac{d\eta}{dt} \equiv -\frac{\partial F}{\partial \eta} = -4a\eta^3 + 3b\eta^2 - 2c\eta - \tau + \xi(t) \quad (1)$$

$$\frac{d\tau}{dt} = h - \beta(1 - \eta)^\gamma \quad (2)$$

ここで、 $\tau$ は”環境”に依存する変数であり、ここでは DNA が感じる温度勾配に相当する(細胞中では、生体高分子周辺のイオンや ATP 等の化学ポテンシャルに相当する)。 $\eta$ は規格化した高分子鎖のセグメント密度(0 ~ コイル状態、+1 ~ 凝縮状態)、 $h$ は非平衡度であり、ここでは局所加熱に相当する。 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ は正の定数、 $\xi(t)$ はホワイトノイズである。ここで、 $\eta$ を以下のように DNA の慣性半径  $R$  で定義した。

$$\eta = (R^{-3} - R_{\text{unfold}}^{-3}) / (R_{\text{fold}}^{-3} - R_{\text{unfold}}^{-3}) \quad (3)$$

$R_{\text{fold}}$ 、 $R_{\text{unfold}}$  は、それぞれ凝縮状態、コイル状態の慣性半径である。式(1)と(2)を適当なパラメータ領域で数値計算するとリミットサイクル振動が得られる[3]。ここで論じた理論のエッセンスは、環境と”対話”するメゾスコピックな1次相転移系からリミットサイクル振動が作り出されるという点にある[2,10]。

以上のように、実験と理論の両面から熱力学的開放条件下ではメゾスコピックな1次相転移系から、リミットサイクル振動が発現することが示された。自由エネルギーの次元で考えた時、光ピンセットで作られた温度勾配は化学ポテンシャル勾配と等価であることから、等温系で構築した化学ポテンシャル勾配下でも同様な現象が発現することが容易に予想される。また、リミットサイクル振動であれば、強い熱揺らぎ下でも周期的な高次構造変化を起こし、何らかの運動を作り出すことができるであろう。このように、本研究で得られた原理は分子モーター

の動作原理となり得る。興味深いことに、最近の分子モーターの研究から、分子モーターとなっているタンパク質は、2つの安定な高次構造をとること（1次相転移）が明らかとなっている。さらに ATP 加水分解に伴い（非平衡条件に相当）、その2状態間で周期的に高次構造変化（自励振動）していることを強く示唆する結果が得られてきている[1]。このように従来の分子モーターで起きている現象と本研究で得られた現象を比較すると、両者は物理的に同じ現象であると考えられる。もし2つの安定な高次構造をとる高分子鎖をデザインすることができれば、自ずと分子機械を作り出すことができるであろう。

## 4 まとめ

非平衡条件と高分子単分子鎖の1次相転移の外場応答性の間に適当なフィードバック条件が働くように実験条件・現象をデザインし、DNA 単分子鎖の自励振動（周期的な高次構造変化）を発現させた。具体的には光ピンセットを用いて、凝縮状態とコイル状態の2状態間で折り畳み相転移を示す T4DNA を熱力学的開放条件下に配置し、非平衡条件（温度勾配）と DNA の外場応答性（温度応答性）を競合させ、周期的な高次構造変化を発現・観測することに成功した。さらに自励振動がリミットサイクル振動の性質を示していることを明らかにすると共に、メゾスコピックな1次相転移系の描像から導き出されるリミットサイクル振動で記述でき、分子モーターの動作原理となり得ることを示した。同様の現象は熱力学的開放条件下に配置された1次相転移を示す他の高分子単分子鎖に普遍的に起こりうる。

## 参考文献

- [1] R. D. Vale and R. A. Milligan, *Science* **288** (2000), 88.
- [2] K. Yoshikawa and H. Noguchi, *Chem. Phys. Lett.* **303** (1999), 10.
- [3] H. Mayama and K. Yoshikawa, *Faraday Discussion* **120** (2001), 67.
- [4] H. Mayama, T. Iwataki and K. Yoshikawa, *Chem. Phys. Lett.* **318** (2000), 113.
- [5] H. Murayama and K. Yoshikawa, *J. Phys. Chem. B* **103** (1999), 10517.
- [6] V. V. Vasilevskaya, A. R. Khokhlov, Y. Matsuzawa and K. Yoshikawa, *J. Chem. Phys.* **102** (1995), 6595.
- [7] S. M. Nomura, Harada and K. Yoshikawa, *Phys. Rev. Lett.* **88** (2002), 0939031.
- [8] M. Ishikawa, H. Misawa, N. Kitamura, R. Fujisawa and H. Masuhara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **69** (1996), 59.
- [9] Y. Matsuzawa and K. Yoshikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **118** (1996), 929.
- [10] 眞山博幸、吉川研一、*電気学会誌* **121** (2001), 238.