

研究終了報告書

「原始生命の進化に学ぶゲノム拡張基盤の構築」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：水内 良

1. 研究のねらい

現在、生物の様々な機能をもつ人工細胞が創出されている。例えばゲノム複製、翻訳、代謝、進化、多様化、環境応答、細胞の成長と分裂、光合成等が再構成され、それぞれの細胞機能を達成するための最小要素などが明らかになってきた。しかし、人工細胞には未だ任意の遺伝子をコードした長鎖ゲノムが複製・機能しないという問題がある。この問題は特に RNA ゲノムで顕著であり、遺伝子の増加はゲノム拡張による複製効率の低下、翻訳資源の取り合い、また RNA 構造の変化による様々な効率低下を引き起こす。これを解決する一つの方法は、遺伝子間の配列を最適化して複製効率や発現バランスを調整することであるが、その一般的な設計原理は明らかでなく、また最適配列は遺伝子毎に異なると予想されることから、配列の設計は困難である。そこで本研究では、自身が専門的に携わってきた原始生命の進化過程から着想を得て、人工細胞内で異なる遺伝子をコードした複数の短鎖 RNA 断片から、自発的にそれらの遺伝子を集積した一本の長鎖 RNA ゲノムを進化させる基盤技術の開発を試みる。これにより、任意の遺伝子をコードして複製・機能する RNA ゲノムの構築やそれら遺伝子の進化的改良が可能になると期待される。

以上が達成できれば、同時に進化によって自発的に複雑化（ゲノム拡張）する人工細胞も世界に先駆けて実現できるため、今まで以上に生命らしい特徴をもった人工細胞の創出に繋がる。これまでの研究ではゲノムの縮小は広く観察されていたが、その自発的な拡張が実証されたことはない。そこで本研究ではこの側面も追求し、進化による遺伝子断片の統合の他に、多様な遺伝子断片が進化する過程の実証なども試みる。これにより、従来の限界を超えたゲノム進化を実現する。

2. 研究成果

(1) 概要

まず2種類の異なる遺伝子をコードした RNA 断片を人為的に結合することで、効率よく複製・機能する長鎖 RNA ゲノムを取得することに成功し、その実現性を示した（下記の研究テーマ A）。次に複数の RNA 断片を人工細胞内で進化させることで、自発的にそれらを集積した長鎖 RNA ゲノムを取得する技術を開発した（研究テーマ B）。これは本さがけ研究の大目標でもあり、RNA ゲノム拡張の基盤技術になり得る。また本成果は自発的に複雑化する人工細胞の創出、さらに「原始染色体の起源」という生命の起源における重要な過程の実証にも繋がった。これらに加え、真に自発的に複雑化する人工細胞の構築に向けて、1種類の RNA 断片から異なる情報を持つ複数の RNA 断片を進化させることにも成功した（研究テーマ C）。

また本さがけ研究を通じて実現した、当ゲノム合成研究領域内の研究者との連携成果として、(i) 再構成型無細胞翻訳系用いたタンパク質の進化工学手法の効率化（車兪澈博士との

連携)、(ii) 液-液相分離によって形成される液滴を用いた RNA ゲノム複製のための新規人工細胞の構築 (野地博行博士との連携、研究テーマ D)、(iii) RNA 複製酵素から DNA 複製酵素への進化可能性の実証 (市橋伯一博士との連携) などに成功し、それぞれ論文発表を行った。

(2) 詳細

研究テーマ A「異なる遺伝子をコードした RNA の人為的結合による長鎖 RNA ゲノムの取得」

原始生命では、独立の遺伝子をもつ短い RNA ゲノムが次々に連結していくことにより、自発的に遺伝子が増加したゲノムへ進化したと考えられている。さきがけ研究ではこの過程に倣い、人工細胞内で異なる遺伝子の断片を集積し、効率良く複製・機能する長鎖 RNA ゲノム (連結 RNA) を自発的に進化させることを試みる。しかし、これまでに複数の遺伝子をコードし、それらの翻訳を介して複製可能な人工 RNA ゲノムは開発されておらず、その実現性は明らかでなかった。そこで本テーマではまず、複数の遺伝子断片が進化可能な RNA 複製システムを基に、人為的に 2 種類の遺伝子をコードした長鎖 RNA ゲノムを構築することを試みた。

本研究で用いた RNA 複製システムはそれぞれ複製酵素 (Replicase、Q β phase 由来) または NDK (NTP 合成酵素、大腸菌由来) をコードした 2 種類の一本鎖 RNA (以下、RNA 1、RNA 2) と大腸菌由来の再構成型無細胞翻訳系から成り、人工細胞 (油中水滴) の中で、それら RNA は両方の遺伝子の翻訳を介して複製する (図 1A)。本研究では、(i) 無細胞翻訳系の改良、(ii) RNA 1 と RNA 2 の複製能力の進化工学的手法を用いた最適化、(iii) それら RNA の構造情報に基づくランダムな組み換えにより、両方の遺伝子の翻訳を介して複製可能な連結 RNA ゲノムを取得することに成功した (図 1B)。この RNA は、自身がコードする複数のタンパク質の翻訳を介して複製することができる世界で初めての人工 RNA ゲノムである。

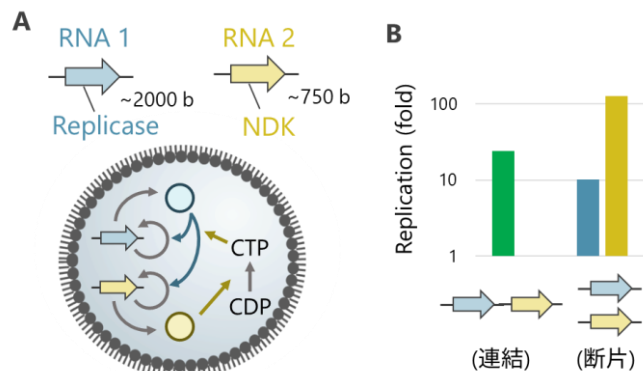


図 1 RNA 複製システムと連結 RNA の構築

(A) RNA 複製システムの概略。(B) 構築した連結 RNA と元の RNA 断片の翻訳を介した複製反応。

また本研究の過程で翻訳能力を維持したまま複製能力を向上させる長鎖 RNA ゲノムの二次構造について調査しており、ループ構造中の GC 含量が少ないほど複製能力が高くなることを見出した。このとき、RNA は相補鎖と結合して二本鎖 (鋳型として利用できない) を形成する確率が下がっており、非結合状態の GC の減少が鋳型鎖と新生鎖の相互作用を抑制した可能性が示唆された。本成果は筆頭著者として RNA 誌に発表した (Mizuuchi et al., 2020)。

以上の知見を用いれば RNA の構造情報などに基づいて合理的に複製や翻訳が可能な長鎖 RNA ゲノムを設計することができるかと期待されるが、ゲノムが長くなると RNA 構造の予測精度は低下するため、コードする遺伝子を増やしていくことは困難である。遺伝子を増やせば翻訳資源の取り合いの影響も顕著になり、最適な配列設計も困難になる。そこで、次に任意の遺伝子

をコードしたゲノムをより簡便に、進化を利用して構築する新たな手法の開発を試みた。

研究テーマ B「異なる遺伝子をコードした RNA の進化実験による長鎖 RNA ゲノムの取得」

上記の研究テーマ A の成果により、複数の短鎖 RNA ゲノムが連結した長鎖 RNA ゲノムが機能し得ることがわかったので、次に RNA 複製システム (図 1A) を用いて、二種類の RNA 断片の継代によって連結 RNA が進化することの実証を試みた (図 2A)。継代実験では、複製、希釈、栄養供給の実験サイクルを繰り返す。この過程で複製ミスによる組み換えや連結反応により連結 RNA が低頻度で出現し、複製を繰り返すと集団中で濃縮されると期待される。

連結 RNA の出現を促す RNA 断片の継代条件を探索するために、まず継代実験を模擬したシミュレーションを構築した。各 RNA の濃度はロジスティック方程式で記述し、RNA 断片だけからスタートして、連結 RNA が進化する条件を、各実験パラメータを振って網羅的に探索した。その結果、特に RNA 濃度が高濃度と低濃度を繰り返して振動する場合に連結 RNA が出現し、濃縮しやすいと見出した。これは、高濃度では連結 (連結・組み換え反応による) 確率が向上して連結 RNA が生成しやすい一方で、低濃度では二種類の RNA 断片 (二種類の必須遺伝子) が同一区画内に共存する確率が下がるのに対し、連結 RNA は必ず両方の遺伝子をもって自己複製できるからであった。

次に上記の振動現象を再現するような継代手法を開発し、実際に RNA 断片から自発的に連結 RNA が出現するかを確かめた (図 2B)。その結果、RNA 1 と 2 を 79 ラウンド継代することができ (約 240 世代の複製)、配列特異的な逆転写 PCR (RT-PCR) により連結 RNA も検出することができた。連結 RNA 候補は集団の約 1% を占めたと推定された。

次に上記で得られたラウンド 79 の連結 RNA と短い RNA をクローニングし、それらの配列を比較することで、連結 RNA の由来を調べた (次ページ図 3A)。もし連結 RNA が継代実験において一定期間維持されているのであれば、その変異パターンは RNA 断片と異なるはずである。実際、連結 RNA は RNA 1、RNA 2 と異なるパターンを示しており、継代実験において出現した後さらに複製を続けて独自の進化を経たと示唆された。次に得られた連結 RNA の代表的な配列について生化学解析を行ったところ、コードする二種類の遺伝子を確かに翻訳し (図 3B)、それによって自己複製可能であることも確かめた (図 3C)。

以上から、今後他の遺伝子への適用可能性は調査する必要があるものの、本さきがけ研究

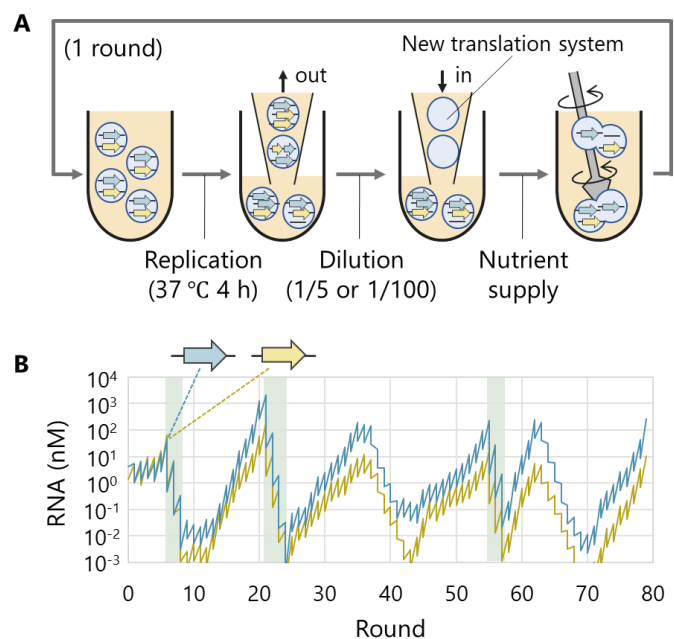


図 2 二種類の RNA 断片の継代実験

(A) 継代手法の概略。希釈については、基本的には 5 倍希釈だが、高濃度になると 100 倍希釈に変更した (B) 継代中の RNA 1 と RNA 2 の濃度。

の目的であった、人工細胞内で異なる遺伝子の断片を集積し、複製・機能する長鎖 RNA ゲノム (連結 RNA) を自発的に進化させる技術基盤の確立は達成できたと言える。出現した連結 RNA は独自の変異を蓄積して進化していたことから、進化的改良も同時に行える可能性が示唆された。さらに進化によって自発的に複雑化する人工細胞という、これまでにない生命の特徴をもつ人工細胞を開発するための一歩となった。それらに留まらず、本成果は「原始染色体の起源」としても知られる、もっともらしい原始生命の進化におけるゲノム拡張過程を初めて実証したものであり、生命の起源の理解も推し進めた。本成果は責任著者として論文投稿中である (Ueda, Mizuuchi* et al., bioRxiv, doi: 10.1101/2022.10.11.511852)。

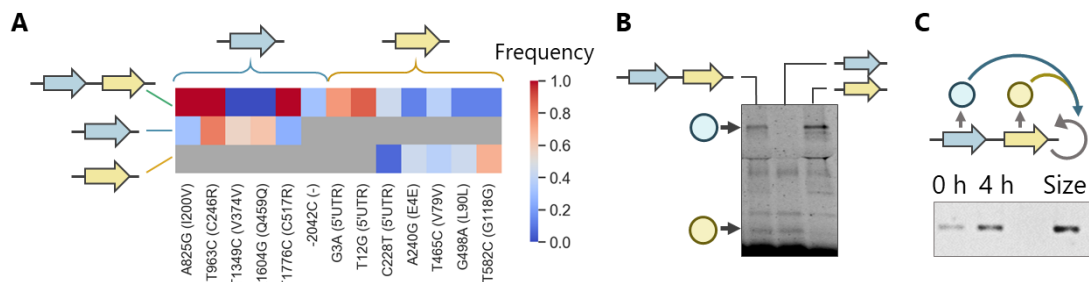


図3 得られた連結 RNA の解析

(A) 連結 RNA と RNA 断片の変異パターンを比較。(B) 連結 RNA の翻訳産物の電気泳動 (SDS-PAGE)。比較としてそれぞれの RNA 断片を翻訳した場合も行った。(C) 連結 RNA の翻訳を介した自己複製。全長の複製を電気泳動により確認した。

研究テーマ C「1 種類の RNA から異なる情報をもつ複数の RNA を進化させる」

真に自発的に複雑化する人工細胞を創出するためには、異なる情報をもつ複数の RNA 断片から連結 RNA を進化させるだけでなく、その前段階、すなわち 1 種類の RNA から複数の RNA 断片の進化も実証する必要がある。そこで最初の研究計画にはなかったが、複製酵素をコードした RNA 1 だけを 図 2B のように長期的に継代する実験も行った。240 ラウンドの実験を行った結果、RNA 集団は約 600 世代にわたり進化した。配列解析の結果、最初は 1 種類の RNA であった集団は、異なる突然変異セットを獲得した 6 種類の RNA 系列 (うち 3 種類は遺伝子領域の一部を欠損した寄生体 RNA) へと分化した (次ページ図 4A)。またそれぞれの RNA 系列は進化実験の前半では互いに排他的であり、集団中の頻度が大きく変動していたのに対し、後半では 5 種類の RNA 系列が安定的に共存する状態へと遷移したことを見出した。生化学解析の結果、これら 5 種類の RNA 系列は進化によって徐々に異なる RNA を複製する機能を獲得し、それぞれの RNA が互いに複製し合う複雑なネットワークを形成していることを突き止めた (図 4B)。この結果は、RNA の新種が次々に現れただけでなく、それらがもはや独立には複製しておらず、1 つの大きなシステムとして複製するように進化した可能性を示唆している。興味深いことに、それぞれの RNA は別の RNA の絶滅を防いでおり、寄生体 RNA も例外ではなかった。寄生体 RNA は複製の資源を横取りするだけの邪魔者ではなく、それによって他の RNA の複製を制御し、ネットワーク全体の安定化に寄与したと示唆された。

以上により、RNA 分子の自己複製システムが遺伝情報を拡張して徐々に複雑化していく様を初めて実験で捉えることに成功した。この結果は、原始生命にありえた進化の道筋の実験証拠

を提示したことに加え、自発的に複雑化していく人工細胞を開発するための一歩となった。本成果は筆頭・責任著者として *Nature Communications* 誌に発表し (Mizuuchi* et al., 2022、主な研究成果リスト 1)、*Current Biology* 誌の Dispatch、*Quanta Magazine*、日経サイエンスなど国内外 50 以上の雑誌・メディアで特集された。

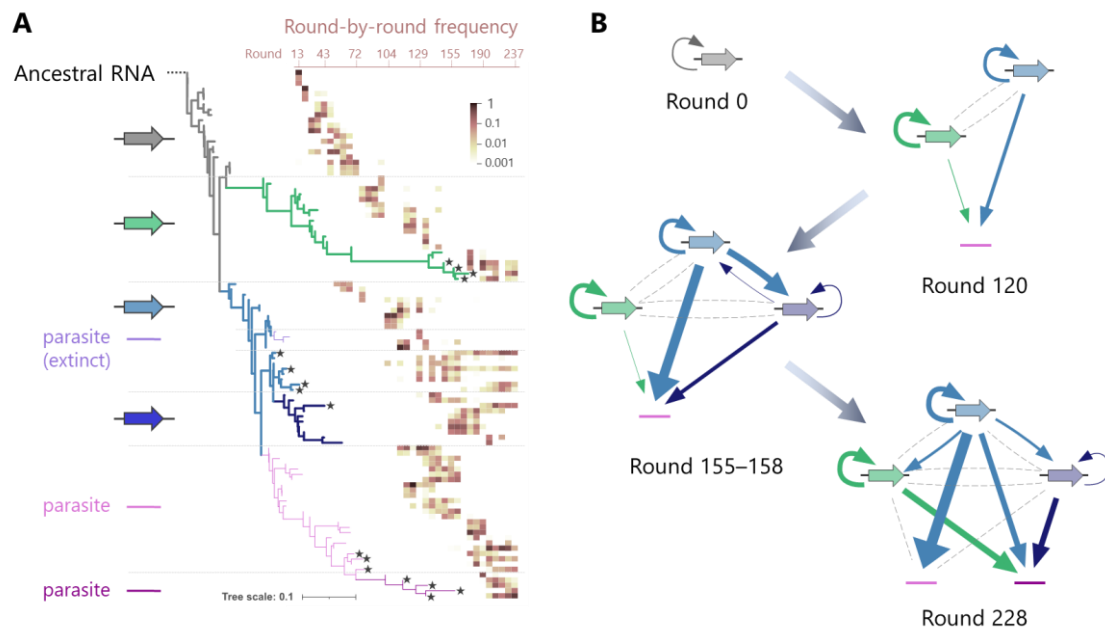


図 4 単一の RNA からスタートした進化実験

(A) 1 種類の祖先 RNA が辿った進化の軌跡を示す系統樹。進化実験サイクル約 30 回毎に RNA 集団の組成を解析し、特に頻度が高かった RNA について示した。共通の突然変異セットをもつ RNA を示す枝は同色で色付けされ、星印は進化実験の最後に生存していた RNA を示す。ヒートマップは進化実験中の各 RNA の頻度を示す。(B) 複製ネットワークの進化。矢印は複製能力を示す。

研究テーマ D「液-液相分離で形成される液滴内での翻訳を介した RNA の自己複製」

上記の研究では油中水滴を人工細胞として用いているが、これらは外環境が油相であるため、環境や他の細胞との相互作用が制限されている。そこで 2019 年に行われた領域会議での野地博行 CREST チームリーダーとの議論を発端とし、私が研究で用いている進化可能な RNA 複製系をセミオープンな人工細胞である液滴 (Dextran と Polyethylene glycol の液-液相分離で形成される膜の無い人工細胞) と組み合わせる可能性を模索した。様々な調査の結果、(a) 液滴に上記 RNA 1 と無細胞翻訳系を十分に封入できること、(b) 液滴の性質から無細胞翻訳系の使用量を 1/4 まで活性を落とさずに減らせること、(c) RNA 1 の自己複製反応が可能であること、(d) 膜が無いので外から基質 (CTP) を供給して持続的な RNA 複製が可能であること、(e) 膜が無くても RNA の液滴間拡散は抑制され、その結果寄生的な性質をもつ RNA の複製を抑えられること等を実証した。本成果は筆頭・責任著者として *Chemical Communications* 誌に発表した (Mizuuchi* & Ichihashi, 2020、主な研究成果リスト 3)。

3. 今後の展開

本研究で開発した長鎖 RNA を取得するための技術基盤を用いて、翻訳タンパク質など様々な遺伝子をコードした長鎖 RNA ゲノムの構築を試みる。長期的な展望としては、本人工細胞 (RNA 複製システム) が進化可能であることを利用し、導入した任意の遺伝子の人為進化を行いたい。例えばこれまで人為進化が困難であった非生理的な環境における酵素の進化的改良が可能であるため、創薬などを見据えた新規酵素開発が期待できる。より基礎的な研究の発展としては、例えば RNA ゲノムでコード可能な遺伝情報量の限界 (= DNA の必要性) といったこれまで研究することが不可能であった生物の根幹に関する問への挑戦も試みたい。また自発的に複雑化する人工細胞としては、継代実験を様々な環境で継続することで、全く新規の機能が自発的に生まれる可能性を探求する。本実験で人工物が生命に近づく過程を調査することで、生命が誕生するために必要な要素の理解などに繋げたい。

4. 自己評価

本研究の一番の目的としていた、人工細胞内で異なる遺伝子をコードした複数の RNA 断片を進化させることで自発的にそれらを集積した長鎖 RNA ゲノムを取得する技術を開発できたため、目標の大半を達成できたと考えている。一方で、これは概念実証であり、本来であれば最終的に同技術を用いた応用まで進めたかったが、様々な困難があり達成できなかった。研究上の困難はもちろんのこと、新型コロナウイルスの影響や、予期せぬ研究室のスペース不足により当初予定していた技術補佐員の雇用が叶わなかったこと等も一因である (そのため本研究は、所属研究室の主宰者である市橋伯一教授の協力のもと、基本的に研究代表者である水内と大学院生 1 名で行った)。しかし、その代わりに当初の計画を異なる角度から発展させ、一種類の RNA 断片から異なる情報をもつ複数の RNA 断片を進化させることに成功した。本成果は国内外 50 件以上の雑誌・メディアで特集されており、社会への波及効果は高いと考えられる。以上の一連の成果は長鎖 RNA ゲノム取得のための新たなツールになるだけでなく、自発的に複雑化する人工細胞という前例の無い技術開発へと繋がった。また領域内の他の研究者 (特に野地博行博士、車愈澈博士) との相互作用によっても研究を発展させることができ、例えば外環境と相互作用が可能な人工細胞 (液-液相分離で形成される液滴) における RNA ゲノム複製の再構成に成功し、人工細胞の新たな可能性を実証した。以上の成果の大半は水内が筆頭・責任著者として出版済である。このように、本さきがけ研究により価値のある多様な研究を展開できたと考えている。またこれらの成果・経験は本年 4 月より早稲田大学で専任講師として独立し、研究室を主宰することにも繋がった。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 11件 (うち第一著者5件、責任著者(*)4件。また他に投稿中論文1件。)

(3本の代表的論文とそれらの概要)

1. Ryo Mizuuchi*, Taro Furubayashi, Norikazu Ichihashi* (2022). Evolutionary transition from a single RNA replicator to a multiple replicator network. *Nature Communications*, 13, 1460.

RNA 複製システムを人工細胞内で進化させることで、1 種類の RNA が進化によって異なる情報をもつ 5 種類の RNA に分化し、それらが互いに複製し合うネットワーク構造を形成したことを見出した。一連の結果は原始生命の進化に関する理論仮説を裏付ける初めての実験証拠となり、また利他的な RNA や寄生的な RNA に関して従来の予測から外れた現象を観察し、仮説の修正にも繋がった。そして自発的に複雑化していく人工細胞という、これまでにない生命の特徴をもった人工物の開発に向けた一歩となった。

2. Ryo Mizuuchi*, Norikazu Ichihashi* (2021). Primitive compartmentalization for the sustainable replication of genetic molecules. *Life*, 11 (3), 191.

RNA などの情報分子の複製体が安定的に複製し、進化するために必要な区画構造とその性質についてまとめた総説論文。特に進化の過程で出現を避けられない寄生的な性質をもつ RNA の複製を抑制して、必要な情報をもつ RNA が持続的に複製するための条件を論じた。これらの情報は進化可能な人工細胞の構築にも有用であると考えられる。

3. Ryo Mizuuchi*, Norikazu Ichihashi (2020). Translation-coupled RNA replication and parasitic replicators in membrane-free compartments. *Chemical Communications*, 56, 13453–13456.

RNA 複製システムを Dextran と Polyethylene glycol の液-液相分離で形成される膜の無い人工細胞内で駆動させることに成功した。従来の研究では類似の液滴での無細胞翻訳反応は蛍光シグナルの検出に留まっていたが、本研究ではそれをゲノム複製という複雑な細胞機能に結び付けた。さらに膜が無い液滴でも異なる RNA を独立に区画化することが可能であり、寄生的な RNA の増殖を抑えるといった進化的な役割を持ち得ることを実証した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

さきかけ研究機関中に国内外 25 件の学会発表 (うち 11 件の招待講演)、2 件の受賞、2 件のプレスリリースを行った。また研究成果が国内外 50 件以上の雑誌・メディアで特集された。以下では代表的なものを 5 件記載する。

(代表的な招待講演)

1. “Evolutionary complexification of a replicase-encoding RNA replicator” The XIXth International Conference on the Origin of Life, online, October 2021.

(代表的な受賞)

2. 研究奨励賞、日本進化学会、2022 年 6 月

3. 最優秀ポスター発表賞、日本進化学会第 22 回大会、オンライン、2020 年 9 月

(代表的なプレスリリース)

4. 「原始生命を模した自己複製システムのダーウィン進化による複雑化を発見」2022 年 3 月

(代表的な雑誌・メディア掲載)

5. "In Test Tubes, RNA Molecules Evolve Into a Tiny Ecosystem" Quanta Magazine (Simons Foundation), May 2022