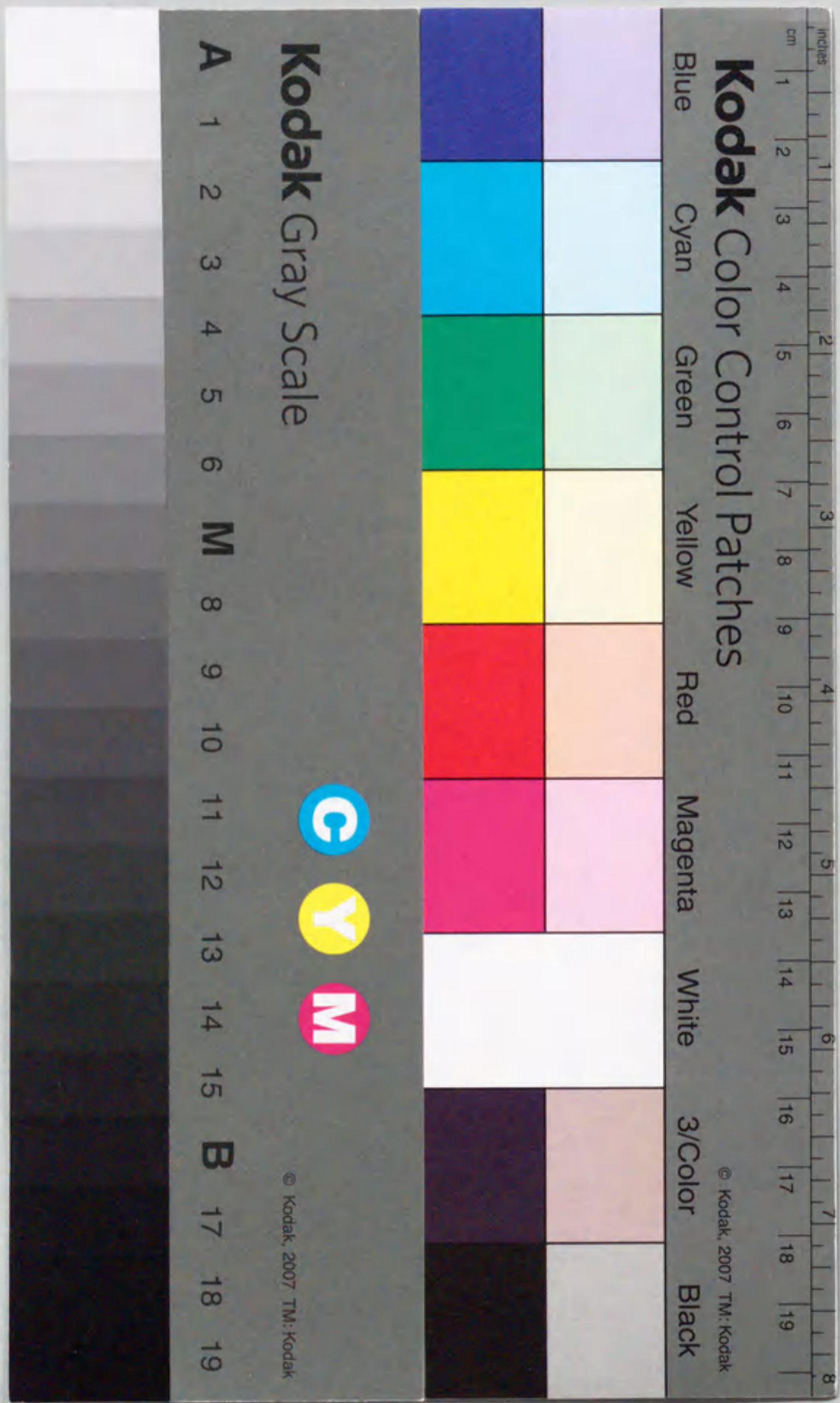


ゲル電気泳動における
DNAの分子ダイナミクス

増渕 雄一



ゲル電気泳動における
DNAの分子ダイナミクス

増渕 雄一

目次

1 序論	1
1.1 はじめに	1
1.2 定常電場ゲル電気泳動による DNA の分離	3
1.3 非定常電場ゲル電気泳動	5
1.3.1 非定常電場法の開発	5
1.3.2 二次元非定常電場法	5
1.3.3 一次元非定常電場法	7
1.3.4 非定常電場法の分離機構	8
1.4 反共鳴現象	8
1.4.1 反共鳴現象とは	8
1.4.2 反共鳴現象と分離	12
1.5 ゲル電気泳動の物理的パラメータ	12
1.5.1 粗視化	12
1.5.2 長さ	13
1.5.3 エネルギー	14
1.6 従来の理論モデル	15
1.6.1 定常電場ゲル電気泳動への適用	15
1.6.2 (I) Ogston 領域	15
1.6.3 (II) レプテーション領域	16
1.6.4 (III) バイアスレプテーション領域	17
1.6.5 従来の理論の限界	18
1.7 蛍光顕微鏡法による研究	18
1.7.1 蛍光顕微鏡の原理と特徴	18
1.7.2 ゲル電気泳動の研究	19
1.7.3 コイル・グロビュール転移の研究	19
1.7.4 DNA のブラウン運動の研究	21
1.8 計算機シミュレーションによる研究	21
1.8.1 Deutsch のシミュレーション	21
1.8.2 その他のモデルによるシミュレーション	22
1.9 反共鳴現象の機構の研究	23
1.9.1 定常電場での伸縮運動との関係	23
1.9.2 反共鳴現象の種々のモデル	23
1.10 本論文の目的	24

2	定常電場での直接観察	27
2.1	はじめに	27
2.2	実験	28
2.2.1	試料	28
2.2.2	装置	28
2.2.3	測定条件	31
2.3	画像解析	32
2.4	結果：DNA分子の周期的運動	36
2.5	考察	43
2.5.1	伸縮運動と泳動速度	43
2.5.2	伸縮運動の周期性	43
2.5.3	非定常電場ゲル電気泳動との関係	46
2.6	付録：モデル関数の相関関数	47
3	定常電場での伸縮運動の数理解析	49
3.1	はじめに	49
3.2	モデル	51
3.3	結果	54
3.3.1	微弱電場の場合	54
3.3.2	強電場の場合	55
3.4	考察：実験との比較	63
3.4.1	運動の特徴的時間	63
3.4.2	多数の引っかかりを考慮したモデルの拡張	63
4	バイアス正弦電場での直接観察	67
4.1	はじめに	67
4.2	実験	68
4.2.1	試料	68
4.2.2	装置	69
4.2.3	測定条件	70
4.3	解析	70
4.4	結果	71
4.4.1	平均値	71
4.4.2	時間発展	73
4.4.3	相関関数	78
4.5	考察	78
5	計算機シミュレーションによる運動の解析	81
5.1	はじめに	81
5.2	モデル	82
5.2.1	運動方程式	82
5.2.2	ポテンシャル	83
5.2.3	パラメーター	85
5.2.4	シミュレーションの方法	85

5.3	結果：定常電場	87
5.4	結果：バイアス正弦電場	90
5.4.1	平均値	90
5.4.2	時間発展	94
5.4.3	相関関数	94
5.5	キンクの挙動	102
5.5.1	キンクの定義	102
5.5.2	定常電場でのキンクの挙動	103
5.5.3	バイアス正弦電場でのキンクの挙動	104
5.6	DNAの形態変化と泳動速度	107
5.6.1	伸びた状態に見られる差異	107
5.6.2	ずれ長さ d	107
5.6.3	バイアス正弦電場でのDNAの挙動の説明	109
5.6.4	Kotakaらの実験との比較	114
5.6.5	他の研究の描像との比較	114
6	まとめ	117
	謝辞	121
	参考文献	123

第 1 章

序論

■ 1.1 はじめに

電気泳動 (electrophoresis) とは一般にイオンや高分子電解質が、電場によって水溶液中を動くことをいう。泳動の速度は、泳動分子の分子量、形、電荷量、溶媒、電場の強さなどによる¹⁾。同種のモノマー単位からなる線状の電解質高分子では、水溶液中の電気泳動速度は分子量にはよらないことが知られている²⁻⁴⁾。このような高分子を分離するにはゲル中を電気泳動させればよいことが 1960 年代のはじめに発見された¹⁾。この技術をゲル電気泳動法 (gel electrophoresis) と呼ぶ¹⁾。

ゲル電気泳動法は DNA の分離に広く用いられている。図 1.1 に一般的なゲル電気泳動装置の模式図を示す⁵⁾。注入用の穴 (injection hole) に様々な分子量の DNA 断片が混ざった溶液を注入する。緩衝溶液中では DNA は強くマイナスに帯電しているため、電極から電場を印加すると DNA は正極の方向へ泳動していく。泳動速度は分子量の小さな分子ほど速く、大きな分子ほど遅いため、数時間の泳動の結果、分子量毎に DNA があつまったパターン (DNA バンド) がゲル上にできる。未知の試料を泳動させる際には、あらかじめ分子量の分かっている DNA 断片 (DNA マーカー) を同時に泳動させる。DNA マーカーとの泳動速度の比較によって、試料の分子量分布を求めることができる。DNA の精製を目的とする場合には、電気泳動による分離の後、必要な DNA バンドのあるゲルの部分を切り出す。適当な条件を選べば、わずか 1bp (bp: ベースペア、DNA の塩基対数) しか差がない DNA 断片でも分離できるので、この操作によって長さのそろった DNA を得ることができる^{1,5,6)}。

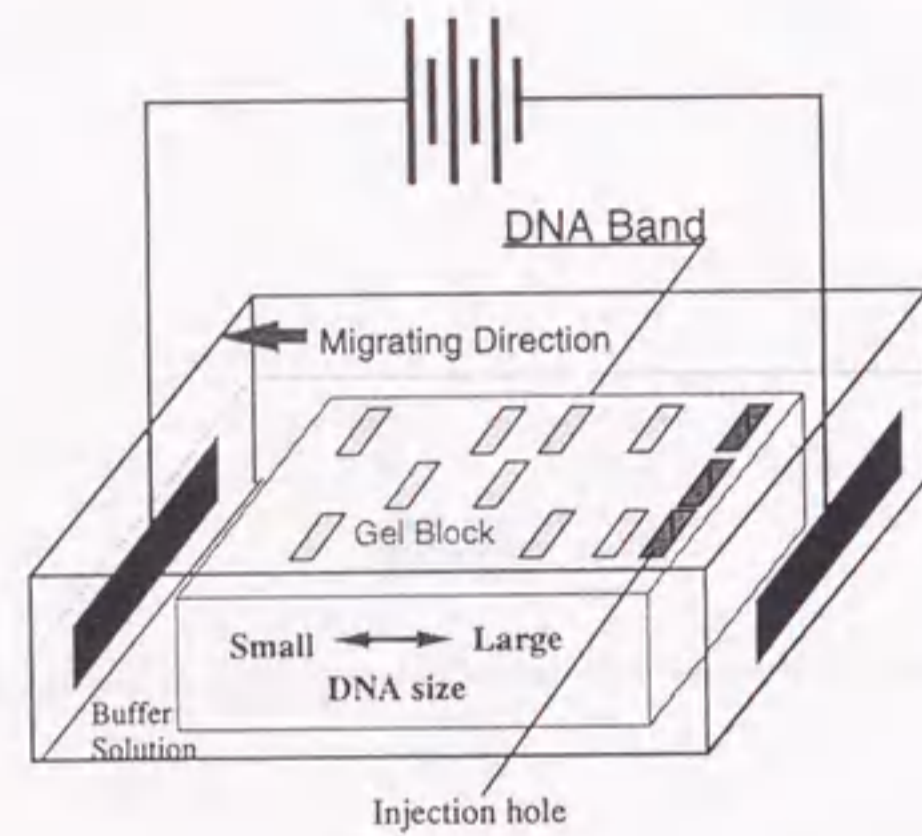


Figure 1.1 Schematic representation of an apparatus of gel electrophoresis for separation of DNA fragments.

ゲル電気泳動法による DNA の分離は広い分野に応用されている^{1,5-11)}。例をあげれば遺伝子診断¹¹⁾、DNA 配列の読みとり¹¹⁾、DNA 鑑定¹¹⁾、生物の種の判定⁹⁾、などがある。これらの例では、DNA 配列の解析を行なうためにゲル電気泳動が用いられる。

遺伝子診断を例に、ゲル電気泳動による DNA 配列の解析について説明する。病気は染色体 DNA の配列の特定の部位が正常な人と違う場合に発症する。この配列の違いは染色体 DNA を酵素で切断した時、DNA 断片の長さの違いとなって現れる。図 1.2 はゲル電気泳動による DNA の分離パターン¹⁰⁾の例である。分離パターンを解析すると DNA 断片の長さの違いを知ることができ、これから DNA の配列の違いを解析することができる。

このような応用では数十 kbp から数 Mbp の巨大な DNA を、高速かつ高分解能で分離しなくてはならない。しかし単純な定常電場ゲル電気泳動装置では 20kbp 程度の DNA しかなかった¹⁾。改良を施された装置でも 10Mbp の DNA の分離に数日間を要する⁶⁾。より巨大な DNA の分離、例えば人間の細胞中の染色体の選別では数十 Mbp の DNA を分離しなくてはならないが、これは現在のゲル電気泳動の技術ではできない。これまでのゲル電気泳動の装置や分離の条件、分離の手法の改良は、実験的・経験的に行なわれてきた¹⁾。高効率な分離のための技術的ブレークスルーのためには、ゲル電気泳動における

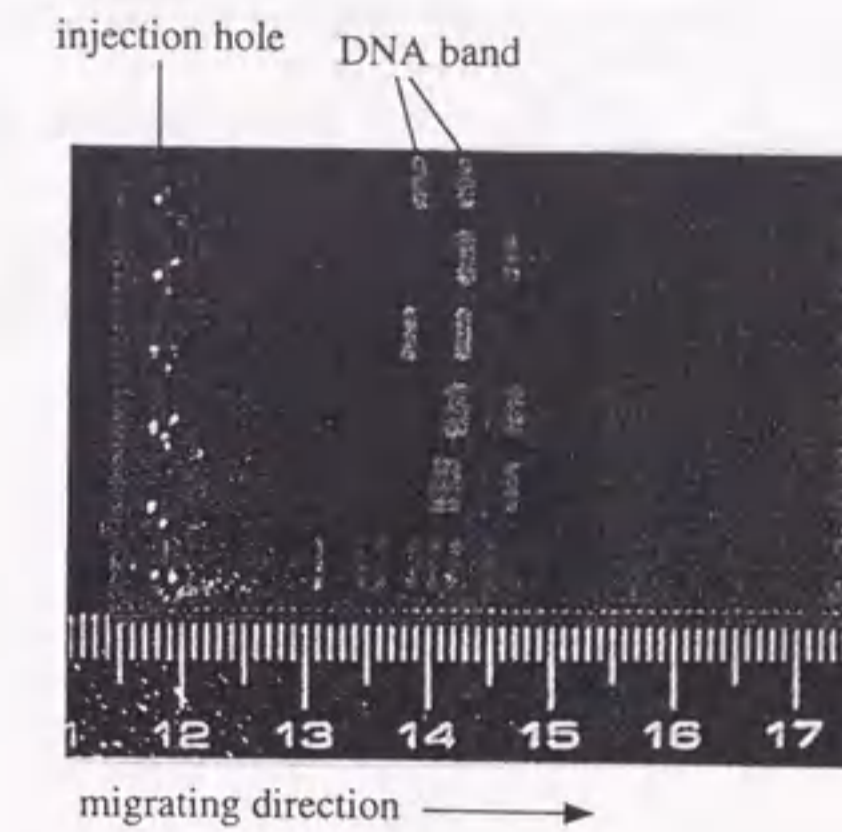


Figure 1.2 An example of the result of gel electrophoretic separation. From Ref.10.

DNA の動きの、分子論的な理解が必要である¹⁴⁾。

本論文では以上のような問題意識に基づき、定常電場ゲル電気泳動¹⁵⁾、非定常電場ゲル電気泳動¹⁶⁾それぞれにおける、DNA 一分子の挙動を研究した。手法として i) 蛍光顕微鏡を用いた直接観察^{17,18)} ii) 理論モデルを使った計算¹⁹⁾ iii) 計算機シミュレーション¹⁶⁾の三つを相補的に用い、様々な角度から巨大 DNA の運動を調べた。結果から DNA の泳動中の形態の変化と泳動速度との関係を考察する。

■ 1.2 定常電場ゲル電気泳動による DNA の分離

図 1.3、1.4 に Kotaka ら²⁰⁾により調べられた定常電場ゲル電気泳動における電気泳動易動度の分子量依存性を示す。電気泳動易動度 (electrophoretic mobility) は以下のように定義される。

$$\mu = \frac{v_x}{E} \quad (1.1)$$

ここで v_x は電場方向への泳動速度、 E は電場強度を示す。電気泳動易動度は DNA の分子量、ゲル濃度、温度、電場強度、イオン強度に依存する²⁰⁻²⁵⁾。図 1.3 は電場強度を、図 1.4 はゲル濃度をそれぞれ変えて調べられている。低分子領域 (図 1.4 と図 1.3 で (I) で示される領

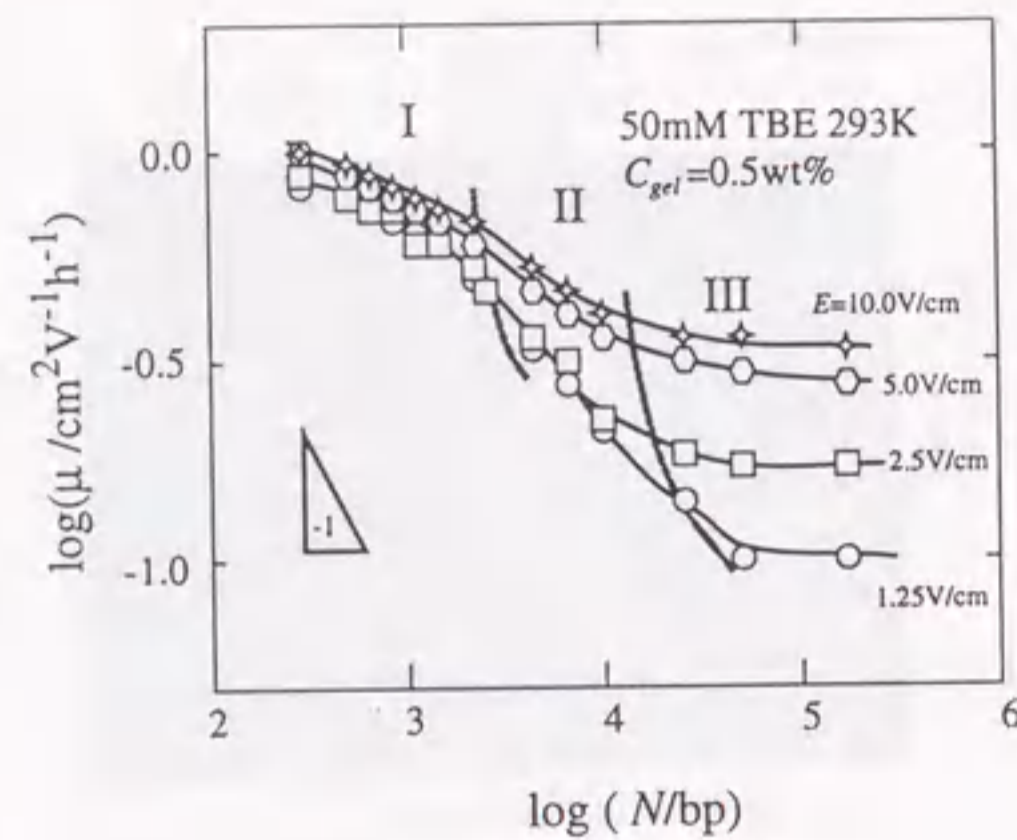


Figure 1.3 Molecular weight dependence of the electrophoretic migration mobility in the steady field gel electrophoresis with various field strength from Ref.20. The divided regions correspond to (I) Ogston regime, (II) reptation regime, and (III) biased reptation regime. The explanation of these regimes is in Sec.1.6.

域)でのDNAの泳動易動度 μ と分子量 N の間には、経験的に

$$\mu = c_1 - c_2 \log N \quad (1.2)$$

の関係があることが知られている⁵⁾。ここで c_1 および c_2 は泳動条件で決まる定数である。

式1.2の関係は数kbp以上のDNAでは成り立たなくなる。数kbpから数十kbpの長さのDNA(図1.4と図1.3で(II)で示される領域)の泳動易動度は近似的に

$$\mu \propto N^{-1} \quad (1.3)$$

とあらわされる。この領域では、電場強度を弱めると高分子量側のDNAの泳動速度が落ち、泳動易動度の傾きが大きくなるので分解能が向上する。またゲル濃度を上げると低分子量側の分解能が向上する。

数十kbp以上の巨大なDNAは図1.4と図1.3の(III)の領域で示されるように泳動速度の分子量依存性が失われるため、定常電場では分離できない。そのような長鎖DNAを分離する場合には非定常電場ゲル電気泳動が用いられる⁶⁾。

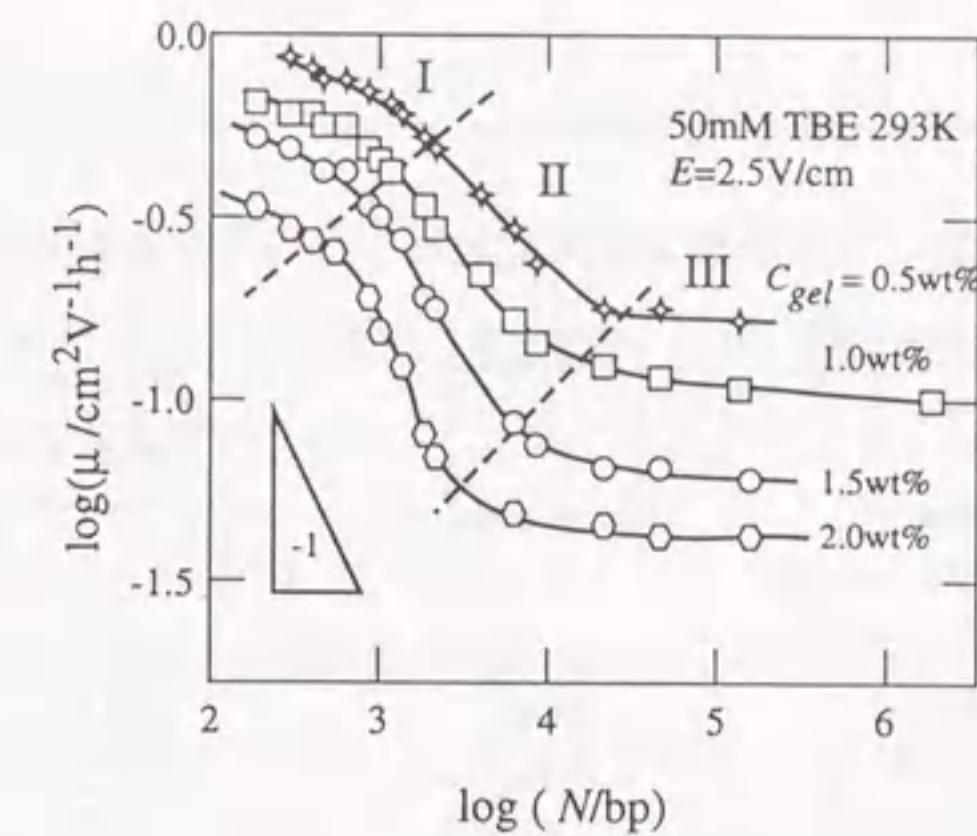


Figure 1.4 Similar with Fig.1.3 with various gel density from Ref.20.

■ 1.3 非定常電場ゲル電気泳動

◇ 1.3.1 非定常電場法の開発

電場の方向を周期的に変える非定常電場法 (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) は、Schwartz と Cantor²⁶⁾によって発明され、ゲル電気泳動のDNAの分離能力を飛躍的に向上させた。定常電場では30kbp程度のDNAまでしか分離できなかったのに対して、非定常電場法は50kbpから2Mbpの分子量の巨大なDNAの分離が可能である。この発明の後、電場を印加する方向、強度、切替のアルゴリズムの改良により、今日までに数多くの非定常電場ゲル電気泳動の装置が開発されてきた(図1.5)。Schwartz と Cantorの非定常電場法は二組の電極をほぼ垂直に配置し、交互に切替えて電場をかける。非定常電場法が、印加する電場を時間的に変化させる方法の総称として使われるために、他の非定常電場法と区別するため交差電場法 (crossed field gel electrophoresis, CFGE) と呼ばれることもある。

◇ 1.3.2 二次元非定常電場法

Schwartz と Cantorの方法を発展させた多くの装置が開発されている。直交に近い角度で電場をかける直交電場法 (orthogonal field alternating gel electrophoresis, OFAGE) は、

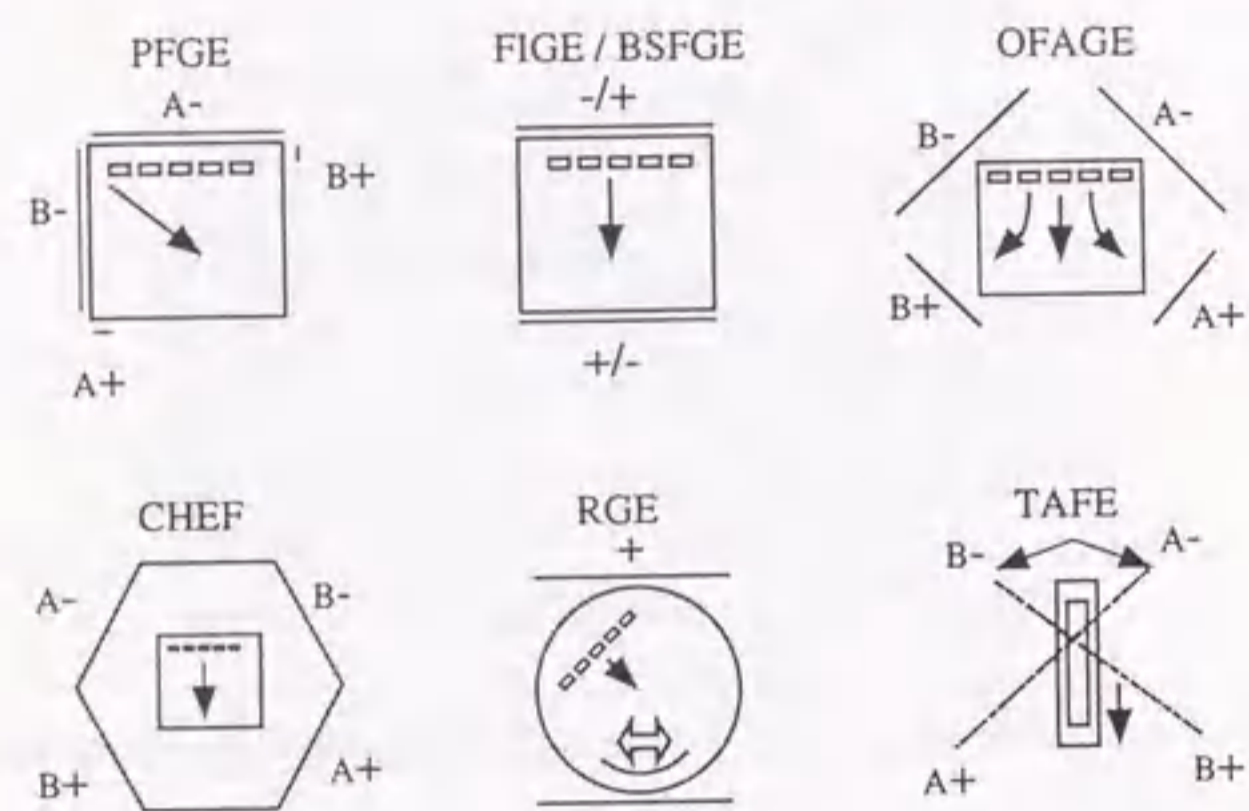


Figure 1.5 Schematic principles of different pulsed-field gel electrophoresis systems. From Ref.12. The field is switched periodically so that either the A or B electrode sets are activated. The explanations are in the text.

各 DNA バンドをより鮮明に分離できる²⁷⁾。直交電場法のシステムを発展させて電場の印加法を工夫した、直交均等電場法 (pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis, PHOGE)²⁸⁾ や、二次パルス電場法 (secondary pulsed-field gel electrophoresis, SPFG)²⁹⁾ といったものもある。直交均等電場法は電場パルスのサイクルのフェイズを二つから四つに増やすことによって電場の場所による不均一をおさえ、DNA バンドのゆがみを少なくした。二次パルス電場法は Zhang ら²⁹⁾ によって開発され、Lai と Birren³⁰⁾ によって性能が詳しく調べられた手法である。通常の電場パルスに二次的な短時間のパルスを加えることによって 0.5Mbp から 10Mbp という広範囲の分子量の DNA の分離を可能にした。

場所による電場の不均一のために生じる DNA バンドのゆがみを解消するために考案されたのは電極固定型均等電場法 (contour clamped homogeneous electric field gel electrophoresis, CHEF)³¹⁾ である。装置は電場を均一にするために電極の配置に工夫が加えられている。この方法は 50kbp から 2Mbp までの DNA の分離に適している。

電場方向ではなくゲルの向きを動かす回転ゲル法 (rotating gel electrophoresis, RGE) は二つのグループが独立に開発した^{32,33)}。円盤状に作ったゲルを緩衝溶液につけ、泳

動軸から ± 55 度の範囲で揺り動かす。動かす周期は分離条件によって変わってくる。このシステムは 10Mbp もの DNA を分離する能力があるが、逆に 100kbp 以下の DNA の分離にはゲルの回転が遅過ぎて効果がない¹²⁾。

直立ゲル交流電場法 (transverse alternating field electrophoresis, TAFE) は垂直に立てたゲルを用いる³⁴⁾。電場は電極固定型均等電場法と同じように印加されるが、電極固定型均等電場法がゲルの広がっている面上で電場を切替えるのに対して、直立ゲル交流電場法ではゲルに対して垂直な面上で電場が切替えられる。このため DNA バンドのゆがみは起こらない。

◇ 1.3.3 一次元非定常電場法

二次元非定常電場法は、電極の配置や電場の制御が複雑なために装置が大がかりなものになる。それに対して一次元非定常電場ゲル電気泳動法は、定常電場で使用する泳動槽を使用でき、電場波形発生器だけを付け加えれば良いため、比較的簡単に装置を作成できる。用いられる電場波形の異なる、種々の方法が考案されている。

反転電場法 (field inversion gel electrophoresis, FIGE) は Carle ら³⁵⁾ によって開発された方法で、電極は定常電場法と同様に一組しかないが、電場を

$$E(t) = \begin{cases} E_0 & nT < t < nT + t_1 \\ -E_1 & nT + t_1 < t < (n+1)T \end{cases} \quad (1.4)$$

のように変化させる。 E_0 と E_1 の値は違う場合も同じ場合もある。また t_1 と T の選び方にも任意性がある。

電場ゼロサム法 (zero integrated field electrophoresis method, ZIFE) は前方と後方に掛ける電場の時間積分が 0 になるようにする方法である³⁶⁾。これによってある長さ以上の DNA は実効的にはほとんど動かなくなり、それ以下の DNA についての分解能が向上する。

後方に印加する電場を 0 とする間欠電場法 (intermittent-field gel electrophoresis, IFGE) は分離性能が反転電場法よりも良いことが知られているが、300kbp をこえる DNA については実用的でないほど長時間電場を切らなくてはならない。これは間欠電場法の分離機構が DNA の緩和を利用したもので、巨大 DNA ほどこの緩和時間が長くなるためだと考えられ

ている³⁷⁾。

Kotaka と Shikata^{20,38-40)}は反転電場法と同様の装置で電場を

$$E(t) = E_b + E_s \sin 2\pi ft \quad (1.5)$$

と変化させる、バイアス正弦電場法 (biased-sinusoidal field gel electrophoresis, BSFGE) を開発し、反転電場法と同等の効果を得られることを示した。彼らはバイアス正弦電場法が反転電場法に対して優位な点として i) 矩形波による高周波成分がなく、DNA の泳動挙動に影響を与える電場周波数を特定できること、ii) 反転電場法に比べて電場のパラメーターが少なく設定が容易であること、などをあげている。

◇ 1.3.4 非定常電場法の分離機構

二次元非定常電場法での DNA 分離の機構は、一般的には次のように理解されている⁵⁾。DNA 分子は泳動中に電場方向に伸びて泳動していると考えられる。電場の方向を変化させる度に DNA は新しい方向へと分子の運動の方向を変化させる。長い分子ほど分子の再配向のための時間がかかる。短い分子は電場方向の変化に短い時間で対応できるが、長い分子は電場方向の変化に対応するために長い時間が必要である。このため両者に泳動速度の差が生じる。分離しようとする DNA のサイズに応じた電場の変動周期を選択することで広い範囲の分子量で分離が可能である。

しかし上に述べた説明は一次元非定常電場法による分離の機構を説明することができない。一次元非定常電場法では次の 1.4 節で述べる反共鳴現象が、分離の機構に深く関わっている。

■ 1.4 反共鳴現象

◇ 1.4.1 反共鳴現象とは

一次元非定常電場法の分離機構を考える上で重要な現象が反共鳴現象である¹³⁾。Heller と Pohl⁴¹⁾は反転電場法で、 λ DNA 多量体と酵母の染色体 DNA の泳動易動度を電場パラメーターを変えながら調べた。図 1.6 は 350~1000kbp の長鎖 DNA の泳動易動度の電場切

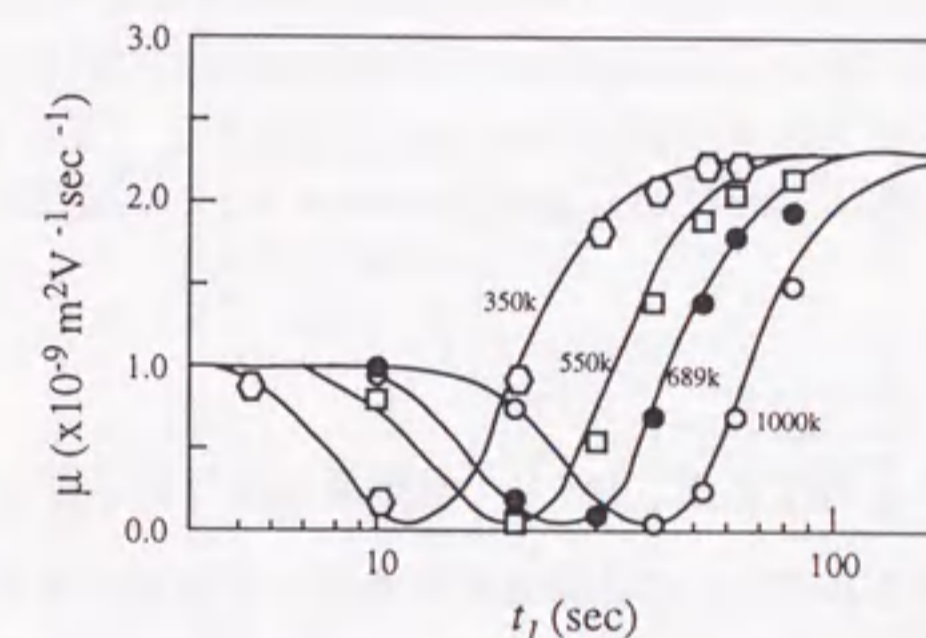


Figure 1.6 The migration mobility of DNA fragments during FIGE from Ref.41. Molecular weight in bp is indicated on each line. The experimental conditions are follows: low melting agarose gel of 1.0wt%, TBE buffer of 50mM, temperature of 291K, the field parameters in Eq.1.4 of $E_0 = E_1 = 5.3V/cm$ and $T = 4t_1/3$.

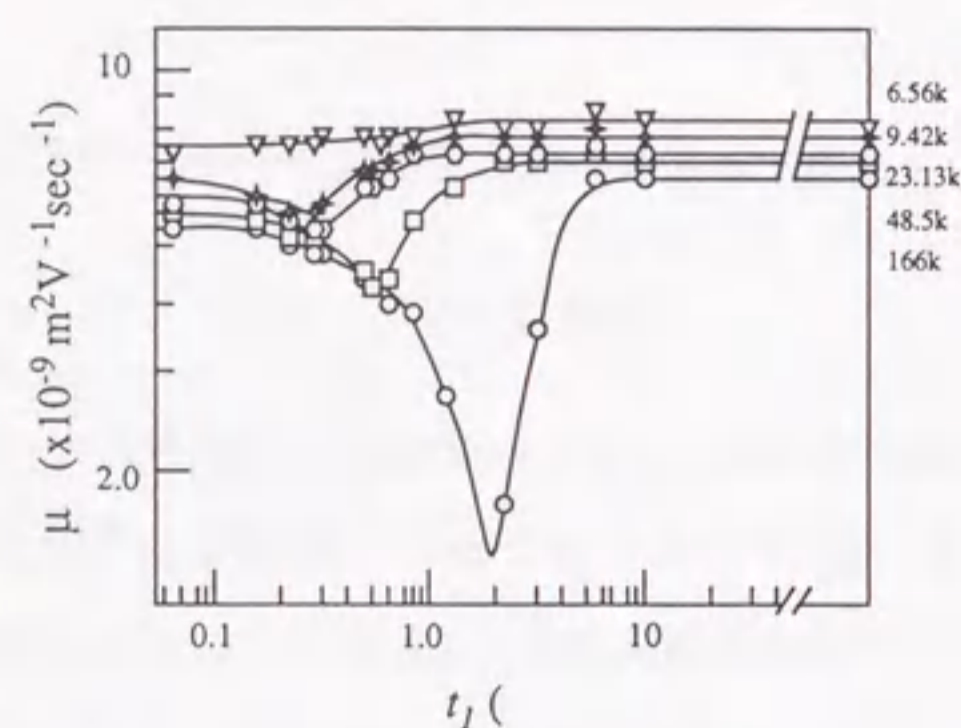


Figure 1.7 The migration mobility of DNA fragments during FIGE from Ref.42. Molecular weight in bp is indicated on the right side of the figure. The experimental conditions are follows: agarose gel of 1.0wt%, TBE buffer of 50mM, temperature of 281K, the field parameters in Eq.1.4 of $E_0 = E_1 = 15.4\text{V/cm}$ and $T = 4t_f/3$.

替え時間依存性を示したものである。DNAの泳動易動度は分子量と電場切替え時間に強く依存して変化し、ある長さのDNAの泳動速度に着目した場合、ある特定の電場切替え時間で極小値をとる。例えば図1.6で1000kbpのDNAは $t_f \approx 40\text{sec}$ 付近で易動度が極小値を示す。この泳動易動度(速度)極小の現象が反共鳴現象である。反共鳴を起こす電場切替え時間はDNAの長さに依存し、長いDNAほど長い電場切替え時間で泳動易動度が極小値をとる⁴¹⁾。

Kobayashiら⁴²⁾はもっと短い、200kbp以下のDNAの反転電場法の下での泳動易動度を測定した。図1.7に泳動易動度の電場切替え時間依存性を示す。極小近傍の泳動易動度の変化の度合は長いDNAほど大きく、6.56kbpの短いDNAでは、もはやはっきりとした泳動易動度の極小が観察されない。

ShikataとKotaka^{20,38-40)}はバイアス正弦電場法で、1kbpから2Mbpの広い長さ範囲のDNAの泳動速度を調べた(図1.8)。電場の形は違っているが反転電場法の場合と同じく反共鳴現象が観察されている。さらにHellerらによって報告された反共鳴条件のDNA長さ依存性、またKobayashiらによって報告された泳動速度カーブのDNA長さによる違い

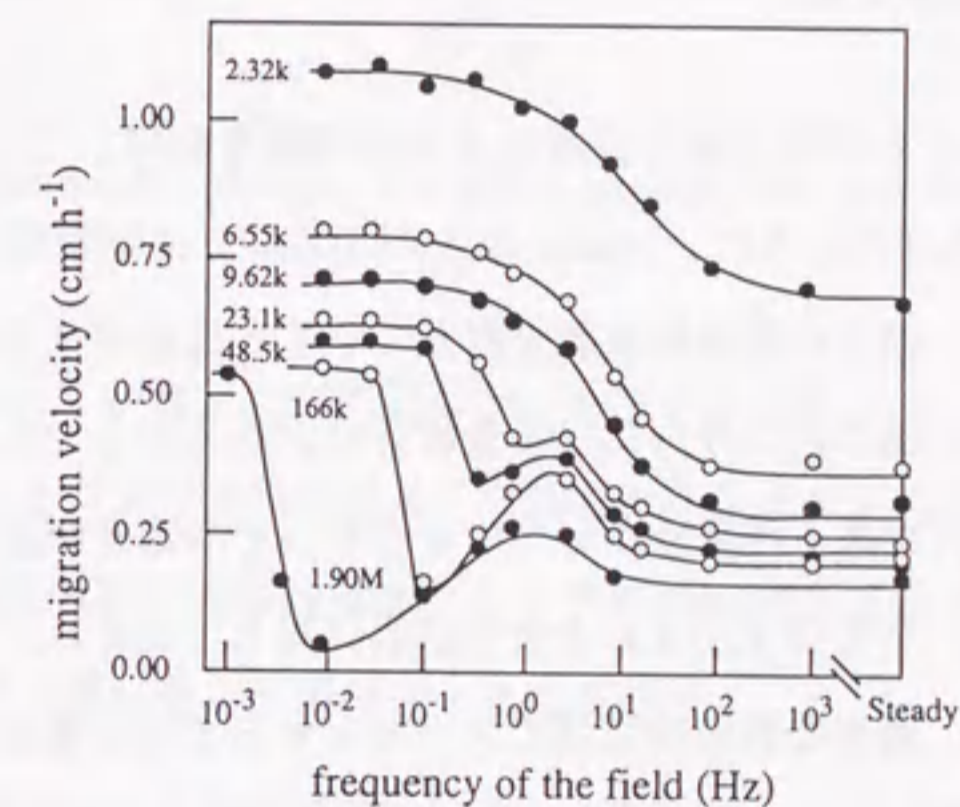


Figure 1.8 The migration velocity of DNA fragments during BSFGE from Ref.38. Molecular weight is indicated on the left end of each line. Other experimental conditions are follows: agarose gel of 1.0wt%, TBE buffer of 50mM, temperature of 293K, the field parameter $E_b = 2.5\text{V/cm}$ and $E_s = 7.5\text{V/cm}$.

が同様に確認できる。Kotaka ら⁴⁰⁾は様々な条件で反共鳴を調べ、それが起きる電場周波数(ピンダウン周波数) f_p のゲル濃度 C_{gel} 、DNA 分子量 N 、電場強度 E_b に対する依存性が式 1.6 になるとした。

$$f_p \propto C_{gel}^{-1} N^{-1} E_b \quad (1.6)$$

さらに E_b と E_s が $E_s > E_b$ の関係にある場合のみ反共鳴が観察され、 f_p は E_s に対する依存性が弱いと報告している。

◇ 1.4.2 反共鳴現象と分離

一次元非定常電場ゲル電気泳動の分離は反共鳴現象を利用して行なわれる。図 1.8 を例に説明する。1.2 節で述べたように、10kbp 以上の DNA では定常電場での泳動速度差が小さいため分離が難しい。適当に電場周波数を落していくと泳動速度差が大きくなり分解能が向上するが、それは反共鳴の起こり方に分子量依存性があるからである。Kotaka ら⁴⁰⁾は回収したい DNA のサイズがある程度分かっているなら、その区分が反共鳴を起こすように電場条件を決めればよく、また巨大 DNA を含む試料に対してはそれぞれの長さの DNA に反共鳴を起こさせるため、適当な周波数領域でスキャンするような電場をかければ良いとしている。

このように反共鳴現象は分離と直接関係するが、それが起きる機構はよく分かっていない。反共鳴現象を含む非定常電場法の分離機構を分子論的に説明するための研究が様々に行なわれている^{12,13)}。本論文も含めて、それらの研究における DNA ゲル電気泳動の取り扱いには次の 1.5 節で述べるスケールの粗視化に基づいている。

■ 1.5 ゲル電気泳動の物理的パラメータ

◇ 1.5.1 粗視化

ゲル電気泳動の分離の機構を理解するには、DNA の挙動を分子論的に理解しなくてはならない。理論的な研究を行なう場合には、DNA は巨大分子であるので適当な粗視化を行なって自由度を落としたモデルを考える。

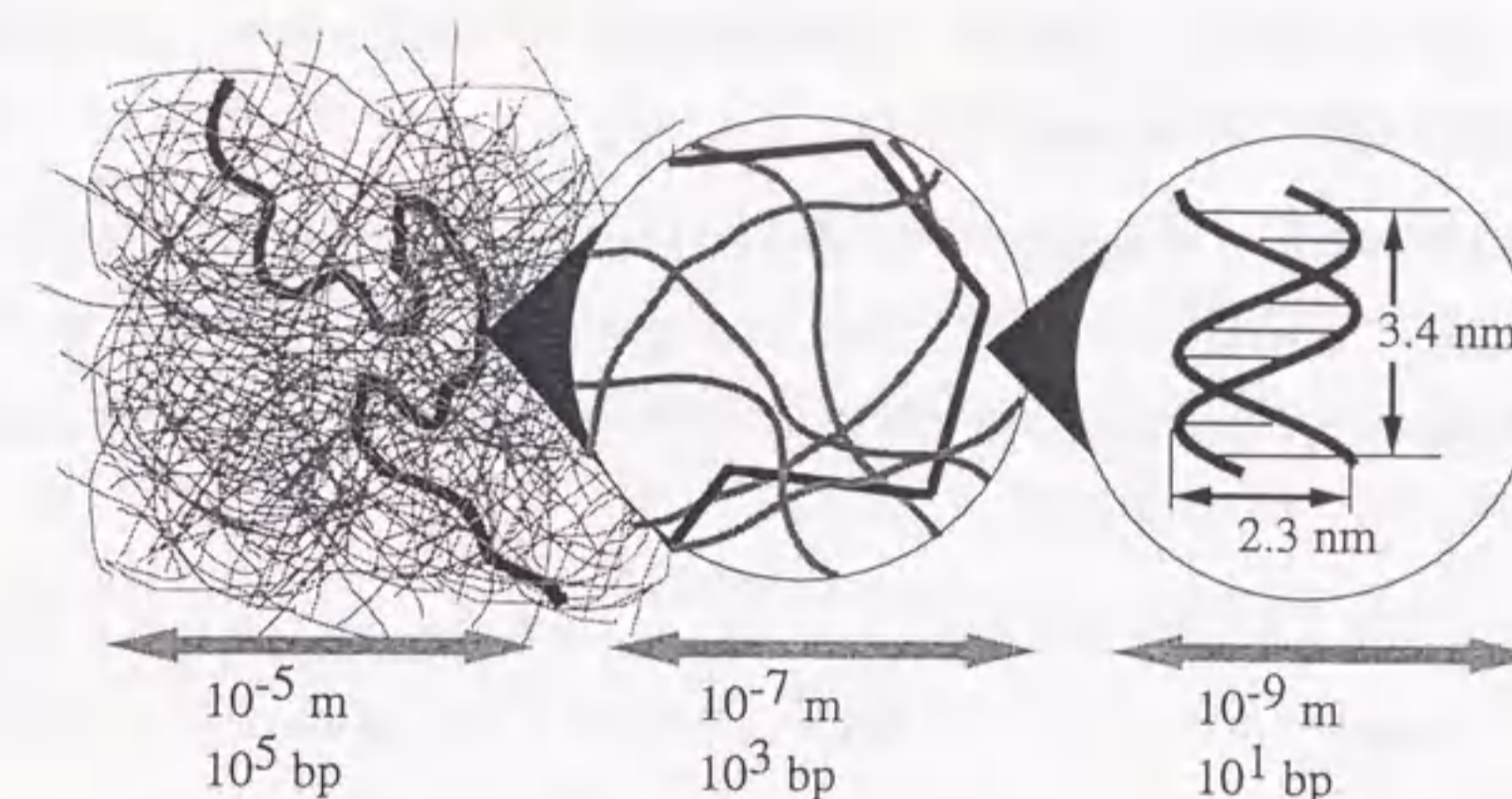


Figure 1.9 Schematic picture of a DNA molecule in gel electrophoresis.

DNA はよく知られているようにアデニン、グアニン、チミン、シトシンの四種類のヌクレオチドからなるヘテロポリマーである。これらヌクレオチドの電気化学的特性は類似しているため、DNA の電気化学的特性はヌクレオチドの配列にはほとんど影響されない¹⁰⁾。したがって本論文では DNA をホモポリマーとして扱う。

本論文では二重螺旋構造を持つ線状の DNA のアガロースゲル電気泳動を念頭に議論を進める。しかし本論文における DNA の取り扱いは粗視化されたものであるから微細な分子構造の違いは重要ではない。適当な粗視化のスケールによって一本鎖 DNA や RNA など他の分離対象物質、またポリアクリルアミドゲルなどの他の分離担体のゲル電気泳動についても同様の取り扱いが可能である。

◇ 1.5.2 長さ

系のサイズを図 1.9 に模式的に示した。この系には三つの特徴的長さがある。DNA の全長、ゲルの編目サイズ、および DNA の硬さの目安となる持続長である。二重螺旋構造の DNA はかなり硬く、強く帯電しているため、持続長は約 180bp (60 nm) である⁴³⁾。Kuhn 長は持続長の二倍であるから、約 120 nm である。これに対して二重螺旋の太さは約 2 nm である⁷⁾。また電気二重層の幅 (Debye 長) も、通常の電気泳動の条件下では数 nm であ

る⁴³⁾。したがって DNA の実効的な太さは持続長に比べて非常に小さい。これらの長さはイオン強度や温度に影響される^{43,44)}。

DNA の全長は一つの塩基対あたりの長さ約 0.34nm に塩基対の数を掛けたものになる。本論文で扱う DNA は数十から数百 kbp の DNA であり、数 μm から数十 μm に達する。これでも生物の DNA としては短い方である。人間の一つの細胞中の DNA の長さは約 2m にもなる⁴⁵⁾。

ゲルは三次元的な編目構造をしている⁴⁶⁾。ゲルの特徴的長さは編目サイズである。Serwer と Hayes⁴⁷⁾ はアガロースゲル濃度 C_{gel} と編目サイズ ξ を様々な大きさの粒子を用いて $1.5\text{wt}\% \leq C_{gel} \leq 4.0\text{wt}\%$ (wt%:重量パーセント濃度) の間で調べ、

$$\xi = 157C_{gel}^{-1.04} \text{ nm} \quad (1.7)$$

の関係を持つことを示した。Serwer と Hayes の実験からは外れるが、分離によく用いられる 1wt% のゲルでは約 100nm であるといわれている¹²⁾。このようにゲルの編目サイズは DNA の Kuhn 長と同程度の大きさで、図 1.9 に示したように相当に濃厚な編目である。

◇ 1.5.3 エネルギー

DNA の Kuhn 長 a 当たりにはその構造上約 $-720e$ の電荷が存在する。対イオンの遮へい効果で、10~40% が電気泳動の実効電荷である^{3,4,43)}。ここに電場強度 E の電場がかかったとすると、Kuhn セグメントあたりでうけるエネルギーは、セグメントあたりの電荷を q とし、 qaE である。後に 5 章および 3 章で述べるが、これを熱エネルギー $k_B T$ で無次元化した Θ ,

$$\Theta = \frac{qaE}{k_B T} \quad (1.8)$$

が重要なパラメーターである。いま $T = 300\text{K}$ 、 $E = 10\text{V/cm}$ 、 $a = 120\text{nm}$ 、 $q = 720e \times 0.17$ を代入すると $\Theta \approx 0.4$ となる。この実効的な電場強度もイオン強度や温度の影響を受ける。

ゲルと DNA との間の相互作用は、いわゆる絡み合い相互作用 (entanglement effect) である。アガロースゲルの場合の、絡み合いにおける構造の強さを考える。ゲル中の編目のある場所に最も強く力がかかる場合として、DNA の片方の端がその場所に固定されてい

る場合を考える。DNA 全体にかかる電場のポテンシャルは、Kuhn 長を一単位として測った時の DNA の長さを N とし、 $qaEN$ である。DNA が 36kbp の長さを持つとして、条件 $E = 10\text{V/cm}$ 、 $a = 120\text{nm}$ 、 $q = 720e \times 0.17$ 、 $N = 100$ を代入すると、 $40k_B T$ のエネルギーになる。ゲル電気泳動では普通ゲルの破壊は起きないので、ゲルの結合エネルギーはこれより高いと考えられる。ゲルが共有結合で編目構造を形成しているとする、結合エネルギーは $100k_B T$ 程度である。例えば $C-C$ 結合の結合エネルギーは約 $120k_B T$ である。アガロースゲルは多数の繊維がより集まったものが組み合わさって編目を作っている⁴⁶⁾ ので、編目の結合エネルギーは数 $100k_B T$ になると考えられる。

■ 1.6 従来の理論モデル

◇ 1.6.1 定常電場ゲル電気泳動への適用

1.5 節での粗視化に基づいた理論モデルによって、比較的低分子量の DNA の定常電場ゲル電気泳動の分離の機構はよく理解されている⁸⁾。定常電場ゲル電気泳動は、その特徴的長さであるゲルの編目サイズ ξ と DNA の全長 N で以下のような三つの領域に分けられる²²⁾。(I) Ogston 領域、(II) レプテーション領域、(III) バイアスレプテーション領域、である。これらが適用できる領域を図 1.3 および図 1.4 に示した。それぞれ、以下で具体的に説明する。

◇ 1.6.2 (I) Ogston 領域

ゲルの編目のサイズが DNA の慣性半径よりも大きい場合には、Ogston のふるい (Ogston sieving)⁴⁹⁾ とよばれる機構で分離される²¹⁾。ゲルを動かない分散した穴の集まりであるとし、DNA を慣性半径程度の大きさの球であるとみなす (図 1.10a)。短い DNA には構造的な異方性があるが、Ogston モデルでは DNA は泳動中にあらゆる方向に均等に回転すると仮定している。この DNA のモデル球は編目中を泳動する間変形しないと考える。このモデルによると電気泳動移動度 μ は以下の式で決められる。

$$\mu = \mu_0 \exp(-c_3 C_{gel} N) \quad (1.9)$$

ここで μ_0 はゲルのない溶液中での球の電気泳動移動度、 c_3 は実験的に決まる定数である。式 1.9 は電場方向への DNA の配向を考慮していないという意味で、電場強度 0 の極限の式で

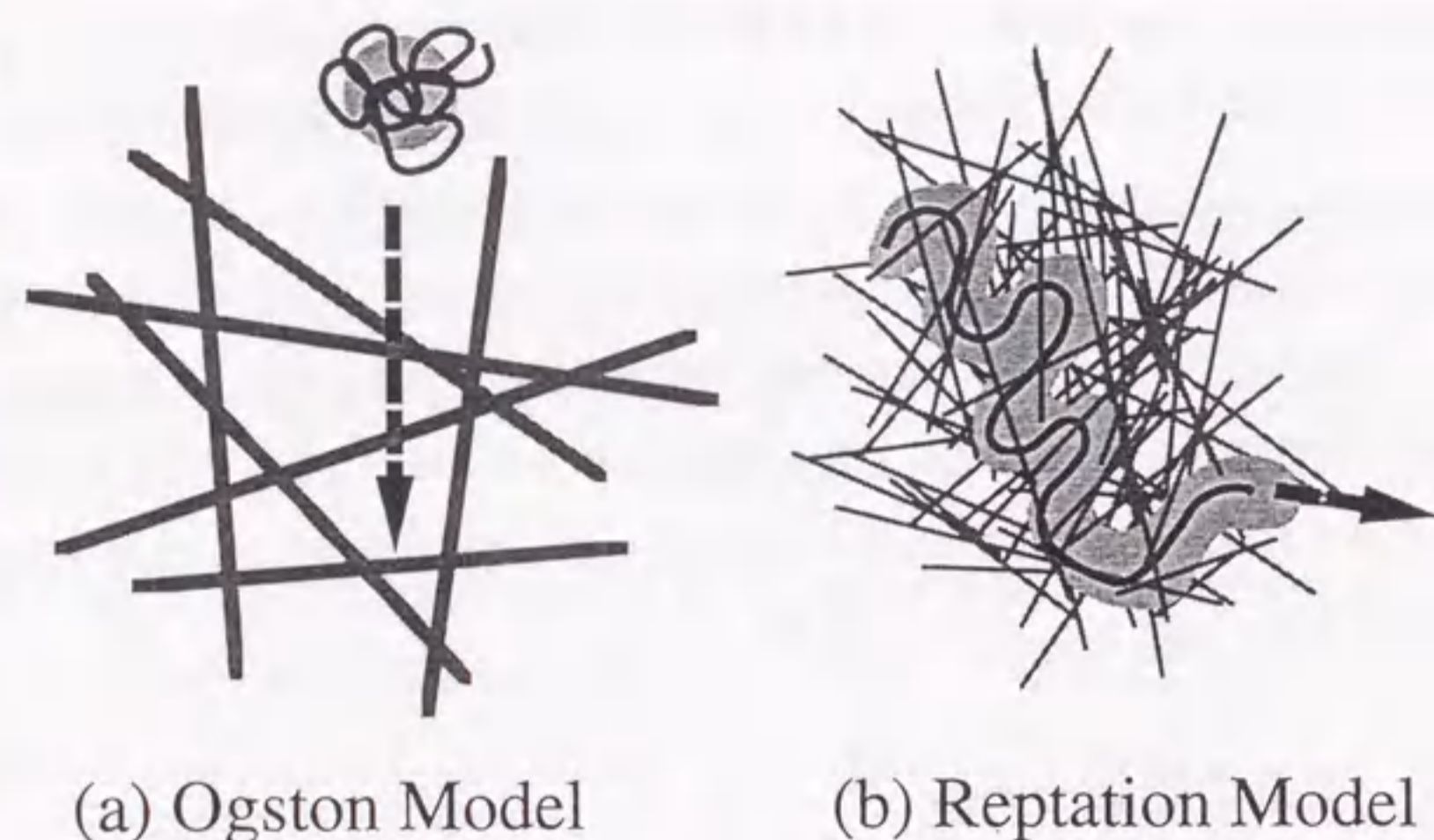


Figure 1.10 Schematic pictures of theoretical models of gel electrophoresis. (a) Ogston model, and (b) reptation model.

ある。

Ogston のモデルは、式 1.2 で表される短鎖領域の DNA の泳動速度の予測に適している。また DNA の配列を読みとる際の技術である、一本鎖 DNA のアクリルアミドゲル電気泳動についてもよく用いられる¹⁾。

◇ 1.6.3 (II) レプテーション領域

DNA がゲルの一つの編目に収まりきらないほど大きくなると、Ogston モデルは適当でなくなる。それは Ogston モデルの重要な仮定である、DNA がゲルの編目から編目へと穴を落ちていくように進む、という描像がもはや適当でないからである。この領域では DNA はレプテーション (reptation) 様式で運動すると考えられている (図 1.10b)。レプテーション理論はもともと溶融体中の高分子の挙動を説明するための理論である⁵⁰⁾。その描像は、周囲の高分子による束縛があたかもチューブのように働き、末端部以外の部分は自由に動け

ない、というものである。末端部がある方向へ進むと、鎖はその背骨に沿った方向に全体がひきずられるように動く。

この描像は編目のしっかりとしたゲル電気泳動の場合には理想的に適用できると考えられた¹³⁾。はじめてレプテーション理論を生体高分子の電気泳動に適用したのは Lerman と Frisch⁵¹⁾である。電場強度が 0 の極限で電気泳動易動度 μ は以下の式で決められる。

$$\mu = \mu_0^r \frac{c_4}{N} \quad (1.10)$$

ここで μ_0^r はレプテーション管 (reptation tube) の内部を DNA が進む易動度、 c_4 は実験的に決まる定数である。 μ が $1/N$ に比例するという式 1.10 の結果は、実験的な式 1.3 とあっている。

◇ 1.6.4 (III) バイアスレプテーション領域

レプテーション理論を強電場、大分子量の場合に拡張したのがバイアスレプテーション (biased reptation) 理論である^{52,53)}。この理論ではレプテーション管の形成時に電場の影響を考え、電場方向にセグメントが配向しやすくなる効果を取り入れたものである。この理論による電気泳動易動度 μ の式は

$$\mu = \frac{c_5}{N} + c_6 E^2 \quad (1.11)$$

で与えられる。ここで c_5 、 c_6 は定数である。この式によると電場強度 E 、分子量 N が大きくなると易動度 μ は分子量依存性を失う。易動度の分子量依存性の喪失は、定性的には以下のように理解されている¹³⁾。極端な場合として、鎖が完全に伸びきって電場方向に配向して泳動している状態を考える。このとき鎖全体にかかる駆動力は電荷の総量に比例する。電荷総量は長さ N に比例するので、駆動力も N に比例する。鎖全体がうける抵抗の総量も長さに比例する。易動度は駆動力を抵抗の総量で割ったものになるので、 N はキャンセルされてしまい、易動度の分子量依存性は失われる。これが定常電場ゲル電気泳動において、長鎖領域で泳動速度の長さ依存性が失われることの原因であると考えられている。

◇ 1.6.5 従来の理論の限界

定常電場ゲル電気泳動の泳動易動度はこれらの理論で一通り説明されたかに見える。しかし非定常電場ゲル電気泳動における DNA の分離の機構や、反共鳴現象の機構は、上述の理論では説明できない。

実用的にも重要な非定常電場での DNA の挙動を調べるため、蛍光顕微鏡や計算機シミュレーションによる研究が行なわれた。その結果、巨大 DNA は従来の理論の描像とは全く異なる運動をすることが明らかになってきた。

■ 1.7 蛍光顕微鏡法による研究

◇ 1.7.1 蛍光顕微鏡の原理と特徴

Yanagida ら⁵⁴⁾によって開発された蛍光顕微鏡法は、DNA 分子の物性を調べる強力な手段である。DNA は 1.5 節で述べたように mm や μm もある非常に長い分子であり、通常の光学顕微鏡で十分に観察可能な大きさである。しかし分子の太さ方向にはわずか 2nm しかない細い分子であるので光学顕微鏡では通常見ることができない。この問題を解決したのは蛍光色素であった。ある種の色素を水溶液中で DNA に結合させるとその構造が変化し、励起させたときに結合していない時に比べて数倍から数十倍もの蛍光を発する⁵⁵⁾。これが蛍光顕微鏡法の原理である。装置は光学顕微鏡に蛍光励起のための水銀ランプやレーザーなどをつけたものである⁵⁵⁾。蛍光色素による DNA の物性への影響は考慮に入れなくてはならないが、適当な条件を選んでやればこれらの影響は無視できる程度に押えることができる^{55,56)}。

DNA を分子レベルで観察するための実験手段としては他に STM や AFM などがある⁵⁷⁾。これらと比較して蛍光顕微鏡法が圧倒的に優位な点は、水溶液中での DNA 分子の挙動をリアルタイムで観察できることである。他の方法のように DNA を基盤上に固定したり、溶液をとばしたりせずに観察できる。この利点をいかした様々な研究が行なわれている⁵⁵⁾。

◇ 1.7.2 ゲル電気泳動の研究

レプテーション理論の描像とは異なり、定常電場ゲル電気泳動中の DNA が伸び縮みを繰り返しながら泳動することを実験的に示したのは、Smith ら⁵⁸⁾による直接観察実験である。図 1.11 に同様の観察で得られた DNA の観察例を示す⁵⁹⁾。この定常電場ゲル電気泳動における DNA の伸縮運動は、2 章、3 章で詳しく議論する。Schwartz と Koval⁶⁰⁾はほぼ同様の観察をおこなうと同時に非定常電場ゲル電気泳動中の DNA の観察をはじめおこない、90 度の角度の PFGE 中の DNA の形態変化の様子を調べた。Rampino ら⁶¹⁻⁶³⁾は定量解析ができるよう改良した装置を使って DNA の動きを数値化した。Howard と Holzwarth⁶⁴⁾は DNA の挙動を画像解析で数値化し、電場を切った状態からパルス的に印加した時の DNA の泳動速度の揺らぎを議論した。Gurierrri ら⁶⁵⁾は OFAGE 中の DNA を観察し、形態変化と配向の電場方向への追従について調べた。Oana ら⁶⁶⁾は DNA がゲルへ侵入する過程を調べ、侵入時間がゲル濃度の約 2 乗に比例することを示した。

◇ 1.7.3 コイル・グロビュール転移の研究

Minagawa ら⁶⁷⁾は DNA とインターカレート結合する薬物 5-[(4-acryloyl-amino)phenyl]-3-amino-7-(dimethylamino)-2-methylphenazinium chloride をもちいて DNA のグラフト体を作成した。これと通常の DNA との慣性半径や拡散定数の違いをしらべ、薬物が DNA の高次構造にどのような影響を与えるかを調べた。また同様の実験を poly-L-arginine との間でも行ない、タンパク質と DNA との相互作用を調べている⁶⁸⁾。さらに Minagawa ら⁶⁹⁾は polyethylene glycol (PEG) 溶液中での DNA の形態変化を調べ、PEG 濃度によって DNA が分子内相転移であるコイル・グロビュール転移を起こすことを発見した。この実験は蛍光顕微鏡の、単分子観察が可能であるという利点を最大限に活かしたものである。光散乱の実験などで集団平均を計測すると転移点がなだらかに見えるので、コイル・グロビュール転移の不連続性が明らかにならない⁵⁷⁾。

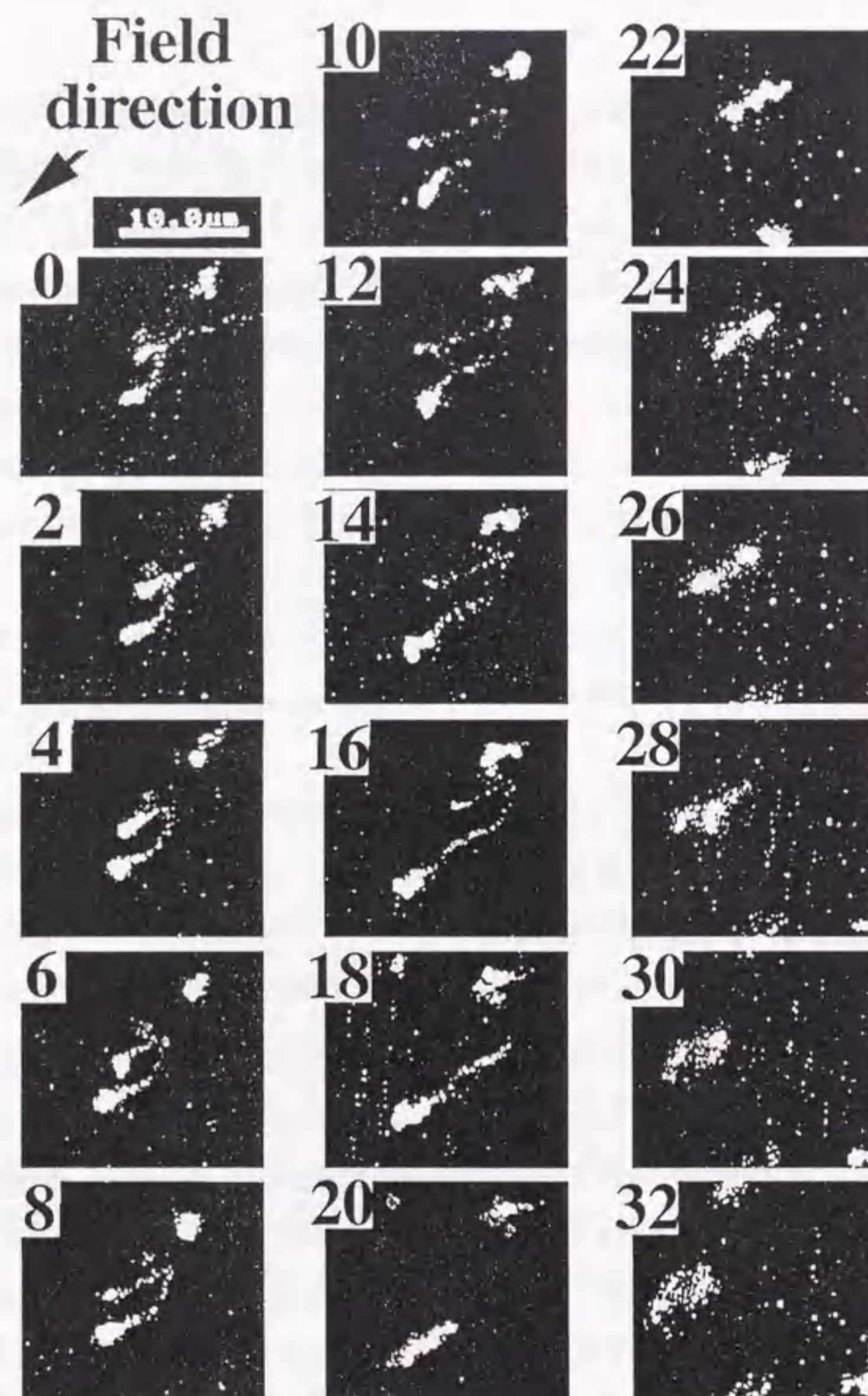


Figure 1.11 An example of sequential snapshots of DNA during steady field gel electrophoresis from Ref.59. The number on each snapshot indicates the time in second. The experimental conditions are: agarose gel of 1.0wt%, steady field of 1V/cm, DNA of T4DNA 166kbp, buffer of 0.5×TBE, fluorescent dye of ethidium bromide.

◇ 1.7.4 DNA のブラウン運動の研究

Matsumoto ら⁷⁰⁾は水溶液中の DNA 分子の拡散を調べ、Rouse モデルよりも流体力学的相互作用を考慮に入れた Zimm モデルの方が実験にあうことを示した。Smith ら⁷¹⁾は拡散定数の DNA の分子量依存性を調べて Zimm モデルの正当性をより明らかにした。Perkins ら⁷²⁾は DNA 分子の濃厚溶液中に少量の染色した DNA をいれ、DNA の先端につけたビーズをレーザーピンセットで動かして様子を調べ、濃厚溶液中でのレプテーション理論の描像の正しさを示した。Smith ら⁷³⁾は DNA 分子をひっぱってバネとしての性質を調べた。

■ 1.8 計算機シミュレーションによる研究

◇ 1.8.1 Deutsch のシミュレーション

Deutsch⁷⁴⁾の計算機を用いたゲル電気泳動のシミュレーションは、直接観察よりも早い時期に DNA の伸縮運動を予言していた。Deutsch⁷⁵⁾のモデルは現実的かつ単純なものである。DNA を長さの固定されたボンドでつながられたビーズでモデル化し、それぞれのビーズは Langevin 方程式に従うとする。ゲルはボンドの長さの半径をもつ障害物で表され、ビーズと障害物との間にハードコアの相互作用を仮定する。これによって DNA がゲルからうけているトポロジカルな束縛を表す。このモデルによるシミュレーションのスナップショットを図 1.12 に示す。初期のモデルでは格子状の障害物が用いられていたが、ランダムな配置のものへと拡張が行なわれている⁷⁶⁾。この結果を見ると基本的なレプテーション理論の仮定が成立しないことがよく分かる。レプテーション理論では、鎖の中央部が電場方向にゲルの編目 (レプテーション管) からはみだして変形するような動きは許さない。ところが図 1.12 では、ゲルのすき間からはみだた、鎖上の折れ曲がった部分 (キック kink) が、鎖のたるみ (ヘルニア hernia) をゲル編目からひきずり出すようにしてレプテーション管を壊して成長していく様子が見られる。

Deutsch によるこの予言は、1.7 節の蛍光顕微鏡の直接観察で確かめられた。計算機シミュレーションと蛍光顕微鏡による直接観察はお互いの結果の比較が直接できるために、その後も相補的に用いられて多くの成果をあげている^{13-15,77)}。非定常電場ゲル電気泳動のシ

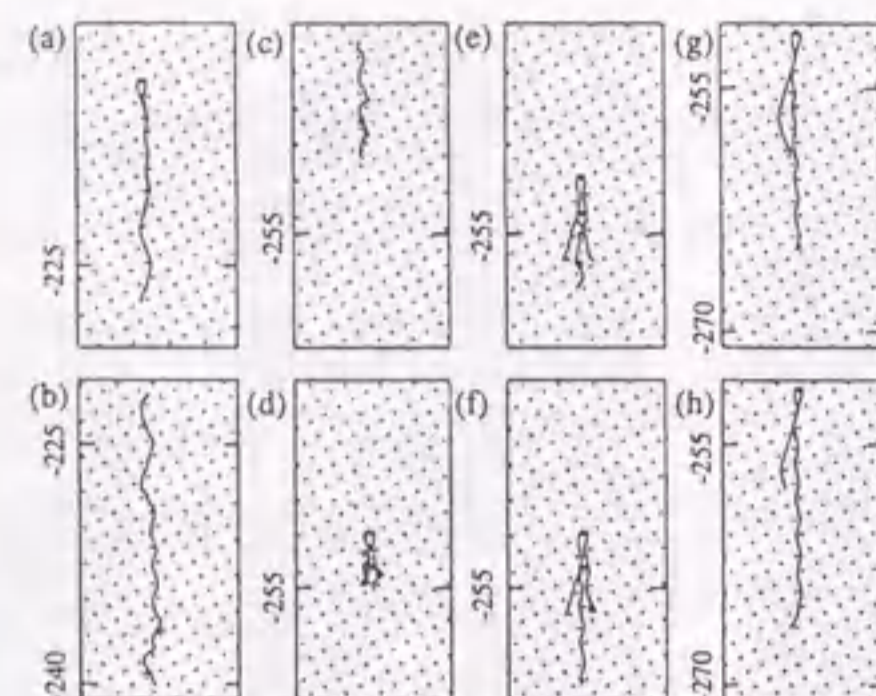


Figure 1.12 Successive conformation of DNA moving through a bed of obstacles, from Ref.75. The electric field is directed downward, and each dot represents one obstacle. The times for each frame are: (a) 100, (b) 105, (c) 110, (d) 112, (e) 114, (f) 116, (g) 118 and (h) 119.

ミュレーションも多数行なわれている⁷⁸⁻⁸⁰。

◇ 1.8.2 その他のモデルによるシミュレーション

Shaffer と Olivera de la Cruz⁸¹)は Deutsch のモデルをボンド長の揺らぎを許すように拡張した。Elvingson⁸²)は Deutsch のモデルを三次元に拡張した。Matsumoto⁸³)は Deutsch のモデルに弾性項を加え、運動の周期性を示した。これらの拡張では、本質的に Deutsch のモデルと変わらない結果が報告されている。Bustamante ら¹⁴)はレプテーション理論を拡張してレプテーション管内での鎖のボンド長の揺らぎをゆるしたモデルにより PFGE での DNA の挙動を調べ、直接観察も同時に行なって結果の比較を行なっている。PFGE への拡張は Deutsch 自身によっても行なわれている^{76,78,79}。

Zimm⁸⁴)は Deutsch とは全く異なったモデルによるシミュレーションで反転電場法の反共鳴の再現に成功している。Zimm のモデルは Lakes-Straits モデルとよばれ、ゲルを DNA の Kuhn 長程度の半径をもつ球状の空間 (Lakes) と、それをつなぐ細いパイプ (Straits) でモデル化し、レプテーションモデルの管を現実のゲルに近い形に変形させたものである。

Duke と Viovy⁸⁵)は repton 理論に基づいた一次元のダイナミックモンテカルロシミュレーションで反転電場法の反共鳴を再現した。Smith と Bar-Yam⁸⁶)はセルオートマトンを用いたシミュレーションで PFGE での DNA の動きが再現できることを示している。

■ 1.9 反共鳴現象の機構の研究

◇ 1.9.1 定常電場での伸縮運動との関係

蛍光顕微鏡による実験や、計算機シミュレーションの結果、DNA の複雑な挙動が明らかになってきた。これらの結果に基づいて、反共鳴現象の機構が考えられてきた¹³)。1.7節で述べたように DNA は定常電場下で伸縮運動をする。2章で詳しく議論するが、この運動の特征的時間は T4DNA(166kbp) の場合数秒のオーダーである¹⁷)。一方、図 1.8 に示されるように、T4DNA(166kbp) がバイアス正弦電場法で泳動速度極小を示す電場周波数は 1 から 0.1Hz の範囲であり、電場変動周期はやはり秒のオーダーである。泳動速度極小を起こす電場切替え時間と DNA の伸縮運動の特征的時間とが近いのはバイアス正弦電場法に限らず反転電場法でも同様である。例えば Kobayashi ら⁴²)の結果、図 1.7 では 166kbp の分子量の DNA の反共鳴条件の電場切替え時間は約 2 秒である。このことから、電場の切替が DNA の伸縮運動と競合し、その結果として泳動速度が低くなるのではないか、反共鳴のような現象がおきているのではないかと考えられるようになった¹³)。

◇ 1.9.2 反共鳴現象の種々のモデル

反転電場法を開発した Carle ら³⁵)は DNA がくさびのような形で泳動していると考えた。泳動方向の前方のほうが細い形で、後方ほど太くなっている形で泳動している DNA が、電場の切替で泳動方向を逆転させるときに形態を反転させる。形態反転のための時間が電場切替え時間と近いときには DNA は中間状態に留まるために泳動速度が遅くなると考えられる。Åkerman ら⁸⁷)は CFGE のもとで線形二色性 (linear dichroism) の実験をおこない、DNA の配向を調べた。その結果反共鳴の条件では DNA はほぼ等方的な、ランダムコイルに近い状態にあると結論づけた。このような形態ではゲルの抵抗が大きく、泳動速度が低下すると考えられる。Zimm⁸⁴)は 1.8節で紹介した 'Lakes and straits' モデルを用いた反転

電場法のシミュレーションで反共鳴を再現し、DNA の形態変化を調べた。DNA が定常電場ゲル電気泳動で見せる V 字型をとっている時に電場が反転すると、逆の A 字型の状態から泳動が始まることになって電場方向に進むまでに時間が必要となる。Zimm は泳動方向反転の特徴的時間と電場反転の時間が近くなると反共鳴が起きると考えた。Duke と Viovy⁸⁵⁾ は反転電場法のモンテカルロシミュレーションを行ない、後方に電場がかかっているときに DNA 上に形成される 'キント' または 'ヘルニア' が、電場方向が反転して前方に泳動する時に DNA の変形を妨げるとしている。反共鳴現象の記述は他のシミュレーションや実験の結果からもなされているが、これらは定性的なものに留まっている^{12,13)}。

■ 1.10 本論文の目的

1.6節で紹介したように、比較的分子量の DNA の、定常電場ゲル電気泳動中の挙動は、理論的にも理解されている。ところが遺伝子解析のために重要な、数十 kbp 以上の長鎖 DNA の挙動、非定常電場ゲル電気泳動による分離の機構はよく分かっていない。遺伝子解析技術は日々進歩している¹¹⁾ といえ、技術的ブレークスルーのためには分離機構の根本的な理解が不可欠であると考えられる。

本研究は“定常電場ゲル電気泳動で分離できないものが、なぜ非定常電場ゲル電気泳動で分離できるのか?” という疑問を中心的テーマとしてはじめられた。1.4節で述べたように、非定常電場ゲル電気泳動の分離機構への疑問は、“反共鳴現象に代表される泳動速度の電場切替え時間に対する非線形応答の機構はどんなものか?” という疑問と直結する (図 1.8 参照)。私はこの疑問を解く鍵は定常電場ゲル電気泳動にあると考えた。定常電場ゲル電気泳動中では 1.7節で見たようにレプテーション理論の描像とはかけはなれた伸縮運動を見せ、この泳動中の変形が非定常電場ゲル電気泳動の分離の機構に重要な関わりがあると考えられる (図 1.11 参照)。

そこで私は研究の目的を次の二点においた。

1. 定常電場ゲル電気泳動における長鎖 DNA の伸縮運動の特性を調べる。
2. バイアス正弦電場法での泳動速度の電場切替え時間に対する非線形応答の機構を分子

論的に解明する。

これらを調べるための手段として、1.7節で紹介した蛍光顕微鏡による直接観察と 1.8節で紹介した計算機シミュレーション、さらに簡単なモデルによる理論計算を用いた。

2章および 3章では、巨大 DNA の定常電場ゲル電気泳動における伸縮運動、とくに運動の特徴的な時間に焦点を当て、実験と理論モデルによってその性質を定量的に調べた結果について述べる。2章の蛍光顕微鏡を用いた直接観察の実験では、伸縮運動の特性量を数値化し、相関関数を使って運動の周期性を議論する^{17,18)}。3章では DNA の一回の伸縮の過程を簡単な理論モデルを用いて議論し、伸縮運動の特徴的時間が何に由来するものかを述べる¹⁹⁾。

4章および 5章では電場の時間変化が DNA 分子の泳動形態にあたる影響を定量的に議論することを目的として、一次元非定常電場ゲル電気泳動の一つである、バイアス正弦電場法での DNA の形態変化を、直接観察の実験と計算機シミュレーションで調べた結果を述べる¹⁶⁾。4章の直接観察では反共鳴現象を議論の中心にして、非定常電場ゲル電気泳動 DNA の泳動挙動を反共鳴の条件近傍で調べ、DNA の形態変化が定常電場でのそれとどのように異なるかを議論する。5章の計算機シミュレーションでは反共鳴を含めて、DNA の挙動が電場の切り替わり周期及び DNA の長さでどのように変化するかについて検討した結果を述べる。実験の結果を再現するようなモデルでシミュレーションを行えば、実験では制限がある空間および時間分解能、また計測可能なサンプル数や時間などを補うことができ、より議論を進めることができる⁷⁷⁾。5.6節では 4章と 5章の結果から、バイアス正弦電場法での DNA の泳動速度の電場周波数依存性、DNA 分子量依存性を分子論的に説明する。

第 2 章

定常電場での直接観察

■ 2.1 はじめに

1章で述べたように、ゲル電気泳動法の分離の機構を分子論的に説明する研究が数多く行われてきた。一つの強力な手法は 1.7節で紹介した蛍光顕微鏡法である。これにより巨大 DNA が定常電場ゲル電気泳動中に伸縮運動をすることが示されている (図 1.11)。DNA は等方的にまるまった状態と、電場方向に伸びた状態を交互にとりながら泳動する。同様の挙動は 1.8節で述べたように計算機シミュレーションでも示されている (図 1.12)。この伸縮運動は一次元非定常電場ゲル電気泳動法の分離機構と、反共鳴現象を通して深く関わっていると考えられている。1.9節でも述べたように、定常電場での DNA の伸縮運動の時間スケールは、一次元非定常電場で反共鳴現象が起きる時の電場の切替え時間と近い。このため反共鳴現象の機構に直接関わると考えられた。しかし多くの研究にも関わらず、DNA の伸縮運動を定量的に解析した例はあまりない。

本章では、我々が行なった定常電場ゲル電気泳動中の DNA 分子の挙動を定量化した実験について述べる^{17,18)}。蛍光顕微鏡法と画像解析装置を組み合わせた装置を開発し、多量のデータを半自動的に解析するシステムを開発した。この装置で、DNA 一分子毎の挙動を直接観察し、運動を定量的に解析できるサンプル数をとることができた。結果から伸縮運動の特徴的時間を計測し、その性質を調べた。この結果を基に、伸縮運動と反共鳴現象との関わり合いについて定量的に議論する。

■ 2.2 実験

◇ 2.2.1 試料

アガロースと緩衝溶液を蒸留水中に攪拌し、電子レンジで加熱した。この溶液を 60° C までさましてから DNA、蛍光色素、退色防止剤を混合した。これを後述する観察用泳動槽上に滴下し、4° C で 20 分冷やしてゲル化させた。

試料に含まれる成分と、その最終的な濃度は以下の通りである。

1. DNA : ニッポンジーン製 T4dCDNA(166kbp)0.9 μ M in nucleotide
2. 蛍光色素 : EB (Ethidium bromide) 0.9 μ M
3. 緩衝溶液 : 0.5 \times TBE (45mM Tris, 45mM borate, 1.25mM EDTA)
4. 退色防止剤 : 2-mercaptoethanol 4% (v/v)
5. ゲル : アガロース (FMC SeaKem LE) 1wt%(w/v)

◇ 2.2.2 装置

装置の概略を図 2.1 に示した。光学顕微鏡に DNA の蛍光を観察するためのシステムと電気泳動を行なうためのシステムが追加装備されたものである。装置全体は大きく分けて i) 泳動槽 ii) 光学系 iii) 電気系に分かれている。泳動槽は DNA を電気泳動させる部分で、顕微鏡のステージに載せて観察する。ここに先述した DNA-ゲル混合溶液をいれて電気泳動を行なう。DNA を観察するためには、DNA に結合させた蛍光色素を励起し、その蛍光をとらえなければならない。そのためのシステムを光学系としてまとめた。ここには色素を励起するための水銀ランプ、励起と観察に必要な波長の光だけを透過させるフィルター、蛍光を観察する顕微鏡本体、観察像を記録するビデオカメラとビデオテープレコーダーが含まれている。さらに DNA を電気泳動させるための電源を供給し、実効電圧を監視する電気系が加わる。これらの各システムについて以下で具体的に述べる。

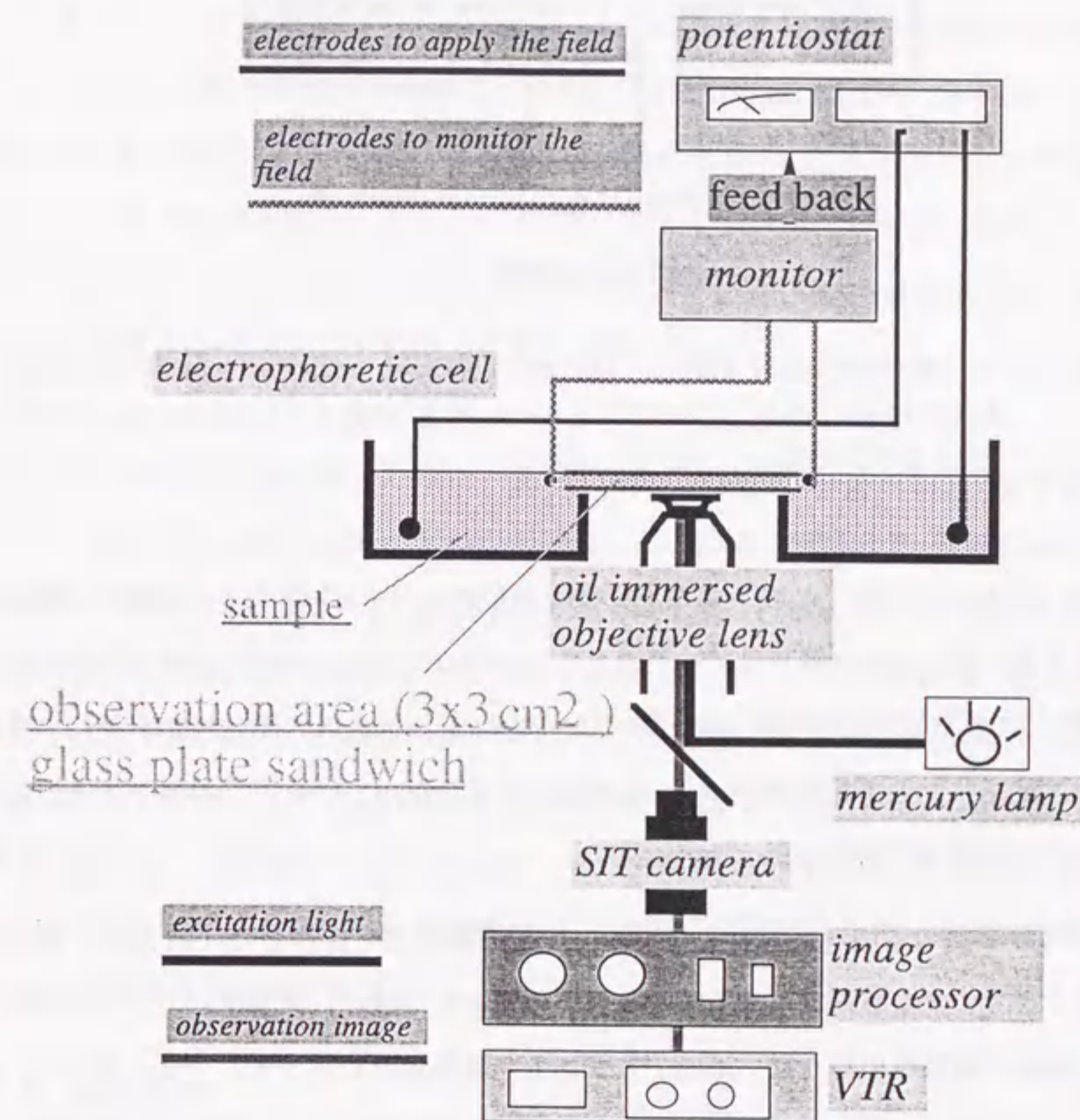


Figure 2.1 A schematic representation of the experimental apparatus used for direct observation of DNA molecule during gel electrophoresis.

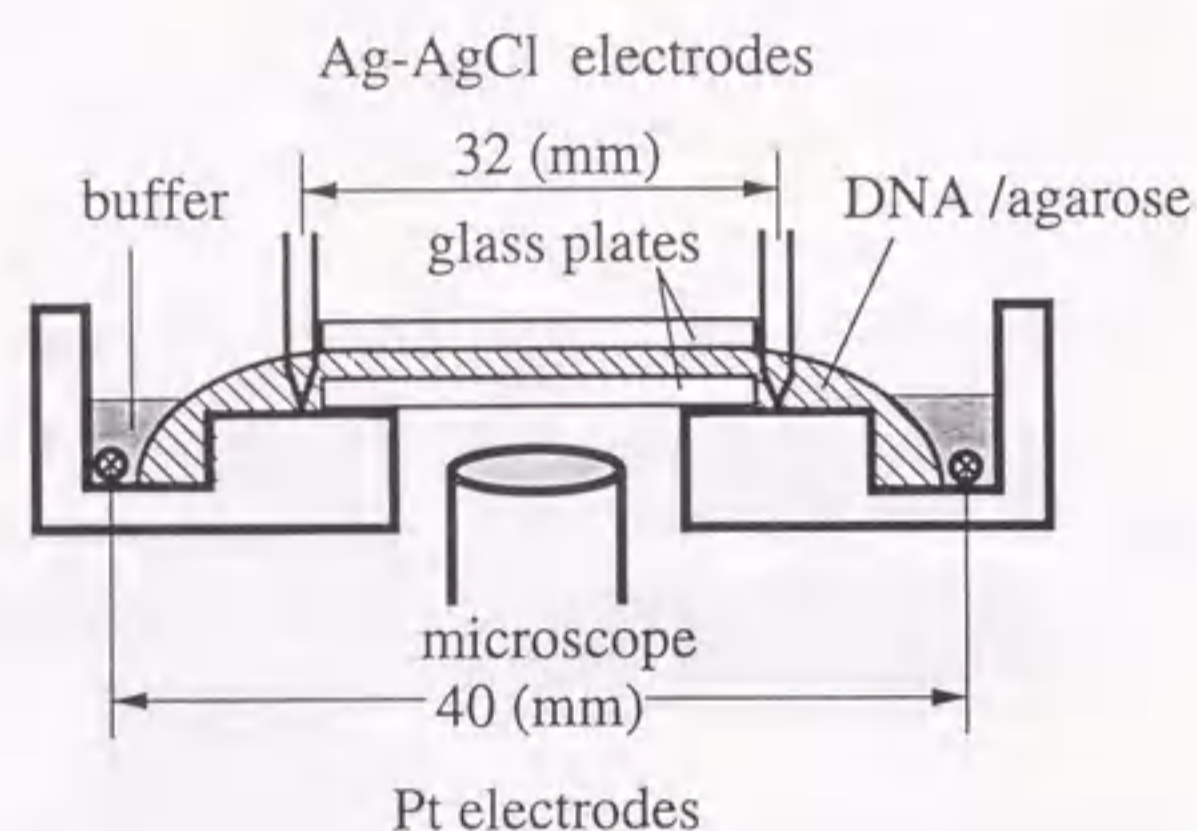


Figure 2.2 A cross-sectional view of the gel electrophoresis cell specially designed for direct observation. The buffer wells, each with a Pt electrode, are filled with $\times 0.5$ TBE buffer.

泳動槽 従来は、スライドガラスの上に微小な間隔 ($\sim 1\text{mm}$) の電極を作成し、電極間に試料溶液を微量 ($\text{数}\mu\text{M}$) 滴下して、その上にカバーガラスをかぶせた観察セルが用いられていた⁸⁸⁾。この方法では電極間距離が小さいために電極付近の界面分極が実験に大きく影響し、印加電圧に対して実効電圧は $1/10$ 程度にまで下がっていた。また滴下する試料が少ないために実効電圧の時間変動が大きかった。

これら界面の影響を極力押えるため、観察用泳動槽を自作した (図 2.2)。電極間距離を大きくとり、また実効電圧を監視するための電極をつけた。泳動槽はアクリルで作られており、底部に観察用の窓 ($30 \times 30\text{mm}^2$) がある。観察用窓にスライドガラスをのせ、泳動槽とスライドガラスの間はグリスでシールした。スライドガラスは DNA の吸着を防ぐために過酸化水素とエタノールで洗浄したのち十分乾燥させたものを用いた。スライドガラス上に試料溶液を滴下し、溶液の上にカバーガラス (スライドガラスと同じもの) をかぶせ、ガラス間の距離をとるためにスペーサーを観察用窓の両脇にはさんだ。試料をゲル化のため冷却する際には、泳動槽ごと冷却した。冷却後、電極部分に緩衝溶液を満たし、試験電極 (Ag-AgCl) をカバーガラスの両側に差し込んだ。

この方法ではスペーサーによってガラス-ガラス間に数十 μm 程度を確保する。また電極

間の距離が 3cm あるため電極近傍での界面分極の効果を相対的に小さくし、ほとんど無視できる程度におさえる⁸⁹⁾。

光学系 顕微鏡は Nikon 倒立顕微鏡 DIAPHOT-TMD に落射蛍光装置 TMD-EF2 を装備したものを使用した。蛍光を励起するための光源として超高压水銀ランプの輝線を用いた。EB は DNA と結合した状態で $510\text{-}560\text{nm}$ の光で励起され、 580nm の蛍光を発する。これ以外の波長の光を取り除いてノイズを減らすため、フィルターを用いて励起光として 520nm 、蛍光として 580nm の光を選択的に透過させた⁸⁹⁾。100 倍の対物油浸レンズを使用して、観察される DNA の蛍光像を浜松ホトニクス製の高感度 SIT (silicon intensifier tube) カメラと画像処理装置 ARGUS10 で S-VHS ビデオに記録した。

電気系 DNA を電気泳動させるために、波形発生機 (TOA 電機 FS-2121) で発生させた電圧をアンプ (RYOWA 電機 model-9623A) で増幅し、泳動槽の両端の Pt 電極に接続した導線から駆動電圧として印加した。観察領域の電圧はイオンの移動のため時間とともにゆっくりと変化していく。この電圧変化を監視するため、カバーガラスの両側に Ag-AgCl 電極を差し込んだ。監視電圧を電圧降下装置をはさんでコンピューター (NEC9801RX) の内蔵増設 AD コンバーターボード (CONTEC 製) に接続した。コンピューターのモニター上で計測電圧を監視し、内蔵増設スーパーインポーズボード (CONTEC 製) で DNA の蛍光像を記録した S-VHS ビデオ上にも電圧を記録した。計測電圧が実験条件として選んだ電圧になるよう数分おきに印加電圧を調節した。

◇ 2.2.3 測定条件

定常電場の強度を $2, 4, 6, 8\text{V/cm}$ と変え、それぞれの条件下で DNA を 10 分子解析した。1 分子ごとには 0.1 秒おきに、少なくとも 5 秒以上の連続した観察を行なった。連続観察時間には次のような実験的制約がある。

1. VTR の観察用フレームは約 $40 \times 40\mu\text{m}^2$ で、分子が泳動してここから外れる。
2. 垂直方向へのブラウン運動による泳動で、分子が焦点面から外れる。

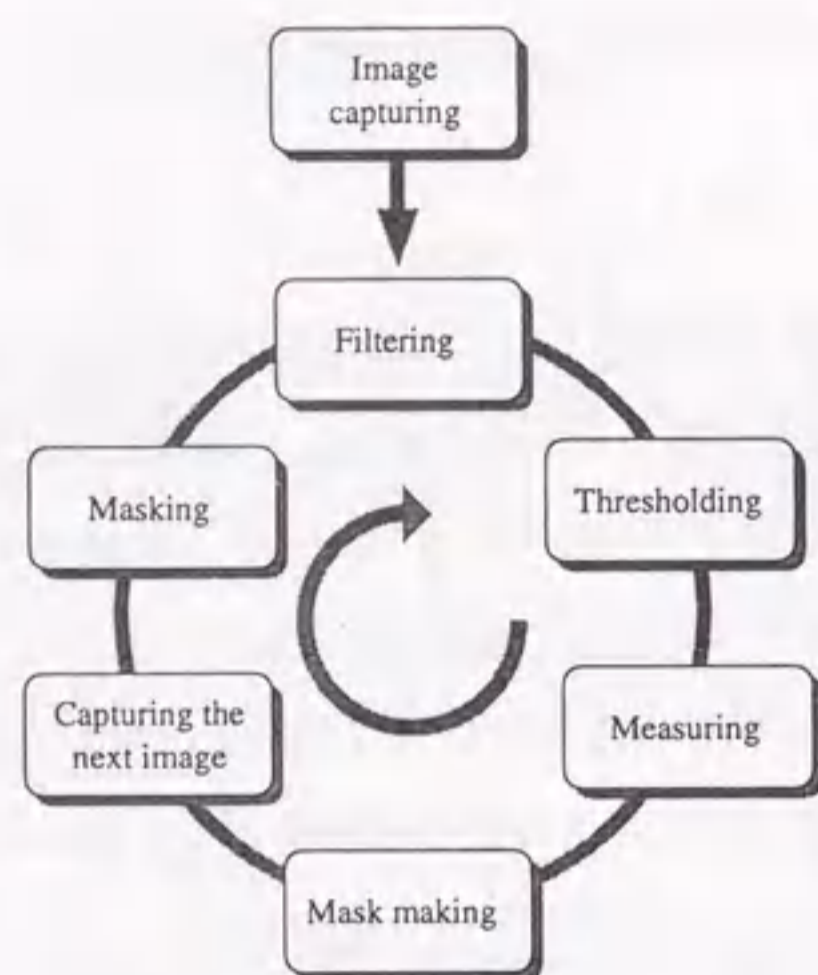


Figure 2.3 Schematic chart of the algorithm of the image analysis. The explanations are in the text.

3. 蛍光励起のために照射している紫外線が、長時間照射の結果 DNA を切断する。

4. 蛍光色素の蛍光が時間とともに弱くなる（退色）。

これらのうち 1 及び 2 が数秒程度と短いために観察時間を制限する。3、4 は励起光用フィルター及び退色防止剤 mercaptoethanol によって数十分のオーダーにコントロールできる⁸⁹⁾。

■ 2.3 画像解析

ビデオテープに収められた観察画像に対して、画面を 512×512 画素に、輝度レベルを 256 段階に、それぞれデジタル化を行なった。この画像を画像解析装置 PIAS3 (PIAS 製) を用いて半自動的に解析し、DNA の重心の位置などを求めた。解析は図 2.3 に示す、以下のよう手順で行なった。

1. 計測分子画像取り込み: 観察された DNA の蛍光像が収録されたビデオテープから適当な DNA を選択する。観察画像には、励起光として用いている紫外線の影響、ゲルとの物理的な絡み合いで切れてしまった DNA 断片があるので、観察対象から除外した。

2. フィルタリング: 熱雑音、不純物による蛍光、観察対象外の DNA 断片などを画像処理でフィルタリングし、DNA 分子を解析可能な状態にした。処理は次のような操作を順番に行なう。図 2.4 に例を示した。

(a) ダイナミックレンジの拡大: SIT カメラの計測可能な輝度レベルは最大で 256 段階ある。理想的な条件では、ある場所の輝度はその場所の DNA の密度に比例し、DNA のない場所では輝度は 0 になる。実際の実験では熱雑音や励起光、ゴミなどのため、DNA のない背景の輝度も 0 にならない。また DNA の形によって観察画像の最大輝度は変化する。DNA が縮んだ状態の時は DNA のセグメント密度が高くなるので輝度が高くなる。これに対して DNA が伸びた状態のときはセグメント密度は低くなり、輝度も下がる。このような観察する場所、時間による画像の見え方の違いを調節し、計測可能な輝度レベルを最大限に活かすため、観測対象 DNA の周囲 100×100 画素の範囲で最も低い輝度レベルを 0 に、最も高い輝度レベルを 255 に、それぞれ設定し直し、その間の輝度分布を線形に拡大する。これをダイナミックレンジの拡大という。

(b) 画像平滑化: 非線形平滑化フィルターのランクフィルターの一つである、 5×5 中央値フィルターを用いて行なう。ある画素にたいして、周囲 5×5 画素のマトリックスを考える。このマトリックスの 25 個の画素の輝度を、明るい順に並べる。このときの中央値の輝度（すなわち 13 番目の明るさとなる輝度）を、はじめに対象とした画素の輝度とする。この処理を行なうフィルターを中央値フィルター (median filter) という。flip-flap ノイズ、または加法的ガウスノイズとよばれる熱雑音は、画素どうしの間や時間による相関がないため、この処理によって相当の軽減がおこなえる (図 2.4b)⁹⁰⁾。

(c) 二値化: 画像解析装置上で画像計測を行なうために、二値化 (thresholding) を行なう。周囲 100×100 画素の範囲の輝度分布をとり、上位 95% に入る輝度を示す画素を白、それ以外を黒とする。この手法は P タイル法とよばれる⁹⁰⁾。周囲 100×100 画素の範囲外の輝点は全て除去する (図 2.4c)。

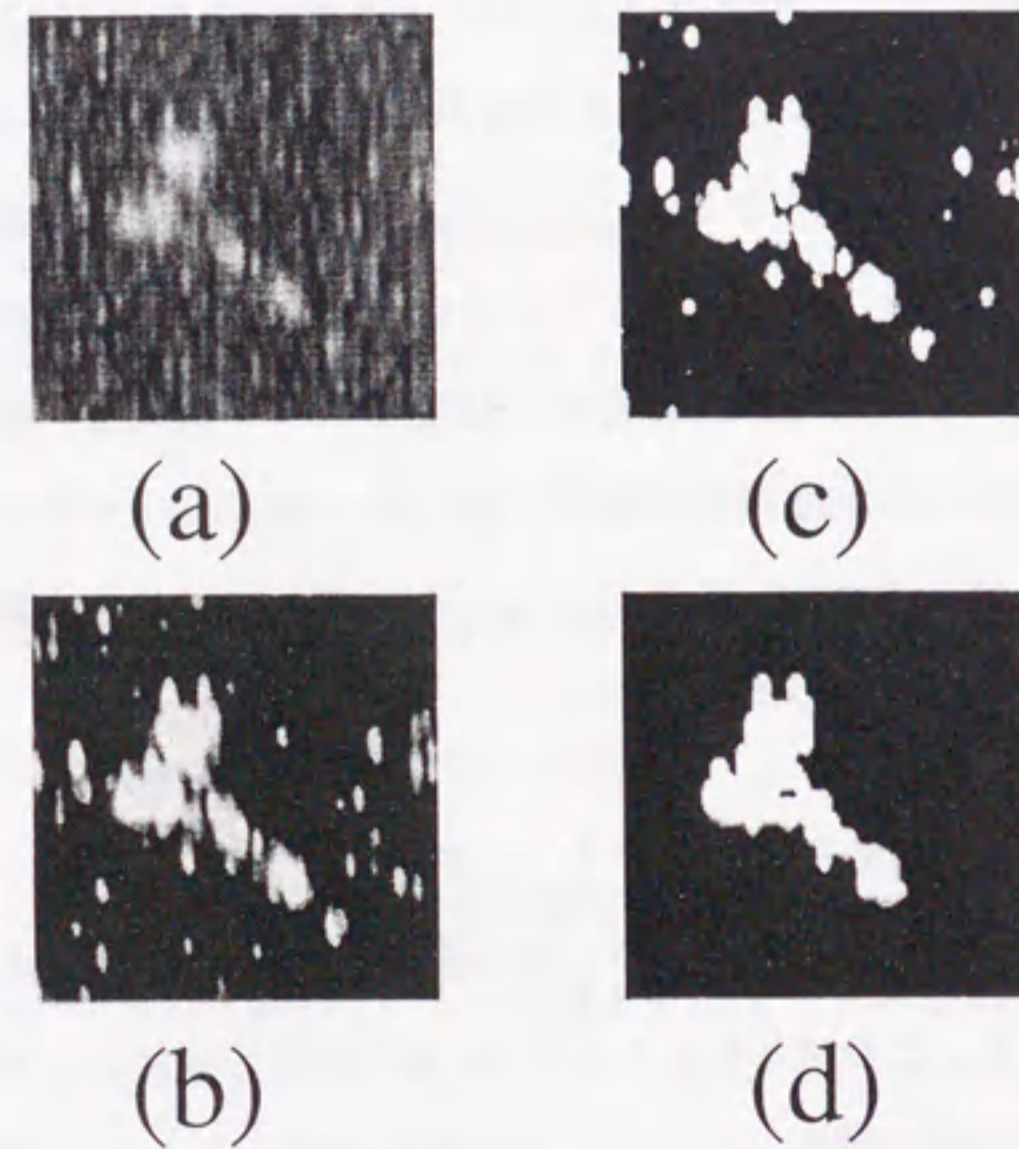


Figure 2.4 An example of the image analysis of DNA molecule: (a) the observed image, (b) after the smoothing, (c) after the thresholding and (d) after the noise elimination.

(d) 小粒子の除去: 計測対象外の輝点が残ることが多いので、粒子数が10画素以下の粒子は除去する(図2.4d)。この画像からDNA画像関数(DNA image function) $I(x, y, t)$ を決めた。 $I(x, y, t)$ は、点 (x, y) が2値化の結果輝点であれば1、暗点であれば0をとる。ここで電場方向を x 軸方向とした。

3. 計測: $I(x, y, t)$ から重心の位置 $\mathbf{r}_g = (x_g(t), y_g(t))$ を次のように求めた。

$$x_g(t) = I_0^{-1} \int dx dy I(x, y, t) x, \quad (2.1)$$

$$y_g(t) = I_0^{-1} \int dx dy I(x, y, t) y, \quad (2.2)$$

ここで

$$I_0 = \int dx dy I(x, y, t) \quad (2.3)$$

である。重心の位置から、泳動速度 $v_x(t)$ を次のように求めた。

$$v_x(t) \equiv \frac{x_g(t + \frac{1}{2}\Delta t) - x_g(t - \frac{1}{2}\Delta t)}{\Delta t}, \quad (2.4)$$

ここで Δt は0.5秒とした。

DNAの変形を定量化するため慣性半径 $R_g(t)$ を次のように決めた。

$$R_g(t) = \frac{3}{2} \int dx dy I(x, y, t) [(x - x_g)^2 + (y - y_g)^2]^{1/2} \quad (2.5)$$

係数3/2は焦点面と垂直の方向の分子の広がりを、焦点面上と同じであると仮定してつけた。

4. マスク作成: 次の時間ステップで取り込む画像のノイズを除去するためのマスクを作成する。前項で計測した二値化画像に対して8近傍画像膨張を5回行なって作成した。
5. 次画像取り込み: 次の時間ステップの画像の取り込みを行なう。本実験では0.1秒おきに画像の取り込みを行なった。
6. マスキング処理: 取り込んだ未処理の画像と、前の時刻の画像から作成したマスクの論理積をとる。この処理によって0.1秒前にDNAがいた場所から5画素の範囲にある輝点のみがのこる。この操作は、0.1秒の間にはDNAの変形や移動が5画素(約0.08 μm)以内である、という観測に基づいて行なった。

Table 2.1 The center-of-mass velocity v_x and the radius of gyration R_g of T4 DNA under various field strength E .

E (V/cm)	$\overline{v_x}$ ($\mu\text{m/s}$)	$\overline{R_g}$ (μm)
2.0	0.84 ± 0.26	3.23 ± 0.66
4.0	2.70 ± 0.43	3.27 ± 0.75
6.0	4.23 ± 0.71	3.68 ± 0.97
8.0	6.88 ± 0.97	4.77 ± 1.53

■ 2.4 結果：DNA 分子の周期的運動

泳動速度と慣性半径の、時間集団平均を表 2.1 に示す。平均泳動速度 $\overline{v_x}$ の値は、通常分離に用いられるマクロスケールのゲル電気泳動の実験で報告されている値とよくあっている。Shikata と Kotaka³⁸⁾ は、T4DNA が 7.5V/cm の定常電場のもとで $4\mu\text{m/s}$ の平均泳動速度を示す、と報告している。このことは本実験の観察が実際分離環境に近い条件で行なわれていることを意味する。直接観察のために加えた蛍光色素による DNA の物性の変化、ガラス界面や電極間距離などのシステムサイズの影響などは無視できるとみなせる。

図 2.5 に DNA の観察像のスナップショットと、そこから画像解析で得られた重心の位置 x_g 、慣性半径 R_g の時間変化を示す。これらの結果から、DNA の動きはおおまかに以下のような特徴があることがわかる。

1. DNA は球状のランダムコイルの状態にある。(1)
2. DNA がゲルに阻まれて変形をはじめ。(2)
3. 変形のために DNA は徐々に V 字型とよばれる特徴的な形をとる。(3)
4. V 字型の腕のバランスがくずれ、長い腕が短い腕を引っ張りあげていく。(4)
5. 短い腕が消滅する。このとき DNA の伸びが最大になる。(5)

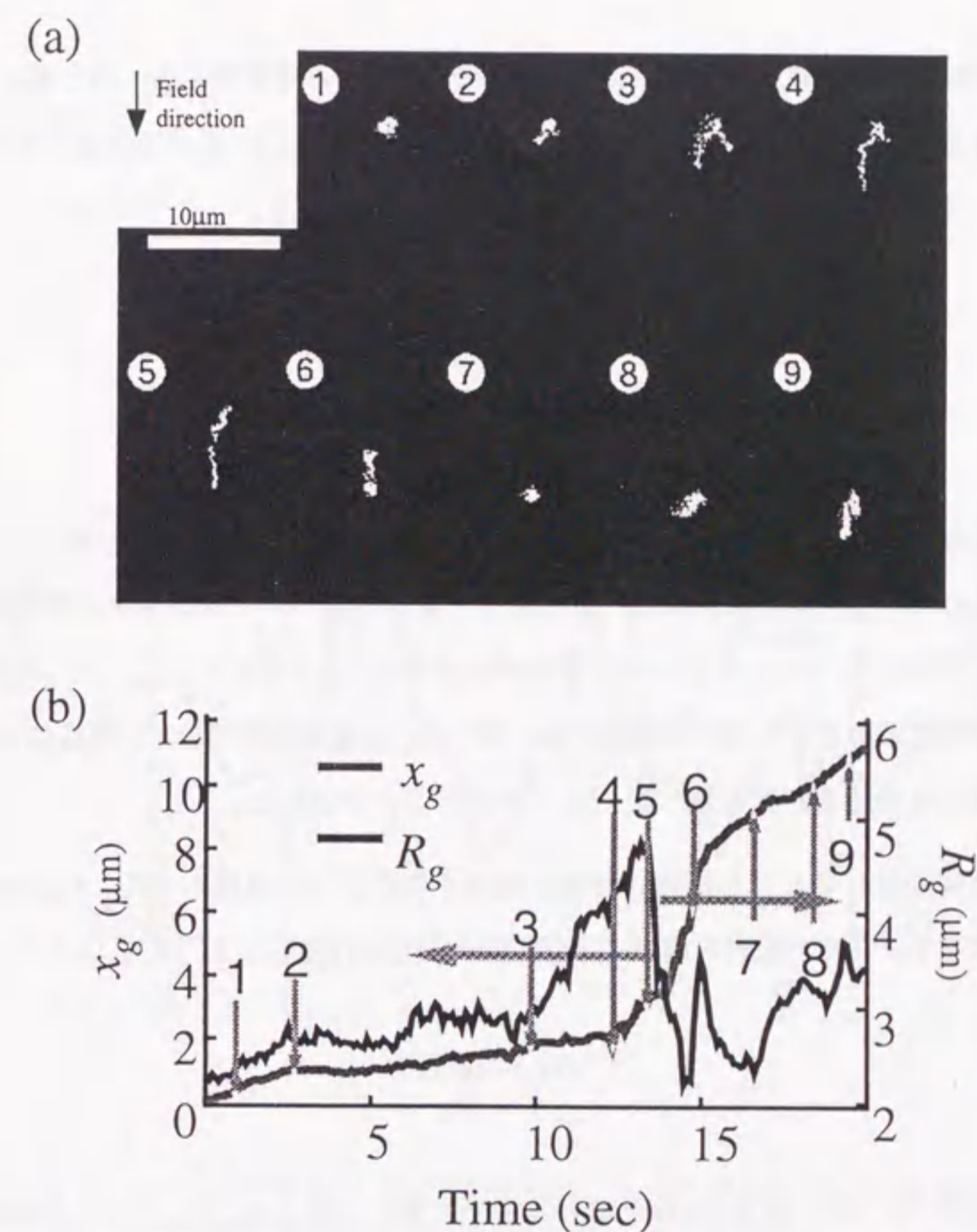


Figure 2.5 (a) An example of sequential snapshots of DNA during steady field gel electrophoresis and (b) time development of the position of center of mass x_g and radius of gyration R_g obtained by the images. The experimental conditions are: agarose gel 1.0wt%, steady field 4V/cm, T4DNA 166kbp, 0.5×TBE buffer, fluorescent dye ethidium bromide. The number on the top of each snapshot of (a) corresponds to one on the figure (b). The time origin is arbitrary.

6. はずれた腕が前方の腕に急速に縮んで追いつき、DNA はランダムコイル状態に戻る。
このとき泳動速度が最大になる。(6)(7)

この伸縮運動は周期的に繰り返される。図 2.6 は v_x と R_g の時間変化の一例である。DNA の伸縮運動を反映して、 v_x も R_g も周期的に増減を繰り返す。 v_x と R_g の時間変化を子細に議論するため、時間自己相関関数 $C_{aa}(t)$ を以下のように計算した。

$$C_{aa}(t) \equiv \frac{\int (a(t+t') - \bar{a})(a(t') - \bar{a}) dt'}{\int (a(t') - \bar{a})^2 dt'} \approx \frac{\sum_i (a(t_i+t) - \bar{a})(a(t_i) - \bar{a})}{\sum_i (a(t_i) - \bar{a})^2} \quad (2.6)$$

ここで a は物理量を示す。本実験では v_x および R_g について相関関数 C_{vv} および C_{rr} を、まずそれぞれのサンプルごとに計算した。次に全サンプルについて計算された相関関数を電場強度ごとに平均した。8V/cm について得られた結果を図 2.7 に示す。 C_{vv} 、 C_{rr} のどちらもあきらかな振動的挙動を示しながら減衰する。図 2.8 に各電場強度での C_{rr} の振舞いを示した。振動の周期は電場強度が強いほど短くなっていることが分かる。

この相関関数に見られる振動の特征的時間を次のように見積もった。 C_{rr} がはじめて 0 になる時間を t_0 とし、“振動の周期 (periodicity of oscillation)” τ を以下のように定義する。

$$\tau \equiv 4t_0 \quad (2.7)$$

τ の各電場強度での値を図 2.8 から上記の方法で計算して図 2.9 に示した。 τ は電場強度 E に対して $\tau \propto E^{-1.1}$ の依存性を持つ。

Larsson と Åkerman⁹¹⁾ は DNA の伸縮運動を蛍光顕微鏡で本実験とは異なった方法で見積もった。彼らは DNA の縮んだ状態に注目し、縮んだ状態の間の時間を計測して、DNA の運動の特征的時間を見積もった。彼らの値は 3-4 倍程度本実験で得られた値よりも大きい。電場強度依存性は $\tau \propto E^{-1.2}$ で本実験の結果と近い。運動の特征的時間の絶対値としての差の原因は分からないが、電場強度依存性が同様であることから見て、本質的には同じ時間を観察しているものと考えられる。

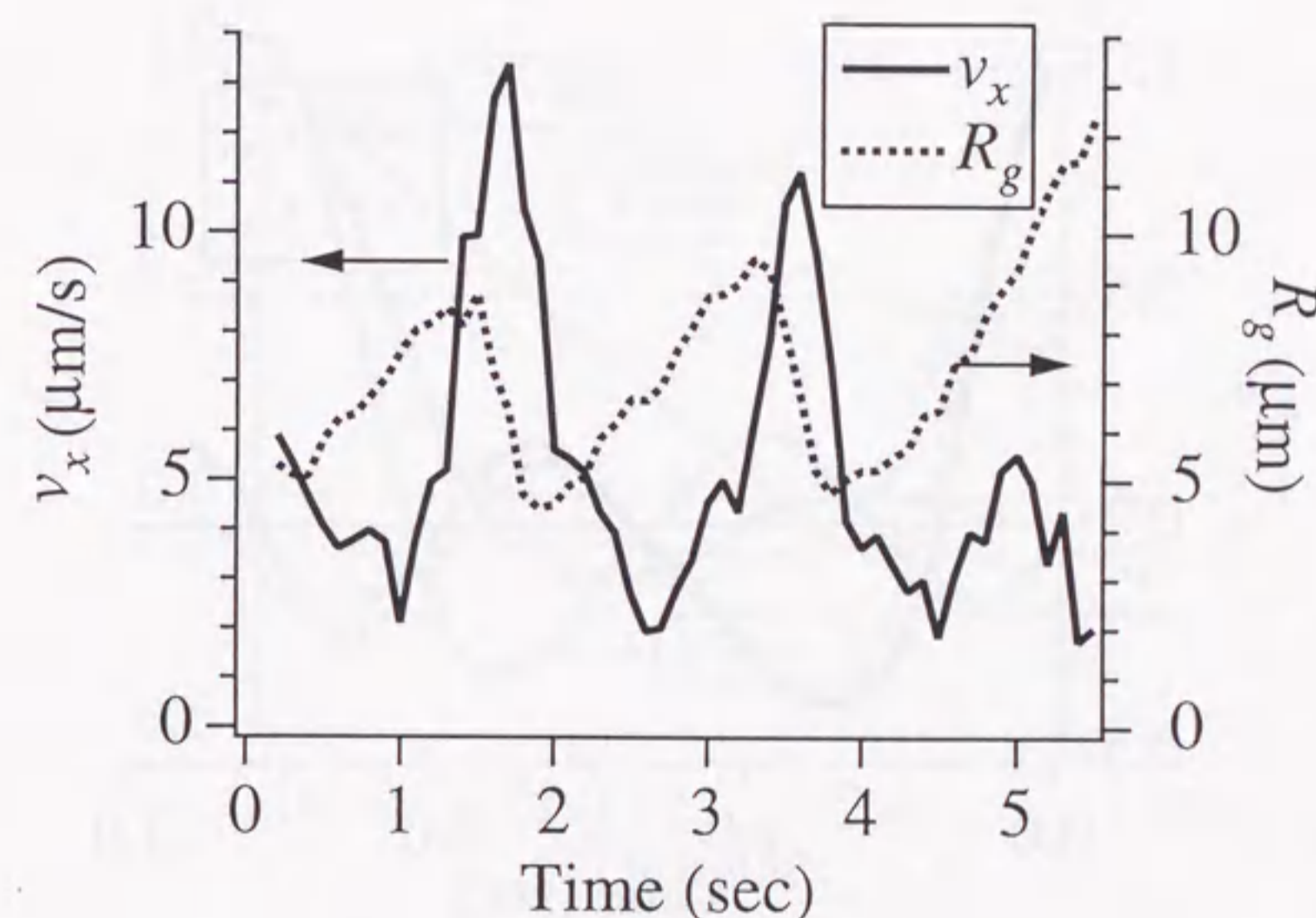


Figure 2.6 An example of the time development of v_x and R_g of T4 DNA during steady field gel electrophoresis. The field strength is 8 V/cm.

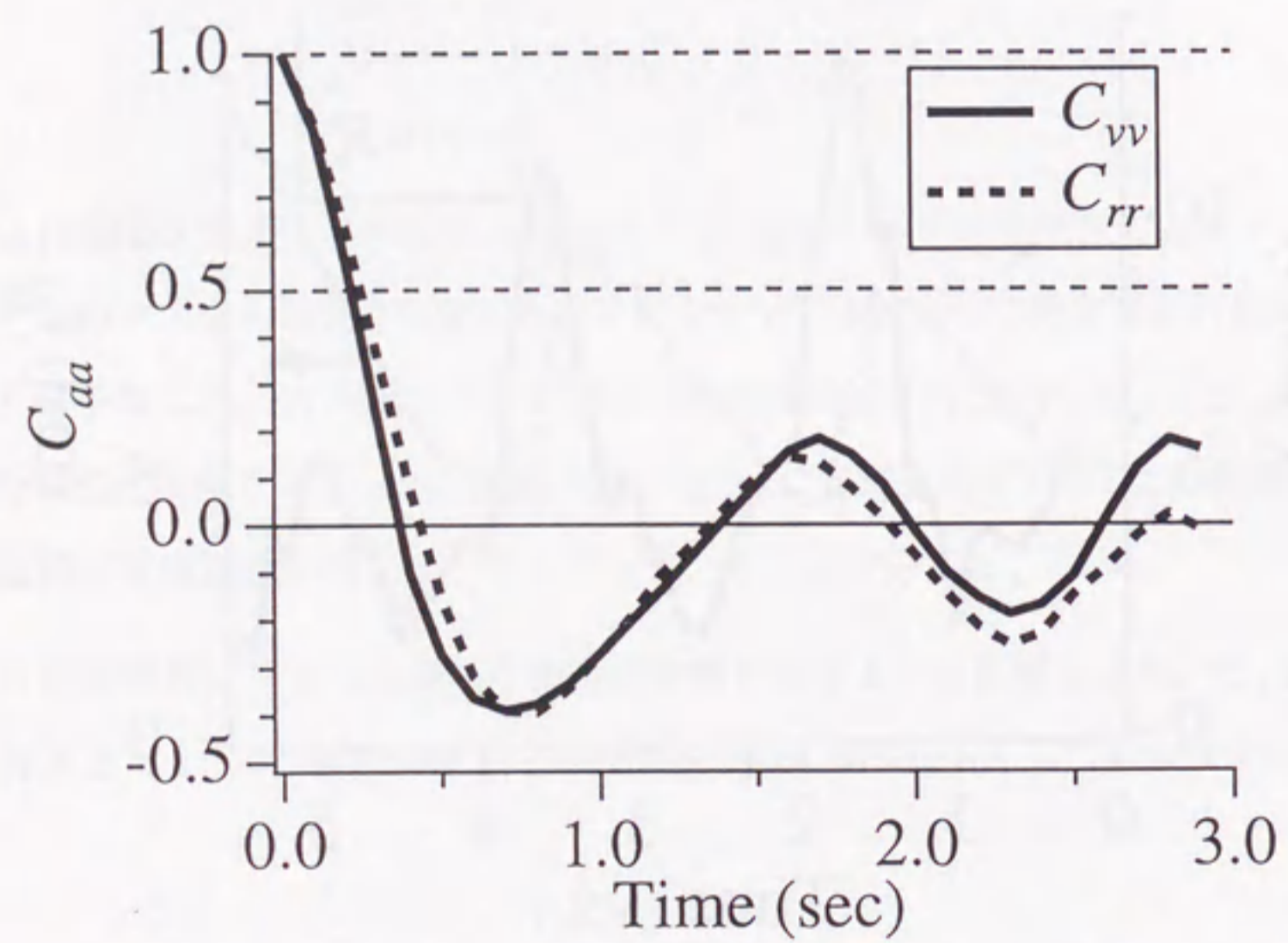


Figure 2.7 Ensemble average of autocorrelation functions of $v_x(t)$ and $R_g(t)$.

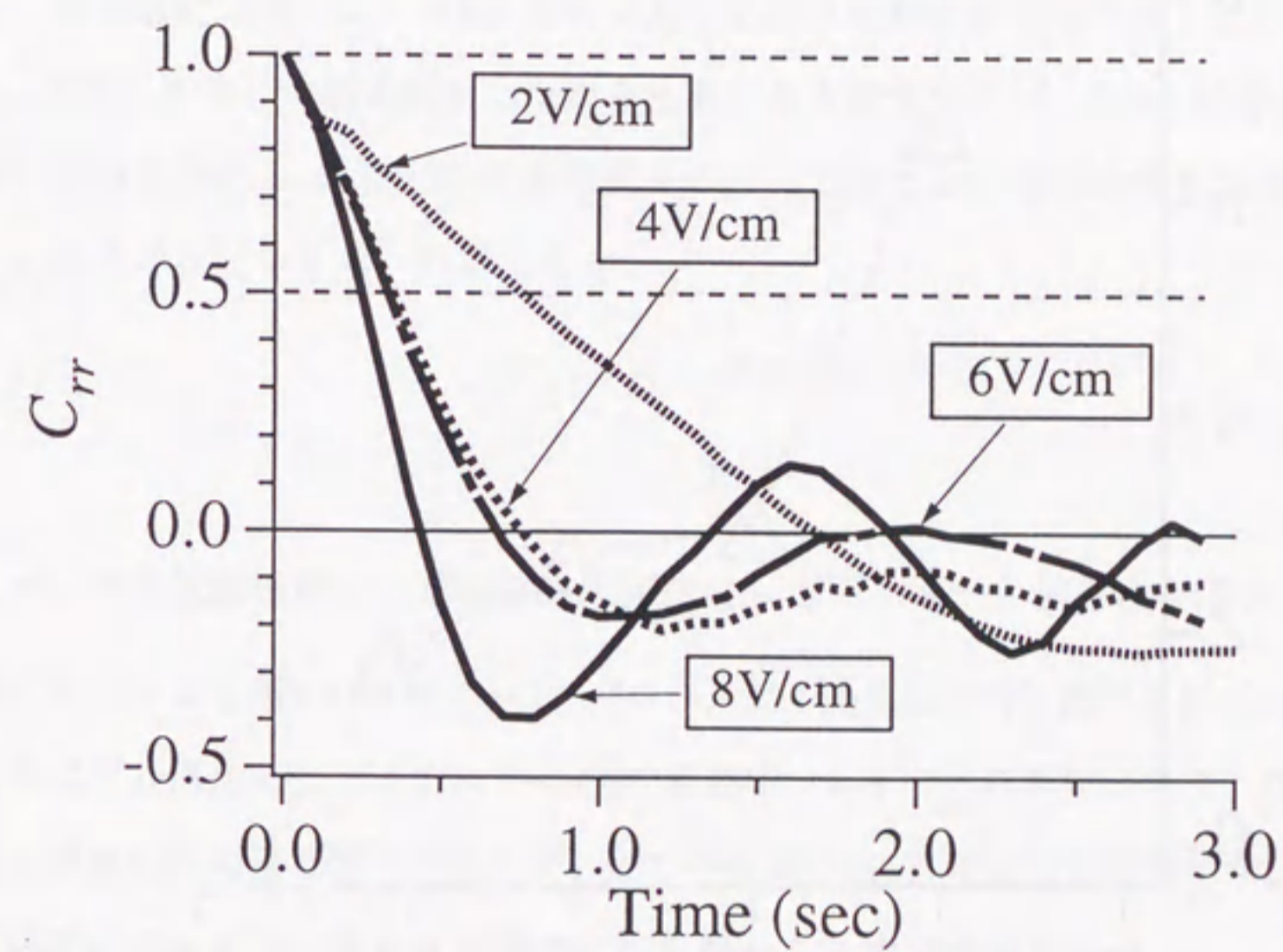


Figure 2.8 Ensemble average of auto-correlation functions of $R_i(t)$ under various E . $C_{gel} = 0.9\text{wt}\%$.

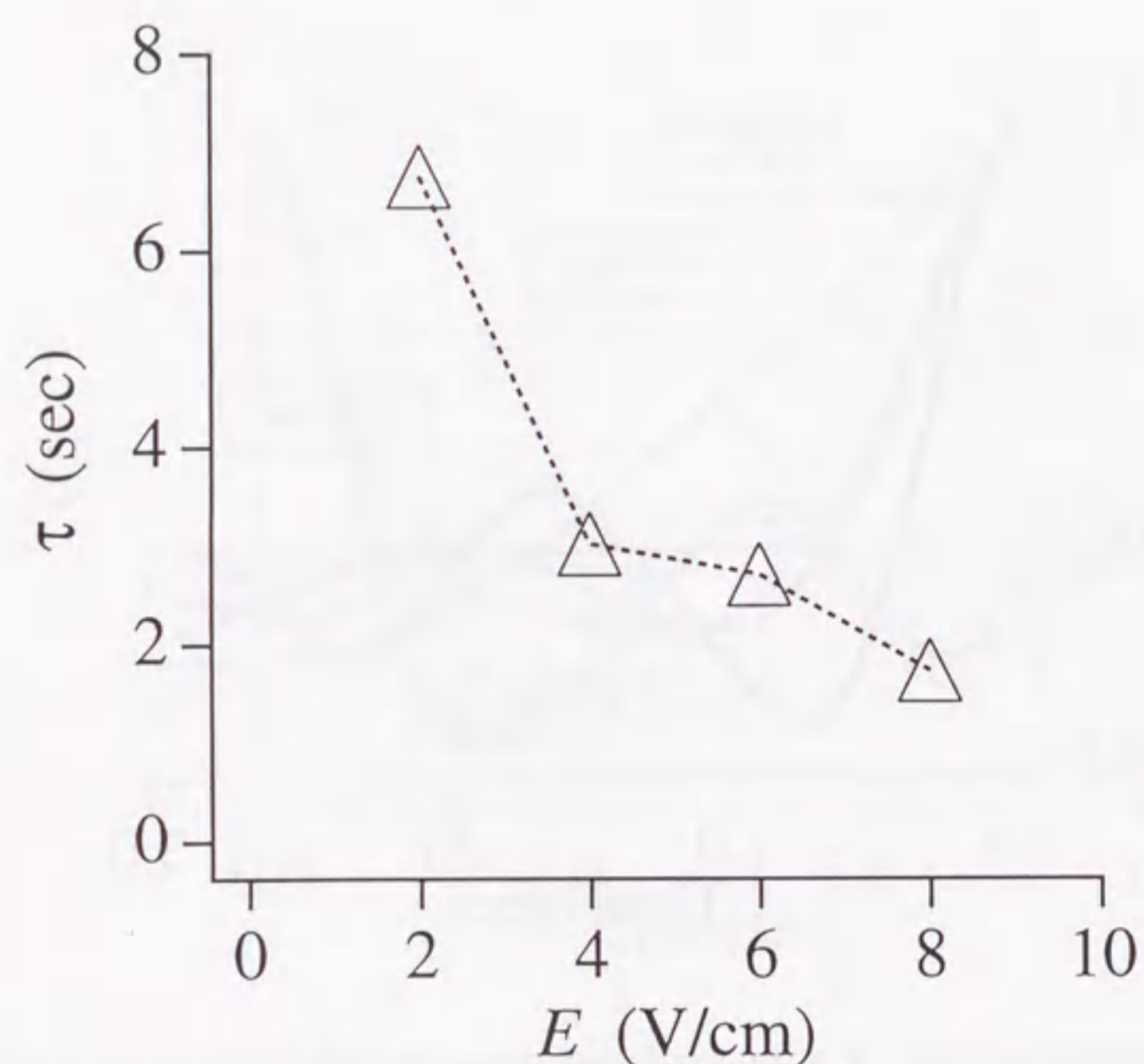


Figure 2.9 Oscillation period τ estimated from C_{RR} plotted against E . $C_{gel} = 0.9wt\%$.

■ 2.5 考察

◇ 2.5.1 伸縮運動と泳動速度

DNA の定常電場下での泳動速度は DNA の伸縮運動の特征的時間、特征的長さに直接影響を受ける。電場強度に対する DNA の運動周期 τ の依存性 $\tau \propto E^{-1.1}$ は、電場強度が強いほど DNA の形態変化がたびたび起こり、しかも変形が速いことを示している。さらに表 2.1 に示したように R_g の平均値は電場強度が強いほど大きく、 $\overline{R_g} \propto E^{0.25}$ の依存性をもつことから、電場強度が強いほど DNA が引き延ばされて変形の度合も大きくなっていることが分かる。DNA が常に伸縮運動をしながら泳動すると仮定すれば、DNA の泳動速度は i) 変形運動の特征的時間と ii) 変形の特征的長さの二つで決まる。変形の高さ $\overline{R_g}$ を運動周期 τ で割ると速さの次元をもち、計算すると

$$\begin{aligned} \overline{R_g}/\tau &\propto E^{0.25}/E^{-1.1} \\ &\propto E^{1.35} \end{aligned} \quad (2.8)$$

となって、平均泳動速度 $\overline{v_x}$ の電場強度依存性 $\overline{v_x} \propto E^{1.5}$ にちかい依存性を示す。

同じシステムを用いた実験で τ のアガロースゲル濃度依存性も調べられている¹⁸⁾。Oana らによればゲル濃度 C_{gel} が 0.75~1.5wt% の範囲で、 $\tau \propto C_{gel}^{0.9}$ の関係があり、DNA の伸びの最大値を速度の平均値で割ったものが、全ての条件で τ に非常に近い値を示す。DNA の運動の特征時間については、簡単な理論モデルを用いて 3 章で議論する。

◇ 2.5.2 伸縮運動の周期性

DNA の伸縮運動が周期性を見せることは直観的には理解しづらい。DNA の回転緩和時間はここで見られる運動周期に比べて長く、また電場強度依存性、ゲル濃度依存性を説明しづらい。ゲルの構造から考えても平均的な編目の大きさは DNA の持続長程度であり、ゲルの構造の不均一性に由来するものでないことは計算機シミュレーションで示されている⁸³⁾。実験的、解析的な手法による要因でないことは、前の 2.5.1 節で平均速度との関係を議論することで示した。

DNA の伸縮運動の周期性を特徴づけるのは $R_g(t)$ および $v_x(t)$ の相関関数の減衰振動

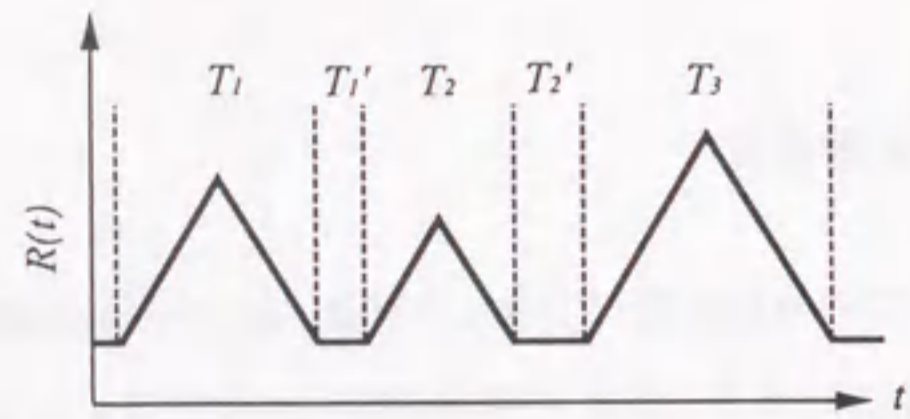


Figure 2.10 Schematic picture of the model function of time development of DNA extension $R(t)$ for calculation of the auto-correlation function.

であるが、これがなぜ現れるのかを考える。DNA の伸び $R(t)$ のモデル関数を仮定し、その相関関数を計算することで減衰振動の特性を理解する。 $R_g(t)$ の時間変化は DNA の V 字型の変形を反映した、鋸型の波の連なりであるが、このピーク付近を取り出すと電場強度、ゲル濃度によらずほぼ完全に相似形であることが分かっている¹⁸⁾。そこで伸び $R(t)$ として図 2.10 のような関数を定義する。各鋸波の大きさ T 及び鋸波の間隔 T' は以下のような確率分布に従うと仮定する。

$$P(T) = (2\pi\Delta^2)^{-1/2} \exp\left[-\frac{(T-\bar{T})^2}{2\Delta^2}\right] \quad (2.9)$$

$$P(T') = \lambda \exp(-\lambda T') \quad (2.10)$$

ここで \bar{T} は鋸波の平均幅、 Δ^2 はその分散、 $1/\lambda$ は鋸波の間隔の平均値を示している。

このモデル関数の時間自己相関関数を考える。 Δ^2 と $1/\lambda$ がともに 0 ならば $R(t)$ は完全な周期関数になるので、時間自己相関関数を計算すると、時間による減衰のない振動関数になる。 Δ^2 と $1/\lambda$ のいずれか、あるいは両方が増加するにつれて時間とともに減衰が見られるようになる。 Δ^2 と $1/\lambda$ を変えて計算した相関関数を図 2.11 に示す。 Δ/\bar{T} が 0.5 の場合でも振動が見られる。この計算の詳細は付録 2.6 に記した。

実際の系では Δ や $1/\lambda$ は何に対応するのだろうか。1.8 節で紹介したシミュレーションでも DNA の運動の周期性が調べられている。Matsumoto ら⁸³⁾ は非線形バネ、乱雑配位障害物を用いたブラウンアインダイナミクス (Brownian Dynamics) シミュレーションを行ない、モデル鎖の末端間距離、重心の速度、慣性半径について時間自己相関関数を計算した。その結果では、鎖長 100 以上の鎖では相関関数は本実験と同様の減衰振動をみせ、鎖長 20 の短

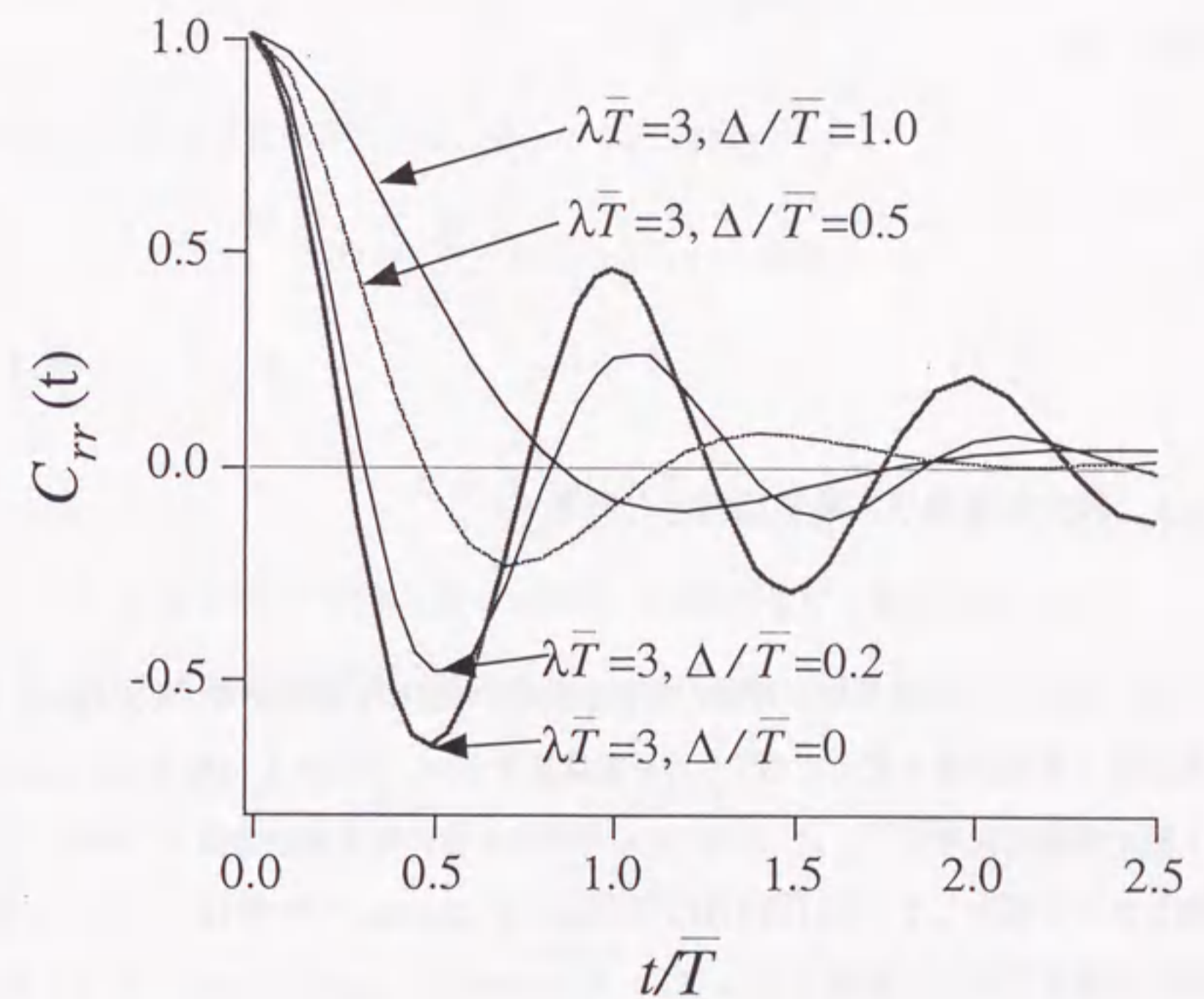


Figure 2.11 Autocorrelation functions of the model function of time development of DNA extension $R(t)$.

鎖では相関関数は指数関数的に減衰するのみで、振動は見られていない。Matsumotoらはゲル濃度を変えた計算も行っており、ゲル濃度が薄い場合には長い鎖の場合でも相関関数には振動的挙動は見られないと報告している。ゲル濃度が薄い状況ではDNAの変形のためのゲルとの接触の機会が減る。つまり式2.10において $1/\lambda$ が大きくなることに対応する。また Δ はDNAのどの部分が引かれるか、ということに対応する。端に近い部分が引かれれば伸縮は小さく、中央に近い部分が引かれれば伸縮は大きくなる。これについては3章で議論する。

◇ 2.5.3 非定常電場ゲル電気泳動との関係

1.4節で触れた反共鳴現象とDNAの伸縮運動との関係を議論する。Kobayashiら⁴²⁾は反転電場法で電場強度を変えてDNAの泳動速度を測り、T4DNAの場合 $E=15.4\text{V/cm}$ では約3秒の電場変動時間で、 $E=7.72\text{V/cm}$ では約8秒の電場変動時間で、それぞれ反共鳴が観察されると報告している(図1.7)。ShikataとKotaka^{20,38-40)}はバイアス正弦電場法で同様の実験を行ない、電場 $E(t) = E_b + E_s \sin 2\pi ft$ で $E_b=7.5\text{V/cm}$ 、 $E_s=12.5\text{V/cm}$ の条件では $1/f$ が約2.5秒で、また $E_b=2.5\text{V/cm}$ 、 $E_s=7.5\text{V/cm}$ の条件では $1/f$ が約8秒で、それぞれ反共鳴が観察されると報告している(図1.8)。彼らはまた反共鳴条件の実験パラメータ依存性を1.4節で紹介したように $f_p \propto C_{gel}^{-1} N^{-1} E_b$ と報告している⁴⁰⁾。

定常電場ゲル電気泳動におけるDNAの伸縮の周期 τ は、これらの実験で得られている反共鳴条件での電場の変動時間に非常に近い値であり、また電場強度依存性、ゲル濃度依存性も定性的によい一致を見せる。これらのことはDNAの伸縮運動が非定常電場ゲル電気泳動中のDNAの泳動挙動と深いつながりがあることを示唆している。これについては5.6節で詳しく議論する。

■ 2.6 付録：モデル関数の相関関数

本節では、2.5.2節で計算したモデル関数の時間自己相関関数の計算の詳細を述べる。まず図2.10のそれぞれのピークを以下の式で定義する。

$$f(t; T) = \begin{cases} 0 & t < 0, \\ t & 0 < t < T/2, \\ T-t & T/2 < t < T, \\ 0 & T < t. \end{cases} \quad (2.11)$$

ここで傾き df/dt は T に依存しない。従ってモデル関数 $R(t)$ は

$$R(t) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} f(t-t_n; T_n) + \text{const.} \quad (2.12)$$

のように書ける。ここで

$$t_n = \sum_{m=0}^{n-1} (T_m + T'_m) \quad (2.13)$$

であり、 T_n と T'_n はそれぞれ確率分布が2.9式と2.10式で書ける確率変数である。

この $R(t)$ の相関関数を計算するためにフーリエ変換を行なう。

$$\begin{aligned} R(\omega) &= \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{i\omega t} R(t) \\ &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} e^{i\omega t_n} f(\omega; T_n) \end{aligned} \quad (2.14)$$

ここで

$$\begin{aligned} f(\omega; T) &= \int_{-\infty}^{\infty} dt e^{i\omega t} f(t; T) \\ &= \frac{1}{\omega^2} (2e^{i\omega T/2} - e^{i\omega T} - 1). \end{aligned} \quad (2.15)$$

である。従って

$$\begin{aligned} \langle |R(\omega)|^2 \rangle &= \sum_{n,m} \langle e^{i\omega(t_n-t_m)} f(\omega; T_n) f^*(\omega; T_m) \rangle \\ &\equiv \sum_{n,m} I(n, m). \end{aligned} \quad (2.16)$$

である。式 2.16 の右辺は $n - m$ の差のみに依存し、 T_n と T'_n が互いに独立であるとすれば計算できる。 $n > 0$ の場合について

$$\begin{aligned} I_n &= \langle \exp \left[i\omega \sum_{m=0}^{n-1} (T_m + T'_m) \right] f(\omega; T_n) f^*(\omega; T_0) \rangle \\ &= \langle e^{i\omega T'} \rangle^n \langle e^{i\omega T} \rangle^{n-1} \langle e^{i\omega T} f^*(\omega; T) \rangle \langle f(\omega; T) \rangle. \end{aligned} \quad (2.17)$$

である。これを 2.16 式に代入すると

$$\langle |R(\omega)|^2 \rangle = \langle |f(\omega; T)|^2 \rangle + 2\text{Re} \left[\frac{\langle e^{i\omega T'} \rangle \langle e^{i\omega T} f^*(\omega; T) \rangle \langle f(\omega; T) \rangle}{1 - \langle e^{i\omega T} \rangle \langle e^{i\omega T'} \rangle} \right]. \quad (2.18)$$

となる。式 2.18 の (...) で表される平均は式 2.9 と式 2.10 より得られる。これらの結果を次式に代入する。

$$C_{rr}(t) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{d\omega}{2\pi} e^{-i\omega t} \langle |R(\omega)|^2 \rangle, \quad (2.19)$$

これを数値的に計算して図 2.11 を得る。

第 3 章

定常電場での伸縮運動の数理解析

■ 3.1 はじめに

1.7 節や 2 章で触れたように、DNA 分子は定常電場ゲル電気泳動中に周期的な伸縮運動を示す。これは DNA がゲル繊維に絡み合うことでおきる。DNA は等方的な状態と伸びた状態を交互に繰り返して泳動するが、図 1.11 のように伸びた状態にある時しばしば観察されるのが V 字型の形態である。

DNA はゲル中を泳動していくとゲル繊維に引っかかる。引っかかった場所はゲルに固定されて動かないが、それ以外の場所は電場によって動かされる。V 字型はその結果としてできる。V 字型の片方の腕が完全に伸び切ると、長い方の腕が短い方の腕を引っ張って、DNA はゲル繊維からはずれる。DNA はゲル繊維からはずれると急速に縮む。

このように DNA の伸縮運動は V 字型の形態が成長して消滅するまでの過程そのものである。この V 字型の頂点の部分はゲル繊維によって固定されており、V 字型が外れるまで動くことはない。多数のゲル繊維があるにも関わらず、あたかもたった一つの繊維によって DNA の動きが支配されているように見える。

このような観察に基づき、この節では単純な場合として、一つの障害物に DNA が引っかかっている状態を考える¹⁹⁾。実験との比較でいえば、繰り返される伸縮運動の一つの伸び-縮み過程に注目する (図 3.1)。

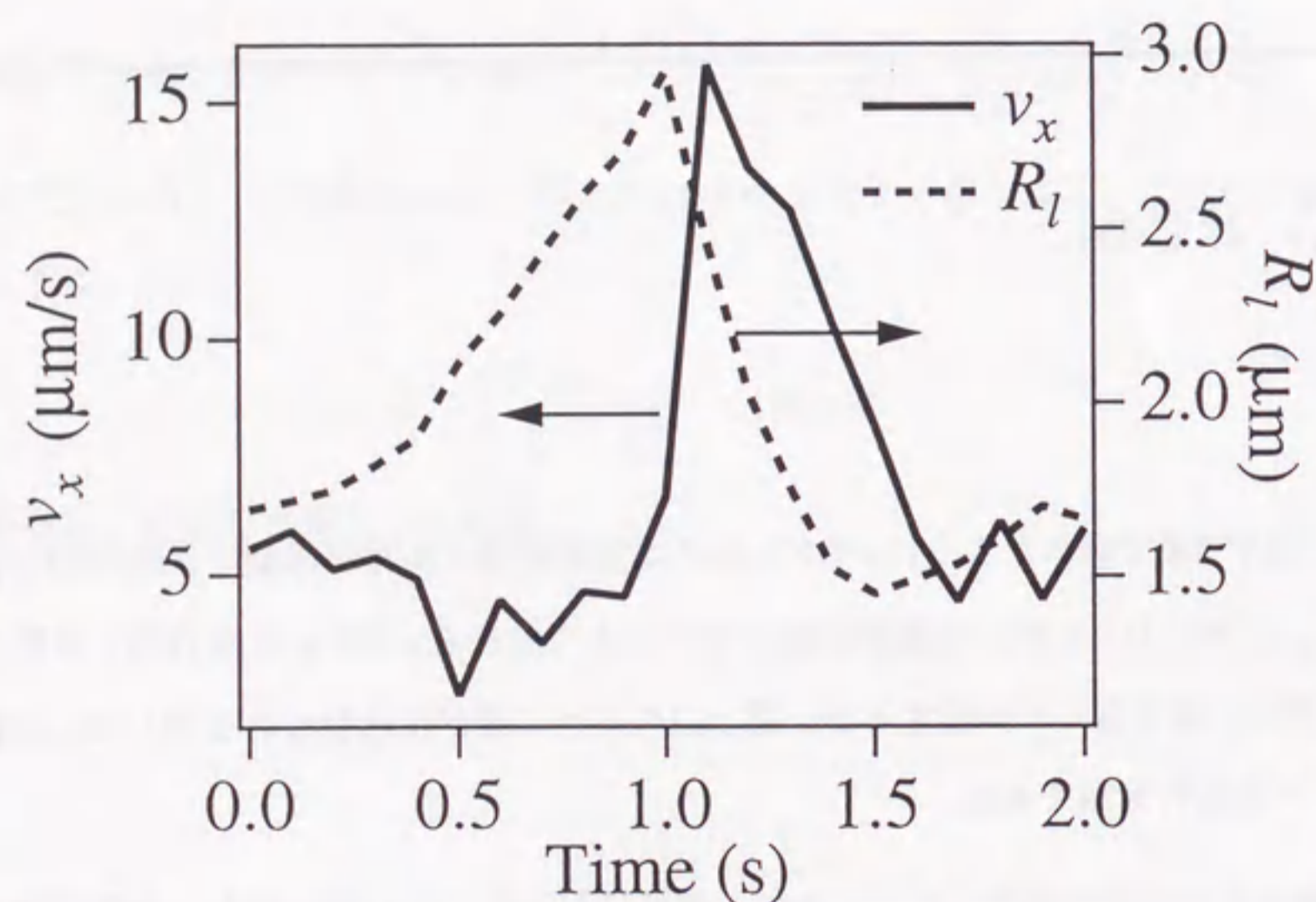


Figure 3.1 An example of the experimental measurement of the time evolution of the spatial expansion $R_l(t)$, and the velocity of the center of mass, $v_x(t)$. The origin of t is arbitrary. The conditions are follows: 0.9wt% agarose gel, 0.5×TBE buffer, T4DNA, field strength 8V/cm, fluorescent dye DAPI. The details are described in section 2.

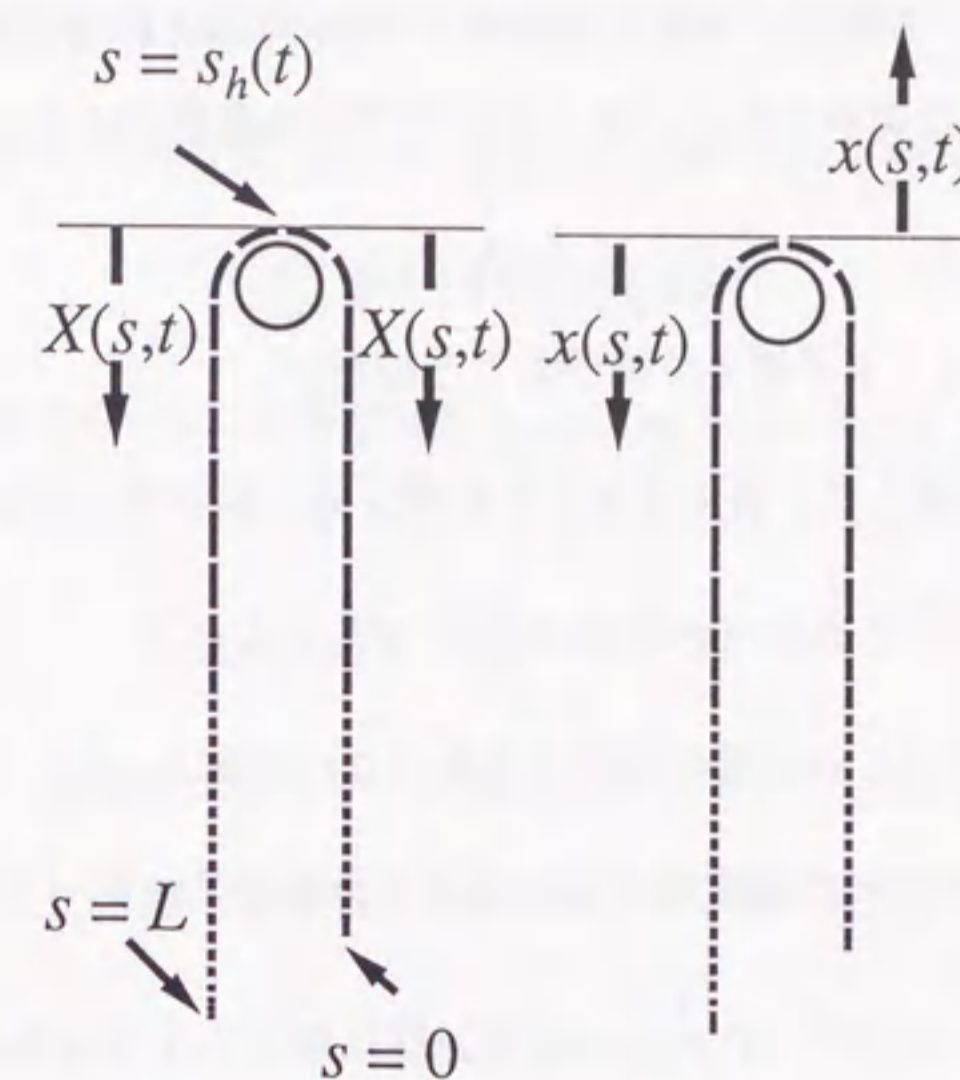


Figure 3.2 The model used in the analysis: An elastic string hanging over an obstacle. The elongation of the string is denoted by the length of the dashes.

■ 3.2 モデル

電場下で運動し、一つの障害物にひっかかる DNA を考える (図 3.2)。電場に対して垂直な方向の運動は考えず、電場方向へ時間とともに DNA がどのように変形していくかに注目する。DNA のセグメントを区別するため、鎖に沿って測った長さ s を用いる。 s は $0 \leq s \leq L$ で、末端 0 から鎖の全長 L までの値をとる。セグメント s とは、DNA の鎖に沿って端から測った距離が s の場所にある DNA の要素を示す。障害物の位置を原点として電場に沿った方向の座標を X とし、時間 t におけるセグメント s の位置を $X(s, t)$ とあらわす。

DNA 上の張力は、DNA の伸び率 (elongational ratio) λ で与えられ、 λ は以下のように定義される。

$$\lambda(s, t) = \frac{\partial X(s, t)}{\partial s} \quad (3.1)$$

ガウス鎖では張力は λ に比例し、以下ようになる。

$$f = k\lambda \quad |\lambda| \ll 1 \quad (3.2)$$

しかし後に示すように、現実のゲル電気泳動においては DNA は伸び切りに近い状態にあり、ガウス鎖の仮定 $\lambda \ll 1$ は適当でない。そこで以下では非線形バネモデルを仮定する⁹²⁾。

$$f = k \frac{\lambda}{1 - |\lambda|} \quad (3.3)$$

このモデルでは鎖は $|\lambda| = 1$ を越えて伸びることはない。

次に運動方程式を考える。各セグメントに働く力には次の三つがある。

1. 鎖の伸びによる力。これは f の勾配 $\partial f / \partial s$ で与えられる。
2. 電場から受ける力。これは鎖の単位長さあたりの電荷を q として qE と書ける。
3. 溶媒から受ける粘性抵抗。鎖の単位長さあたりの摩擦係数を ζ として $\zeta \partial X / \partial t$ と書ける。

慣性項は無視できるので、 $X(s, t)$ の時間発展は以下のような釣合の式で与えられる。

$$-\zeta \frac{\partial X}{\partial t} + \frac{\partial f}{\partial s} + qE = 0 \quad (3.4)$$

式 3.3、3.4 は $X(s, t)$ についての非線形拡散方程式をあたえる。

これを解くためには境界条件と初期条件が必要である。初期条件として、時刻 $t = 0$ で全てのセグメントについて $X = 0$ を仮定する。そして s_{h0} に位置するセグメントが障害物の上に触れているとする。つまり $0 \leq s \leq s_{h0}$ の部分は障害物の右側に、 $s_{h0} \leq s \leq L$ の部分は障害物の左側にそれぞれ位置するとする。

この障害物に触れているセグメントを、引っかかりセグメント (hanging segment) と呼ぶことにする。時間 t における引っかかりセグメントは $s_h(t)$ と書ける。初期条件は $s_h(t) = s_{h0}$ であるが、鎖が障害物上を滑り落ちていくに従って $s_h(t)$ も時間とともに変化していく。

$s_h(t)$ の時間発展を決めるには境界条件が必要である。明らかに

$$X(s_h(t), t) = 0 \quad (3.5)$$

を満たす。さらにここでは、鎖が障害物上を滑る際に、障害物と鎖の間には摩擦は働かないとする。そのような状況では $s_h(t)$ で鎖の張力は連続である。つまり

$$f(\lambda)|_{s=s_h(t)-0} = -f(\lambda)|_{s=s_h(t)+0} \quad (3.6)$$

である。式 3.5 と 3.6 が $s_h(t)$ の時間発展を決める。

鎖の両端でも境界条件が必要である。両端は自由端であるから、 $f(\lambda) = 0$ または

$$\frac{\partial X}{\partial s} = 0 \quad \text{at } s = 0 \text{ and } L \quad (3.7)$$

である。ここまでの式 3.4~3.6 には移動境界 (moving boundary) が含まれているが、以下のような手続きで取り除くことができる。いま新たに $x(s, t)$ を以下のように定義する。

$$x(s, t) = \begin{cases} -X(s, t) & s < s_h(t) \\ X(s, t) & s > s_h(t) \end{cases} \quad (3.8)$$

これは障害物の右側にあるセグメントの座標を反転させたことに等しい (図 3.2 を参照)。

$s < s_h(t)$ のセグメントに対しては、 $x(s, t)$ についての方程式は

$$-\zeta \frac{\partial x}{\partial t} = +f \left(-\frac{\partial x}{\partial s} \right) + qE \quad (3.9)$$

$$= -f \left(\frac{\partial x}{\partial s} \right) + qE \quad (3.10)$$

となる。これは $s < s_h(t)$ のセグメントについて、電荷を反転させたことに等しい。

一方、 $s > s_h(t)$ のセグメントについては方程式は変わらないので、式 3.4 は $x(s, t)$ で以下のように書き直される。

$$\frac{\partial x}{\partial t} = \frac{1}{\zeta} \frac{\partial}{\partial s} f \left(\frac{\partial x}{\partial s} \right) + v_0 \text{sign}(s - s_h(t)) \quad (3.11)$$

ここで $v_0 = qE/\zeta$ は自由空間中での泳動速度で、

$$\text{sign}(x) = \begin{cases} 1 & x > 0 \\ -1 & x < 0 \end{cases} \quad (3.12)$$

である。 $\partial x / \partial s$ は $s = s_h(t)$ で連続であるから、 $s_h(t)$ にたいして特別な取り扱いは不要であり、ここでの境界条件は考慮する必要がない。 $x(s, t)$ は式 3.11 を以下のような初期条件、境界条件のもとで解けば決まる。

$$x(s, 0) = 0 \quad (3.13)$$

$$\frac{\partial x}{\partial s} = 0 \quad \text{at } s = 0 \text{ and } L \quad (3.14)$$

さらに引っかかりセグメントは以下の条件で決まる。

$$x(s_h(0), t) = 0 \quad (3.15)$$

最終形として、式 3.11 を伸び率 λ で書きなおすと以下のようになる。

$$\frac{\partial \lambda}{\partial t} = \frac{1}{\zeta} \frac{\partial^2}{\partial s^2} f(\lambda) + 2v_0 \delta(s - s_h(t)) \quad (3.16)$$

この式は $s_h(t)$ に湧きだしをもつ非線形拡散方程式になっている。

■ 3.3 結果

◇ 3.3.1 微弱電場の場合

はじめに微弱電場の場合を考える。具体的には、全てのセグメントについて式 3.2 の応力ひずみ関係が成り立つ場合を考える。鎖が長い場合には、このような状況は電場が極端に弱くないと実現しないということは注意されるべきである。なぜならば引っかかりセグメントにかかる張力は qEL のオーダーであり、 $|\lambda|$ が小さいためには以下の条件を満たさなくてはならないからである。

$$qEL/k \ll 1 \quad (3.17)$$

または以下のように書き換えても良い。

$$E \ll \frac{k}{qL} \quad (3.18)$$

長鎖 DNA では式 3.18 の右辺は非常に小さくなるため、式 3.18 の条件は現実には満たし得ない。とはいえ微弱電場の場合について解析することは、方程式の解の挙動を理解する上で有用である。

式 3.11 に式 3.2 を代入すると、解くべき方程式は

$$\frac{\partial x}{\partial t} = D \frac{\partial^2 x}{\partial s^2} + v_0 \text{sign}(s - s_h(t)) \quad (3.19)$$

ここで $D = k/\zeta$ である。

$t \ll s_{h0}^2/D$ の短い時間の間、引っかかりセグメントは $(s_h(t) = s_{h0})$ で動かない。なぜなら障害物の左右の部分が、それぞれ同じように動くからである。このような場合には解がすぐ得られ、

$$x(s, t) = 2v_0 \int_{s_{h0}}^s ds' \int_0^t dt' G(s' - s_{h0}, t - t') \quad (\text{for } s > s_{h0}) \quad (3.20)$$

ここで

$$G(s, t) = (4\pi Dt)^{-1/2} \exp\left(-\frac{s^2}{4Dt}\right) \quad (3.21)$$

である。引っかかりセグメントが動き出すのは拡散の両端 $s_{h0} + \sqrt{Dt}$ 及び $s_{h0} - \sqrt{Dt}$ が鎖の端に到達した時である。これは t が s_{h0}^2/D の程度でおこる。 $(s_{h0} > L/2$ ならば $(L - s_{h0})^2/D$ の程度であるが、いまは $s_{h0} < L/2$ を仮定する。) これに続く過程の解析には困難があるが、単純なスケーリングによって特徴は明らかになる。次のようなスケールされた変数を導入する。

$$\tilde{x} = \frac{kL}{qE} x, \quad \tilde{t} = \frac{D}{L^2} t, \quad \tilde{s} = \frac{s}{L} \quad (3.22)$$

これによって式 3.19 は次のように書き直される。

$$\frac{\partial \tilde{x}}{\partial \tilde{t}} = \frac{\partial^2 \tilde{x}}{\partial \tilde{s}^2} + \text{sign}(\tilde{s} - \tilde{s}_h(\tilde{t})) \quad (3.23)$$

ここには電場強度 E ははいつてこない。従って、微弱電場の場合には、伸び縮み運動の特徴的時間は電場強度にはよらず、 L^2/D で近似できると結論づけられる。

◇ 3.3.2 強電場の場合

次に次式であらわされる、強電場の極限を考える。

$$\frac{qEL}{k} \gg 1 \quad (3.24)$$

式 3.11 を数値的に解くことは難しくない。結果を図 3.3 に示す。図 3.4 に表したように、結果は明らかに三つの領域に分かれる。

(I) 初期の過程では、引っかかりセグメントは動かず、鎖の動きは片端を障害物に固定されている場合と本質的に同じである。動いていく部分の速度は明らかに v_0 に等しい。図 3.3 に見られるように、解は伸び切った部分と完全に弛緩した部分とからなっており、この二つの部分の境界は明らかに速度 v_0 で動く。式 3.16 の解は次のように分けることができる。

$$\lambda(s, t) = \begin{cases} \psi(s - v_0 t) & s > s_h \\ \psi(s + v_0 t) & s < s_h \end{cases} \quad (3.25)$$

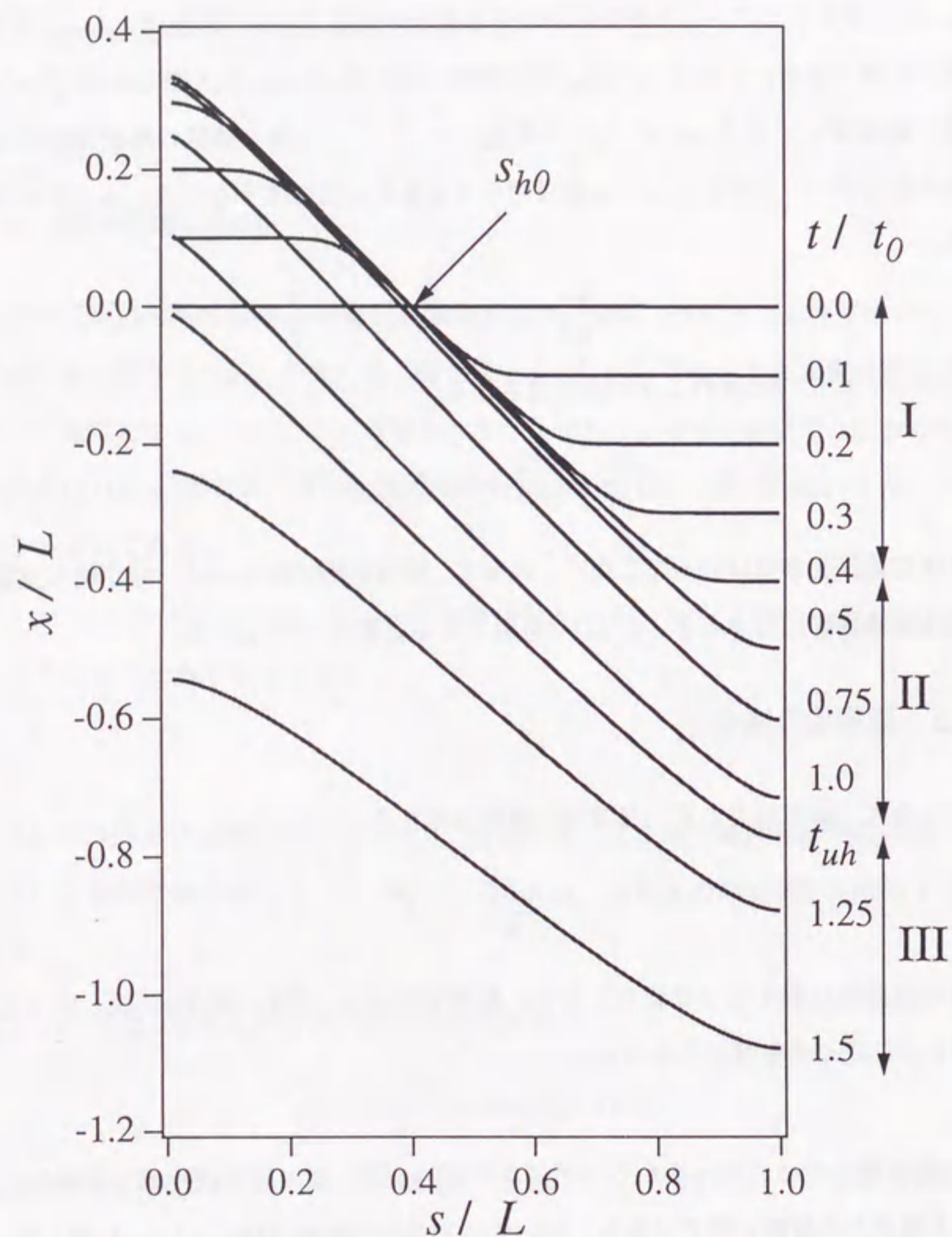


Figure 3.3 The numerical solution of eq.3.16, where $t_0 = L/v_0 = L\zeta/qE$ and $s_{h0} = 0.4L$.

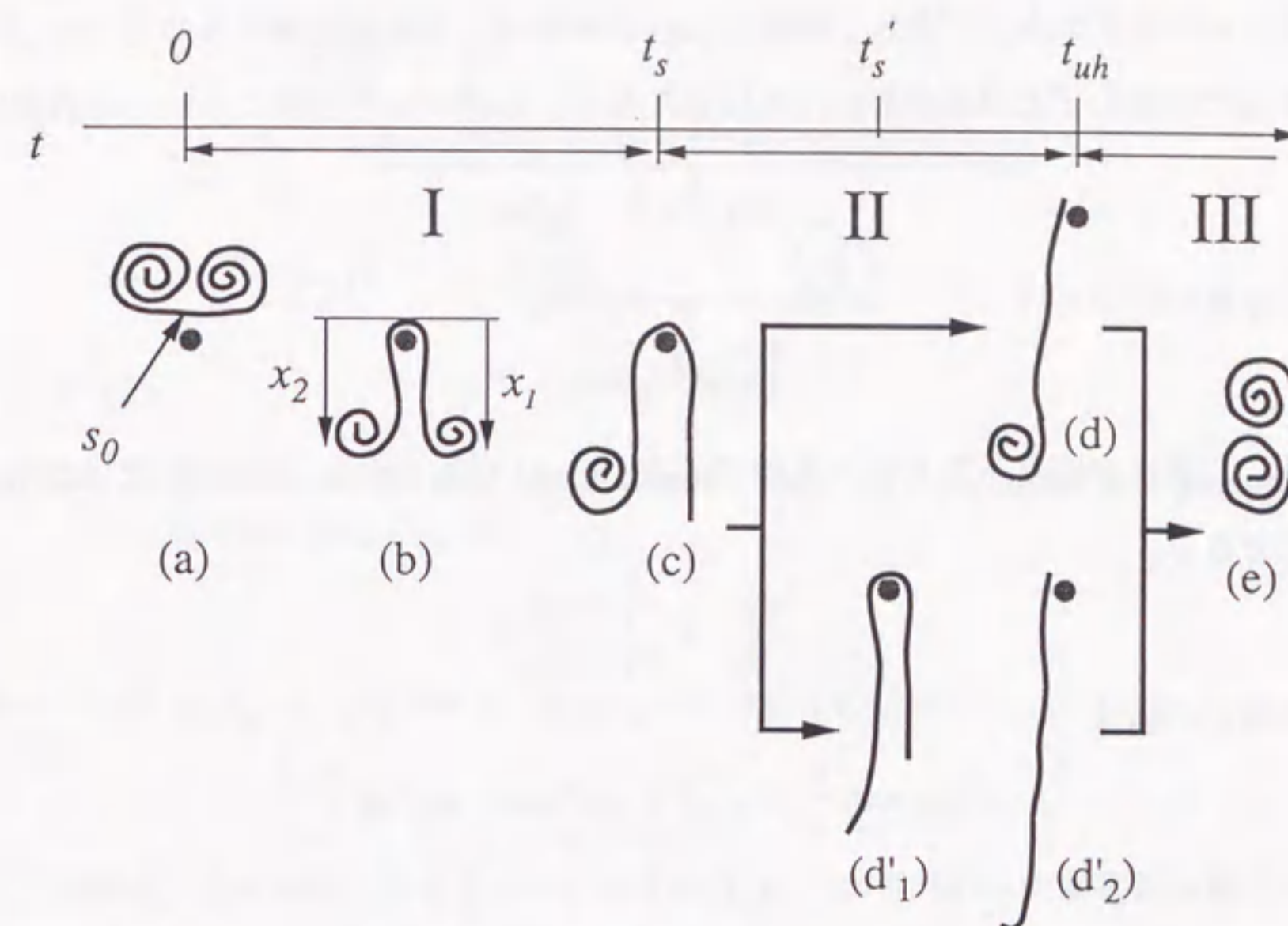


Figure 3.4 The schematic picture of the time evolution of the chain conformation. The explanation is in the text.

ここで $\psi(s)$ は以下を満たす。

$$v_0 \frac{d\psi}{ds} = \frac{k}{\zeta} \frac{d^2}{ds^2} \left(\frac{\psi}{1-\psi} \right) \quad (3.26)$$

この方程式の解は

$$\frac{v_0 \zeta}{k} s = \frac{1}{1-\psi} - \ln \frac{\psi}{1-\psi} \quad (3.27)$$

である。従って λ が 0 から 1 へとかわる遷移領域の幅は $k/v_0\zeta = k/qE$ であり、式 3.24 が満たされる状況では L に比べて十分小さい。ここで障害物の両側から垂れ下がる腕の長さを考える。 $x_1(t)$ 、 $x_2(t)$ をそれぞれ腕の長さとする、この領域 (I) では $x_1(t)$ 、 $x_2(t)$ のどちらも時間に対して線形に増加する。

$$x_1(t) = x_2(t) = v_0 t \quad (3.28)$$

(II) 時刻 $t_s = s_{h0}/v_0$ で、右側の腕は完全に伸び切ってしまう (図 3.4)。そして左側の腕が右側の腕をひっぱりあげはじめる。この領域での運動方程式は次のように求められる。右腕

は速度 $v = -\dot{x}_1$ で引き上げられ、摩擦係数 $\zeta x_1 v$ がかかる。これは電場からの力 qEx_1 及び引っかけり点での張力 T とつり合わなければならない。したがって右腕についての釣合の式は

$$\zeta x_1 v = T - qEx_1 \quad (3.29)$$

同様に左腕については

$$\zeta x_2 v = qEx_2 - T \quad (3.30)$$

である。左腕は自由落下をしているので $x_2(t) = v_0 t$ であるから、式 3.29 と 3.30 は次の式に変形できる。

$$\frac{dx_1}{dt} = \frac{x_1 - v_0 t}{x_1 + v_0 t} v_0 \quad (3.31)$$

この方程式の解は

$$\sqrt{2s_{h0}} \exp \frac{\pi}{4} = \sqrt{x_1^2 + v_0^2 t^2} \exp \left(\arctan \frac{x_1}{v_0 t} \right) \quad (3.32)$$

である。鎖が障害物から外れるのは $x_1(t) = 0$ になったときで、外れるまでの時間 (unhook time t_{uh}) は

$$t_{uh} = \frac{s_{h0}}{v_0} \sqrt{2} \exp \left(\frac{\pi}{4} \right) \quad (3.33)$$

である。

式 3.31 が成り立つのは左腕が伸び切っていない場合に限られることに注意してほしい。時刻 0 のときの引っかけりセグメントが鎖の中央に近い場合には、 t_{uh} よりも早く左腕が伸び切ってしまう (図 3.4(d'1) (d'2))。この場合には t_{uh} の表式は式 3.33 とは異なる。長い方の腕が伸び切る時間 t'_s は式 3.32 で次のように求まる。

$$x_1(t'_s) + v_0 t'_s = L. \quad (3.34)$$

この方程式は以下の条件を満たすとき解をもつ。

$$\left| \frac{s_{h0}}{L} - \frac{1}{2} \right| \leq \frac{1}{2} (1 - \sqrt{2} e^{-\pi/4}) \simeq 0.177. \quad (3.35)$$

$t > t'_s$ での運動方程式は、

$$\frac{dx_2}{dt} = -\frac{L - 2x_2}{L} v_0 \quad (3.36)$$

$$\text{または} \quad (3.37)$$

$$x_2(t) = x_2(t'_s) \exp \left(\frac{2v_0}{L} t \right) \quad (3.38)$$

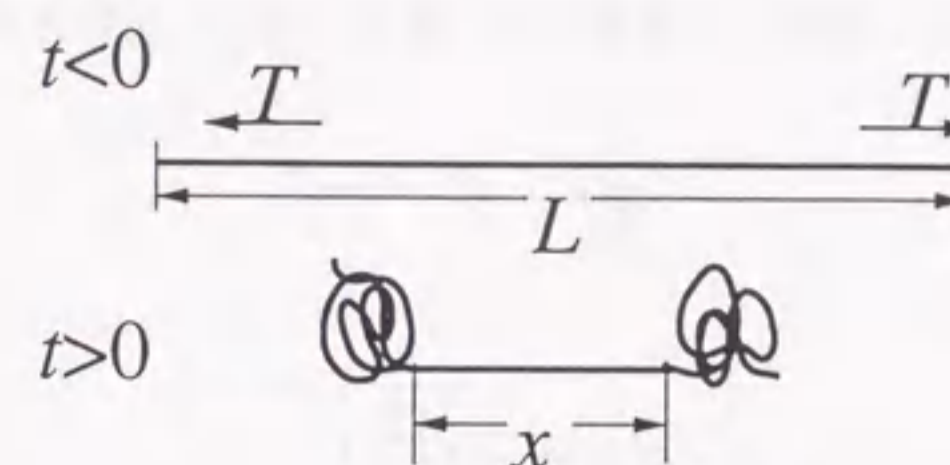


Figure 3.5 The schematic picture of an elastic chain during contraction process. The explanation is in the text.

となる。ここで $x_2(t'_s) = v_0 t'_s$ である。従って外れるまでの時間は

$$x_2(t_{uh}) = L \quad (3.39)$$

$$t_{uh} = \frac{L}{v_0} \ln \frac{L}{x_2(t'_s)} \quad (3.40)$$

であたえられる。長い方の腕が伸びない場合、伸びる場合、どちらの場合でも外れるまでの時間 t_{uh} は $1/v_0$ に比例する。

(III) 鎖は障害物から外れると縮みはじめる。縮む過程では重心は v_0 で泳動し、鎖の伸びの時間発展は以下で記述できる。

$$\zeta \frac{\partial \lambda}{\partial t} = \frac{\partial^2}{\partial s^2} f(\lambda) \quad (3.41)$$

この方程式には電場の強さ E を含んでいないにも関わらず、縮む過程の特徴的時間は電場による、ということは注意すべきである。これは過程 (I) および (II) で鎖に蓄えられた弾性エネルギーが電場強度によることに起因する。言い替えれば、強い電場では鎖は長く伸ばされるが、緩和するのも早いということである。

式 3.41 の解の挙動を大雑把に知るため、外部からの張力 T で伸び切っている非線形鎖の縮みを考える (図 3.5)。外部からの張力が弱ければ緩和時間は T によらず L^2/D で与えられる。一方、外部からの張力が強い場合には、緩和過程は伸び切った領域と弛緩した領域の間の、はっきりとした境界の動きによって記述できる。外部からの張力がなくなった後でも、

鎖の中央部は伸びており、弛緩した領域を引っ張る。従って運動方程式は

$$\zeta \frac{1}{2}(L-x)\dot{x} = -T \quad (3.42)$$

であり、これは

$$L-x(t) = -\sqrt{\frac{4T}{\zeta}(t-t_{uh})} \quad (3.43)$$

を導く。障害物からはずれる鎖の場合、 T は qEL の程度である。従って縮む過程は、大まかには次のように書ける。

$$L-x \propto \sqrt{qEL(t-t_{uh})/\zeta} = \sqrt{Lv_0(t-t_{uh})} \quad (3.44)$$

結局、縮み過程の特徴的時間は L/v_0 の程度になる。上記の議論は大雑把なもので、図3.3の(III)の領域を見ると分かるように、縮みはじめるときの鎖の各部の伸びは均一ではないのだが、これを考慮に入れていない。とはいえ、縮み時間が L/v_0 で見積もれるということは正しい結論である。それは式3.4の数値解で確かめることができる。

図3.6は重心の速度 v_x と鎖の最大長 R_l の時間発展を表している。 v_x は次のように求められる。

$$v_x = \frac{1}{L} \int_0^L ds \dot{X}(s,t) \quad (3.45)$$

また R_l は次のように定義した。

$$R_l(t) = \begin{cases} \text{Max}(|X(L,t)|, |X(s,t)|) & \text{when DNA is hooked} \\ |X(L,t) - X(s,t)| & \text{when DNA is unhooked} \end{cases} \quad (3.46)$$

$R_l(t)$ が最大値をとる時刻 t_{max} はほぼ鎖の外れ時間 t_{uh} に等しい。図3.7に外れ時間と $R_l(t)$ の最大値 R_{lmax} の、初期条件 s_{h0} との関係を示した。図で

$$t_0 = L/v_0 \quad (3.47)$$

である。外れ時間 t_{uh} は s_{h0} が $L/2$ に近づくにつれて発散するが、現実の系では熱揺らぎのためにそのようなことは起きない。一方で R_{lmax} は s_{h0} が $L/2$ に近付いても一定の値を保つ。これは鎖が外れ時間 t_{uh} よりも前に縮みはじめることを示している。

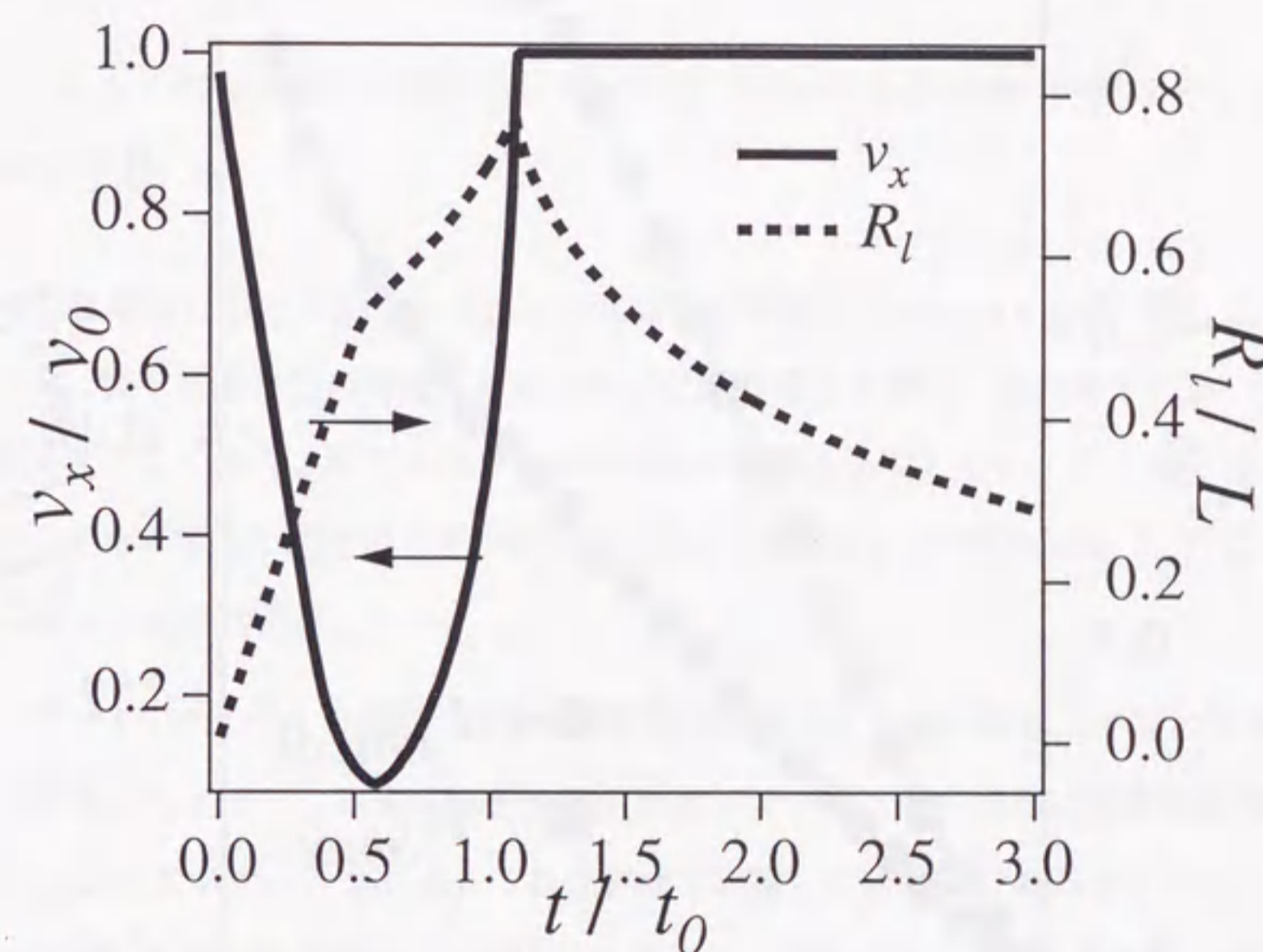


Figure 3.6 The time evolution of the spatial expansion $R_l(t)$, and the velocity of the center of mass $v_x(t)$, using the model of eq.3.16, where $t_0 = L/v_0 = L\zeta/qE$ and $s_{h0} = 0.4L$.

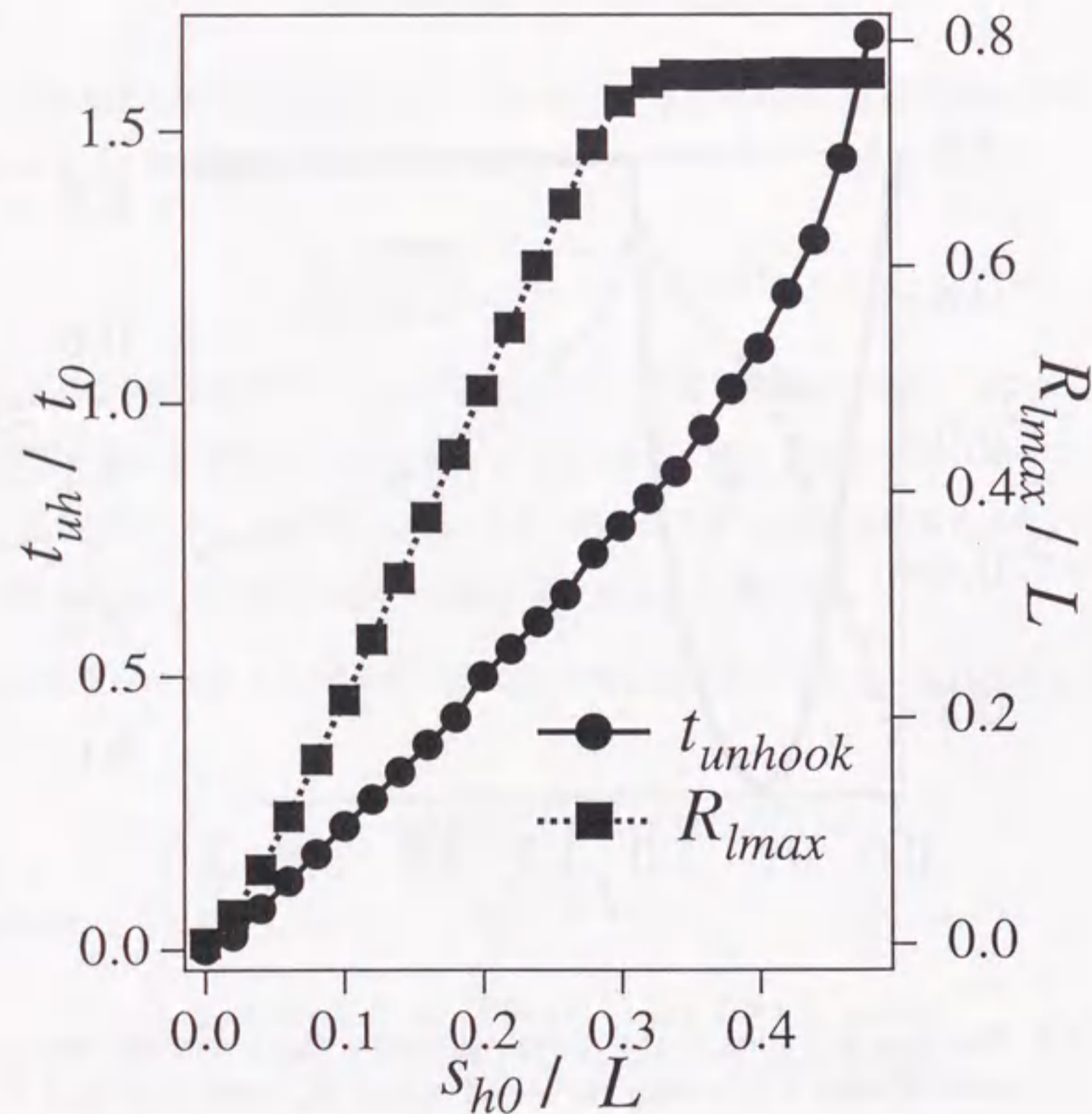


Figure 3.7 s_{h0} dependence of the unhooking time t_{uh} and the maximum spatial expansion R_{lmax} .

■ 3.4 考察：実験との比較

◇ 3.4.1 運動の特徴的時間

ここまでの 3.3.1 節、3.3.2 節の結果は以下のようにまとめられる。

1. $qEL/k \ll 1$ の微弱電場の場合、伸び縮み過程の特徴的時間は電場強度 E にはよらず、Rouse 緩和時間 $\zeta L_0^2/k$ で与えられる。
2. $qEL/k \gg 1$ の強電場の極限では、伸び過程、縮み過程の特徴的時間はどちらも L/v_0 に比例する。

一つの障害物に引っかかった DNA の実験的な観察が Volkmuth ら^{93,94)}によって行なわれている。彼らは障害物の両側に垂れ下がった腕の長さを調べ、腕の長さの違いの時間発展が指数関数によくあうと報告した。これは本章の計算と矛盾しない。式 3.38 を見れば明らかである。また本論文と同様のモデルを用いて独立に行なわれた Williams ら⁹⁵⁾による解析とも、本論文の結果は矛盾しない。

ここでゲル中の DNA の挙動、多数の障害物中を泳動する鎖の挙動との関わりを考える。2.5.1 節で議論したように、定常電場ゲル電気泳動下での DNA の変形は特徴的時間をもち、それは R_{lmax}/v_0 でスケールされる。これは本章で議論してきた伸び縮み過程で説明できる。現実系は明らかに強電場の極限の場合に相当する。この場合には伸び過程も縮み過程も、その特徴的時間は L/v_0 に比例する。そのため伸び縮み過程全体の時間 (stretch-contraction time)、 T_{s-c} も L/v_0 に比例する。時間 T_{s-c} は s_{h0}/L に依存するが、 $T_{s-c} \propto L/v_0$ の関係は s_{h0} について平均をとっても保たれる。さらに R_{lmax} の平均は L に比例するので、結局 T_{s-c} は R_{lmax}/v_0 に比例する。

◇ 3.4.2 多数の引っかかりを考慮したモデルの拡張

このように、本章で解析したモデルは DNA の挙動を理解する上で有用ではあるが、実験的に得られている DNA の挙動の特徴に再現されないものがある。モデルでは速度 v_x は、障害物から鎖が外れたあとは一定値 v_0 を保つ。これに対して実験では、伸びが極大値になる

のとはほぼ同時に速度も極大値を示す（図 2.6 を参照）。この速度の減少は、他の多数にある障害物に起因すると考えられる。実際の系では DNA は非常に密なゲルの編目の中を泳動している。そのため先端部の張力が低い部分はたくさんの障害物に引っかかり、ヘルニアまたはキックとよばれる形になる。ヘルニアの存在時間と密度は DNA の張力に依存する。DNA が強く引き延ばされている場合にはヘルニアはできづらく、仮にできたとしてもすぐ消えてしまう。これに対して、DNA が等方的なコイルの状態にあるときには、たくさんのしかも寿命の長いヘルニアが存在する。それらが DNA の泳動を妨げるので、引き延ばされた状態の DNA に比べて泳動速度が遅い。従って速度 v_x は DNA が障害物からはずれて縮む過程においては減少する。これが速度のピークの説明である。

上記の効果は定性的に本章のモデルに採り入れることができる。摩擦係数 ζ が伸び率 λ の関数であるとして、 λ が大きいほど ζ が小さくなるようにすればよい。例として、

$$\zeta = \zeta_0 \exp(-\lambda) \quad (3.48)$$

としたときの $v_x(t)$ と $R_l(t)$ を計算し、結果を図 3.8 に示した。このモデルでは $R_l(t)$ と $v_x(t)$ がほぼ同時に極大値を示し、実験と同様の振舞いを示す。

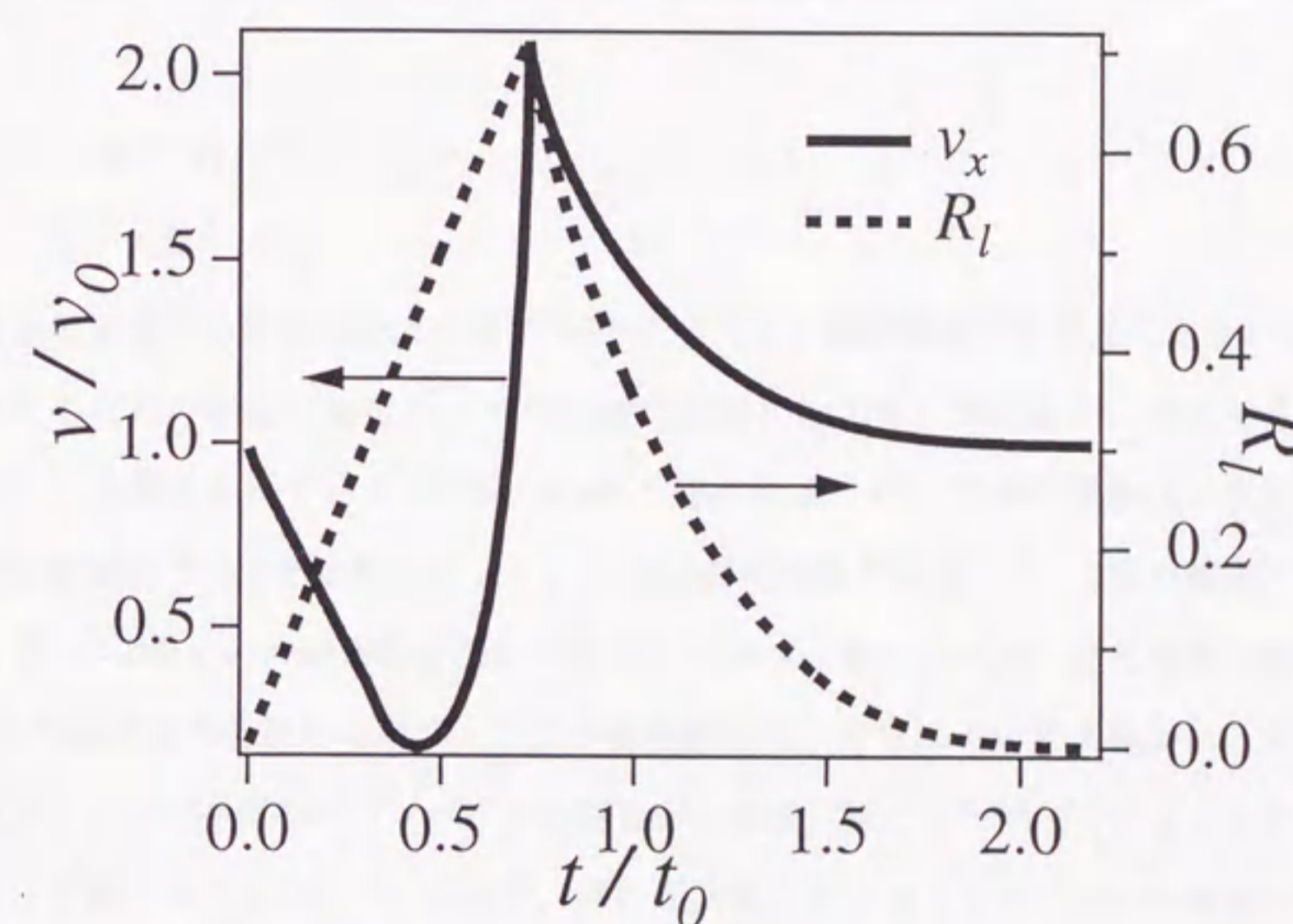
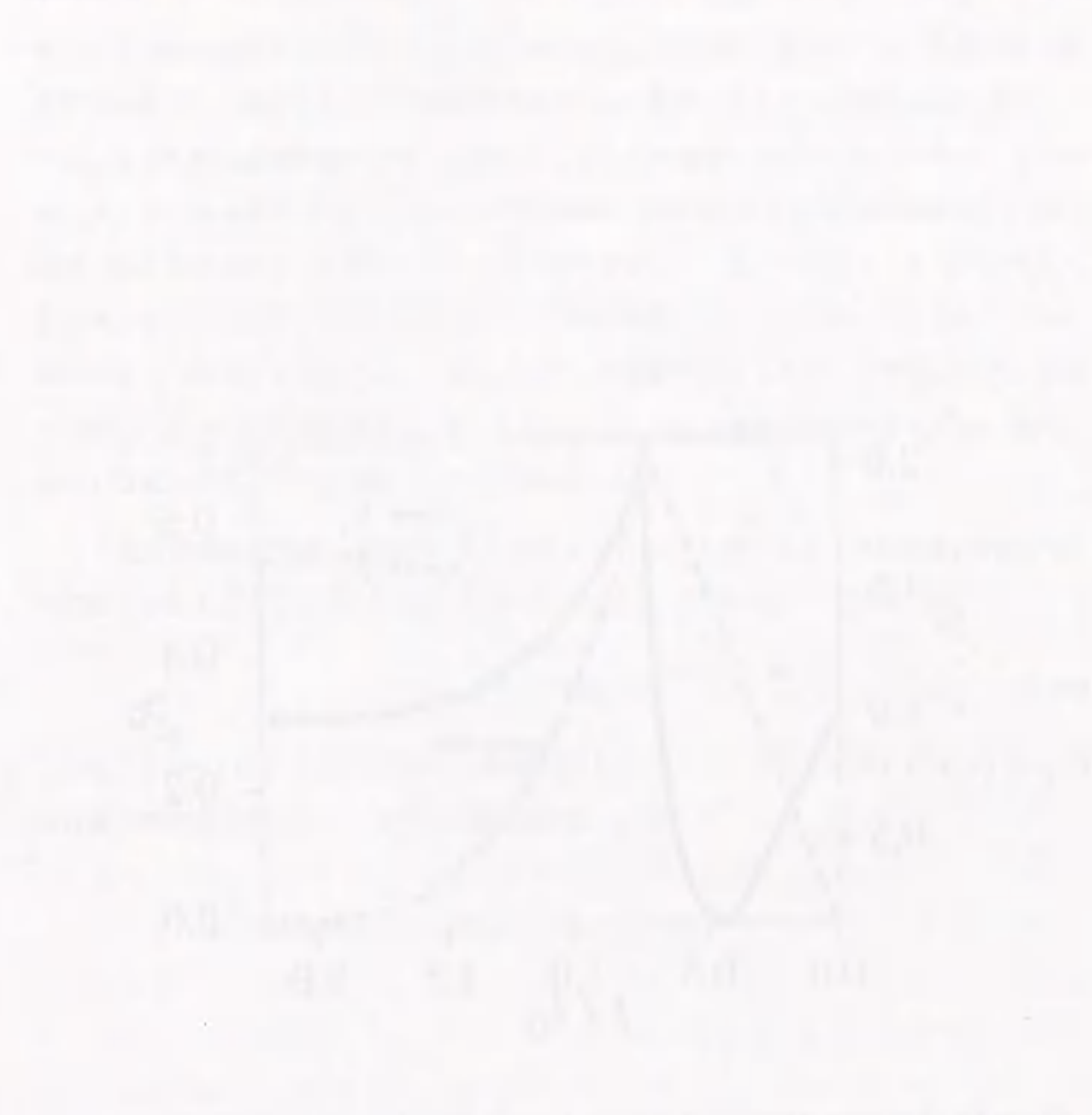


Figure 3.8 The time evolution of $R_l(t)$ and $v_x(t)$ using the model of 3.48. The notation and the initial condition are the same with Fig.3.6



第 4 章

バイアス正弦電場での直接観察

■ 4.1 はじめに

非定常電場ゲル電気泳動は 1.3 節で述べたように、定常電場では分離できない長鎖 DNA を分離するための手法である⁶⁾。その分離の機構には DNA が泳動中に変形することが関与していると考えられている¹²⁻¹⁴⁾。1.4 節で述べたように、反共鳴現象は一次元非定常電場法の分離機構そのものといってよい。この反共鳴現象の機構には、2 章の実験で詳しく調べたように、DNA の伸縮運動が深いつながりを持つと考えられる。定常電場で観察される DNA の伸縮運動の特徴的な時間と、反共鳴現象を起こす電場の切替え時間は、電場強度やゲル濃度といった物理的パラメーター依存性が定量的にほとんど同じである。しかし、一次元非定常電場のもとでの DNA の挙動、特に反共鳴現象のもとでの DNA の挙動は実験的な観察例がほとんどない。計算機シミュレーションなどによる研究では、1.9 節で述べたような定性的な議論しか行なわれていない。

非定常電場ゲル電気泳動での DNA の挙動の直接観察は主に二次元の非定常電場ゲル電気泳動で行なわれ、DNA の電場方向への配向時間などが議論されてきた¹⁴⁾。しかし定量的な実験はあまりなかった。その理由としては i) 界面分極など、観察装置のサイズの影響、ii) 定量的議論のためのサンプル数を集めることの困難さ、などがあったと考えられる。

本章では電場の時間変化が DNA 分子の泳動形態にあたる影響を定量的に議論することを目的として、一次元非定常電場ゲル電気泳動の一つである、バイアス正弦電場法³⁸⁾での DNA の形態変化を、直接観察実験で調べる¹⁶⁾。反共鳴現象を議論の中心にして、非定

常電場ゲル電気泳動 DNA の泳動挙動を反共鳴の条件近傍で調べ、DNA の形態変化が定常電場でのそれとどのように異なるかを議論する。

■ 4.2 実験

実験的手法は2章と基本的には同じだが、以下のような点で改良が加えられている。i) 蛍光染料を EB より輝度の高い DAPI に変更した。ii) サンプルのプレパレーションの方法を改善してノイズを軽減した。iii) 蛍光顕微鏡本体を交換した。の三点である。以下でそれぞれ具体的に述べる。

◇ 4.2.1 試料

以下のものを蒸留水中に混合して、まずゲルを作った。

1. ゲル：アガロース (FMC SeaKem LE) 1wt%(w/v)
2. 緩衝溶液：0.5×TBE (45mM Tris, 45mM borate, 1.25mM EDTA)
3. 退色防止剤：2-mercaptoethanol 4% (v/v)

これを攪拌しつつ加熱してアガロースを十分溶かし、観察用泳動槽上に滴下して4°Cで20分冷ましてゲル化させた。次に以下のものを蒸留水中に混合してDNA溶液を作成した。

1. DNA：ニッポンジーン製 T4dCDNA(166kbp)0.75μM in nucleotide
2. 蛍光色素：DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 0.75μM
3. 緩衝溶液：0.5×TBE (45mM Tris, 45mM borate, 1.25mM EDTA)
4. 退色防止剤：2-mercaptoethanol 4% (v/v)

これを観察用泳動槽上のゲルに入れるため、まず泳動槽の陰極側の、観察領域の外に針でいくつかの穴(直径数μm)を開けた。ここにDNA溶液を滴下して、穴に染み込ませるために1分間おき、その後電場を印加して観察領域までDNAを泳動させた。この方法には以下のような利点がある。

4.2 実験

1. DNAの実験一回あたりの消費量を減らすことができる。
2. 蛍光色素によるノイズが減少する。
3. 観察領域のゲルの構造を破壊しない。

上記2項めでノイズが減少するのは、蛍光色素が陽イオンであるためDNAと逆の方向に泳動して観察領域に入っていないためである。2章で用いた方法ではゲル中にはほぼ均一に色素があったため、それによる background noise が発生していた。3項めは以下のようなことを意味している。従来法ではDNAをゲル溶液中に分散させてからゲル化させていたために、ゲル中でDNA分子のあった場所に穴が残ってしまい、泳動中の挙動にその穴が影響すると考えられた。本実験の方法では、穴は観察領域の外に作られるため、観察される泳動挙動には影響はない。

◇ 4.2.2 装置

泳動槽 泳動槽は図2.2と同一のものを使用した。

光学系 顕微鏡はZeiss倒立顕微鏡Axiovert 135TVを使用した。蛍光を励起するための光源としては超高压水銀ランプの輝線を用いた。DAPIはDNAと結合した状態では450nmの光で励起され、365nmの蛍光を発するので、それぞれフィルターを用いて選択的に透過させた。×100対物油浸レンズを使用して観察されるDNAの蛍光像を浜松ホトニクス製の高感度SITカメラと画像処理装置ARGUS10でS-VHSビデオに記録した。

電気系 バイアス正弦電場 $E(t) = E_b + E_s \sin 2\pi ft$ を波形発生機(TOA電機FS-2121)で発生させ、電圧をアンプ(RYOWA電機model-9623A)で増幅し、泳動槽の両端のPt電極に接続した導線から与えた。電圧変化を監視するため、カバーガラスの両側に差し込んだPt試験電極からの導線を自作した電圧降下装置をはさんでコンピューター(NEC9801RX)の内蔵増設ADコンバーターボード(CONTEC製)に接続した。コンピューターのモニター上で計測電圧を監視するとともに、内蔵増設スーパーインポーズボード(CONTEC製)で

DNA の蛍光像を記録した S-VHS ビデオ上に測定電圧を記録した。ビデオ上の測定電圧は画像解析装置で読み込み、後述する DNA の測定量とあわせて記録した。

◇ 4.2.3 測定条件

本実験システムで観察できる周波数帯は以下のような理由で制限がある。i) 最も高い周波数は VTR の記録速度 (1/30 秒) で制限される。ii) 最も低い周波数は、DNA 分子の連続観察時間に制限される。連続観察時間は 2.2.3 節で述べた理由により、最長でも 20 秒以下である。Shikata と Kotaka によれば、T4DNA の場合 $E_b = 2.5\text{V/cm}$ 、 $E_s = 7.5\text{V/cm}$ では反共鳴は 0.1~1.0Hz で観察される (図 1.8)。そこで本実験では、バイアス正弦電場 $E(t) = E_b + E_s \sin 2\pi ft$ のパラメータ E_b および E_s は、それぞれ $E_b = 2.5\text{V/cm}$ 、 $E_s = 7.5\text{V/cm}$ に固定し、周波数 f は $f=5.0, 1.0, 0.2\text{Hz}$ の 3 つを選んだ。比較のために $E = 2.5\text{V/cm}$ での定常電場ゲル電気泳動の実験もおこなった。それぞれの測定条件で、10 個の DNA サンプルを観察し、それぞれのサンプルについては 10 秒以上の連続観察を行なった。測定インターバルは $f=1.0\text{Hz}$ 、 0.2Hz については 0.1 秒間隔、 $f=5.0\text{Hz}$ については 1/30 秒間隔で行なった。

■ 4.3 解析

画像解析を 2 章と同様の手法を用いて行ない、測定量として慣性テンソルの主値である R_l 、 R_s を以下のように求めて、DNA の形態変化を R_l の時間変化および統計平均で特徴づけた。

$$R_l(t) = \left[\frac{1}{2}(M_{xx} + M_{yy}) + \frac{1}{2}\sqrt{(M_{xx} - M_{yy})^2 + 4M_{xy}^2} \right]^{1/2} \quad (4.1)$$

$$R_s(t) = \left[\frac{1}{2}(M_{xx} + M_{yy}) - \frac{1}{2}\sqrt{(M_{xx} - M_{yy})^2 + 4M_{xy}^2} \right]^{1/2} \quad (4.2)$$

ここで M_{xx} 、 M_{yy} 、 M_{xy} は、 $I(x, y, t)$ および I_0 の定義を 2 章と同じにとって、以下で定義される。

$$M_{xx} = \sum_x \sum_y (x - x_g)^2 I(x, y, t) / I_0, \quad (4.3)$$

$$M_{yy} = \sum_x \sum_y (y - y_g)^2 I(x, y, t) / I_0, \quad (4.4)$$

$$M_{xy} = \sum_x \sum_y (x - x_g)(y - y_g) I(x, y, t) / I_0 \quad (4.5)$$

2 章の R_g と、 R_l 、 R_s とは以下の関係がある。

$$R_g(t) = \left[\frac{3}{2}(R_l(t)^2 + R_s(t)^2) \right]^{1/2} \quad (4.6)$$

重心の泳動速度 $v_x(t)$ は Savitzky-Golay 法⁹⁶⁾を用いて以下のように計算した。

$$v_x(t) = \frac{-2x_g(t - 2\Delta t) - x_g(t - \Delta t) + x_g(t + \Delta t) + 2x_g(t + 2\Delta t)}{10\Delta t} \quad (4.7)$$

ここで Δt はサンプリング時間を表し、前述したように $f=1.0, 0.2\text{Hz}$ では 0.1 秒、 $f=5.0\text{Hz}$ では 1/30 秒である。 x_g は電場方向の、DNA 分子の重心の位置であり、2 章と同様に定義される。

■ 4.4 結果

◇ 4.4.1 平均値

図 4.1 に泳動速度と伸びの平均値、 \bar{v}_x と \bar{R}_l を電場周波数に対して表示した。泳動速度の絶対値は図 1.8 の、Shikata らの実験による値とよくあっている。例えば、図 1.8 で 166kbp の分子量の DNA の、定常電場 $E = 2.5\text{V/cm}$ での泳動易動度は $0.08\text{cm}^2\text{V}^{-1}\text{h}^{-1}$ であるが、これは $0.52\mu\text{m sec}^{-1}$ に相当する。本実験での値は $0.56\mu\text{m sec}^{-1}$ である。一方、泳動速度の極小値の位置は $f \approx 1\text{Hz}$ で、これは図 1.8 での $f \approx 0.1\text{Hz}$ と違っている。この違いについてはいくつかの理由が考えられる。第一に、本実験の泳動槽の大きさが彼らの実験の泳動槽の大きさに比べてかなり小さいことがあげられる。サイズや界面の影響が結果に及んだと考えられる。第二は蛍光染料 DAPI の影響である。蛍光染料である ethidium bromide は、DNA の動的物性に影響があることが調べられており⁹⁷⁾、本実験で使用した DAPI も同様の効果を持つことが考えられる。いずれにしても正確な理由は知られていない。また反共鳴条件を正確に決めるためには明らかに観測点が不足してはいるが、本論文では $f = 1\text{Hz}$ を反共鳴に近い条件とみなすことにする。

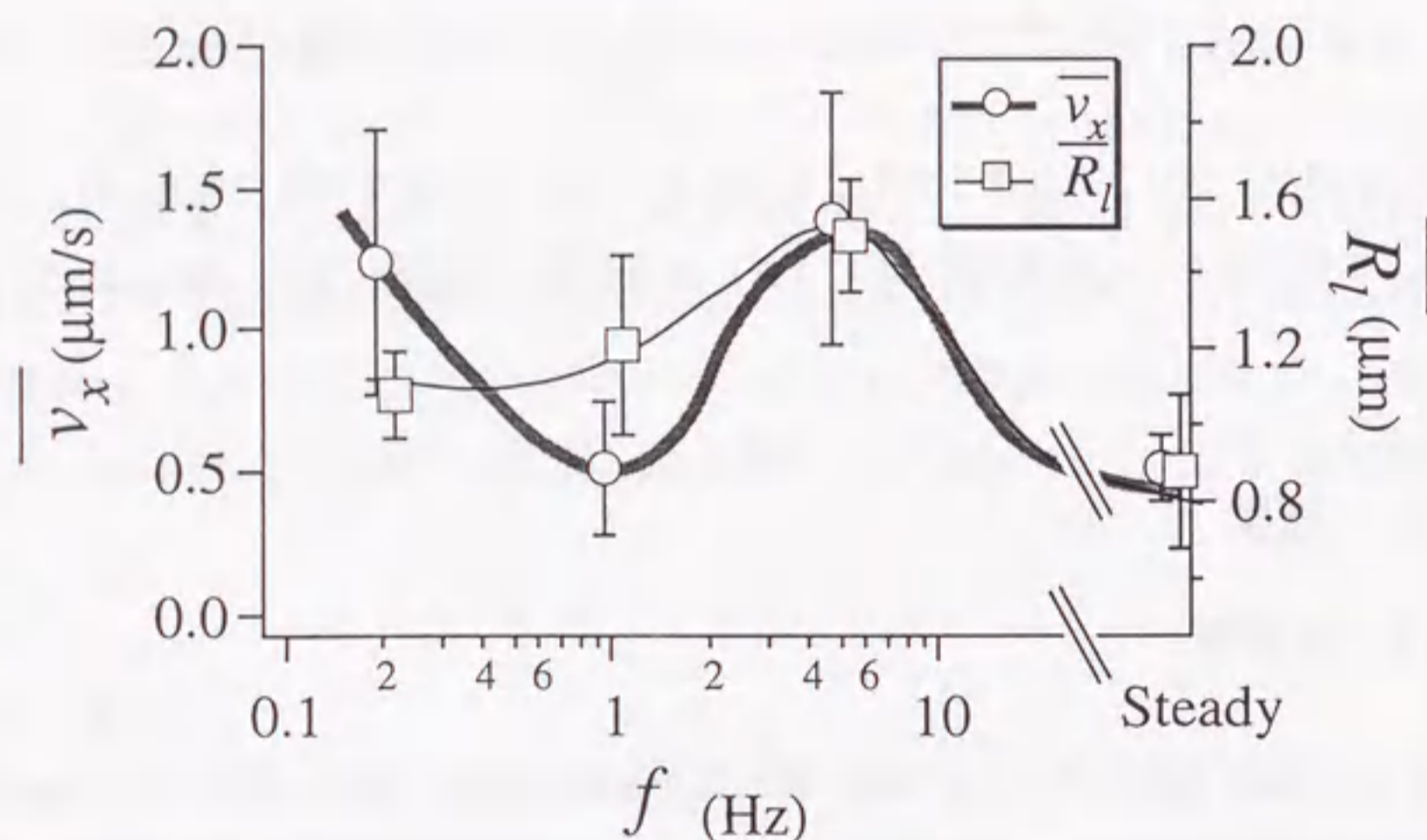


Figure 4.1 The migration velocity \bar{v}_x and the length of the long axis of DNA, obtained by direct observation, for the biased sinusoidal field are plotted against the field frequency f . Error bars correspond to standard deviation of the time average of the samples.

◇ 4.4.2 時間発展

重心の位置 x_g の時間発展を、図 4.2 に示す。長い時間のスケールで見れば、 $x_g(t)$ は傾き \bar{v}_x で線形に増加していく。短い時間で見ると、この傾き \bar{v}_x の線からのずれが $x_g(t)$ にあるが、それは二つの理由による。一つはゲル中の DNA の動きにおける内的な乱雑さ (intrinsic randomness) であり、もう一つは電場の時間変化である。前者は、2章で詳しく述べた定常電場下で見られる伸縮運動に起因する。

図 4.2 で、最低周波数 $f = 0.2\text{Hz}$ においては、ずれ $x_g(t) - \bar{v}_x t$ は明らかに電場の振動を反映したものである。周波数が上がってくると、電場によるずれは小さくなっていく。最高周波数においては定常電場と同様の、伸縮運動による揺らぎが観察される。

形態変化をさらに詳しく調べるため、 $v_x(t)$ 、 $R_l(t)$ 、 $E(t)$ の時間変化を周波数毎に図 4.3 から図 4.5 に示した。観察像を比較のために添付する。これらの図から、 $E(t)$ と $v_x(t)$ の間に非常に強い相関があることが分かる。最高周波数でも、 $v_x(t)$ のピークの位置は $E(t)$ と一致する。この $E(t)$ と $v_x(t)$ の間の強い相関によって、速度が本質的に電場で決められるという印象が生じる。しかし最高周波数である $f = 5.0\text{Hz}$ において、 $v_x(t)$ に伸縮運動による揺らぎがあることに注目してほしい。これは $R_l(t)$ に、よりはっきりと見られる。 $R_l(t)$ のゆっくりとした変動の特徴的な時間は、電場の周期とは無関係に見える。

$R_l(t)$ のゆっくりとした変動は DNA の伸縮運動を反映したものであるが、変動の程度は定常電場 $E = 2.5\text{V/cm}$ のもとで観察されるそれに比べて非常に大きい。 $E = 2.5\text{V/cm}$ では、観察される $R_l(t)$ の最大値は $1.5\mu\text{m}$ 程度であるが、図 4.3 においては $2.8\mu\text{m}$ である。

反共鳴周波数 $f = 1.0\text{Hz}$ では、 $v_x(t)$ と $R_l(t)$ が $E(t)$ と同じ周期で変動するのが見られる。しかし、変動の大きさは小さくなっており、DNA は伸びた状態でも縮んだ状態でもない、中間的な形態で泳動し、いわゆる伸縮運動はあまり観察されなかった。

最低周波数 $f = 0.2\text{Hz}$ では、 $v_x(t)$ と $R_l(t)$ が $E(t)$ に同期して変動するのが見られる。この条件では DNA は伸縮運動を電場の周期で行なう。

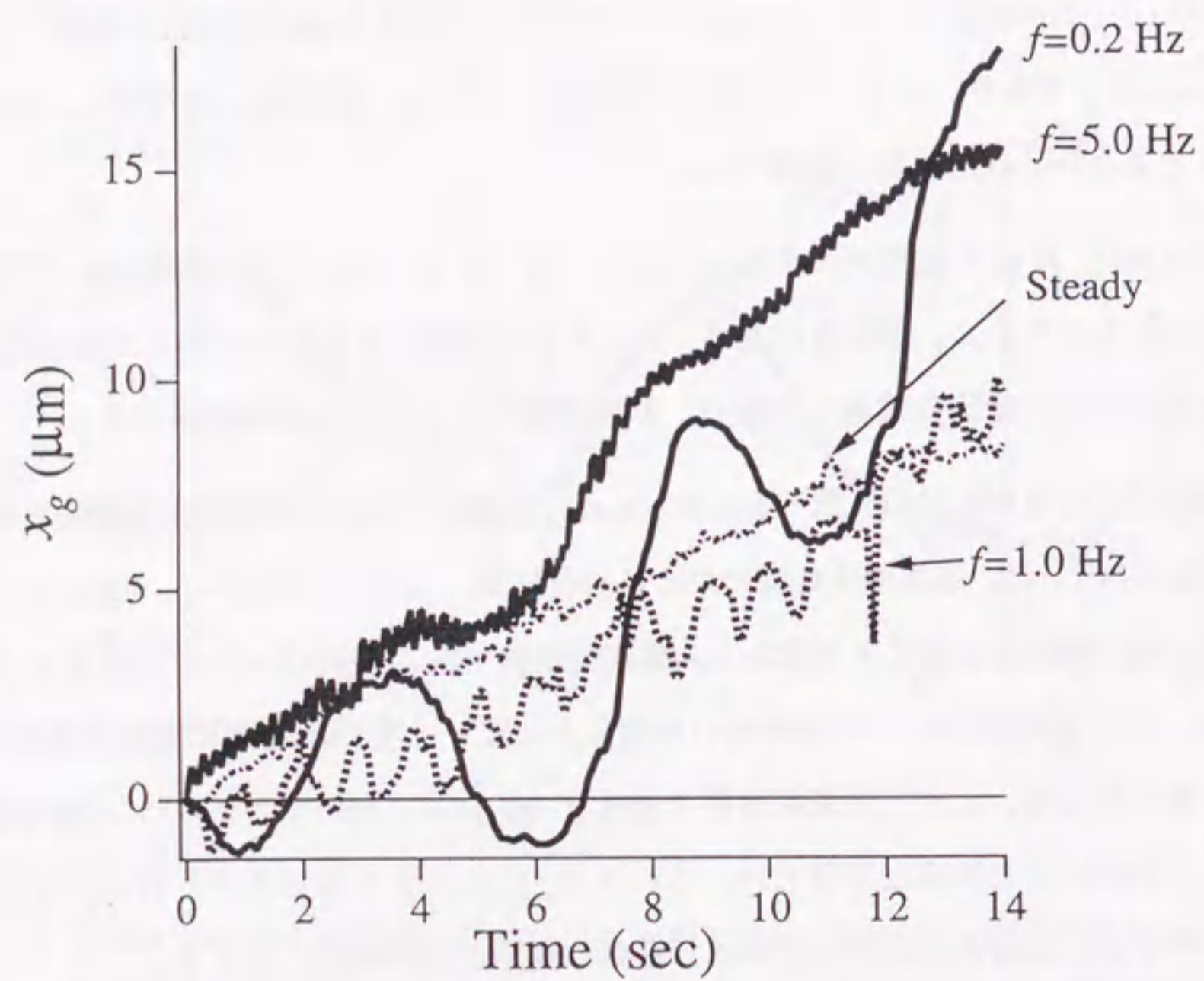


Figure 4.2 Examples of the time development of the position of the center of mass, $x_g(t)$, under the biased sinusoidal field for various frequencies.

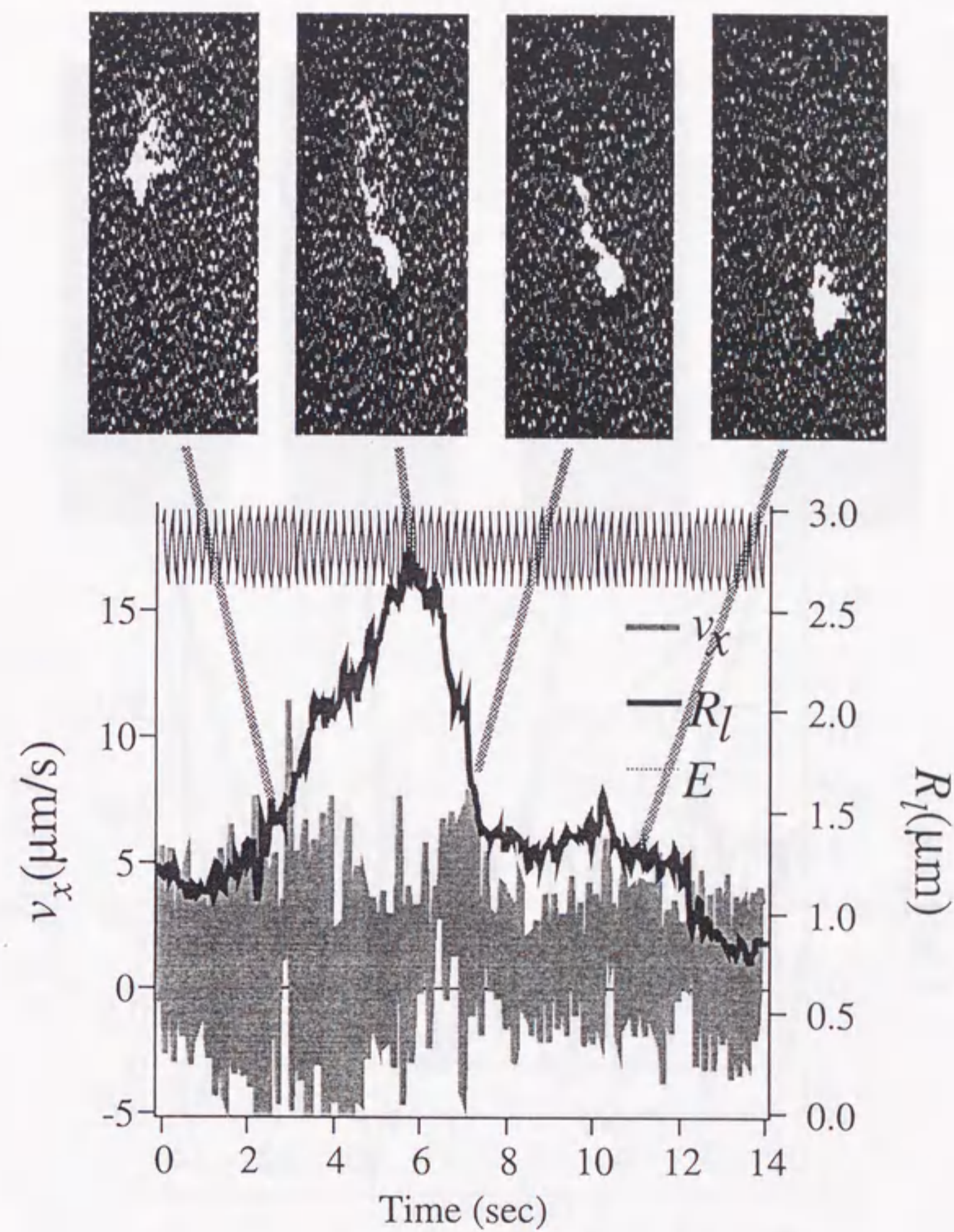


Figure 4.3 An example of the time development of $v_x(t), R_l(t)$, under the biased sinusoidal field at $f=5.0\text{Hz}$. Time origin is arbitrary.

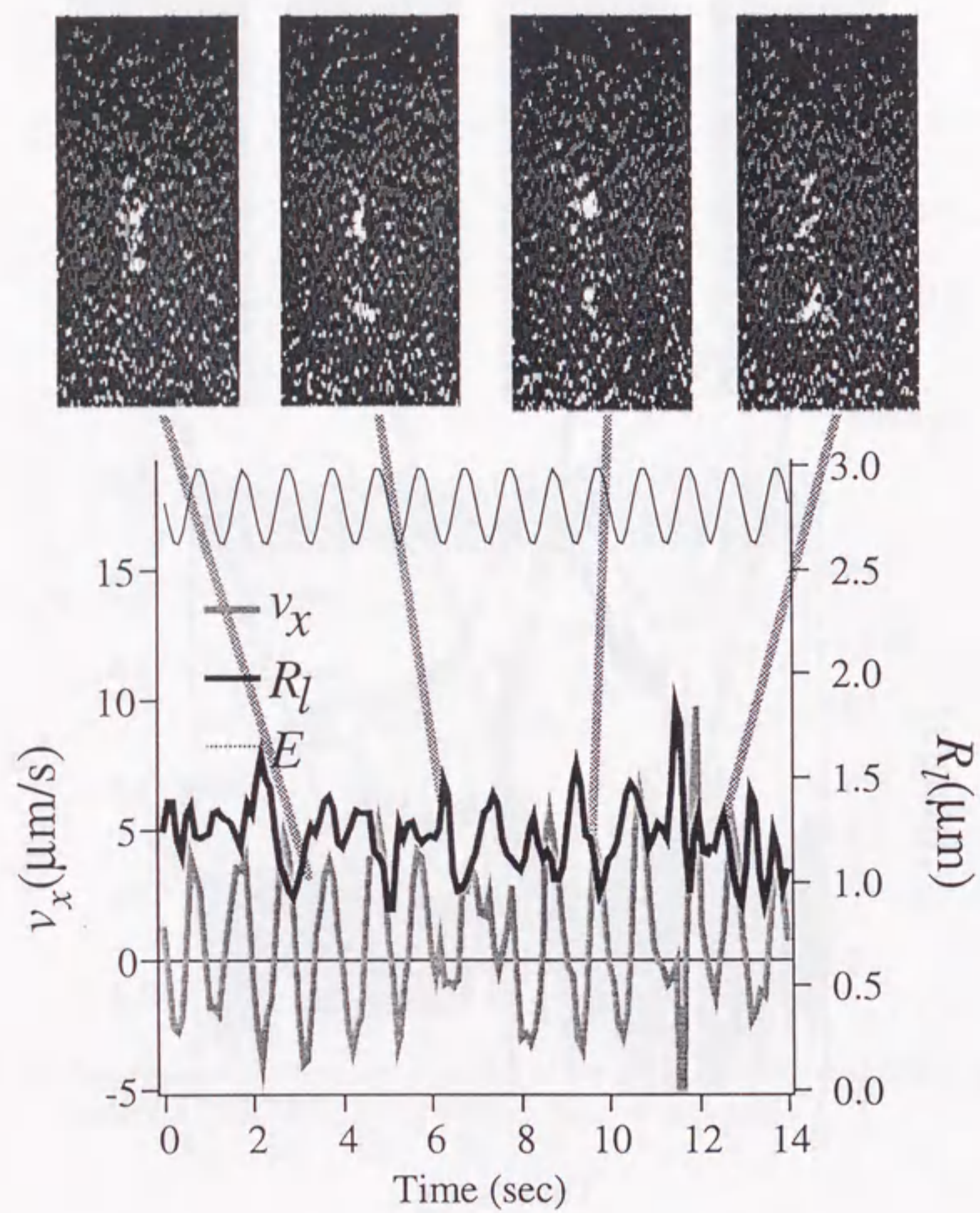


Figure 4.4 Similar to Fig.4.3 at $f=1.0\text{Hz}$.

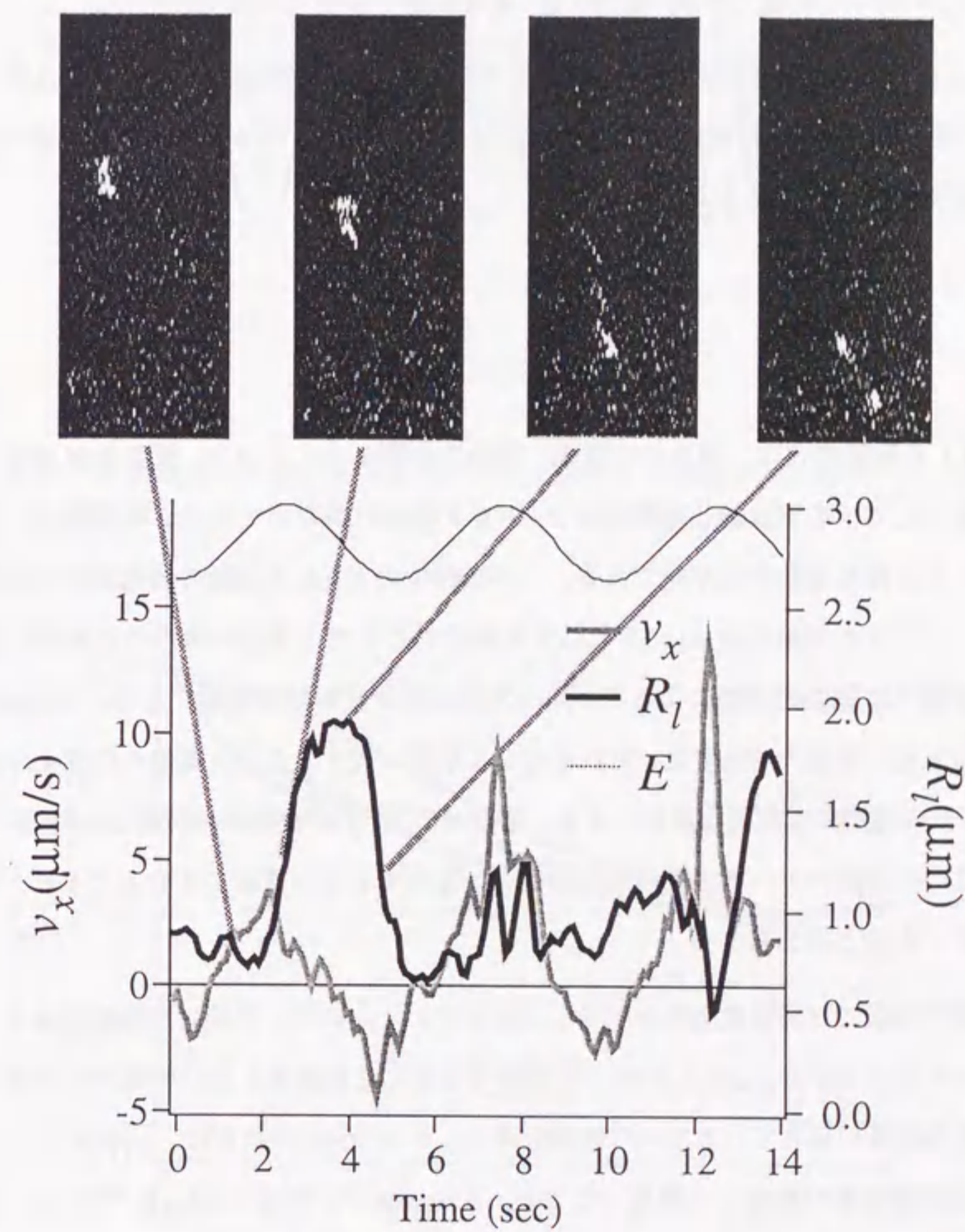


Figure 4.5 Similar to Fig.4.3 at $f=0.2\text{Hz}$.

◇ 4.4.3 相関関数

$v_x(t)$ と $R_l(t)$ の揺らぎを定量的に議論するため、式 2.6 で定義された時間自己相関関数を計算した。速度相関 $C_{vv}(t)$ を図 4.6 に示した。 $C_{vv}(t)$ は明らかに電場の周期で変動しており、 $v_x(t)$ が全ての条件で $E(t)$ と同期して変化していることを示している。

図 4.7 は伸びの相関 $C_{rr}(t)$ の計算結果である。 $C_{rr}(t)$ の特徴的時間は $C_{vv}(t)$ に比べて明らかに長い。この特徴的時間は反共鳴条件よりも高周波の電場の場合には電場の揺らぎとは無関係であるように見える。

■ 4.5 考察

DNA の形態変化は、明らかに電場の変動の影響を受けている。反共鳴がおきる電場周波数を境として、高周波側と低周波側で DNA の挙動は異なっている。高周波側では定常電場で見られる伸縮運動が支配的である。この条件での DNA の運動の特徴的な時間は、電場強度がバイアスの電場強度 E_b に等しい定常電場のもとの運動の特徴的な時間に近い。一方低周波側では電場の変動による DNA の方向転換が支配的な運動である。DNA は電場方向が変わる度に泳動方向を変え、それに応じて形態も変えるので、電場の切替え時間がそのまま DNA の運動の支配的な時間になる。電場が DNA の伸縮運動の特徴的な時間に近いと、上記の二つの運動のモードの間の過渡的な、どちらでもない運動を見せるだろう。これが反共鳴現象であると考えられる。

本章の実験では周波数条件を三つしか変えていないので、正確に反共鳴現象をとらえていないかも知れないが、DNA が伸びた状態でも縮んだ状態でもない中間的な形態で泳動した時に泳動速度が落ちているという結果を得た。この DNA の動きは、1.9 節で紹介した他の研究の反共鳴現象の描像とは異なっている。Åkerman ら⁸⁷⁾ や Carle ら³⁵⁾ らは、反共鳴現象のもとでは DNA が縮んだ状態になるので泳動速度が落ちるとした。Zimm⁸⁴⁾ や Duke⁸⁵⁾ は、電場反転によって DNA の V 字型、伸びた状態の方向転換が妨げられ、泳動速度が落ちるとした。しかし本章の結果は Åkerman らの描像のように等方的な縮んだ状態ではなく、電場方向に配向をもっている。また Zimm らの描像のような方向転換も見せない。これま

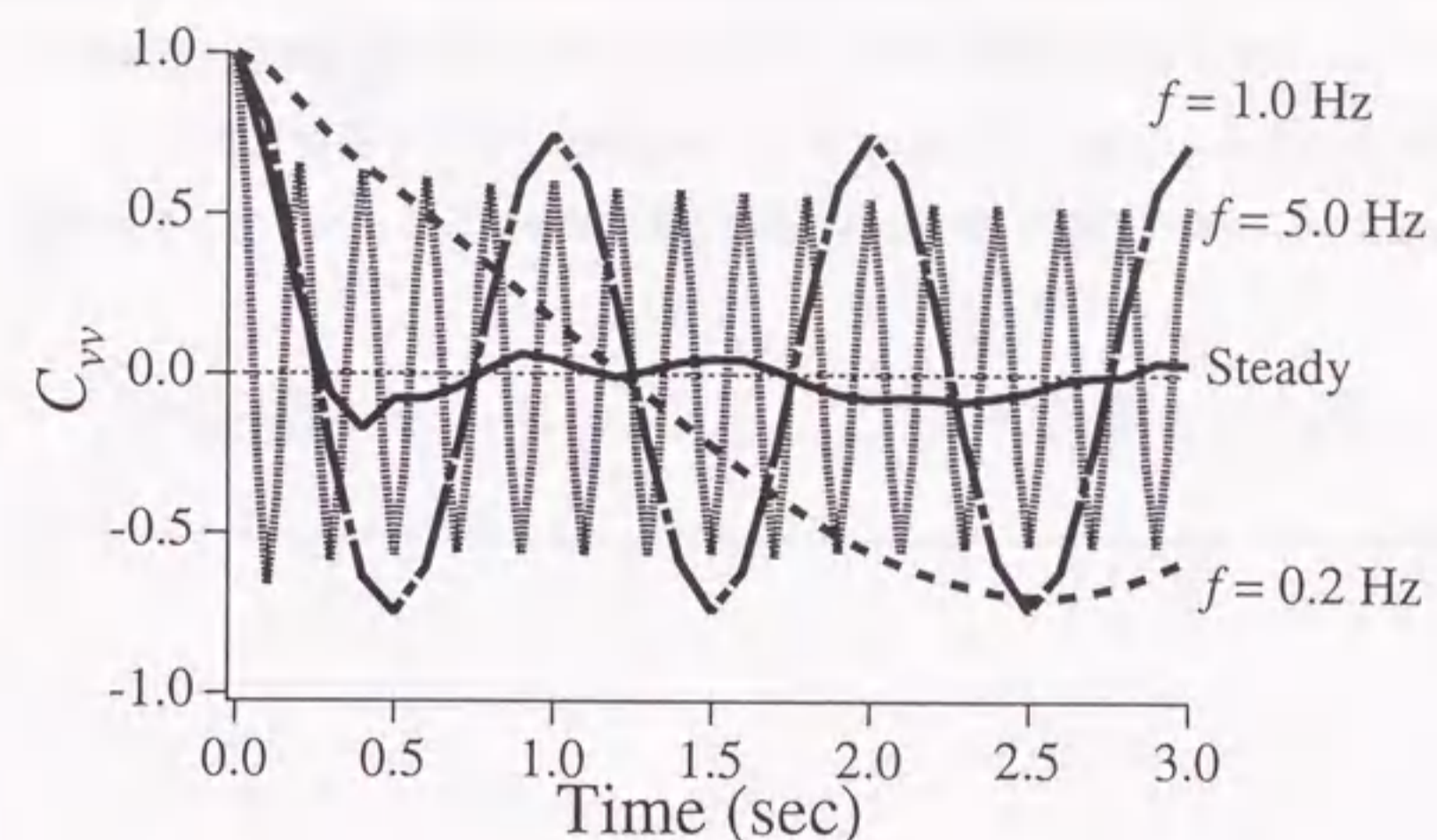


Figure 4.6 Ensemble average of the auto-correlation functions of $v_x(t)$, $C_{vv}(t)$, under BSFGE.

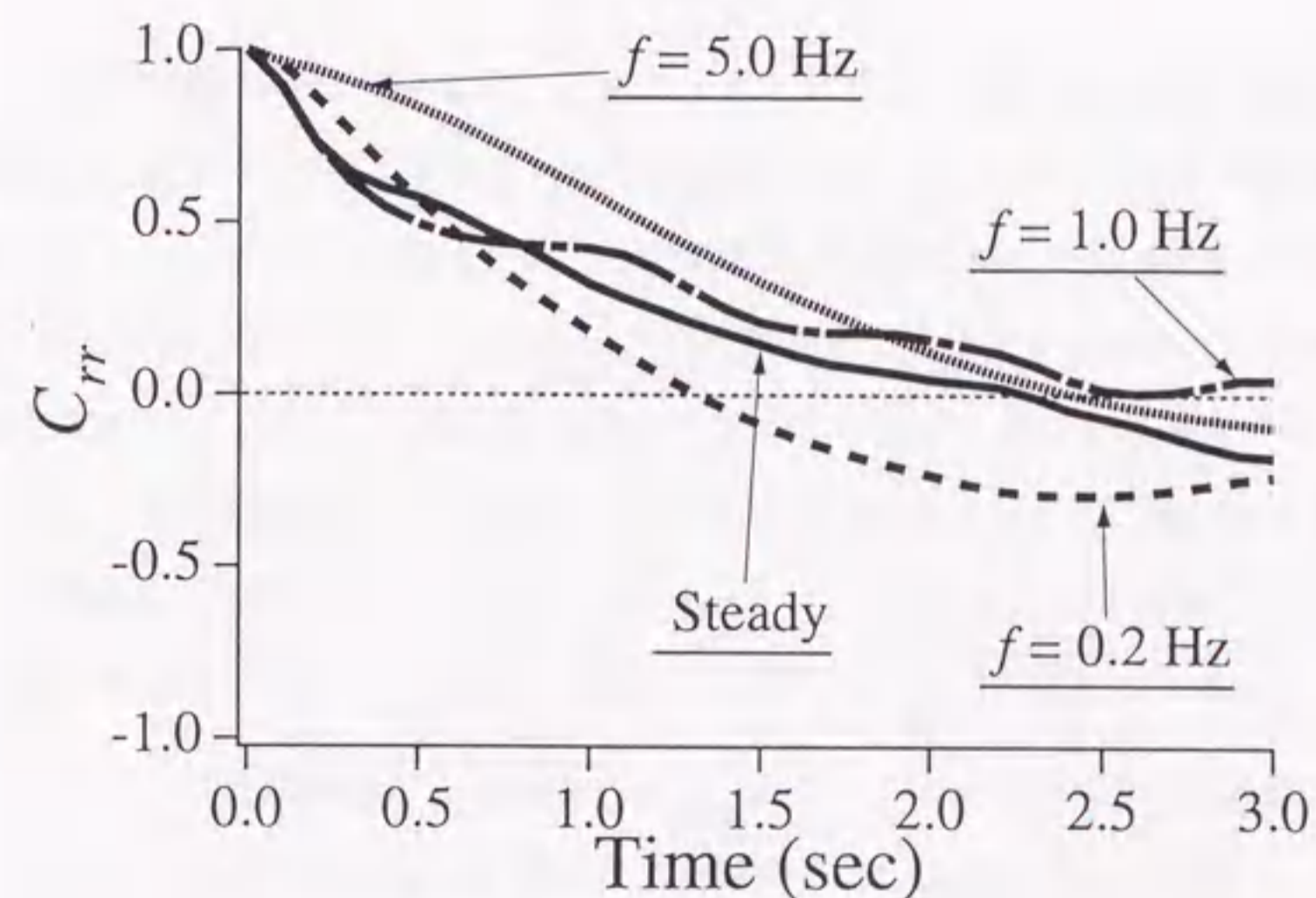


Figure 4.7 Ensemble average of the auto-correlation functions of $R_l(t)$, $C_{rr}(t)$, under BSFGE.

で考えられていなかった機構で泳動速度が落ちていると考えられる。その機構を知るには、ゲルと DNA の絡み合いを詳細に調べる必要があるが、蛍光顕微鏡法による実験では以下のような限界がある。i) 染料の蛍光によるにじみの効果で空間分解能が低い。ii) ゲルの構造が分からない。これらの点を補うため、次の 5 章で計算機シミュレーションを行なった。

第 5 章

計算機シミュレーションによる運動の解析

■ 5.1 はじめに

ゲル電気泳動の分離の機構は、結局のところゲルと DNA の絡み合い効果である。1.6 節で紹介した理論も、3 章で解析を行なった理論モデルも、ゲルと DNA の絡み合いのモデル化であるといつてよい。2 章で実験した定常電場ゲル電気泳動での DNA の伸縮運動や、4 章で実験した非定常ゲル電気泳動での反共鳴現象などの機構がよく分からないのは、それぞれの場合でゲルと DNA との絡み合いがどうなっているか分からないからである。4 章で述べたように、蛍光顕微鏡法による実験で分かる事柄には限界がある。特にゲルと DNA の絡み合いに踏み込んで議論するには空間分解能が低い。また一分子毎に観察できるという長所は、大量の集団を対象とする統計的な処理には向かないという短所でもある。

本章では、蛍光顕微鏡による観察では見られない、ゲルと DNA の絡み合いを調べ、また多くの条件での鎖の挙動を知るために、計算機シミュレーションを行なった。1.8 で紹介した Deutsch⁷⁵⁾ のモデルを改良して、定常電場、バイアス正弦電場の下での鎖の挙動を調べた。実験では調べられなかった長さの異なった鎖の挙動も調べた。ゲルと DNA との絡み合いに注目して、バイアス正弦電場法における DNA 分離の機構を説明する。

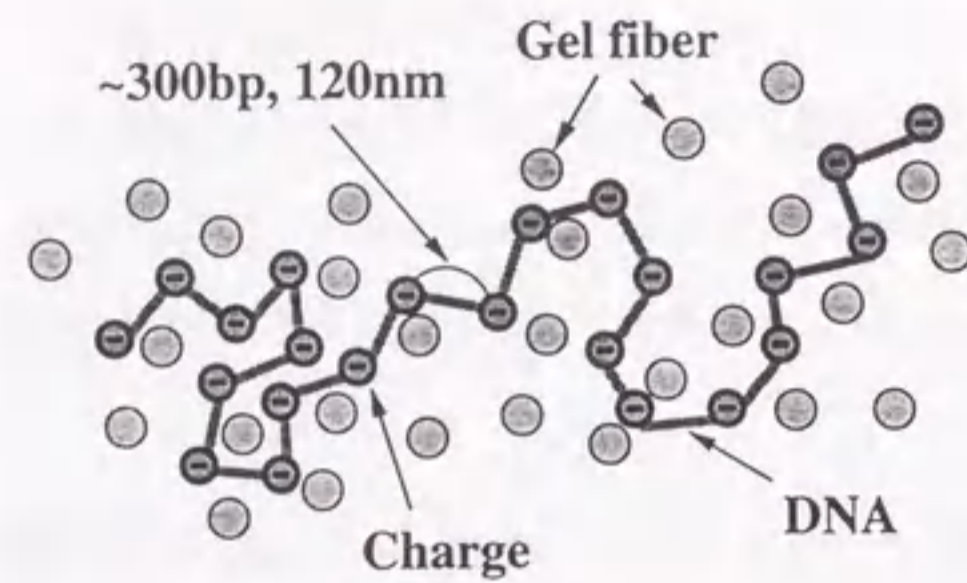


Figure 5.1 Schematic representation of the model used in the computer simulation.

■ 5.2 モデル

◇ 5.2.1 運動方程式

モデルの模式図を図 5.1 に示す。DNA は N 個のビーズを長さ a のボンドでつないだもので表した。それぞれのビーズは q の電荷と ζ の摩擦係数を持つとする。図中の灰色の円はゲル繊維の断面を表し、DNA はこれを横切っては動けないものとする。 i 番目のビーズの位置 r_i は以下の Langevin 方程式に従う⁷⁵⁾。

$$\zeta_i \dot{r}_i = q_i E - \frac{\partial U^{tot}}{\partial r_i} + f_i + \lambda_i (r_{i+1} - r_i) - \lambda_{i-1} (r_i - r_{i-1}) \quad (5.1)$$

式 5.1 の右辺はビーズに作用する様々な力を表している。

1. qE は電場 E による力を表す。
2. $-\partial U^{tot}/\partial r_i$ はゲルをあらゆる障害物からうける力で、鎖が障害物をすりぬけて動くことを禁止するために加えられている。ポテンシャル U^{tot} は後で詳しく説明する。
3. f_i は溶媒分子の熱揺らぎによるランダム力で、以下のガウス分布に従って、計算ステップ毎に発生させられる。

$$\langle f_i \rangle = 0, \quad (5.2)$$

$$\langle f_i(t) f_i(t') \rangle = 2k_B T \zeta_i \delta_{ij} \mathbf{I} \delta(t - t'), \quad (5.3)$$

ここで $\langle \dots \rangle$ は統計平均を表す。

4. $+\lambda_i (r_{i+1} - r_i)$ と $-\lambda_{i-1} (r_i - r_{i-1})$ は隣あって結合されているビーズから受ける力で、 $\{\lambda_i\}$ はボンド長を a に保つための Lagrange の未定定数である。 $r_i(t)$ と $\dot{r}_i(t)$ が決まっていれば時間 δt 後の位置 $r_i(t + \delta t)$ が、 $r_i(t + \delta t) = r_i(t) + \dot{r}_i(t) \delta t$ で決められる。 $\{\lambda_i\}$ は $(r_{i+1}(t + \delta t) - r_i(t + \delta t))^2 = a^2$ を満たすように、計算ステップ毎に計算する。

◇ 5.2.2 ポテンシャル

ポテンシャル U^{tot} は鎖と障害物との相互作用を表し、鎖が障害物を横切って動くのを防止するために導入した。1.8 節で紹介した Deutsch の方法では、このために障害物とビーズとの間に働く斥力ポテンシャルを用いた。しかしそのようなモデルでは 1.8 節でも述べたように、横切りを防ぐために斥力効果がおよぶ範囲を相当に大きくとる必要がある。横切りを防ぐためには、少なくとも障害物の実効的な直径をボンド長と同じにしなくてはならない。これは、障害物を点であるとみなした場合には鎖がボンド長と同じ太さを持つ、“太い鎖”のモデルに相当する。

ここでは“細い鎖”のシミュレーションを行なうため、障害物とボンドとの間に働く斥力ポテンシャルを用いた。

$$U^{tot} = \sum_i \sum_{\alpha} U_{i\alpha}^{bond} \quad (5.4)$$

ここで $U_{i\alpha}^{bond}$ は i 番目のボンドと α 番目の障害物との間に働く斥力ポテンシャルである。これは以下のように決められる (図 5.2)。まず i 番目のボンドと α 番目の障害物とで楕円 $D_{i\alpha}$ を決める。このとき i 番目のボンドの両端が楕円の焦点、 α 番目の障害物の中心が楕円の軌道上来るように定める。この楕円の短軸の長さ $b_{i\alpha}$ に、 $U_{i\alpha}^{bond}$ が以下のように依存するとした。

$$U_{i\alpha}^{bond} = k_B T (\sigma / b_{i\alpha})^6, \quad (5.5)$$

ここで σ はパラメーターである。ボンドが障害物に近付くと $b_{i\alpha}$ が減少していくので、式 5.5 で与えられるポテンシャルはボンドが障害物を横切ることを防止するようになっている。短軸長さ $b_{i\alpha}$ は障害物 α を原点とした時のボンドの両端の位置ベクトル $r_{i\alpha}$ と $r_{i+1\alpha}$ で以下の

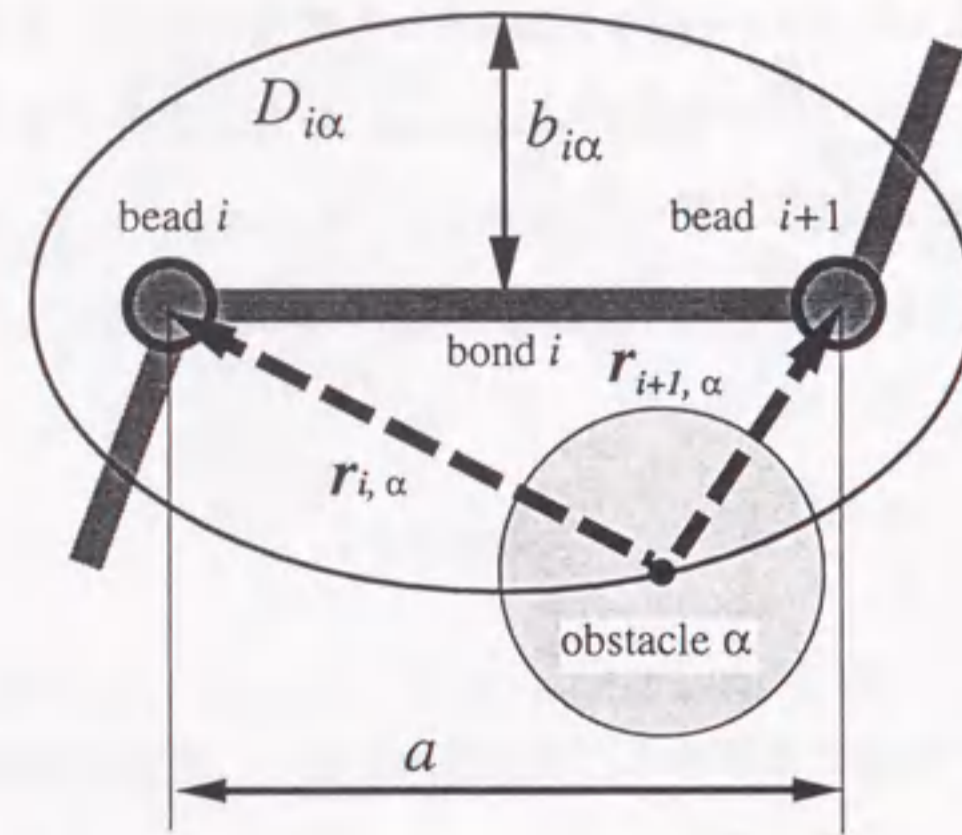


Figure 5.2 The elliptic potential developed to restrict the bond motion from passing across an obstacle. The detail is explained in the text.

ように書ける。

$$b_{i\alpha} = \frac{1}{2} \left[(|r_{i+1\alpha}| + |r_{i\alpha}|)^2 - |r_{i\alpha} - r_{i+1\alpha}|^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (5.6)$$

5.4式のポテンシャルはそれだけで十分に鎖の横切りを防止するが、等ポテンシャル面を滑らかにする目的でもう一つの項を付け加えた。加えたのは障害物とビーズとの間の斥力ポテンシャルである。

$$U_{i\alpha}^{bead} = k_B T (\sigma / |r_{i\alpha}|)^6, \quad (5.7)$$

ここで σ は 5.5式と同じパラメーターである。結果的に相互作用ポテンシャルは以下のようになった。

$$U^{tot} = \sum_i \sum_{\alpha}^{bead\ gel} U_{i\alpha}^{bond} + \sum_i \sum_{\alpha}^{bond\ gel} U_{i\alpha}^{bead}. \quad (5.8)$$

式 5.5と式 5.7のパラメーター σ は障害物の大きさを決める。本研究では $\sigma = 0.25a$ に固定した。この σ を用いると $U_{i\alpha}^{bead}$ は $|r_{i\alpha}| = a/4$ のとき $k_B T$ に等しくなる。

◇ 5.2.3 パラメーター

ボンド長 a を単位長さ、熱エネルギー $k_B T$ を単位エネルギー、 $\zeta a^2 / k_B T$ を単位時間とした。このスケールを用いると電場は無次元量

$$\Theta = \frac{q E a}{k_B T}. \quad (5.9)$$

で表される。1.5節で述べたように、 $T = 300\text{K}$ 、 $E = 10\text{V/cm}$ 、 $a = 120\text{nm}$ 、 $q = 600e \times 0.2$ を代入すると $\Theta \approx 0.4$ となる。これに基づいてバイアス正弦電場

$$\Theta(t) = \Theta_b + \Theta_s \sin 2\pi f t, \quad (5.10)$$

を発生させた。 $\Theta_b = 0.1$ 、 $\Theta_s = 0.3$ でそれぞれ固定し、周波数を $f = 10^{-1} \sim 10^{-4}$ の範囲で変化させた。

ゲル濃度は面積 a^2 あたりの障害物の個数 C で表される。障害物の実効的な半径は $a/4$ であるから、平均編目サイズ ξ は

$$\xi = \left(C^{-1/2} - 2 \times \frac{1}{4} \right) a \quad (5.11)$$

で与えられる。本シミュレーションでは $C = 0.5$ で固定した。これを上式に代入すると $\xi \approx 0.9a$ となり、90nm に相当する。これはほぼ 1wt% のアガロースゲルに近い¹²⁾。

鎖の長さ N は 10, 25, 50, 100 の 4 つを用いた。全長はそれぞれ a をかけた長さになる。Kuhn 長 a が DNA の分子量で約 360bp の相当することを考慮するとそれぞれ 3.6kbp, 9kbp, 18kbp, 36kbp に相当する。

◇ 5.2.4 シミュレーションの方法

周期境界条件 電場方向に $300a$ 、電場と垂直方向に $100a$ の大きさのセルを単位セルとした周期境界条件をもちいた。

ゲルの作成 ゲルは障害物を単位セル上に一様分布乱数で発生させて作成した。このとき障害物どうしの重なりも許した。ゲルは全ての条件で同一のものを使用した。

初期配置 鎖の初期配置の決定はメトロポリスのモンテカルロ法を用いて行なった。まずはじめに障害物を無視し、ボンド長が a に保たれることのみ考慮して N 個のビーズの配置を乱数で決定する。これを状態 1 とし、状態 1 のときの鎖全体のゲルとの相互作用ポテンシャル U_1 を計算する。次にボンド長 a を保ったままビーズの配置を状態 1 からわずかに動かす。具体的には各ビーズを独立に、ランダムに動かしたあとで、ボンド長が a となるように補正を加える。これを状態 2 とし、状態 2 のときの鎖のポテンシャルを U_2 とする。 $U_2 < U_1$ ならば状態 2 を採用する。 $U_2 > U_1$ のときは 0 から 1 までの一様分布乱数 r_m を発生させ、 $r_m \leq \exp[-(U_2 - U_1)/k_B T]$ を満たせば状態 2 を採用する。これを繰り返してそれぞれのボンドおよびビーズのポテンシャルが $k_B T$ 以下になるまで形態を緩和させた。

時間ステップ シミュレーションの時間ステップ δt は全ての条件で $0.002\zeta a^2/k_B T$ とした。

データ解析 長さ $N = 100$ の鎖では 60,000 ステップ以上、それ以外の条件では 80,000 ステップ以上の計算を行なった。初期状態から電気泳動中の定常状態に移るまでの時間を考慮して、計算開始から 10,000 ステップ以降のデータで解析を行なった。

データのサンプリング間隔 Δt は $N = 100$ の $f < 2 \times 10^{-2}$ の条件では規格化された時間で 2、それ以外では 1 で行なった。時刻 t での重心の位置 $r_g(t)$ を以下の式で決めた。

$$r_g(t) = \frac{1}{N} \sum_i^N r_i(t) \quad (5.12)$$

重心の電場方向への射影を $x_g(t)$ とし、重心の速度 $v_x(t)$ を Savitzky-Golay 法⁹⁶⁾を用いて以下の式で求めた。

$$v_x(t) = \frac{1}{60\Delta t} \sum_{i=1}^4 ix_g(t+i\Delta t) - ix_g(t-i\Delta t) \quad (5.13)$$

形態変化を定量化するために、実験と同様に慣性テンソルの主値 $R_l(t)$ を以下で求めた。

$$R_l^2(t) = \frac{1}{2}(S_{xx} + S_{yy}) + \frac{1}{2}[(S_{xx} - S_{yy})^2 + 4S_{xy}^2]^{1/2} \quad (5.14)$$

$S_{\alpha\beta}$ は以下で定義される慣性テンソルである。

$$S_{xx}(t) = \frac{1}{N} \sum_i^N (x_i - x_g)^2 \quad (5.15)$$

N	C	Θ	\bar{v}_x	\bar{R}_l	τ	μ
100	0.5	0.4	0.101	10.4	830	0.25
100	0.5	0.2	0.042	7.9	1270	0.21
100	0.5	0.1	0.018	6.0	3930	0.14
50	0.5	0.4	0.099	5.1	550	0.25
50	0.5	0.1	0.017	2.6	3020	0.17
25	0.5	0.1	0.018	1.4	1790	0.14
20	0.5	0.4	0.111	2.1	—*	0.28
10	0.5	0.1	0.026	0.9	—*	0.26

Table 5.1 Characteristic values obtained by the simulation for the steady field. *The chain of length 20 and 10 did not show clear periodicity so that τ were not obtained.

$$S_{yy}(t) = \frac{1}{N} \sum_i^N (y_i - y_g)^2 \quad (5.16)$$

$$S_{xy}(t) = \frac{1}{N} \sum_i^N (x_i - x_g)(y_i - y_g) \quad (5.17)$$

ここで $r_i = (x_i, y_i)$ であり、 y_g は重心の位置の電場とは垂直な方向への射影である。

■ 5.3 結果：定常電場

定常電場下 $\Theta = 0.4$ での $N = 100$ の鎖の、 v_x と R_l の時間変化を図 5.3 に示す。鎖は 2 章の実験や 1.8 節で紹介したこれまでのシミュレーション⁷⁵⁾と同様に伸縮運動をし、それを反映して図 2.6 と図 5.3 がよく似た振舞いを示している。実験と同様にこの運動の特征的時間を求めるために式 2.6 に従って相関関数を計算した。結果を図 5.4 に示す。これも図 2.7 と同様の振舞いを示す。他の長さの鎖、および異なる電場強度のもとで調べた v_x 、 R_l 、 τ の平均値の値をまとめて表 5.1 に示した。易動度 μ もあわせて示した。 \bar{v}_x 、 \bar{R}_l 、 τ の電場強度依存性は実験と定性的に一致している。また $N = 20$ 以下の短い鎖で相関関数に振動が見られなくなるのも Matsumoto と Doi⁸³⁾によるシミュレーションの結果と矛盾しない。

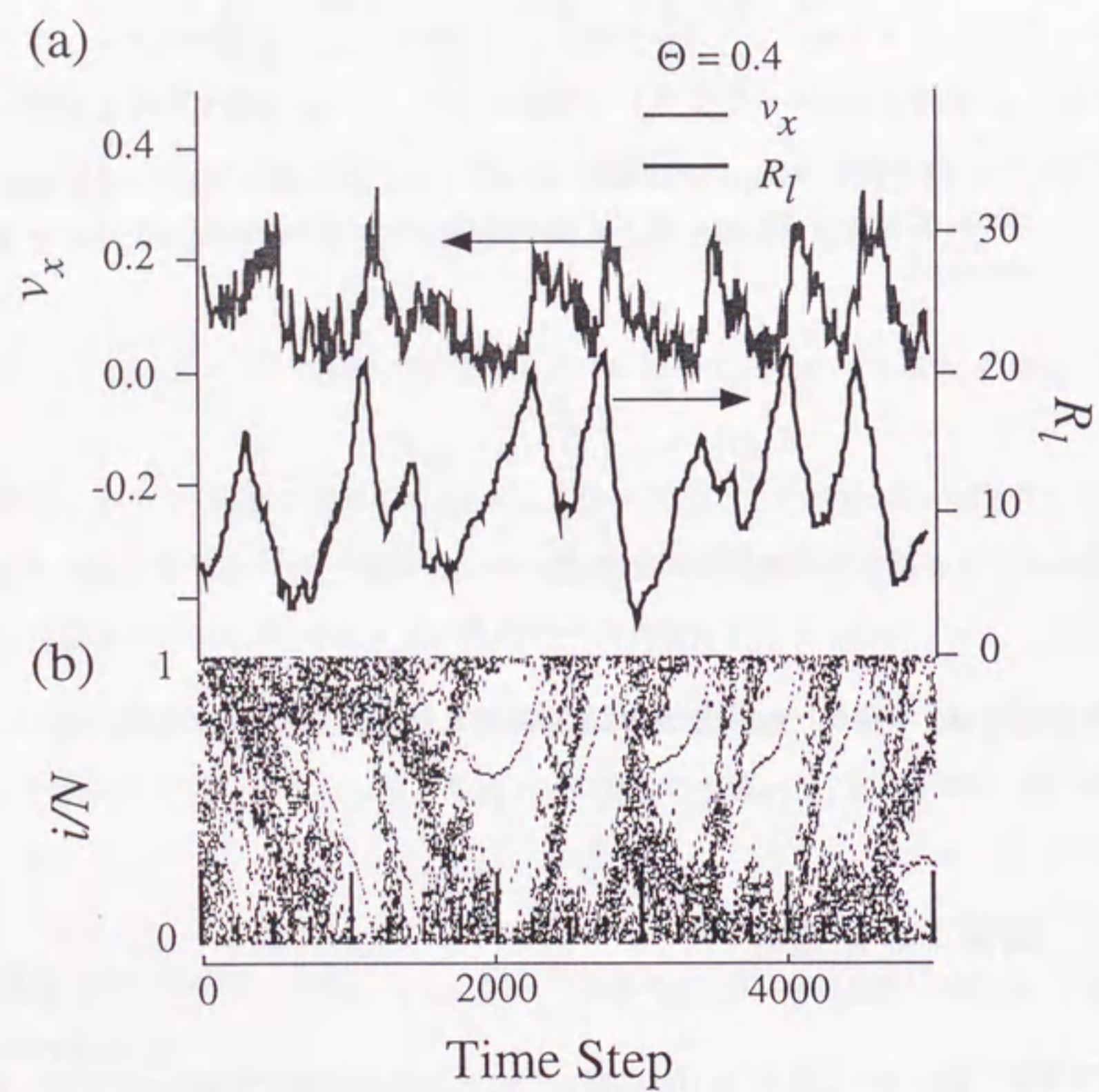


Figure 5.3 (a) An example of time development of v_x and R_l of $N = 100$ in the steady field $\Theta = 0.4$. (b) The time development of the kink points.

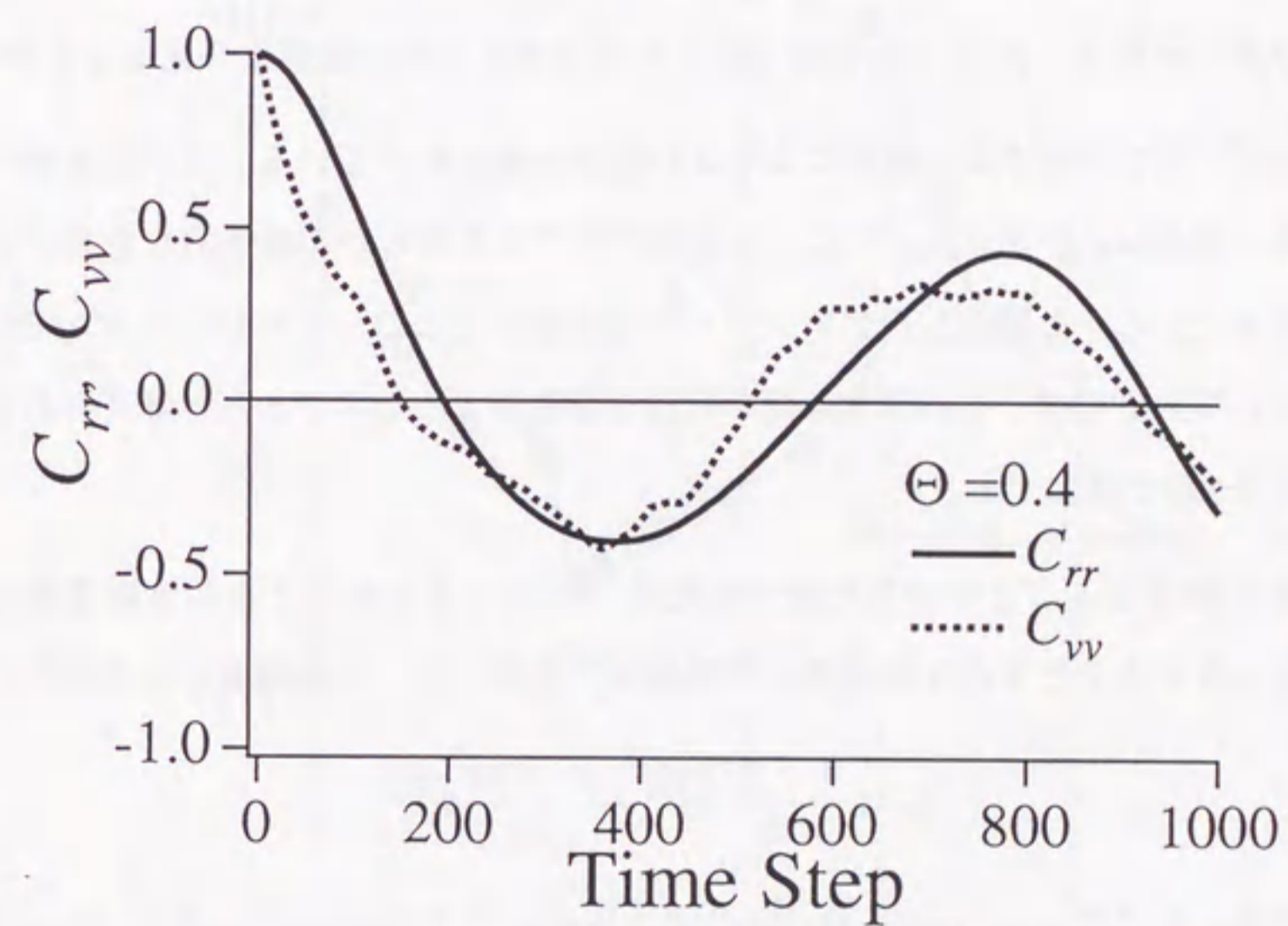


Figure 5.4 The autocorrelation functions of $N = 100$ in the steady field $\Theta = 0.4$.

■ 5.4 結果：バイアス正弦電場

◇ 5.4.1 平均値

泳動速度 図 5.5 に泳動速度の平均値 \bar{v}_x の電場周波数 f 依存性をそれぞれの長さの鎖について示す。図 5.5 の結果は、図 1.8 に示した Shikata と Kotaka³⁸⁾ による実験と非常によく一致している。最も短い $N = 10$ の鎖では、高周波数側の定常値から低周波数側の定常値へと $f < 2 \times 10^{-3}$ で変化する。 $N = 25$ の鎖では $2 \times 10^{-3} > f > 5 \times 10^{-1}$ の領域に平坦な箇所が現れる。 $N = 50$ では速度の極大値が $f \approx 10^{-2}$ に、極小値が $f \sim 5 \times 10^{-3}$ に見られ、反共鳴現象があらわれる。 $N = 100$ の鎖ではよりはっきりと反共鳴現象を見ることができる。

$N = 50$ と 100 の鎖では、鎖長によらない極大があらわれている。これは実験でも観察されている。Shikata と Kotaka³⁸⁾ は、この極大をゲルの何らかの弾性的な応答によるものであると考えた。しかし固定したゲルマトリクスを用いたこのシミュレーションでも同様の結果がえられているので、この極大は鎖の内的な挙動によるものであると考えられる。考えうる機構は 5.6 節で議論する。

電場を反転させることの効果を調べるため、 $\Theta(t) > 0$ であるときの泳動速度の平均値 \bar{v}_x^{for} と $\Theta(t) < 0$ であるときの泳動速度の平均値 \bar{v}_x^{inv} を調べた。泳動速度の全平均とこれらは

$$\bar{v}_x = \frac{\pi + 2\alpha}{2\pi} \bar{v}_x^{for} + \frac{\pi - 2\alpha}{2\pi} \bar{v}_x^{inv} \quad (5.18)$$

の関係にある。ここで $\alpha = |\arcsin(\Theta_b/\Theta_s)|$, $0 < \alpha < \pi/2$ である。 $\Theta_b = 0.1$ 、 $\Theta_s = 0.3$ では $\alpha = 0.34$ となる。 \bar{v}_x^{for} と \bar{v}_x^{inv} の電場周波数依存性を図 5.6 に示した。 \bar{v}_x^{for} も \bar{v}_x^{inv} も周波数が下がるにつれて絶対値が上がっていく。しかし両者の振舞いは異なっている。 \bar{v}_x^{for} が \bar{v}_x と同様に鎖長に依存し、 $N = 50$ と 100 で極大や極小を見せるのに対して、 \bar{v}_x^{inv} は鎖長依存性が小さく、また極大や極小も見られない。

形態 \bar{R}_l の周波数依存性をそれぞれの鎖長について図 5.7 に示した。比較のために \bar{v}_x もそれぞれ示してある。 \bar{R}_l は \bar{v}_x とは異なった振舞いをみせている。 $N = 10$ では \bar{R}_l はほとんど f に依存しない。これは \bar{v}_x が高周波側と低周波側で二倍近く変わることに大きく異なっている。 $N = 25$ と 50 では \bar{R}_l は $10^{-3} < f < 5 \times 10^{-2}$ の間で高周波側の定常値から低周波側の定常値

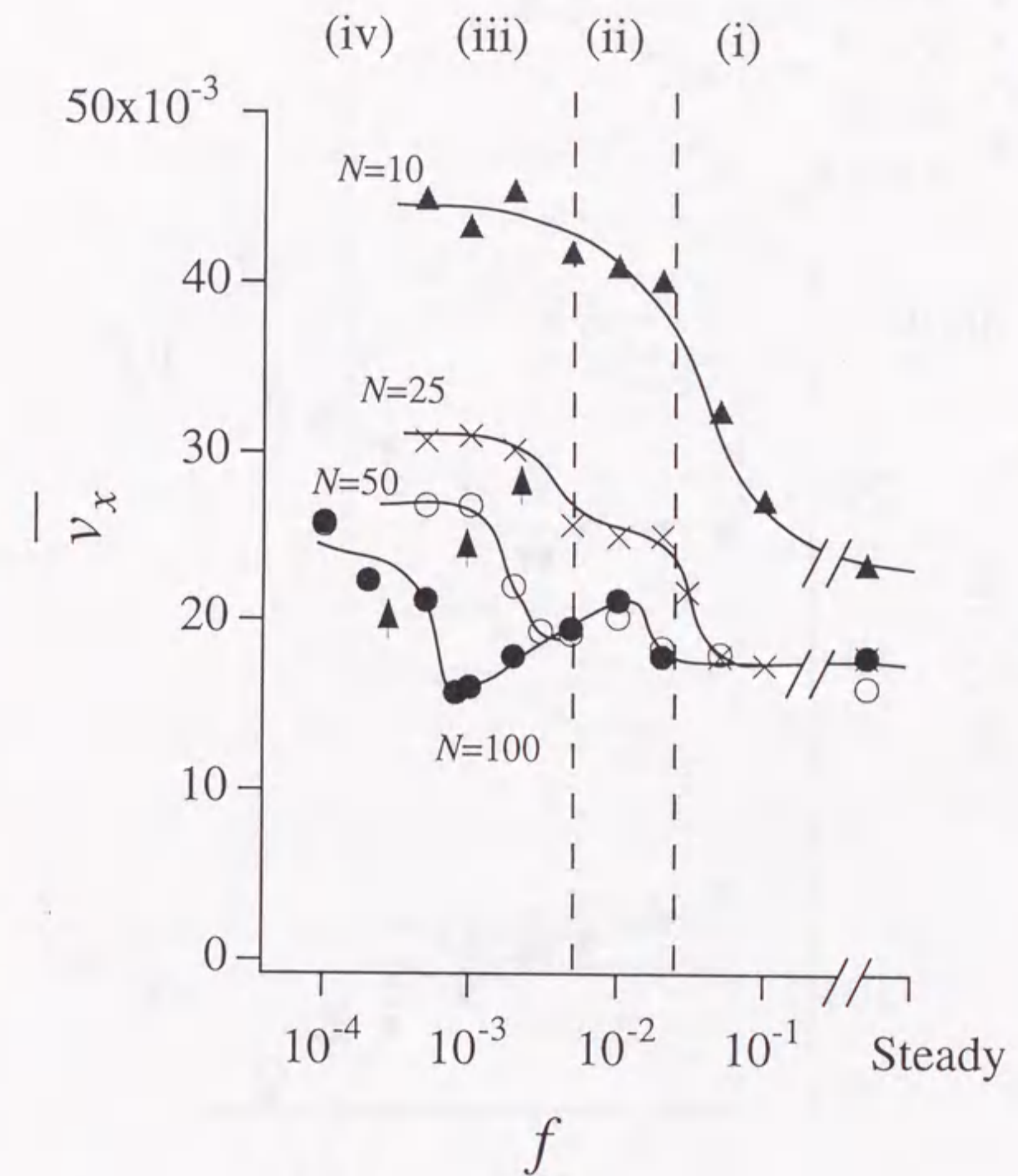


Figure 5.5 The averaged migration velocity \bar{v}_x . Solid lines are to guide the eyes.

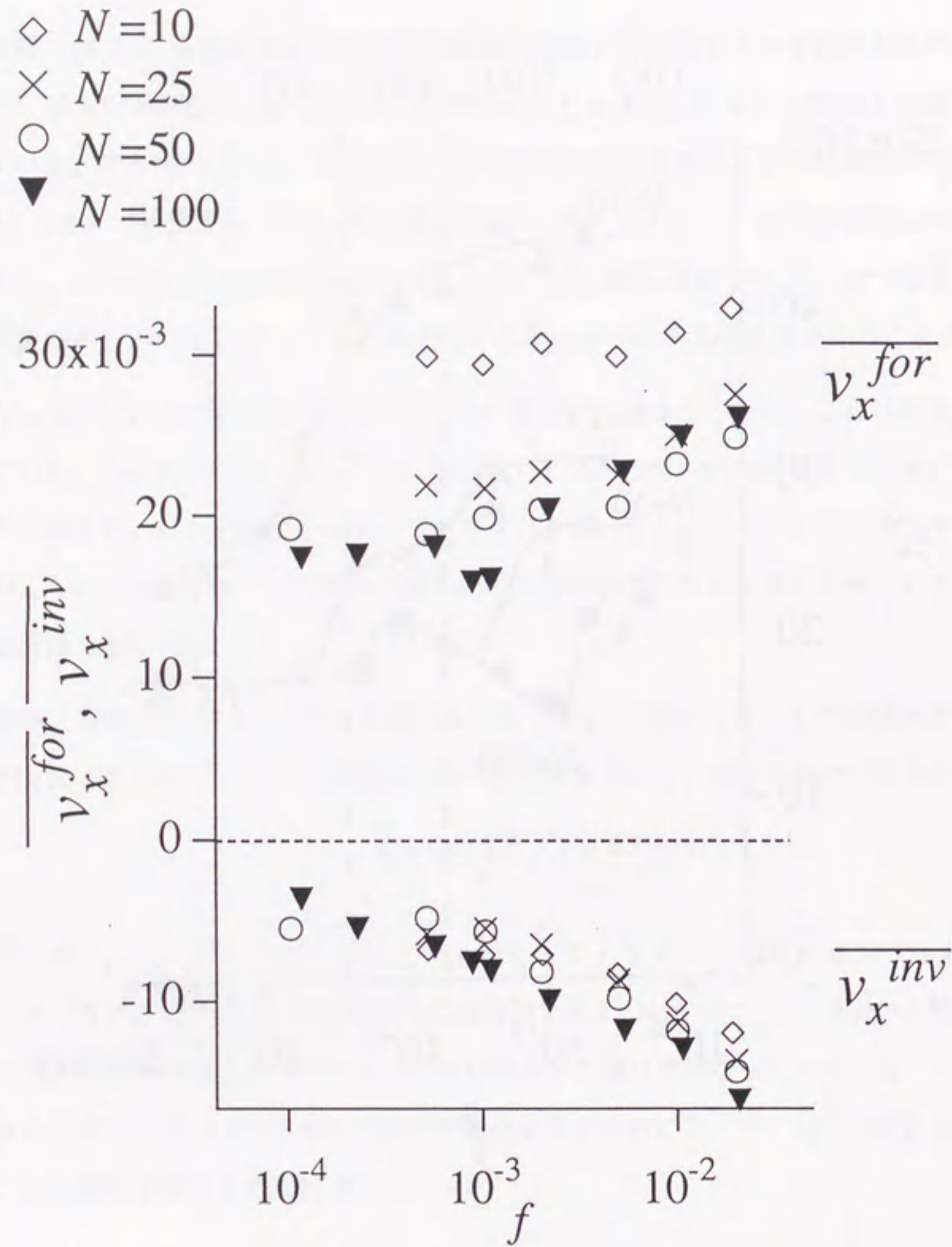


Figure 5.6 The migration velocity for $\Theta(t) > 0$ and $\Theta(t) < 0$.

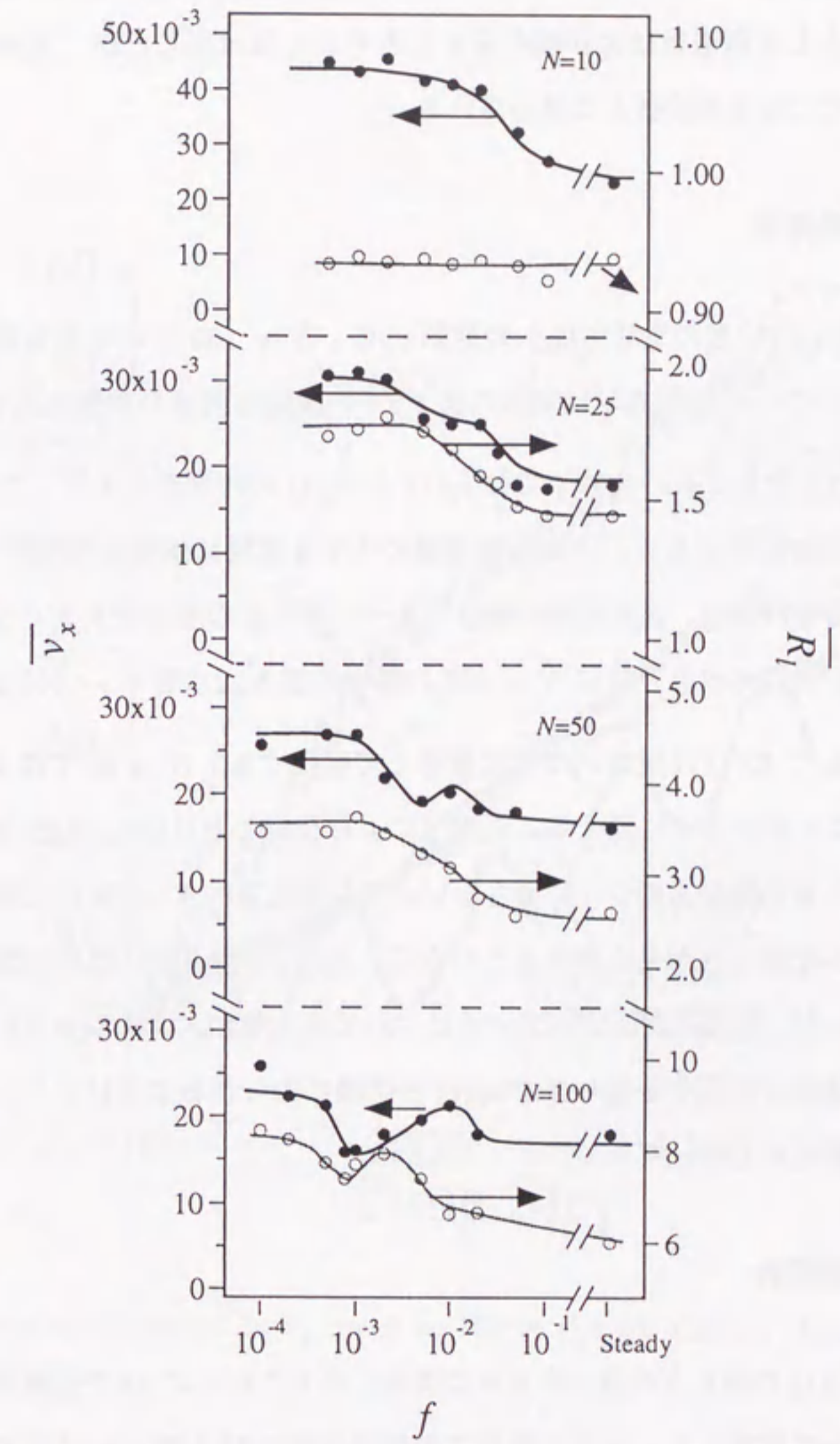


Figure 5.7 The averaged values of the larger principal values of the gyration tensor \overline{R}_l . Lines are to guide the eyes.

へと値をかえていく。 \overline{R}_l が値を変化させる周波数領域で \overline{v}_x も大きく値を変えるが、 \overline{v}_x で見られる極大値や極小値は \overline{R}_l には見られない。 $N = 100$ の鎖では \overline{R}_l に極大と極小が現れる。この \overline{R}_l が極小値をとる周波数は \overline{v}_x が極小値をとるそれとほぼ同じだが、 \overline{R}_l が極大値をとる周波数は \overline{v}_x が極大になる周波数とは違っている。

◇ 5.4.2 時間発展

図 5.8に重心の位置の電場方向への射影 x_g の、 $N = 100$ での時間発展の例を示す。シミュレーションでの x_g の振舞いは実験の図 4.2での議論と同様の特徴を見せている。

図 5.9-5.12にそれぞれの条件下での $v_x(t)$ と $R_l(t)$ の時間変化を示した。 $v_x(t)$ には全ての条件で共通な性質がある。i) 高周波電場の下でも電場に追従して変化する。ii) バイアス正弦電場の場合の方が、定常電場の場合に比べて揺らぎの度合いが大きくなる。ここでも実験と同じ性質が現れており、特に $N = 100$ の場合の図 5.12は図 4.3-4.5によく対応する。

これに対して $R_l(t)$ の振舞いは N に依存して変化する。 $N = 10$ では $R_l(t)$ の振舞いはほとんど f によらないように見える。 \overline{R}_l が f によらないことは図 5.7で示されているが、それに加えて揺らぎの程度までが f によらないように見える。 $N = 25$ 以上の長い鎖では伸縮運動による大きな揺らぎが見られるようになる。 $R_l(t)$ の極小値には周波数による違いはあまり見られないが、周波数が下がっていくにつれて極大値が大きくなっていく。低周波の電場のもとでは電場に応答する揺らぎが $v_x(t)$ と同様に見られるようになり、伸縮運動による揺らぎの出現頻度が上がっていく。

◇ 5.4.3 相関関数

$v_x(t)$ と $R_l(t)$ の揺らぎの違いをさらに明確に示すために式 2.6で定義された相関関数をそれぞれについて計算した。全ての条件での結果を図 5.13と図 5.14に示す。電場周波数と揺らぎの特征的な時間との関係を示すため、電場周波数でスケールした時間 ft に対して表示した。明らかに速度相関関数 C_{vv} は電場周波数 f での振動を示している。これは速度が電場に対してよく応答するという観測結果と対応する。また実験の図 4.6とは表示の方法は違っているが、同様の結果になっている。これに対して形状相関 C_{rr} は f にはよらずに特征的な

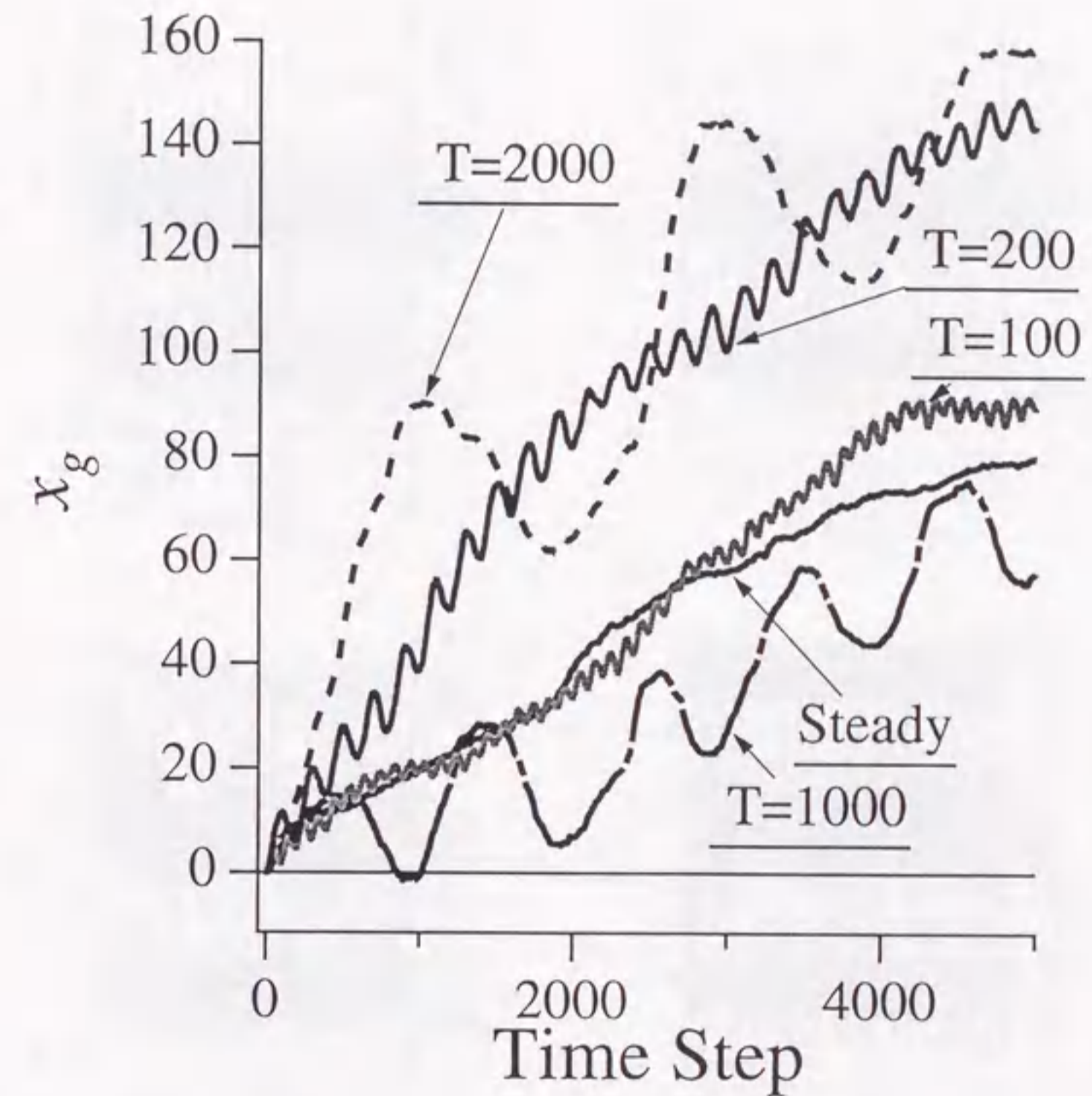


Figure 5.8 Time development of x_g for $N = 100$ in the simulation. The time origin is arbitrary.

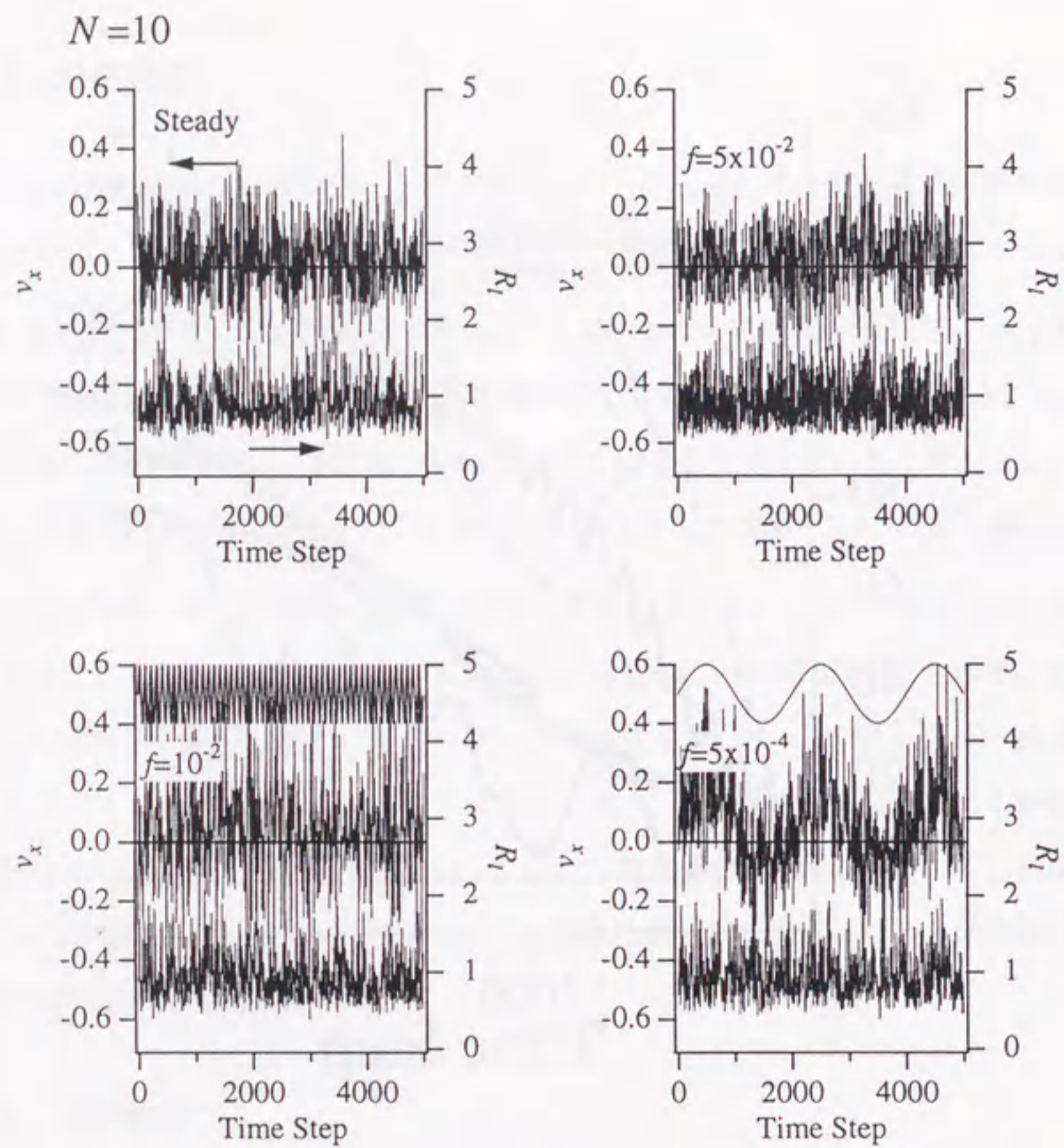


Figure 5.9 Time development of $v_x(t)$ and $R_l(t)$ for $N = 10$. The field condition is indicated on each figure. The time origin is arbitrary.

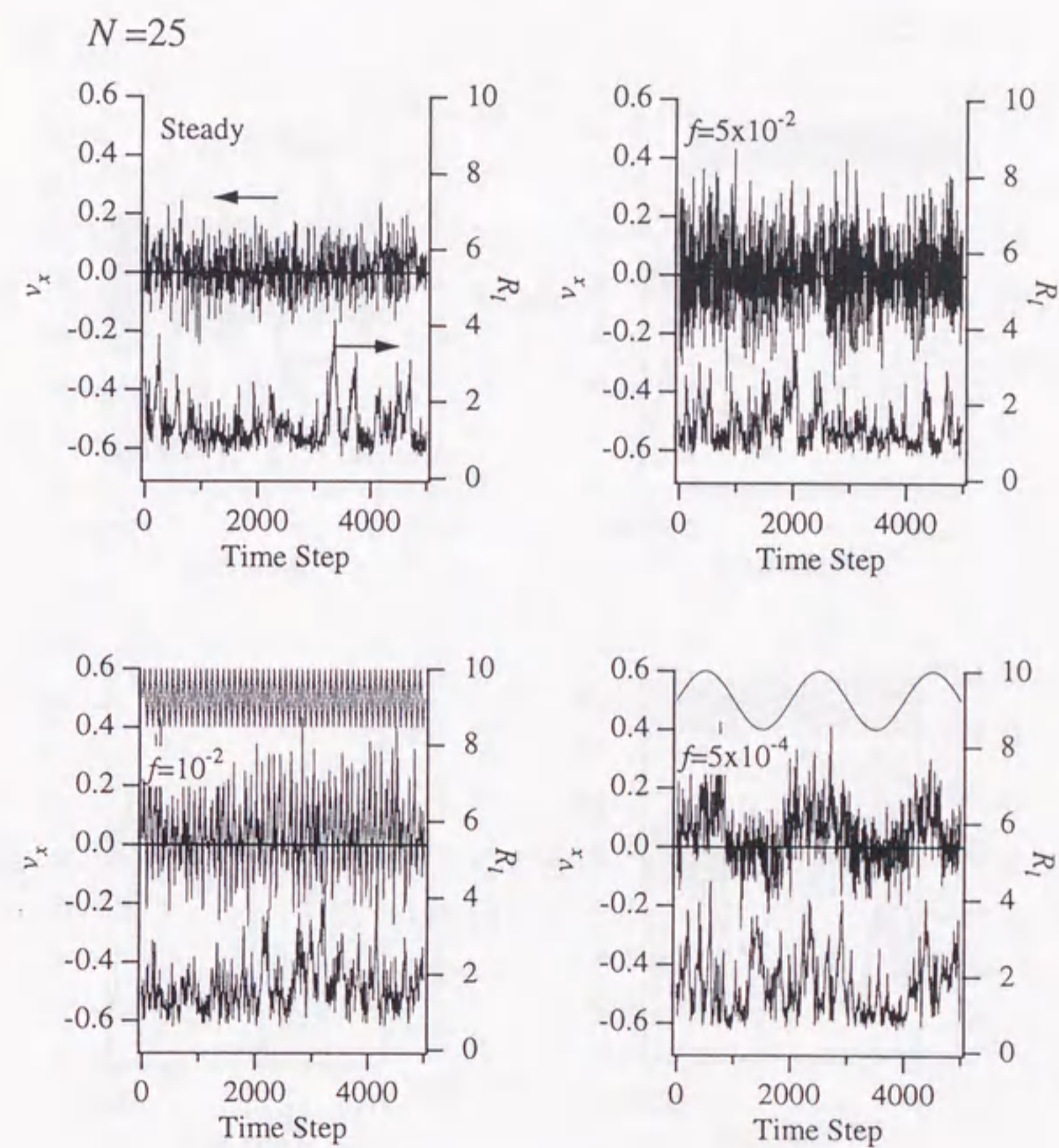


Figure 5.10 Similar with Fig.5.9 for $N = 25$.

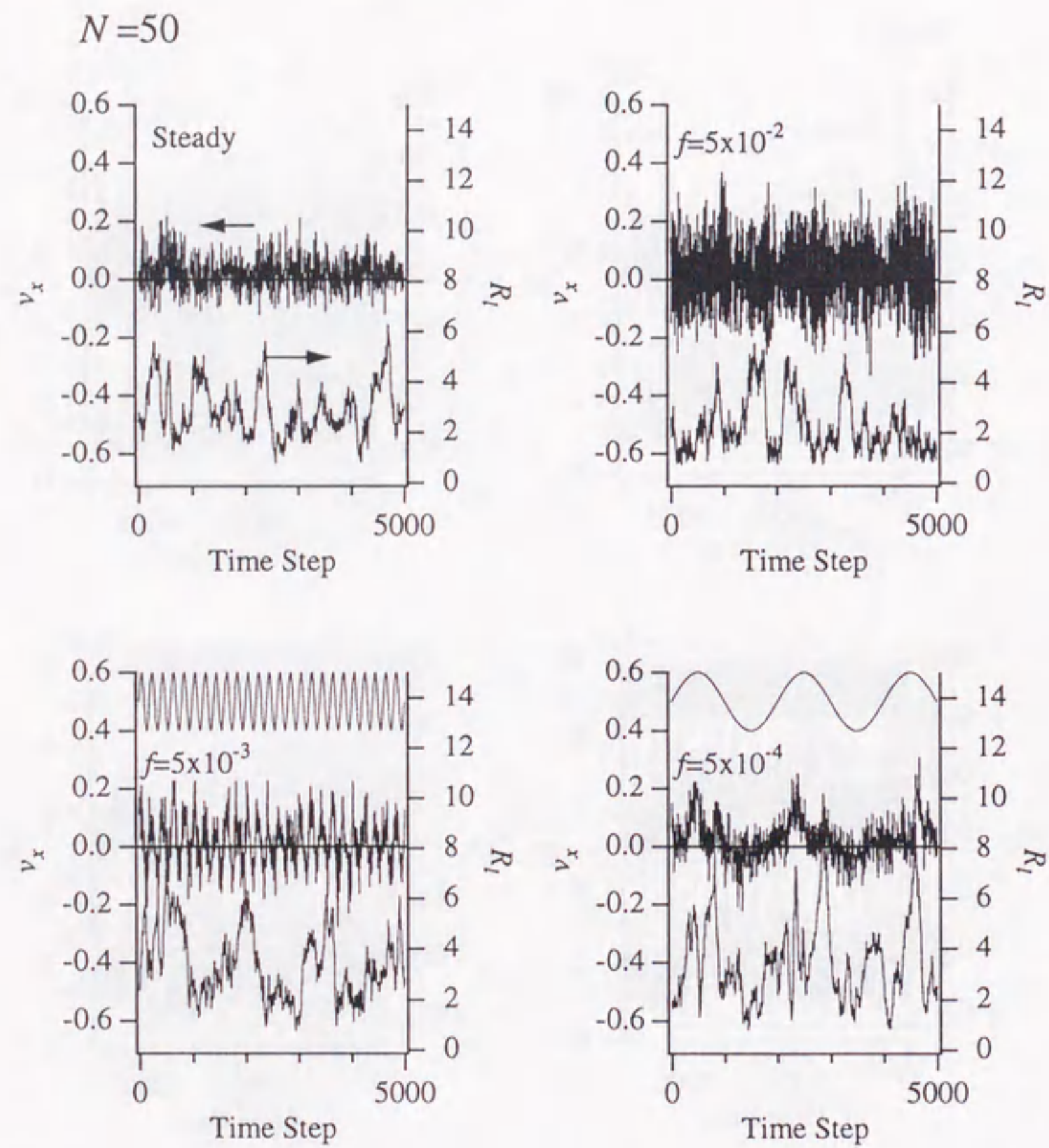


Figure 5.11 Similar with Fig.5.9 for $N = 50$.

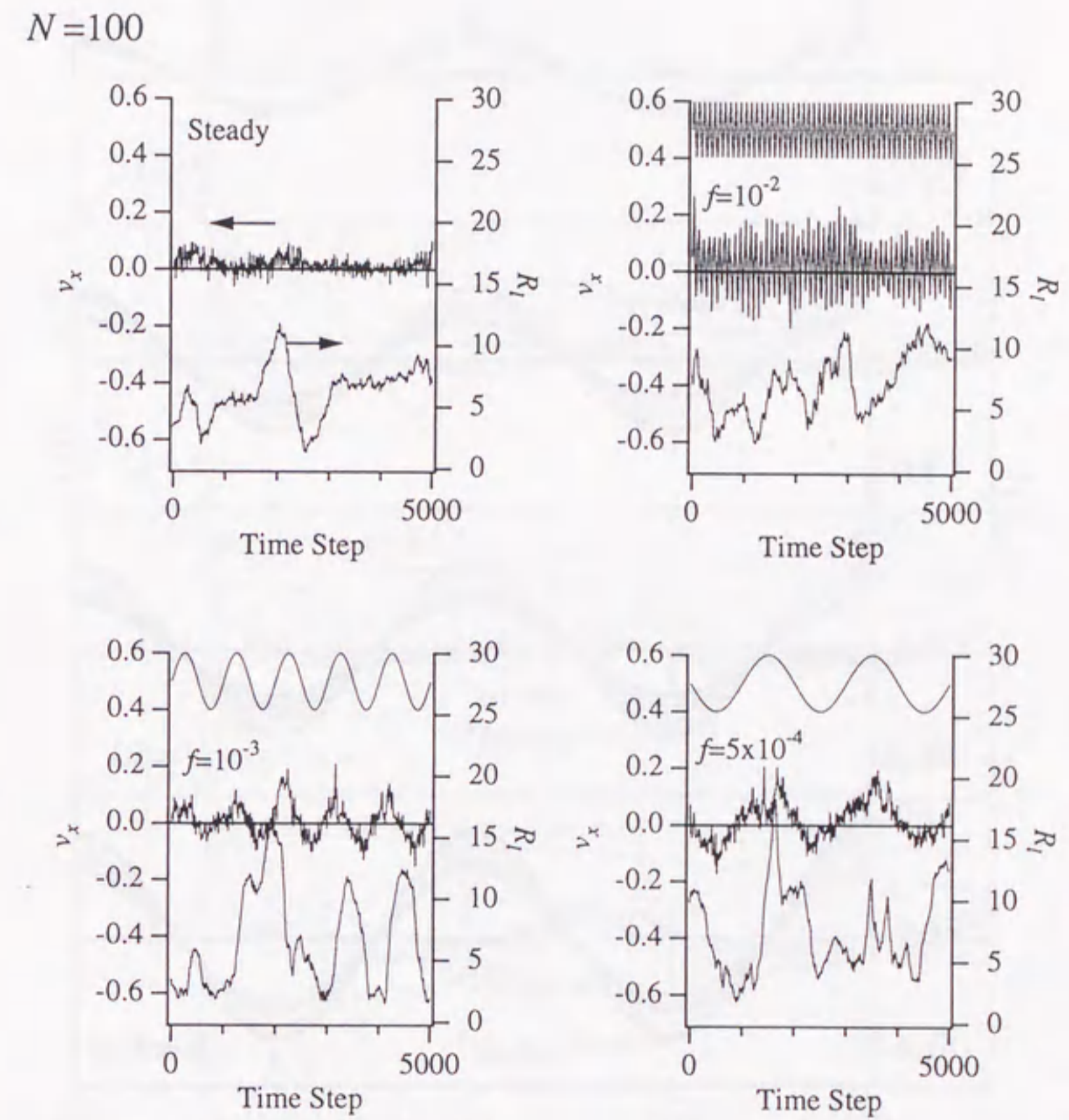


Figure 5.12 Similar with Fig.5.9 for $N = 100$.

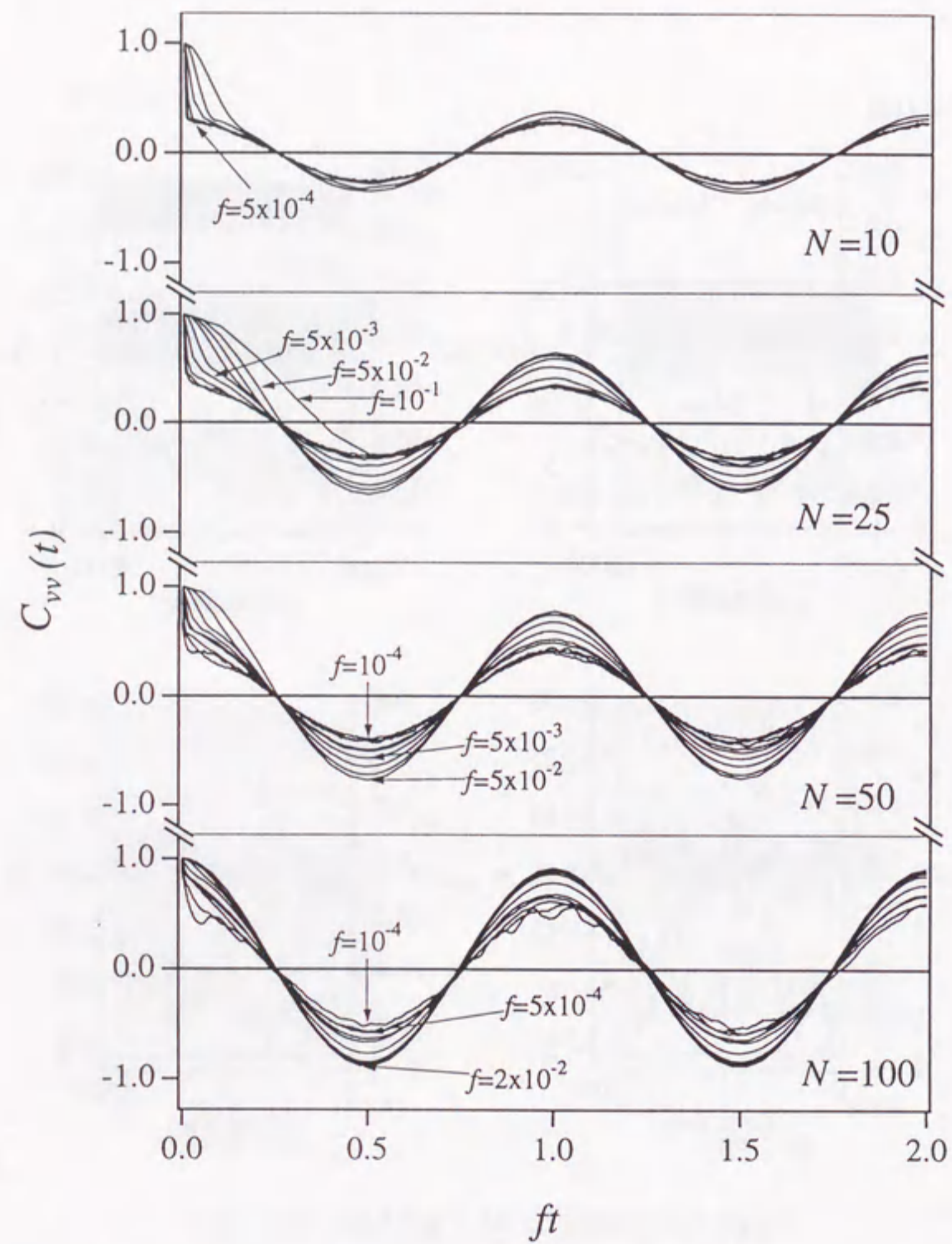


Figure 5.13 Autocorrelation functions of $v_x(t)$, $C_{vv}(t)$ plotted against the scaled time ft .

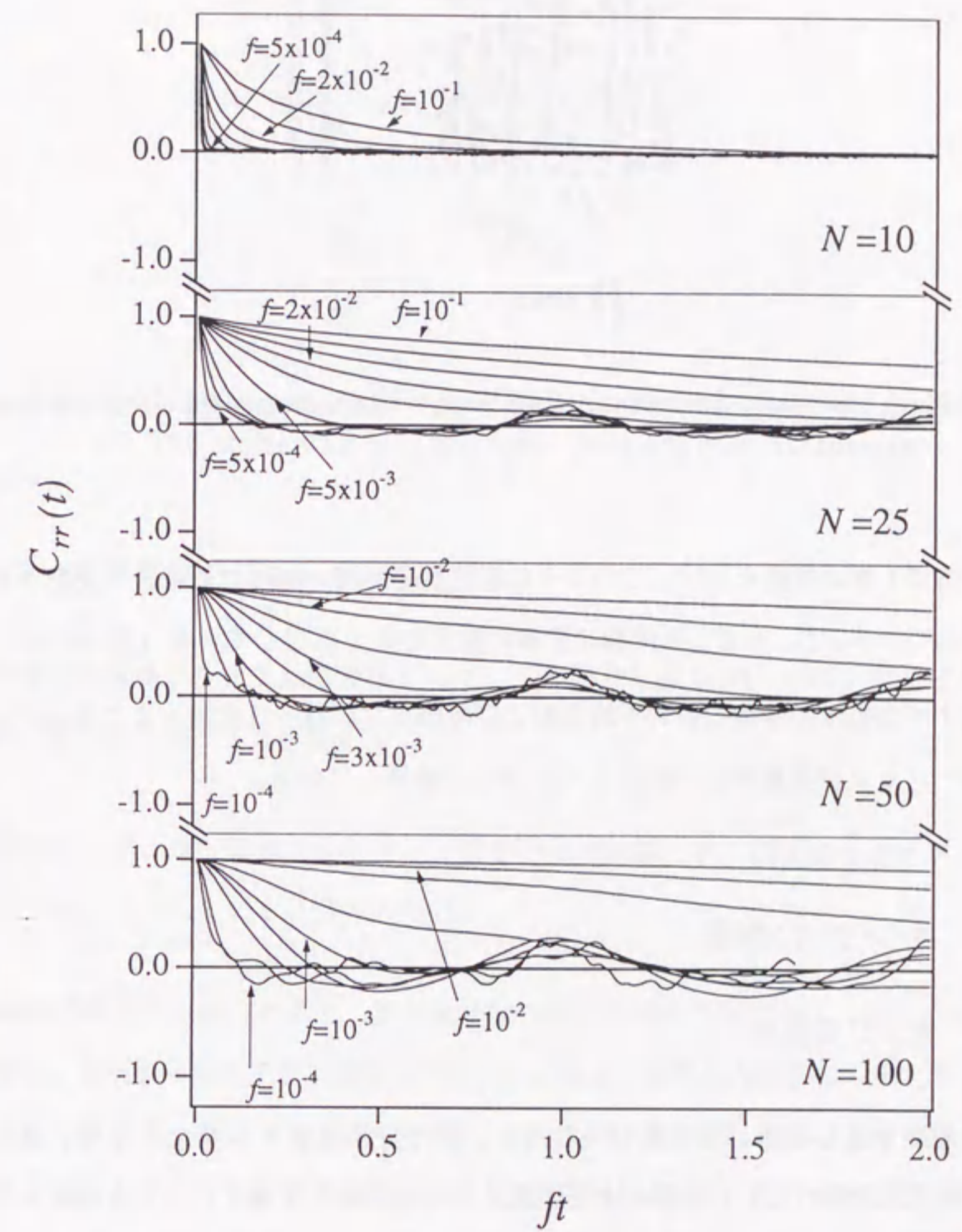


Figure 5.14 Autocorrelation functions of $R_l(t)$, $C_{rr}(t)$ plotted against the scaled time ft .

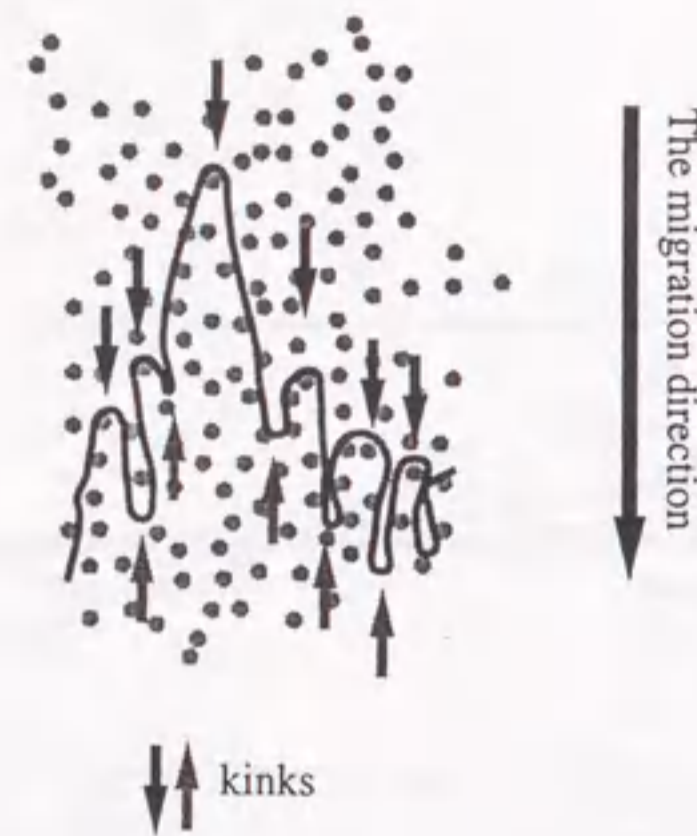


Figure 5.15 A schematic description of kinks on a chain during gel electrophoresis. The explanation is in the text.

和時間に基づく減衰挙動を示す。このことは形態変化が遅い緩和のモードで支配されていることを示している。 C_{rr} も C_{vv} と同様に実験の結果をよく再現している(図4.7)。

ここまでの種々の特徴的値の平均値および時間変化の様子は実験とよくあっており、本シミュレーションが実験をよく再現していることを示している。

■ 5.5 キンクの挙動

◇ 5.5.1 キンクの定義

鎖の形態をさらに詳しく特徴づけるため、鎖の折れ曲がり(キンク)の、鎖に沿った分布の時間変化を調べた。いま鎖がある形態をとっているとする。このときボンドベクトル $\mathbf{u}_i \equiv \mathbf{r}_{i+1} - \mathbf{r}_i$ の電場方向成分 u_{ix} を鎖に沿って調べていくと、電場に対して反転している箇所 i を見つけることができる。式で表すと $u_{ix}u_{i+1x} < 0$ となる箇所 i がいくつかある。このような箇所を鎖に沿って一次元的に i/N 軸上に点で表していく。鎖が時間とともに形態を変えるとこれらの点の位置も変わっていくので、鎖に沿った軸と直交する方向に時間軸をとると、鎖の形態を二次元的に表すダイアグラム、キンクダイアグラムができる。

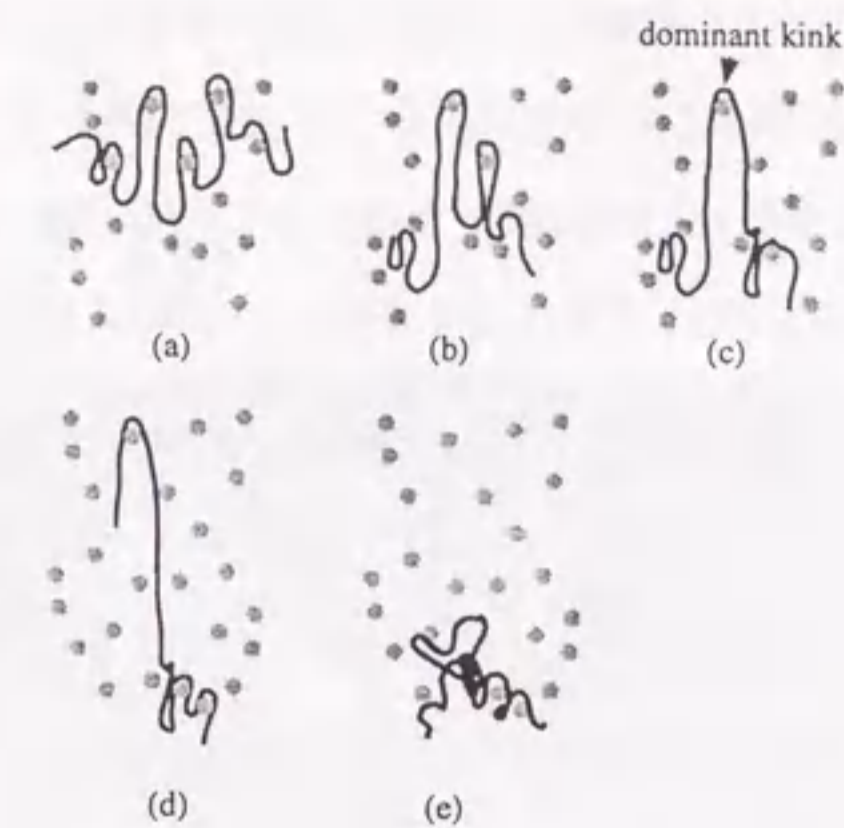


Figure 5.16 A schematic picture of the kink dynamics during steady field gel electrophoresis. The explanation is in the text.

◇ 5.5.2 定常電場でのキンクの挙動

まず定常電場ゲル電気泳動の場合のキンクの動きを図5.3(b)のキンクダイアグラムおよび模式的な図5.16とともに考える。

1. 鎖がランダムコイル状のまるまった形をとっているとき、鎖上にはたくさんのキンクが一様に分布している(図5.16(a))。
2. 電場で鎖がひっぱられると、鎖が障害物の編目につかかって多くの引っかかり点ができる。ある引っかかり点と隣あった引っかかり点との間から鎖がはみ出してくる。このような箇所はヘルニアとよばれる⁷⁶⁾。ヘルニアはそれぞれ電場によってひきずりだされ、成長していくが、その過程で隣あった別のヘルニアと競合が起こる。小さなヘルニアは電場で引っ張られる力が弱いので、より大きなヘルニアに吸収されていく(図5.16(b))。ヘルニアに付随したキンクも同様に統合されていき、最終的にただ一つのキンクだけが残る。このとき鎖はV字型の形態をとり、引き延ばされている。V字型の形態の頂点近くの部分は張力が高いためにキンクは最後に残った一つしか見えない。この一つのキンクの動きで鎖の伸縮運動が説明できることは3章で詳しく議論した。鎖

全体の運動がこのキンクに支配されているという意味で、このキンクを支配的キンク (dominant kink) と呼ぶことにする。一方、支配的キンクから離れた V 字型の腕の両端の部分では張力が低いために鎖がまるまっている。鎖の端の部分には常に張力が低い状態なので、それに対応していくつかのキンクが常に存在している (図 5.16(c))。

3. V 字型が外れていく挙動に対応して、支配的キンクが鎖の上を走っていく。支配的キンクの進む先、つまり V 字型の短い方の腕にあったキンクは吸収されてしまう。一方、V 字型の長い方の腕の先端部は張力が低いためにいくつかのキンクが存在しており、支配的キンクの動きとは独立にキンクの統合が行なわれている (図 5.16(d))。
4. 支配的キンクが鎖の端に達すると V 字型が外れる。瞬間的に鎖の張力は 0 になるので熱揺らぎによってたくさんのキンクが一気に作られる。この外れた部分は先端部のヘルニアの統合が起こっている部分よりも速く泳動するために、鎖は球状の状態になる。(図 5.16(e))。

支配的キンクの挙動は決定論的であるが、キンクの発生は確率論的である。鎖の伸縮運動の周期性はこれら二つの要因で決まる。これについては 2 章で $R_l(t)$ のモデル関数を用いて議論した通りである。キンクの発生の乱雑さが式 2.9 や式 2.10 の分布の誤差に対応する。

◇ 5.5.3 バイアス正弦電場でのキンクの挙動

$N = 100$ の場合のバイアス正弦電場の下でのキンクダイアグラムの例を図 5.17 に示す。また比較のためにそれぞれの場合で特徴的な形態のスナップショットを図 5.18 に示した。バイアス正弦電場法ではキンクの動きは電場に影響されて定常電場の時とは異なった振舞いを見せている。低周波電場 $f = 5 \times 10^{-4}$ では、張力の高い部分に相当するキンクの疎な部分が周期的に現れ、その中央の部分に支配的キンクが走る様子が観察される。この周期は電場周期と一致しており、強い電場がかかった時にキンクの疎な部分が現れる。

反共鳴条件付近の $f = 10^{-3}$ でもキンクの疎な部分が周期的に現れるが、低周波電場の時と異なって 2 個か 3 個のキンクが疎な部分の中に見える。これらは鎖が V 字型ではなく N 字型や W 字型をとることを反映したものである。このように反共鳴条件は 2-3 個の共存する支配的キンクと、それに対応する N または W 字型で特徴づけることができる。

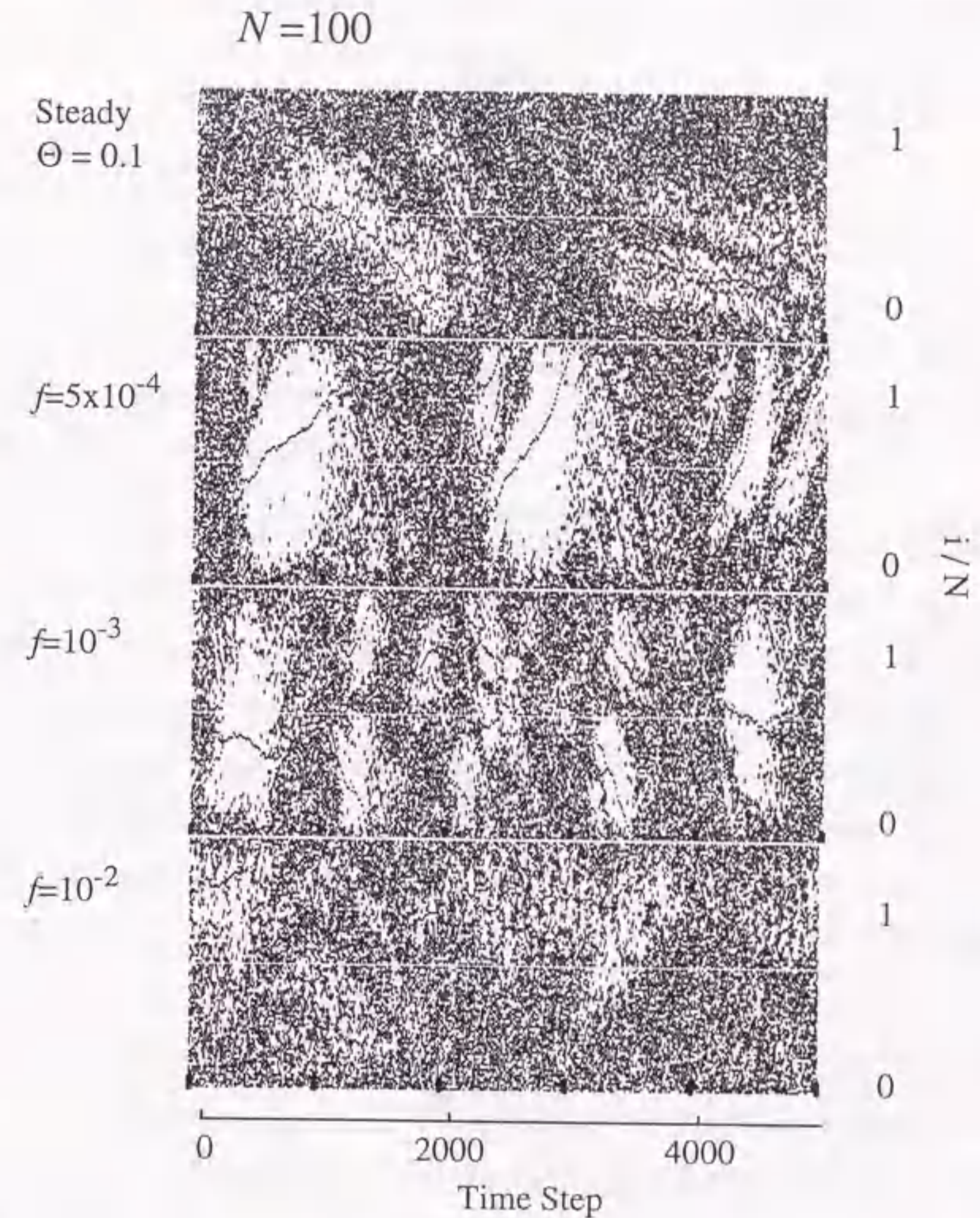


Figure 5.17 The kink motion for $N = 100$. The time origin are the same with Fig.5.3 or Fig.5.12

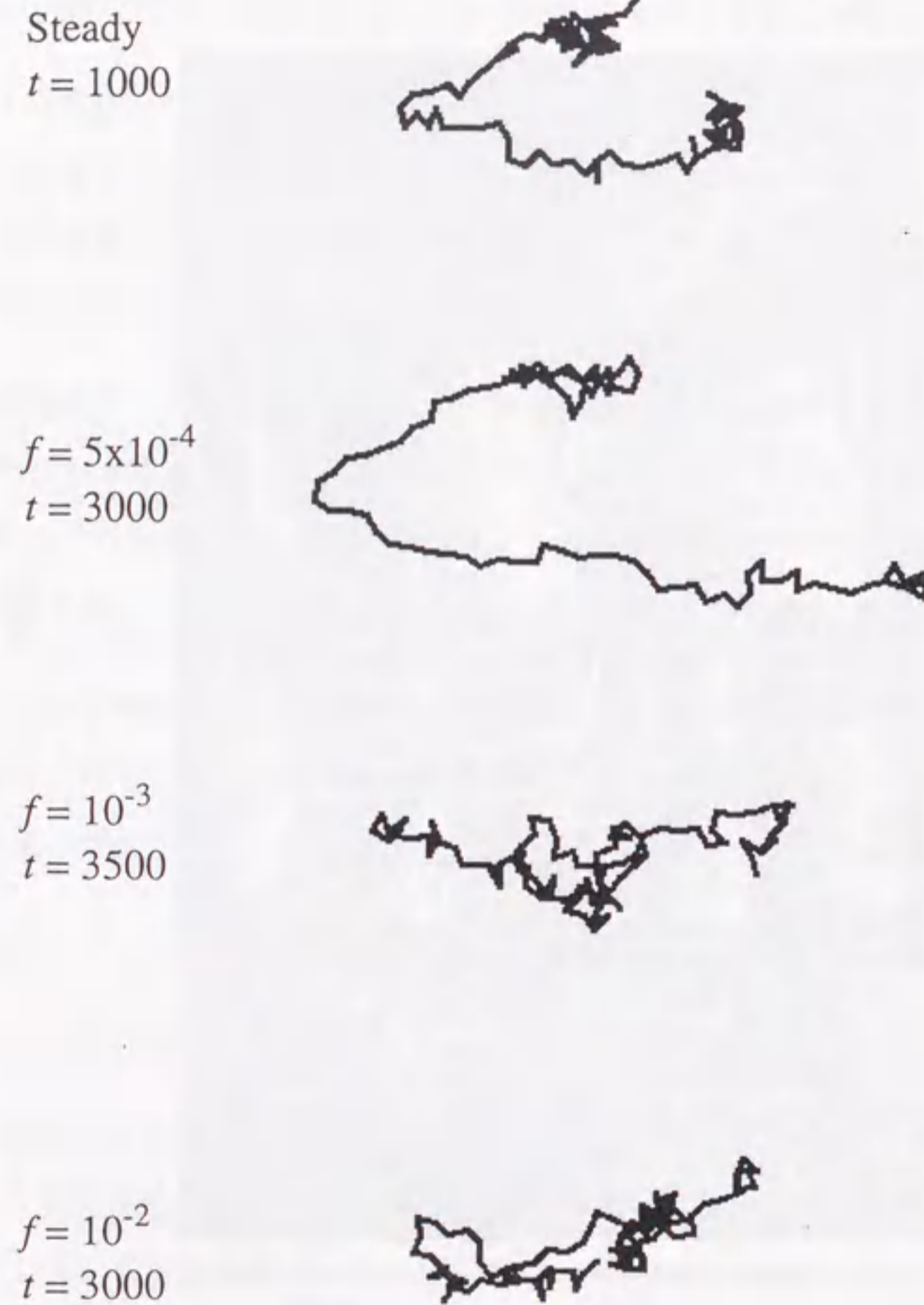


Figure 5.18 Examples of the stretched conformation in each condition. The indicated time step are the same with Fig.5.12 and Fig.5.17. $N = 100$.

高周波電場 $f = 10^{-2}$ ではキンクの疎な部分ははっきりと見えなくなるが、それでもキンクのパターンに電場の変動に応じた揺らぎがあることが見える。この揺らぎのため支配的キンクも特定しづらいが、V字型が外れることに対応する、キンクの疎な部分の動きが見えている。

■ 5.6 DNA の形態変化と泳動速度

◇ 5.6.1 伸びた状態に見られる差異

本節ではここまでの実験とシミュレーションの結果をもとに、バイアス正弦電場法での DNA の泳動速度の周波数依存性、分子量依存性を、DNA のそれぞれの条件下での形態変化を考察することで説明する。

DNA が泳動する時、短い鎖を除けばどのような条件下でも縮んだ状態と引き伸ばされた状態を交互にとりながら泳動している (図 5.10-5.12)。縮んだ状態の大きさは $R_l(t)$ で見ると限り違いがなく、またキンクの状態も一様に分布しており同じように見える。縮んだ状態と伸びた状態を区別するために、図 5.10-5.12 から $R_l(t)$ のピークとボトムを、Savitzky-Golay 法の二次多項式適合による平滑化微分に基づいた方法⁹⁸⁾で検出した。ノイズを除去するために 9 点平滑化微分を用い、また $\overline{R_l}$ の値を閾値として、伸びた状態に対応するピーク R_l^p 、縮んだ状態に対応するボトム R_l^b を選んだ。それぞれの平均値を鎖長毎に、周波数に対して図 5.19 に示した。図から明らかなように、 $\overline{R_l^p}$ の値には全ての N についてほとんど周波数依存性が認められない。 N が大きくなるにつれてわずかに見られる程度である。これに対して、 $\overline{R_l^b}$ は $N = 10$ の場合を除いて強い周波数依存性を示し、 $\overline{R_l}$ の周波数依存性に大きく影響している。実験での観察、シミュレーションでのスナップショットでも縮んだ形態はどの条件下でも同様に見えた。以上の結果から、泳動速度の違いは引き伸ばされた状態の違いに起因すると考えられる。

◇ 5.6.2 ずれ長さ d

定常電場での DNA の引き伸ばされた状態を特徴づけるのは、支配的キンクと V 字型の形態であった。V 字型は電場の反転によって乱されていくことがキンクの解析とスナップ

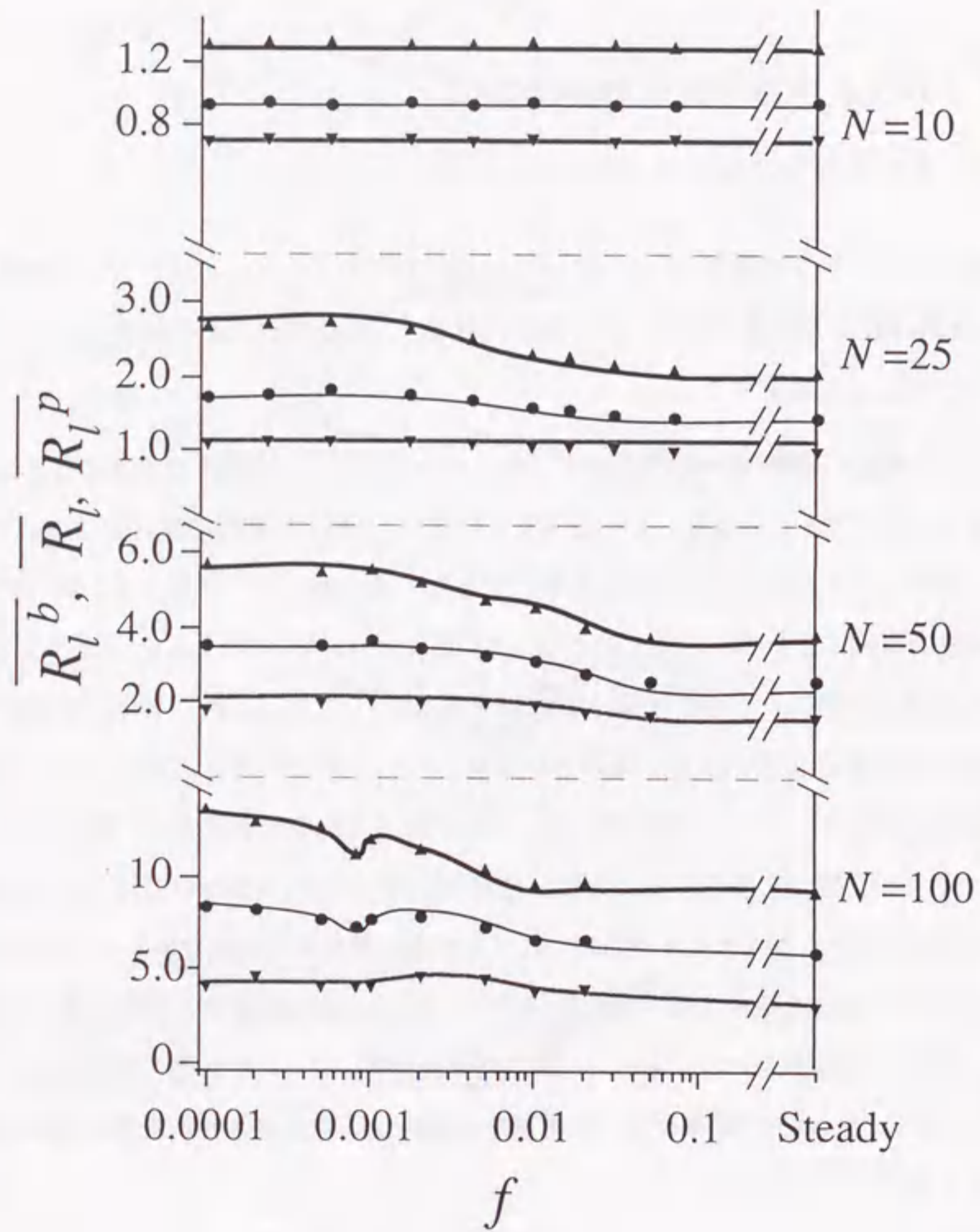


Figure 5.19 Average values of R_l^p and R_l^b plotted against f for each N . \bar{R}_l are plotted for comparison. Lines are to guide the eyes.

ショットから分かった (図 5.17、図 5.18)。それぞれの条件での V 字型の乱され具合を定量化するために、電場が反転した時にそれぞれのビーズがどれだけ動くかを調べた。その平均をずれ長さ d と名付け、以下のように定義した。

$$\begin{aligned} d &= \left\langle \left\langle x_i \left(t = \frac{1}{2\pi f} (2\pi n - \alpha) \right) - x_i \left(t = \frac{1}{2\pi f} (2\pi n - \pi + \alpha) \right) \right\rangle_i \right\rangle_n \\ &= \left\langle x_g \left(t = \frac{1}{2\pi f} (2\pi n - \alpha) \right) - x_g \left(t = \frac{1}{2\pi f} (2\pi n - \pi + \alpha) \right) \right\rangle_n \\ &= \frac{\pi - 2\alpha}{2\pi f} v_x^{inv}, \end{aligned} \quad (5.19)$$

ここで α は式 5.18 のそれと同じである。結果的に d は $\Theta(t) < 0$ の間に重心が進んだ距離になっている。 d を計算した結果を図 5.20 に示す。図 5.6 で見たように、 $\Theta(t) < 0$ の間の泳動速度 \bar{v}_x^{inv} には鎖の長さによる差は少ない。それを反映して d は全ての条件ではほぼ共通の線上にのる。

◇ 5.6.3 バイアス正弦電場での DNA の挙動の説明

d を用いて \bar{v}_x の振舞いを説明する。 d の値によって DNA の挙動は以下のような領域に区分できる。図 5.21 にそれぞれの領域での特徴的な形態を模式的に示した。

- (i): $d < 1$ d が 1 より小さい状況では、V 字型はほとんど電場反転の影響を受けない。1 はボンドの長さであり、鎖の上に生じる最小のヘルニアの大きさである。それを越えない程度のゆがみがあっても V 字型の動きには本質的な影響はない。従ってこの領域での泳動速度は定常電場 $\Theta = \Theta_0$ のそれに近い。図 5.20 から $d < 1$ を満たす領域を求めると $f > 2 \times 10^{-2}$ であるが、この領域を図 5.5 で見ると泳動速度は定常電場での値から大きく変化していない。この領域は定常電場と同じく V 字型で特徴づけられる。
- (ii): $1 < d < d_c$ d が 1 を越えて大きくなると、V 字型が反転電場の影響を受けはじめる。影響は次のような二つが考えられる。一つは、電場で前後に揺さぶられることによって V 字型の頂点の部分の張力が緩み、スムーズに動かされる効果である。これによって泳動速度が上がることを期待される。もう一つは、V 字型の腕の部分に新たなヘルニアが生じて V 字型の腕の動きを阻害する効果である。この効果で泳動速度は下がると思われる。二番目の効果の、V 字型の腕に生じるヘルニアは、小さければ熱揺らぎ

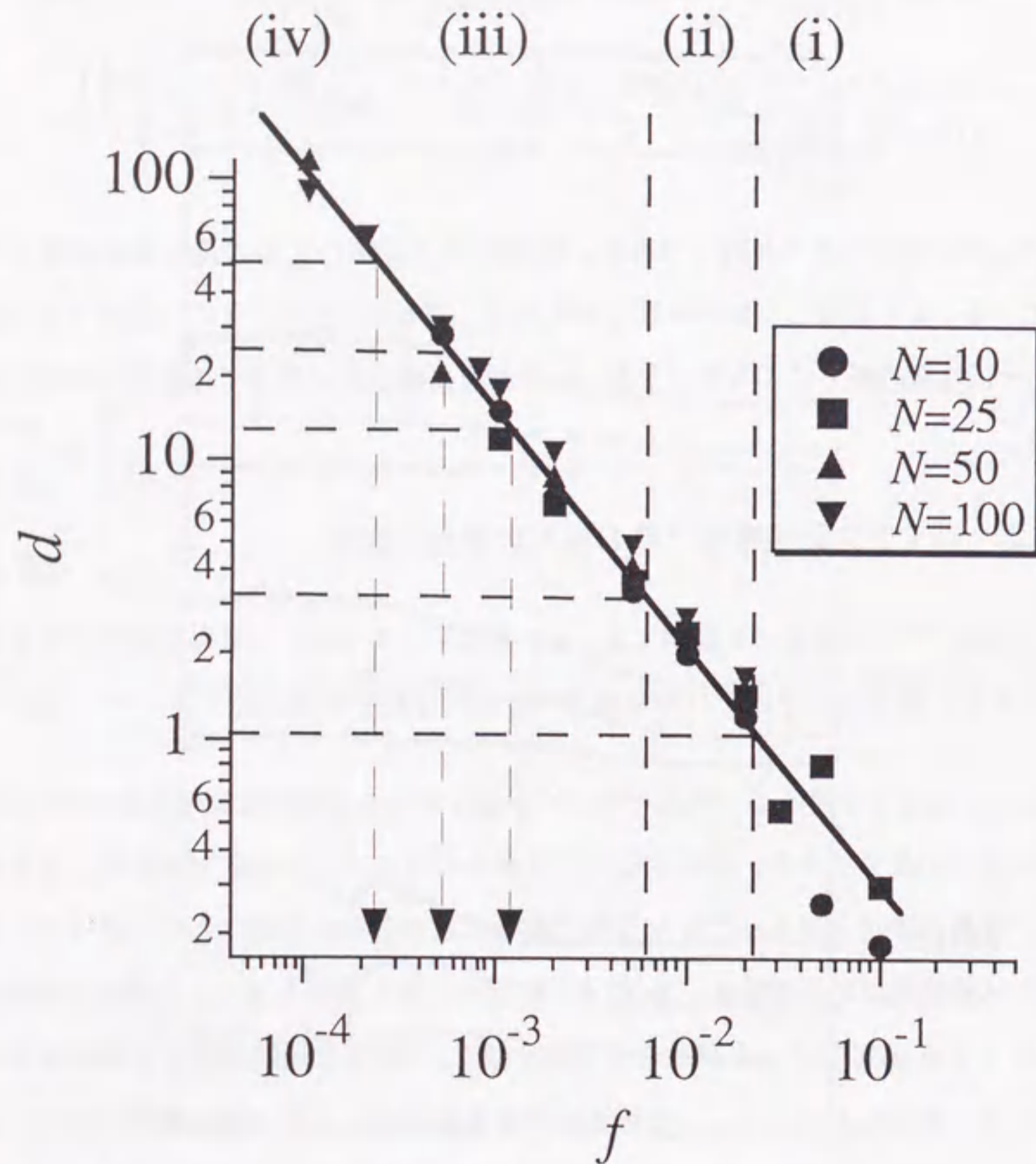


Figure 5.20 The modulated length d defined by Eq.5.19. The explanation is in the text.

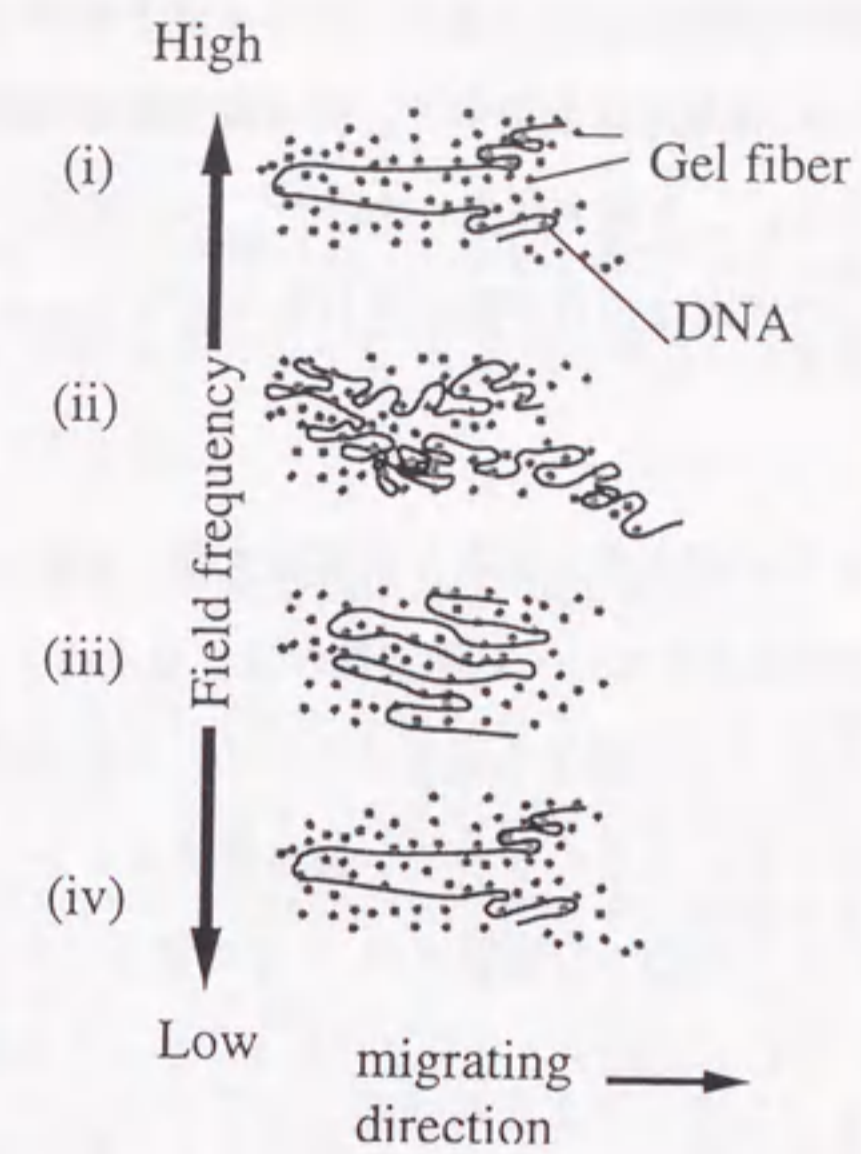


Figure 5.21 Schematic pictures of DNA during BSFGE. The explanation is in the text.

で消えてしまうので泳動の邪魔にはならない。従って一番目の効果が効いて泳動速度は上がる。逆に熱揺らぎでは消えないほどに大きなヘルニアが作られると、V字型の泳動は阻害される。二番目のこの効果が、一番目の効果を打ち消すほどに大きくなれば泳動速度は下がる。ヘルニアが熱揺らぎによって消されるか残るかの臨界の大きさ、 d_c を求める。反転電場によって、理想的に深さ d のヘルニアができたとする。ヘルニアに含まれるセグメントの数は、鎖の折り返しを考慮すると $2d$ である。 $2d$ のセグメントからなる部分の電場によるポテンシャルは、その瞬間の電場の強さを $\Theta(t)$ として $2d\Theta(t)$ で与えられる。いま $\Theta(t) < 0$ の間のこのヘルニアの平均電場ポテンシャル U^{hernia} を計算すると、

$$U^{hernia}/k_B T = 2d \frac{(\pi - 2\alpha)f}{2\pi} \int_{\Theta < 0} dt [\Theta_b + \Theta_s \sin 2\pi ft] \quad (5.20)$$

式5.20に $\Theta_b = 0.1$ 、 $\Theta_s = 0.3$ を代入すると、 $|U^{hernia}|/k_B T \approx 0.26d$ を得る。 $|U^{hernia}|/k_B T$ が1に等しくなる d が臨界ヘルニアサイズ d_c であるから、 $0.26d_c = 1$ より $d_c \approx 3.8$ を得る。領域 (i) の場合と同様に図 5.20 からこれを満たす周波数を見積もると、 $f \approx 5 \times 10^{-3}$

である。この周波数から領域(i)との境界である $d=1$ を満たす周波数までの範囲を領域(ii)とする。図5.5に領域(ii)を示すと、長い鎖で泳動速度の極大が出ている周波数帯であることが分かる。この極大は先にあげた二つの相反する機構の競合の結果であると考えられる。この領域は頂点が動かされるV字(apex-moved V-conformation)が特徴的である。

(iii): $d_c < d < N/2$ さらに d が大きくなるとV字は大きくゆがみ、腕の部分に枝のようなヘルニアがしばしば形成されていく。周波数が低くなるほど d は大きくなり、 d に応じたサイズのヘルニアがV字の動きを阻害するために泳動速度は低くなる。この領域はヘルニアのサイズが十分に大きくなって、鎖自体の大きさを越えるまでの周波数帯である。電場反転によるV字型への影響 d が、V字の深さである $N/2$ を越えてしまえば、V字型自体が電場に応じて反転するモードに入る。従って本領域(iii)と、次の領域(iv)との境界は鎖長依存性を持つ。この考えに基づくと、短い鎖 $N=10$ ではこの領域はほとんど存在しない。なぜならば $N=10$ の場合 $d=5$ となる周波数 $f \approx 3 \times 10^{-3}$ がこの領域(iii)と領域(iv)との境界だが、これは境界(ii)と(iii)の境界 $f \approx 5 \times 10^{-3}$ に非常に近い。その他の長さの鎖に対しては $d=L/2$ を満たす f を図5.20から求めて図5.5に領域(iii)と領域(iv)の境界を矢印で示した。この領域(iii)には次に説明する反共鳴条件が含まれる。

ここではV字型に大きなヘルニアが枝分かれしたようにできるので、枝分かれV字型(branched V-conformation)が特徴的である。

反共鳴: $d \approx N/4$ 反共鳴は領域(iii)に含まれるが、特徴的なので特に取り出して議論する。領域(iii)のヘルニアの成長が進み、その深さが $L/4$ 程度に達すると鎖の形態はもはやV字ではなくW字になり、競合する支配的キックが現れる。このような状態ではそれぞれの腕とヘルニアが競合して、電場による力が共存するキックの箇所打ち消されてしまい、泳動速度が極端に落ちることが期待される。これが反共鳴の機構である。反共鳴が起きる周波数は $d=L/4$ を満たす f として図5.20から求めることができるが、その際に注目すべきは、ある長さ N_1 の鎖の反共鳴条件は、 $2N_2 = N_1$ なる長さの短い鎖 N_2 にとっての領域(iii)と領域(iv)の境界になることである。実際図5.5では

$N=50$ の鎖の反共鳴条件が $N=25$ の鎖の(iii)と(iv)の境界にあたり、 $N=100$ と $N=50$ との間でも同様の関係を示している。

$N=10, 25$ の短い鎖では反共鳴は起こらない。なぜなら $d=L/4$ を満たす周波数が領域(ii)に入るので、熱揺らぎによってW字型が崩され、泳動速度を極端に落すほどの効果を持たないからである。

このように反共鳴を特徴づける形態はW字型である。

なぜ腕が4本のWであって、腕が3本のNや、あるいは逆により多くの腕を持った形にならないのだろうか。電場下での力学的な釣合を考えると、Nのようは腕が奇数本の形は偶数本の形に比べて力学的に不安定ですぐ解消される。これらは腕が一本少ない偶数の腕の形になる。また腕が4本以上の形は、V字型が逆方向に泳動する過程でできることを考えると、V字型に枝があるような形になる。この形では、それぞれのヘルニアの上端部や下端部は揃わないので、鎖全体の駆動力がキャンセルされることはない。駆動力がキャンセルされるのは、競合するヘルニアの上端部・下端部が揃った形である。V字型を逆方向の電場で変形させていく過程で、上記のような状態になるのは鎖がW字型をとった時である。

(iv): $d > N/2$ 領域(iii)の項でも述べたように、V字型に対する電場の影響が大きくなって d がV字型自体の大きさを越えるような状況では、鎖は電場の方向に従ってV字型とΛ字型を交互にとって泳動する。定常電場のもとでの泳動速度が電場強度 Θ の関数として $V_{ST}(\Theta)$ のように求まっていれば、このような低周波電場の極限での泳動速度は

$$\lim_{f \rightarrow 0} V_{BS}(f) = f \int_0^{1/f} V_{ST}(\Theta_b + \Theta_s \sin 2\pi ft) dt. \quad (5.21)$$

で計算される。 $V_{ST}(\Theta) \sim \Theta^{1.5}$ ¹⁸⁾なので、低周波電場極限の値は普通 $V_{ST}(\Theta_b)$ よりも大きくなる。この領域を特徴づける形態は、交互に繰り返されるV字型とΛ字型である。

この泳動機構は4章の実験結果と、本章のシミュレーションの結果をうまく説明する。

◇ 5.6.4 Kotaka らの実験との比較

反共鳴条件を予測するための Kotaka ら⁴⁰⁾の結果である反共鳴周波数 f_p の式、 $f_p \propto C_{gel}^{-1} N^{-1} E_b$ と比較して議論する。分子量 N 依存性は直接議論できる。本節の議論では反共鳴周波数 f_p は $d = N/4$ を満たす周波数として求められる。図 5.20 から $d \propto f^{-0.9}$ より $f_p \propto N^{-1.1}$ と求まる。これは Kotaka らの結果 $f_p \propto N^{-1}$ に近く、実験的な反共鳴周波数の分子量依存性の、分子論的な描像による説明ができていていると考えている。

ゲル濃度依存性については d の電場周波数依存性が変化するためと考えられる。 d は $\overline{v_x^{inv}}$ に電場周期 $1/f$ を印加したものに比例する。 $\overline{v_x^{inv}}$ はゲル濃度、電場強度に対する依存性があると考えられる。定常電場ゲル電気泳動において調べられている平均泳動速度 $\overline{v_x}$ の電場強度 E およびゲル濃度 C_{gel} 依存性は $\overline{v_x} \propto E^{1.5} C_{gel}^{-0.9}$ であるから¹⁸⁾、 $\overline{v_x^{inv}} = \overline{v_x}$ を仮定すると $d \propto \overline{v_x^{inv}} \propto E^{1.5} C_{gel}^{-0.9}$ となる。このゲル濃度依存性は Kotaka らの結果 $f_p \propto C_{gel}^{-1}$ とよく合う。

本節の議論では、 $\overline{v_x^{inv}}$ は電場が反転している時の速度であるからバイアス電場強度 E_b 依存性は d からは議論できない。バイアス電場強度は泳動方向への V 字型の形成とその挙動に重要な量である。従って 2 章の、定常電場における V 字型の挙動の特徴的時間 τ の電場強度依存性 $\tau \propto E^{-1.1}$ が関わっていると考えられる。実際 f_p の E_b 依存性がこの要因に支配されていると考えると $f_p \propto E_b^{1.1}$ となり、Kotaka らの結果 $f_p \propto E_b$ と合う。

◇ 5.6.5 他の研究の描像との比較

1.9 節で紹介した、反転電場法における反共鳴の機構の他の研究による描像は、4 章で考察したように i) DNA が縮んだ状態に留まるので泳動速度が落ちる。ii) DNA の伸びた状態の方向転換に時間がかかる。の二つに大別できる。これらでは 4 章の、中間的な形態の DNA の泳動速度が落ちるという結果を説明しない。また反共鳴現象以外の周波数条件における DNA の泳動速度の非線形性を説明できない。これは DNA とゲルとの絡み合いを大雑把に取り扱い、DNA の全体運動だけに注目している結果であると思われる。

それに対して、本節の描像は DNA とゲルとの絡み合いを詳細に採り入れることによって、広い電場周波数帯での DNA の挙動を体系的に説明している。反共鳴現象に代表される

ように、電場が絡み合い効果を強める場合も、逆に高周波側にあらわれる泳動速度の極大のように、電場が絡み合い効果を弱める場合も、どちらも説明できている。

第 6 章

まとめ

本論文では定常電場及び非定常電場ゲル電気泳動中の DNA 分子の挙動を、形態の変化に焦点をあてて、蛍光顕微鏡、理論モデル、計算機シミュレーションの三つの異なる手法で調べた。結果をまとめる。

■ 定常電場での直接観察

1. 蛍光顕微鏡上で実際の分離条件に近い環境を再現し、DNA 一分子毎の動的形態変化を観察した。
2. DNA の伸縮運動の画像解析による定量化を行なった。
3. 伸縮運動の特徴時間 τ を計量し、 τ が電場強度 E に対して $\tau \propto E^{-1.1}$ の依存性を持つことを見い出した。

■ 定常電場での伸縮運動の数理解析

1. 一つの障害物に引っかかった、非線形場バネでつながれた紐のモデルで、ゲル電気泳動の DNA の伸縮運動を考察した。
2. 実験に近い電場条件では、引っかかり点近傍では紐は伸び切っている。逆に両端付近では完全に緩和していることを示した。
3. 伸縮の特徴時間は紐の長さに比例することを示した。

■ バイアス正弦電場での直接観察

1. バイアス正弦電場での DNA の挙動を定量的に解析した。
2. DNA の伸縮運動は電場によって変調されることを示した。
3. 反共鳴条件では伸縮運動が抑えられ、DNA は伸びた状態と縮んだ状態の中間的な形態で泳動することを発見した。

■ 計算機シミュレーションによる運動の解析

1. ゲルと DNA との絡み合いをモデル化する新しいポテンシャルを開発した。
2. 開発したポテンシャルを用いたブラウン・ダイナミクスシミュレーションは、定常電場、非定常電場双方の DNA の挙動をよく再現することを示した。
3. キンクの解析から、反共鳴条件では支配的キンクが 2-3 個共存していることを示した。
4. バイアス正弦電場法での泳動速度の電場周波数および分子量依存性を、DNA の泳動形態によって体系的に説明した。

序論で本論文の目的として掲げた、i) 定常電場ゲル電気泳動における伸縮運動の特性を調べる、ii) バイアス正弦電場法での泳動速度の電場切替え時間に対する非線形応答の機構を分子論的に解明する、に対する答が出せた。特に最大の関心であった、非定常電場における分離機構の解明が、バイアス正弦電場法での DNA の動きを具体的に描くことで果たせた。

本論文の結果はゲル電気泳動において DNA の形態変化が分離に直接影響すること、DNA とゲルとの局所的な絡み合いが重要であることを示している。図 1.10 に示した従来の理論モデルではこのような鎖の変形、局所的な絡み合いは考慮されていないので、図 6.1 のように、多数の引っかかりをあらわに考慮したモデルを考える必要があるだろう。また実用上の問題としていえば、分離の重要な機構が局所的な絡み合いにあることが分かったのだから、それを積極的にコントロールする分離場を考えることもできるだろう。例えば図 6.2 のように、泳動方向とは垂直な方向に電場を掛けることによって DNA の変形をコントロール



Figure 6.1 A schematic picture of a new theoretical model of gel electrophoresis.

してやる。この泳動装置を想定した試験的なシミュレーションでは、DNA は V 字型では泳動せず、横 M 字型で泳動するために引っかかりが起きづらくスムーズに泳動する様子をとらえている (図 6.3)⁹⁹⁾。

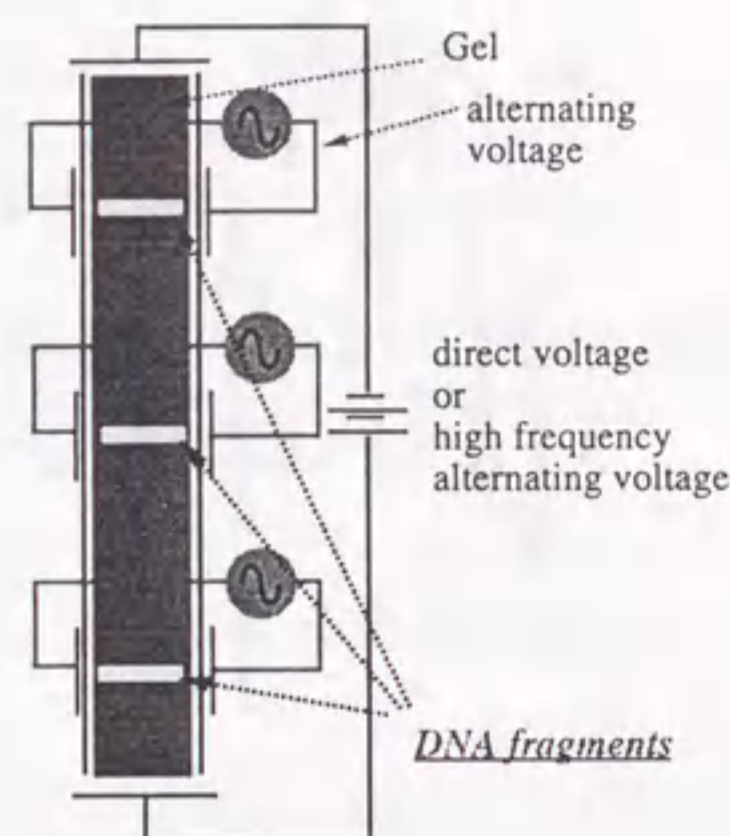


Figure 6.2 A schematic picture of a new technology of DNA separation technology. The orthogonal-sinusoidal field gel electrophoresis (OSFGE).

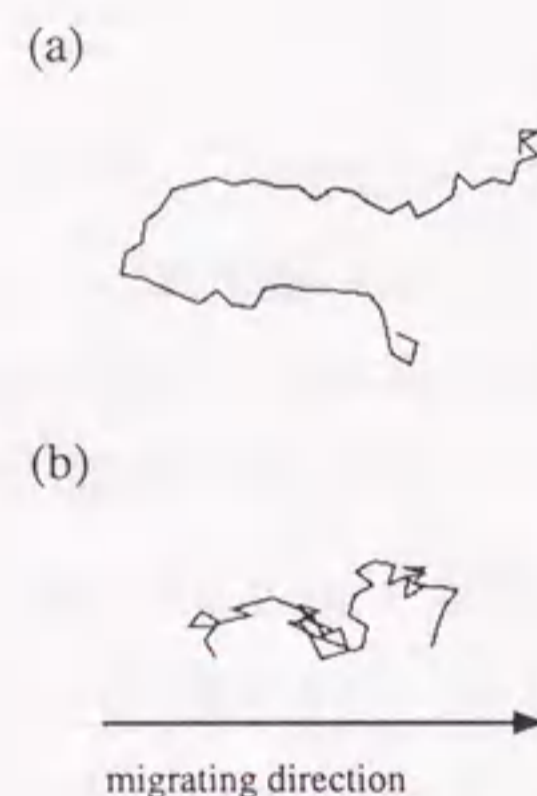


Figure 6.3 A snapshot of a chain of $N = 50$ during gel electrophoresis in (a) steady field, and (b) orthogonal sinusoidal field.

謝辞

本論文の作成に当たり、また著者の研究全体を通して、多くの方々の御助力を頂いています。

名古屋大学工学部教授、土井正男先生に感謝いたします。筆者は土井先生の研究室に配属された時から修士の学位をいただくまでに実験を行ない、その内容は本論文の半分を占めています。土井先生が高分子物理学理論を御専門にされていることを考えれば特異なことであったかも知れません。実際、「土井先生は実験もされるのですか？」と学会で尋ねられることも少なくありませんでした。しかし先生はいつもおっしゃられました。「実験がなければ理論もシミュレーションも意味がない」この先生の御指導によって、筆者は自分で行なった実験の結果を、理論とシミュレーションによって自分で解析できたのです。また土井先生は、筆者に様々な学会や研究会に出席して多くの方々と議論することを勧めて下さいました。このことに対しては特に感謝申し上げます。

名古屋大学理学部助教授、松本充弘先生には気さくに御指導いただき、土井先生よりも議論していただいた時間は多かったように思います。特に松本先生の計算機や実験機器のハードウェア、ソフトウェアに対する豊富な知識と経験は、実験、理論、シミュレーションを問わず、筆者の研究全体にとって大きなプラスになりました。

筆者の実験を中心として、多くの時間御指導いただいたのは名古屋大学人間情報学研究所教授、吉川研一先生です。先生の研究室にある蛍光顕微鏡実験装置、また先生と吉川研究室のみなさんの御助力がなければ、本論文で重要な直接観察の実験はなしえませんでした。蛍光顕微鏡は手のかかるシステムなので、吉川研究室にいらっしゃった現徳島大学理学部助手、南川慶二さん、現豊橋技術科学大学助手、松沢有希子さんの御協力はありがたいものでした。筆者が所属する学科におられ、また御専門が生物物理であったことから幾度となく御議論頂いた、名古屋大学工学部教授、八田一郎先生、同助教授、栗原和枝先生にも感謝いたします。

神戸薬科大学助教授、馬場嘉信先生にお会いできたのは、DNA を研究対象としていたことによる幸運の一つです。筆者は馬場先生の、研究者としてのありかたに大きく影響されました。また生化学の最前線からの数々の御助言は、大変参考になりました。豊橋技術科学

大学エコロジー工学系教授、水野彰先生はDNAのマイクロマニピュレーションを研究しておられ、本論文の蛍光顕微鏡システムとはほぼ同様の装置をお使いでした。研究室にも何度かお伺いし、研究室の大学院生のみなさんと直接実験的な情報の交換をさせていただきました。

理論、シミュレーションの分野では、金沢大学理学部教授、樋渡保秋先生、同助教授、高須昌子先生には、特に多くの御助言を頂きました。著者がシミュレーションに手をつけた直接のきっかけは、樋渡先生の研究室で主催された高分子系のモンテカルロシミュレーションに関する研究会に参加させて頂いたことです。東京都立大学理学部助教授、川勝年洋先生には有益なコメントを頂きました。

本論文の実験は同じ研究室に所属する小穴英廣さんの協力がなくては上がりませんでした。観察用泳動セルは彼の手によるものです。同じ部屋に机を並べたこともあって、研究全体を通して、なにかと面倒を見て頂いた現神戸大学理学部助手、樹神弘也さん、議論して頂く時間の多かった泰岡顕治さん、長谷川龍一さんには特にお礼申し上げます。

最後に、著者の研究活動を理解し、援助と励ましを続けてくれた父と母、祖父と祖母に、心より感謝します。

本研究は日本学術振興会特別研究員制度第0785番の援助を受けています。

平成8年6月30日 増渕 雄一

参 考 文 献

- 1) Rickwood, D.; Hames, B. D. edited *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids*; Oxford University Press; Oxford 1990
- 2) Olivera, B. M.; Baine, P.; Davidson, N. 'Electrophoresis of the nucleic acids' *Biopolymers*, 1964, 2, 245-257.
- 3) Ross, P. D.; Scruggs, R. L. 'Electrophoresis of DNA II. Specific interactions of univalent and divalent cations with DNA' *Biopolymers*, 1964, 2, 79-89.
- 4) Ross, P. D.; Scruggs, R. L. 'Electrophoresis of DNA III. The effect of several univalent electrolytes on the mobility of DNA' *Biopolymers*, 1964, 2, 231-236.
- 5) 日本生正化学会編
核酸 I 分離精製; 新生化学実験講座 第二巻 ; 東京化学同人; 東京 1991
- 6) Burmeister, M.; Ulanovsky, L. edited
PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS Protocols, Methods and Theories ; Methods in Molecular Biology Vol.12; Humana Press; New Jersey 1992
- 7) 柳田充弘 *DNA 学のすすめ 躍動する生命の二重らせん*;
講談社; 東京 1984
- 8) Cantor, C. R.; Lim, H. A. edited
The First International Conference on Electrophoresis, Supercomputing and the Human Genome ; World Scientific; Singapore 1991
- 9) SUPER STRINGS サーフライダー 21 編著
ゴジラ生物学序説 妄想から科学へ; 文藝春秋; 東京 1992
- 10) 寺田 弘 編
核酸の電気泳動 基礎と実験; 広川書店; 東京 1992
- 11) Jordan, B.; 美宅 成樹 訳
ヒトゲノム計画とは何か 全世界を巻き込む DNA 解析プロジェクト ;
講談社; 東京 1995

- 12) Nordén, B.; Elvingson, C.; Jonsson, M.; Åkerman, B.
' Microscopic behavior of DNA during electrophoresis; electrophoretic orientation '
Quart. Rev. Biophys., 1991, 24, 103-164, and references therein.
- 13) Zimm, B. H.; Levene, S. D.
' Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA '
Quart. Rev. Biophys., 1992, 25, 171-204. and references therein.
- 14) Bustamante, C.; Gurrieri, S.; Smith, S.
' Toward a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis '
Trends Biotechnol., 1993, 11, 23-30. and references therein.
- 15) Masubuchi, Y.; Oana, H.; Matsumoto, M.; Doi, M.
' DNA Motion During Gel Electrophoresis: Direct Observation and Computer Simulation '
Computational Physics as a New Frontier in Condensed Matter Research; The Physical Society of Japan; Tokyo 1995, 347-354.
- 16) Masubuchi, Y.; Oana, H.; Matsumoto, M.; Doi, M.; Yoshikawa, K. ' Conformational dynamics of DNA during biased sinusoidal field gel electrophoresis '
Electrophoresis, in press.
- 17) Masubuchi, Y.; Oana, H.; Ono, K.; Matsumoto, M.; Doi, M.; Minagawa, K.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K.
' Periodic behavior of DNA molecules during steady field gel electrophoresis '
Macromolecules, 1993, 26, 5269-5270.
- 18) Oana, H.; Masubuchi, Y.; Matsumoto, M.; Doi, M.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K.
' Periodic motion of large DNA molecules during steady field gel electrophoresis '
Macromolecules, 1994, 27, 6061-6067.
- 19) Masubuchi, Y.; Oana, H.; Akiyama, T.; Matsumoto, M.; Doi, M.
' Dynamics of a DNA Molecule Hanging over an Obstacle in Gel Electrophoresis '
J. Phys. Soc. Jpn., 1995, 64, 1412-1420.
- 20) Kotaka, T.; Adachi, S.; Shikata,
' Biased sinusoidal field gel electrophoresis for the separation of large DNA '
Electrophoresis, 1993, 14, 313-321.
- 21) Stellwagen, N. C. ' Effect of the electric field on the apparent mobility of large DNA fragments in Agarose Gels '
Biopolymers, 1985, 24, 2243-2255.
- 22) Slater, G. W.; Rousseau, J.; Noolandi, J.; Turmel, C.; Lalande, M.
' Quantitative analysis of the three regimes of DNA electrophoresis in agarose gels '
Biopolymers, 1988, 27, 509-524.

- 23) Calladine, C. R.; Collis, C. M.; Drew, H. R.; Mott, M. R.
' A study of electrophoretic mobility of DNA in agarose and polyacrylamide gels '
J. Mol. Biol., 1991, 221, 981-1005.
- 24) West, R.
' The electrophoretic mobility of DNA in agarose gel as a function of temperature '
Biopolymers, 1987, 26, 607-608.
- 25) West, R. ' The mobility of polyions in gel electrophoresis '
Biopolymers, 1987, 26, 609-611.
- 26) Schwartz, D. C.; Cantor, C. R. ' Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis '
Cell, 1984, 37, 67-75.
- 27) Cantor, C. R.; Smith, C. L.; Mattew, M. K.
' Pulsed field gel electrophoresis of very large DNA molecule '
A. Rev. Biophys. Chem., 1988, 17, 287-304.
- 28) Bancroft, I.; Wolk, C. P.
' Pulsed homogeneous orthogonal field gel electrophoresis (PHOGE) '
Nucl. Acids Res., 1988, 16, 7405-7418.
- 29) Zhang, T. Y.; Smith, C. L.; Cantor, C. R. ' Secondary pulsed field gel electrophoresis: a new method for faster separation of larger DNA molecules '
Nucl. Acids Res., 1991, 19, 1291-1296.
- 30) Lai, E.; Birren, B. W. ' Use of Secondary Pulsed Field Gel Electrophoresis in Separation of Large DNA '
Anal. Biochem., 1995, 224, 68-74.
- 31) Chu, B.; Vollrath, D.; Davis, R. W. ' Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields '
Science, 1986, 234, 1582-1585.
- 32) Serwer, P. ' Gel electrophoresis with discontinuous rotation of the gel: an alternative to gel electrophoresis with changing direction of the electric field '
Electrophoresis, 1987, 8, 301-304.
- 33) Southern, E. M.; Anand, R.; Brown, W. R.; Fletcher, D. S. ' A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis '
Nucl. Acids Res., 1987, 15, 5925-5943.
- 34) Gardiner, K.; Laas, W.; Patterson, D. ' Fractionation of large mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis '
Somatic Cell Mol. Genet., 1986, 12, 185-195.

- 35) Carle, G. F.; Frank, M.; Olson, M. V. ' Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field ' *Science*, 1986, 232, 65-68.
- 36) Turmel, C.; Brassard, E.; Forsyth, R.; Hood, K.; Slater, G. W.; Noolandi, J. ' High resolution zero integrated field electrophoresis (ZIFE) of DNA ' *Electrophoresis of Large DNA Molecules. Current Communications in Molecular Biology, Vol. I*; Cold Spring Harbor Press; 1990, 101-131.
- 37) Jamil, T.; Frisch, H.; Lerman, L. S. ' Relaxation effects in the gel electrophoresis of DNA in intermittent fields ' *Biopolymers*, 1989, 28, 1413-1427.
- 38) Shikata, T.; Kotaka, T. ' Biased sinusoidal field gel electrophoresis for size-dependent DNA separation ' *Biopolymers*, 1991, 31, 253-254.
- 39) Shikata, T.; Kotaka, T. ' Biased sinusoidal field gel electrophoresis for large DNA separation ' *Macromolecules*, 1991, 24, 4868-4873.
- 40) 小高 忠男; 四方 俊幸 ' バイアス正弦電場ゲル電気泳動法による巨大 DNA の分離 ' 電気泳動最前線 クロマトグラフィ最前線, 1994, 15, 1-9.
- 41) Heller, C.; Pohl, F. M. ' A systematic study of field inversion gel electrophoresis ' *Nucleic Acids Res.*, 1988, 16, 5989-6003.
- 42) Kobayashi, T.; Doi, M.; Makino, Y.; Ogawa, M. ' Mobility Minima in field-inversion gel electrophoresis ' *Macromolecules*, 1990, 23, 4480-4481.
- 43) Schellman, J. A.; Stigter, D. ' Electrical Double Layer, Zeta Potential, and Electrophoretic Charge of Double-Stranded DNA ' *Biopolymers*, 1977, 16, 1415-1434.
- 44) Stigter, D. ' Sheading Effects of Small Ions in Gel Electrophoresis of DNA ' *Biopolymers*, 1991, 31, 169-176.
- 45) 立花隆; 利根川 進
精神と物質 分子生物学はどこまで生命の謎を解けるか;
文藝春秋; 東京 1993
- 46) Attwood, T. K.; Nelmes, B. J.; Sellen, D.B.Schellman, J. A. ' Electron Microscopy of Beaded Agarose Gels ' *Biopolymers*, 1988, 27, 201-212.

- 47) Serwer, P.; Hayes, S.Schellman,
' Exclusion of spheres by agarose gels during agarose gel electrophoresis ' *Anal. Biochem.*, 1986, 158, 72-78.
- 48) Burlatsky, S.; Deutch, J.
' Influence of Solid Friction on Polymer Relaxation in Gel Electrophoresis ' *Science*, 1993, 260, 1782-1784.
- 49) Ogston, A. G. ' The spaces in a uniform random suspension of fibres ' *Trans. Faraday Soc.*, 1958, 54, 1754-1757.
- 50) Doi, M.; Edwards, S. F.
The theory of Polymer Dynamics ; Oxford University Press ;New York 1986
- 51) Lerman, L. S.; Frisch, H. L. ' Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule ? ' *Biopolymers*, 1982, 21, 995-997.
- 52) Lumpkin, O. J.; Dejardin, P.; Zimm, B. H. ' Theory of gel electrophoresis of DNA ' *Biopolymers*, 1985, 24, 1573-1593.
- 53) Slater, G.W.; Noolandi, J.
' Prediction of chain elongation in the reptation theory of DNA gel electrophoresis ' *Biopolymers*, 1985, 24, 2181-2184.
- 54) Yanagida, M.; Hiraoka, Y.; Katsura, I. ' Dynamic behaviors of DNA molecules in solution studied by fluorescence microscopy ' *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1982, 47, 177-187.
- 55) Bustamante, C. ' Direct observation and manipulation of single DNA molecules using fluorescence microscopy ' *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, 1991, 20, 415-446.
- 56) Yoshikawa, K.; Matsuzawa, Y.; Minagawa, K.; Doi, M.; Matsumoto, M. ' Opposite Effect between Intercalator and Minor Groove binding Drug on the Higher Order Structure of DNA as Is Visualized by Fluorescence Microscopy ' *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1992, 188, 1274-1279.
- 57) 吉川 研一 ' DNA 分子のダイナミクスと「生命現象」 ' 生命現象と物理学 北原 和夫; 田中 豊一 編;
朝倉書店; 東京, 1994, 40-63.
- 58) Smith, S. B.; Aldridge, K.; Callis, J. B. ' Observation of individual DNA molecules undergoing gel electrophoresis ' *Science*, 1989, 243, 203-206.
- 59) 増渕 雄一 ' Direct Observation of DNA Molecules during Gel Electrophoresis ' 名古屋大学修士論文, 1994

- 60) Schwartz, D. C.; Koval, M.
' Conformational dynamics of individual DNA molecules during gel electrophoresis '
Nature, **1989**, *338*, 520-522.
- 61) Rampino, N. J. ' Information concerning the mechanism of electrophoretic DNA separation provided by quantitative video-epifluorescence microscopy '
Biopolymers, **1991**, *31*, 1009-1016.
- 62) Rampino, N. J.; Chrumbach, A. ' Apparatus for gel electrophoresis with continuous monitoring of individual DNA molecules by video epifluorescence microscopy '
Anal. Chem., **1991**, *194*, 278-283.
- 63) Rampino, N. J.; Chrumbach, A. ' Conformational correlatives of DNA band compression and bidirectional migration during field-inversion gel electrophoresis, detected by quantitative video epifluorescence microscopy '
Biopolymers, **1991**, *31*, 1297-1307.
- 64) Howard, T. D.; Holzwarth, G. ' Fluctuations in the velocity of individual DNA molecules during agarose gel electrophoresis '
Biophys. J., **1992**, *63*, 1487-1492.
- 65) Gurrieri, S.; Rizzarelli, E.; Beach, E.; Bustamante, C.
' Imaging of kinked configurations of DNA molecules undergoing OFAGE using fluorescence microscopy '
Biochem., **1990**, *29*, 3396-3401.
- 66) Oana, H.; Masubuchi, Y.; Matsumoto, M.; Doi, M.; Yoshikawa, K. ' Motion of Large DNA Molecules Traveling from Solution to Gel Under Steady Field '
J. Polym. Sci. B. Polym. Phys., **1996**, *34*, 1105-1111.
- 67) Minagawa, K.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K.; Masubuchi, Y.; Matsumoto, M.; Doi, M.; Nishimura, C.; Maeda, M.;
' Change of the higher order structure of DNA induced by complexation with intercalating synthetic polymer, as is visualized by fluorescence microscopy '
Nucl. Acids Res., **1993**, *21*, 37-40.
- 68) Minagawa, K.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K.; Matsumoto, M.; Doi, M.
' Direct observation of the biphasic conformational change of DNA induced by cationic polymers '
FEBS Let., **1991**, *295*, 67-69.
- 69) Minagawa, K.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K.; Khokhlov, A. R.; Doi, M.
' Direct Observation of the Coil-Globule Transition in DNA Molecules '
Biopolymers, **1994**, *34*, 555-558.

- 70) Matsumoto, M.; Sakaguchi, T.; Kimura, M.; Doi, M.; Minagawa, K.; Matsuzawa, Y.; Yoshikawa, K. ' Direct Observation of Brownian Motion of Macromolecules by Fluorescence Microscope '
J. Polym. Sci. B. Polym. Phys., **1992**, *30*, 779-783.
- 71) Smith, D. E.; Perkins, T. T.; Chu, S.
' Dynamical Scaling of DNA Diffusion Coefficients '
Macromolecules, **1996**, *29*, 1372-1373.
- 72) Perkins, T. T.; Smith, D. E.; Chu, S.
' Direct Observation of Tube-Like Motion of a Single Polymer Chain '
Science, **1994**, *264*, 819-822.
- 73) Smith, S. B.; Finzi, L.; Bustamante, C. ' Direct Mechanical Measurements of the Elasticity of Single DNA molecules by Using Magnetic Beads '
Science, **1992**, *258*, 1122-1126.
- 74) Deutsch, J. M. ' Theoretical studies of DNA during gel electrophoresis '
Science, **1988**, *240*, 922-924.
- 75) Deutsch, J. M.; Madden, T. L.
' Theoretical studies of DNA during gel electrophoresis '
J. Chem. Phys., **1989**, *90*, 2476-2485.
- 76) Madden, T. L.; Deutsch, J. M. ' Theoretical study of DNA during orthogonal field alternating gel electrophoresis '
J. Chem. Phys., **1991**, *95*, 2065-2071.
- 77) 増淵 雄一; 土井 正男 ' 分子運動の可視化 (計算機シミュレーション) '
高分子, **1993**, *42*, 506.
- 78) Deutsch, J. M. ' Dynamics of pulsed-field electrophoresis '
Phys. Rev. Lett., **1987**, *59*, 1255-1258.
- 79) Deutsch, J. M. ' Explanation of anomalous mobility and birefringence measurements found in pulsed field electrophoresis '
J. Chem. Phys., **1989**, *90*, 7436-7439.
- 80) Smith, S. B.; Heller, C.; Bustamante, C. ' Model and Computer Simulation of the Motion of DNA Molecules during Pulse Field Gel Electrophoresis '
Biochem., **1991**, *30*, 5264-5274.
- 81) Shaffer II, E. O.; Olvera de la Cruz, M. ' Dynamics of gel electrophoresis '
Macromolecules, **1989**, *22*, 1351-1355.
- 82) Elvingson, C. ' A general Brownian dynamics simulation program for biopolymer dynamics and its implementation on a vector computer '
J. comp. Chem., **1991**, *12*, 71-77.

- 83) Matsumoto, M.; Doi, M.
'Brownian Dynamics Simulation of DNA Gel Electrophoresis'
Mol. Sim., 1994, 12, 219-226.
- 84) Zimm, B. H. 'Lakes-straits' model of field-inversion electrophoresis of DNA'
J. Chem. Phys., 1991, 94, 2187-2206.
- 85) Duke, T. A. J.; Viovy, J. L. 'Motion of megabase deoxyribonucleic acid during field-inversion gel electrophoresis; investigation by Monte Carlo'
J. Chem. Phys., 1992, 96, 8552-8563.
- 86) Smith, M. A.; Bar-Yam, Y.
'Cellular automaton simulation of pulsed-field gel electrophoresis'
Electrophoresis, 1993, 14, 337-343.
- 87) Åkerman, B.; Jonsson, M. 'Reorientational dynamics and mobility of DNA during pulsed-field agarose gel electrophoresis'
J. Phys. Chem., 1990, 94, 3828-3838.
- 88) 南川 慶二 '蛍光顕微鏡による直接観察に基づく巨大 DNA 分子の構造のダイナミクスに関する研究'
名古屋大学博士論文, 1993
- 89) 松沢 有希子 '巨大 DNA 分子の高次構造に関する研究'
名古屋大学博士論文, 1995
- 90) 鳥脇 純一郎
画像理解のためのデジタル画像処理 (I)(II);
昭晃堂; 東京 1991
- 91) Larsson, A.; Åkerman, B. 'Period Times and Helix Alignment during the Cyclic Migration of DNA in Electrophoresis Gels Studied with Fluorescence Microscopy'
Macromolecules, 1995, 28, 4441-4454.
- 92) Bird, R. B.; Armstrong, R. C.; Hassager, O.
Dynamics of Polymeric Liquids 2nd Edition;
Wiley; New York 1987
- 93) Volkmuth, W. D.; Austin, R. H.
'DNA electrophoresis in microlithographic arrays'
Nature, 1992, 358, 600-602.
- 94) Volkmuth, W. D.; Duke, T.; Wu, M. C.; Austin, R. H.; Szabo, A.
'DNA Electrodiffusion in a 2D Array of Posts'
Phys. Rev. Lett., 1994, 72, 2117-2121.

- 95) Sevick, E. M.; Williams, D. R. M.
'Motion of a polyelectrolyte chain hooked around a post'
Phys. Rev. E, 1994, 50, 3357-3360.
- 96) Savitzky, A.; Golay, M. J. E.
'Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures'
Anal. Chem., 1964, 36, 1627-1639.
- 97) Whitcomb, R.; Holzwarth, G. 'On the movement and alignment of DNA during 120° pulsed-field gel electrophoresis'
Nucl. Acids Res., 1991, 18, 6331-6338.
- 98) 南 茂夫 編著
科学計測のための波形データ処理 計測システムにおけるマイコン/パソコン活用技術;
CQ 出版; 東京 1986
- 99) 増渕 雄一
'遺伝子解析装置のコンピューターによるデザイン'
日本工業新聞社第 10 回先端技術学生論文懸賞応募論文, 1996

