

アミノ酸熱重合物のマイクロカプセル形成

公立はこだて未来大学・システム情報科学部 櫻沢 繁(Shigeru Sakurazawa)
School of System Information Science,
Future University-Hakodate

1. はじめに

現存する生物は全て生物から誕生する。しかし、最初の生物が如何に誕生したかを問う時、我々は無生物的に生物の誕生を説明しなくてはならない。無生物的な生物の誕生の可能性が科学的に認められたのは、科学のその長い歴史の中で比較的最近のことである。その口火を切ったのは、1950年代、S. L. Miller らが行った火花放電実験[1]である。彼らは、原始太陽系の星雲のスペクトルを根拠に、メタン、アンモニア、水素、水蒸気の混合気を原始地球上の大気と考え、循環型のガラス密封容器内にその混合気を封入し、雷を模した火花放電を起こした。その結果、無機物しか存在しなかったガラス容器内に、無生物的にアミノ酸や核酸などの有機物が生成した。この実験を機に、有機化学の分野で「生命の起源」をテーマとした物質進化や化学進化のモデル実験が盛んになされ、多様な化学反応や有機物の生成が研究されてきた。

ところが、これら物質進化、化学進化の研究で化学反応の議論が進み、生物の無生物的な誕生は信憑性を増す一方で、反応生成物は生物かと問われればやはり単なる有機物でしかないと言わざるを得ない。なぜならば、これら化学反応の議論には、生物の重要な特徴である「空間的な実体」が含まれないからである。

有機物はその重合反応が進むことによりその分子量が大きくなり、複雑な分子となることで、静電的結合、疎水結合などの比較的弱い結合によって互いに凝集し、水相から分離して「空間的な実体」を形成し始める。そこに着目し、高分子の凝集体を原始的な細胞と提唱したのがオパーリンや Fox らである。オパーリンはアラビアゴム由来の高分子による油滴状の凝集体をコアセルベートと呼んだ[2]。しかしコアセルベートは生物由来の分子を用いている。そこで Fox らは無生物的に合成しうるアミノ酸を熱重合して、プロテインイドと呼ばれるタンパク質に近い高分子を生成し、これがプロテインイドミクロスフィアと呼ばれる直径数マイクロメートルの微小球を形成することを見出した[3]。またそれら微小球は、原料となるアミノ酸の組成や重合の条件によって表面に細胞のような膜を有するものもあり、原始細胞のモデルとして期待された。

しかし、これらの議論は歴史的に有機化学の分野で議論されてきたため、その後「空間的な実体」を形成する物理的なプロセスに関する研究はなされないまま放置されて

きた。

そこで本論文は、このような高分子の凝集による「空間的な実体」の形成を、物理的な観点から調べ、生命の起源における物理プロセスの重要性を論ずる。その指針となるのは、会合反応と拡散とのカップリングである。本論文で取り上げる高分子は、物理過程の議論をしやすいするため Fox らのプロテノイドをより簡略化して、我々が独自に構成したアミノ酸熱重合物とした。このアミノ酸熱重合物は pH や温度などの環境要因に応じて、その水中での状態を分散状態または相分離状態（溶解または析出）へと変化させる。本論文では、特にアミノ酸熱重合物の pH の変化に伴う物理反応の過程を電子顕微鏡などで詳しく調べてみたところ、相分離状態にある構造物の表面付近に一種の反応拡散系が形成されていると考えられ、その結果として多様な形態形成（ここでは細胞様のマイクロカプセルの形成）が可能となることを示す。

2. 材料と方法

2. 1 アミノ酸熱重合物と微小球の作成

2. 1. 1 DP1

アスパラギン酸とプロリンをモル比 1:1 で十分に混合した粉末 25g を、500ml パイレックストールビーカーに入れ、通常雰囲気下でオーブンにより 200℃、3 時間の加熱をすることで褐色の溶融物を得た[4-6]。これをアミノ酸熱重合物と呼び、特にアスパラギン酸とプロリンから得られた溶融物を DP と呼ぶ。

この溶融物に、純水 250ml を加え、ガスバーナーで加熱し、沸騰が始まってから 20 分間煮沸した。その際、ストールビーカーの上に氷水を入れたフラスコをのせ、水蒸気を還流させることでできるだけ蒸発を防いだ。この段階で、溶融物はほぼ水中に溶解した。その後、ストールビーカーを氷水につけ、10 時間以上冷却した。ここで、水中に溶解していた成分の一部が、直径数マイクロメートルの内部の充填された微小球として析出し、溶液は懸濁液となった。

次にデカンテーションにより懸濁液からコゲ等を取り除き、ろ紙（ADVANTEC No.1 110mm）で吸引ろ過し、残渣（微小球）に純水 1ℓを加え再び吸引ろ過した後、できるだけ少量の純水で残渣を懸濁させて回収・精製した。

濃度の定量はアルカリ性の緩衝液に溶解し、分光光度計により 300nm の吸光度により測定した。吸光係数は $5.445 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ を用いた。

ゲルろ過クロマトグラフィー(Sephadex G-50, G-25)により分析した結果によれば、デカンテーション直後の懸濁液は、分子量約 100 から 10000 程度の非常に多様な分子種の複合であり、広がった 3 つのピークがみられた。この分子量の大きいものから

順に、DP1、DP2、DP3 と名前をつけたところ、ろ紙で精製した微小球は、分子量約 4000 にピークを持つ DP1 に相当した。

2. 1. 2 DPV

アスパラギン酸とプロリンとバリンを等モル比で混合した粉末を、DP1 と同じ手順にて微小球とした。これを DPV と呼ぶこととした。

2. 2 カプセル形成

微小球懸濁液にアルカリ性溶液を加えると、DP, DPV などの酸性アミノ酸の入ったアミノ酸熱重合物は溶解する。しかしここで、完全に溶解し切れない適度な pH のアルカリ性溶液を加えることで、直径数マイクロメートルのカプセルが形成される。マイクロカプセルの観測の目的に応じて、以下の二通りの方法でカプセル形成を行った。

2. 2. 1 スライドガラス上でのマイクロカプセルの形成

カプセル形成過程の直接観察は微分干渉光学顕微鏡(Nikon OPTIPHOT)で行った。カプセルの形成は、スライドガラス上に 1mg/ml の DP1 微小球懸濁液 200 μ l を滴下し、カバーガラスをかけ、カバーガラスの一端に 1M KOH を滴下し、反対の端からろ紙で水分を吸い取るという方法で、カバーガラス内の溶液を交換することによって行った。

2. 2. 2 バッチ法によるマイクロカプセルの形成

アミノ酸熱重合物の微小球懸濁液に塩基性溶液を加え攪拌したあと任意時間静置することでマイクロカプセルを得た。マイクロカプセルの回収は 4000rpm、3 分間の遠心分離でつぶれることなく回収可能であった。またはメンブランフィルター (ADVANTEC CELLULOSE ACETATE C045A025A, pore size 0.45 μ m) による吸引ろ過でも可能であった。

この段階では、カプセルの形成過程はそのまま進むため、最終的には全て溶解してしまう。この反応を止め、カプセルをそのままの形で保存するためには、酸性溶液で元の懸濁液と同程度の pH にした。

2. 3 電子顕微鏡観察

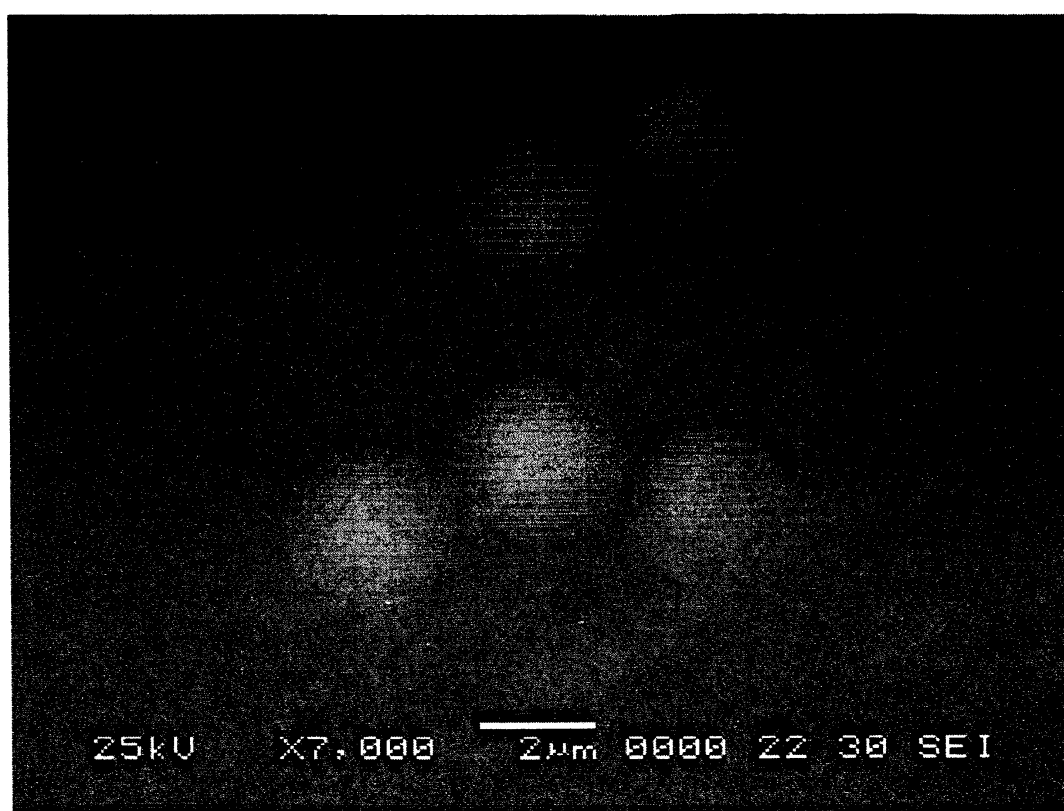
観察しようとするマイクロカプセルはバッチ法で形成し、遠心分離によるエチルア

ルコールへの置換と 10 分間静置を 3 回繰り返した後、t-ブチルアルコールに置換して黄銅のサンプル台上に滴下した。その後、20℃で凍結させたまま放置して t-ブチルアルコールを昇華させた。乾燥したサンプルにイオンスパッタリングデバイス(日本電子データム株式会社 JFC-1500)を用いて 50 Å の厚さで蒸着をした。観察は走査型電子顕微鏡(日本電子データム株式会社 JSM-6301F)によって行った。

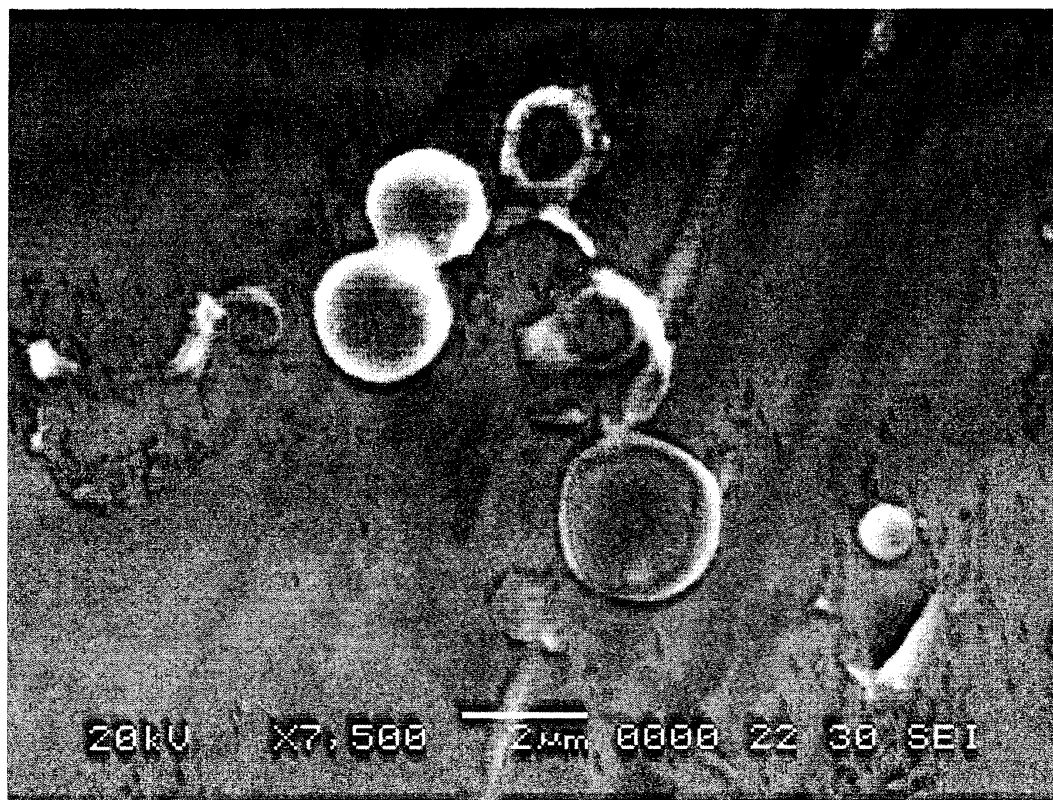
3. 実験結果と考察

3. 1 マイクロカプセルの電子顕微鏡観察像

マイクロカプセル形成前の DP1 微小球と、pH の上昇後に形成されたマイクロカプセルのそれぞれの走査型電子顕微鏡観察像を図 1 (a), (b)に示す。この観察条件では構造物の内部に電子が透過し、内部の様子が観察された。(a)では、内部が充填されている様子が観察された。一方、(b)では、内部の物質が抜け出し、溶け切れなかった小さな微小球が、鈴のような構造として残っている様子が観察された。この様に、マイクロカプセルは、内部の詰まっていた微小球が溶出することで形成される。



(a) カプセル形成前の微小球



(b) 形成されたマイクロカプセル

図1 微小球とマイクロカプセルの走査型電子顕微鏡観察像

3. 2 微小球から形成されるマイクロカプセル

光学顕微鏡のスライドグラス上で、実際に DP1 微小球からマイクロカプセルを形成した。そのスナップショットを図2に示す。

図2(a)から、マイクロカプセルの形成は微小球表面で起き、内部の微小球が溶解してカプセルを透過して外部に流出することにより空洞化していることがわかる。しかも、初期のカプセル形成時には、微小球の外径がわずかに大きくなっている。つまり、カプセルは pH 変化の前に微小球の表面に形成されていたのではなく、pH 変化後に微小球の表面に形成される。

図2(b)は、カプセル形成過程でカプセルが壊裂してしまい、その後外液が急激に流れ込んだことにより、内部で溶け残っていた小さな微小球の表面で改めてカプセル形成が起こり、2重のカプセルが形成された例である。このことから、カプセルは pH 変化によって形成されたものであるといえる。また、外液が急激に流れ込んだときにのみ内部のカプセルが形成された。pH の変化速度は、カプセルの構造物形成に重要な影響を与える。

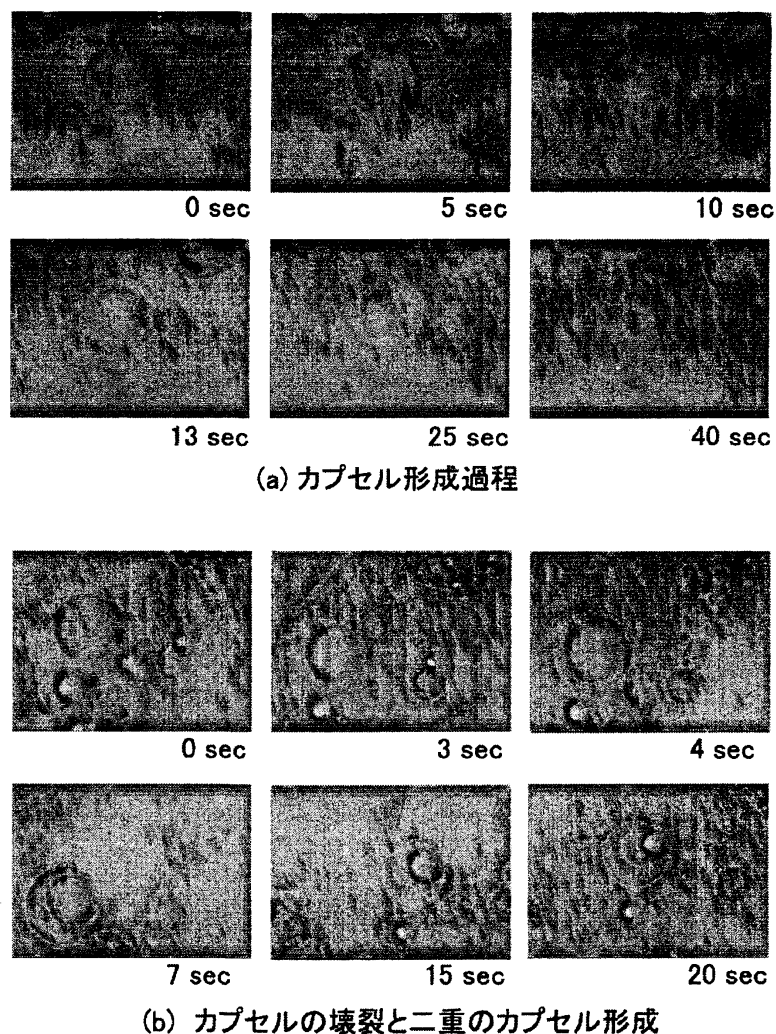


図2 マイクロカプセル形成過程の光学顕微鏡観察

3. 3 カプセル形成過程の電子顕微鏡観察像

バッチ法によりカプセル形成が進む過程で、バッチから少量ずつサンプルを採取し、直ちに反応を停止した。カプセル形成の各ステップで、微小球の表面にどのような形態変化が起きているのかを電子顕微鏡によって詳しく調べた。その観察像を図3に示す。

微小球は、 pH の上昇後、初期の数十秒で表面部が溶解した。その後数分の間に、微小球表面で溶解した熱重合物が直径 50nm 程度の微粒子として再析出した。それらの微粒子は、微小球を包み込むように殻状に構造化し、最終的には内部の微小球が溶解してカプセルとなった。これらの殻状の構造は、徐々に溶けつつある微小球を内部に残している間は安定に存在したが、完全に空洞のカプセルになると次第に殻状構造

物自体が溶解しはじめ、最終的には全て溶解してしまった。

この様に、一度、表面から溶解した熱重合物は、溶解の過程の中で完全な安定状態に至る前に構造化する。微小球表面で再析出するメカニズムは非常に興味深い、そのメカニズムは明らかではない。

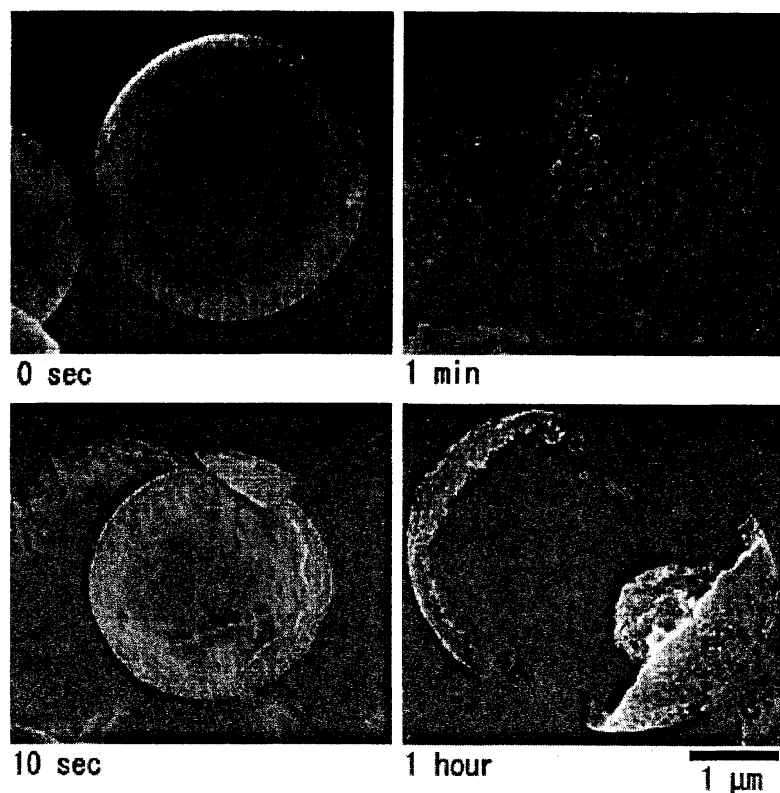


図3 カプセル形成過程の微小球表面の変化

3. 4 DPV 微小球が pH 上昇に対して示す形態変化

DPV 微小球懸濁液にアルカリ性溶液を加え、DP1 と同様にカプセル形成が起きるか否か調べた。その結果、図4に示すように内部から溶解していく様子が観察されたが、DP1 とは異なりカプセルではない内部の充填した構造物へと形態変化した。最終的に残された構造物には中心部の極わずかな部分に空洞と見られる穴が残った。また、溶けてゆく過程で、内部に残っている球体は、DP1 の場合ブラウン運動をするが、DPV の場合、一切動くことなく溶解していった。

これらの現象より、DP と同様なメカニズムで溶解直後から再析出し、それが最後まで続いて形成された構造物とも考えることができる。すなわち、DP の殻状構造物の

厚さが非常に厚く、ほぼ微小球の半径に等しいものと考えることができる。

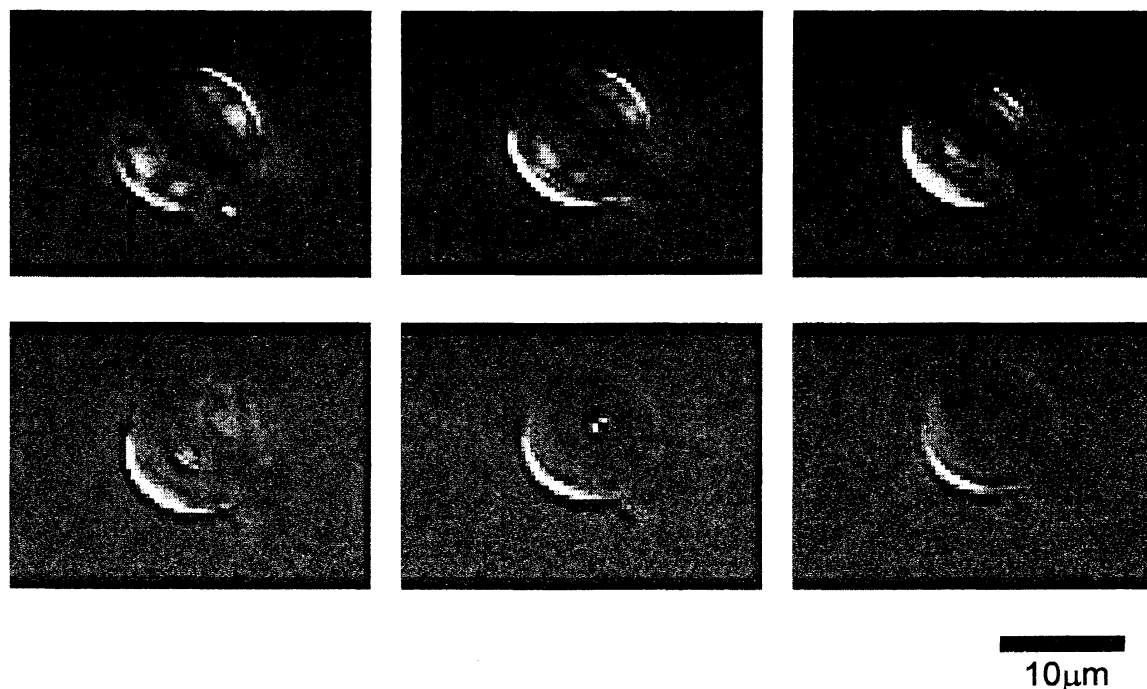


図4 DPV 微小球が pH 上昇に対して示す形態変化

4. まとめ

観察されている現象から、カプセル形成について現象論的に推測されるメカニズムは、高分子が微小球表面から溶解して拡散する流れの中で、反応拡散系のダイナミクスを示した結果としての凝集である。

ここで扱った高分子は多様な構造を持つ酸性の高分子電解質であり、アルカリ性のイオンや水酸化物イオンなどの拡散とは拡散係数が大きく異なると考えられる。同時に高分子電解質自身が溶解することで、自身の周囲の pH を下げる。また、多様な構造を持つ分子の複合であることから、ミクロにはイオン交換や、高分子同士の多様な会合状態（イオン結合、水素結合、疎水結合など）を複雑に変えながら、マクロには長時間の緩和時間を持ちながらパターン形成を起こす。

このように分子が高分子化することで、複合分子の集合体は複雑なダイナミクスを示し、原始的な「空間を持つ実体」の形成には重要であったと考えられる。これらの高分子を更に物理的な側面から調べることにより、そのダイナミクスから形態形成の重要な機能が見出される可能性は高い。

参考文献

- [1] S. L. Miller: *Science* **117**, 528 (1953)
- [2] A. I. Oparin: *The Origin of Life on the Earth*, Edinburgh: Oliver and Boyd (1957)
- [3] S. W. Fox and K. Harada: *Science* **128**, 1214 (1958)
- [4] H. Honda, M. Maezawa, E. Imai and K. Matsuno: *Origins of Life and Evolution of Biosphere* **23**, 177 (1993)
- [5] H. Honda, M. Maezawa, E. Imai and K. Matsuno: *Viva Origino* **22**, 71 (1994)
- [6] E. Imai, S. Sakurazawa, H. Honda and K. Matsuno: *Viva Origino* **24**, 159 (1996)
- [7] S. Sakurazawa, H. Honda, E. Imai and K. Matsuno: *Viva Origino* **22**, 81 (1994)
- [8] S. Sakurazawa, H. Honda, E. Imai and K. Matsuno: *Colloid and Polymer Science* **274**, 899 (1996)
- [9] S. Sakurazawa, T. Ishimori, H. Honda and K. Matsuno: *Colloid and Polymer Science* **275**, 502 (1996)