

人工細胞モデルとダーウィン進化

市橋 伯一*・四方 哲也

導入：進化する能力

生物の単位である細胞は、数マイクロメートルという微小な入れ物でありながら、その中は核酸と多彩な機能を持つタンパク質で組織化されている。その小ささと精巧さは、現代のテクノロジーをもってしても到達できない。生物がこのような驚異的な仕組みを持つに至ったのは、生物が進化する能力を獲得したためだと考えられている。おそらく生命は誕生した時は単純で原始的な機能しか持たなかったが、どこかの段階で進化する能力を獲得したことにより、少しずつ長い時間をかけて自らの遺伝情報を改良し続け、現在のような精巧で緻密な細胞を作り上げたと考えられている。

この生物のもつ進化する能力は、生物に特異的なものなのだろうか、それとも一定の条件を満たせば人工物に付与することも可能な能力なのだろうか？もし人工物に進化する能力を持たせることができれば、生物のように精巧で、しかも生物よりもずっと扱いやすいものができるのではないだろうか。私達のグループでは、このようなアイデアに基づいて生物の持つ進化する能力を試験管内で再構築することを試みている。そしてその過程で、生命の持つ進化能力を理解したいと考えている。さらにあわよくばその進化能力を新しいテクノロジーとして使うことを期待している。本稿では、進化能力をもった反応システムを生体分子から構築する試みの現状と展望を紹介する。

進化の仕組み

進化が起こるための理論的な条件については、これまでに何人かの研究者により提唱されてきた（たとえば伏見¹⁾、Maynard Smith²⁾ら）。それぞれ表現方法や条件の分け方に違いがあるものの、共通して以下の3条件をあげている。

1. 複製
2. 遺伝する性質の多様性
3. 選択

1の複製とはある個体が自らの複製体を作る能力である。このとき完全に同一物を複製するのではなく、2で述べた遺伝する性質の多様性を生じる必要がある。こ

で「遺伝する性質」という条件が付いている理由は、多様性が生じたとしてもその性質が遺伝しない性質（たとえば後天的に獲得した免疫など）ではだめだということである。3の選択とは、個体を取捨選択することである。複製された個体が全員生き残るのでは進化は起きない。何らかのやり方で取捨選択が起こる必要がある。また選択のなかでも、恣意的な基準で特定の性質を持つ個体を選択する場合は、人為選択と呼ばれる（たとえばより多くの実をつけた作物に品種改良する場合など）。逆に恣意的な基準はなく、ただより多くの自己の複製体を残したものが自然に数を増やす場合（たとえばランダムに間引いて個体数を一定にする場合など）が、自然選択と呼ばれる。この自然選択による進化が一般的にダーウィン進化と呼ばれている。

ここで重要なのは、自然界にはこれらの条件を満たすものは生物以外には存在しないものの、必ずしも生物である必要はないということである。もし、複製し、遺伝する性質の多様性が生じ、何らかの選択をうける物質を作り出すことができればその物質は進化するはずである。このことを初めて実験的に示したのは、シュピーゲルマンらのグループであった。

シュピーゲルマンの試験管内RNA進化

1967年、シュピーゲルマンらのグループは、1本鎖RNAファージに由来するRNA複製酵素を使い、ファージゲノムRNAを複製しながら長期継代する実験を行った³⁾。実験方法は単純である。ただゲノムRNAを精製したRNA複製酵素とNTPなどの基質存在下で複製させる。1hもすればゲノムRNAは数十倍に複製するので、その一部を新しい複製酵素と基質を含む反応液で一定濃度にまで希釈し、次の複製反応を行わせるだけである。この実験は単純であるが、前述の進化が起きるための3条件を満たしている。複製酵素によってRNAは複製する。RNAの持つ複製されやすさ（複製酵素に対する認識されやすさなど）の性質はRNA配列に基づいているため、自然に生じた変異による多様な複製されやすさも遺伝する。そして、常にRNAを一定濃度にする希釈をしているので、より複製されやすいRNAが増えるという自然選択が起こるはずである。

*著者紹介 大阪大学大学院情報科学研究科バイオ情報工学専攻（准教授） E-mail: ichihahshi@ist.osaka-u.ac.jp

特 集

実際にこの継代反応を数十回繰り返したところ、段階的に長さが短くなったRNAが出現し、もとの長いゲノムRNAに取って代わる現象が起きた。最終的にもともと4217塩基あったゲノムRNAに代わって222塩基長の短いRNAが集団を占めるようになった。この反応系ではRNAが短いほど、より少ない基質でしかもより速く複製することができる。この結果はつまり、もともとの長いゲノムRNAに代わって短く複製速度の高いRNAが進化したことを示している。

シュピーゲルマンの進化系の限界

シュピーゲルマンらの実験で、生物ではないRNAという化合物でも条件を満たせば進化する能力を持つことを示した。しかし、その進化能力は生物が持つ進化能力と同じなのだろうか？実は、大きく違う点がある。生物の持つ進化能力の特徴として“open end”，つまり再現のないものだということがある。事実、生物はどのような環境にも適応して進化しており、その形態も千差万別であり、進化には再現がないように見える。一方でシュピーゲルマンらのRNA進化では最終的に222塩基長の一つも遺伝子がコードしていない短いRNAに収束し、それ以上の発展は起きなかった。したがって、生物もシュピーゲルマンらのRNAもどちらも進化する能力は有しているものの、その進化によって達成できる可能性（進化可能性）には大きな差があるように思われる。この進化可能性の違いは、いったい何に基づいているのだろうか。一つの可能性として私達は「タンパク質を使えるかどうか」ではないかと考えた。生物は多くの種類のタンパク質をゲノム中にコードし、進化によって発明、改良しながら、さまざまな環境に適応している。一方でシュピーゲルマンのRNAは、RNA複製酵素というタンパク質を使っているものの、そのタンパク質は実験者により与えられているものであり、自らコードしているわけではないため、進化によって改良することもできない。さらに新しいタンパク質を獲得することもできない。これがシュピーゲルマンのRNAの進化可能性を制限している原因だと考えた。タンパク質の獲得は、生命の起源においても、原始生命がRNAワールドから脱却し新しい可能性を切り開いたターニングポイントだったと言われている⁴⁾。そこで私達のグループでは、シュピーゲルマンのRNAにタンパク質をコードさせ、そのタンパク質の翻訳と共役してRNA複製するシステムの開発を試みた。

翻訳共役型RNA複製

私達はまず、シュピーゲルマンらの実験で最終的に進

化してきた短いRNAの内部に、RNA複製酵素遺伝子を導入した。このRNA複製酵素を翻訳するために、大腸菌の翻訳タンパク質群を精製して再構成したPURE system⁵⁾を用いた。これらを組み合わせることにより、RNAからRNA複製酵素が翻訳され、その複製酵素により元のRNAが複製されるという翻訳共役型のRNA複製が達成できた(図1)。この複製を達成するためには、いろいろな困難（たとえば翻訳反応と複製反応が競合するなど⁶⁾）があったが、何とか複製するようになった⁷⁾。このRNA複製は変異率が高いため、複製時に一定頻度で突然変異が導入される。あとは、この翻訳共役型RNA複製反応をシュピーゲルマンらの実験と同じように継代すれば、RNAが進化するかと思われた。ところが実際に継代してみたところ、継代するにつれてRNA複製量は次第に低下していき、16回目の継代でまったく複製しなくなり絶滅してしまった(図2)。

なぜ翻訳共役型のRNAは進化をせず、絶滅してしまったのだろうか。原因は遺伝情報を持つ分子（RNA）と機能を持つ分子（複製酵素）が関連していなかったことにある。現状の反応系では、あるRNAからRNA複製酵素が翻訳されても、その翻訳された酵素が自身の遺伝子を持つRNAを複製する保障がない。確率的にはむしろ

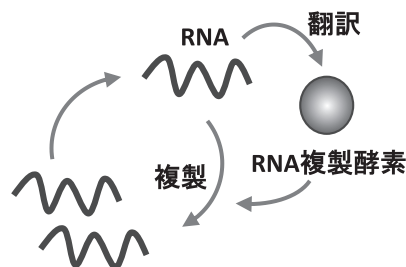


図1. 翻訳共役型RNA複製システム

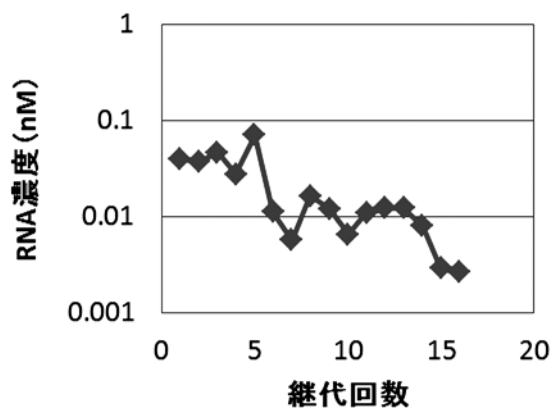


図2. 翻訳共役型RNA複製の継代

ろ他のRNA分子を複製する可能性の方が高いだろう。したがって、もし複製酵素活性の高い複製酵素の変異体が出現したとしても、その複製酵素は自身の変異を持つ遺伝子を持つRNAを複製することはないため、そのRNAは選択されないことになる。さらにもっと深刻な問題を生じるのは、淘汰がかからないことである。つまり、もし突然変異により複製酵素遺伝子が破壊されても（そのような突然変異がほとんどである）、その壊れた遺伝子を持つRNAは、別の正常な遺伝子持つRNAから翻訳された複製酵素に依存して、自身のコピーを残すことができてしまい、淘汰されることがない。したがって、継代を繰り返して変異が蓄積するにつれて正常な遺伝子がなくなっていき、最終的にはどのRNAも複製できなくなって絶滅したと考えられる。つまり、進化条件の3, 何らかの取捨選択が多様化した性質にかかることが満たされていない。この条件3を満たす方法は、複製酵素は自分の情報を持つRNAだけを複製するようにすることである。その方法の一つは反応系を細胞のような区画構造内封入し、同時に区画あたりのRNA分子数を少数に制限することである⁹⁾。

細胞様区画構造の導入

複製酵素が自分の情報を持つRNAだけを複製するようにするために、私達は反応系を細胞のような微小区画構造に導入することを試みた。このとき理想的にはRNAは一つの区画内に1分子が望ましい。そうすれば、そのRNAから翻訳された複製酵素は、確実に自身の由来するRNAだけを複製することができる(図3)。これを達成するには、微小区画構造はいくつかの条件を満たす必要がある。第一に複製酵素とRNAの結合定数が数nMであることを考えると、1分子のRNAでこの濃度を達成するために区画のサイズは数ミクロン（細菌と同定度）である必要がある。第二に内部で翻訳と複製反応を起こすことができる素材である必要がある。これらの条件を満たす区画として、私達は油中水滴（water-in-oil

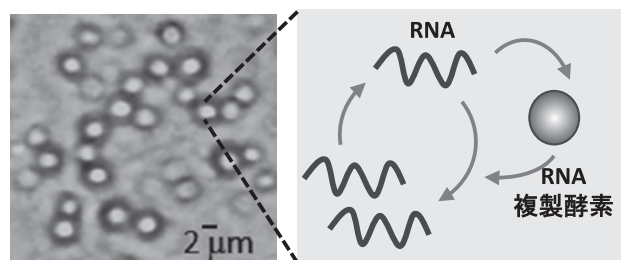


図3. 油中水滴内翻訳共役型RNA複製システム

エマルション)を用いた。界面活性剤を含む油層中で反応液を激しく攪拌すると、数ミクロンのサイズの油中水滴による区画構造を作ることができる。油層をPURE systemの低分子成分であらかじめ飽和させることで、内部で翻訳と複製反応をほとんど阻害なく起こすことができた⁹⁾。さらに便利なことに、反応後のエマルションにPURE systemのみを含む水滴を加えてさらに攪拌することにより、水滴どうしを融合・分裂させ、内部の反応溶液を希釈し、区画構造を維持したまま反応を継代することもできるようになった。

翻訳共役型RNA複製反応のダーウィン進化

私達は、この細胞様区画に封入した翻訳共役型RNA複製反応を長期継代した。その結果、8回目の継代までは、区画がなかった前述の場合と同じようにRNA濃度がどんどん低下していったものの、8回目継代以降逆に上昇し始め、その後はほぼ際限なく継代することができた(図4)。継代中の各段階のRNAの配列を解析してみたところ、シュピーゲルマンのRNAの実験とは異なりほぼ全長のサイズが維持されており、また継代回数に依存して変異数が上昇していることが分かった。さらに検出された変異のうちの多くは、他のRNAにも共通して観察されていたことから、変異が集団内に固定されていることが分かった。また、最終的に得られたRNAの複製能力を元のRNAと比較すると、同一時間で100倍以上の速さでRNAを複製できるように進化していることが明らかになった。この結果は、細胞状の区画構造に封入すること、すなわち人工細胞という形にすることにより、RNAが自身にコードしたタンパク質の翻訳を介してダーウィン進化することが可能となったことを示している¹⁰⁾。

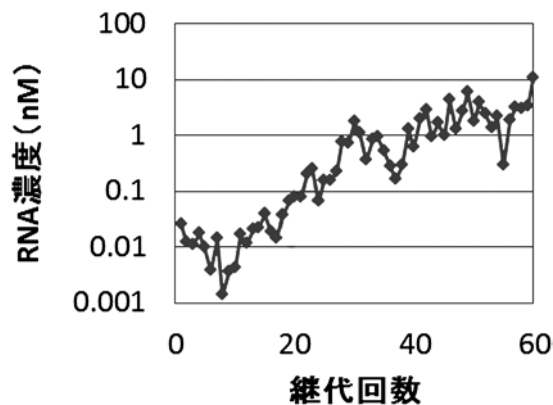


図4. 区画内翻訳共役型RNA複製の継代

まとめと展望

以上の研究により、外部から材料の供給を受けて成長分裂を繰り返しながら内部反応が自然選択によって自律的に進化するシステムができた。これはもはや人工細胞モデルと言ってよいであろう。それではこの人工細胞モデルは生物と同じように際限のない進化を見せるのだろうか？残念ながら現状ではそうではない。我々は、上記の区画内ダーウィン進化をさらに100回以上繰り返してみた。そうすると少しずつ点変異は蓄積していくものの、その蓄積速度は徐々に低下しており、やはり進化は収束していくように見えた。翻訳共役型のRNA複製システムは、シュピーゲルマンらのRNA複製システムにはないさまざまな進化可能性があるはずである。たとえば、遺伝子を重複させて新しい遺伝子を生み出したり、PURE system中に混入している大腸菌由来のmRNAから遺伝子を取り込んで、より自律的なシステムへと進化する可能性もあるはずである。あるいは、遺伝情報として分解されやすいRNAを使うことを止めてDNA複製に進化することも不可能ではないはずであるが、そのような進化は起きる気配はない。

翻訳共役型のRNA複製にまだまだ足りないものはなんだろうか？単純に継代数が足りないだけかもしれない。あるいは別の可能性として、遺伝情報分子としてRNAを使っていることに問題があるのかもしれない。すべての生物は遺伝情報分子としてDNAを使っている。RNA

を使っているものは一部のウイルスに限られる。それはRNAをゲノムとして用いることには、DNAに比べて何か大きな制限があるためかもしれない。可能性はさまざま考えられるが、今後の重要な課題はこれらの可能性を実験的に検証することである。そのためには、実際にさまざまな可能性を付与した人工システム、たとえばDNAをゲノムとして持つ人工システムを構築し、その進化を生物と比較することが必要である。私達の構築した微小区画に封入した翻訳共役型RNA複製システム（これを私達は人工細胞モデルと呼んでいる）はその出発点となると考えている。このシステムを生物に近づけていく過程で、生物のもつ際限のない進化能力を理解し、手に入れることができると期待している。

文 献

- 1) 伏見 譲: DNAと遺伝情報の物理, p. 52, 岩波書店 (2005).
- 2) John Maynard Smith: *The Problems of Biology*, Oxford University Press (1986).
- 3) Mills, D. R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 217 (1967).
- 4) Ruiz-Mirazo, K. *et al.*: *Biol. Philos.*, **23**, 67 (2008).
- 5) Shimizu, Y. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 751 (2001).
- 6) Ichihashi, N. *et al.*: *ChemBioChem*, **9**, 3023 (2008).
- 7) Kita, H. *et al.*: *ChemBioChem*, **9**, 2403 (2008).
- 8) Sunami, T. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **357**, 128 (2006).
- 9) Bansho, Y. *et al.*: *Chem. Biol.*, **19**, 478 (2012).
- 10) Ichihashi, N. *et al.*: *Nat. Commun.*, **4**, 2494 (2013).