

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2015～2019

課題番号：15KT0080

研究課題名(和文) 原始自己複製体の機能的再構成により生命の初期進化を追体験する

研究課題名(英文) Experimental evolution of an primitive cell model to understand possible evolutionary process

研究代表者

市橋 伯一 (Ichihashi, Norikazu)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：20448096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、どうやって原始的な自己複製RNAが機能を増やして複雑化しえたのかを明らかにするために、2種類の異なる機能を持ち、2種類が協力しないとどちらも増えないようなRNAを設計し、実際に長期進化実験を行うことにより、RNA間の協力関係がどうやったら維持され、さらに発展していくのかを検証した。その結果、重要なのは細胞のような区画構造と、その中の平均的なRNA濃度、さらにRNAの希釈頻度であることを理論的および実験的に示した。本研究結果により、原始のRNA複製体が協力関係を維持して機能を増やしていくための条件を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純な化合物からどうやって生命が生まれたのかは、人類に課された大きな謎のひとつである。本研究では、原始の生命体の実験モデルをつくってみて、実際に試験管内で進化させてみることにより生命誕生の秘密を明らかにすることを試みた。生命が生まれるためには多くの機能を進化させる必要があり、そのためには異なる機能を持ったRNAが協力して働く必要があると言われている。本研究ではどうやったらRNA間の協力関係が安定になるのかを明らかにすることができた。本研究結果は、生命が誕生するための条件としてRNAの濃度や攪拌の程度が重要だと示した。この結果により、生命の誕生場の条件を絞り込むことができるだろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigate the conditions that allow the maintenance and development of cooperation between primitive self-replicators. First, we construct two types of RNAs that encode different functions. Second, we performed a long-term evolutionary experiment of the RNAs and found that the most important conditions that allow the maintenance and development of the cooperation are micro-compartmentalization, the average RNA concentration, and the mixing rate of the compartments. The results were supported by computer simulation. This study revealed essential conditions under which primitive life-forms could develop their functions.

研究分野：合成生物学

キーワード：RNA 進化 生命の起源 協力関係 共進化

1. 研究開始当初の背景

生命は、原始地球において単純な自己複製体として誕生し、その後進化することにより現在のような多機能で複雑化したシステムになったと一般的に考えられている。この生命の複雑性の進化がどうやって可能だったのかについて、これまでにハイパーサイクル仮説など多くの理論的仮説が提唱されてきたものの、ほとんど実験的な検証がなされておらず、ゆえに生命の初期進化は未だ多くの謎にまつまれている。この現状を打破するためには、構成的なアプローチで原始の自己複製体を機能的に模擬した実験モデルを作りだし、それがどういう条件で現在の生物のような機能で複雑に進化できるのかを実験的に観察する必要がある。

これまでに申請者らは、RNA とタンパク質を使って自発的な進化能を持つゲノム RNA の複製システムを構築した (図1 市橋ら 2013)。このシステムは RNA 複製酵素のみをコードした人工ゲノム RNA と無細胞翻訳系からなる。遺伝情報の翻訳と複製という生命の根幹の機能を再構成したこのシステムは、原始の RNA プロテインワールドにおける自己複製体のモデルとみなすことができる。この実験モデルを実際に機能を増やし複雑化してみることによって、生命の初期進化の仮説の検証が可能である。

原始自己複製体が新たな遺伝子を獲得し、複雑さを進化させていくモデルとして、アイゲンによって提唱されたハイパーサイクル仮説がある。この仮説では、複数の独立に生じた遺伝情報の自己複製体がお互いに相互協力関係を発展させ、高次の複製システム (ハイパーサイクル) を形成することで多機能化、および複雑化の進化が起こる (図2)。ハイパーサイクルの利点は、既存の自己複製体どうしが組み合わせることにより、一気に新しい遺伝子とその機能を獲得することができること、さらに RNA 複製などの正確性の低い複製であっても、多くの遺伝情報を安定に維持できる点である。このハイパーサイクルは多くの理論研究から現在も支持されているものの、未だ実験的に証明されていない。また、ハイパーサイクルを形成した複数のゲノムが、いかにして現在の生物が持つような統合された 1 本のゲノムへと進化するのは未解決である。

2. 研究の目的

本研究では、人工 RNA ゲノム複製システムを用いてハイパーサイクル仮説の実現性を検証し、さらに発展させてハイパーサイクルが 1 つのサイクルへと統合される条件を探る。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、以下の 3 つの研究を実施する。

1. これまでに構築した RNA ゲノム複製システムに新しい遺伝子を持つ第 2 ゲノム複製システムを導入し、ハイパーサイクルを構築する
2. このハイパーサイクルが理論的に予想されるように安定に複製できるかを検証する。
3. さらに、このハイパーサイクルを長期継代することにより、ハイパーサイクルが安定化し発展するかを検証する。

4. 研究成果

本研究ではこれまでに私達のグループで構築した人工RNAゲノム複製システムに、新しい遺伝子を加えて複雑化させることを試みる。そのための手段としてH27年度は導入すべき遺伝子の選択を行った。新しく加える遺伝子としての要件は、RNAゲノム複製に必須なタンパク質をコードする遺伝子である必要がある。また少ない翻訳量で十分な機能を持つタンパク質である必要がある。それらの要件にあてはまる遺伝子として、翻訳の開始因子であるIF1-3, 終結因子であるRF1, 2, エネルギー再生系のNDKを選んだ。さらにこれらのタンパク質を反応系から除いて、代わりに遺伝子として系中に加えることで、遺伝子発現に依存したRNA複製が起こるかを検証した。その結果、最も効率良く複製が起きたRF1とNDKを候補遺伝子として採用した。

さらに27年度はRF1についてRNAにコードさせ、かつ複製酵素の認識部位を付けたRNAを構築した。これまでに分かっているように、このRNAはそのままでは2次構造がほとんどないため複製できない。そこでランダム変異を導入し、その後人為進化実験を行うことにより複製可能なRF1遺伝子を得ることを試みた。約20ラウンド継代した結果、予想に反してRF1としての活性が失われた配列が選択されてしまった。原因を検証した結果、RF1の場合は、その活性がなかったとしてもある程度選択される経路が存在することが判明した。

H28年度は、新しい遺伝子として nucleotide diphosphate kinase (ndk)について検討した。この遺伝子は例えばCDPをCTPに変換する反応を触媒する。したがって翻訳には不要だが、RNA複製には必須という状況を作り出すことができる。この遺伝子の利点として全長が約400bpと短いということがある。通常遺伝子をコードしたRNAは我々のシステムではほとんど複製しない。それは私達の用いているRNA複製酵素により複製されるにはRNA全長に渡る強固な2次構造が必要だからである。本年度はこのndk遺伝子をコードしたRNAに同義変異を導入することで、ndk遺伝子の機能を変えずに2次構造を導入し複製しやすくすることを試みた。その結果、数十個の変異の導入により100倍以上複製しやすいRNAを得ることに成功した。

ndk遺伝子を使うことにより、反応系中のNDKの混入が問題となった。私達は精製された翻訳系を用いているが、わずかに残存したNDK活性があり、それによってRNAからNDKが発現しなくてもRNA複製してしまうという問題が生じた。これを解決するために、翻訳系の成分を精製しなおして残存するNDK活性を無視できるほどに減らすことに成功した。

H29年度では、昨年度までに作成した nucleotide diphosphate kinase (ndk)をコードしたRNAをもととのRNA複製酵素をコードしたRNAとさらにNDKの混入を極力減らした翻訳系を使うことで、2つのゲノムRNAからなるハイパーサイクル(協力的な複製システム)の構築を行った。その結果、確かに2つのRNAが両方存在するときのみ効率良く複製する反応系を構築することに成功した(図1)。さらにこの複製システムを長期継代することを試みた。その結果、多くの場合、元々は入っていない小さいRNA(寄生体RNAとよぶ)が増えてしまい、複製が継続できないという問題に直面した。この解決法を探るために理論モデルを構築したところ、RNAの濃度が高すぎず、かつ反応液が区画構造

に封入されていれば、たとえ寄生体 RNA が生じても協力的な RNA 複製が継続できることを予想した。これは区画存在下では寄生体が出現しても、確率的に寄生体の存在しない区画が生じるからである。実際の実験でも予想に一致して、ある一定の RNA 濃度以下を保つことにより 50 ラウンドまで協力的な RNA 複製を継続することに成功した。高い濃度では寄生体が出現し、実際に複製が停止した。一方で低い濃度ではそもそも複製が開始できなかった。

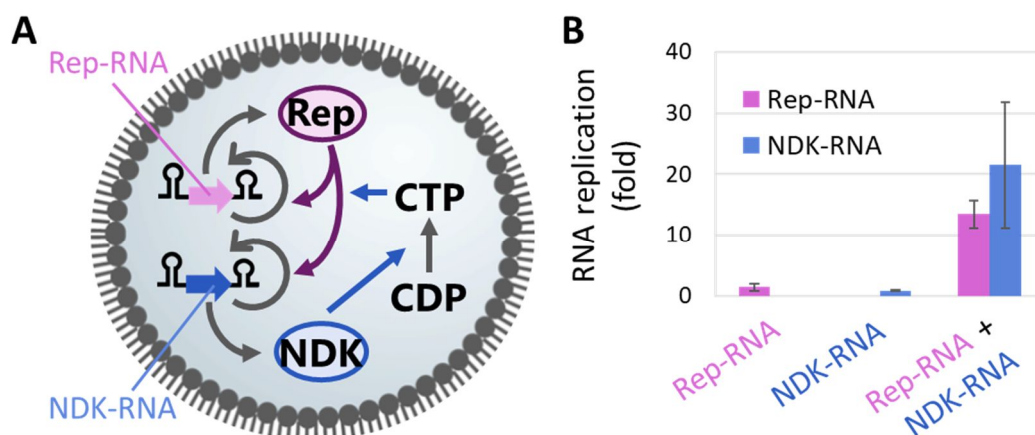


図1 構築した2種類のゲノムRNAからなるハイパーサイクル

H30年度では、昨年度までに作成した nucleotide diphosphate kinase (ndk) をコードした RNA をもともとの RNA 複製酵素をコードした RNA と協力的に複製するハイパーサイクルについて、どういう条件でなら継代可能かを理論的、実験的に調べた。その結果、重要なのは平均 RNA 濃度であることを見出した。RNA 濃度が高すぎる場合には寄生体 RNA が出現してしまい、協力的 RNA 複製が持続できない。一方で RNA 濃度が低すぎると2つの協力的 RNA が出会うことが難しくなり、やはり複製ができない。したがって、中間的な濃度でのみ協力的な RNA 複製が持続することを見出した(図2)。すなわちこの条件でハイパーサイクルが安定に維持されることを示す。さらに中間濃度で継代を続けていくと、RNA 複製酵素をコードした RNA ではその大部分が協力性を失うのに対し、ndk をコードした RNA の方は、半分以上の RNA が協力性を維持しており、さらにそのうち一部はより ndk の発現を上昇させていた。すなわち、このハイパーサイクルは進化により発展していくことを見出した。いままでの理論研究からは世代を重ねると協力性を失ったものが選択されることが多いと言われていたが、この結果は必ずしもそうではないことを示している。この原因のひとつは、ndk というのが相手の複製だけではなく、自身の複製にも貢献するためではないかと考えている。いままでは、協力性という相手だけを助けて自分の複製は助けないというモデルが考えられていたが、分子の仕組みを考えるとそのような仮定は考えにくく、本研究のように相手も自分も同程度に助けるという方がむしろ自然である。このような“自然な”仮定の下では、協力関係からなるハイパーサイクルは今まで考えられていたよりも維持・発展しやすいのかもしれない。

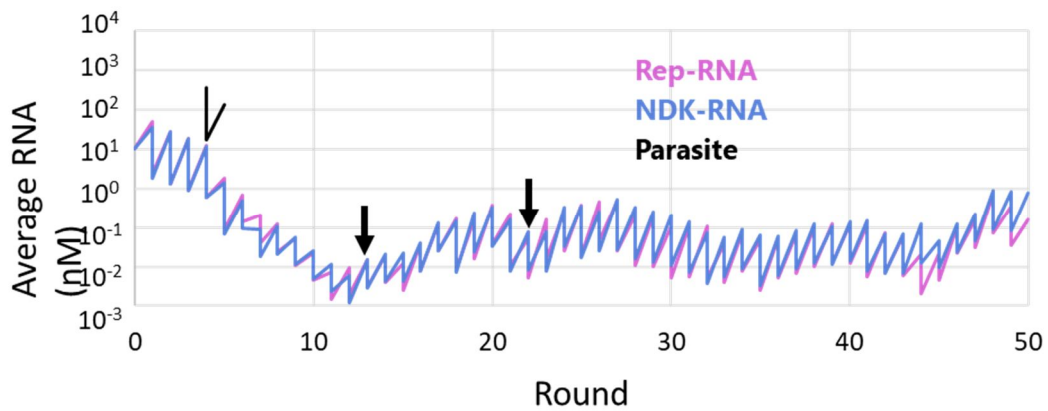


図2 中間的な濃度における2種類のゲノムRNAからなるハイパーサイクルのうえつき実験結果

H31年度では、このH30年度までに進化実験を行っていた2つのゲノムRNAが融合し、1本のRNAへと進化するかどうかを調べた。まず計算機シミュレーションをもちいて、どういう場合に融合したRNAが選択されるかを検証し、反応液の混ぜ方が重要であることを見出した。さらに実験としては、人為的に融合させたRNAを構築し、上記のシミュレーション結果を検証可能にする材料を作成した。実際にうえつき実験を行った際にこの融合RNAが分離したRNAに比べ選択されるかは将来の課題であるが、シミュレーションの結果は十分にその条件があることを示唆している。もし実験的にRNAの融合が示されたならば、ハイパーサイクルは進化により安定化し発展するのみならず、さらに融合して大きくなっていくことを示す初めての知見となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoshiyama Tomoaki, Ichii Tetsuo, Yomo Tetsuya, Ichihashi Norikazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Automated in vitro evolution of a translation-coupled RNA replication system in a droplet flow reactor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11867-11875
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-30374-0	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mizuuchi Ryo, Ichihashi Norikazu	4. 巻 2
2. 論文標題 Sustainable replication and coevolution of cooperative RNAs in an artificial cell-like system	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Ecology & Evolution	6. 最初と最後の頁 1654 ~ 1660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41559-018-0650-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furubayashi Taro, Ichihashi Norikazu	4. 巻 8
2. 論文標題 Sustainability of a Compartmentalized Host-Parasite Replicator System under Periodic Washout-Mixing Cycles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 3~3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life8010003	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furubayashi, T. Ichihashi, N.	4. 巻 8
2. 論文標題 Sustainability of a Compartmentalized Host-Parasite Replicator System under Periodic Washout-Mixing Cycles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Life (Basel)	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/life8010003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yumura, M. Yamamoto, N. Yokoyama, K. Mori, H. Yomo, T. Ichihashi, N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Combinatorial selection for replicable RNA by Qbeta replicase while maintaining encoded gene function	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0174130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yumura, M., Yamamoto, N., Yokoyama, K., Mori, H., Yomo, T., Ichihashi, N.	4. 巻 12
2. 論文標題 Combinatorial selection for replicable RNA by Q replicase while maintaining encoded gene function	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plos ONE	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0174130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakatani, Y., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Yomo, T.	4. 巻 5
2. 論文標題 A transcription and translation-coupled DNA replication system using rolling-circle replication	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10404, 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ichihashi, N., Aita, T., Motooka, D., Nakamura, S., Yomo, T.	4. 巻 32
2. 論文標題 Periodic Pattern of Genetic and Fitness Diversity during Evolution of an Artificial Cell-Like System	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 3205-3214
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomita, K., Ichihashi, N., Yomo, T.	4. 巻 467
2. 論文標題 Replication of partial double-stranded RNAs by Qbeta replicase	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 293-296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Usui, K., Ichihashi, N., Yomo, T.	4. 巻 43
2. 論文標題 A design principle for a single-stranded RNA genome that replicates with less double-strand formation	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8033-8043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mizuuchi Ryo, Usui Kimihito, Ichihashi Norikazu	4. 巻 26
2. 論文標題 Structural transition of replicable RNAs during in vitro evolution with Q replicase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RNA	6. 最初と最後の頁 83 ~ 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1261/rna.073106.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueda Kensuke, Mizuuchi Ryo, Matsuda Fumio, Ichihashi Norikazu	4. 巻 20
2. 論文標題 A Fusion Method to Develop an Expanded Artificial Genomic RNA Replicable by Q Replicase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 2331 ~ 2335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Norikazu Ichihashi
2. 発表標題 Making an artificial cell capable of Darwinian evolution
3. 学会等名 BDR symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norikazu Ichihashi
2. 発表標題 Experimental evolution of self-replicating RNAs with spontaneously-appeared parasites
3. 学会等名 46th Naito Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norikazu Ichihashi
2. 発表標題 Sustainability and evolvability of cooperative RNAs in an artificial cell-like system
3. 学会等名 Biophysics Society Annual Meeting (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norikazu Ichihashi
2. 発表標題 Experimental evolution of self-replicating RNAs with spontaneously-appeared parasites
3. 学会等名 EVOLUTION Genetic Novelty/Genomic Variations by RNA Networks and Viruses (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Norikazu Ichihashi
2. 発表標題 Evolution of a self-replicable RNA, the roles of compartment, parasites, and hypercycle
3. 学会等名 International Conference The Origin of life (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Y. Bansho , T. Furubayashi , N. Ichihashi
2. 発表標題 Host-parasite oscillation dynamics and evolution in a compartmentalized RNA replication system
3. 学会等名 XVIIIth International Conference on the Origin of Life (国際学会)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 市橋 伯一
2. 発表標題 実験進化で探る 物質から生命への進化可能性
3. 学会等名 生命の起源と進化学会 (招待講演)
4. 発表年 2017年～2018年

1. 発表者名 Ichihashi N.
2. 発表標題 Synthesizing an evolvable replication system from bacterial components
3. 学会等名 Synthetic biology workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 市橋伯一
2. 発表標題 人工RNA複製システムの構築と寄生体との共進化
3. 学会等名 進化学会年会（招待講演）
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 市橋伯一	4. 発行年 2019年
2. 出版社 光文社	5. 総ページ数 240
3. 書名 協力と裏切りの生命進化史	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----