

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19740256

研究課題名（和文） 単一荷電高分子鎖のダイナミクスにおける内部摩擦の効果

研究課題名（英文）Effect of the internal friction on the dynamics of a single polyelectrolyte

研究代表者

村山 能宏（MURAYAMA YOSHIHIRO）

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：60334249

## 研究成果の概要：

生体内ではDNAや蛋白質など溶液中で帯電した高分子鎖（荷電高分子鎖）が、一分子レベルでダイナミックに変形し反応が制御されている。本研究では、荷電高分子鎖の変形時に生じる摩擦の効果を定量的に明らかにすることを目的とし、光ピンセットによる一分子計測の方法を用いて、多価陽イオン存在下で凝縮した一分子DNAの内部摩擦の定量化を行った。理論モデルに基づく考察から、凝縮DNA伸長時に生じる内部摩擦が、凝縮相 - 非凝縮相間の2状態遷移過程で生じていることを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	0	2,600,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	210,000	3,510,000

研究分野：生物物理

科研費の分科・細目：生物物理・化学物理

キーワード：荷電高分子鎖，内部摩擦，一分子計測，光ピンセット，DNA

## 1. 研究開始当初の背景

生体高分子の多くは水への可溶性から電解質である。DNAや蛋白質の構造は生体内でダイナミックに変化しており、溶液環境の変化や力学的摂動にともなう構造変化は、生体内の反応に直接影響を及ぼす。

溶液中の単一高分子鎖の変形には、部分鎖の異なる立体配座の間のエネルギー障壁に由来する摩擦や、部分鎖間の擦れ合いによる摩擦が存在する。溶媒による粘性抵抗とは異なるこれらの摩擦は、内部摩擦として知られ

ている。我々は、先行研究において、多価陽イオン存在下で凝縮した一分子DNAの伸長 - 緩和サイクルで、DNAの力学応答に履歴が生じることを見出ししていた。DNAの負電荷は対イオンで遮蔽され、凝縮時には対イオンどうしが強い相関を持つことが知られている。観測された力学応答の履歴は、荷電高分子鎖特有の内部摩擦に起因しているのではないかと予測した。単一荷電高分子鎖の内部摩擦は、蛋白質のフォールディング過程においても、その重要性が示唆されていたが、

一本の高分子鎖のダイナミクスに内部摩擦がどの程度影響するのか定量的に測定した例はなかった。

そこで本研究では、一分子計測の手法を用いて、単一荷電高分子鎖の内部摩擦を直接観測し定量化するための研究を行った。

## 2. 研究の目的

高分子鎖の変形に対し、いかなる要因がいかなる時間スケールで支配的なのか明らかにすることは、高分子物理学のみでなく生物学、生物物理学においても重要な課題である。本研究の目的は、単一荷電高分子鎖に生じる内部摩擦の要因を解明し、鎖のダイナミクスにおける内部摩擦の効果を定量的に明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 凝縮DNAの張力測定

末端をピオチン標識した DNA (48,502 bp) とストレプトアビジンコートビーズ (2  $\mu\text{m}$ ) を混合し、DNA 両末端にビーズを結合する。得られた試料を溶液交換可能なフローチャンバーに入れ、赤外レーザー光を用いた 2 点捕捉型光ピンセットによりビーズを捕捉する。DNA を伸長させた状態でスペルミジン (SPD, 3 価陽イオン) 溶液に交換し凝縮転移を引き起こす。片側のビーズ捕捉位置を移動することで DNA を伸長し、ビーズ像の画像解析により DNA の末端間距離および張力を測定する。

伸長速度を変化させたときの力学応答の変化から、凝縮 DNA 伸長時の内部摩擦の定量化を行った。

### (2) DNA の熱揺らぎの定量化

光ピンセットを用いて DNA を伸長させた状態で、蛍光色素 (YOYO-1) を含む溶液に交換し、DNA の蛍光像を取得する。

得られた像の画像解析により、伸長方向に垂直な方向の揺らぎの大きさを定量化した。

### (3) 蛋白質一分子 (SNase) の力学的アンフォールディング

N 末端および C 末端にシステインを持つスタフィロコッカルヌクレアーゼ (SNase) 変異体を試料として用いた。金蒸着したガラス基板の上に SNase 溶液をのせ、SNase の一端を基板と結合させる (金-チオール結合)。金コートされたカンチレバーを用いた原子間力顕微鏡により、SNase の他端をカンチレバーと結合させ、力学応答を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 凝縮 DNA の内部摩擦の定量化

400  $\mu\text{M}$  SPD 存在下で凝縮した一分子 DNA を一定速度  $v$  で伸長、緩和させると、伸長

- 緩和サイクルで力学応答に履歴が生じる。このときに生じる不可逆な仕事 ( $\Delta W$ ) を解析した結果、 $\Delta W$  が速度に対し線形に増加すること、および  $v \rightarrow 0$  の外挿値が有限の値を持つことを見出した。

SPD 非存在下で非凝縮状態にある DNA に対しては、力学応答の履歴は生じない。凝縮 DNA に対し、 $\Delta W$  が伸長速度に対し線形に増加する要因は、凝縮相内部で生じる実効的摩擦力 (内部摩擦) によるものではないかと予測し、内部摩擦の定量化を試みた。

DNA の両末端は光ピンセットで保持されているため、末端間距離が固定された状態では、DNA は凝縮、非凝縮相が共存した平衡状態にある。準静的伸長過程では、凝縮相がなくなるまで、末端間距離の変化に対し一定の張力を示す。このときの力を  $f_{eq}$  とすると、 $f_{eq}$  と伸長時の張力 ( $f_{st}$ ) で囲まれる部分の面積 (図 1 挿入図の  $W_{diss}$ ) が、伸長時のエネルギー散逸に相当する。

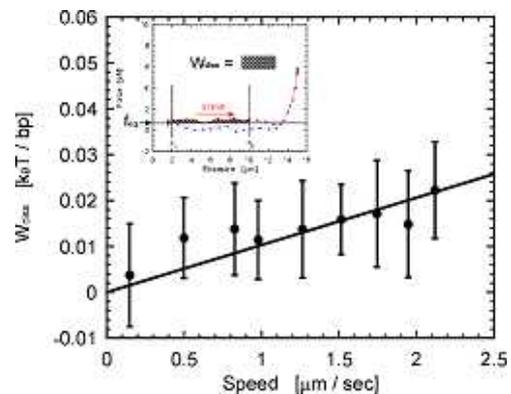


図 1: 凝縮 DNA 伸長時のエネルギー散逸

速度を系統的に変化させ、測定で得られた  $f_{eq} = 0.69$  pN を用いて  $W_{diss}$  を解析した結果、図 1 に示す速度依存性が得られた。 $W_{diss}$  が伸長速度  $v$  に比例していることから、 $\Gamma v = f_{st} - f_{eq}$  の実効的摩擦力が生じていることが分かる。図 1 の直線の傾きから摩擦係数  $\Gamma = 10^{-7}$  kg/sec を得た。この値は、伸長時に DNA およびビーズに生じる流体の粘性抵抗より 10 倍以上大きいことから、凝縮相内部の DNA 部分鎖が、力学的にほどける際に生じる内部摩擦に起因しているといえる。この結果は、荷電高分子鎖の内部摩擦を一分子レベルで定量的に示した初めての結果である。

### (2) 凝縮 DNA の内部摩擦の起源

凝縮相で生じる内部摩擦の起源を明らかにするために、クラマース型の 2 状態遷移モデルを考えた。DNA 部分鎖を長さ  $L_s$  の棒で粗視化し、凝縮状態 (condensed) と非凝縮状態 (decondensed) は、高さ  $E$  のエネルギー障壁

で隔てられているとする(図2) .ばね定数  $K_s$  の光ピンセットによる一定速度  $v$  の伸長では, DNAが凝縮状態であれば, 時刻  $t$  での張力は  $f_{st}(t) = f_{eq} + K_s vt$  と表せる. このとき, 凝縮状態から非凝縮状態への単位時間あたりの遷移頻度は,  $f_{st}(t)$  に依存し, 本実験の速度範囲では,  $f_{st} - f_{eq} = (K_s/k_0)v$  と近似できる.  $k_0$  は平衡状態における遷移頻度であり,  $\Gamma = 10^{-7}$  kg/sec の測定結果から,  $k_0 = 240$   $s^{-1}$  が得られた.

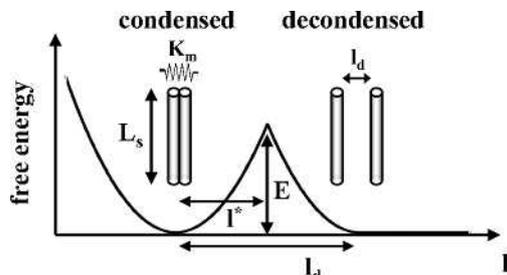


図2: 凝縮DNA部分鎖の2状態遷移モデル

本モデルにおいて,  $k_0 = 240$   $s^{-1}$  を実現し得る棒の長さは,  $L_s = 88$  nm であり, この長さはDNAを粗視化する際のクーン長(約100 nm)とほぼ一致する. この結果から, 凝縮DNA伸長時の内部摩擦の起源が, 凝縮-非凝縮相間の遷移過程にあると考えられる.

### (3) 緩和過程における凝縮相の核形成

次に,  $v \rightarrow 0$  の準静的極限で有限な不可逆仕事 ( $\Delta W$ ) が生じる要因について調べた. 緩和過程では, ある末端間距離  $x_c$  において, 張力が急激に上昇し一定値 ( $f_{eq} = 0.69$  pN) に近づく.  $x_c$  の値は一定ではなく,  $2 \sim 8$   $\mu\text{m}$  の間に分布することから,  $x_c$  で凝縮相の核が形成され, 張力の増加は凝縮相の成長を示していると予測した. 予測の確証を得るため,  $x_c$  で核形成が生じたとみなし, 核形成頻度の  $v$  依存性を調べた結果, 核形成に基づく理論予測とよい一致を示すことが分かった(図3).

これらの結果から, 凝縮DNAの伸長-緩和サイクルで生じる履歴の要因は, i) 伸長時の内部摩擦, ii) 緩和過程における凝縮相の核形成にあるといえる.

(1) - (3) の結果は, 部分鎖間に強い相互作用を持つ荷電高分子鎖の力学的応答を分子レベルで明らかにした最初の結果であり, 論文2 および国際会議1, 3 で発表を行った.

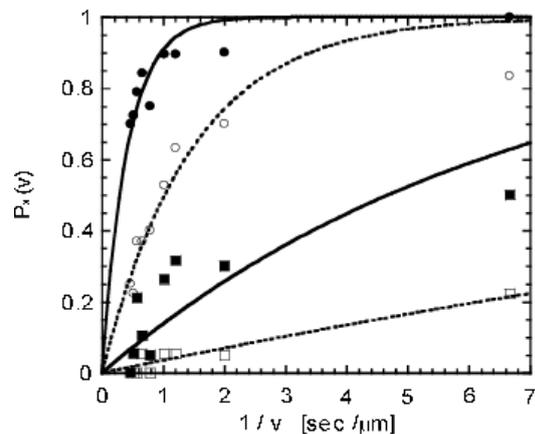


図3: 緩和過程における核形成頻度の速度依存性. データ点は末端間距離  $x$  まで緩和させる間に核形成が生じた確率を示しており, 曲線は理論曲線である.  $x = 2.5, 4.5, 5.5, 6.5$   $\mu\text{m}$  のデータをプロットしている.

### (4) DNAの熱揺らぎの定量化

(3) の緩和過程では, DNA部分鎖が熱的に揺らぎ, 部分鎖どうしが一定の距離に近づくことで核形成が生じると考えられる. DNAの熱揺らぎは, 一本の高分子鎖のダイナミクスだけでなく, DNA結合蛋白質のような一分子DNAと相互作用する物質の運動にも影響を及ぼすと考えられる.

そこで本研究を進展させ, DNAの熱揺らぎを制御した状態で, DNAおよびDNA結合蛋白質の運動を同時観測するために, 装置の改良を行った. DNA結合蛋白質の観測に金ナノ粒子による標識化が有効であることを確認し, 金ナノ粒子の散乱光とDNAの蛍光を同時観測するための測定系を構築した.

蛍光色素を用いてDNAの可視化を行い, 光ピンセットにより両末端を固定化した状態で蛍光像を取得し, 画像解析により伸長方向に垂直な方向の揺らぎの大きさを定量化した. 揺らぎの大きさ(部分鎖の位置の分散)は, 末端間の中心にピークを持つ放物線を示すことが分かった(図4).

今後, 末端間距離と揺らぎの大きさの関係を定量的に明らかにした後, DNA結合蛋白質の運動の観測を行い, DNAの揺らぎとDNA結合蛋白質の運動の関係を明らかにする予定である.

### (5) 蛋白質一分子(SNase)の力学的アンフォールディング

蛋白質はアミノ酸が連なった荷電高分子鎖であり, 固有の構造に折れ畳まり, 様々な生体内化学反応を調節している. 凝縮DNAと同様に, 力学的伸長過程では部分構造のアンフォールディングに対応した張力ピーク

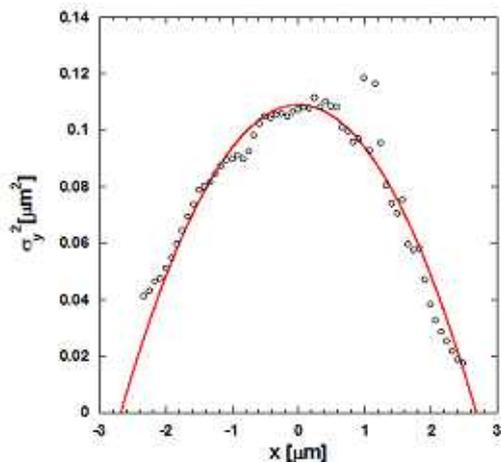


図4：両末端が固定された一分子DNAの揺らぎ

が現れる。

原子間力顕微鏡を用いて一分子蛋白質（スタフィロコッカルヌクレアーゼ，SNase）の伸長実験を行い，アンフォールディング過程における力学応答を測定した．その結果，部分構造がほどける経路（アンフォールディング経路）は，単一の経路ではなく，確率的に変化することを明らかにした．SNaseは蛋白質フォールディング分野において，モデル蛋白質として盛んに研究が行われているが，一分子レベルの力学応答を示したのは，本研究が初めてである．これらの結果は，論文1に掲載されている．

凝縮DNAおよび蛋白質の一分子力学応答は，ともにクラマース型の遷移ダイナミクスで議論することができ，アンフォールディング時の張力の増加は，エネルギー障壁を超える際の実効的摩擦力と解釈できる．本研究で得られたDNAおよび蛋白質の力学的伸長に関する定量的知見は，荷電高分子鎖のダイナミクスを解明するにあたり，従来のバルク系の測定では得ることのできない有用な知見である．

#### 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1 T. Ishii, Y. Murayama, A. Katano, K. Maki, K. Kuwajima, and M. Sano, Probing force-induced unfolding intermediates of a single staphylococcal nuclease molecule and the effect of ligand binding, *Biochem. and Biophys. Res. Comm.* 375 (2008) 586-591. 査読あり

2 Y. Murayama, H. Wada, and M. Sano, Dynamic force spectroscopy of a single condensed DNA, *Europhysics Letters* 79 (2007) 58001-p1-p6. 査読あり

〔学会発表〕(計 3 件)

1 Y. Murayama, Irreversible force response of a single condensed DNA, International Workshop on Bio-Soft Matter 2008, June 09 2008, the University of Tokyo.

2 村山能宏，生体高分子伸長実験で見えてきたもの，日本物理学会第63回年次大会領域12シンポジウム「ソフト凝縮系のマイクロ・ナノ空間」，2008年3月24日，近畿大学

3 Y. Murayama, Internal friction of a single condensed DNA, International Soft Matter Conference, October 4 2007, Aachen Germany.

#### 6．研究組織

(1)研究代表者

村山 能宏 (MURAYAMA YOSHIHIRO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：60334249

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし