

# 高分子電解質の孤立高分子鎖コンフォメーション解析

東大院工・准教授 山崎 裕一

## 1. 初期の研究目標と実際の研究推進

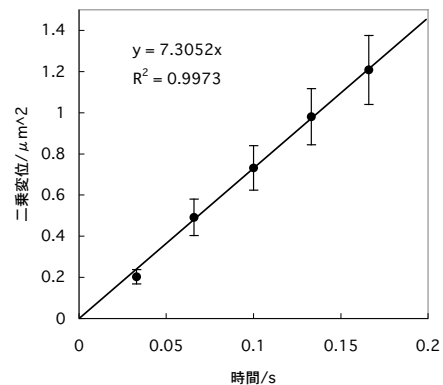
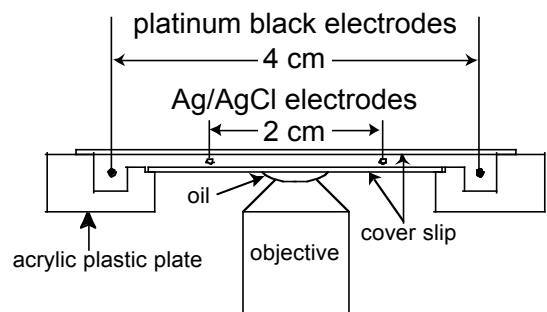
本研究では、DNA 凝縮におけるコンフォメーション変化について、荷電状態変化との相関を見出すことを目的とした。直鎖状 DNA が多価カチオン共存下で膨潤状態から単分子凝縮状態へ転移する DNA 凝縮は、蛍光顕微鏡下での転移挙動解析より、分子鎖全域に渡り不連続に生じる場合と、分子内相分離状態を経て転移が生じる場合に分類され、後者の転移の終状態では DNA のリン酸基の負電荷がほぼ完全に中和されることが電気泳動光散乱によって明らかとなっていた。しかし、転移領域でのコンフォメーション変化と荷電状態変化との相関は未解明で、適切な実験方法も提案されていなかったため、本研究では蛍光顕微鏡下で DNA の自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。初期の目標以外には、遺伝子治療での遺伝子導入に用いられるプラスミド DNA(pDNA)についても同様の解析を行った。複雑な環状超らせん構造を持つ pDNA は、直鎖状 DNA とは異なるコンフォメーション変化を生起するが、本研究では、凝縮状態の pDNA のコンフォメーション解析から、新しい折りたたみ機序を提案した。

## 2. 研究成果

### 2-1. 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(図1)を設計し、チャンバー内での定常電場下の DNA の挙動をビデオカメラで観察する方法を採用した。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、電場印加用の白金黒電極と電場強度測定用の銀/塩化銀電極を用いることで、溶液内に適正な定常電場が発生する。

このチャンバー内で 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、ブラウン運動とみら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はコンフォメーションのみならず荷電状態も異なることを示唆しており、膨潤鎖では一定の残留電荷が存在するものの、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挙動については、凝縮鎖の重心の軌跡を画像解析により解析し、この運動がブラウン運動であることを確認した。典型的な DNA 凝縮体の平均二乗変位は時間に比例し、この傾きより拡散係数が得られる(図 2)。また、Stokes-Einstein の式から流体力学的半径が得られ、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 だった。この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。

## 2-2. 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(pDNA)とよばれる環状超らせん構造の DNA が運び屋として用いられ(図 3 左)、pDNA は凝縮状態を保ったまま毛細血管から組織や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遺伝子発現効率に大きく影響す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 pDNA の凝縮構造について、AFM 観察を行い、図 3 のような凝縮構造が誘起されることを確認した。すなわち、pDNA 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い、ロッド状凝縮体の長軸長とトロイド状凝縮体の円周は、pDNA の全長に比して、1/2 (b, e)、1/4 (c, f)、1/6 (d) といった長さを特異的にとることを明らかにした。また、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 に示す構造転移モデルを提案した。本モデルの妥当性については、一本鎖切断酵素 (S1 ヌクレアーゼ) を用いたゲル電気泳動での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いる<sup>(1)</sup>。

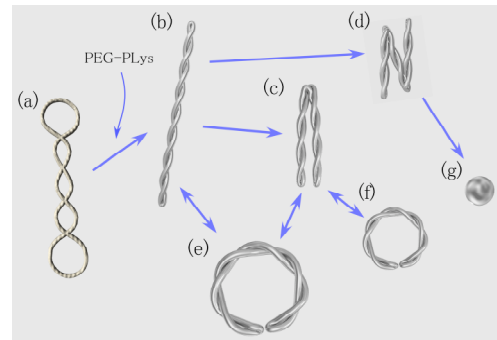


図 3 環状超らせんプラスミド DNA (pDNA) に見られる様々な凝縮構造

## 2-3. 交付期間後の展開

PEG-PLL と pDNA との複合体形成について、等温滴定熱分析による解析を行い、PEG-PLL の PLL 鎖の重合度や溶液の塩濃度を変化させ、PEG-PLL の pDNA に対する結合定数などの熱力学定数を独自に開発した結合モデル<sup>(2)</sup>を用いて導出した。その結果、比較的短い重合度 20 程の PLL 鎖を持つ PEG-PLL の DNA に対する結合様式は低分子カチオンのそれと一致することを見出した<sup>(3)</sup>。また、図 3 に対応する座屈に基づく折れたたみ機序を新たに提案した<sup>(4)</sup>。

### <参考文献>

- (1) Osada, K.; Yamasaki, Y. et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, **44**, 3544-3548.
- (2) Kim, W.; Yamasaki, Y.; Kataoka, K. *J. Phys. Chem. B* 2006, **110**, 10919-10925.
- (3) Kim, W.; Yamasaki, Y. et al., *Biomacromolecules* 2010, **11**, 1180-1186.
- (4) Osada, K.; Yamasaki, Y. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 12343-12348.