

生体高分子1分子のレオロジー

佐野雅己、村山能宏、和田浩史、石田良
東京大学理学部物理学科

1 レオロジーと奇妙な現象

この講演では高分子1分子の力学応答をレオロジーと言う観点から考察する。レオロジーと言うとなにやら古めかしい学問のように思えるが、話題を1分子に限らなくとも、流動にまつわる興味ある現象はつきない。例えば、Shearを加えると粘性が減少する Shear Thinning やその逆に増大する Shear Thickening を示す物質を振動させると極めて不思議な現象が観測される。ジェルや生クリーム、ある種のプラスティックなどは、逆さまにしても流れ落ちないほど粘性が高いが、押し出すとシェアにより粘性が減少して流れ出す典型的な Shear Thinning 現象を示す。ジェル（髭剃り用のジェルなどが適当）をシャーレに入れてスピーカーを用いて 50Hz 程度で振動させる。振動の振幅が小さい場合、ジェルはその形を変えないが、振幅を増すと表面に Faraday 波が現れる。さらに大きな振幅では細長い対流ロールが形成され、Faraday 波と複雑に相互作用する現象が観測される [1]。Shear Thickening を示すものとしてコーンスターチ溶液などのコロイド溶液がある。最近の研究ではこれらを振動させると流体中に空いた孔が安定に保たれたり、その逆に盛り上がった隆起が次々と広がり、隆起が踊りくねるパターンを作り出す [2]。両者とも流体は容器のふちをよじ登り、外に流れ出す点で超流動液体にも近い振る舞いを示す。これらは、シェアの強さや外力の振動数により粘弾性の性質が変化するために生じる現象である。ここでは、非常に長い高分子1分子に外力を加えて応答を見るとともに、外力の周波数を変化させた場合の応答にどのような変化が起こるかを調べてゆく。

2 1分子のレオロジーは可能か？

物質の流動特性を記述することをレオロジーと呼ぶことにすると、分子1個のレオロジーが可能かどうかをまず考察する。分子が高分子であるとして、高分子モノマーが分子内の他のモノマーと相互作用しながら拡散したり変形する状況を考えて、高分子であってモノマー間の相互作用が問題となるほど長い分子であれば、モノマーの分子内流動の特性、すなわちレオロジーが問題となることがわかる。特に長い高分子として DNA

などの生体分子がある。DNA は、直径が 2nm であるのに対し、長さは λ ファージの DNA の場合で約 15 μ m、人の DNA では総延長が 2m にもなるので、1分子でも分子内でのモノマーの拡散やモノマー間の流体的相互作用が DNA の流動特性を左右することになり、1分子のレオロジーを問題にする必要が生じる例である。また広い意味で、力学応答を問題とするならば、蛋白質のようにそれほど高分子でなくとも分子内の相互作用の数が十分多い場合は、1分子の変形と応答を問題とすることには十分意味がある。実際、蛋白質1分子を引き伸ばしてその応答を見ることは、蛋白質のアンフォールディングのダイナミクスを見ることに相当するので、フォールディングのメカニズムや蛋白質のエネルギーランドスケープを知る観点からも興味ある実験である。

測定対象として生体高分子を用いることの意義は、このように長く扱いやすい分子が容易に得られるということのほかに、条件により物性が大きく変化したり、多様な振る舞いが見られる点にある。例えば、DNA は、二重らせん状態 (dsDNA) か一重らせん状態 (ssDNA) かによって分子の剛直性が大きく変化する。剛直性を特徴づける持続長で比べると dsDNA では持続長が 50 nm なのに対して、ssDNA では 1 ~ 5 nm と短くなることが知られている。また、溶液のイオン雰囲気などを変えたと DNA は分子内相転移を起こして凝縮することが知られており、力学的操作によりこの転移がどう影響を受けるかなど興味はつきない。さらに飛躍すると、生体高分子のレオロジーがエネルギー変換を伴う化学反応と結合するような状況は、アクチンフィラメントや微小管と分子モーターの系において見られ、細胞運動のメカニズムとも深く関わる現象につながってゆく。これらは今後、物理的な解明が待たれる領域である。

3 シェアによる力と直接力

1分子を変形してその応答を見るために、孤立した1分子がシェア流によって変形が可能かどうかを考察を行う。シェア流により分子に加わる力は、以下で与えられる。

$$F = \eta \frac{\partial u}{\partial z} A(L) \sim \eta \dot{\gamma} A(L) \quad (1)$$

ただし、流体の粘性率を η 、力を受ける面積を A とする。DNA や蛋白質を変形するのに必要な力はおおよそ 10 pN 程度であることが分かっている。10pN の力を生じるために必要な Shear rate, $\dot{\gamma}$ を求めてみる。分子が流れと相互作用する面積は、分子が伸びているかあるいは小さくまとまっているかによって異なるが、ここでは伸ばされた状態を考えることにし、 $A \sim L^2$ の関係が成り立っているとして計算を行うことにする。すると 10 μm の DNA の場合で $\dot{\gamma} = 100$ 、10nm の蛋白質の場合で $\dot{\gamma} = 10^8$ という概略値が得られる。このことから、DNA ではシアにより引き伸ばし可能だが、蛋白質のような比較的小さな分子ではシアによる変形は困難で AFM の探針などを直接分子につけて引き伸ばしてやる必要があることが分かる。実際、シア流による DNA の引き伸ばしは、S. Chu らによって行われたことは広く知られている (Science, 1994)。

4 分子内拡散

DNA 1 分子内でのモノマーの拡散は、最近いくつかのグループにより研究された。Quake 等は、DNA に 1 重から 7 重までの結び目を作ることににより、結び目が DNA のひもに沿って拡散する場合の拡散定数が結び目 1 個当たりの長さ L に逆比例して減少することを見出した [3]。これは、結び目が自分自身と相互作用しながらレプテーションで拡散することを証明した結果になっている。また Krychevski 等は、DNA の端点に蛍光分子をつけ、FCS (Fluorescence Correlation Spectroscopy) で 1 分子内でのモノマーの拡散を直接測定した [4]。それによれば、拡散による平均 2 乗距離 $\langle r^2 \rangle$ は、dsDNA では $t^{1/2}$ に比例し、流体相互作用を無視した Rouse モデルと良く一致する。一方、ssDNA の場合 $\langle r^2 \rangle$ は $t^{2/3}$ に比例し、流体相互作用を考慮した Zimm モデルで良く説明されることを明らかにした。これは、dsDNA の堅さが相互作用に影響を与えている顕著な例と考えられる結果になっている。

5 DNA1 分子の凝縮転移と力学応答

DNA は、通常の溶媒 (緩衝液) 中ではランダムコイル状態にあり、その伸び・張力特性は次の WLC (Warm Like Chain) モデルの式で良く近似されることが 90 年代に明らかになった。

$$f = \frac{k_B T}{P} \left\{ \frac{x}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{x}{L})^2} - \frac{1}{4} \right\} \quad (2)$$

ここで、 P は持続長である。dsDNA は曲げ剛性の大きい、ひも状分子であり、その軸方向ベクト

ルが熱ゆらぎにより相関を失う距離として持続長は定義される。伸び x が全長 L に比べて小さい時は、分子の剛性はきかず、自由連結鎖のようにエントロピー弾性を示す。しかし、溶媒に多価イオンなどを加えると、モノマー間の相互作用により DNA は凝縮転移を起こし、小さく凝縮したグロビュール状態となる。この転移は、1 次相転移であることが吉川等によって示されている。DNA に代表される棒状の生体高分子が、塩や多価イオンの存在下で凝縮現象を示すことは古くから良く知られた現象で、電荷を持った棒状分子に溶液中の対イオンが凝縮して電荷相互作用を変化させる結果、近距離において引力を生み出し、棒状分子の凝縮を引き起こすと考えられる。しかし、理論的にはごく最近まで論争が続いた問題である。我々は、この凝縮転移と気体液体相転移の間にアナロジーが成立すると考え、凝縮した DNA に外力を加えると、気液相転移における PV 線図と同等な応答が得られるとの予想を立て、レーザーピンセットを用いて凝縮 DNA を引っ張ることにより伸びと張力の関係を測定した。

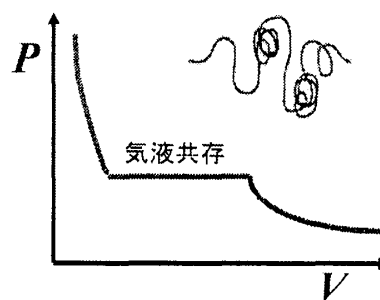


Figure 1: 気液相転移と DNA 凝縮のアナロジー

実験では、 λ ファージ DNA の一部 (15Kbp) 利用し、片端をビオチン化、他端をジゴキシンゲン化しそれぞれアビジン化した 2 μm のビーズと抗ジゴキシンゲン化した 3 μm のビーズに特異的に結合させた。2 ビーム・レーザー・トラップ (波長 1064nm) を製作し、2 つのビーズをトラップし DNA 両端間の距離とその間に働く張力を測定した。チャンバー内の溶液を (10mM, Tris-HCL, pH 7.0) から 3 価のポリアミンである Spermidine (SPD) を含むものに徐々に交換し、DNA の凝縮相転移を引き起こし、いろいろ SPD 濃度における DNA の伸びと張力の関係を測定した。

その結果、SPD 濃度の違いにより、DNA は WLC 特性、プラトー特性、stick-release 特性の 3 種類の応答を示すことが明らかになった (図 2) [5]。Spermidine の濃度が低い時は、WLC の特性と同じ張力特性を示すが、イオン濃度が約 200 μM を超えると DNA は凝縮転移を起こし、張力一定で伸びるプラトー特性を示す。この状態は、気液相転移において気体と液体が共存する圧力一定

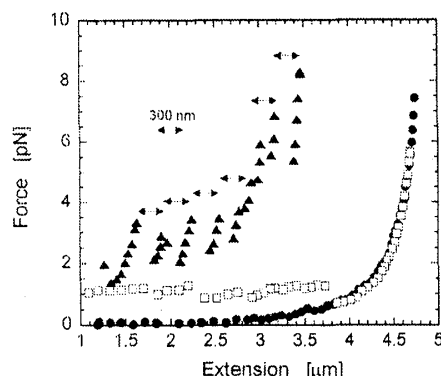


Figure 2: DNA の 3 種類の張力応答。● WLC 特性 (SPD $0\mu M$)、□ プラトール特性 (SPD $500\mu M$)、▲ stick-release 特性 (SPD 10 mM)。

の状態に相当している。イオン濃度が 1 mM を超えると張力応答は鋸波状の非線形応答 (stick-release) を示す。この現象は、凝縮が強くなると凝縮状態から伸張状態に移行するためには、 kT より十分大きなエネルギー障壁を越える必要があり、DNA の力学応答とレーザートラップのバネとの間で stick-release 型の非線形振動を生じていると解釈される。ここで興味深いことは、さらに高い SPD 濃度では再び WLC 特性が復活する Reentrant 転移を示すことである。実際、SPD 濃度が 200 mM 以上では再びきれいな WLC 応答が観測された [5]。これは、1 分子で Reentrant 転移が観測された初めての例である。以上のような WLC 特性とプラトール特性の移り変わりは次のような現象論的モデルで説明できる。DNA をひもとく考え、端点から測ったひもの弧長を s とする。凝縮状態を $\rho = 0$ 、伸張状態を $\rho = 1$ とし秩序パラメータ $\rho(s)$ を導入すると、部分的に凝縮したひもの有効長 L_e は次の式で表される。

$$L_e = \int_0^L \rho(s) ds \quad (3)$$

また、秩序パラメータのダイナミクスを次式で定義する。

$$\frac{1}{L} \frac{\partial \rho}{\partial t} = -\frac{\delta F}{\delta \rho} + \epsilon(s, t) \quad (4)$$

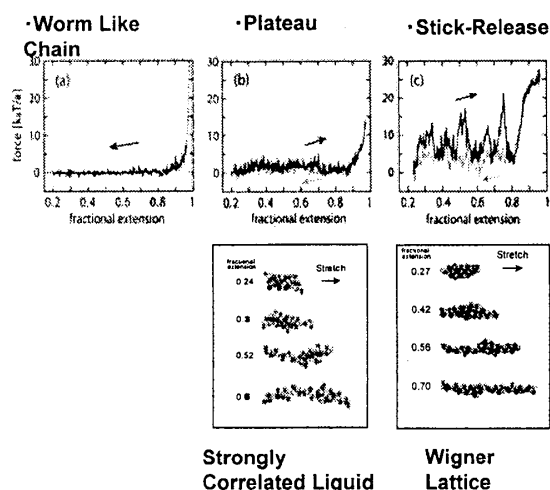
ただしここで、 $\langle \epsilon(s, t) \epsilon(s', t') \rangle = 2k_B T \delta(t - t') \delta(s - s')$ である。ポテンシャル関数 F として、 $\rho = 0$ と $\rho = 1$ で極小値を持ち、外力により相対的な安定性が変化するような関数と空間変化からの寄与を考慮した項を導入する。これに従って $\rho(s)$ のダイナミクスを解き、得られた有効長 L_e を全長として WLC の方程式 (1) を用いることにより、各時点での張力が求まる。このモデルにより、プ

ラトール特性は再現されることがわかった [6]。しかしこのモデルでは、stick-release 応答は説明することができなかった。その原因として、モノマー間の相互作用にひもの 3 次元的なトポロジーが反映されていないことや長距離の静電相互作用が考慮されていないことなどが考えられた。そこで、適当な粗視化を行い DNA をバネとビーズで近似し、DNA が持つ負電荷や溶液中の正電荷による静電相互作用を考慮したランジュバンダイナミクスのシミュレーションを行った [7]。熱揺らぎの大きさと静電エネルギーの比 Γ を $\Gamma = q^2 l_B / a$ で定義する。 Γ が大きいほど静電相互作用が強いことを意味する。ただしここで、 l_B は単位電荷同士の静電エネルギーが熱エネルギー $k_B T$ と等しくなる距離で Bjerrum 長と呼ばれる。 $(l_B \equiv e^2 / (4\pi\epsilon k_B T))$ また、 q はビーズとイオンが持つ電荷量であり、 a はビーズの半径である。

図 3 にシミュレーションの結果を示す。相互作用の大きさを強くしてゆくと順に、 $\Gamma = 0.1$ では張力応答は WLC 応答、 $\Gamma = 40$ ではプラトール特性、 $\Gamma = 110$ では stick-release 応答を示した。この時の分子構造を同時に図 3 に示す。プラトール特性を示す場合と stick-release 特性を示す場合の大きな違いは、後者では対イオンが周期的に配列しているのに対して、前者ではそれほど秩序は見られないことである。対イオンの周期的配置は、DNA 凝縮のメカニズムとして提唱されている Wigner 結晶モデルに近い構造が現れていると言うことができる。また、プラトール特性の場合でも周期的ではないが、イオン間に強い相関が見られる。もう一つの特徴として、stick-release 特性を示す場合はビーズがラセン構造を取っていることであり、鋸波状の応答はラセン構造の一巻きが集団的にほどこける事象に対応している。そのことは、バネの延長方向に沿った回転数を測定すると、一つの鋸波に対応して、段階的に巻数が減少してゆくことから確認することができた [7]。

6 蛋白質 1 分子の力学応答

蛋白質 1 分子を引き伸ばしてその応答を見ることは、蛋白質のアンフォールディングのダイナミクスを見ることに相当するので、フォールディングのメカニズムや蛋白質のエネルギーランドスケープを知る観点からも興味を持たれる。この目的のために AFM (原子間力顕微鏡) を自作して、蛋白質の伸張実験を行った。試料として、蛋白質フォールディングの研究において比較的良く用いられ、モデル蛋白質とも呼ばれる SNase (スタフィロコカル・ヌクレアーゼ) を用いた。SNase は 140 残基からなる球状蛋白質であり、仮に完全に引き伸ばしたとすると全長 50 nm 程度になる ($\sim 0.37\text{ nm/残基}$)。また、ここで用いる SNase は改変してあり両末端にシステイン残基を配置した構造となっ

Figure 3: (a) $\Gamma = 0.1$, (b) $\Gamma = 40$, (c) $\Gamma = 110$

ているため、ガラス基盤とAFMカンチレバーの両方を金コートすることにより、蛋白質の1端がガラス基盤に他端がカンチレバーに接着する配置をとることが可能である。(内部にはシステイン残基を持たない。)

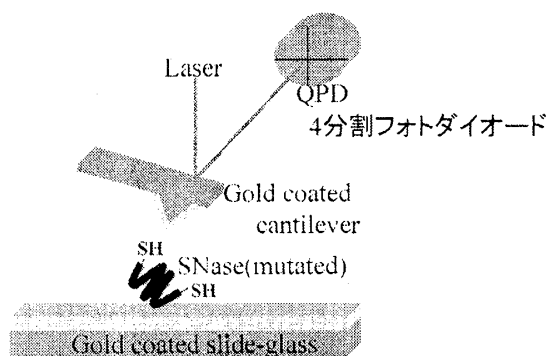


Figure 4: AFM の原理と蛋白質 SNase の接着

図5に見られるように1分子でも伸張時にstick-release 応答が見られ、収縮時にはWLC特性が観測された。SNase のについては、stopped flow 装置などを用いて化学的条件の変化により、2つの主要なアンフォールディング経路があることが知られている。これらはそれぞれ、1.5 sec と20 sec という特徴的な時間を持つことが知られている。したがって、AFMの伸張速度を変化させることにより2つの経路の違いを検出できる可能性がある。我々はすでに速度を変えることにより張力応答が変化することを確認し、現在この統計的解析を進めている。以上述べたように、1分子の力学応答についても外力の周波数を変化させることにより、レオロジーの重要な情報を特性を引き出すことが可能であると考えられる。

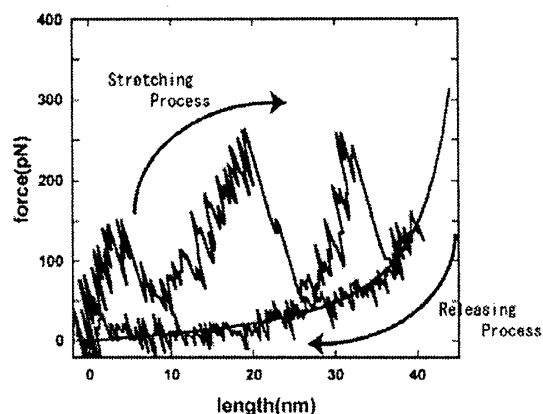


Figure 5: SNase の力学応答。収縮時の応答はWLCの式でフィットしている。

References

- [1] Sano: private communication (2004).
- [2] 以下に興味深い movie がある。
http://chaos.ph.utexas.edu/research/vibrated_cornstarch.htm
- [3] X. R. Bao, H. Lee, and S. R. Quake: Behavior of Complex Knots in Single DNA Molecules, Phys. Rev. Lett. 91, 265506 (2003).
- [4] R. Shusterman, S. Alon, T. Gavrinov, and O. Krichinsky: Monomer Dynamics in Double- and Single-Stranded DNA Polymers, Phys. Rev. Lett. 92, 048303 (2004).
- [5] Y. Murayama, Y. Sakamaki, and M. Sano: Elastic Response of Single DNA Molecules Exhibits a Reentrant Collapsing Transition, Phys. Rev. Lett. 90, 018102 (2003).
- [6] H. Wada, Y. Murayama, and M. Sano: Model of Elastic Responses of Single DNA Molecules in Collapsing Transition, Phys. Rev. E 66, 061912 (2002).
- [7] H. Wada, Y. Murayama, and M. Sano: Elastic Response of Single DNA Molecules Exhibits a Reentrant Collapsing Transition, preprint (2004).