

# 紐の一次相転移現象. ポリアミンによる巨大DNA鎖の単分子凝縮

名大院・人間情報学研究科

高橋真澄、吉川研一

## §1. 長鎖DNA分子の高次構造

ヒトの細胞中に存在する各々のDNAは、全長は、1~10cmのオーダーであり、細菌類ではmmのオーダーである。このように、生物が遺伝情報源として利用しているDNA分子の全長は極めて大きい。しかしながら、それらは直径わずか数 $\mu\text{m}$ の細胞核、あるいは細胞の内部にパッキングされ、高度に凝縮された状態にある。本稿の実験で使用したT4ファージのDNA(166 $\cdot 10^3$ 塩基対)は、全長が56 $\mu\text{m}$ ある。

これらの長鎖DNA分子は、良溶媒中では空間的に広がったランダムコイル状の形態をとり、貧溶媒中では凝縮した構造(グロビュール)となる。従来、このコイル-グロビュール転移は、連続的に起ると見なされてきた。最近、長鎖DNA分子のコイル-グロビュール転移は、著しい不連続性を示し、各鎖について「一次相転移」であることが、私達の研究により明らかとなった。この転移において、分子鎖のアンサンブル(集団)平均は、連続的な変化を示す。このことは、光散乱や粘度測定など、アンサンブルの性質を調べる実験手段では、コイル-グロビュール転移は緩慢転移のように“見える”ことを意味している。本研究では、各々の単一分子鎖の形態を、蛍光顕微鏡を用いて調べることにより、転移の不連続性を見出した。

## §2. 単一分子鎖の一次相転移

二重らせんのDNA(B型DNA)は、マイクロには、直径20 $\text{\AA}$ 程度の剛直な円筒状の形態をしている。ところが、このような長鎖DNAを、サブミクロンのレベルまで粗視化すると、くねくねと曲がった紐のように見えてくる。ここで、実在鎖およびガウス鎖の慣性半径をそれぞれ $R$ 、 $R_0$ とし、高分子鎖の空間的広がりを表わすパラメータ $\alpha = (R^2/R_0^2)^{1/2}$ を導入する。高分子鎖を、長さ $b$ 、幅 $d$ のセグメントが $N$ 個ランダムな方向に結合した自由連結鎖とみなすと、一分子の自由エネルギーが次式で表わされる。

$$\frac{F(\alpha)}{T} = \frac{3}{2}\left(\alpha^2 + \frac{1}{\alpha^2}\right) + \frac{BN^{1/2}}{\alpha^3 b^3} + \frac{C}{\alpha^6 b^6} \quad (1)$$

ここで、 $B$ 、 $C$ はそれぞれ第二、第三ビリアル係数である。自由エネルギーの極値条件 $\partial F(\alpha)/\partial \alpha = 0$ より、

$$\alpha^5 - \alpha - \frac{2y}{\alpha^3} = x \frac{d}{b} \quad (2)$$

ただし、 $x = BN^{1/2}/b^2 d$ 、 $y = C/b^6$ 。図1に、(2)式での $\alpha$ の $x$ に対する相図の例を示した。<sup>1)</sup>

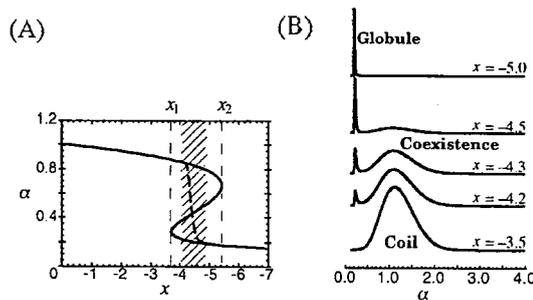


図1. (A) 自由エネルギー極小の条件を表わす相図。(y = 1 $\cdot 10^{-3}$ )。斜線領域はコイルとグロビュールの共存状態を示し、 $x_1$ と $x_2$ の間は、自由エネルギーがbimodalとなる状態に対応している。

(B) 自由エネルギーより計算した、 $\alpha$ の分布。

文献(1)より

この結果、次のようなことが明らかとなった。

- (i) 高分子鎖がstiffなとき、コイル-グロビュール転移は、各々の鎖について all-or-none の一次相転移と

なる。(DNAに限らず、 $b/d \ll 1$ であれば、一般的に一次相転移となる。)

(ii) コイル-グロビュール転移には有限の巾の共存領域が存在する。このため、高分子鎖のアンサンブルは緩慢転移を示す。

### §3. 実験

二重ラセンを形成している DNA では、その横断面の直径は約 2nm (約 20Å) しかない。可視光線の波長は 400~700nm であるから、波長よりも 2桁も小さい。しかし、一般に、生物の DNA は、数 $\mu\text{m}$ ~数 mm と、その長さは光の波長よりも十分大きい。そこで、DNA 分子を蛍光染色して、励起光を照射することにより分子を光らせる (蛍光発光) と、分子像が可視化できることになる。本研究では、水溶液中 DNA 分子の高次構造を蛍光顕微鏡を用いて直接観察し、スベルミジンによるコイル-グロビュール転移について実験を行なった。

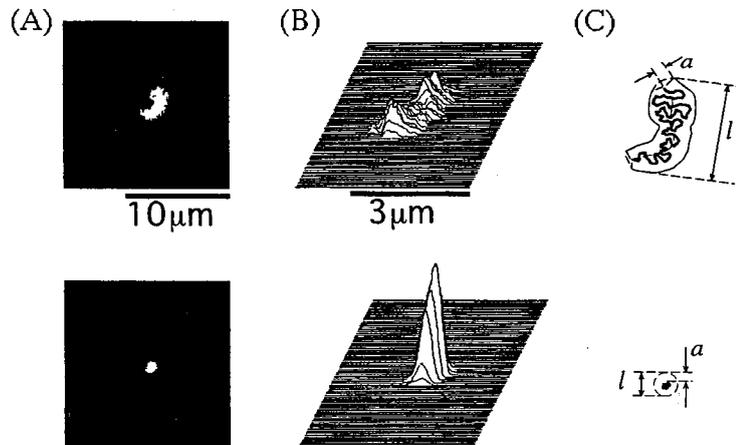


図 2. 長鎖 DNA のランダムコイルとグロビュール状態。

(A) T4DNA の蛍光顕微鏡像。

(B) 蛍光強度分布。

(C) 蛍光顕微鏡像と二重ラセン DNA (太線) の比較の模式図。 $l$  は長軸長、 $a$  はニジミの効果。

文献 (1) より

図 2 に、コイル状態とグロビュール状態の DNA の蛍光顕微鏡像を示した。ニジミの効果があるため、コイルとグロビュールのサイズは、実際の値より 0.3 $\mu\text{m}$  程小さくなっている。ここで示した三価のポリアミン、すなわち、スベルミジンによる相転移の場合、実効的な占有体積の比は  $10^4 \sim 10^5$  と、非常に大きいことが明らかとなっている。

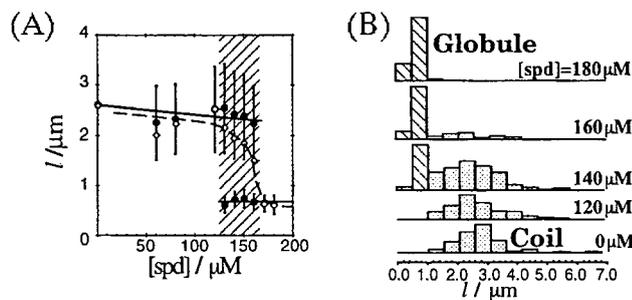


図 3. 長鎖 DNA のコイル-グロビュール転移。

(A) 長軸長のスベルミジン濃度による変化。斜線はコイルとグロビュールの共存領域を示す。

(B) T4DNA のサイズ分布のスベルミジン (spd) 濃度依存性。

文献 (1) より

図 3(A) には、スベルミジン濃度を変化させたときの、長軸長  $l$  の分布の変化を示した<sup>1)</sup>。図 3(B) より明らかなように、一つの DNA 分布は all-or-none の変化を示し、一次相転移現象となっていることがわ

かる。図 3(B) の破線は DNA の長軸長  $l$  のアンサンブル平均であるが、これは見かけ上、連続的な緩慢転移となっていることが明らかである。

長鎖 DNA のコイル-グロビュール転移が一次相転移となることは、スペルミジン以外にも、(1) PEG などの中性高分子、(2) ポリグルタミン酸などのポリアニオン、(3) コバルトなどの多価イオン、(4) アルコールなどの低誘電率媒質、(5) CTAB などの陽イオン性界面活性剤、などについて確認されている。このように、DNA 鎖の不連続な転移は、極めて一般的な現象であることが判る。

#### §4. 対イオンの効果

以上のように、長鎖 DNA は、一次相転移によりその高次構造が大きく変化することが明らかとなった。DNA やポリイオンでは、対イオンを含め水溶液中に存在する低分子の全自由エネルギーに対する並進エントロピーの寄与が非常に大きく、高次構造の安定性に重要な役割を果たしている。

ここで、低分子多価カチオンとして三価のスペルミジンを例にとって考える。一分子のスペルミジンが DNA 分子鎖の実効体積内に侵入すると、それに伴って、分子量の少ない一価陽イオン 3 個が、選択的にバルクの水溶液中へと放出される。このとき、放出された一価陽イオンによって、系の並進エントロピーが増大する。すなわち、スペルミジンの結合によって、系全体の自由エネルギーが減少する。ただし、水溶液中の DNA 分子鎖は、対イオンにより電気的に中性化されていると仮定する。さらに、多分子のスペルミジンが共同的に DNA 分子鎖へ結合することによって、自由エネルギー曲線が変化し、コイルからグロビュールへと状態が転移する。

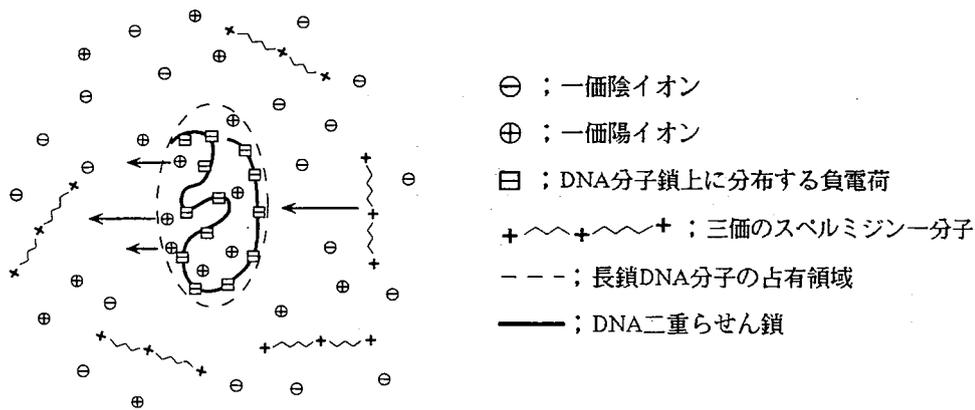


図 4. 水溶液中 DNA 分子における、スペルミジンと対イオンの交換相互作用。

このような描像に従って、DNA 一分子当たりの全自由エネルギー  $F_{total}$  を三つの寄与の和として表すと、

$$F_{total} = F_{el} + F_{int} + F_{trans} \quad (3)$$

一項目は DNA 分子の弾性エネルギーの寄与、二項目は溶媒を媒介とした DNA セグメント同士の相互作用の寄与、そして三項目は対イオンを含めた溶液中の低分子、つまり、凝縮剤である低分子多価カチオンとその対イオン、DNA 分子の対イオンの並進エントロピーの寄与である。ここで、 $F_{trans}$  を求めるため、系全体を DNA 分子鎖の実効体積とそれ以外の外部溶液に分けて考える。DNA 単分子鎖の実効体積を  $V$  とおき、溶液中一分子当たりの、系全体の体積を  $\Omega$  とする。つまり、 $\Omega$  は、DNA 溶液の全体積を溶質の DNA 分子数で割ったものに相当する。DNA 分子鎖上に露出しているあからさまな負電価数を  $Q$  とおくと、これは同時に、DNA の対イオンである一価陽イオンの、DNA 一分子当たりの個数に等しい。同様に、DNA 一分子当たりの低分子多価カチオンの数を  $P$ 、その対イオンである一価陰イオンの個数を  $C_-$  とおく。このとき、凝縮剤である低分子多価カチオンの価数を  $m$  とすると、 $C_- = mP$  が成立する。ここで、DNA の実効体積内に存在する DNA 対イオン、低分子多価カチオン、低分子多価カチオンの対イオンの数をそれぞれ  $C_+^{in}$ 、 $P^{in}$ 、 $C_-^{in}$  とし、外部溶液中におけるそれらの数を、各々  $C_+^{out}$ 、 $P^{out}$ 、 $C_-^{out}$  とする。このとき、 $C_+^{in} + C_+^{out} = Q$ 、 $P^{in} + P^{out} = P$ 、 $C_-^{in} + C_-^{out} = C_-$  が成り立つ。これら三種のイオンの並進エントロピーを DNA 実効体積の内外にわけて書き表すと、

$$F_{trans} = F_t^{in} + F_t^{out} \quad (4)$$

$$\frac{F_t^{in}}{T} = C_+^{in} \ln \left( \frac{C_+^{in}}{V} \right) + C_-^{in} \ln \left( \frac{C_-^{in}}{V} \right) + P^{in} \ln \left( \frac{p^{in}}{V} \right)$$

$$\frac{F_t^{out}}{T} = C_+^{out} \ln \left( \frac{C_+^{out}}{\Omega - V} \right) + C_-^{out} \ln \left( \frac{C_-^{out}}{\Omega - V} \right) + P^{out} \ln \left( \frac{p^{out}}{\Omega - V} \right)$$

ここで、 $F_t^{in}$ はDNAの実効体積、 $F_t^{out}$ は外部溶液中における並進エントロピーの寄与を表わす。また、 $V_0$ を、 $\alpha = 1$ のとき、すなわち、理想鎖のときのDNA分子鎖の実効体積とおくと、 $V = V_0 \alpha^3$ の関係が成り立つ。ただし、 $V_0 = 4\pi/3 N^{3/2} b^3$ 。最後に、系の電気的中性条件から、

$$mC_p^{in} + C_+^{in} = Q + C_-^{in} \quad (5)$$

となる。

図5に、対イオンの効果を考慮に入れて計算した、熱平衡状態下の各自由エネルギー曲線と、 $\alpha$ の分布を掲げた。低分子多価カチオンが対イオンと交換することによって、凝縮に伴う膨大な並進エントロピー損失を補足していることがわかる。図中、 $\alpha_c$ と $\alpha_g$ は、それぞれコイル側とグロビュール側のミニマムに対応する。 $\Delta F$ は、 $F$ の参照値を $\alpha_c$ 値についてとったものである。 $\alpha_c$ と $\alpha_g$ の位置から、低分子多価カチオンの濃度が高くなるに従ってDNAのサイズが減少し、やがて、グロビュールへと状態が不連続に変化することが示される。

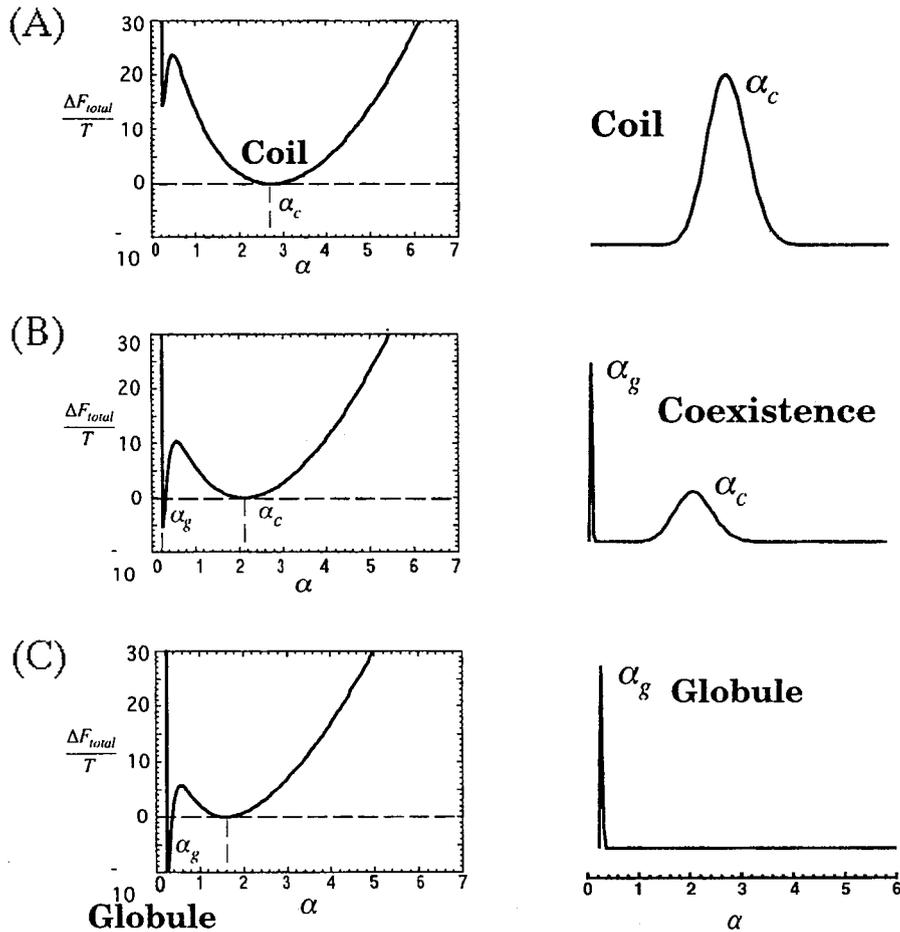


図5. (3)、(5)式に基づいて計算した、各状態における自由エネルギー曲線(左側)と $\alpha$ 分布図(右側)。 $C_p$ は無次元化した溶液中の低分子多価カチオンの濃度、 $C_p = C_+/\Omega$ 。それぞれ、(A);コイル状態( $C_p = 4.0 \cdot 10^{-6}$ )、(B);共存状態( $C_p = 3.0 \cdot 10^{-5}$ )、(C);グロビュール状態( $C_p = 3.0 \cdot 10^{-4}$ )を表す。その他のパラメータは次の通りである。 $m = 3$ 、 $r = \Omega/V_0 = 500$ 、 $Q = 16$ 、 $B = -1.5$ 、 $C = 0.01$ 、 $N = 100$ 。

同様の計算を、二価カチオンと四価カチオンの場合について行った。図6は、 $m = 2 \sim 4$ について、自由エネルギー最小値を $\alpha$ の関数として描いたものである。

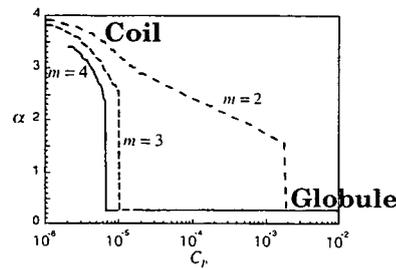


図6. 図5と同じパラメータを採用し、 $C_p$ をコントロールパラメータとして、二価から四価の低分子カチオンについて計算した結果。二価カチオンによっても、DNA分子鎖のサイズが不連続に変化することがわかる。

上図から、凝縮剤の価数が大きいほど単分子凝縮が起きやすいことがわかる。二価カチオンによっても、DNA分子鎖のサイズが不連続に変化することに注意したい。しかしながら、二価カチオン ( $m = 2$ ) と三、四価カチオン ( $m = 3, 4$ ) によるコイル-グロビュール転移には、歴然とした違いがある。 $m = 3, 4$ の場合、コイル状DNAのサイズは、共存状態でも凝縮剤が存在しないときのサイズとほとんど変わらない。一方、多価カチオンが二価の場合、DNA分子鎖の実効体積は凝縮剤の濃度が高くなるに従って徐々に減少し、共存状態におけるコイルとグロビュールのサイズの差が非常に小さくなっている。また、対イオンとの交換相互作用が三、四価カチオンと比べて相対的に弱いため、極高濃度側にしかグロビュール状態が発現しない。図5に示したように、 $\alpha_c$ の分布の広がり を考慮すると、実際に観測される転移点は、ここで対応する値よりもさらに高濃度側にシフトし、共存状態を示す濃度領域は、三、四価カチオンに比較して非常に大きな幅をもつことが予想される。従来、一般に、二価カチオンはDNAのコイル-グロビュール転移を誘起しないとされてきた。光散乱法や沈降法など、アンサンブル平均を測定する観測方法では、上に述べたような二価カチオンの性質から、DNAの単分子凝縮を確認するのはほとんど不可能であると予想される。

## §5. さいごに

高分子のアンサンブルの物性を調べる従来の研究では、これらのような、高次構造に関する重要な特質を見落としていた恐れがある。また、ここで紹介した理論は、紐状分子における非常に大きな自由度を一次元の位相空間に投影し、平均場近似を用いたものにとどまっている。しかしながら、グロビュールとなっている凝縮体の表面と、水溶液との界面に生じる表面ゆらぎの問題や、システムサイズに依存する臨界現象の解明など、まだ解かれていない興味深い問題を数多く見出すことができる。このような、一次元の紐状分子の安定性のメカニズムを解明するには、高次元の位相空間を考慮に入れて、実験・理論の両面から系統的に検証することが必要である。

### 〔謝辞〕

理論的な部分は、モスクワ大学物理学部 A. R. Khokhlov 教授、および、ロシア科学アカデミーの V. V. Vasilevskaya 博士に助言をいただいた。

### 〔文献〕

本稿で紹介した研究は、主として文献(1)、(2)に基づいて行ったものである。(3)以下は本研究に関連する、DNAの高次構造に関する報告である。

- (1) K. Yoshikawa, M. Takahashi, V. V. Vasilevskaya, and A. R. Khokhlov, "Large discrete transition in a single DNA molecule appears continuous in the ensemble", *Phys. Rev. Lett.*, **76**, 3029 (1996).
- (2) K. Yoshikawa, S. Kidoaki, M. Takahashi, V.V. Vasilevskaya and A.R. Khokhlov, "Marked Discreteness on the Coil-Globule Transition of Single Duplex DNA", *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **100**, in press.
- (3) 吉川研一, "DNA分子のダイナミクスと生命現象", 北原和夫・田中豊一編、「生命現象と物理学」第3章、朝倉書店(1994).

- (4) 吉川研一, "単一高分子鎖の折り畳みを制御する—長鎖DNA分子の凝縮を例として—", 海外高分子研究レビュー, (1995).
- (5) K. Minagawa, *et al.*, "Direct Observation of the Biphasic Conformational Change of DNA Induced by Cationic Polymers", *FEBS Lett.*, **295**, 67 (1991).
- (6) K. Yoshikawa, *et al.*, "Opposite Effect between Intercalator and Minor Groove Binding Drug on the Higher Order Structure of DNA as Is Visualized by Fluorescence Microscopy", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 1274 (1992).
- (7) K. Minagawa, *et al.*, "Change of the Higher Order Structure of DNA Induced by the Complexation with Intercalating Synthetic Polymer, as Is Visualized by Fluorescence Microscopy", *Nucleic Acids Res.*, **21**, 37 (1993).
- (8) K. Minagawa, *et al.*, "Direct Observation of the Coil-globule Transition in DNA Molecules", *Biopolymers*, **34**, 555 (1994).
- (9) Y. Matsuzawa, and K. Yoshikawa, "Change of the Higher Order Structure in a Giant DNA Induced by 4',6-diamino-2-phenylindole as a Minor Groove Binder and Ethidium Bromide as an Intercalator", *Nucleosides & Nucleotides*, **13**, 1415 (1994).
- (10) S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeev, and K. Yoshikawa, "Discrete Coil-Globule Transition of Large DNA Induced by Cationic Surfactant", *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2401 (1995).
- (11) S. M. Mel'nikov, V. G. Sergeev, and K. Yoshikawa, "Transition of Double-Stranded DNA Chains between Random Coil and Compact Globule States Induced by Cooperative Binding of Cationic Surfactant", *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9951 (1995).
- (12) V. V. Vasilevskaya, A. R. Khokhlov, Y. Matsuzawa, and K. Yoshikawa, "Collapse of Single DNA Molecule in Poly(ethylene glycol) Solutions", *J. Chem. Phys.*, **102**, 6595 (1995).
- (13) Y. Yoshikawa, and K. Yoshikawa, "Diaminoalkanes with an Odd Number of Carbon Atoms Induce Compaction of a Single Double-Stranded DNA Chain", *FEBS Lett.*, **361**, 277 (1995).
- (14) K. Yoshikawa, and Y. Matsuzawa, "Discrete Phase Transition of Giant DNA Dynamics of Globule Formation from a Single Molecular Chain", *Physica*, **D84**, 220 (1995).
- (15) Yu. S. Mel'nikova, N. Kumazawa, and K. Yoshikawa, "Positively Charged Surface Induces Discontinuous Transition for the High Order Structure in Duplex DNA", *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 1040 (1995).
- (16) K. Yoshikawa, and Y. Matsuzawa, "Nucleation and Growth in Single DNA Molecules", *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 929 (1996).
- (17) M. Ueda, and K. Yoshikawa, "Phase Transition and Phase Segregation in a Single Double-Stranded DNA Molecule", *Phys. Rev. Lett.*, *in press*.