

自由溶液電気泳動で明らかになる DNA 凝縮転移におけるコンフォメーション変化と荷電状態変化の相関

(東大院工) 山崎 裕一

【はじめに】

高分子電解質の単一鎖でみられるコンフォメーション変化は、荷電状態変化を伴い、両者の相関については未解明な部分が多い。直鎖状 DNA 分子が多価カチオン共存下で膨潤状態から単分子凝縮状態へ転移する DNA 凝縮は、蛍光顕微鏡下での転移挙動の解析により、分子鎖全域に渡り不連続に生じる場合と、分子内相分離状態を経て転移が生じる場合に分類される⁽¹⁾。前者の転移の終状態では、DNA のリン酸基の負電荷がほぼ完全に中和されていることが電気泳動光散乱によって明らかとなっている⁽²⁾。しかし、転移領域でのコンフォメーション変化と荷電状態変化との相関は未解明で、適切な実験方法も提案されていない。本研究では、蛍光顕微鏡下で DNA の自由溶液電気泳動を行い、コンフォメーション解析と荷電状態解析を同時に行い、転移領域での両者の相関を解明した。また、遺伝子治療において治療用遺伝子を細胞内に導入する際に用いられるプラスミド DNA は、環状超らせん構造という複雑な構造を持つため、直鎖状 DNA とは大きく異なるコンフォメーション変化を誘起する。本発表では、直鎖状 DNA と環状超らせん DNA の両者でみられる DNA 凝縮について、特に構造論的な特性解析の結果を紹介する。

【結果と考察】

1. 直鎖状 DNA の DNA 凝縮におけるコンフォメーション解析

本研究では、倒立型蛍光顕微鏡のステージに固定可能な電気泳動チャンバーを設計し、このチャンバー内で定常電場下の DNA の挙動をビデオカメラで観察する方法を主たる方法論として採用した (図 1)。このチャンバーでは、カバーガラス表面はアクリルアミドオリゴマーのコーティングにより電気浸透流の発生が抑えられており、電場印加用電極に白金黒電極、電場強度測定用電極に銀/塩化銀電極を用いることで、溶液内に適正な定常電場が生成することが確認された。

このチャンバーを用いて DNA の膨潤鎖と凝縮鎖が共存する転移領域にて観察を行ったところ、膨潤鎖では一様な泳動が観察されたが、凝縮鎖については泳動は観察されず、ブラウン運動と予想される現象が観察された。このことは膨潤鎖と凝縮鎖の間でコンフォメーションのみならず、荷電状態も大きく異なっていることを示唆しており、凝縮鎖についてはほぼ完全な電荷中和が達成されていると予測される。凝縮鎖で観察された

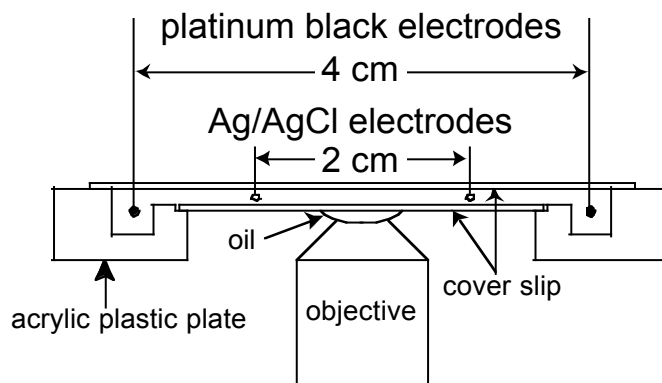


図 1 顕微電気泳動チャンバー断面図

挙動については画像解析を行い、ブラウン運動であることを確認し、DNA凝縮体の流体力学的半径を導出した。典型的なDNA凝縮体の平均二乗変位は時間に比例し、傾きより拡散係数が得られ、Stokes-Einsteinの式より流体力学的半径が得られる(図2)。解析の結果、共存領域で観察されたDNA凝縮体の流体力学的半径は50-100nmであった。このような解析が可能であることは、電荷中和に関する上記の予測が正しいことを示している。当日は上記の観察結果と解析について、ビデオ画像を用いて報告する。

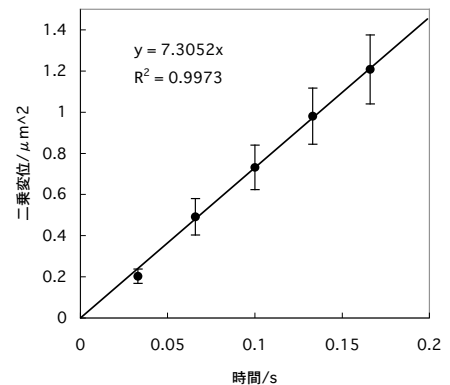


図2 DNA凝縮体の平均二乗変位

2. 環状超らせんDNAのDNA凝縮におけるコンフォメーション解析

DNA凝縮では上記の通り、高分子鎖の占有体積が大きく減少し、これが治療用遺伝子の血管内送達に役立つことが知られている。血管内送達を経て治療用遺伝子を細胞内に導入するにはプラスミドDNAとよばれる環状で超らせん構造をもつDNAが運び屋として用いられ(図3左)、プラスミドDNAは凝縮状態を保ったまま毛細血管から組織及び細胞内へ導入されるが、最近の我々の研究により凝縮構造の違いがその後の遺伝子発現効率に大きな影響を与えることが判ってきた。

本研究では、poly(ethyleneglycol)-*b*-poly-L-lysine ブロック共重合体(PEG-PLL)により誘起されたプラスミドDNAの凝縮構造について、AFMによる観察を行い、図3のような様々な折りたたみ機序によって凝縮構造が誘起されることを明らかにした。プラスミドDNAの凝縮構造は主にロッド状、トロイド状、球状となること、及びロッドの長軸ないしはトロイドの円周の長さが極めて高い規則性に従うことを見出している。ロッド状凝縮体の長軸長とトロイド状凝縮体の円周は、プラスミドDNAの全長に比して、1/2、1/4、1/6の倍数といった長さを特異的にとり、この規則的折りたたみを矛盾なく説明する機序として図3に示すモデルを提案している。本モデルの妥当性については、一本鎖切断酵素を用いたフラグメンテーション解析によって支持される結果を得ており⁽³⁾、その詳細については当日報告する。

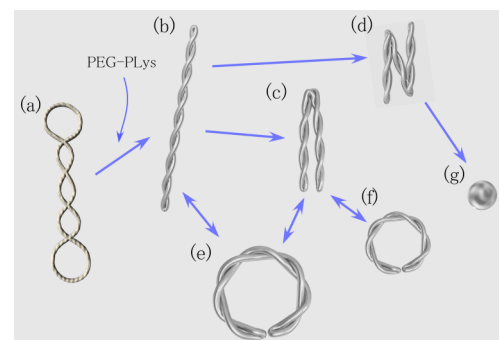


図3 環状超らせんDNA(プラスミドDNA)に見られる様々な凝縮構造

【参考文献】

- (1) Starodoubtsev, S. G.; Yoshikawa, K. *J. Phys. Chem.* 1996, *100*, 19702-19705.
- (2) Yamasaki, Y.; Teramoto, Y.; Yoshikawa, K. *Biophys. J.* 2001, *80*, 2823-2832.
- (3) Osada, K.; Yamasaki, Y.; Katayose, S.; Kataoka, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, *44*, 3544-3548.