

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650127

研究課題名(和文)生命の初期進化におけるアミノ酸獲得仮説の実験的検証

研究課題名(英文)Examination of the codon-acquisition hypothesis in the early evolution of 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) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：原始生命のタンパク質は現在のような20種類よりも少ない数だったと考えられている。本研究ではタンパク質を構成する20種類のアミノ酸を減らせるかを検証するために、独自に開発したRNA自己複製システムを用いて、20未満のアミノ酸からなる酵素が進化するかを検証した。その結果、RNA複製酵素中に元々8個存在したメチオニンコドンをも2つにまで減少させることに成功した。ただし、残りの2つについては別のどのアミノ酸に変異させても十分な活性を示さなかった。したがって、完全に20未満のアミノ酸からなる複製酵素を得るには、もっと異なる環境、例えば完全にメチオニンのない環境など、での進化が必要だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Present-day proteins consist of mainly 20 amino acids, while ancient proteins are considered to consist of fewer amino acids. In this study, I attempted to examine this hypothesis through developing an RNA replication enzyme that consists of fewer than 20 amino acids by using an evolvable RNA replication system that we have established. We succeeded to reduce the number of methionine codons in the RNA replicase from 8 to 2, but further reduction abolish the replication activity. This result demonstrates that the development of an RNA replicase consists of 19 amino acids requires evolution under more different conditions, such as the completely methionine-depleted condition.

研究分野：合成生物学

キーワード：RNA複製酵素 コドン

1. 研究開始当初の背景

現存するほとんどのタンパク質は、20種類以上のアミノ酸から構成されている。しかし、コドンの並び方、使用頻度等のデータから、原始生命の持つタンパク質はもともと少数(～4種類程度)であり、進化の中で徐々に新しいアミノ酸が獲得されていったと考えられている(Trifonov 2000)。もしこの仮説(アミノ酸の獲得仮説)が正しければ、核酸の複製など生命の主要な機能を触媒する酵素は、20未満のアミノ酸(極端には4種類)で達成されなければならない。しかしながら、実験的な検証はなされていない。

これまでに申請者らは、RNAとタンパク質からなる原始生命を機能的に模した人工RNA自己複製系を構築した。この系は、RNA複製酵素をコードした人工ゲノムRNAと再構成された大腸菌の翻訳系からなる(図1A)。ゲノムRNAから複製酵素が翻訳され、それによりRNAが複製される。この反応を図1Bに示す方法で繰り返すと、複製エラーにより変異が導入され、その環境下で最も活性の高いRNA複製酵素が自発的に進化することを

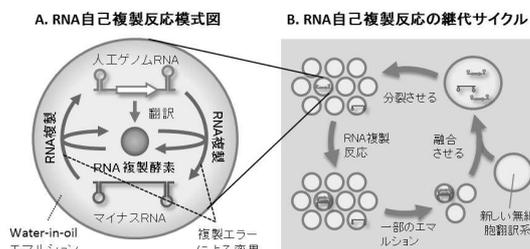


図1 本研究で用いるRNA複製酵素の自発的進化システム

示した(Ichihashi 2013)。

2. 研究の目的

生命の初期進化におけるアミノ酸の獲得仮説を実験的に検証するために、我々の開発したRNAの自己複製系をもちいて、各アミノ酸を欠乏させた環境下でRNA複製酵素を進化させる。そして、20未満のアミノ酸で機能するRNA複製酵素が出現するかを検証する。

3. 研究の方法

まず最も新しく獲得されたと言われていた3種類のアミノ酸(メチオニン、トリプトファン、チロシン)について、濃度をそれぞれ低下させた条件下で、RNAの自己複製反応を継代したのち配列解析を行いコドンが減少しているか検証した。

その後、継代を続けても無くならない残りコドンについては、選択的に変異を導入することで、対象となるコドンを別の19種類のアミノ酸のコドンに置き換えたライブラリを調製した。そのライブラリを継代し、増えてくるものを選択することで、残りのコドンを置き換えた変異体を得ることを試みた。

4. 研究成果

メチオニン、トリプトファン、チロシンについてそれぞれの濃度を低下させた条件下で継代した。図2に継代中の各条件のRNA濃度を示す。2時間RNA複製を行った後、5-100倍希釈して次の反応を行った。反応前後のRNA濃度を逆転写定量PCRにより測定した。各条件でまず150回継代を行い、その後複数のRNAをクローン化し配列解析を行った。

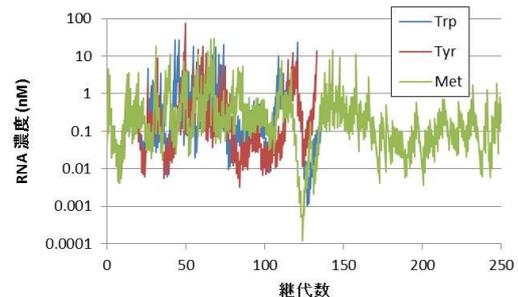


図2 各アミノ酸欠乏下での継代実験

その結果、メチオニンを欠乏させた条件下で継代したRNAについては、130回継代した時点で元々8個あったメチオニンコドンのうち4個のコドンはロイシンかスレオニンに変異していた。この結果は、メチオニン欠乏下で継代したことにより、メチオニンを含まないRNA複製酵素が進化したことを示している。一方でトリプトファン、あるいはチロシンを欠乏させた条件下で継代したものでは、140回継代後でも各コドンに変異は見られなかった。

次にコドンの減少が見られたメチオニン欠乏条件下について、さらに継代を250回まで増やした(図2)。途中の各世代についてRNAをクローン化し配列解析を行ったところ、160継代目にさらに1個のメチオニンコドンがロイシンに変化していた。しかしその後は、さらに100回継代してもそれ以上のメチオニンコドンの変異は観察されず、別の部位への変異が蓄積しているだけだった。

以上の結果から、メチオニン欠乏下の継代により、メチオニンコドンは全8個中3個まで減ったものが進化することが分かった。では、残りの3つのメチオニンコドンについてはなぜ無くならないのだろうか? ひとつの可能性として、変異導入部位に偏りがあるために、これらのメチオニン部位に変異が入っていないことが考えられた。そこで次に、選択的に残る3つのメチオニンコドン(1st, 5th, 8th)を他の19種類全てのコドンに変異させたライブラリを作り、そのライブラリを継代することを試みた(図3)。

ライブラリの作成は各変異を含む多数のプライマーを用いてPCRを繰り返すことにより行った。予想通りのライブラリができてい

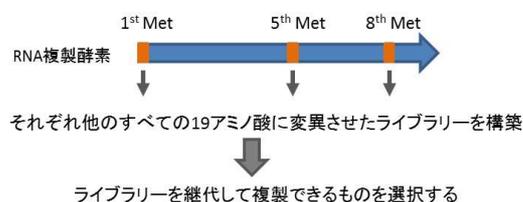


図3 残り3個のメチオニンコドンの変異体の選択方法

るかは、ライブラリーを直接配列解析し、変異導入部位のシグナルが4種類の塩基の混じりであることを確認することにより検証した。1st メチオニンコドンに変異を入れたライブラリーを継代したところ、6回継代した時点で、RNA濃度が低くなりすぎてそれ以上継代できなくなった。8th メチオニンコドンに変異を入れたライブラリーについては8回継代すると、変異を入れたにもかかわらず、ほとんどのRNAはメチオニンコドンに戻ってしまっていた。5th メチオニンコドンについては、18回まで継代することができた。このときメチオニンコドンがロイシン、パリンに変異したものが選択されていた。以上の結果から、5th メチオニンコドンについては、他のアミノ酸に置き換え可能であることが分かった。しかしながら、1st、8th メチオニンコドンについては、他のアミノ酸に変えると十分なRNA複製酵素活性を持たなくなることが判明した。

以上の結果をまとめると、RNA複製酵素に存在する8個のメチオニンコドンのうち6個については他のアミノ酸（ロイシン、スレオニン、パリン）で置き換えることが可能だったが、2個については他のアミノ酸で置き換えるとRNA複製活性が維持できないことが分かった。この結果は、現在のRNA複製酵素からは活性を維持したままメチオニンコドンを無くすることはできないことを示唆している。すなわち、本研究からはアミノ酸の獲得仮説（コドンが順次追加されていったという仮説）を支持する知見は得られなかった。このような結果になった理由として、現在のRNA複製酵素が既に20アミノ酸を使う環境で長い間進化してきたために、もう太古の昔の環境である19アミノ酸の環境には戻れなくなっている可能性がある。そのため、メチオニンコドンを変えても、元に戻ったRNAが進化したと考えられる。

今後、19アミノ酸からなるRNA複製酵素が存在するかどうかをさらに検証するためには、系中から完全にメチオニンを除いてアミノ酸が19種類しかない環境をつくり、その環境で進化させることが必要であろう。本研究でもそのような環境をつくることを試みた。すなわち、アミノ酸としてメチオニンを加えず、またmethionyl-tRNA synthetaseも除いた無細胞翻訳系を使ったものの、それでもメチオニンコドンが再生した変異体を選択してしまった。これはメチオニンが系中から完全に除かれていないためだと考えられる。お

そらく無細胞翻訳システムの各タンパクやRNA成分の中にメチオニンやmethionyl-tRNA synthetaseが混入しているためだと予想される。19アミノ酸からなる環境をつくるには、もっと精製された無細胞翻訳システムが必要であろう。

本研究では大きな集団サイズ(10^8 以上)で長期継代した。RNAの変異頻度は高く、10個のRNAのうち1個には点変異が存在する。したがって集団中には 10^7 種類の点変異が常に存在することになる。RNAの長さは約2000塩基であるため、可能な1塩基変異の数は約6000種類、2塩基変異の数は約 4×10^7 種類である。したがって、長期継代すれば全ての種類の2塩基変異体は集団内に存在したはずである。このことから、少なくとも適応度空間上の2塩基変異距離の中にはメチオニンを除く19アミノ酸で元のRNA複製酵素と同程度の活性を持つ変異体は存在しないことを示している。本研究では、当初目指していたような19以下のアミノ酸からなるRNA複製酵素を進化させることはできなかったが、そういったRNA複製酵素が2塩基変異内には存在しないという重要な知見を得ることができた。この知見に基づくと、19アミノ酸で動くRNA複製酵素を得るには、もっと広い、あるいは別の空間上の探索が必要である。集団サイズをこれ以上上げることは難しいため、今後、前述のように完全にメチオニンを欠乏させることにより適応度空間を変えて進化実験をすることが有効だと考える。

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)

Nishiyama, K., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Yomo, T.

Development of a reporter peptide that catalytically produces a fluorescent signal through γ -complementation.

Protein Science, **In press** 2015

査読あり

DOI 10.1002/pro.2667

Ichihashi, N., Kobori, S., Yomo, T.

Simple identification of two causes of noise in an aptazyme system by monitoring cell-free transcription.

Methods in Enzymology, **550**, 93-107, 2015

査読あり

DOI 10.1016/bs.mie.2014.10.043

Uno, K., Sunami, T., Ichihashi, N., Kazuta, Y., Matsuura, T., Yomo, T.

The Evolutionary Enhancement of Genotype-Phenotype Linkages in the Presence of Multiple Copies of Genetic

Material.
Chembiochem, **15**, 1-9, 2014
査読あり
DOI 10.1002/cbic.201402299

Ichihashi, N., Yomo, T.
Positive roles of compartmentalization in
internal reactions.
Current Opinion in Chemical Biology, **22**,
12-17, 2014
査読あり
DOI 10.1016/j.cbpa.2014.06.011

Mizuuchi, R., Ichihashi, N., Usui, K.,
Kazuta, Y., Yomo, T.
Adaptive Evolution of an Artificial RNA
Genome to a Reduced Ribosome Environment.
ACS Synthetic biology, **4**, 292-298, 2014
査読あり
DOI 10.1021/sb5000884

Kazuta, Y., Matsuura, T., Ichihashi, N.,
Yomo, T.
Synthesis of milligram quantities of
proteins using a reconstituted in vitro
protein synthesis system.
Journal of Bioscience and Bioengineering,
118, 554-557, 2014
査読あり
DOI 10.1016/j.jbiosc.2014.04.019

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

〔学会発表〕(計 1 件)

Ichihashi, N.
The International Astrobiology Workshop

2013(as the Japan Astrobiology Network
Annual Meeting #6)
JAXA/ISAS, Sagamihara, Japan
Nov. 28-30, 2013

〔図書〕(計 0 件)

〔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