

氏名(本籍)	村山能宏	(宮城県)
学位の種類	博士(情報科学)	
学位記番号	情博第188号	
学位授与年月日	平成13年3月26日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
研究科、専攻	東北大学大学院情報科学研究科(博士課程)システム情報科学専攻	
学位論文題目	一分子DNAの熱力学的特性と構造変化の研究	
論文審査委員	(主査)	
	東北大学教授 沢田 康次	東北大学教授 堀口 剛
	東北大学教授 海老澤 丕道	東京大学教授 佐野 雅己 (理学系研究科)

論文内容要旨

第1章 序論

近年における生体高分子の1分子計測技術は、溶液中での生体高分子の動きを1分子レベルで観測、操作することを可能にした。生体内環境に近い状態において、生体高分子をピコニュートン、ナノメートルオーダーで観測することは、生体高分子の機能解明の観点からも重要視されている。

生体内におけるDNAは、その環境に応じて様々な形態を取り得る。真核生物のDNAは、種々のタンパク質が介在することで階層的に折れ畳まれた高度な凝縮形態を取る。また、転写や複製時にはその凝縮構造が解きほぐされ、部分的には1本の鎖として振る舞う。一方、タンパク質が介在しない場合においても、多価陽イオンによりDNAの凝縮が引き起こされることが知られている。この凝縮転移については、凝縮後のDNAの構造がウイルス中に見られる折れ畳み構造と類似していることから、生体内でのDNAの折れ畳みとの関係性が示唆されている。多価陽イオンによるDNAの凝縮転移については、従来化学的手法を用いた多分子系での測定や蛍光観測、モデル化した系における理論的研究が重点的に行われてきたが、熱力学的変数の直接測定による1分子レベルでの研究はわずかであり、その解明が待たれていた。

本研究では、1分子DNAの張力測定によりDNAの熱力学的性質を明らかにし、凝縮転移の機構を解明することを目的とする。

第2章 高分子鎖の性質に関する基礎理論

DNAの2重らせんの直径は2 nmであり、全長が μm ～cmオーダーのDNAは、水溶液中では熱揺らぎにより至る所で曲がりくねった糸くずのような形態をとる。

本章では、水溶液中において高分子電解質として振る舞うDNAを考える上での基礎理論について述べている。また、多価陽イオンによるDNAの凝縮転移について、現在までに提唱されている理論で未解決とされている問題を示し、本研究において凝縮状態にある1分子DNAの張力測定を行うことの意義について述べている。

第3章 試料作成と1分子DNAの張力測定系

本研究では、Nd-YAGレーザー(波長: 1064 nm)を光ピンセットとして用いることで、1ビームトラップ系及び2ビームトラップ系の2つの実験系を構築し、1分子DNAの張力測定を行った。

末端に化学的修飾が施されていないDNAの張力特性を調べるために、Low-pH法と呼ばれる方法を用いて λ -DNA(48,502 bp)の一端をポリスチレンビーズに、他端を底面のカバーガラス上に非特異的に結合

させた試料を作成した。Low-pH法で作成した試料に対しては、DNAの一端に結合しているポリスチレンビーズを1本のレーザー光で捕捉し、底面のガラス面を移動させることでDNAを伸長させ、焦点からのビーズのずれを4分割フォトダイオードで測定することで、DNAに生ずる張力を測定した（1ビームトラップ系）（図1）。

多価陽イオンによるDNAの凝縮転移における張力測定では、多価陽イオン存在下においてDNAと底面のガラス面との相互作用を抑えるため、DNAと底面の距離を十分離れた状態で測定を行なった。この場合には、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法を用いて両末端をタンパク質で修飾したDNA (15,659 bp) を合成し、DNAの両端にポリスチレンビーズを結合させ、各々のビーズを2本のレーザー光で捕捉した。片方のレーザー光を移動させることでDNAを伸長させ、焦点からのビーズのずれを画像処理により測定することで、DNAの張力を測定した（2ビームトラップ系）（図2）。

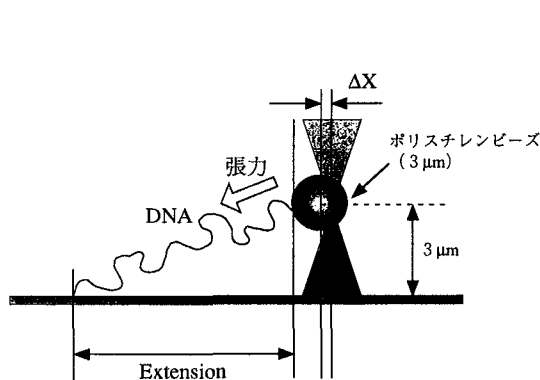


図1：1ビームトラップ系

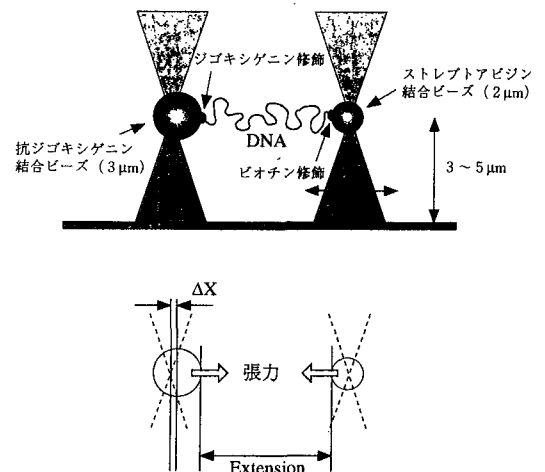


図2：2ビームトラップ系

第4章 1分子DNAの張力特性

本章では、Low-pH法で作成した末端修飾が施されていないDNAに対する張力測定の結果について述べている。本測定において1分子DNAを伸長させたときに生ずる張力は、分子鎖の熱揺らぎにより生ずるエントロピー力である。分子鎖の固さは、分子鎖の方向相関の減衰幅によって定義される持続長によって特徴付けられる。従来の研究において、DNAの伸びと張力の関係はWormlike Chain (WLC) モデルによって記述できることが知られている。本測定では、測定結果に対しDNAの持続長、及び全長をパラメータとしてWLCモデルでフィッティングすることで持続長を求めた。

本測定結果から得られたDNAの持続長 (51.4 nm) は、DNAの末端に化学的修飾を施した場合における、従来の測定結果 (53.4 ± 2.3 nm) とほぼ一致する。この結果から、DNA鎖の末端修飾による持続長への影響は無視できることが明らかとなった。

また、持続長の温度依存性を調べた結果、持続長の逆数がボルツマン分布に従うことが分かった。DNA鎖は、2本の鎖が相補的塩基対間の水素結合により結合した2重らせん構造をとり、温度上昇とともに水素結合が解離することで1本鎖となることが知られている。2本鎖状態、1本鎖状態の持続長、及びこれらの状態間のエネルギー差を考慮すると、測定結果から得られる1本鎖DNAの持続長 (0.77 nm) は、従来1本鎖DNAの張力測定において得られている値 (0.7 nm) とほぼ一致する。さらに、測定結果から得られる2本鎖、1本鎖状態のエネルギー差 (1.7×10^{20} J) は、水素結合のエネルギーに相当している。これらの結果は、温度上昇により、塩基対間水素結合の部分的解離が生じ、2本鎖DNAの持続長に1本鎖としての特徴が現われることを示唆している。

第5章 多価陽イオンによるDNAの凝縮転移

DNAが含まれる溶液に多価陽イオンを加えると、ランダムコイル状のDNAが凝縮したグロビュール状

態へと変化することが知られている。本章では、多価陽イオンによる DNA の凝縮転移における、1 分子 DNA の張力測定結果、及び測定結果に基づいた DNA の凝縮転移についての考察について述べている。本実験では、凝縮剤として DNA の凝縮転移を引き起こすことが知られている、3 価のポリアミンであるスペルミジンを用いた。溶液交換が可能な試料セルを作成し、スペルミジンを含む溶液に交換することで、凝縮過程の張力変化、及び溶液交換前後での張力特性の変化について調べた。

凝縮時の張力測定により、DNA の凝縮過程において張力に ~ 10 s の速い変化と ~ 100 s の遅い変化が起こることが観測された。従来、光散乱による多分子系での測定から、分子内凝縮と分子間凝集による異なる時間スケールの反応が存在することが知られていたが、本測定で得られた結果は、分子内凝縮においても 2 つの過程があることを示している。また、凝縮後の DNA の張力特性において、全長の約 85 % 以下の伸びに対し、張力が一定となる応答が観測され (図 3)、凝縮にともなうエネルギーを測定結果から直接的に求めた結果、単位塩基対あたり $0.1 k_B T / \text{bp}$ のエネルギーで凝縮が生じていることが分かった。張力一定の応答は、分子内凝縮によるコイル・グロビュール共存状態の存在を示している。この結果は、凝縮転移における DNA の自由エネルギーに 2 つの極小点が存在することを示しており、この転移が一次相転移であることを確証付ける結果である。さらに、凝縮後の張力特性には、伸長-緩和過程で履歴が生ずることが観測され、凝縮可能な溶媒環境において非凝縮状態となる DNA の準安定状態が存在することが明らかとなった。

また、伸長-緩和過程の繰り返しによるコイル・グロビュール共存状態に対する張力の減少、及び温度上昇による共存状態の張力の増加から、凝縮状態においても複数の準安定状態が存在することが分かった。

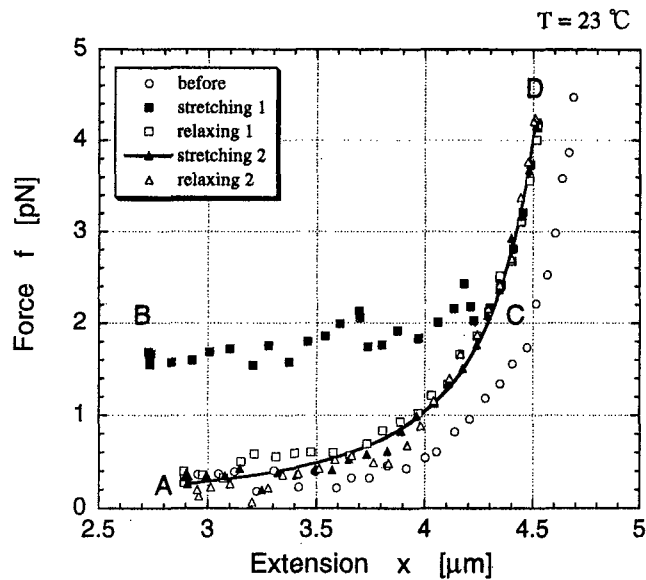


図 3：スペルミジンによる凝縮前後での張力特性の変化

第 6 章 結論

本章では、本研究の結論について述べている。

論文審査の結果の要旨

生体高分子の1分子計測に関する研究は、近年生体高分子の機能解明の観点から重要視されている。DNAの折り畳み機構に関する凝縮転移については、これまでに化学的手法を用いた多分子系での測定や蛍光観測、モデル化した系における理論的研究が重点的に行われてきたが、熱力学的変数の直接測定による1分子レベルでの研究はわずかであり、その熱力学的解明が待たれていた。著者は、DNAの凝縮転移の熱力学的性質について、1分子DNAの詳細な張力測定を行い、この問題の解明に貢献した。本論文はこれらの成果をまとめたもので、全編6章からなる。

第1章は序論であり、関連する研究分野の背景と本研究の目的について述べている。

第2章では、本研究を行う上での基礎となる既存の理論、及び未解決とされている問題について述べ、本研究の重要性を示している。

第3章では、本研究で用いる試料の作成方法と、1分子DNAの張力測定系及び測定方法について述べ、この研究方法の特徴を明らかにしている。

第4章では、末端に化学的修飾の施されていないDNAの張力測定を行うことで、その持続長を従来の修飾が施された場合と比較し、末端修飾による持続長への影響が無視できることを明らかにしている。さらに、持続長の温度依存性を調べることで、DNAの塩基対間水素結合の解離により、2本鎖DNAの持続長に1本鎖としての特徴が現われることを見出している。この結果は、DNAの張力特性に対する従来のモデルの修正を示唆する重要な成果である。

第5章では、多価陽イオンによるDNAの凝縮転移に関する実験結果について述べている。凝縮状態にあるDNAの張力測定から、凝縮可能なイオン環境下でDNAが非凝縮状態となる準安定状態が存在することを示し、凝縮にともなうエネルギーを測定結果から直接的に求めている。さらに、凝縮状態の溶媒環境依存性を調べることで、凝縮状態においても複数の準安定状態が存在することを明らかにしている。これらの結果は、DNAの凝縮転移について新しい知見を加えたものであり高く評価できる。

第6章は結論である。

以上要するに本論文は、異なる溶媒環境におけるDNAの張力-伸長度の関係を1分子レベルの張力測定により詳細に調べ、溶媒環境の変化にともなう転移の熱力学的機構を明らかにしたもので、生物物理学及びシステム情報科学の発展に寄与するところが少なくない。

よって、本論文は博士（情報科学）の学位論文として合格と認める。