

微小系における分子輸送：生命の起源と分子操作

1. 生命の起源における濃度問題

300年前、Hookeが発見した小さな部屋の中には大きな謎が敷き詰められていた。彼が顕微鏡越しに覗き見た小さな部屋は“Cell（細胞）”と名づけられ、あらゆる動植物は細胞を構成要素として形作られることがSchwannのスケッチから明らかになる。その後、ワインの醸造を研究する過程で微生物（酵母）による発酵を発見したPasteurは、微生物の増殖を突き詰めた結果「細胞は細胞から生まれる」として微生物の自然発生説を否定的に結論づけた。昆虫がゴミや汚泥から生まれるとすら信じられていた時代、生命のルーツへの関心は次の問いに着地した。「最初の細胞はいかにして誕生したのか？」¹⁾

細胞もまた分子の集まりであることから、太古の地球で、化学種の反応と集積が幾重にも折り重なり次第に原始的な生命システムへと発展したと考えられる。この考え方は化学進化説と呼ばれ、中でも高分子有機物を形成する反応や原始的な代謝系が生じる過程は、生命科学を始めとして化学、物理学、地球科学、天文学にまたがる自然科学最大の謎の一つとなっている。分子の集合から原始生命が誕生するにはいかなる要請が必要であろうか。現存する細胞を物理学的見地からみると、構成要素の一つの特徴を見いだすことができる²⁾。膜や高分子ネットワークにみられるように細胞の構造を規定する分子は自己集積する性質を備える。脂質分子は集合し脂質二重膜に囲まれる小胞を構成する（図1）。さらに構造のみならず機能の観点からも同様に自己集積する分子が活躍する。アミノ酸が脱水縮合してペプチドができるように、単量体が重合して高分子フィラメントや巨大ポリマーになる polymerization も遺伝物質

であるDNAの複製の根幹となる。膜形成により内と外を切り分け、その内部に遺伝物質を保持し、次世代へと伝承することが原始的な生命に必要とされたと想像することは難しくない。一方で自己集積により集合体が形成されとするには避けられない障壁がある。分子の濃度、そして分子の分離・選択である（図1）。

なぜ濃度が問題となるのだろうか。それは自己集積が効果的に進行するには臨界濃度と呼ばれる閾値以上の濃度の単量体を要するためである。さらに水中で加水分解されるような不安定な化合物であれば、分解よりも集積化が早く進まなくてはならないため、もっと高い濃度が必要となる。

そして次に、自己集積能をもつ分子がいかにして選択されるかも重要である。遺伝情報の起源となる性質を備えた高分子を、特定の情報をもたないランダムポリマーから選り分けるには、現代的な技術に依拠すればゲル電気泳動で長さに応じて分離する、またはアフィニティークロマトグラフィーで特定の配列に結合する高分子を抽出するなどが可能である。しかし、このような操作が存在しえない太古の昔、希薄で夾雑な分子の集団から局所的であっても濃度が高まり、自己集積する機能分子が選択されることは可能なのだろうか。

2. 熱対流とソーレ効果

近年、分子の濃縮問題への解決の糸口となる報告がなされた。水溶液を局所的に加熱し水平方向に温度勾配を形成すると、水が流動し始め、熱対流が起こる。Libchaberらはこの熱対流を利用することで、数kbp程度のDNAを局所的に1,000倍の濃度に濃縮できることを発見した³⁾。またSzostakらはキャピラリーカラムに30℃の温度差をつけて熱対流を発生させると、カラム底面に10塩基程度のオリゴDNAが100倍以上濃縮されること、さらにカラム側面から脂質膜が遊離し底面に10~20μmの脂質小胞が蓄積することを見いだした⁴⁾。これらの報告は熱対流が生体分子を局所的に捕捉し、繰り返される流れの中で生体分

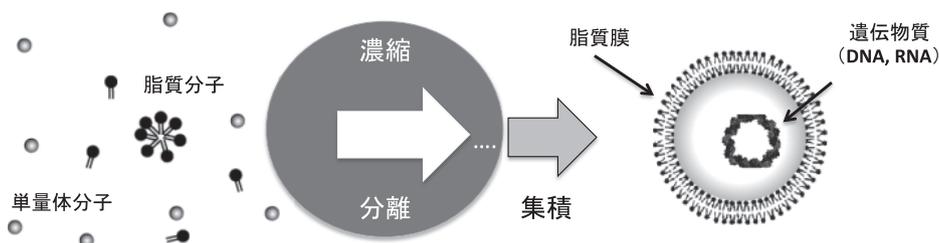


図1 生命の起源における分子の濃縮の問題

脂質膜や高分子は細胞を形作る基本分子であり、構造形成には高濃度の分子が必要。

子を濃縮することを示唆する。

温度勾配がある溶液中で起こることは熱対流だけではない。熱対流が十分抑えられた環境では、温度勾配に沿って、なおかつ一方向に進む分子の動き（輸送）が誘起される。この効果は、発見者の名にちなみソーレ効果 (Ludwig-Soret effect) と呼ばれる。本稿ではその詳細に立ち入らないが、最も重要な点を紹介したい。

局所的な温度勾配を形成すると、溶液中にある高分子は温度勾配の大きさに決まる速度で輸送される。そして温度勾配が小さくなるにつれて輸送速度は減少し、次第に高分子は単純拡散の影響を大きく受けるようになる。このようにソーレ効果と拡散の効果により、十分な時間がたつと、輸送される分子（濃度 $c(r)$ 、 r は加熱点からの距離）は次式に従う濃度分布になる：

$$c(r) = c_0 \exp[-S_T(T(r) - T_0)] \quad (1)$$

ただし $T(r)$ は温度分布、 S_T は後述するソーレ係数という定数、 c_0 と T_0 は周囲（無限遠）における濃度と温度である³⁾。この式は実験結果とよく一致しており、常温における DNA や RNA、タンパク質のソーレ係数 S_T は典型的には正の値であるため、高温側から低温側に輸送され分子濃度は希釈される方向に発展する。したがって、単純なソーレ効果は分子濃度にも選択にも寄与しないと考えられる。しかし一方で、ソーレ効果によって形成される濃度差そのものが分子の濃縮と分離に寄与することが最近の研究から明らかになりつつある。

3. 分子輸送でシンプルな分離

式(1)は、1種の分子が溶けた水溶液という最も単純な系で起こるソーレ効果を説明している。生命現象を支える反応は多成分であり、より複雑な系を対象とすることも有意義であろう。新たにもう一成分が加わり、水溶液中に2種の分子がある場合にはソーレ効果に変化が現れるだろうか。Sano らはポリエチレングリコール (PEG) が3~5% 含まれ、より少ない体積分率で荷電コロイド粒子が分散する水溶液中に温度勾配を形成すると、コロイド粒子が本来とは逆の輸送方向に運ばれ、高温側に集まることを見いだした⁵⁾。輸送方向の反転には添加した PEG のソーレ効果が重要な役割を果たしており、温度勾配による輸送の方向を切り替えることに成功している。

しかし DNA や RNA など主たる生体高分子はコロイド粒子とは異なり、柔らかなポリマーである。多成分の生体高分子を含む溶液におけるソーレ効果を明らかにするため、著者らは次のような実験を行った。1,480 nm の波長

を持つ赤外線レーザーを集光し、最大温度差は5℃、温度勾配はおよそ0.25 K/μm に局所的に溶液を加熱した (図2)。体積分率0.01% の DNA 溶液に、1% から5% までポリエチレングリコール (PEG10,000) を添加し、ソーレ効果による DNA (5.6 kbp) の輸送を蛍光顕微鏡で観察した (図2)。すると DNA は PEG を含まない水溶液では低温側へと輸送されるが、1.5% 以上の PEG が存在すると輸送の方向が逆転し DNA の高温側への輸送が始まることを見いだした⁶⁾。1.5% から2.5% 程度の PEG では DNA は加熱点を中心としてリング状に局在すること、そして2.5% 以上では完全に高温側に DNA が集まり10倍以上の濃縮率に達した (図2)。興味深いことに、DNA がリング状に局在する場所には DNA のサイズ依存性があり、10 kbp 以下の長さの DNA では全長が長いものほど高温側に局在し、DNA の鎖長に応じてあたかもゲル電気泳動のように分離することができる (図2)。これらの結果は、多成分系ではソーレ効果が分子濃縮と分子分離を行うことを示している。

4. ソーレ効果による濃縮と分離のメカニズム

ここで PEG の添加により DNA の分子濃縮と分子分離が起こる機構にふれたい。温度勾配の下では DNA だけでなく添加した PEG もまたソーレ効果により低温側に輸送される。PEG の輸送は DNA に比べると移動度が小さいため、温度勾配に沿って PEG の緩やかな濃度勾配が形成される。DNA が PEG に比べて十分大きいと、DNA にまたがる PEG 濃度勾配は浸透圧差を生むが、溶媒の静水圧とつり合うため DNA を動かす駆動力とはなりえない。しかし DNA 表面近傍 (2~3 nm) では、表面に接する方向に対して PEG 浸透圧は静水圧とつり合わなくなり、表面に沿う水の流れを誘導する。すると流動の反作用によって DNA が低 PEG 濃度側へ輸送される (拡散泳動と呼ばれる)⁵⁻⁷⁾。この挙動は次式で表される。

$$c(r) = c_0 \exp[-S_T^{DNA}(T(r) - T_0) + (c_0^{PEG} - c^{PEG}(r))V] \quad (2)$$

式(1)と比較すると、指数関数の肩に $(c_0^{PEG} - c^{PEG}(r))V$ が加わっている。これは PEG の濃度勾配により DNA が高温側へと押し戻される拡散泳動の効果を表している。すなわちソーレ効果により低温に向かう輸送と、PEG 濃度勾配により高温側へと押し戻される輸送が競合することを示している。PEG 濃度が高ければ、押し戻す効果が勝り高温側に濃縮する。そして、中間の濃度であれば二つの効果が釣り合う場所でリング状に局在する。そして輸送の競合にサイズ依存性があるため、分子分離が起こると考えられる⁸⁾。

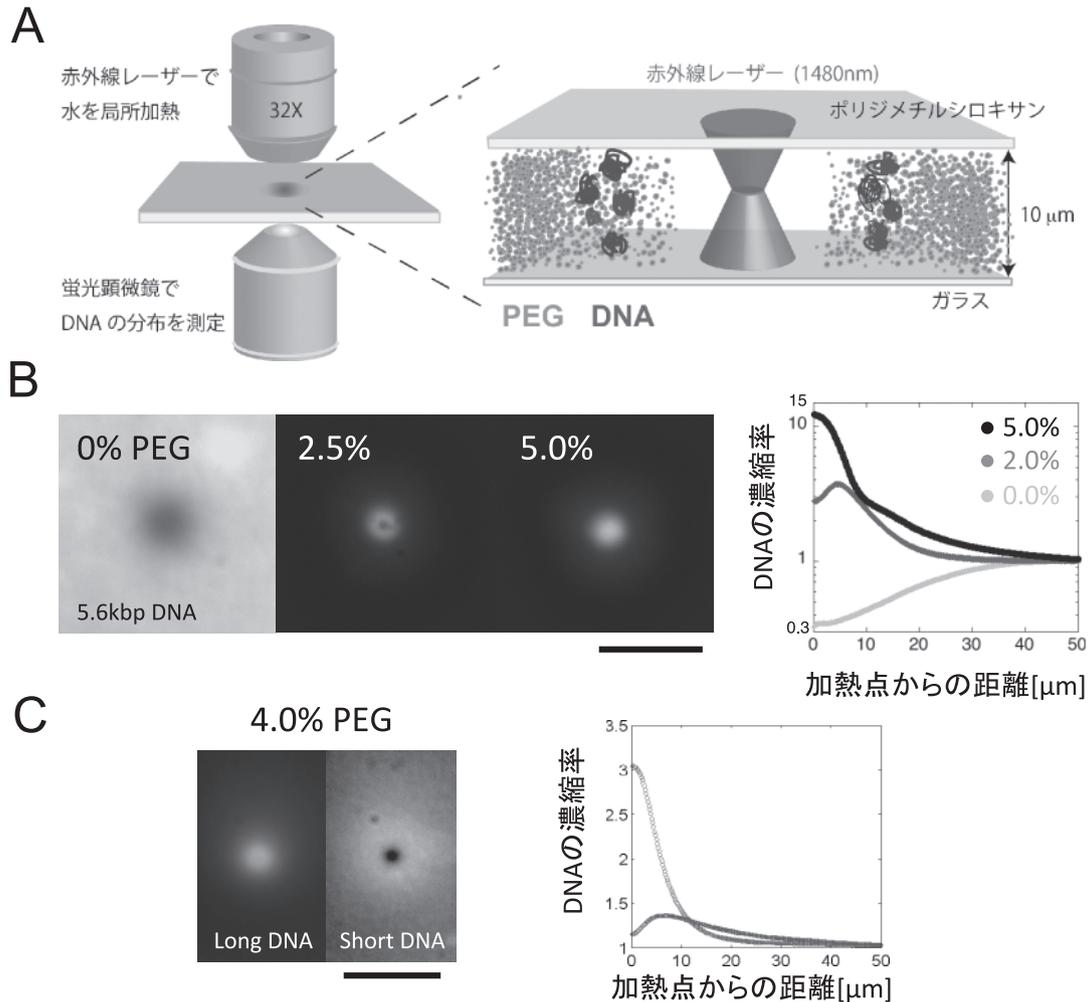


図2 高分子溶液中のソーレ効果

(A) 実験装置の概略。(B) DNA (5.6 kbp) のソーレ効果. PEG 濃度を上げるにつれ DNA が高温側へ局在, 濃縮される。(C) 長さの異なる二つの DNA (Long DNA: 1 kbp, Short DNA: 250 bp) の分離.

5. 輸送から小さな DNA/RNA の構造を検出

DNA の濃縮や分離は数百から数千塩基対の長さのもので顕著に見ることができるが, 短くなるに連れて PEG 濃度勾配の効果, そしてソーレ効果も小さくなってゆく. 生命の起源を考えると, 長大な核酸分子が自然に誕生しうるとは考えにくく, むしろ小さいながらも遺伝情報を持ち, なおかつ酵素活性をも備える RNA が主要な分子であったかもしれない. こうした RNA を基礎に原始生命システムが誕生したとする仮説は RNA ワールドと呼ばれ, 今なお議論が続いている⁹⁾. ここでは 100 塩基を下回る小さな核酸分子のソーレ効果を考えてみたい.

ソーレ効果は分子の表面電荷の影響を強く受けるため,

電荷密度が異なる一本鎖 DNA (ssDNA) と二本鎖 DNA (dsDNA) ではソーレ係数 S_T にわずかな差がある. その差を指標として 15 bp 程度の短い dsDNA の熱変性が検出されている¹⁰⁾. そこで著者らは, 小さな DNA/RNA であっても構造の違いを検出できることを見込み, PEG 溶液中でのソーレ効果を評価した. 局所的な加熱は同様に赤外線レーザーを集光し, 温度分布は最大温度差 3°C, 勾配は 0.15 K/μm を構築した. 4 bp から 20 bp の dsDNA/dsRNA あるいは 10 塩基 (nt) から 120 nt の ssDNA/ssRNA を 0.01% 含む水溶液に 5% の PEG10,000 を加え, 核酸分子の分布を蛍光顕微鏡で測定した. その結果, 6 bp より長い dsDNA は高温側に集まり濃度が 1.16 倍に上昇した. ところが 10~120 nt の ssDNA では高温側よりむしろ低温

側へ、すなわち濃縮より希釈の方向に輸送が進んだ¹¹⁾。さらに、塩基対形成をしない 15 nt の poly-U ssRNA は 0.95 倍の希釈になるのに対し、12 bp の二本鎖構造をもつステムループ RNA や 6 bp の二本鎖をもつアミノアシル RNA 酵素¹²⁾ は、1.2 倍の濃縮が起こった (図 3)。この結果は塩基対形成による二本鎖構造をもつことで輸送の方向が低温側から高温側へと反転することを示唆しており、PEG 溶液中のソーレ効果は小さな DNA/RNA の構造の違いを検出し、わずかに分離しうることを示している。また、より大きな tRNA は濃縮度が 1.5 倍に達し、より複雑な構造をもつものほど濃縮率が大きく高温側への輸送が支配的になる^{6,11)}。これらの結果は、多成分溶液中のソーレ効果が、単純でランダムな構造をもつ RNA のプールから二本鎖構造をもち遺伝情報を保持する RNA を選択する物理現象の一つとして有力であることを示唆する。他にも相分離という現象によって dsDNA と ssDNA が分離されることが知られており¹³⁾、複数の機構で分子分離が起こる可能性を示唆する。分子進化の観点では、熱源付近で polymerization が進むと、成長した長い DNA が集まり、十分長くなったものが選別されると考えられる。

6. 新たな分子操作法へ

これまでに見てきた DNA/RNA の濃縮と分離は、ソーレ効果による直接的な輸送よりむしろ、PEG の濃度勾配に駆動される浸透圧起源の輸送が主役といえる。その駆動力は分子表面に形成される PEG 濃度勾配に依存するため、対象となる分子の性質には強く依存しないと考えられる^{5,6)}。実際、電気的に中性であるポリマービーズや、ホスファチジルコリン (非荷電のリン脂質) からなるベシクルも捕捉、濃縮できることをこれまで確認している。

生命科学分野では光ピンセットや磁気ピンセットといった、捕捉対象物に電磁気的な性質を制約するものが主流である。本稿で紹介した多成分系でのソーレ効果による捕捉はそうした制約にとらわれないため、これまで操作が難しかった脂質などの操作・分離が可能かもしれない。また、レーザー光による局所的な加熱が難しい場合は、微小流体デバイス (microfluidics) で直接的に濃度勾配を形成し、分子の分布を制御できる¹⁴⁾。分子輸送の理解から生命の起源に新たな展開をもたらすと共に、分析技術への利用に期待が高まっている。

7. おわりに

高分子溶液中のソーレ効果が DNA や RNA を濃縮、分

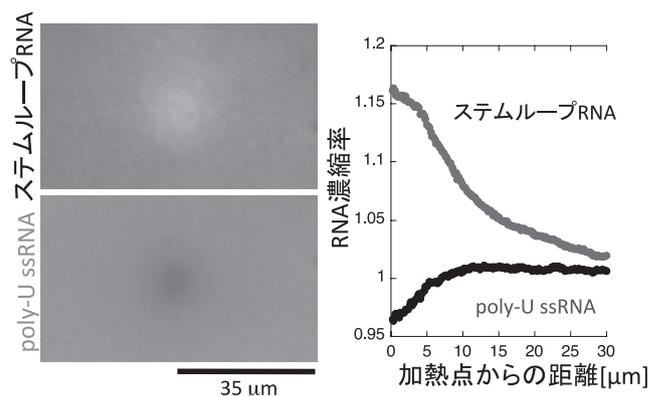


図 3 高分子溶液中のソーレ効果による小さな核酸分子の分離。ステムループ RNA (12 bp の二本鎖構造をもつ) は高温側へ、poly-U-ssRNA (15 nt の一本鎖) は低温側への輸送が勝る。

離するプロセスの一つとして示された。今後 6~20 bp の小さな RNA の輸送と構造依存性のメカニズムを明らかにすることが課題である。さらに、温度勾配や濃度勾配のもとの分子濃縮と分離を化学反応と関連づけることも興味深い。触媒活性が高い RNA 酵素ほど輸送を介して濃縮し、他の分子からふるい分けられ、自己複製を経て分子進化が進む系を実現することが、生命の起源の理解への手がかりをもたらすかもしれない。

謝辞

本研究はロックフェラー大学 Albert Libchaber 教授、キュリー研究所 Axel Buguin 教授、ワイズマン研究所 Tsvi Tlusty 教授らとの共同研究に基づく。立命館大学 和田浩史准教授、東北大学 義永那津人助教には多くの助言を頂いた。なお本研究の一部は科学技術振興機構さきがけの助成による。末筆ながら、ここに謝意を表す。

- 1) Noireaux, V., Maeda, Y.T., & Libchaber, A. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3473–3480.
- 2) Budin, I. & Szostak, J.W. (2010) *Ann. Rev. Biophys.*, **39**, 245–263.
- 3) Braun, D. & Libchaber, A. (2002) *Phys. Rev. Lett.*, **89**, 188103.
- 4) Budin, I., Brickner, R.J., & Szostak, J.W. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 9628–9629.
- 5) Jiang, H.-R., Wada, H., Yoshinaga, N., & Sano, M. (2009) *Phys. Rev. Lett.*, **102**, 208301.
- 6) Maeda, Y.T., Buguin, A., & Libchaber, A. (2011) *Phys. Rev. Lett.*, **107**, 038301.
- 7) Anderson, J.L. (1989) *Ann. Rev. Fluid Mech.*, **21**, 61–99.
- 8) Odagiri, K., Seki, K., & Kudo, K. (2012) *Soft Matter*, **8**, 6775–6781.

- 9) Deamer, D. & Szostak, J.W. (2010) *The Origins of Life*, CSHL Press, CSH, NY.
- 10) Wienken, C.J., Baaske, P., Duhr, S., & Braun, D. (2011) *Nucl. Acids Res.*, **39**, e52.
- 11) Maeda, Y.T., Tlusty, T., & Libchaber, A. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 17972-17977.
- 12) Illangasekare, M., Sanchez, G., Nickles, T., & Yarus, M. (1995) *Science*, **267**, 643-647.
- 13) Nakata, M., Zanchetta, G., Chapman, B.D., Jones, C.D., Cross, J.O., Pindak, R., Bellini, T., & Clark, N.A. (2007) *Science*, **318**, 1276-1279.
- 14) Abecassis, B., Cottin-Bizonne, C., Ybert, C., Ajdari, A., & Bocquet, L. (2008) *Nat. Materials*, **7**, 785-789.

前多 裕介^{1,2,3}

¹ 京都大学白眉センター,

² 京都大学大学院理学研究科物理学・宇宙物理学専攻,

³ 科学技術振興機構さきがけ)

Molecular transport at a small scale: the origins of life and molecular manipulation

Yusuke T. Maeda^{1,2,3} (¹The Hakubi Center for Advanced Research, Kyoto University, Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan, ²Division of Physics and Astronomy, Graduate School of Science, Kyoto University, ³Japan Science and Technology Agency, PRESTO)

複雑系における細菌-細菌間, 細菌-宿主間の相互作用

1. はじめに

ヒトは、常在細菌（善玉菌）により病原細菌（悪玉菌）から守られていると言われている。しかしながら、細菌-細菌間および細菌-宿主間に存在するであろう複雑な相互作用のために、その実態を知ることは難しい。近年我々は、ヒト常在細菌叢という複雑系において、疫学・*in vitro*・*in vivo* 研究を組み合わせた総合的アプローチを用いることで、ヒトの常在細菌である表皮ブドウ球菌がヒトの主要な病原細菌である黄色ブドウ球菌の定着を阻害することを見いだした^{1,2}。また本年、黄色ブドウ球菌の定着を阻害する因子の結晶化とその構造解析を行った³。本稿において、我々が得た知見や研究手法について紹介したい。

2. 研究の背景

1) 黄色ブドウ球菌について

黄色ブドウ球菌は今から約130年前に膿中から分離された⁴。当初、表在性の化膿性疾患を引き起こす細菌と考えられてきたが、その後の調査により、肺炎や敗血症、そして心内膜炎のような重篤な感染症を引き起こすことが明らかにされ、今日では医学的に極めて重要な細菌として認識されている⁵。またMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）などの多剤耐性の黄色ブドウ球菌による院内感染は、医療機関において大きな問題となっている⁶。

2) 黄色ブドウ球菌の保菌率について

臨床的には良く知られるようになった黄色ブドウ球菌ではあるが、その一方で黄色ブドウ球菌の生態に関しては不明な点が多い。黄色ブドウ球菌は、我々ヒトの約30%に存在することが知られている⁷。数多くの国で黄色ブドウ球菌の保菌率について調べられているが、国ごとで大きく変わるという報告はない。それ故、何らかの規定因子／メカニズムがあるのではないかと考えられる。この規定因子の解明は、微生物の生態学的側面を明らかにするのみならず、黄色ブドウ球菌感染症に対する新たな治療法ならびに予防法の開発につながると考えられ、これまでに数多くの研究がなされてきた。

黄色ブドウ球菌の保菌率を説明する上で、最初に考えられるものとして宿主側の因子があげられる。つまり、宿主の免疫の強さの違いによって、黄色ブドウ球菌の定着のしやすさが変わるのではないかとという仮説である。これは大変魅力的な考えであり、ヒトの自然免疫系の一員であるインターロイキン等の遺伝子多型と黄色ブドウ球菌の保菌率に関する調査が行われた⁷。しかしながら、現象を説明しうる有意な相関を見いだせず、いまだその仮説は実証されていない。

次に考えられるのは、黄色ブドウ球菌側の因子である。ヒト組織に対して接着しやすいタイプの黄色ブドウ球菌がいるのではないかとこの考えである。接着因子の同定を目指して大きな努力が払われた結果、いくつかの因子が見いだされた⁷。しかしながら、ほとんどすべての黄色ブドウ球菌がこれらの接着因子を有していることが判明し、黄色ブドウ球菌側から保菌率を説明することは現在のところ難しい。

3. 研究の切り口

我々は、「黄色ブドウ球菌を保菌していない約70%の