

DNAの折り畳み相転移と遺伝子群の発現調節

●吉川 研一¹⁾ ◆瀬戸 秀紀²⁾ ◆吉村 哲朗²⁾ ◆湊元 幹太²⁾

1) 京都大学大学院理学研究科 2) 三重大学工学部

〈研究の目的と進め方〉

数10kbp～Mbpにおよぶ長鎖の二本鎖DNAは、溶液環境の変化に応じ、膨潤状態と凝縮状態との間で、著しい不連続性を伴う転移を起こす。我々は、このようなon/off型の高次構造転移は、Landau流の一次相転移であり、環境パラメータの変化に応じて、多彩な折り畳み構造が現れることを明らかにしてきている。本研究では、長鎖DNAの折り畳み転移に関する研究を、蛍光顕微鏡ならびに原子間力顕微鏡（AFM）を用いた単一分子鎖観察による実験と、計算機実験を利用した理論研究の両面から飛躍的に発展させ、細胞内でのDNAの存在様式と関連させて議論を行った。さらに、重点的な課題として、DNAの高次構造と遺伝子活性との相関を、モデル実験系を用いて調べ、遺伝子発現の自己制御メカニズムの本質に迫ることを目的とした。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) サイズ・塩基組成・溶液温度・イオン環境・凝縮剤濃度等の環境パラメータに対する長鎖DNA折り畳み相転移の依存性、並びに折り畳み状態の残留電荷や流動性等の特性を、理論と実験により研究し、DNAのメソスコピックなレベルでの状態変化の相図を完成させる。
- 2) *in vitro*転写系を用い、長鎖DNAの折り畳み転移と転写活性の相関を単一のDNA分子鎖のレベルで調べる。
- 3) さらに、DNAの折り畳み相転移による、遺伝子群の発現制御ダイナミクスに関する研究を試みる。

〈研究期間の成果〉

- 1) 折り畳み相転移の構造論
長鎖DNAの希薄溶液と濃厚溶液における折り畳み転移で、単分子凝縮体（トロイド）と多分子凝縮体（バンドル）が安定な構造体として、それぞれ競合的に出現することや、荷電高分子の「分子鎖内相分離」構造（単一分子鎖内での凝縮/膨潤の二状態の共存）が安定となる条件を、蛍光顕微鏡・AFMによる実験と計算機実験・理論研究により明らかにした1-3,14,15。また、一連のポリリジンを用いた研究により、低分子カチオンおよび高分子カチオンによる転移メカニズムが本質的に異なる転移様式であること、すなわち、前者が溶液環境、すなわち「場の量」の変化により長鎖のDNA分子にon/offの構造転移を引き起こすのに対し、後者ではDNAとの強い相互作用のために緩慢な連続的な転移を起こすことを明らかにした4-6,16-18。さらに、AFMを中軸とした実験的研究により、100kbpのDNAからの再構成クロマチンでは、ランダムコイルに膨潤した状態と、堅く凝縮状態との間で不連続な転移が起こることを見出し、理論的に転移に対する環境パラメータの役割を明らかにしてきている3,7,19-21。（京大院・生命科学・竹安邦夫教授との共同研究）。

2) DNA高次構造と遺伝子活性

DNA単分子鎖上で転写反応によって生じたRNA分子を直接可視化し、長鎖DNAの高次構造と転写活性の相関を、

単一分子鎖レベルで調べた。これにより、個々のDNA分子鎖レベルで、折り畳み転移と転写活性との相関を明確にした。短鎖と長鎖DNAの構造転移と転写活性の関連性を解明し、DNAの高次構造転移の特質と、転写活性が直接対応することを示すことに成功した8-11。

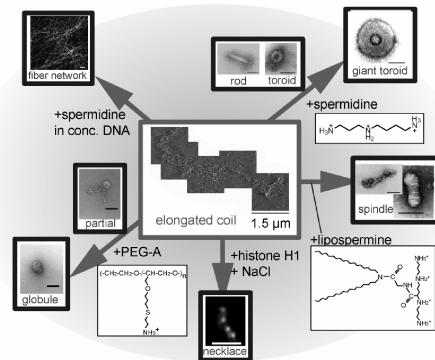


図1 長鎖DNAの多彩な構造変化
(165キログ塩基対のT4 DNAの電顕像スケールバーは100 nm)。

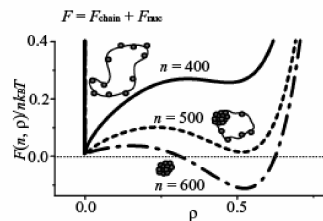
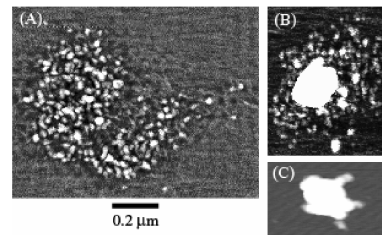


図2 分布関数の解析による長鎖DNAからの再構成クロマチンの一次相転移挙動。(上) AFMによる、再構成クロマチンの凝縮転移の観察。(下) ナクレオソームの分布関数から導いたクロマチンの自由エネルギー(下)。

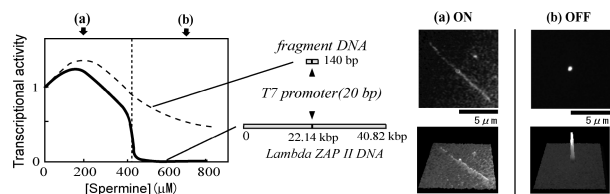


図3 DNAの高次構造変化と転写活性との相関関係。(左) 転写活性の sperimine(3+)濃度依存性。長鎖DNA(λZAP II)では、活性が急激に変化し、高濃度側では完全に抑制されている。それに対して短鎖DNAの転写活性は緩慢な変化を示すだけである。(右) 一分子DNAでの転写活性のon/offスイッチング。青はDNA、赤はRNAよりの発色。折り畳まれたDNAでは、RNA合成が完全に抑制されている。

3) 遺伝子群の発現制御ダイナミクス

1) によって確立した、長鎖DNAの折り畳み相転移の構造論と、2) によって実証した、長鎖DNAの高次構造転移による遺伝子活性制御の成果を基に、DNAの形状（直鎖状/環状：短鎖/長鎖）による折り畳みと転写活性の相関を明らかにした。直鎖状の長鎖DNAのみが、構造転移により転写活性が完全に阻害がされた。

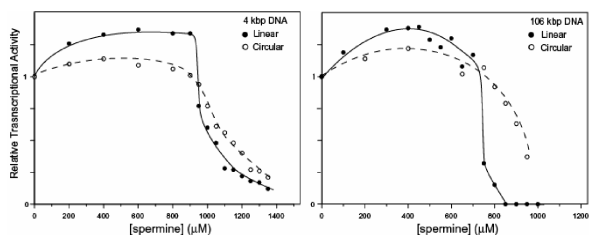


図4 直鎖状と環状 DNA における高次構造転移と転写活性の相関。これらの場合も高次構造の変化と転写活性の変化が良く対応している。

〈国内外での成果の位置づけ〉

巨大DNAの折り畳み転移が一次相転移であることを、単一分子鎖観察の実験と統計力学的理論により確立するとともに、それが遺伝子活性のon/offに直接的に関与していることを明らかにした本研究の成果は、DNAとヒストンタンパクとの複合体を理論物理学の立場から概観した文献(H. Schiessel, "The physics of chromatin", J. Phys. Cond. Mat., 15, 699-774 (2003))に、ほぼ1ページにわたって引用されている。また、レーザーを用いた巨大ゲノムDNAを無侵襲・無接触に搬送、構造制御する実験手法の開発も12,13,22、大きな注目を集めており、Nature誌(2003)のNews & Views欄で紹介されるなどの反響をもたらしている。これらのことから分かるように、本研究は世界的に極めて先駆的で、注目を集めている研究であるといえる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

スペルミジンのような比較的簡単な低分子多価カチオン凝縮剤による折り畳み転移と、転写活性との相関関係は、ほぼ明らかとなったといえるが、実際に細胞内で多種多様なタンパク等が共存する環境下における折り畳み転移と遺伝子活性の関連性を明らかにするまでには至らなかった。さらに、転写によって生成するRNA分子を、単一の鋳型の長鎖DNA分子レベルで観察することも、今後に残された重要な技術的課題である。

〈今後の課題〉

細胞内環境を想定した複雑な系で、長鎖DNAの折り畳み相転移の物理学研究を進める。可視化技術等をさらに改良した測定系を確立させ、時間スケールにおいて折り畳み状態の物性と転写活性との相関を調べ、その知見に基づき、さらに発展させた発現の自己制御モデル構築・検証する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 030910033 Y. Yoshikawa, M. Suzuki, N. Chen, A. Zinchenko, S. Murata, T. Kanbe, T. Nakai, H. Oana and K. Yoshikawa, "Ascorbic acid induces a marked conformational change in long duplex DNA" Eur. J. Biochem., 270, 3101-3106 (2003).
- 0401162013 A. A. Zinchenko, V. G. Sergeyev, S. Murata and K. Yoshikawa, "Controlling the intrachain

segregation on a single DNA molecule" J. Am. Chem. Soc., 125, 4414-4415 (2003).

- 0401251902 T. Okuda, S. Kidoaki, M. Ohsaki, Y. Koyama, K. Yoshikawa, T. Niidome and H. Aoyagi, "Time-Dependent Complex Formation of Dendritic Poly(L-lysine) with Plasmid DNA and Correlation with in vitro Transfection Efficiencies" Org. Biomol. Chem., 1, 1270-1273 (2003).
- 0401161942 T. Iwaki and K. Yoshikawa, "Competition between interchain and intrachain phase segregation" Phys. Rev. E, 68, 031902 (2003).
- 0401251913 N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai and K. Yoshikawa, "DNA Dissolves Single-walled Carbon Nanotubes in Water" Chem. Lett., 132, 456-457 (2003).
- 0402011919 L. Zherenkova, P. Khalatur and K. Yoshikawa, "Self-Consistent Integral Equation Theory for Semiflexible Polyelectrolytes in Poor Solvent" Macromol. Theor. Simul., 12, 339-353 (2003).
- 0401251913 S. G. Starodoubtsev, S. Kidoaki, and K. Yoshikawa, "Interaction of Double-Stranded T4 DNA with Cationic Gel of Poly (diallyldimethylammoniumchloride)" Biomacromolecules, 4, 32-37 (2003).
- 0312012114 K. Tsumoto, L. Francois and K. Yoshikawa, "Giant DNA molecules exhibit on/off switching of transcriptional activity through conformational transition" Biophys. Chem., 106, 23-29 (2003).
- 0312012136 T. Akitaya, K. Tsumoto, A. Yamada, N. Makita, K. Kubo and K. Yoshikawa, "NTP Concentration Switches Transcriptional Activity by Changing the Large-Scale Structure of DNA" Biomacromolecules, 4, 1121-1125 (2003).
- 0402011926 Y. Sato, S.-i. M. Nomura and K. Yoshikawa, "Enhanced uptake of giant DNA in cell-sized liposomes" Chem. Phys. Lett., 380, 279-285 (2003).
- 0402011938 S.-i. M. Nomura, K. Tsumoto, T. Hamada, K. Akiyoshi, Y. Nakatani and K. Yoshikawa, "Gene Expression Within Cell-Sized Lipid Vesicles" ChemBioChem, 4, 1172-1175 (2003)
- 038311848 M. Ichikawa, Y. Matsuzawa, Y. Koyama and K. Yoshikawa, "Molecular fabrication: Aligning DNA molecules as building blocks" Langmuir, 19, 5444-5447 (2003).0402011926
- 0312010014 K. Kubo, M. Ichikawa, and K. Yoshikawa, "Optically driven transport into a living cell" Appl. Phys. Lett., 83, 2468-2470 (2003).
- 0408232025 A. A. Zinchenko, V. G. Sergeyev, K. Yamabe, S. Murata and K. Yoshikawa, "DNA Compaction by Divalent Cations: Structural Specificity Revealed by the Potentiality of Designed Quaternary Diammonium Salts" ChemBioChem, 5, 360-368 (2004).
- 0408232030 A. A. Zinchenko, V. G. Sergeyev, V. A. Kabanov, S. Murata and K. Yoshikawa, "Stereoisomeric Discrimination in DNA Compaction" Angew. Chem. Int. Ed., 43, 2378-2381 (2004).
- 0602101903 Y. Yoshikawa, M. Suzuki, N. Yamada, and K. Yoshikawa, "Double-strand break of giant DNA: Protection by glucosyl-hesperidin as evidenced through direct observation on individual DNA molecules", FEBS Lett., 566, 39-42 (2004).

17. 0602101909 Y. Matsuzawa, T. Kanbe, and K. Yoshikawa, "Compaction and Multiple-Chain Assembly of DNA with the Cationic Polymer, Poly-Aluminumchloride (PAC)", *Langmuir.*, 20, 6439-6442 (2004).
18. 0602101913 H. Kitahata, H. Mayama, and K. Yoshikawa, "Spontaneous rhythmic motion of a polymer chain in a continuous-wave laser field", *Phys. Rev. E.*, 70, 021910 (2004).
19. 0404032114 T. Iwataki, S. Kidoaki, T. Sakaue and K. Yoshikawa, "Competition between compaction of single-chains and bundling of multiple chains in giant DNA molecules" *J. Chem. Phys.*, 120, 4004-4011 (2004).
20. 0602101906 I. Rychkov and K. Yoshikawa, "Structural Changes in Block Copolymer Solutions under Shear Flow as Determined by Non-Equilibrium Molecular Dynamics", *Macromol. Theory Simul.*, 13, 257-264 (2004).
21. 0602101915 T. Iwaki and K. Yoshikawa, "Counterion-mediated intra-chain phase segregation on a single poly-electrolyte chain", *Europhys. Lett.*, 68, 113-119 (2004).
22. 0602101918 H. Oana, K. Kubo, K. Yoshikawa, H. Atomi and T. Imanaka, "On-site manipulation of single whole-genome DNA molecules using optical tweezers" *Appl. Phys. Lett.*, 85, 5090-5092 (2004).