

細胞サイズのリン脂質ベシクル中における
DNA 高次構造転移と転写・発現反応

加藤絢子

本論文中で扱うおもなリン脂質の構造式および略語表記

16:0 PC

1,2-di-O-hexadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine



18:0 PC

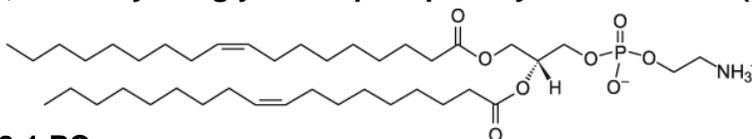
1,2-di-O-octadecyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine



eggPC

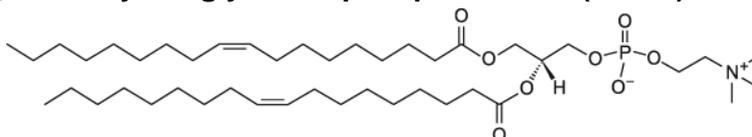
18:1 PE

1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE)



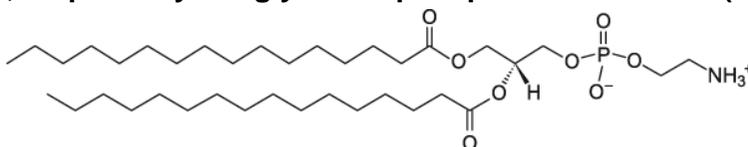
18:1 PC

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC)



16:0 PE

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE)



目 次

緒 言	1
第一章 リン脂質ベシクル中の T4 DNA の高次構造転移と転写活性	2
第一節 水溶液中の T4 DNA の高次構造変化と転写活性との相関	3
第二節 DNA を封入したベシクルの作製	6
第三節 DOPE および eggPC ベシクル中の T4 DNA の分布	7
第四節 DOPE ベシクル中の T4 DNA の高次構造	9
第五節 DNA の状態とベシクルサイズとの相関	15
第六節 DNA の長さや分布との相関	16
第七節 ベシクル中の DNA の転写活性に対するリン脂質膜の影響	19
小 括	21
第一章の結論	22
第二章 リン脂質二重膜の相分離に伴う DNA の高次構造転移	23
第一節 三成分から構成されるリポソームの調製	24
第二節 膜の相分離と T4 DNA の吸着	25
第三節 GUV の相分離と T4 DNA の高次構造	27
小 括	29
第二章の結論	30
結 論	32
実験の部	33
引用文献	39
謝 辞	44

緒言

地球上には μm スケールから m スケールまで様々な生物が存在するが、それらはリン脂質膜で囲まれた数~数十 μm の細胞を基本的な構成単位としている。各々の細胞内には遺伝情報を担う DNA が存在し、その遺伝子発現は脂質二重膜で区切られた μm スケールの微小な環境に依存した特異性を示すと考えられる。しかし、このような環境が細胞内の諸反応に対してどのような影響を及ぼすかについては十分には理解されていない。

近年の研究により、溶液中に存在する数十 kbp 以上の長い DNA 分子は、細胞内に多量に存在するポリアミン(スペルミン、スペルミジン)といった縮合剤の影響によりコイル状態からトロイドやロッド構造のような非常にコンパクトな折り畳み状態への大きな密度変化を伴う高次構造転移を示すことが明らかにされている⁽¹⁻⁵⁾。さらに、長い DNA 分子の高次構造の変化と転写活性との間に相関があることが *in vitro* の系で報告されている^(6,7)。

しかし、細胞内では、DNA と他の分子はマイクロスケールの狭い空間に存在している。バルク中(一般的な *in vitro* の系)で起こる反応が、細胞内環境でも同じように生じるかについてはまだ解明されていない。細胞内で起こる分子反応の特性について理解するためには、バルク中の反応に加えて、リン脂質膜に囲まれた細胞サイズ空間に閉じ込められた条件下での反応を検証することは有効であると考えられる。最近では、いくつかの方法を用いて DNA、タンパク質、およびその他の生化学的反応の成分を封入した巨大なリン脂質小胞 ($> 1 \mu\text{m}$ の直径)を作成することが可能となっており、小胞内で転写、翻訳など様々な反応が再構成された人工細胞モデルの研究も進んでいる⁽⁸⁻¹²⁾。また、リン脂質膜で囲まれた油中水滴(“water-in-oil” microdroplet, 以下ベシクル, Fig. 2)の作成についても検討されてきた^(13, 14)。これらを利用して微小な細胞環境における反応や機構の特異性を明らかにすることは、生命現象の本質に迫る研究につながると考えられる。

そこで著者は、細胞にとって必要不可欠なリン脂質膜と DNA との相互作用・性質に着目し、細胞に特徴的なリン脂質膜で囲まれた μm サイズの空間における DNA の構造転移と転写反応との関連をボトムアップ式に検

証することで、細胞内で生じている反応におけるリン脂質膜や微小環境の影響を明らかにする第一歩とした。第一章では、脂質一重膜に囲まれた細胞サイズの水滴すなわちベシクル⁽¹⁴⁾を用いて、バクテリオファージ T4 のゲノム DNA(T4 DNA, 166 kbp)の分布と構造変化に対するマグネシウム (Mg^{2+})およびスペルミン、ベシクルサイズの影響を検討し、さらに DNA-膜相互作用と転写活性との関連について検討した。第二章では、実際の細胞膜に特徴的な、様々な種類のリン脂質、糖脂質、コレステロールなどが不均一に分布するリン脂質二重膜構造の簡単なモデルとして、細胞膜の組成を模倣したリポソーム(GUV : giant unilamellar vesicles)を作成し、DNA と GUV 膜の相互作用による DNA の構造転移へのリン脂質膜の相分離の影響を検証した。

第一章 リン脂質ベシクル中の T4 DNA の高次構造転移と転写活性

本章では、リン脂質に囲まれた μm スケールの環境が DNA の高次構造や機能発現(転写活性)に与える影響について検証した。ベシクル中の DNA の分布および構造変化において、リン脂質膜、リン脂質膜と結合する Mg^{2+} 、および DNA の高次構造転移を引き起こすスペルミンの影響を検討した。さらに、リン脂質膜と DNA の相互作用による DNA の高次構造転移と転写活性との相関について検討した。

実験は、T4 DNA を含む転写反応溶液をリン脂質膜で囲まれたベシクルに封入して行った。

第一節 水溶液中の T4 DNA の高次構造変化と転写活性との相関

T4 DNA は、線状の二本鎖 DNA である。T4 DNA をインターカレーター型蛍光色素 YOYO-1 で染色し、水溶液中で蛍光観察すると、Fig. 1A (a) に示すように、コイル状に広がった状態で存在する。得られた蛍光像より DNA 分子の長軸長を求めると、 $4.03 \pm 0.90 \mu\text{m}$ である。次に、この溶液に 4 価のポリアミンであるスペルミンを加える。スペルミン濃度 1.5 mM では、Fig. 1A (b) に示すように、密に凝縮した構造をとる(長軸長 $1.09 \pm 0.27 \mu\text{m}$)。これは、DNA のようなセミフレキシブルな荷電高分子の特性である高次構造のコイル⇔グロビュールの一次相転移である。すなわち T4 DNA は、スペルミンにより、高次構造がほどけた状態(コイル状態)から密に折りたたまれた状態(凝縮状態)へと転移した(Fig. 1B)。

次に、この高次構造転移と転写活性の相関を見るために、T4 DNA からの大腸菌 RNA ポリメラーゼによる RNA 合成反応を測定した。Fig. 1C は、転写反応溶液中の蛍光強度の時間変化を測定した結果を示したものである。転写反応液中に、UTP- γ AmNS を加えておく。UTP- γ AmNS は、合成される RNA 分子に UTP として取り込まれるときに、 γ AmNS の部分が解離し、蛍光性分子として溶液中に放出される。すなわち、合成される RNA 分子の総量に対応して、反応溶液中の γ AmNS の蛍光強度が増大していく。スペルミン 0 mM では、時間とともに蛍光強度が増大し、RNA 合成が行われていることが確認された。一方、スペルミン 1.5 mM を加えた試料においては、蛍光強度の増大は全く観察されず、RNA 合成が行われなかった。よって、T4 DNA がコイル状態にあるときには、転写反応が起こり、密に折りたたまれたグロビュール状態では、転写が起こらないこと、すなわち、T4 DNA において、高次構造転移と転写活性との間に相関があることが確認された。この 166 kbp の長さを持つ T4 DNA における報告は、すでに報告されている 106 kbp の DNA で認められた知見⁹⁾と同様の結果である。

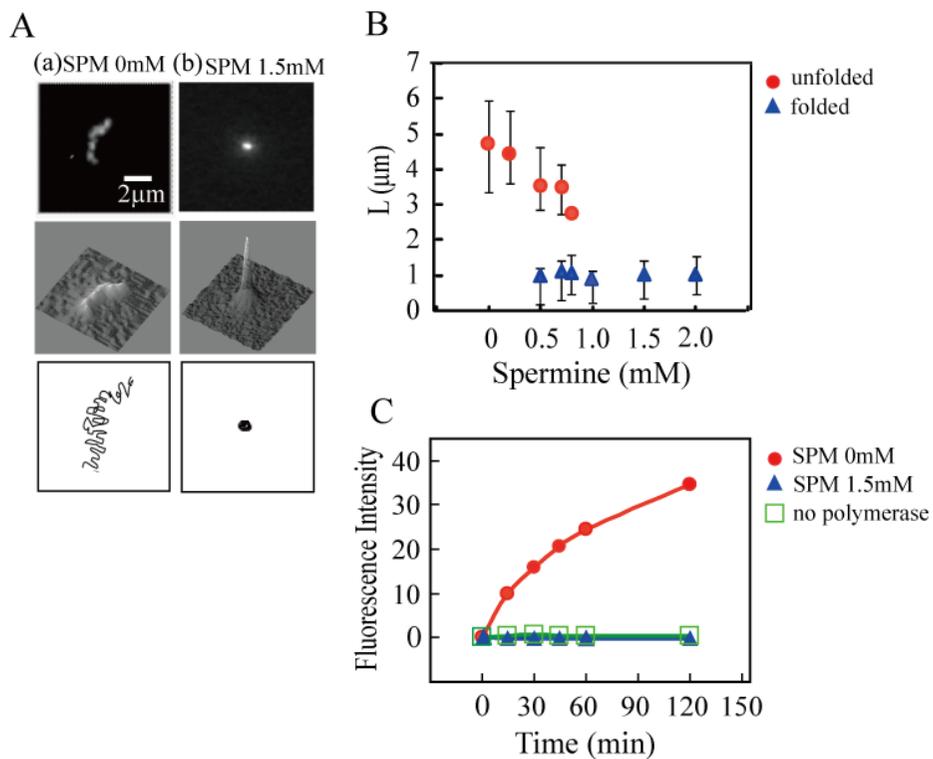


Fig. 1. T4 DNA の高次構造転移と転写活性

A : T4 DNA 一分子の蛍光顕微鏡画像と模式図 ; (a) spermine 0 mM, (b) spermine 1.5 mM. B : spermine により引き起こされる DNA の構造転移 ; 縦軸: T4 DNA 一分子の長軸長 (L)、横軸: spermine 濃度. C : DNA の高次構造と転写活性 ; 縦軸: RNA 合成量, 横軸: 時間

第二節 DNA を封入したベシクルの作製

次にリン脂質ベシクル中の T4 DNA の挙動を検討するために、ベシクルを用いた。作製法は、ミネラルオイルに 1 mM のリン脂質を分散させ、油相とする。水相は T4 DNA を含む転写反応溶液とした。リン脂質は、細胞膜を構成する脂質のうち二重膜の外側の膜に多い phosphatidylcholine(PC)と同じ親水基を持つリン脂質と、内側の膜に多い phosphatidylethanolamine(PE)と同じ親水基を持つリン脂質を使用した。

100 μL のミネラルオイルに対し、5 μL の水溶液を入れてピペッティングにより混合し、直径 10~100 μm (細胞サイズ)のベシクルを作製した(Fig. 2)。ここでは共焦点蛍光顕微鏡を用いて直径が 20~60 μm のベシクルを観察した。

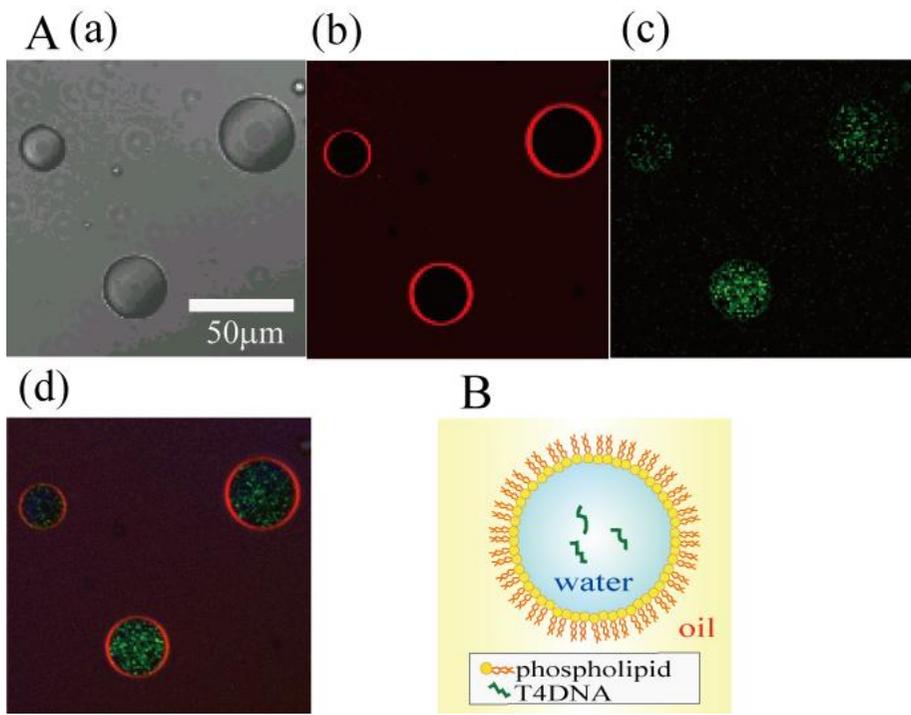


Fig. 2. T4 DNA を封入したベシクル
 A (a)透過光画像、(b) 蛍光リン脂質 TRITC-DHPE、(c) YOYO-1 で
 染色した T4DNA、(d) (b)と(c)の合成、 B 模式図

第三節 DOPE および eggPC ベシクル中の T4 DNA の分布

<Mg²⁺の影響>

T4 DNA をリン脂質 DOPE (dioleoylphosphatidylethanolamine)、eggPC で囲まれたベシクル中に封入し、T4 DNA の膜との相互作用と Mg²⁺の影響を検証した。蛍光色素 YOYO-1 で染色した T4 DNA をベシクルに封入し、ベシクル中の T4 DNA の分子を共焦点蛍光顕微鏡で観察した (10 mM Tris-HCl pH7.5 ,100 mM KCl) (Fig. 3)。直径 20~60 μm のベシクル中において平均 100 分子の T4 DNA が取り込まれる実験条件である。

DOPE ベシクル中において、T4 DNA は Mg²⁺非存在下では水相中に分布したが(Fig. 3A (a))、Mg²⁺ 10 mM 存在下では膜表面に分布した(Fig.3A (b))。一方、eggPC ベシクル中においては、Mg²⁺存在下および非存在下の両条件で T4 DNA は水相中に分布した(Fig.3B)。

PE や PC などの両性イオン脂質は DNA とは直接的には相互作用しない。しかし、リン脂質親水基の負に帯電したリン酸基に Mg²⁺を介して DNA が吸着したと考えられる。PC と PE では親水基の大きさが異なり、これが Mg²⁺との親和性に影響を与えることで DNA の吸着が異なると推察される。

※今回用いた eggPC とは、Hydrogenated Egg phosphatidylcholine (16:0) 34%、(18:0) 58%、(20:0) 5%、(22:0) 3%の飽和脂肪酸である。

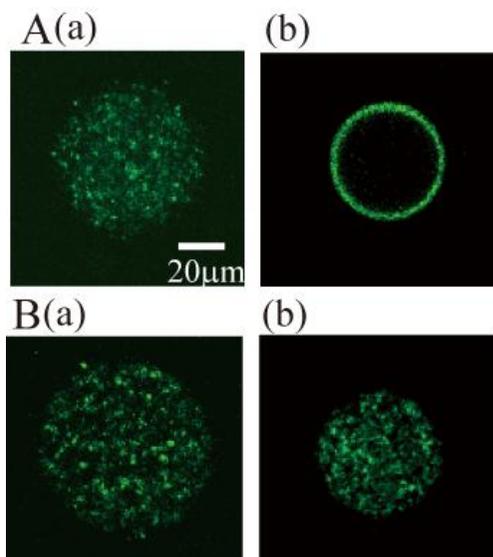


Fig. 3. ベシクル中の DNA の分布

A : DOPE (a) Mg^{2+} 0 mM, (b) Mg^{2+} 10 mM,

B : eggPC (a) Mg^{2+} 0 mM, (b) Mg^{2+} 10 mM

第四節 DOPE ベシクル中の T4 DNA の高次構造

<T4 DNA の一分子観察>

溶液中および DOPE ベシクル中において T4 DNA 分子の構造変化を一分子観察により評価した。超高感度カメラ (EM-CCD または EB-CCD) により、T4 DNA 一分子の蛍光のリアルタイム画像を撮影した。T4 DNA は、共焦点顕微鏡で観察した条件の 10 分の 1 の濃度とした (直径 40 μm のベシクル中に 10 分子前後の T4 DNA 分子が入る)。

代表的な T4 DNA 分子の蛍光画像を (Fig. 4, Fig. 5) に示す。

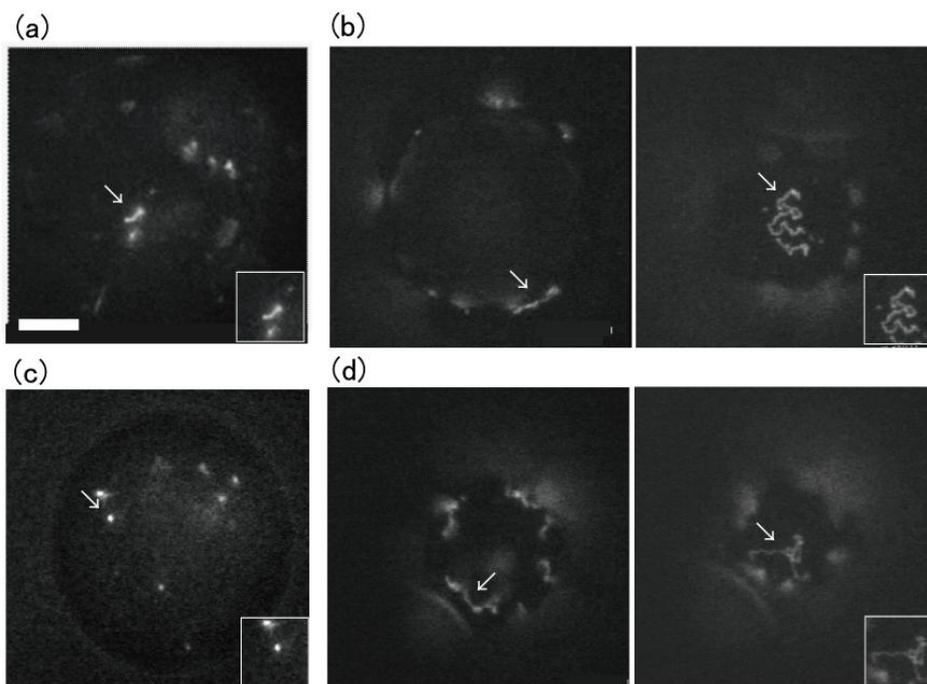


Fig. 4. ベシクル (droplet)中の DNA 分子の蛍光顕微鏡画像

(a) Mg^{2+} 0 mM, spermine 0 mM, (b) Mg^{2+} 10 mM, spermine 0 mM, 左: 赤道面上、右: 底面, (c) Mg^{2+} 10mM, spermine 1.5 mM, (d) Mg^{2+} 10 mM, spermine 1.5 mM, 左: 赤道面上、右: 底面

- (a) Mg^{2+} 0 mM スペルミン 0 mM の条件では、T4 DNA の高次構造はコイルであり、水相中に分布してブラウン運動をしていた。DNA は膜に結合した状態をとらない。
- (b) Mg^{2+} 存在下では (Mg^{2+} 10 mM, スペルミン 0 mM) T4 DNA は、膜内面上に吸着し、溶液中のコイル状の DNA よりもさらに広がった状態をとった(右：底面参照)。膜面上の DNA は完全に固定されてはおらず(左：赤道面上参照)、分子鎖内運動をしていることが観察された。
- (c) スペルミンが存在すると(Mg^{2+} 0 mM, スペルミン 1.5 mM)、T4 DNA の高次構造は凝縮状態であり、その多くはベシクルの水相に分布してブラウン運動していた。
- (d) Mg^{2+} とスペルミンの両者が存在すると (Mg^{2+} 10 mM, スペルミン 1.5 mM)、T4 DNA の高次構造は、ベシクル中ではコイル(右：下面参照)の状態でも膜内面上に分布した。膜表面の DNA は完全に固定されてはおらず(左：赤道面上参照)、分子鎖内運動をしていることが観察された。この条件では、溶液中で凝縮状態であったにもかかわらず、ベシクル膜面上では広がった状態で存在していた。

すなわち、スペルミン 1.5 mM 存在下、T4 DNA は水相に存在するときには凝縮状態である(c)。

ところが、 Mg^{2+} 10 mM 共存下で、DOPE ベシクル中では DNA が膜に吸着して、折りたたまれていた DNA が広がる様子が観察された(d)。

さらに連続画像の詳細な観察から、膜表面に存在する DNA 分子は、完全に膜に張り付いていない。矢印で示した箇所で膜に吸着し、他の部分は動いている様子が確認された (Fig. 5)。

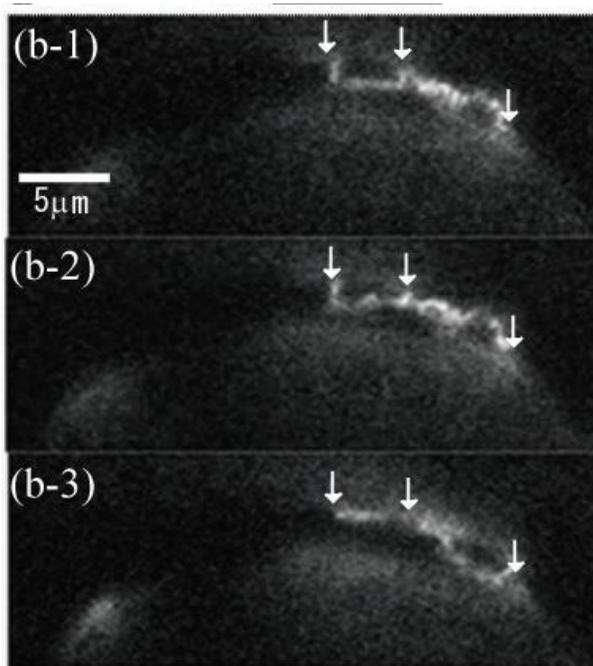


Fig. 5. DOPE ベシクル膜表面の DNA 分子の連続画像
Fig.4 の(b)の条件に対応している。(b-1) 0s、(b-2) 0.2s、(b-3) 0.6s

・溶液中とベシクル中の T4 DNA の長軸長のヒストグラム

溶液中および DOPE ベシクル中において T4 DNA 分子の構造変化を一分子観察により評価した。T4 DNA 蛍光顕微鏡画像から、「長軸長 L」を計測し、分布をヒストグラムに示した(Fig. 6)。(実験の部参照)。比較のために Mg²⁺、スperlミンを含む水溶液中における T4 DNA の高次構造の一分子観察を同様に行い、DNA 分子の長軸長のヒストグラムを作成した (Fig. 6)。下にそれぞれの条件下での DNA の長軸長の平均 (μm) を示す。

Table 1. Fig. 6 に示したそれぞれの条件下の DNA の長軸長と存在状態

	in bulk solution		in droplet	
(a)	4.87±1.01 μm	コイル	4.53±0.95 μm	水相中 コイル
(b)	4.26±1.03 μm	コイル	6.66±1.48 μm	膜表面 コイル
(c)	1.06±0.19 μm	凝縮	1.15±0.74 μm	水相中 凝縮
(d)	1.15±0.71 μm	凝縮	6.80±1.59 μm	膜表面 コイル

Mg²⁺非存在下では、スperlミンの有無に関わらず、溶液中と DOPE ベシクル中の T4 DNA の高次構造の違いは見られなかった。また、DOPE 中の T4 DNA は水相に分布していた。

一方、Mg²⁺ 10 mM 存在下では、スperlミンの有無に関わらず、DNA は DOPE 膜内面上に分布する。さらに、溶液中でスperlミンにより凝縮構造となった T4 DNA も、ベシクル中では膜上に吸着しコイル状態になる。膜面上にコイル状態で存在する T4 DNA は、溶液中のコイル DNA よりも広がっている様子が観察された。

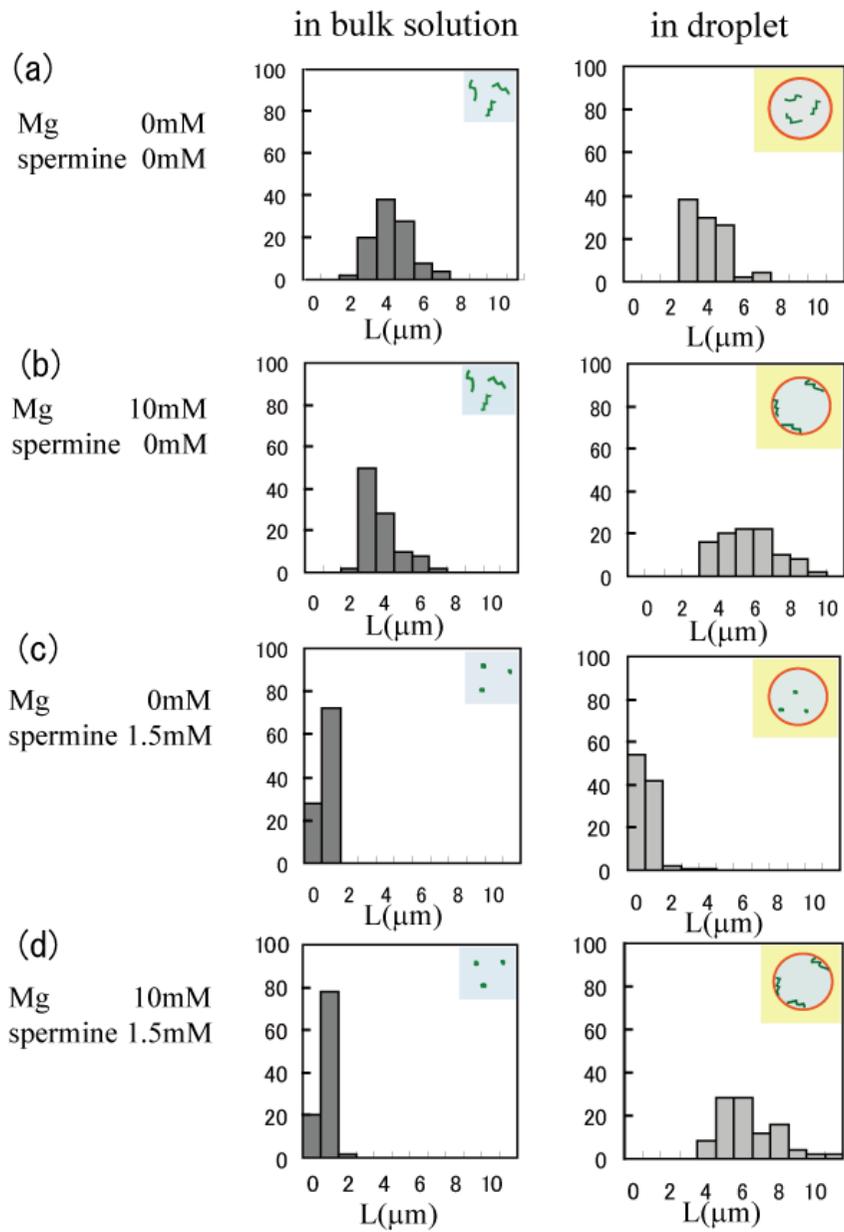


Fig. 6. バルク溶液中とベシクル中の T4 DNA の長軸長の分布

• ベシクル中の DNA 状態図

スペルミン (0, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 1.8 mM) 、 Mg^{2+} (0, 2, 3, 5, 7, 10 mM) の条件で実験を行った。Fig. 7 に DNA の状態図を示す。

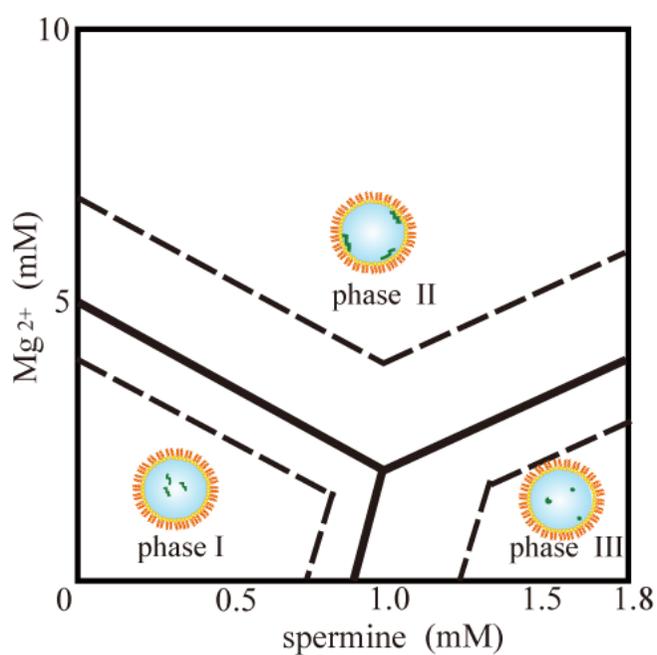


Fig. 7. DOPE ベシクル中の DNA の状態図 spermine と Mg^{2+} の影響

Phase I : コイル状態で水相中に分布

Phase II : 膜表面に分布し引きのばされた構造

Phase III : 凝縮状態で水相中に分布

第五節 DNA の状態とベシクルサイズとの相関

Mg²⁺ 10mM、スぺルミン 1.5 mM 条件下、直径 20~200 μm のベシクル中の T4 DNA の分布を調べた。直径 20~60 μm のベシクル中では、ほぼすべてのベシクルで、DNA 分子は PE 膜表面に吸着した。一方、直径 100 μm 以上のベシクルでは、DNA が PE 膜表面と溶液中に分布したベシクルと、すべての DNA が溶液中に分布したベシクルの割合が増加した(Fig. 8)。

このように DNA と PE 膜との相互作用およびそれに伴う DNA 高次構造転移はベシクルサイズに依存する結果となった。本研究の実験条件では、ベシクル中の DNA の膜への吸着や構造転移には、数十 μm スケールの空間内に拘束されることが重要な要素であることが示唆された。

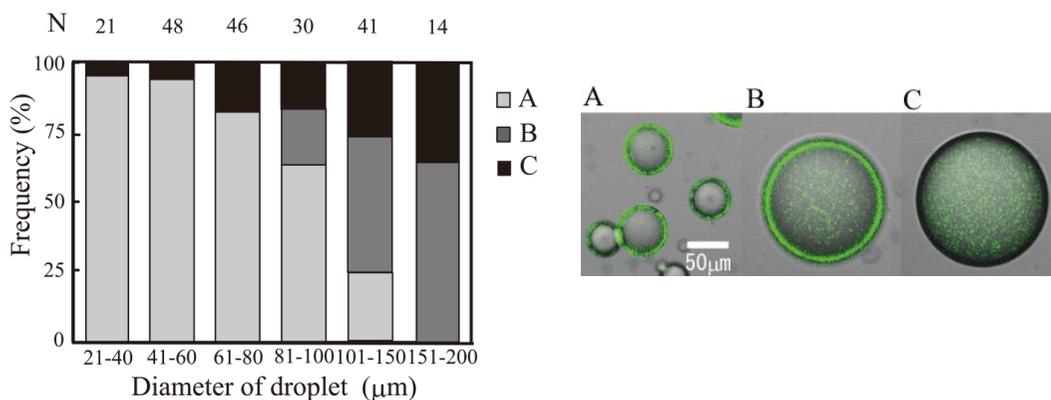


Fig. 8. PE ベシクルサイズと DNA の分布の状態

A : すべての DNA が膜表面に吸着

B : 水相中と膜表面に分布

C : すべての DNA が水相中に分布

第六節 DNA の長さや分布との相関

Mg²⁺ 10 mM 溶液条件下、T4 DNA (166 kbp) と linearized plasmid DNA (6 kbp) をそれぞれ 40~60 μm のベシクル中に封入した結果を Fig. 9 に示す。DOPE ベシクル中に封入したところ、T4 DNA はリン脂質膜表面に分布し(a)、plasmid DNA は溶液中に分布した(b)。一方、eggPC ベシクル中に封入した DNA は、T4DNA (c)、plasmid DNA (d) 共に溶液中に分布した。

これらの結果から、膜と DNA の相互作用にはリン脂質の種類に加え、DNA の長さも重要なファクターであると考えられる。短い DNA は長い DNA に比べて膜との結合点が少なく、相互作用が小さくなるためと考えられる。また、細胞内においても外部から導入された DNA や短く切断された DNA は、本来の細胞がもっていた DNA とは生体膜との相互作用が異なる可能性が示唆された。

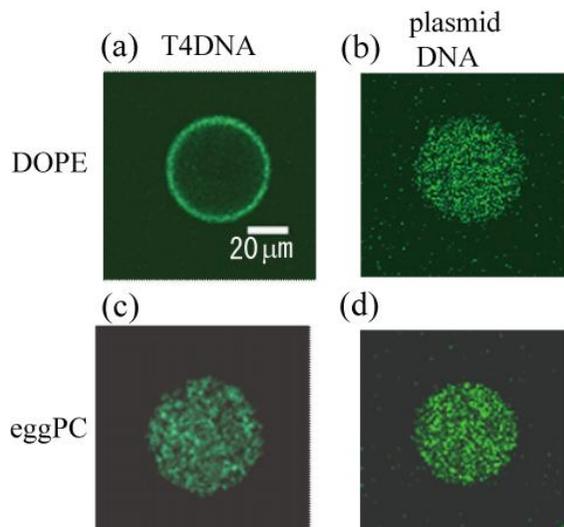


Fig. 9. ベシクル中の DNA の分布

- (a) DOPE ベシクル中 T4DNA (166 kbp)
- (b) DOPE ベシクル中 plasmid DNA (6 kbp)
- (c) eggPC ベシクル中 T4DNA (166 kbp)
- (d) eggPC ベシクル中 plasmid DNA (6 kbp)

考察

Mg^{2+} 存在下、DNA が DOPE で囲まれたマイクロメートルスケールの空間 (ベシクル中) に閉じ込められることで、DNA の膜表面への吸着が誘発されたが、eggPC ベシクル中では吸着は起こらなかった (Fig. 3)。

カチオン性脂質と DNA の相互作用については、これまでに DNA とカチオン性脂質を含んだ膜が結合することが報告されている⁽¹⁵⁻¹⁷⁾。一方 PE や PC などの両性イオン脂質については、DNA と直接的には相互作用しないことが示されているが、 Ca^{2+} および Mg^{2+} といった二価陽イオンと相互作用することにより可能となる⁽¹⁸⁻²³⁾。このような事実から、脂質膜を構成するリン脂質親水基の負に帯電したリン酸基が二価カチオンを介することにより脂質膜が正電荷を帯びると考えられる^(18, 19)。この場合、DNA 分子と PE 膜表面との相互作用はかなり弱くなると考えられる。実際 DNA 分子は一分子内のいくつかのポイントで膜に付着し、ポイント間の他の部分は膜表面から離れていた。また、DNA 分子は 10 mM の Mg^{2+} 存在下でも eggPC 膜に吸着していない (Fig. 3)。以前のレポート⁽²⁰⁻²²⁾を考慮すると、 Mg^{2+} 存在下ベシクルの PC 膜表面の静電的性質は PE 膜と大きく異なることはなく、両方の PE 膜と PC 膜の表面はわずかに正に帯電される。したがって、 Mg^{2+} の PE 膜の Mg^{2+} 濃度は PC 膜の値と比較してそれほど大きくないと想定することができる。しかし今回の実験では、ベシクル中の DNA は PE 膜には吸着するが、PC 膜には吸着しなかった。

また、特定量の縮合剤スペルミンが存在する条件下では、DNA のリン脂質膜への吸着に伴い DNA 分子が折り畳まれた凝縮状態から膜表面上で広がった構造へと高次構造転移を起こした (Fig. 6, Fig. 7)。また、大きなベシクル中に閉じ込められた DNA 分子は水相に分布する傾向がある (Fig. 8) という実験結果は、このシステムで微妙なバランスが働いていることを示唆している (Fig. 8)。

熱力学的解析によると、吸着 (閉じ込められた三次元空間内から二次元表面上) による DNA 分子の並進エントロピーの損失が、マイクロスケール

空間内に閉じ込められた DNA 分子の立体構造の動作を決定する重要な要素であることを示唆している。このような環境下 (ベシクル中) においては、DNA 分子が膜に吸着することによる並進エントロピーの損失は、膜とのインタラクションによる自由エネルギーの利得 (凝縮状態と膜面に吸着して引き伸ばされた状態の自由エネルギーの差) に匹敵する。そのため、膜表面の静電気力そして、閉じ込められた体積のわずかな違いが吸着が起こるか起こらないかを決定する要因となると考えられる。すなわち、スペルミンや Mg^{2+} 濃度、ベシクルサイズ、DNA の長さなどにより、DNA の存在状態が容易に影響を受けるものと考えられる。

第七節 ベシクル中の DNA の転写活性に対するリン脂質膜の影響

リン脂質に囲まれた μm スケールの環境が DNA の機能発現 (転写活性) に与える影響について検証するために、ベシクル中で転写反応を起こし RNA 合成量を測定した。

水相には第一節と同じ転写反応溶液 (T4 DNA、0.25 mM ATP, GTP, CTP, 10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl) に MgCl_2 5~20 mM、転写活性を蛍光測定するための UTP- γ AmNS を加えた。最後に *E.coli* RNA ポリメラーゼを加えそれぞれ DOPE ベシクル、eggPC ベシクル^{*}に封入し 37°C で 3 時間反応させた。コントロールとして、溶液中(チューブ内)で反応させた試料を DOPE ベシクル中に封入した。UTP- γ AmNS 法では RNA 合成量に比例して蛍光強度が強くなるため、それぞれのベシクルを共焦点蛍光顕微鏡により撮影して蛍光強度を測定した。ベシクルの赤道面上に焦点をあわせて撮影し、円の中心部(2/3 半径)の蛍光強度を測定した (Fig. 10)。

その結果、DOPE ベシクル中では溶液中と比較して RNA 合成量(転写反応量)は 1/3 程度に抑えられ、eggPC ベシクル中では、溶液中と差は認められなかった。DOPE ベシクル中では DNA が膜表面に吸着したことが、転写活性が抑えられる要因になったと考えられる。

今回の実験で扱ったベシクルの直径 30~110 μm の範囲ではサイズによる違いは確認されなかった。しかし、第一章 Fig. 8 の実験結果から、100~200 μm のベシクルではサイズの影響が表れると予測される。

^{*}eggPC 単体では、ベシクルが球形の形状を保つのが困難であったため、ここでは代わりに eggPC/DOPE 混合ベシクルを用いた。eggPC/DOPE 混合ベシクル中の DNA の状態は、eggPC ベシクル中と同じであることを確認した。

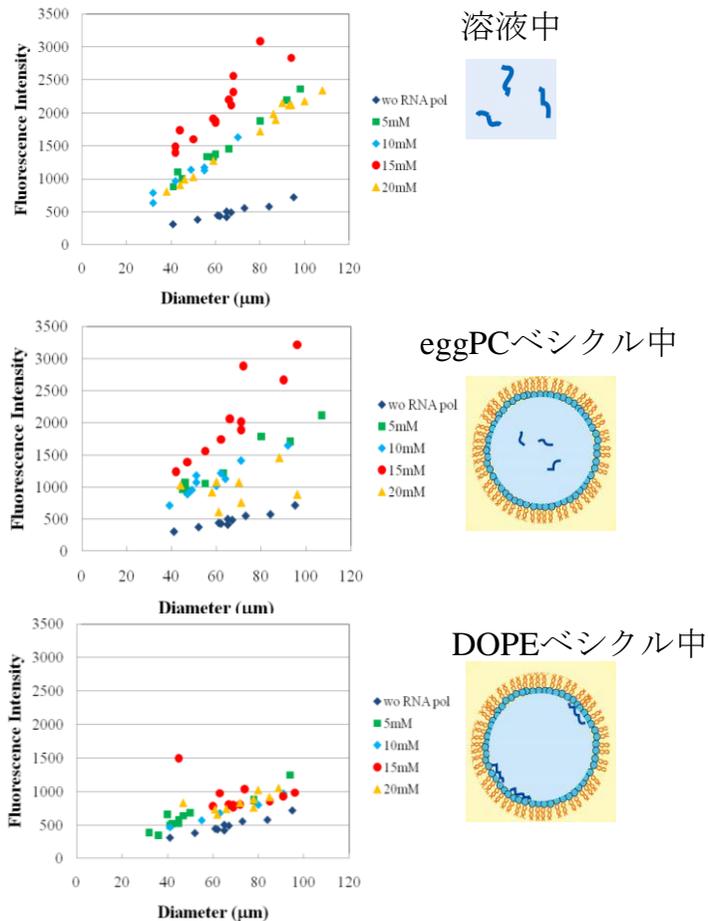


Fig. 10. 溶液中、eggPC ベシクル中^{*}、および DOPE ベシクル中の転写反応量

グラフの縦軸は蛍光強度(RNA 合成量)、横軸はベシクルの直径(30~110 μm)を示す。各グラフのひし形の点(蛍光強度 500 付近に位置)は、RNA ポリメラーゼを加えておらず転写反応が起こっていないコントロールを示している。その他 Mg²⁺ 5, 10, 15, 20 mM の条件下で RNA 合成量を測定した。溶液中およびベシクル中の DNA の状態を模式図に示す。

小括

DNA は、DOPE ベシクル中では Mg^{2+} 存在下で膜表面に吸着した。さらに Mg^{2+} 10_mM、スぺルミン存在下の水溶液中では凝縮構造をとっていた DNA が、同条件のベシクル中では PE 膜に吸着して膜上で引き伸ばされた状態へと構造転移を起こした。また、このような DNA と PE 膜との相互作用およびそれに伴う DNA 高次構造転移はベシクルサイズに依存することが明らかとなった。さらに、ベシクル中で DNA が溶液中と異なる高次構造をとることにより、転写活性にも影響が現れることが確認された。

Fig. 4 に示した、DOPE ベシクル中で 4 つの状態 (コイルで水相中に分布、コイルで膜表面に分布、凝縮状態で水相中に分布、コイルで膜表面に分布 (バルク中では凝縮状態をとる条件)) をとる λ zap II DNA (43 kbp) について、RNA 合成反応の有無を調べた結果が報告された⁽²⁴⁾。それによると、コイル状態の DNA からは水相中、膜表面いずれも合成された RNA が確認され、凝縮状態では RNA は確認されないと報告されており、今回の実験で得られた結果とも矛盾しない。

第一章の結論

細胞は、様々な種類の大きな分子、小さな分子を内封し、様々な反応が起こるマイクロメートルスケールの閉じられた空間である。これらの分子反応のほとんどは高分子複合体の形成と Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NTP といった小さい分子が高分子に結合することによって進む。それらの分子反応の特性や駆動力、細胞内で起こっている法則を明らかにするために、バルク中だけでなく細胞サイズの空間で実験することは有効であると考えられる。

過去 10 年間広範囲にわたって開発されてきた単一の生体細胞の研究は⁽²⁵⁻²⁷⁾、これらの分子反応の細胞サイズの特性を決定する一つの方法である。近年もう一つ、実験的に簡単な細胞モデルを再構築し、細胞環境における分子反応を再構築するアプローチも行われている⁽⁸⁻¹⁴⁾。これらのベシクルは、様々なタンパク質と生化学反応成分⁽¹⁴⁾ をカプセル化するためにも使用することができる。本研究で使用したアプローチ、細胞サイズのベシクルを用いて細胞環境における分子イベントを研究することは、生きた細胞システムの特性の新たな洞察やより深い理解につながると考えられる。

第二章 リン脂質二重膜の相分離に伴う DNA の高次構造転移

細胞膜は様々な種類のリン脂質、グリセロール、コレステロールから構成されている。膜内でのこれらの脂質の分布は一様ではなく、ラフトなど様々なマイクロドメインが動的に形成されることが明らかになっている⁽²⁸⁻³¹⁾。ラフト構造上では細胞分子反応などが行われ、表面細胞と細胞内膜の重要な要素である⁽³²⁻³⁴⁾。

ここでは、飽和アシル鎖・不飽和アシル鎖を持つリン脂質とコレステロールの三種類の分子から形成される GUV ($\geq 1 \mu\text{m}$) を使用した。2つのマイクロスケールのドメインの相分離により、飽和リン脂質が豊富な液体無秩序相 liquid-disordered phase (L_d)と、不飽和リン脂質とコレステロールが豊富な液体秩序相 liquid-ordered phase (L_o)が形成される⁽³⁵⁻³⁸⁾。膜上で別の相が共存した GUV は、細胞膜の機能の中でも不均一構造の役割を研究するためのモデルとしての役割を果たす。本研究では細胞膜の組成を模倣して、ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、コレステロールから構成された GUV を作成し、長い DNA 分子と膜の相互作用における GUV の相分離の影響を調べた。

GUV は水和法⁽³⁹⁾により作成し、構成成分は DOPC、DOPE または DPPE (dipalmitoylphosphoethanolamine)、コレステロール(chol)とした。GUV のドメイン構造を明らかにするため、 L_d 相に分布する Rhodamine-DOPE (headgroup に蛍光標識)を加えた^(37,40)。

第一節 三成分から構成されるリポソームの調製

<DOPC/DOPE/chol、DOPC/DPPE/chol>

水和法により、DOPC/DOPE/chol、および DOPC/DPPE/chol から構成される 2 種類の GUV を調製し、それぞれの GUV について、共焦点蛍光顕微鏡により室温で観察した(Fig. 11)。GUV のドメイン構造を明らかにするために、 L_d 相に分布する Rhodamine-DOPE を加えている。DOPC/DOPE/chol から成る GUV は液体無秩序相 (L_d)一相となり、DOPC/DPPE/chol から成る GUV は不飽和リン脂質 DOPC が豊富な L_d 相と飽和リン脂質 DPPE とコレステロールが豊富な液体秩序相 (L_o) の 2 つのドメインに相分離した。

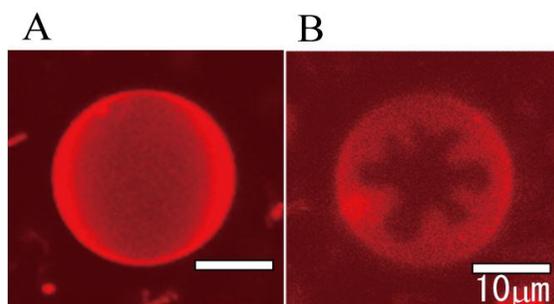


Fig. 11. 三成分混合リポソーム

A; DOPC/DOPE/cholesterol 3:3:3.5 B; DOPC/DPPE/chol 3:3:3.5

第二節 膜の相分離と T4 DNA の吸着

第一節で作成した二種類の DOPC/DOPE/choI、DOPC/DPPE/choI の三成分系リポソーム溶液 (Fig. 11) に、YOYO-1 で染色した T4 DNA と Mg^{2+} (0 mM, 2.5 mM) を加え、リポソームのリン脂質膜の状態と DNA の分布を共焦点蛍光顕微鏡により観察した (Fig. 12)。

Mg^{2+} 0 mM の条件下では、いずれのリポソーム溶液中においても DNA の膜への吸着は確認されなかった。 Mg^{2+} 2.5 mM では、室温で三成分が均一相となるリポソーム(DOPC/DOPE/choI)では、DNA の吸着は確認されなかった。一方、室温で二相に分離するリポソーム(DOPC/DPPE/choI)では、DPPE の豊富な L_o 相にのみ DNA が吸着した。

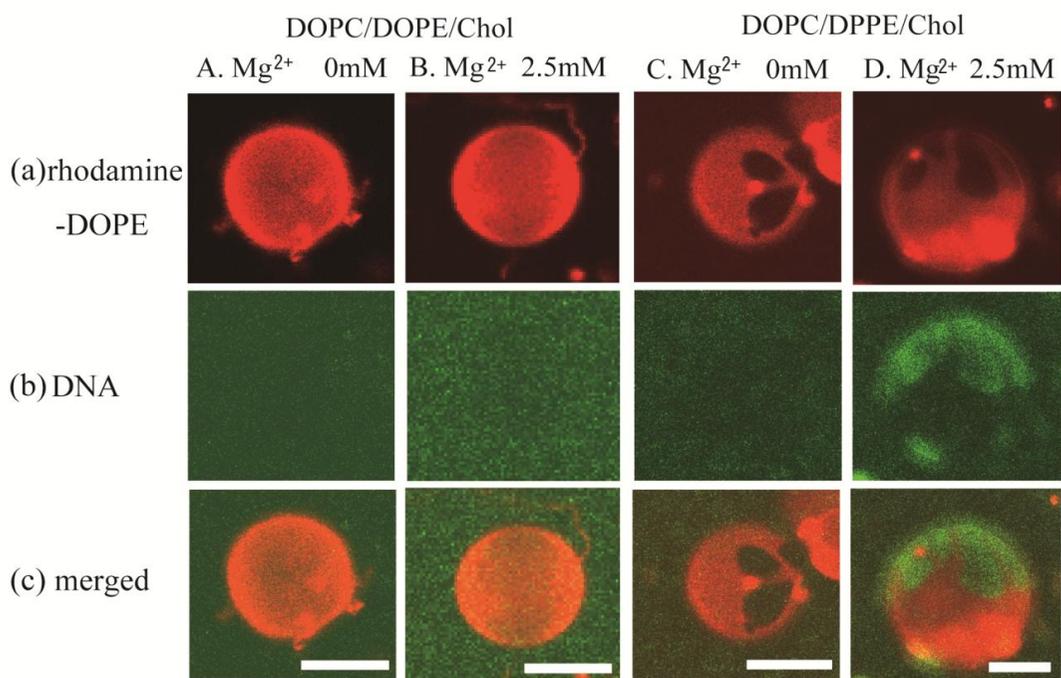


Fig. 12. GUV の相分離と DNA の吸着

A, C Mg²⁺ 0 mM, B, D Mg²⁺ 2.5 mM

(a) Rhodamine-DOPE : Ld 相を示す

(b) DNA : YOYO-1 で染色

(scale bar 5 μm)

第三節 GUV の相分離と T4 DNA の高次構造

<DNA の一分子観察>

DOPC/DPPE/chol のリポソーム溶液に Mg^{2+} 2 mM, スペルミン 150 μ M 存在下、凝縮状態の T4 DNA 分子を加えて観察した結果を示す。

Fig. 13 では、スペルミン存在下、溶液中と DOPC/DPPE/chol GUV 上の個々の T4 DNA 分子をリアルタイム(33 ms/frame)で観察した。T4 DNA 分子の蛍光顕微鏡画像と、蛍光強度の 3D 画像を示す。左側の凝縮した DNA 分子は溶液中でブラウン運動をしており、この DNA 分子の蛍光強度は非常に高い (Fig. 13a, b)。画像の右側は、GUV の表面に広がった状態で吸着した三分子である。これら三分子の DNA は蛍光強度が低い。さらに、溶液中と GUV 上の DNA 分子それぞれ 20 分子以上について蛍光強度と長さを計測した (Fig. 13d)。

溶液中で観察したすべての DNA 分子 (25 分子) はすべて、密に折りたたまれた状態で長さは短く ($0.7 \pm 0.2 \mu$ m)、蛍光強度は高かった (1.1 ± 0.53)。溶液中の DNA 分子はブラウン運動により非常に早く動いており (Fig. 13a)、左側の DNA 分子は 10 フレーム (0.33 s) ほどしか画面上に現れなかった。フォーカスが完全には合わないにも関わらず蛍光強度は非常に高いことから、DNA が非常に高密度な状態であることを示している。一方、GUV 上の DNA 分子は、バルク中の DNA 分子に比べて長く、また平均蛍光強度は低く明らかに異なっていた。溶液中の DNA は密に凝縮されていたが、GUV 上の DNA 分子は、非凝縮または部分的凝縮状態であった。このため DNA の長さには幅がある。これらの結果から、溶液中では、T4 DNA はスペルミンにより凝縮構造をとっているが、膜表面に吸着することにより高次構造転移を起こし引き伸ばされた構造をとることが明らかとなった。

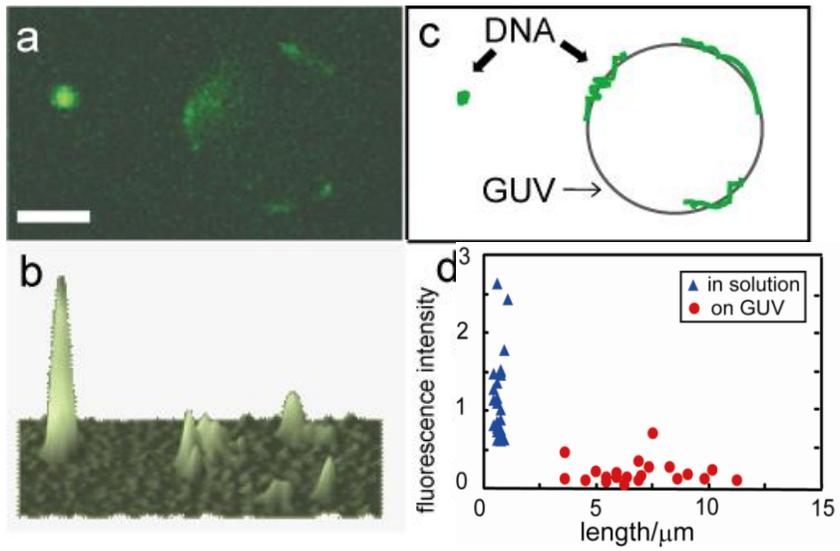


Fig. 13. a : T4 DNA の蛍光顕微鏡画像 (scale 5 μm) b : 蛍光強度を3Dで示した図 c: 模式図 左: 溶液中に存在する DNA、右 GUV と、GUV の膜上に吸着した DNA d: 溶液中と GUV 上に存在する DNA 位置分子の長さ と 蛍光強度との相関

小括

DNA は、DOPC/DOPE/chol が均一に分布した GUV に吸着せず溶液中に存在する。一方、DOPC/DPPE/chol から成る GUV で膜の相分離が起こり DPPE の多い L_0 ドメインが形成されると、DNA は広がった状態で DPPE の多い L_0 ドメインに吸着した。

DNA の構造は、共存するリン脂質二重膜の相状態に依存するリン脂質の集合状態に影響を受け、リン脂質膜の相分離が起こり、表面電荷密度が高い DPPE に富む L_0 相が出来た時、表面に Mg^{2+} が配置し、DNA が膜に吸着したと考えられる。さらに溶液中でスペルミンにより凝縮した構造をとっていた DNA も膜に吸着すると引き伸ばされた構造へと転移した (Fig. 14)。

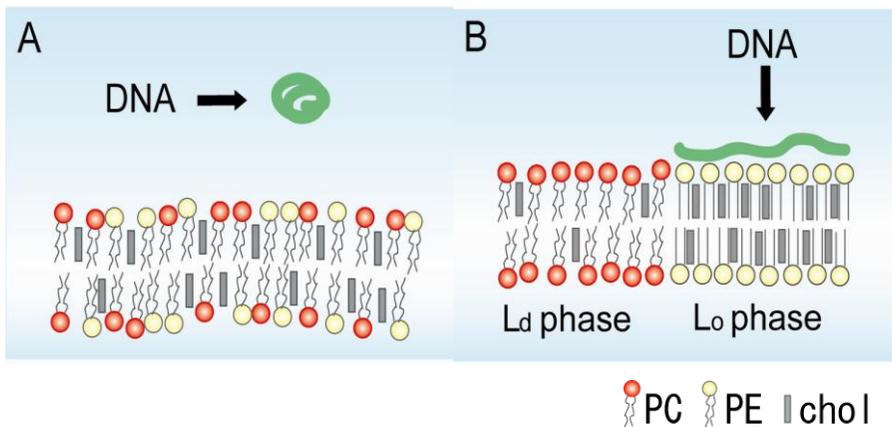


Fig. 14. DOPC/DOPE/chol および DOPC/DPPE/chol GUV における DNA 存在状態の概念図

A : 三成分が均一に分布した膜とグローブール状態で溶液中に分布する DNA、B : 二相に分離した膜と、DPPE 相に吸着して引き伸ばされた DNA

第二章の結論

負に帯電したセミフレキシブルポリマーである長いDNA分子($\geq 20-30$ kbp) は、ポリアミンのような縮合剤の影響により、大きな密度変化を伴う構造転移 (coil \leftrightarrow folded 密におりたたまれた状態) を起こす。ところがリン脂質二重膜小胞であるGUVとMg²⁺が共存すると、スペルミンにより溶液中では密に凝縮されていたDNAも、DPPEドメイン上では膜表面に吸着して引き伸ばされた構造をとった。同様の現象が、第一章で示したDOPE単層膜で覆われたベシクルでも観察されている。

Mg²⁺もしくはCa²⁺存在下、両性リン脂質膜へのDNAの吸着は、イオン吸着により引き起こされる。つまり、リン脂質の親水基のリン酸基にMg²⁺またはCa²⁺が付くと正に荷電するようになり、負に帯電するDNAを引き寄せる⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾。そしてDNAが膜に付いた状態を十分安定にするために、膜表面に広がった構造をとると考えられる。

膜表面の電荷密度は、DNA-膜の相互作用を決める重要な因子である。Lo相ではリン脂質の密度がLd相より高くなるため、表面の電荷密度が高くなると考えられる。また、第一章でも述べたように、リン脂質膜で囲まれたベシクル中の実験で、T4 DNAはMg²⁺存在下eggPC膜には吸着せず、DOPE膜に吸着した。これと同じように、PEの親水基 (エタノールアミン基) はPC (コリン基) よりも小さいため、Mg²⁺存在下DNAはPE膜により強く結合すると考えられる。相分離により膜上に高い表面電荷密を持つ領域 (DPPEを多く含むLoドメイン) が出来、その静電的相互作用により膜上にDNA分子を吸着させる。さらにDNAと膜のインタラクションはDNA-膜接触領域が増加することで強くなり、エントロピー的にも有利であるため、DNA分子は膜表面に引き伸ばされた状態となると考えられる。

タンパク質のような高分子が、膜上で酸性リン脂質に結合することで相分離を誘発することについては、すでに多数報告されている⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾。一方、今回の結果はアシル基の構成が違うために起こった相分離が電荷密度の異なる領域を生み出すことを示している。そして、膜の相分離に伴うリン脂質の集合状態の変化は、ドメインへのDNAの吸着と膜上での引き伸ばしを

誘発した。リン脂質膜の相分離と膜表面のDNAの関係についてのこの研究結果は、高分子と膜のインタラクションだけでなく、細胞膜のヘテロドメイン構造の役割についてより深い知見を与えることになると考えられる。

結論

生物の状態は細胞内の状態により決定され、細胞内小器官や生体分子は必要に応じて異なる位置に配置されている。最近の研究により、DNA についても核内での配置と転写活性との間に関連があることが分かってきた。膜近傍での DNA の転写活性制御については、ヒストンなどの関連についても明らかになってきているが、まだそのメカニズムは完全には解明されていない。モデル細胞系を用いて行った本研究により、膜表面に DNA が存在することで DNA の状態・活性が異なるといった新たな知見が得られた。これらの研究と、本研究を発展させたベシクル中でのタンパク合成に関する研究で得られた知見が、膜と生体分子の相互作用、リン脂質膜に囲まれた微小空間内での反応の特異性の解明にとどまらず、細胞内で起こる反応の解明につながることを期待する。

第一章 第二節から第五節の内容は、*Biophys. J* 誌⁽⁵¹⁾に掲載された。

第二章 第一節から第三節の内容は、*J. Phys. Chem. Lett.* 誌⁽⁵²⁾に掲載された。

実験の部

転写反応の測定

試薬

T4 GT7 DNA、は株式会社ニッポンジーン、東京より、UTP- γ AmNS は Molecular Probes より、ATP、GTP、CTP (リボヌクレオシド三リン酸セット)は Roche Diagnostics より購入した。

KCl 2 M、MgCl₂ 1 M は Ambion より、DTT と *E. coli* RNA polymerase は Epicentre Biotechnologies より購入した。

RNA 合成量の測定

氷冷下で、10 mM Tris-HCl、100 mM KCl、10 mM MgCl₂、0.1 mM ATP、GTP、CTP、0.05 mM UTP- γ AmNS、10 mM DTT、0.1 μ g/mL T4 GT7 DNA、となるように溶液を調製し、*E. coli* RNA polymerase (1 U/ μ L) 3.0 μ L を加えた。蛍光分光光度計(HITACHI F-7000)に入れて、転写反応溶液は 37°C に保ち、0 分、15 分、30 分、60 分、90 分後の蛍光スペクトルを以下の条件で測定した。

Ex: 330 nm, Em: 350-600 nm

Slit width(Ex/Em):5 nm/2.5 nm

PMT gain: 400 V

最後に *E. coli* RNA polymerase を加えた直後に溶液をそれぞれのベシクルに封入し、溶液中(チューブ内)、DOPE ベシクル中、eggPC ベシクル中の条件で、37°C 3 時間反応させた。反応後、溶液中で反応させたサンプルも DOPE ベシクル中に封入した。UTP- γ AmNS 法では RNA 合成量に比例して蛍光強度が強くなるため、それぞれのベシクルを共焦点蛍光顕微鏡により撮影して蛍光強度を測定した。ベシクルの赤道面上に焦点をあわせて撮影し、円の中心部 (2/3 半径) の蛍光強度を測定した。

T4 DNA の顕微鏡観察・測定

試薬

YOYO-1 は Molecular Probes Inc., Eugene, OR (USA) より、スペルミン、ミネラルオイル、Tris-HCl 緩衝液、メタノール、クロロホルムはナカライテスク株式会社（京都）より購入した。1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine(DOPE)、L- α -lysophosphatidylcholine from chicken egg (eggPC) は Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL より購入した。

T4 DNA の蛍光染色

T4 DNA をインターカレーター型の蛍光色素 YOYO-1 で標識した (T4 DNA/YOYO-1 = 10:1 (bp))。T4 DNA と YOYO-1 の混合溶液を 4°C で保管した。共焦点顕微鏡による観察では、T4 DNA の濃度を 1 μ g/L、蛍光顕微鏡による一分子観察では 0.1 μ g/L (=0.15 μ M) とした。溶液条件は、10 mM Tris-HCl (pH7.4)、KCl 100 mM、MgCl₂ 0 mM 又は 10 mM、スペルミン 0 mM 又は 1.5 mM とした。

T4 DNA を内封したベシクル (water in oil droplet) の作製

リン脂質 DOPE または eggPC を有機溶媒 (クロロホルム : メタノール = 3:1) に溶かし、10 mM とした。DOPE 溶液 10 mM をダーラム管に入れ、窒素ガスで溶媒を揮発させフィルム状にし、その後真空で一時間以上置いた。フィルム状の DOPE に終濃度が 1 mM になるようにミネラルオイル 100 μ L を加え、50°C で 1 時間以上の超音波処理によりリン脂質を分散させた。DOPE/ミネラルオイル 100 μ L に T4 DNA 溶液 5 μ L を添加した後、ピペッティングによりベシクル (water in oil droplet) を作製した。

観察

水溶液中の DNA 観察では、DNA のガラスへの吸着を防ぐため、スライドガラスは 500°C で 20 分焼いたものを使用した。30×40 mm スライドガラスに両面テープを貼り、18×18 mm スライドガラスを乗せ、チャンバーを作成した。スペルミン、DNA のガラス面への吸着を防ぐために、横の隙間からサンプルの DNA 水溶液を入れて共洗いした後、DNA 水溶液を入れて観察した。

w/o ベシクルの観察では、ベシクルの吸着が起こりにくいシリコンコートスライドガラス (20 mm×20 mm ; マツナミ) を用いた。シリコンコートスライドガラスに両面テープを貼り、上に 18 mm×18 mm スライドガラスを乗せ、チャンバーを作成した。横の隙間から w/o ベシクルの入ったミネラルオイルを入れて観察した。

共焦点レーザースキャン顕微鏡による観察

ZEISS LSM510 (対物レンズ×40) により観察した。撮影条件を以下に示す。

励起光 : アルゴンレーザー 488 nm、ダイクロイックミラー : HFT 488、
蛍光フィルター : BP 505-550

超高感度カメラを用いた蛍光顕微鏡下の T4 DNA の一分子観察

T4 DNA の高次構造を観察するために、高感度カメラ (EM-CCD、EB-CCD) により、蛍光顕微鏡 (Nikon TE2000-U) ×100、フィルター (GFP-3035B-NTE) を用いて T4 DNA 一分子の蛍光のリアルタイム画像を撮影した。

DNA の長軸長の測定

溶液中

溶液中の T4 DNA にピントが合って 5 秒以内に、Long-axis length が最も長く見えるところで長さを測定した(Fig. 15)。

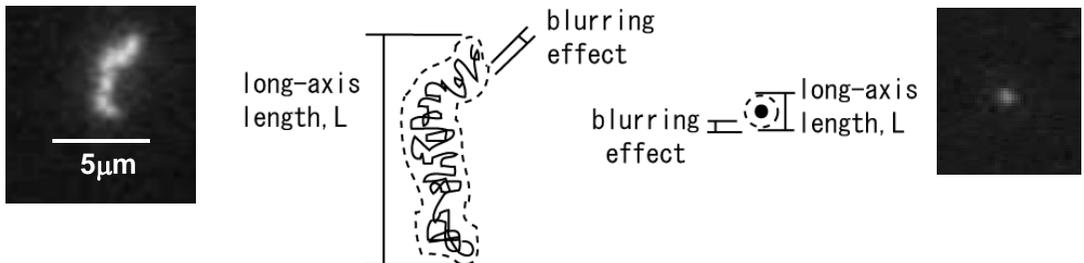


Fig. 15. 溶液中の T4 DNA の長軸長の測定法

ベシクル中

直径 20~60 μm の DOPE ベシクルを観察してベシクル中の T4 DNA の分布と長さを計測した。水相中に分布する DNA は溶液中と同様に計測した。膜面上に分布する DNA のうち、ベシクルの上面と底面に存在する T4 DNA については、全体像が確認できる分子の長さを計測した。赤道面上の T4 DNA については、両端が確認できる分子の長さを計測した(Fig. 16)。

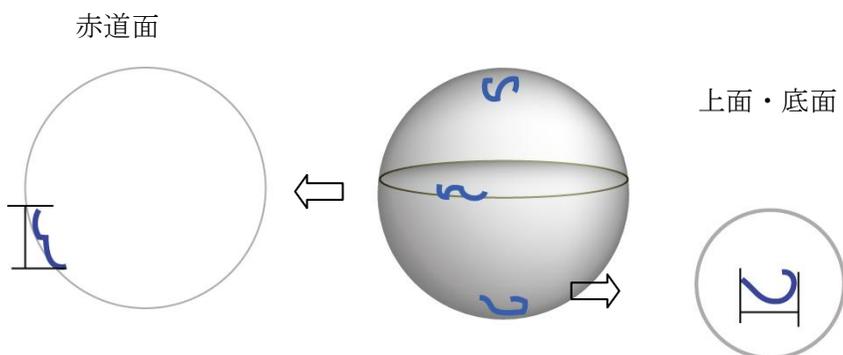


Fig. 16. ベシクル中の T4 DNA の長軸長の測定

相図の作成

スペルミン (0, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 1.8 mM) 、 Mg^{2+} (0, 2, 3, 5, 7, 10 mM) の条件で実験を行った。直径 20 ~ 60 μm の DOPE ベシクルを蛍光顕微鏡により観察し、それぞれの条件で 20 個以上のベシクルについて DNA の状態と分布を調べて相図を作成した。

ベシクルサイズの効果の評価

スペルミン 1.5 mM 、 Mg^{2+} 10 mM の条件で実験を行った。直径 20 ~ 200 μm の DOPE ベシクルを共焦点蛍光顕微鏡により観察し、DNA の分布を評価しグラフを作成した。

プラスミド DNA との比較

T4 DNA もしくは linearized plasmid DNA pTRI-Xef (Ambion より購入) を、 Mg^{2+} 10 mM の条件でベシクルに封入して実験を行った。直径 20 ~ 40 μm の DOPE または eggPC ベシクルを共焦点蛍光顕微鏡により観察し、DNA の分布を確認した。

リポソームの作製

Dioleoylphosphatidylcholine (DOPC)、Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE)、Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE)、cholesterol (chol)、MgCl₂、KCl は和研薬株式会社、大阪より購入した。蛍光リン脂質 rhodamine-DOPE は Avanti Polar Lipid Inc., Alabaster, AL (USA) より購入した。

共焦点顕微鏡による観察では、T4 DNA 1 μg/L (= 1.5 μM)、MgCl₂ 0 mM 又は 2.5 mM とした。蛍光顕微鏡による一分子観察では T4 DNA 0.1 μg/L (= 0.15 μM)、MgCl₂ 2 mM、スペルミン 150 μM とした。

DOPE、DOPC、DPPE、コレステロールを有機溶媒(クロロホルム：メタノール=3:1)に溶かし、10 mM とした。それぞれの溶液から① (DOPC/DOPE/コレステロール 3 μL/3 μL/3.5 μL) ② (DOPC/DPPE/コレステロール 3 μL/3 μL/3.5 μL) をダーラム管に入れ、窒素ガスで溶媒を揮発させフィルム状にし、その後真空で一時間以上置いた。フィルム状の DOPE に milliQ water 1mL を加え、①37°Cで3時間 ②65°Cで2時間 水和しリポソームを作成した。

共焦点顕微鏡による観察

2つのレーザー(488 nm (YOYO-1)、543 nm (rhodamine)) をサンプルにあって、rhodamine-DOPE (a) と T4 DNA (b) の画像を撮影した。焦点はそれぞれの GUV の上表面に合わせ、slice 5.5 μm で撮影した。

蛍光顕微鏡による一分子観察

T4 DNA 分子の蛍光画像は EM-CCD カメラで撮影した (33 ms/frame)。焦点は GUV の赤道面上とした。

引用文献

1. Bloomfield V.A., Condensation of DNA by multivalent cations: consideration on mechanism. *Biopolymers*, **31**, 1471-1481 (1991).
2. Bloomfield V.A., DNA condensation. *Curr. Opin. Struct. Biol*, **6**, 334-341 (1996).
3. Marquet R., Houssier C., Thermodynamics of cation-induced DNA condensation. *J. Biomol. Struct. Dyn*, **9**, 159-167 (1991).
4. Wisdom J., Baldwin R.L., Monomolecular condensation of DNA induced by cobalt hexamine. *Biopolymers*, **22**, 1595-1620 (1983).
5. Yoshikawa K., Controlling the higher-order structure of giant DNA molecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **52**, 235-244 (2001).
6. Yamada A., Kubo K., Nakai T., Tsumoto K., Yoshikawa K., All-or-none switching of transcriptional activity on single DNA molecules caused by a discrete conformational transition. *Appl. Phys. Lett.*, **86**, 223901 (2005).
7. Luckel F., Kubo K., Tsumoto K., Yoshikawa K., Enhancement and inhibition of DNA transcriptional activity by spermine: A marked difference between linear and circular templates. *FEBS Lett.*, **579**, 5119-5122 (2005).
8. Luisi P.L., Ferri F., Stano P., Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften*, **93**, 1-13 (2006).
9. Murtas G., Kuruma Y., Bianchini P., Diaspro. A., Luisi P.L., Protein synthesis in liposomes with a minimal set of enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, **363**, 12-17 (2007).
10. Chen I.A., Salehi-Ashtani K., Szostak J.W., RNA catalysis in model protocell vesicles. *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 13213-13219 (2005).
11. Hanczyc M.M., Fujikawa S.M., Szostak J.W., Experimental models of primitive cellular compartments: Encapsulation, growth, and division. *Science*, **302**, 618-622 (2008).
12. Kita H., Hosoda K., Sunami T., Ichihashi N., Matsuura T., Tsukada K., Urabe I., Yomo T., Replication of genetic information with self-encoded replicase in liposomes. *Chem. Bio. Chem.*, **9**, 2403-2410 (2008).

13. Pautot S., Frisken B.J., Weitz D.A., Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir*, **19**, 2870-2879 (2003).
14. Hase M., Yamada A., Hamada T., Baigl D., Yoshikawa K., Manipulation of cell-sized phospholipid-coated microdroplets and their use as biochemical microreactors. *Langmuir*, **23**, 348-352 (2007).
15. Koltover I., Wagner K., Safinya C.R., DNA condensation in two dimensions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 14046-14051 (2000).
16. Matulis D., Rouzina I., Bloomfield V., Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: Role of electrostatics and hydrophobicity. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 7331-7342 (2002).
17. Tsukahara S., Suehara M., Fujiwara T., In situ measurements of the dynamics of single giant DNA molecules at the toluene-trioctylamine/water interfaces by a total internal reflection fluorescence microscopy. *Langmuir*, **24**, 1673-1677 (2008).
18. Lis L.J., Lis W.T., Parsegian V.A., Rand R.P., Adsorption of divalent cations to a variety of phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry*, **20**, 1771-1777 (1981).
19. Herbette L., Napolitano C., McDaniel R., Direct Determination of the calcium profile structure for dipalmitoyllecithin multilayers using neutron diffraction. *Biophys. J.*, **46**, 677-685 (1984).
20. McManus J.J., Radler J.O., Dawson K.A., Phase behavior of DPPC in a DNA-calcium-zwitterionic lipid complex studied by small-angle X-ray scattering. *Langmuir*, **19**, 9630-9637 (2003).
21. McLoughlin D., Dias R., Lindman B., Cardenas M., Nylander T., Dawson K., Miguel M., Langevin D., Surface complexation of DNA with insoluble monolayers. Influence of divalent counterions. *Langmuir*, **21**, 1900-1907 (2005).
22. Gromelski S., Brezesinski G., DNA condensation and interaction with zwitterionic phospholipids mediated by divalent cations. *Langmuir*, **22**, 6293-6301 (2006).

23. Tresset G., Cheong W.C.D., Lam Y.M., Role of multivalent cations in the self-assembly of phospholipid-DNA complexes. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 14233-14238 (2007).
24. Tsuji A., Yoshikawa K., ON-OFF switching of transcriptional activity of large DNA through a conformational transition in cooperation with phospholipid membrane. *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 12464-12471 (2010).
25. Ying L., Single molecule biology: coming of age. *Mol. Biosyst.*, **3**, 377-380 (2007).
26. Joo C., Balci H., Ishitsuka Y., Buranachai C., Ha T., Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *Ann. Rev. Biochem.*, **77**, 51-76 (2008).
27. Kim S.A., Heinze K.G., Schwille P., Fluorescence correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Methods*, **4**, 963-973 (2007).
28. Edidin M., Lipid Microdomains in Cell Surface Membranes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **7**, 528-532 (1997).
29. Lagerholm B., Weinreb A., Jacobson G. E., Tompson K., Detecting N., Microdomains in Intact Cell Membranes. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **56**, 309-336 (2005).
30. Cheng Z. J., Singh R. D., Marks D. L., Pagano R. E., Membrane Microdomains, Caveolae, and Caveolar Endocytosis of Sphingolipids. *Mol. Membr. Biol.*, **23**, 101-110 (2006).
31. Day C. A., Kenworthy A. K., Tracking Microdomain Dynamics in Cell Membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1788**, 245-253(2009).
32. Simons K., Gerl M. J., Revitalizing Membrane Rafts: New Tools and Insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 688-699 (2010).
33. Garcia-Marcos M., Dehaye J.-P., Marino A., Membrane Compartments and Purinergic Signalling: the Role of Plasma Membrane Microdomains in the Modulation of P2XR-Mediated Signalling. *FEBS.*, **276**, 330-340 (2009).
34. He H.-T., Marguet D., T-Cell Antigen Receptor Triggering and Lipid Rafts: A Matter of Space and Time Scales. *EMBO Rep.*, **9**, 525-530 (2008) .

35. Korlach J., Schwille P., Webb W. W., Feigenson G. W., Characterization of Lipid Bilayer Phases by Confocal Microscopy and Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 8461-8466 (1999).
36. Scherfeld D., Kahya N., Schwille P., Lipid Dynamics and Domain Formation in Model Membranes Composed of Ternary Mixture of Unsaturated and Saturated Phosphatidylcholines and Cholesterol. *Biophys. J.*, **85**, 3758-3768 (2003).
37. Veatch S. L., Keller S. L., Separation of Lipid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol. *Biophys. J.*, **85**, 3074-3083 (2003).
38. Veatch S. L., Keller S. L., Seeing Spots: Complex Phase Behaviour in Simple Membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1746**, 172-185 (2005).
39. Hup H. H., Zimmermann U., Ringsdorf H., Preparation of Large Unilamellar Vesicles. *FEBS Lett.*, **140**, 254-256 (1982).
40. Baumgart T., Hunt G., Farkas E. R., Webb W. W., Feigenson G. W., Fluorescence Probe Partitioning Between Lo/Ld Phases in Lipid Membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1768**, 2182-2194 (2007).
41. Lis L. J., Lis W. T., Parsegian V. A., Rand R. P., Adsorption of Divalent Cations to a Variety of Phosphatidylcholine Bilayers. *Biochemistry*, **20**, 1771-1777 (1981).
42. Herbert L., Napolitano C., McDaniel R., Direct Determination of the Calcium Profile Structure for Dipalmitoyllecithin Multilayers Using Neutron Diffraction. *Biophys. J.*, **46**, 677-685 (1984).
43. Gromelski S., Brezesinski G., DNA Condensation and Interaction with Zwitterionic Phospholipids Mediated by Divalent Cations. *Langmuir*, **22**, 6293-6301 (2006).
44. Tresset G., Cheong W. C. D., Lam Y. M., Role of Multivalent Cations in the Self-Assembly of Phospholipid-DNA Complexes. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 14233-14238 (2007).

45. Mengistu D. H., Bohinc K., May S., Binding of DNA to Zwitterionic Lipid Layers Mediated by Divalent Cations. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 12277-12282 (2009).
46. Mitraskos P., Macdonald P. M., Domains in Cationic Lipid Plus Polyelectrolyte Bilayer Membranes: Detection and Characterization via ²H Nuclear Magnetic Resonance. *Biochemistry*, **35**, 16714-16722 (1996).
47. Radler J. O., Koltover L., Salditt T., Safinya C. R., Structure of DNA-Cationic Liposome Complexes: DNA Intercalation in Multilamellar Membranes in Distinct Interhelical Packing Regimes. *Science*, **275**, 810-814 (1997)
48. Heimburg T., Angerstein B., Marsh D., Binding of Peripheral Proteins to Mixed Lipid Membranes: Effect of Lipid Demixing upon Binding. *Biophys. J.*, **76**, 2575-2586 (1999).
49. Hammond A. T., Heberle F. A., Baumgart T., Barid B., Feigenson G. W., Crosslinking a Lipid Raft Component Triggers Liquid Ordered-Liquid Disordered Phase Separation in Model Plasma Membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **102**, 6320-6325 (2005).
50. Liu A. P., Fletchler D. A., Actin Polymerization Serves as a Membrane Domain Switch in Model Lipid Bilayers. *Biophys. J.*, **91**, 4064-4070 (2006).
51. Kato A., Shindo E., Sakaue T., Tsuji A., Yoshikawa K., Conformational Transition of Giant DNA in a Confined Space Surrounded by a Phospholipid Membrane. *Biophys. J.*, **97**, 1678-1686 (2009).
52. Kato A., Tsuji A., Yanagisawa M., Saeki D., Juni K., Morimoto Y., Yoshikawa K., Phase Separation on a Phospholipid Membrane Inducing a Characteristic Localization of DNA Accompanied by Its Structural Transition. *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 3391-3395 (2010).

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学研究科教授 従二和彦先生に、深甚なる謝意を表します。

さらに、本論文の作成にあたり、御校閲と御教示を賜りました城西大学薬学部教授 白幡晶先生、並びに城西大学薬学部教授 関 俊暢先生に深謝の意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました京都大学理学研究科教授 吉川研一先生に、深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました城西大学薬学研究科教授 森本雍憲先生に、深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導並びに御鞭撻を賜りました、ICORP 研究員 辻明彦氏に、深甚なる謝意を表します。

本研究に際し、有益な御意見並びに御指導を賜りました、京都大学理学部 佐藤祐子博士、柳澤実穂博士、九州大学助手 坂上貴洋先生 に深く感謝いたします。

本研究に際し、有益な御意見並びに御指導を賜りました、城西大学薬学部、城西大学薬学部助教 上田秀雄先生、城西大学薬学部助手 木村聡一郎先生に深く感謝いたします。

終始御指導並びに御激励を賜りました、京都大学理学研究科 進藤恵理氏、佐伯大輔氏に、深く感謝の意を表します。

結果の検討方法についてアドバイスをいただいた、有賀隆行氏、久保康児氏、根岸真紀子氏、さらに、理論について議論していただいた、樋口祐次氏、実験・解析に関してアドバイスをいただいた、牧田直子氏、荒木須美子氏、下川直史、山中透氏、現象についてともに議論していただいた、山田彩子氏、菱田真史氏、野村慎一郎氏、瀧ノ上正浩氏、宮崎牧人氏に深く感謝いたします。

また、吉川研究室秘書 古本真希子氏、藤田和代氏、坂上佳子氏に厚く御礼申し上げます。

京都大学理学研究科吉川研究室諸氏に、厚く御礼申し上げます。

また、様々な面でサポートいただきました三木涼太郎氏、村田勇氏に深く感謝いたします。

城西大学病院薬剤学講座諸氏に厚く御礼申し上げます。

本研究は、平成 21 年度 笹川科学研究費助成 学術研究部門（研究番号 21-339）の助成を受けています。