

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770256

研究課題名（和文）

持続的な遺伝情報複製に対するマイクロ環境の重要性の実験的検証

研究課題名（英文） Experimental verification of the requirement of micro-environment for continuous self-replication system.

研究代表者

市橋 伯一 (ICHIHASHI NORIKAZU)

大阪大学・大学院情報科学研究科・招聘教員

研究者番号：20448096

研究成果の概要（和文）： 自律複製する細胞のほとんど全てマイクロメートルサイズである。大きすぎるものも小さい過ぎるものも存在していない。この生命のサイズ依存性の一端を明らかにするために、本研究では人工的に遺伝情報の複製システムを構築し、その反応場サイズ依存性を実験的に検証した。その結果、ちょうど細胞と同じマイクロメートルサイズでのみ、寄生体の増殖を抑えることができ、持続的な複製が達成された。本研究は、細胞サイズは寄生体からの防御に密接に関わることを示唆する。

研究成果の概要（英文）： Most of the self-sustained cell are micro-meter size; there are no larger cells or smaller cells. In order to investigate the importance of micro-size of cells, I constructed an artificial self-replication system of genetic information, and examine the size-dependency of it. I found that the replication proceeded continuously only in micro-size reaction volume because of the repression of the propagation of parasitic replicator. This result suggested that the cell size is strongly connected with defense mechanism against parasite.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・進化生物学

キーワード：細胞サイズ、エマルジョン、自己複製、RNA複製、寄生体

1. 研究開始当初の背景

進化のメカニズムを実験的に検証するためには、進化する人工細胞モデルの構築が有効である。近年申請者らのグループでは、遺伝情報の複製システムを持った人工細胞モデルを世界に先駆けて構築した（図1）。この細胞モデルが進化するためには、+鎖が持続的に複製する必要がある。予備的な実験から、細胞サイズ、すなわち反応場のサイズが

遺伝情報の複製システムの持続性に大きな影響を与えることがわかってきた。具代的には、ミリメートルサイズの反応場（例えば試験管）では、遺伝情報を欠失した短いRNA（寄生RNA）が優先的に複製し、+鎖RNAの複製が停止した。一方、大腸菌と同じマイクロメートルサイズの反応場（エマルジョン内）では寄生RNAは増幅せず、継続的に+鎖RNAが複製された。

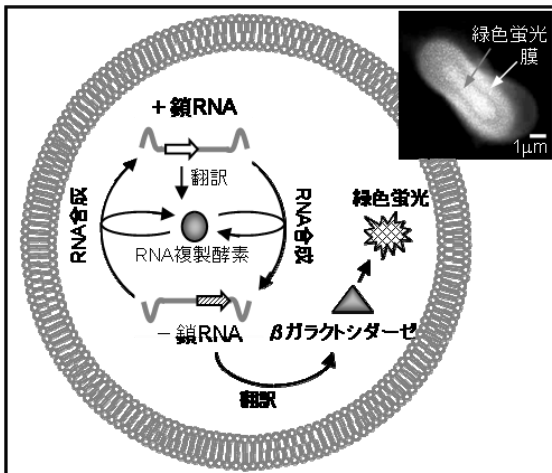


図1 遺伝情報の複製機構を持つ人工細胞モデル
RNA複製酵素をコードした+鎖RNA(遺伝情報)と、再構成された無細胞翻訳系からなる。+鎖からRNA複製酵素が翻訳され、その酵素により、-鎖合成を介して元の+鎖RNAが複製される。この反応が、脂質2重膜であるリボソーム内で観察されている。しかし、細胞のサイズが内部反応に与える影響は未だ不明である。

2. 研究の目的

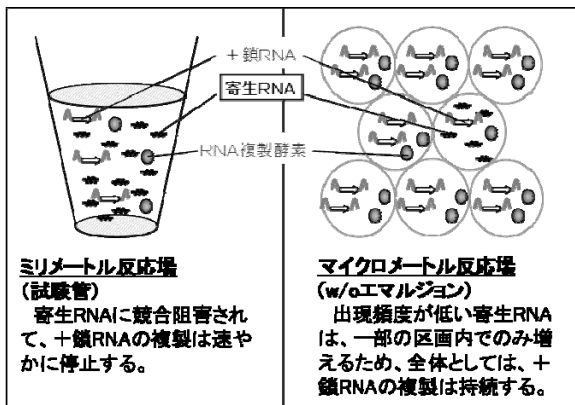
マイクロサイズの反応場で寄生RNAが抑えられ、持続的な遺伝子複製が達成されるメカニズムを明らかにする。

それにより、マイクロ環境が持続的な遺伝情報の複製に重要であることを示す。

3. 研究の方法

寄生RNAの配列を調べた結果、寄生RNAは+鎖RNAの遺伝子領域が欠損して生じたと考えられた。また過去の研究から、RNAの欠損は低頻度 ($10^{-5} \sim 10^{-8}$ /h) で起こることが知られている。これらの知見から、マイクロサイズの反応場で寄生RNAが抑えられたのは、寄生RNAは出現頻度が低いからという仮説を立てた(図2)。しかし、別の可能性として、エマルジョンの内部ではなんらかの理由により、寄生RNAの複製が

図2 寄生RNA抑制メカニズム(仮説)



遅くなっている可能性もある。また、我々の使っているシステムで寄生RNAの出現頻度が低いかどうかの実験的証拠はない。

そこで、これら仮説を検証するために、本研究では、ミリメートルからマイクロメートルに渡る平均サイズを持つ均一な反応場を調整し、各サイズの反応場での寄生RNAの複製速度、+鎖RNA複製速度を調べた。さらに、寄生RNAの出現頻度と反応場のサイズ、および+鎖、寄生RNAの複製速度から、寄生RNAの抑制効果が図2の効果により定量的に説明できるかどうかを検証した。簡単に述べると、反応場のサイズを小さくし、1区画あたりの寄生RNA出現数を1以下にすれば、寄生RNAを抑えられるはずである。

4. 研究成果

(1) 反応場のサイズをコントロールする方法の確立

これまでは人工細胞モデルの反応場としてリボソームを用いてきたが、リボソームではサイズのコントロールや内部の反応液を回収しRNAを定量することが難しい。そこで本研究では、反応場として水溶液をオイルに分散させたw/oエマルジョンを用いた。エマルジョンを使えば、遠心操作により反応溶液を回収し、通常の生化学アッセイが行うことができる。また、攪拌強度を変えることにより直径 $2 \mu\text{m}$ から $100 \mu\text{m}$ サイズのエマルジョンをコントロールして調整することができた(図3)。また、オイル組成を検討することにより、エマルジョン内で、翻訳やRNA複製反応が進行することができた。

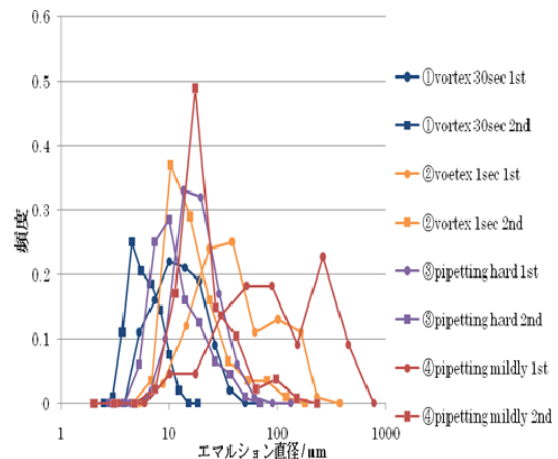


図3 エマルジョンのサイズ分布

(2) エマルジョン内での遺伝情報 (RNA) 複製反応の測定

上記の各サイズのエマルジョン内でRNAからの複製酵素の翻訳、及びその複製酵素によるRNA複製反応を行なった。その後、反応液を回収し、RNAの複製量、及び寄生

RNAの増幅量を測定した。その結果、エマルジョンサイズが小さくなればなるほど、寄生RNAの増幅が抑えられていた(図4A)。また遺伝情報である鋳型RNAは逆にエマルジョンが小さいほど複製量が大きくなっていった(図4B)。

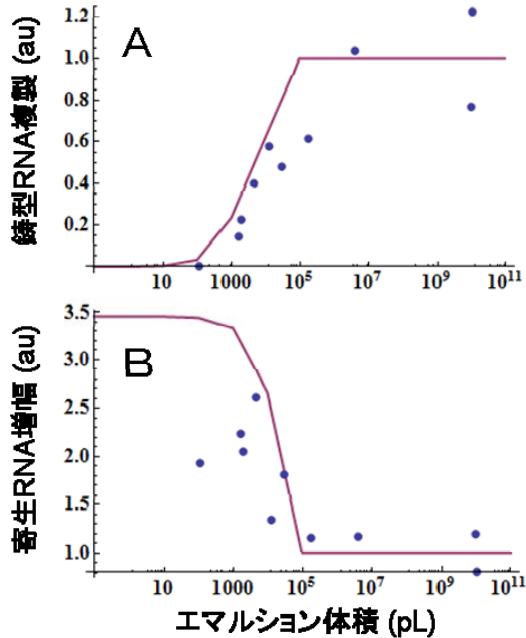


図4 エマルジョン内RNA複製反応

この結果は、図2に示すような、小さいエマルジョンではより寄生RNAの抑えられ、それにより鋳型RNA複製の持続性が向上するという区画化効果で説明ができる。

申請者はさらに、この区画化効果が定量的に実験結果を説明できるかを検証するために、RNA複製反応の計算機シミュレーションを構築し、区画化効果の定量的評価を試みた。

RNA複製反応は図5に示す素反応の集まりと近似することができる。そこで様々な実験条件で測定したRNA複製量、複製酵素の翻訳量のデータから各素反応の速度定数を見積もった。その速度定数と反応式からRNA複製反応を計算機上でシミュレートす

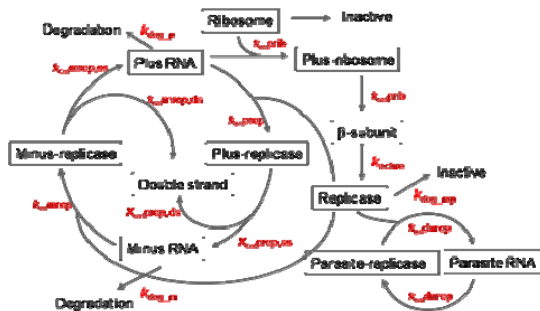


図5 RNA複製反応の模式図

ることができた。

このシミュレーターにさらに反応区画効果を導入し、図4で示す実験結果と合うかどうかを検証した。その結果、区画化効果を考慮したシミュレーションによる予想(図4の紫の線)は、実験結果(青点)をよく説明することができた。この結果は、実験結果で見られた鋳型RNA複製と寄生RNA増幅のエマルジョン体積依存性は、寄生RNAの区画化による封じ込め効果で定量的に説明ができることを示している。

以上の結果から、RNA複製反応を試験管のようなミリメートルサイズの環境ではなく、エマルジョン内のようなマイクロサイズの環境で行なうことにより、寄生体の増幅を抑え、より持続的な遺伝情報の複製が達成できることを実験的に明らかにすることができた。この成果は、なぜ全ての生物がマイクロサイズの細胞という単位から構成されているのかという生物学における根本的な謎について、ひとつの可能性を提示する。すなわち、細胞のようなマイクロサイズの区画構造は、寄生体からの防御に有効である可能性である。この防御機構は特に、始原的な生命やRNAウイルスといった正確な複製機構を持たず、寄生種が出現しやすいシステムにおいて、より重要となったはずである。本研究結果は、細胞の起源を理解する上で重要な知見を提供する。

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2件)

① Norikazu Ichihashi, Tomoaki Matsuura, Kazufumi Hosoda, Tetsuya Yomo

Identification of two forms of Q β replicase with different thermal stabilities but identical RNA replication activity

The Journal of Biological Chemistry

査読有

285, 2010, 37210-37217

② Hiroya Urabe, Norikazu Ichihashi, Tomoaki Matsuura, Kazufumi Hosoda, Yasuaki. Kazuta, Hiroshi Kita, Tetsuya Yomo

Compartmentalization in a water-in-oil emulsion repressed the spontaneous amplification of RNA by Q β replicase

Biochemistry

査読有

49, 2010, 1809-1813

[学会発表] (計2件)

① 市橋 伯一

Constructing an artificial self-replication system of genetic information from RNA and proteins
12th International Conference on the Synthesis and Simulation of Living Systems (Alife XII)
2010年8月22日
Odense, Denmark

②市橋 伯一

Constructing self-replication system in liposome.
International Symposium on Complex System Biology
2009年9月29日
東京

〔図書〕(計1件)

①Norikazu Ichihashi, Tomoaki Matsuura, Hiroshi Kita, Takeshi Sunami, Hiroaki Suzuki, Tetsuya Yomo
COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS
The Origins of Life
2010, 295-303

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

①

名称：エマルジョンを用いたRNAの選択的増幅法

発明者：四方哲也、松浦友亮、市橋伯一、占部博也

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2009-168285

出願年月日：平 21. 7.16

国内外の別：国内

〔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・大学院情報科学研究科・招聘教員

研究者番号：20448096

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：