

研究報告書

「分子輸送から解く生命の起源：構造、情報、輸送の動的相関の解明と新たな分子操作技術の確立」

研究タイプ：大挑戦型（※大挑戦型課題として延長有／増額有）

研究期間：平成23年12月～平成29年3月

研究者：前多 裕介

1. 研究のねらい

細胞は、母なる細胞がもつ遺伝情報に従ってコピーされて生まれる自己複製系である。遺伝情報は DNA の塩基配列にコードされ、その長大な情報分子の誕生は生命の起源を理解する重要な手がかりである。本研究は遺伝情報分子の物理的起源の探求をめざし、非平衡系における DNA 輸送現象と秩序形成の解明、そして酵素反応との共存により重合反応が増強された情報成長の構成的実験を行った。

さらに、我々が注目する分子輸送現象は、従来の分子操作技術である光ピンセットや磁気ピンセットとは大きく異なる特性がある。その性質は、生体分子や細胞の電磁気学的な性質に依らずにマニピュレーションを行うことができる「弱マテリアル依存性」である。この特性を利用し、生体分子と細胞を自在に操作し、機能制御を可能とする新たな分子操作技術の開発を行った。

2. 研究成果

(1) 概要

空間内の二点に温度差があると温度勾配が形成され熱流が生じ、熱平衡から離れた非平衡系となる。我々は赤外線レーザーを集光することで、巨大な温度勾配を持つ実験系を構築した。高分子ポリエチレングリコール (PEG) 溶液中の温度勾配下では、DNA や RNA がサイズ依存的・構造依存的に高温側にあつまり、様々なパターンを形成する「選択的な分子輸送現象」が生じることを実験的に示した。さらに、輸送現象とともに DNA ライゲーション反応を進行させると長大な DNA が選択的に基質となって、より長くなる選択性を獲得することがわかった。温度勾配は自然界に顕在する非平衡系であり、海底の熱水噴出口には本研究で構築した温度勾配と同等の巨大な非平衡系が実現していると考えられる。得られた知見は、(1) DNA がサイズや構造に応じて選り分けられながら濃縮され、(2)濃縮とともに平衡系ではほとんど得られない長大な DNA を優先的に合成する、というメカニズムで濃度問題をシンプルな物理現象から解消しうることを示唆する。

さらに、マテリアル依存性のない新たな分子操作技術を実現するため、高分子 PEG 溶液中の温度勾配でタンパク質、バクテリア *E.coli*、細胞性粘菌 *Dictyostelium* の密度分布を光で制御する Opto-thermal diffusiophoresis 法 (OpTD 法)を開発した。さらに、集光レーザーが動く、すなわち熱源が動く状況では、溶液に流れが生じ、生体分子を捕捉する光マニピュレーションが増強される効果を新たに発見した。理論モデルは実験結果を良く再現しており、「マテリアル依存性のない新たな分子操作技術」の基盤を確立する重要な知見を得ることに成功した。

(2) 詳細

研究テーマ A: 「非平衡系における分子輸送の理解と生命の起源の濃度問題」

細胞分裂など自己複製において DNA は遺伝情報を保つ分子として重要な役割をもつ。では、いったいどのように太古の地球においてどのように DNA を保持する生命システムを得るに至ったのだろうか。DNA は塩基対配列に遺伝情報をコードする高分子ポリマーであり、とりわけ細胞のように複雑なシステムの構築や制御には膨大な配列情報を必要とする。しかし長大な DNA を作るには、拡散による分子の散逸を防ぐプロセスが不可欠である。これは「生命の起源の濃度問題」とよばれる分子進化の謎の1つである。本研究では、温度勾配下の分子輸送現象が濃度問題を解消しうることを示すため、構成的実験から解析を行った。

代表的な非平衡系の温度勾配であり、温度勾配下で溶質分子が輸送される現象が知られている。そこで赤外線レーザーを集光して定常的な温度勾配を形成し、同時に DNA の濃度分布を蛍光顕微鏡で計測する実験系を構築した(図1A)。次いで、溶液中にタンパク質を模したポリエチレングリコール高分子を少量ドープし、DNA の濃度分布を計測した。その結果、

- 1) DNA が局所的に集積し、リング状のパターン形成や高温側での濃縮が起こる
- 2) パターン形成は DNA サイズ依存적であり、大きな DNA ほど濃縮率が高い
- 3) DNA や RNA が二重らせん構造を持つことで分子濃縮率が增強される

ことを見いだした(図1B および1C)。温度勾配下の輸送方程式の理論解析から、PEG の浸透圧勾配と温度勾配のバランスで DNA 濃縮場所が決まることを示した。

温度勾配は海底の熱水噴出口や温泉の間欠泉など、地球上に顕在する非平衡系である。太古の地球の非平衡環境下では、温度勾配下のパターン形成と二重らせん構造による輸送の增強を通じて、長大な遺伝情報を保持する分子への進化が加速されたのかもしれない。

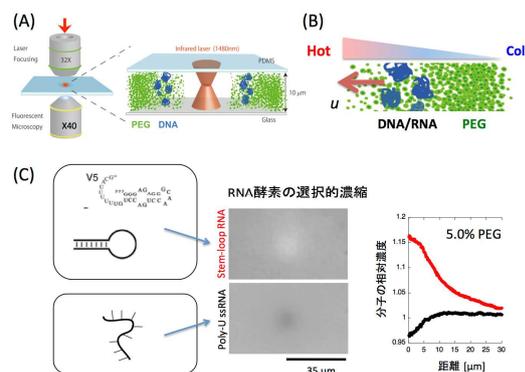


図1. (A) 温度勾配下の分子輸送を計測する実験系. (B) 高分子溶液中の分子輸送モデルの概念図. (C) 温度勾配下の分子輸送による構造依存的な分子輸送の計測.

研究テーマ B: 「非平衡系の酵素反応と情報成長の統計則」

テーマ A では、温度勾配下での生体分子の選択的な分子濃縮を示す事に成功した。いかにして長大な DNA が温度勾配下で出現するか、これを構成的に理解することが次なる課題である。大挑戦型の延長課題として、非平衡系の輸送現象と酵素反応の共存による選択的な DNA 重合反応の構成的実験と統計則の解明を行った。

輸送現象と同時に DNA を基質とした酵素反応が共存する系を構築し、サイズ依存的な分子輸送を通じて長大な DNA が選択的に合成されうるかを検証した。熱平衡条件下または温度勾配下において耐熱性の DNA 非相同組み換え反応(ライゲーション)を行い、qPCR (Quantitative polymerase chain reaction) を用いて DNA 長さ毎の濃度を定量計測した。その

結果、平衡条件下においては単一分子内で起こったライゲーション回数に対して、DNA 濃度が指数関数的に減少する統計則が現れることがわかった(図2)。温度一様の平衡系ではランダムにライゲーション反応が起こることを示唆しており、DNA 重合度が高まるほど反応産物の量は急速に減衰することがわかった。

次に、非平衡条件である温度勾配・濃度勾配の共存下で、DNA 分子を濃縮しながらライゲーション反応を行った。この非平衡条件下では、最も連結数の長い DNA が 100 倍の生成量を示すことが検出された。分子輸送によるサイズ依存的濃縮が指数関数的減衰を相殺し、増幅されたライゲーション反応(Non-random DNA Ligation)が誘起されたと考えられる。今後、選択的なライゲーション反応のメカニズムを解明し、生命の起源の濃度問題の解決に向けた物理的シナリオを構成的に実証することが期待される。

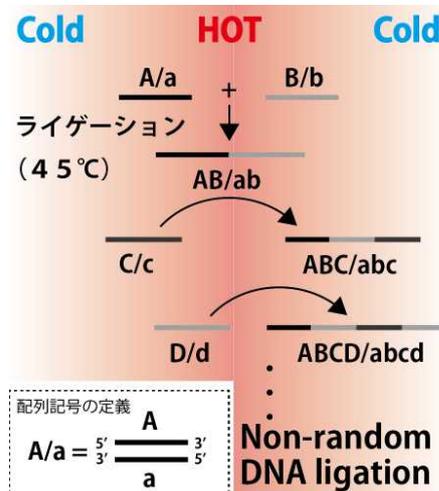


図2. 非平衡系で成長する DNA 重合反応の概念図

研究テーマ C: 「分子輸送を利用した新たな分子・細胞操作技術の確立」

温度勾配・濃度勾配下の輸送現象は運ばれる分子の電磁気学的な性質には左右されない。この性質は、光ピンセットや磁気ピンセットといった電磁気学的な性質を利用した操作技術と一線を画しており、生体分子や細胞の操作をマテリアル依存性無く行う新たな分子操作技術につながる。そこで、新原理に基づく分子操作技術”Opto-thermal-diffusiophoresis (OpTD)法”の開発を行った。

最大の温度差を 3.0 K、溶液中の PEG 濃度を 5.0%に設定した溶液下において濃度勾配の成型を行うと、タンパク質や細菌が高温側に集まり、レーザー強度を時間的に変化させることで局在分布も時空間的に操作できることが示された(図 3A および 3B, Appl. Phys. Lett. 2013)。さらに、OpTD 法は細菌に比べて複雑な表面をもつアメーバ細胞(細胞性粘菌 *Dictyostelium discoideum*)に対しても、適用可能であることを実証した(図 3C)。細胞形態やメ

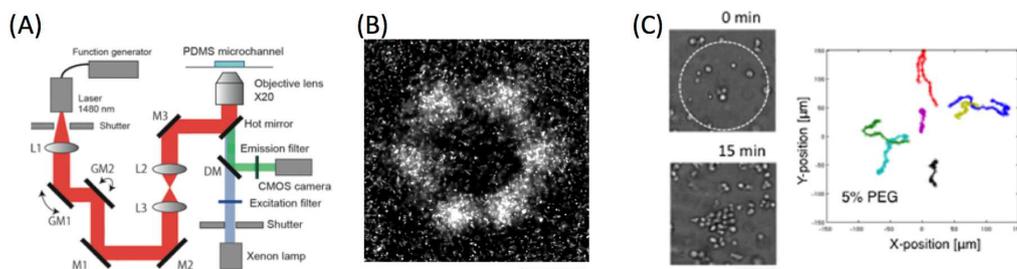


図3. (A) 分子操作の光学系. (B) 開発した光操作によって分布制御された *E. coli* 細胞集団. (C) 細胞性粘菌 *Dictyostelium* 集団の光操作.

カニカルな状態をモニターするバイオセンシングとしても利用できることを示すとともに、本手法が細胞のように複雑な表面をもつ物体に対しても有効であることを示した。

研究テーマ D: 「動的な温度勾配下における流れと秩序」

研究テーマ C を受けて、ヒト培養細胞(HeLa 細胞)を含む真核培養細胞の分布制御を行う技術開発を進めた。しかしながら、これらの培養細胞の光操作では設計と異なる分布を示す事がわかり、その原因究明を行った。その結果、温度勾配・濃度勾配を形成する赤外線レーザーのスキニング速度によっては、分子輸送のみならず溶液の流動化が起こっていることがわかった。本課題の達成目標である「新たな分子操作技術の確立」に向けた大挑戦型の延長課題として、新たに見いだされた流動現象の解析を行った。

実験においては PDMS チャンバーに 5.0% PEG20000 水溶液を封入し、赤外線レーザー(波長 1480nm)を一定速度でスキニングし、動く温度勾配を実現した(図 4A)。その結果、温度勾配が動く方向とは逆向きに溶液の流れが生じること、あるレーザースキニング速度(または周期的な温度刺激の周波数)で流速が最大となる共鳴現象に類似した周波数依存性を示すことがわかった。そして、(1)流れの Stokes 方程式、(2)熱拡散方程式、(3)温度変化による境界の熱膨張の 3つのダイナミクスに基づく理論モデルを導いた。流動をうみだす物理的起源が「温度勾配の波(温度波)の伝搬による熱膨張・粘性変化・熱拡散のクロストーク」にあることを意味している。この現象の利点として、溶液の条件を一切変える事なくレーザースキニング速度の変化だけで「分子濃縮率」と「局在パターン」を制御できる点がある(図 4B)。非平衡系の分子輸送による分子操作をより自在に行う技術基盤の確立につながる成果である。

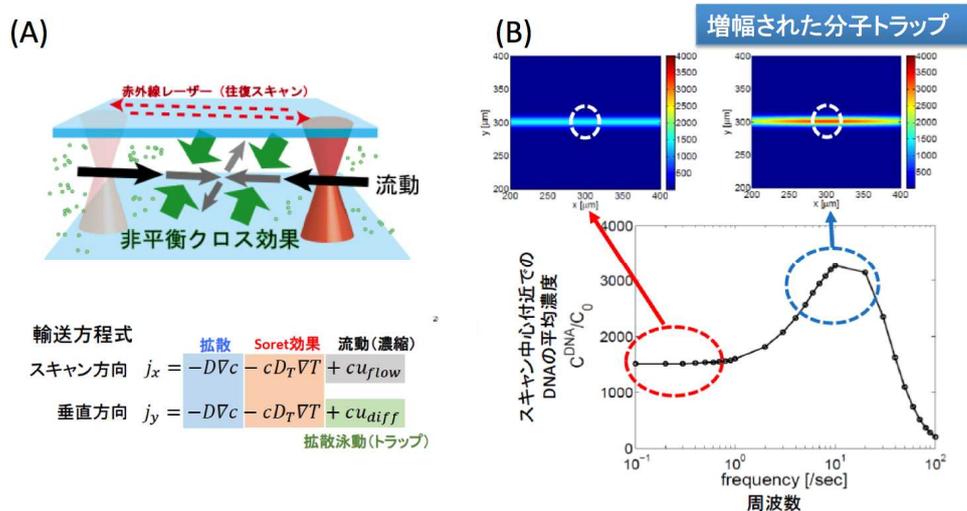


図 4. 動く熱源下で見いだされた新規の輸送・流動現象. (A) 実験結果の概要図. (B) 理論モデルで得られた動く温度勾配による増強された分子トラップ.

3. 今後の展開

自己複製する生命システムの起源と成長は、生命科学の最大の謎の1つである。その解明には単純な分子から複雑なシステムが生じる過程を実験室内で追体験し、普遍的な法則を明らかにする事が不可欠である。本研究で得た成果から、非平衡系の物理学が生命の起源に新たな視点からアプローチする方向を示したといえる。今後は、鑄型依存的な重合反応を進行させるなどして自律的複製をも駆動する物理的プロセスの探求し、物理学と合成生物学を連携させた異分野融合研究を展開することが期待される。

また、テーマAとBで得た知見は、パターン形成が酵素反応を非ランダムにし、質的な変化をもたらすことを示唆している。細胞内部は物質の流入出や生産と分解を繰り返すアクティブな系である。細胞内の非平衡環境で進行する酵素反応は、試験管内の平衡系とは大きく異なるダイナミクスを示すと期待され、システム生物学・合成生物学の反応論を再考する契機となる。

さらに、Opto-thermal diffusiophoresis (OpTD) 法による分子操作は、動く熱源による流動現象の理解を経て、分子操作技術としての原理の理解に到達したと自負している。光で生体分子を直接操る手法は少なく、Scale/CUBIC/Clarity などの透明化技術、Expansion microscopy ら最先端イメージングとの融合を通じて”光で見て・光で操る”生命科学に向けた技術を確立してゆきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

・ 研究目的の達成状況、延長／増額の目標の達成状況

テーマ A において高分子溶液中に形成された温度勾配下で、DNA や RNA のサイズや構造に依存して選択的な濃縮が起こることを実験的に示した。さらにテーマ B では、この選択的な分子輸送と DNA ライゲーション反応を組み合わせた系で、長く成長した DNA が優先的に合成される非ランダムなライゲーション反応が起こりえることを見出した。これらの結果は、遺伝情報を蓄える高分子の重合率が熱平衡系では指数関数的に減衰してしまう「濃度問題」が、温度勾配下の輸送現象を通じて解消されるコンセプトを提示している。当初目標であった「構造、情報、輸送の動的相関」を明らかにし、生命の起源の謎に挑む物理的プロセスの理解を達成したと評価できる。

またテーマ C として、温度勾配下の輸送現象を利用し、生体分子と細胞を操作する新たな光操作技術の開発を行い、2次元面上でのマニピュレーションを実証した。しかし、複雑で大きなパターンへと細胞密度分布を制御しようと試みたところ、流れが発生するという予想しない結果を得た。この新現象の解明が、本技術を拡張するために不可欠であると考え、大挑戦型延長期間に流動発生メカニズム解明を行った。その理解はテーマ D に示すように、十分達成することができた。今後は技術応用として、生体透明化技術やイメージングと光による分子操作を融合させ、「見て操り、理解する」生命科学の発展に貢献する基盤となることが期待される。

・ 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

採択当時は研究代表者がアメリカにいたため、帰国とともに研究が開始された。研究実施場所に計測の要となる光学系を含む実験室の構築に一年程度を要した。光学系を立ち上げた後に研究補助員2名(うち1名は学生)を含む3名の体制で研究が進められた。さらに分子・細胞操作の技術開発のため、マイクロ流体デバイスの系を新たに取り入れた。大挑戦型で延長が決まった直後、代表者は異動とともに自身のラボを立ち上げた。延長期間では物品の購入を主体とした研究費執行がなされ、DNA 重合反応をqPCR で定量分析する設備を整えた。非平衡物理学を基軸としつつ「光技術」「マイクロ流体デバイス」「分子進化」の3つを揃える世界的にみても独自性が高く、設備も整った研究室を立ち上げる事ができたと評価している。

・ 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果(今後の見込みを含む)

本研究で開発した分子・細胞操作技術は、従来の光ピンセットや磁気ピンセットとは異なりマテリアル依存性が少ない光技術であるという特性がある。さらに、動く熱源の下で溶液の流れを光と熱で誘起するとともに、分子濃度を外液の条件を変えずに操作する事が可能となった。以上の成果より、非平衡系の輸送現象を基軸とする分子技術の基盤を確立した。マイクロ流体デバイスは医学・工学で近年注目を浴びる技術である。流れを光で制御する微小なポンプとして得られた成果を援用する事で、複雑なバルブを必要としないオプ्टフルイディクス¹の創出につながると期待される。

・ 研究課題の「挑戦性」

最後に、極限環境を模倣した実験系を再構成し、物理的アプローチから生命の起源の「濃度問題」の解決を試みた点が最大の挑戦的姿勢である。従来の分子進化説に立脚すれば、濃度問題の解決は自己触媒的な増幅プロセスによって説明されるが、自己触媒反応がなくとも温度勾配と濃度勾配の共存という非平衡環境下で選択的な分子濃縮を通じた物理的プロセスが同等の効果をもたらすことを提唱した。このようなプロセスが実際に生命誕生に寄与したかを示す事は困難であるが、極限環境を再構成し、物理的・数量的な手法で構成的に理解するひとつの道筋を拓いた点は、「大挑戦型」にふさわしい展開であったと考えられる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

温度勾配濃度勾配の共存下で、DNA や RNA が二重らせん構造をもつことで輸送される新たな分子輸送現象を発見した。さらに、動く温度勾配下では、周囲の高分子濃度が一定であっても、温度勾配の動く速度というダイナミクスによって、分子が局在するパターンが変化する特性を発見した。温度勾配下での DNA 分子輸送によって、DNA ライゲーションによる重合が長い分子ほど選択的に進むという特性を見だし、これらのパターンのもとで DNA 重合反応を進めると、長い DNA が選択的に合成されることを示した。このような論証を集めて、「生命の起源を理解する前多理論」を提唱していることは高く評価できる。今後、ブレイクスルーする研究者の一人として、期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Y.T. Maeda, T. Tlusty, A. Libchaber. Effects of long DNA folding and small RNA stem-loop in thermophoresis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2012, vol.109, 17972-17977.
2. Y.T. Maeda. (2+1)-Dimensional manipulation of soft biological materials by opto-thermal diffusiophoresis, *Appl. Phys. Lett.*, 2013, vol. 103, 243704.
3. T. Ohmura, M. Ichikawa, K. Kamei, Y.T. Maeda. Oscillation and collective conveyance of water-in-oil droplets by microfluidic bolus flow, *Appl. Phys. Lett.*, 2015, vol. 107, 074102.
4. T. Fukuyama, A. Fuke, M. Mochizuki, K. Kamei, Y.T. Maeda. Directing and boosting of cell migration by the entropic force gradient in polymer solution, *Langmuir*, 2015, vol. 31, 12567-12572.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【国際会議・招待講演】

1. Y.T. Maeda and A. Libchaber. Molecular transport of DNA/RNA in thermal and solute gradients: possible sorter for the early life, *Origin of life workshop and Princeton center for theoretical sciences*, 2013年1月21-24日, Princeton University, USA
2. Y.T. Maeda. Motion, pattern and collective oscillation in complex biological fluids out of equilibrium, *BioComplex Taiwan 2013: Taiwan International workshop on biological physics and complex systems*, 2013年7月17-20日, National Taiwan University, Taiwan.
3. Y.T. Maeda. Opto-thermal approach for studying genetic polymers and cells, *International symposium: Breaking barrier from physics to biology*, 2014年6月15-17日, Xian, China.
4. Y.T. Maeda. A physicist's approach to the origin of life: Non-equilibrium entropic force. NIG International Symposium 2016: Quantitative biology, 2016年1月8-11日, The University of Tokyo, JAPAN

【受賞】

1. 前多裕介 第30回とやま賞理工部門(基礎ゲノム科学)「非平衡系の分子輸送と生命の起源に関する研究」2013年5月23日.
2. 前多裕介 日本物理学会 第9回若手奨励賞「温度勾配濃度勾配の共存下での生体高分子の分離現象の発見および制御法の開拓」, 2015年3月21日.

【解説・総説】

1. 前多裕介 「微小系の分子輸送: 生命の起源と分子操作」 *生化学*, 2013, vol. 85, 299-303.
2. 前多裕介, 福山達也. 「温度勾配・濃度勾配の共存下での生体高分子の非平衡輸送現

象」日本物理学会誌, 2015, vol. 71, 746-751.

【プレスリリース】

1. 前多裕介「DNA/RNA を分離・濃縮する熱泳動の分子構造依存性を解明」2012 年 10 月 16 日 京都大学プレスリリース

http://www.kyoto-u.ac.jp/static/ja/news_data/h/h1/news6/2012/121016_1.htm