

平成 26 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687034

研究課題名(和文) 生命の初期進化を模擬した実験モデルの構築

研究課題名(英文) Construction of an experimental model system that mimic the evolution of early life

研究代表者

市橋 伯一 (Ichihashi, Norikazu)

大阪大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号：20448096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円、(間接経費) 5,400,000円

研究成果の概要(和文)：生命がどのように進化してきたのかはほとんどわかっていない。その原因の一つは、初期生命を模した実験モデルが存在していなかったことにある。そこで本研究では、初期生命を機能的に模擬した単純なゲノム複製システムを構築した。そしてそのシステムに自発的な進化能を付与することに成功した。このシステムを用いることにより、単純なゲノム複製システムがどうやって現在の生命のような複雑なシステムへ進化しうるのかを実験的に確かめることができるようになるだろう。

研究成果の概要(英文)：The evolutionary process from the assembly of chemical compounds to the present-day life is largely unknown. One of the major obstacles is the lack of the experimental model. In this project, we have succeeded in the construction of an experimental model that functionally mimic the early life and have the ability of autonomous evolution. This system would be useful for the experimental investigation of the evolutionary process from a simple genome replication system to a present-day complex life system.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：進化生物学

キーワード：進化 人工ゲノム 実験進化 RNAゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

生命の起源では、RNA とペプチドからなる化学反応の集まりが自己複製能と進化能を獲得し、現在のような精巧で複雑な生物に進化したと考えられている。しかしこれは推測に過ぎず、化学反応の集まりが進化して生物に近づいていく様子を見た者は誰もいない。どのような条件を整えばそのような進化が可能なのか？ そしてどのような過程で進化するのか？ これらは生命の初期進化における大きな謎である。これらの質問に答える最も直接的な方法は、進化能を持つ自己複製体を核酸やタンパク質などから構築し、その進化過程を逐次観察することである。化学反応が生物と同様な進化能を持つためには、少なくとも3条件（1. 遺伝子からの翻訳反応、2. 遺伝子の複製反応、3. 遺伝子に対する変異）が必要だと言われている。我々のグループでは、これまでに1と2の条件を満たすRNAの自己複製反応系の構築に成功していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまでに構築したRNAの自己複製反応系を長期間継代することにより、自己複製RNAを実験的に進化させることができるのか、そしてその進化はどのようなプロセスで進んでいくのかを実験的に明らかにすることを試みた。

### 3. 研究の方法

毎日栄養となる翻訳システムを供給してやることによりRNA複製反応を継続させ、最終的に約600世代継代し、毎世代におけるRNA複製能を測定した。継代途中の20か所についてRNAをクローン化し、配列、および生化学活性を解析した。

### 4. 研究成果

約600世代の継代実験行い、毎世代RNA集団の複製能力を測定した結果、複製能力は最初の数世代は少し低下し、その

後は世代を重ねるごとに徐々に上昇することを見出した(図1)。最終的に初期RNAに比べて100倍以上の複製能力を獲得した(32ラウンド、72ラウンドで反応条件を変えたために複製能力が一時的に低下している)。

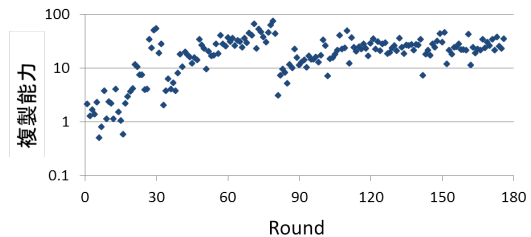


図1 継代実験によるRNA複製能力の上昇

進化途中の20か所の世代について各16個のRNAをクローン化して配列解析を行った結果、継代に伴って変異が集団内に次々に固定されていた。最終的に38種類の変異が固定されていた。この中には35種類の点変異と3種類の欠失変異、1種類の挿入変異が含まれていた。

以上のRNA集団の複製能力の上昇と変異の固定は、RNA複製の継代により、より複製能力の高いRNAが進化したことを示している。

次に、この進化が起きたプロセスを生化学的に解析した。まず、RNA自己複製反応を11個の速度論的パラメータから成る化学反応でモデル化した。次に、進化前のRNAと進化途中の3種類のRNAクローンを選択し、その中にコードされているRNA複製酵素を精製した。各RNAと各RNA複製酵素について、複製速度、酵素とRNAの親和性、複製酵素の翻訳速度等の速度論的パラメータを測定した。これらのパラメータを使って、RNA自己複製反応における各反応(翻訳、複製反応)のフラックスをシミュレーションした。その結果、進化前のRNA複製反応では、RNA複製反応は起こらず、その代わりに当初想定していな

い短い RNA (パラサイト) が出現し、その RNA が主に増えてしまっていた。これに対し進化が進むと、パラサイトの複製が徐々に抑えられ、目的 RNA (鋳型 RNA) の複製が選択的に起こるようになっていた (図 2)。

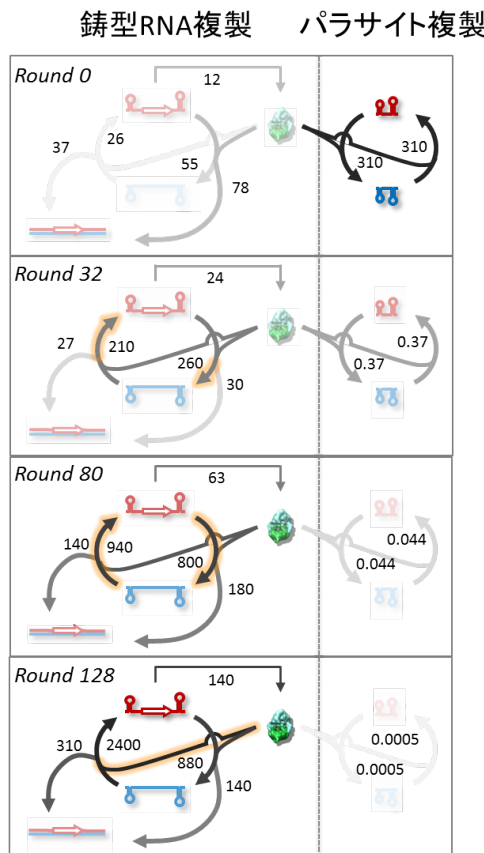


図2 進化によるRNA複製フラックス変化

フラックスが変化した詳細を調べると、まず第一段階として RNA が 1 本鎖として複製される速度が上昇していた。すなわち、進化前の RNA では、複製の鋳型にならない 2 本鎖 RNA (鋳型と新規合成鎖が結合したもの) が主に増えていたが、進化により、その形成が抑えられ、主に 1 本鎖として新規合成鎖が作られるようになっていた。さらに第二段階として、1 本鎖、2 本鎖を含めた総 RNA 複製速度が上昇していた。そして第三段階として、RNA 複製酵素と鋳型 RNA の親和性が上昇していることが明らかになった。

この進化プロセスが妥当なものかを調べるために、反応モデルの理論的解析を行った。速度論反応モデル中の各パラメータについて 3 か所の進化段階において感度解析を行い、どのパラメータが変わると RNA 複製能力が上昇しやすいかを調べた。その結果、感度が高く変化することが期待されるパラメータは、実際の進化でも変化していることが明らかになった。また、変化しても RNA 複製には影響しないパラメータは実際の進化でも変化していないことが明らかになった。この結果は、進化により反応ネットワーク中の変わるべきパラメータが選択的に変わることを示している。また、感度が高く変化したほうが望ましいにもかかわらず、進化により全く変化しないパラメータ (翻訳速度) も見つかった。おそらくこのパラメータは、別の制限条件によりこれ以上変化が許されないということが推測される。

以上の結果から、本研究では継代するだけで自発的に進化する RNA の自己複製システムを構築することができた。さらにその進化プロセスの解析から、進化は反応ネットワーク中の変えるべきパラメータを選択的に変えることができる効率のよい機構であることが明らかになった。また進化の結果、RNA 自己複製システムは、天然の RNA ウイルスなどに匹敵する高効率な複製能力を獲得することができた。今後、この RNA 複製システムをさらに生物に近づけるように進化させていくことで、原始地球において非生物がどうやって現在の生物になっていったかの謎の解明につながると期待している。

5 . 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)  
〔雑誌論文〕(計 9 件)

Usui, K., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Matsuura, T., Yomo, T.  
Effects of ribosomes on the kinetics of Qb replication.  
FEBS Letters, **588**, 117-123, 2014  
査読あり  
DOI 10.1016/j.febslet.2013.11.018

Ichihashi, N., Usui, K., Kazuta, Y., Sunami, T., Matsuura T., Yomo, T.  
Darwinian evolution in a translation-coupled RNA replication system within a cell-like compartment.  
Nature Communications, **4**, 1-7, 2013  
査読あり  
DOI 10.1038/ncomms3494

Usui, K., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Matsuura, T., Yomo, T.  
Kinetic model of double-stranded RNA formation during long RNA replication by Q replicase.  
FEBS Letters, **587**, 2565-2571, 2013  
査読あり  
DOI 10.1016/j.febslet.2013.06.033

Matsuura, T., Hosoda, K., Kazuta, Y., Ichihashi, N., Suzuki, H., Yomo, T.  
Effects of compartment size on the kinetics of intracompartamental multimeric orotein synthesis.  
ACS Synthetic Biology, **1**, 431-437, 2012  
査読あり  
DOI 10.1021/sb300041z

Kobori, S., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Yomo, T.  
A controllable gene expression system in liposomes that includes a positive feedback loop.  
Molecular Biosystems, **9**, 1282 - 1285, 2013  
査読あり  
DOI 10.1261/rna.032748.112

Nishiyama, K., Ichihashi, N., Matsuura, T., Kazuta, Y., Yomo, T.  
-Complementation in an artificial genome replication system in liposomes.  
Chembiochem, **13**, 2701-2706, 2012  
査読あり  
DOI 10.1002/cbic.201200586

Kobori, S., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Matsuura, T., Yomo, T.  
Kinetic analysis of aptazyme-regulated gene expression in a cell-free translation system: modeling of ligand-dependent and -independent expression.  
RNA, **18**, 1458-1465, 2012  
査読あり

DOI 10.1261/rna.032748.112

Y Bansho, Y., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Matsuura, T., Suzuki, H., Yomo, T.  
Importance of parasite RNA species repression for prolonged translation-coupled RNA self-replication.  
Chemistry and Biology, **19**, 478-487, 2012  
査読あり  
DOI 10.1016/j.chembiol.2012.01.019

〔学会発表〕(計 10件)

Ichihashi, N.  
The Thirteenth International Conference on the Synthesis and Simulation of Living Systems (Artificial Life XIII)  
Michigan State University in East Lansing, Michigan, USA  
July. 19-22, 2012

Ichihashi, N.  
The International Astrobiology Workshop 2013(as the Japan Astrobiology Network Annual Meeting #6)  
JAXA/ISAS, Sagami-hara, Japan  
Nov. 28-30, 2013

〔図書〕(計 1件)

Ichihashi, N., Matsuura, T., Kita, H., Sunami, T., Suzuki, H., Yomo, T.  
Constructive approaches for the origin of life.  
A captor in "Genesis - in the Beginning: Precursors of Life, Chemical Models and Early Biological Evolution." J. Seckbach Ed., Springer, 2012  
289 - 304

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www-symbio.ist.osaka-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
市橋 伯一 (ICHIHASHI, Norikazu)  
大阪大学・情報科学研究科・准教授

研究者番号: 20448096

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし