生命を制御するのは遺伝子か環境か —細胞内環境に左右される遺伝子の構造と機能—

核酸やタンパク質などの生命分子は、生体内・細胞内でその機能を最大限に発揮するために進化してきた。そのため、遺伝子をもつ「生命の設計図」を理解するためには、細胞内環境における生命分子の挙動を知る必要がある。本稿では、細胞内環境として重要な分子クラウディングが生命分子の構造と熱力学的安定性に及ぼす効果を解説し、生命活動と細胞内環境の化学について考察する。

杉 本 直 己
三 好 大 輔

1. はじめに

われわれの生命活動は遺伝子によって決まってしまうのか、はたまた環境に左右されるのか。「カエルの子はカエル?」「トンビがタカを生む?」あなたはどちら派ですか。

ヒトゲノムプロジェクトなどのゲノムプロジェクトにより、遺伝子に関する膨大な情報が明らかになりつつある¹⁾。さらに、ポストゲノムプロジェクトとして、タンパク質の網羅的解析であるプロテオームも精力的に進められている。また、ゲノム情報に基づいて生合成される、メッセンジャー RNA (mRNA) の網羅的解析 (トランスクリプトーム) も成果をあげ始めている (糖鎖を解析するグライコームや、細胞内の代謝にかかわる小分子を解析するメタボロームなどの進展も忘れてはならない)。このような試みは、DNA→RNA→タンパク質という遺伝情報の伝達に関するセントラルドグマの詳細を明らかにするアプローチであり、遺伝子をもつ「生命の設計図」を理解するために必要不可欠である。しかし、これらのアプローチだけで、「生命の設計図」を十分に理解できるのであろうか。

核酸やタンパク質などの生命分子は、生体内・細胞内でその機能を最大限に発揮するために、生命の誕生以来進化を続けている。また、必要でない生命分子は、変性や失活を起こし、消え去っていく。これらの事例は、生命分子が周辺環境に非常に敏感であることを示している。すなわ

ち、生命分子の構造や機能を理解し「生命の設計図」を解明するためには、その周辺環境を考慮することが必須であろう。筆者らは、生命分子の周辺環境を化学的にとらえることで、細胞内における生命分子の機能や構造を研究してきた^{2), 3)}。その結果、細胞内を模倣した環境と試験管内の実験環境では、DNA の構造やその安定性がまったく異なることが明らかになりつつある。そこで本稿では、生命分子の構造や機能に及ぼす周辺環境の効果について解説し、生命活動における分子環境の役割について論じる。

2. 細胞内環境とは

一般的に、*in vitro* 実験で使用する生命分子の量は少なく、1 g/L 以下の濃度で種々の測定を行う場合が多い⁴⁾。また、測定やデータ解析を容易にするために、実験系を単純化するのが常である。その結果、測定は希薄溶液中で行われる。このような測定条件は、細胞内環境を反映しているとはいえない。

細胞内には非常に高濃度の可溶・不溶成分が混在する (図 1)⁵⁾。可溶成分として、タンパク質や核酸などの高分子に加え、金属イオンや補酵素などの低分子が存在する。また、不溶成分として、細胞骨格や膜が存在する。大腸菌の場合では、細胞内のタンパク質と RNA の総量は 300~400 g/L にも達することが知られている⁶⁾。また赤血球には、350 g/L ものヘモグロビンが含まれている⁶⁾。これら

SUGIMOTO, Naoki (左)

甲南大学理工学部先端生命工学研究所 (658-8501 神戸市東灘区岡本 8-9-1)・教授、理学博士。1985年 京都大学大学院理学研究科博士後期課程修了。専門は生命分子化学。

MIYOSHI, Daisuke (右)

同上・講師、博士(理学)。2003年 甲南大学大学院自然科学研究科博士課程修了。専門は生体モデル化学。

What Regulates Biological Reactions? Genetic Information or Environmental Conditions?

図1 細胞(左)と細胞内環境(右)の模式図
黒色の棒状のものはアクチンをはじめとする細胞骨格を表す。そのほかに、トランスファー RNA (tRNA)、リボソーム、タンパク質、メッセンジャー RNA (mRNA) が存在する。

の生命分子は、細胞内の全空間の 20~40% を占有する。このように分子が非常に混み合った状態を、**分子クラウディング (molecular crowding)** と呼ぶ。細胞内は分子クラウディング状態にあり、試験管内環境の希薄で均一な条件とはまったく異なっている。

細胞内では、一価カチオン、二価カチオン(金属イオン)、多価カチオンの種類や濃度などの影響も甚大である。たとえば、筆者らは、二重鎖、三重鎖、四重鎖の核酸の熱力学的安定性に対する金属イオンの効果を定量的に検討し、データベース化を進めている^{7)~9)}。しかし、分子クラウディングの定量的かつ系統的研究はその緒についたばかりである。

3. 分子クラウディングと生命分子

分子クラウディングの研究はタンパク質を標的にしたものがほとんどであった。タンパク質への分子クラウディング研究の先駆者は、Kornberg [1959 年のノーベル生理学医学賞受賞者] であろう。Kornberg は、高濃度のポリエチレングリコール (PEG: poly(ethylene glycol)) を添加することで、DNA ポリメラーゼ反応を試験管内で再現した¹⁰⁾。1980 年代以降になると、Zimmerman や Minton らが種々のタンパク質反応に及ぼす分子クラウディングの重要性、たとえば、DNA リガーゼの反応が PEG の添加に

よって促進されることなどを、次々に見いだした^{11), 12)}。図 2 に示すような、PEG、デキストラン、フィコールなどの合成高分子やウシ血清アルブミンタンパク質などの天然高分子による、タンパク質構造への分子クラウディング効果も明らかになってきた。さらに、細胞分裂に重要な FtsZ タンパク質や、パーキンソン病の原因タンパク質であるシヌクレインなどの会合や線維化が分子クラウディングによって促進されることも報告されている^{5), 11), 13)}。このように、タンパク質に及ぼす分子クラウディング効果については多くの事例が蓄積されつつある。

一方、核酸に及ぼす分子クラウディング効果は、長鎖 DNA の沈殿を促進するなどの報告があるものの、めばしいものがほとんどなかった。そこで筆者らは、生命情報をつかさどる核酸に対する分子クラウディングの効果を定量的に解析することを試みた。とくに、周辺環境に敏感に応答してその構造と安定性を変化させるグアニンに富んだ核酸配列 (G-rich 配列) に注目した。G-rich 配列は、染色体末端に位置するテロメア配列や、癌遺伝子 (C-myc) の転写制御領域、染色体の分離・分配に重要なセントロメア配列など、染色体上に非常に多く存在し重要な役割を担っているからである。

G-rich 配列は、4 つのグアニンが平面上で Hoogsteen 塩基対を形成する G-カルテット (G-quartet) がスタッキングすることにより四重鎖構造を形成する (図 3)³⁾。G-rich 配列は、希薄溶液中において非常にコンパクトな逆平行型四重鎖構造を形成することが NMR や X 線結晶構造解析により示されている³⁾。さて、この G-rich 配列の DNA に及ぼす分子クラウディング効果はどのようなものであろうか。

PEG による分子クラウディング環境下では、この四重鎖は劇的に構造が変化することを筆者らは見いだした¹⁴⁾。希薄溶液中では逆平行型四重鎖構造があるものが、分子クラウディング環境下では、多数の鎖が平行に会合した G-wire 構造を形成するのである (図 4a)。さらに、この G-rich 配列にその相補鎖であるシトシンに富んだ配列 (C-rich 配列) を加えると、それらに及ぼす分子クラウ

図2 分子クラウディングを誘起するために多用されるポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン、フィコール、ウシ血清アルブミン

図3 四重鎖構造の構造形成メカニズム 左に示すように4つのグアニンによってG-カルテットが形成される(中心部分の丸印はカチオンを表す)。G-カルテットがスタッキングすることで、四重鎖構造が形成される。四重鎖構造の一例として、 $d(G_4T_4G_4)$ が形成する逆並行型四重鎖構造を示した(右)。

図4 (a) 分子クラウディングによって誘起されるテロメア核酸の構造遷移の模式図。希薄溶液中でコンパクト逆並行型四重鎖構造を形成するテロメア核酸は、分子クラウディング環境中で多数の鎖が会合するG-wire構造を形成する。(b) G-rich鎖とC-rich鎖の希薄溶液環境と分子クラウディング環境下における構造の模式図。希薄溶液中では二重鎖を形成し、分子クラウディング環境中では、二重鎖が解離して四重鎖構造を形成する。

ディグの効果は驚くべきものであった¹⁵⁾。希薄溶液中ではG-rich鎖とC-rich鎖は二重鎖構造を形成するが、分子クラウディング環境下ではその二重鎖は解離し、それぞれが四重鎖構造を形成することが見いだされたのである(図4b)。これらの結果から、情報を保持のためにWatson-Crick塩基対によって強固な二重鎖構造を形成すると考えられてきたDNAが、周辺環境(たとえば細胞内環境)に依存して非常に多様な構造を形成することが示唆された。

4. 分子クラウディングと水

分子クラウディングの物理学的解釈はどのようなもので

あろうか。分子クラウディング効果の解釈として最初に考えられるのが、排除体積効果である。排除体積とは、ある分子(クラウディング分子)が系内に存在することで、ほかの分子(反応種)が利用できない体積のことである⁴⁾。一般的に、このような排除体積効果により分子間反応が促進されると考えられる。しかし、分子クラウディングの効果は排除体積効果からのみでは説明できないこともしばしばである。たとえば、チトクロムcとチトクロムc酸化酵素の複合体形成は、糖鎖による分子クラウディングによってほとんど促進されない¹⁶⁾。さらに、分子クラウディングによってHoogsteen塩基対によって形成されるDNA三重鎖が安定化されるのに対し、DNA二重鎖の安定性はほとんど変化しないか不安定化することも示されている¹⁷⁾。このような現象は、排除体積効果のみならず、分子クラウディングが誘起する分子間の相互作用の変化、粘性の変化、誘電率の変化、相分離などのさまざまな要因によると考えられる。このような複雑さゆえに、分子クラウディング効果を分子レベルで定量的に解明することはかなりの難題である。

筆者らは、核酸の二重鎖構造の熱力学的安定性に及ぼす分子クラウディングの効果を定量的に検討することにより、上記の要因の中でどのような効果が重要であるかを解明することを試みた¹⁸⁾。まず、二状態遷移(構造を形成していない一本鎖状態と二重鎖状態間の遷移)によって熱変性する短鎖DNAを設計した。この短鎖DNAに0 wt%から40 wt%までのPEGを加え、それぞれの条件で融解曲線を測定し、短鎖DNAが形成する二重鎖構造の熱力学的安定性を自由エネルギーの観点から評価した。その結果、PEGではなく水の活量変化が、DNA二重鎖の安定性を決定する非常に重要な因子であることが見いだされた。さらに、水分子の重要性を明らかにするために種々のクラウディング分子を用いてDNA二重鎖の構造形成に関与する水分子の数を算出した。その結果、クラウディング分子の水酸基の数が多いほど、DNA二重鎖がより不安定化することも示された。このように分子クラウディング環境下ではDNA二重鎖は不安定化したが、三重鎖や四重鎖は分子クラウディング環境下で安定化する^{17), 19)}。このように、

図5 細胞内環境における核酸構造の想像図

細胞内環境においては、二重鎖が解離し、非 Watson-Crick 塩基対で形成される三重鎖、ヘアピンループ、四重鎖、ホリデイジャンクションなど多様な構造が形成される。その結果、これらの構造をタンパク質が認識し、さまざまな生体反応や疾患発症に関与することが考えられる。

DNA 構造の安定性は、塩基配列だけでなく周辺環境に大きく依存しているのである。

このような実験事実の蓄積から考察すると、分子クラウディング環境下である細胞内においては、Watson-Crick 塩基対によって形成される二重鎖は不安定化し、Hoogsteen 塩基対によって形成される三重鎖や四重鎖構造は安定化する場合があっても不思議ではない。すなわち、「細胞内で核酸は Watson-Crick 塩基対によって安定な二重鎖構造を形成している」という常識は誤っているかもしれない。

Hoogsteen 塩基対をはじめとする非 Watson-Crick 塩基対による多様な構造が周辺環境に依存して二重鎖中に存在すれば、それはタンパク質などの認識部位として非常に重要な役割を担うであろう(図5)。つまり、このような核酸の特異構造は、さまざまな生体反応や疾患の原因となることが考えられる。また、水の活量から分子クラウディングを考察する手法は、核酸のみならずタンパク質や糖鎖の構造と機能における水分子の重要性をも明らかにしてくれる。このようなデータを総合し、細胞内環境を水分子の物性の観点から俯瞰することで、細胞内の種々の生命分子の構造、安定性、機能などを予測できるかもしれない。

5. 展 望

本稿では、細胞内環境を知る目的で分子クラウディング

を取り上げ、生命分子の構造と熱力学的安定性に及ぼすその効果について解説した。細胞内には、さまざまな物性をもつ高分子が存在し、細胞分裂や成長段階で動的にその挙動を変化させている。このような細胞の動的複雑性を化学的に再現する第一歩として、合成高分子を用いて細胞内小器官を再現する試みも始まっている²⁰⁾。今後は、細胞内化学反応を理解し制御するために、さまざまな特性をもつ人工高分子や天然高分子を用いて、生命分子の熱力学的挙動と動的挙動を定量的に解明することがますます重要になってくるであろう。

文 献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium: *Nature*, **409**, 860 (2001)
- 2) S. Nakano, N. Sugimoto: *Recent Res. Devel. Nucleosides & Nucleotides*, **1**, 59 (2003)
- 3) D. Miyoshi, N. Sugimoto: *Curr. Pharmacogenomics*, **3**, 217 (2005)
- 4) 杉本直己, 三好大輔: 未来材料, **4** (7), 26 (2004)
- 5) R. J. Ellis, A. P. Minton: *Nature*, **425**, 27 (2003)
- 6) S. B. Zimmerman, S. O. Trach: *J. Mol. Biol.*, **222**, 599 (1991)
- 7) S. Nakano, M. Fujimoto, H. Hara, N. Sugimoto: *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2957 (1999)
- 8) N. Sugimoto, P. Wu, H. Hara, Y. Kawamoto: *Biochemistry*, **40**, 9396 (2001)
- 9) D. Miyoshi, A. Nakao, T. Toda, N. Sugimoto: *FEBS Lett.*, **496**, 128 (2001)
- 10) A. Kornberg: *J. Bacteriol.*, **183**, 3613 (2000)
- 11) S. B. Zimmerman, A. P. Minton: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **22**, 27 (1993)
- 12) S. B. Zimmerman, B. H. Pfeiffer: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 5852 (1983)
- 13) A. P. Minton: *J. Biol. Chem.*, **276**, 10577 (2001)
- 14) D. Miyoshi, A. Nakao, N. Sugimoto: *Biochemistry*, **41**, 15017 (2002)
- 15) D. Miyoshi, S. Matsumura, S. Nakano, N. Sugimoto: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 165 (2004)
- 16) A. S. Morar, X. Wang, G. J. Pielak: *Biochemistry*, **40**, 281 (2001)
- 17) C. H. Spink, J. B. Chaires: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 12887 (1995)
- 18) S. Nakano, H. Karimata, T. Ohmichi, J. Kawakami, N. Sugimoto: *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14330 (2004)
- 19) D. Miyoshi, H. Karimata, and N. Sugimoto: *Angew. Chem., Int. Ed.*, **44**, 3740 (2005)
- 20) M. S. Long, C. D. Jones, M. R. Helfrich, L. K. Mangeney-Slavin, C. D. Keating: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **102**, 5920 (2005)