

# 博士論文

無細胞系における複製・転写・翻訳の共存条件および  
熱と界面による分子濃集を用いた RNA 複製の研究

瀬尾 海渡



# 目次

<b>1. 序論</b> .....	<b>4</b>
1.1 人工細胞の作成 .....	4
1.2 既存生命が持つ部品を使って再構成する .....	8
1.3 複製システムと寄生体問題 .....	13
1.4 熱と界面を用いた分子濃集 .....	16
1.5 本研究の目的 .....	19
<b>2 無細胞系における複製・転写・翻訳反応の共存条件</b> .....	<b>20</b>
2.1 本章の研究目的 .....	20
2.2 阻害効果を持つ成分の探索 .....	21
2.3 阻害物質の調査 .....	28
2.4 $Mg^{2+}$ 濃度による阻害効果の回復と共役系への応用 .....	41
2.5 考察 .....	48
2.6 手法 .....	53
<b>3 熱と界面による分子濃集を用いた RNA 複製</b> .....	<b>59</b>
3.1 本章の研究目的 .....	59
3.2 寄生体 RNA による阻害と RNA 濃集条件の検討 .....	60
3.3 分子濃集システム中での RNA 複製反応 .....	73
3.4 考察 .....	79
3.5 手法 .....	81
<b>4 まとめ</b> .....	<b>83</b>
4.1 無細胞系における DNA 複製, 転写, 翻訳の共存条件に関する研究についてのまとめ と展望 .....	83
4.2 熱と界面による分子濃集を用いた RNA 複製に関する研究についてのまとめと展望 .....	85

## 略語一覽

PURE : Protein synthesis Using Recombinant Elements

rNTP : Ribonucleotide

tRNA : transfer RNA

dNTP : Deoxyribonucleotide

Glu-K : Potassium glutamate

TTcDR : Transcription-Translation coupled DNA Replication

PCR : Polymerase Chain Reaction

## 1. 序論

無から生命は生じない。これは Pasteur の白鳥の首フラスコ実験で初めて示された(Bordenave 2003)。しかし、生命誕生の謎は未だ解かれていない。生命の起源研究は地球惑星科学、無機化学、有機化学など多岐に亘る。その中でも本研究では人工細胞の作成に向けた無細胞系を用いた細胞機能の再構成と、生命誕生以前の複製系における寄生体問題と区画構造による解決を対象とする。序論の 1.1 と 1.2 節では前者の周辺研究について、1.3 と 1.4 節では後者の周辺研究について取り上げ、1.5 節で本研究全体の目的についてまとめる。またこの二つの内容は本論文の 2 章と 3 章にそれぞれ対応する。

### 1.1 人工細胞の作成

生命システムはその誕生から現在に至るまで連綿と子孫を残しているが、現象と成り立ちについてはまだわかっていないことが多い。生命を現象の原理を理解するため、生物が必要とする最小構成要素とその構成要素を達成するに至った条件が調べられている。人間の手で細胞を作ることにより、生命現象を理解しようという試みである。物理学者 Richard P. Feynman が残した”What I cannot create, I cannot understand“という言葉に通ずるこの試みは、大きく分けて二つの手法によって進められている(Luisi 2002; Murtas 2009; Jewett and Forster 2010)。一つ目は、既存の生命から余分な要素を取り除いていき、生命が生存できる最小の構成要素を見つけることだ。この場合の要素とは、地球上の生命全てが核酸を用いることで情報を保持している遺伝子を指す。そして二つ目は、既存の生命が細胞内で使用している部品を取り出し、試験管内で再び組み合わせることによって生命現象を再構成しようという試みである。本節では前者について、次節では後者の試みについて、これまでの研究史を振り返る。

#### 1.1.1 既存生命から不要遺伝子を取り除く

肉眼で見るのできない微生物について研究を進めるうちに、Morowitz らは最も単純な生命について興味を持った(Morowitz 1984)。多数の複雑なシステムを前にした時、その中で最も単純なシステムを調べることで全体の理解を深めよう、というのは理に適った考え方であろう。サーベイの結果、彼らは自立し

て成長及び増殖することが可能な微生物のうち、細胞とゲノムの両方が小さいマイコプラズマを最も単純な生命システムとして挙げた。

このマイコプラズマを対象に行われたのが Venter らによる、最小の必須遺伝子セットしか持たない生物の開発である。当時は DNA の塩基配列を決定できるサンガー法の開発されたことにより、様々な生物種のゲノムを読むプロジェクトが活発に進められていた。その中で、対象のゲノムを様々な長さに調製した DNA 断片に配列を両末端から読み、その情報をコンピューターの計算能力を利用して一本のゲノムに繋げ直すペアエンドショットガンシーケンスを用いることで、Venter らは *Mycoplasma genitalium* (Fraser et al. 1995) の全ゲノムを読むことに成功した。これによってゲノム比較による複数種間で共通に保存されている遺伝子セットの特定が可能になり、同時期にゲノムが読まれた *Haemophilus influenza* との比較や (Mushegian and Koonin 1996)、最も近縁な種であり、ゲノムサイズの大きい *Mycoplasma pneumoniae* (C. A. Hutchison et al. 1999) との比較、共生細菌なども含めた複数種との比較などが行われ (Gil Rosario et al. 2004)、それぞれの研究結果として 200 以上の遺伝子が必須遺伝子として提案されていた。また、より直接的な研究として *M. genitalium* の全ゲノムを対象としたトランスポゾンによる変異導入と変異株の解析が行われた結果、全 482 遺伝子のうち 382 遺伝子が必須遺伝子セットであることが示された (C. A. Hutchison et al. 1999; Glass et al. 2006)。

次に彼らが目指したのは、人工的に合成した最小遺伝子セットからなるゲノム DNA から情報を読み取って生きることのできる人工細胞の創生である。そのために、全ゲノム合成手法 (Gibson et al. 2008) と近縁種細菌へゲノム移植手法 (Lartigue et al. 2007) という必要技術の開発、さらに成長速度の遅さから対象を *M. genitalium* から *Mycoplasma mycoides* (ゲノム移植元) と *Mycoplasma capricolum* (ゲノム移植先) の 2 種への変更した。上記の技術を組み合わせることで、*M. mycoides* の全ゲノムを元とした人工合成ゲノム (1.08 Mbps) を *M. capricolum* へ移植し、合成ゲノムで生存する細胞 JCVI-syn1.0 の開発に成功した (Gibson et al. 2010)。ここからトランスポゾンによる変異導入とデザイン-ビルドサイクルによる致死遺伝子や成長因子の探索を通してゲノムサイズ 531 kbps, 473 遺伝子を持つ JCVI-syn3.0 が作り出された (Clyde A. Hutchison 3rd et al. 2016; Suzuki et al. 2015)。この細胞は自立して成長する生物の中で最も小さなゲノムを持つことで知られている。一方で JCVI-syn3.0 中の 149 遺伝子

は現在においても機能がわかっていない。これはまだ発見されていないものの生命の生存にとって必要不可欠な機能がまだ存在することを示唆している。

### 1.1.2 マイコプラズマ以外のゲノム縮小について

自然界にはマイコプラズマよりもゲノムサイズが小さい微生物が発見されている。例えば *Carsonella rudii* は 160 kbp, *Sulcia muelleri* は 190 kbp, そして *Nasuia deltocephalinicola* は 112 kbp とマイコプラズマと比べると数倍短いゲノムを持つ(Nakabachi et al. 2006; Bennett and Moran 2013)。しかし、前の 1 種は *Pachyphylla venusta*, 後ろ 2 種は *Macrosteles quadrilineatus* という昆虫の寄生細菌である。これらは共生先の宿主に栄養の取り込みや生産などを完全に任せている部分があることから、自立して生存することはできない。他にもゲノムサイズの小さい細菌や古細菌が自然界で発見されているものの、自立して生きることができない共生菌や寄生菌であることが知られており、現在においても自立して生きる能力を持つ生物の中でゲノムサイズが最も小さい微生物はマイコプラズマである。

マイコプラズマ以外にも現存生命のゲノムサイズを小さくすることで最小構成遺伝子を調べる試みは行われている。モデル生物として広く知られている大腸菌や枯草菌を含めた 14 種類の細菌がこれまで対象となっている(LeBlanc and Charles 2022)。大腸菌と枯草菌については全ゲノムに含まれる遺伝子を一つずつ欠損させてその影響を調べるという地道だが重要な研究が行われており(Baba et al. 2006; Kobayashi et al. 2003)、現在までに必須遺伝子がそれぞれ 295 個と 253 個あるとされている。その必須遺伝子のうち大腸菌については 13 箇所の ORF、枯草菌については 1 つの遺伝子が関連する機能が不明な機能未知タンパク質とされている(Juhas et al. 2014)。また大腸菌と枯草菌の必須遺伝子を比較すると、その相同遺伝子は 168 個にとどまることがわかっている(Baba et al. 2020)。また枯草菌と同じ門に分類されるという点で、大腸菌よりも枯草菌に近い種であることが知られているレンサ球菌の必須遺伝子も含めて比較しても、相同遺伝子 135 個にとどまっている(Baba et al. 2020)。さらに興味深いのは大腸菌で必須遺伝子である遺伝子の相同遺伝子は枯草菌やレンサ球菌において必ずしも必須遺伝子であるとは限らないという点である。このようにそれぞれの種における最小構成遺伝子は絞り込まれてきたものの、機能未知遺伝子が残っていることや大腸菌と枯草菌のように生物種によってかなり異なること

から，生物を機能させるために必要な最小構成遺伝子のセットはまだ明らかになっていない。

## 1.2 既存生命が持つ部品を使って再構成する

生命が持つ部品による再構成について簡単な例を挙げるとすれば、DNA の情報を読み取りタンパク質を合成する転写と翻訳反応がある。後述する試験管内で転写と翻訳反応を行うシステムでは、T7 バクテリオファージ由来の RNA 合成酵素という一つのタンパク質で転写反応が進むのに対し、翻訳反応は 50 個以上のタンパク質及び 3 つの核酸の複合体であるリボソームや 20 種類のアミノアシル化酵素、21 種類の tRNA というように複数のタンパク質や核酸が共役することで生化学反応が再現される場合もある(Y. Shimizu et al. 2001)。生化学反応を組み合わせることで細胞内の反応を模擬することを目指した時に、その手法として取られたのが、化学反応システムを区画構造に内包するという試みである (図 1.1) (Szostak, Bartel, and Luisi 2001)。

生命の定義は定まっていないものの、重要な要素の一つに自己と外界を区別する区画構造がある。生物では細胞膜などによって構成される区画を模倣するために使われたのがリボソームである。リボソームは細胞膜の成分であるリン脂質のカプセルで、周囲の脂肪酸を取り込むことでまるで生命のように成長し、物理的な刺激を与えれば分裂するような挙動も見せる(Hanczyc, Fujikawa, and Szostak 2003)。当初は DNA をベシクルに封入することで DNase から守るだけの単純な構造だったが (Jay and Gilbert 1987)、中に封入するシステムをより複雑したいという考えの元、PCR による DNA 合成や RNA 合成反応が行われた(Chakrabarti et al. 1994; Oberholzer, Albrizio, and Luisi 1995)。ここで生物特有の能力としてタンパク質の生産がある。このタンパク質合成を試験管内で行えるようにしたのが Oberholzer らによる、抽出物からなる無細胞翻訳系の封入だった(Oberholzer, Nierhaus, and Luisi 1999)。しかしベシクル内部への栄養供給が行われなかったため、ペプチド合成量が少ないという問題があった。それを受けて Yu や野村らは、より大きいベシクルを用いることで翻訳系に供給される栄養量を増やし、GFP を合成することに成功した(Yu et al. 2001; Nomura et al. 2003)。さらに Noireaux らはベシクル内部に大腸菌由来の抽出物を封入し、膜に穴を開けるタンパク質として知られる  $\alpha$ -ヘモリシンをさらに発現させることで、ベシクル外部から栄養を継続的に供給させることに成功した(Noireaux and Libchaber 2004)。その後、光合成系や分裂系、膜タンパク質合成系やタンパク質修飾系が再構成されてきており、様々な細胞の要素が揃ってきている (Kuruma et al. 2009; Scott et al. 2016; Furusato et al. 2018; Berhanu, Ueda,

and Kuruma 2019; Gaut and Adamala 2021; Eto et al. 2022; Takada et al. 2022; Matsumoto et al. 2023). 人工細胞の開発はバイオテクノロジーや産業利用という点でも大きな意味を持つが(Villarreal and Tan 2017; Powers and Jang 2023), 生命らしい人工細胞を作る上で重要となるのが地球生命のセントラルドグマとされるタンパク質の合成反応と DNA 自己複製系の再構成である.

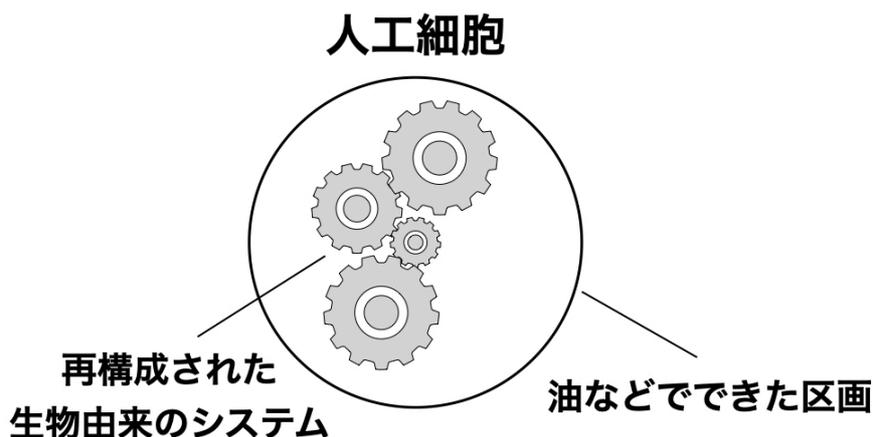


図 1.1 人工細胞の概要

油などで形成された区画構造の中に、再構成された生物由来のシステムが歯車で示されている。

### 1.2.1 精製産物からなる無細胞転写翻訳系 PURE システムの開発と応用

無細胞翻訳系は元々1960年代に Nirenberg らがコドン表解読実験のために開発したものが始まりとされている(Matthaei and Nirenberg 1961; Zubay 1973). 目的のタンパク質がコードされた DNA/RNA を混ぜるだけでタンパク質合成ができる手軽さから、大腸菌だけでなく小麦胚芽(Roberts and Paterson 1973; Takai and Endo 2010)やウサギの網状赤血球由来(Oliver and Boyd 1985)の無細胞翻訳系も開発されてきた。無細胞翻訳系はもちろん生きていないので流出した際のリスクが低いこと(Perez, Stark, and Jewett 2016), 生体に悪い影響を及ぼすような毒性物質も合成可能なこと(Karig 2017), 凍結乾燥法による長期間の保存が可能であることなど(Smith et al. 2014), 多くのメリットがある。一方、無細胞翻訳系はいくつかの問題も抱えていた。一つ目がペプチド結合効率に関係しない急速なエネルギー消費, そして二つ目が無細胞系に含まれるプロテアーゼやヌクレアーゼによる翻訳産物や鋳型 DNA の分解である。一つ目の問

題はフローシステムを用いることによるエネルギー分子の持続的な供給によって解決された(Spirin et al. 1988).

細胞抽出物による無細胞翻訳系によって、生きた細胞を直接扱うことなく翻訳反応を再現することに成功した。しかし、抽出物中には無数の成分が含まれており、反応系の全貌を把握することは叶わない。それを可能としたのが、精製タンパク質によって再構成された翻訳システムの開発である。

最初の試みとして Weissbach らによる研究が知られている(Kung et al. 1977)。彼らはすでにほとんどの翻訳因子を特定し、精製に成功していたものの十分なタンパク質の翻訳量は得られなかった。次に行われたのは、すでにアミノアシル化された tRNA と精製翻訳因子を用いた再構成システムだ(Ganoza, Cunningham, and Green 1995)。しかし、このシステムは tRNA の再アミノアシル化が行われないことからタンパク質の生産性が低かった。そこで Shimizu らは組み換えタンパク質を His-tag 精製して使用し、翻訳量を 1mL あたり数百  $\mu\text{g}$  のオーダーまで上げることに成功した (Y. Shimizu et al. 2001; Yoshihiro Shimizu, Kanamori, and Ueda 2005)。

PURE システムは従来の抽出物に由来する無細胞系とは異なり、中に含まれている成分が全て既知である。その特性を活かした様々な研究が行われている。一つは PURE システムによるタンパク質合成量を増やす試みだ(Kazuta et al. 2014; Li et al. 2014)。方法としてはタンパク質・非タンパク質成分濃度の調整や、シャペロンなどの新規成分の追加がまずあげられる。成分の組成と濃度が既知なため、一成分の濃度だけを上げるような細かい調整も容易である。もう一つは透析膜やフローシステムを用いることで消費される基質を供給する方法が開発されている(Lavickova, Grasmann, and Maerkl 2022; Kazuta et al. 2014; Jackson et al. 2014)。翻訳系はエネルギー分子を利用する他、RNA やタンパク質合成には基質が必要なため、絶えず供給することによって溶液中の枯渇状態を避け、反応を持続させることができる。また PURE システムは便利ではあるものの大腸菌抽出物と比較すると高価である。研究室で一から自作するには数十もの組み換えタンパク質精製が必要であり、非常に手間がかかる点から、精製プロセスを一度に短縮することで、より安価で製造が楽な PURE システムも提案されている(Lavickova and Maerkl 2019)。また現在ではゲノム縮小によって作りだした人工細胞である JCVI-syn3A から作成した無細胞系(Sakai et al. 2023)や、ゲノム縮小によって遺伝子が 30%以上も減った大腸菌から作成した無

細胞系(Wang and Lu 2023), 真菌, 昆虫, 原生生物由来(Schramm et al. 2022; Stech et al. 2014; Kovtun et al. 2011)など無細胞系という意味では様々な選択肢がある. PURE システムの応用例として非天然アミノ酸の取り込みや, アミノ酸以外の物質の取り込みなども PURE システムを用いて行われており, 薬の開発や産業的な応用に用いられている(Wu et al. 2020; Z. Cui, Johnston, and Alexandrov 2020; Brookwell, Oza, and Caschera 2021; Y. Cui et al. 2022; Lee et al. 2022; Zawada et al. 2022).

### 1.2.2 PURE システムと DNA 複製の共役系

自らの遺伝情報を持つ子孫を増やすことで種の存続を図る生命にとって, 自己の複製は重要な機能である. PURE システムによる転写と翻訳を使用すれば, DNA から DNA 複製酵素を発現し, 鋳型の DNA を複製させることで自己複製を実現することができる. なお, もちろん RNA でも転写をせずに同様のシステムが作れるものの, 将来的にシステムを生物に近づけるために複雑にするために DNA 複製酵素以外の遺伝子も組み込みたいと考えた時に大きな RNA ゲノムは不安定となるため, DNA が採用されている.

PURE システムと DNA 複製反応を組み合わせた先行研究をあげると, Fujiwara らが大腸菌のゲノム複製システムを PURE システムの中で発現し再構成している(Fujiwara and Nomura 2013). Han らは再構成された大腸菌のゲノム複製システムと PURE システムが共存する条件について調べている(Han et al. 2022). また van Nies らと Sakatani らは独立して phi29 DNA 複製酵素による DNA 複製システムと PURE システムを組み合わせている(van Nies et al. 2018; Sakatani et al. 2015). PURE システムと DNA 複製の共存条件を調べる上で見つかったこととして, rNTP と tRNA が多いと DNA 複製が阻害されてしまうという問題があった. これまでの研究では二つの成分濃度を下げることによって PURE システムと DNA 複製の共存を達成している. 一方で rNTP と tRNA は転写翻訳に必要不可欠な成分であり, 濃度を下げるとは転写と翻訳効率の低下につながる. DNA 複製量のみで考えた際には継代実験までできる DNA 複製量があればそれで十分として進められてきた(van Nies et al. 2018; Okauchi and Ichihashi 2021). しかし自己を完全に複製できる人工細胞を作るという最終的な目標を考えた際に, PURE システムを構成するタンパク質と RNA だけでも 30 種以上のタンパク質, 20 種以上の RNA を生産する必要があるため, 転

写翻訳の反応量低下は解決する必要がある問題である。そこで本研究の第 2 章では転写、翻訳、DNA 複製の三つの反応をより高い反応量を保った状態で共存できる条件について、非タンパク質成分に着目して調べた。

### 1.3 複製システムと寄生体問題

本節と次節では生命が誕生する以前の化学システムにおいて提示される問題とその解決策について説明する。自らの遺伝情報を持つ子孫を増やすことで種の存続を図る生命にとって、自己の複製は重要な機能である。この情報の複製という点について言えば、生命誕生以前の化学システムでも起こっていたのではないかと考えられている。RNA が情報の保存だけでなく、触媒としての機能を持てることがリボザイムの発見によりわかった(Guerrier-Takada et al. 1983; Kruger et al. 1982)。テトラヒメナから発見されたリボザイムは RNA の切断や挿入などといった自己スプライシング能力を保持していることがわかっており、これにより RNA が持つ可能性が一気に広がった。リボザイムの発見を踏まえて提案されたのが、情報分子である RNA が同時に自己複製を行う機能を持ち、複製を繰り返すことで進化することで生命誕生へ向かったと考える、RNA ワールド仮説である(Gilbert 1986)。

自己複製機能を持つリボザイムが複製する時、ある確率で間違いを犯す。この間違いは RNA 集団が様々な配列を試し、よりよい機能を持つ RNA 分子が集団を占めるようになることで進化するためにも必要であるものの、エラーが蓄積することによって RNA が持つ情報を解読不能にする可能性もある。これはエラーカタストロフィー問題と呼ばれている。Eigen らによる推定では、エラーの蓄積が起きることなく情報を複製できる配列長の限界は 100 塩基ほどであり、問題を解決するためには 100 塩基以上の配列にコードされる複製と修正を行うシステムが必要になる。そこで Eigen によって提案されたのがハイパーサイクル仮説である(Eigen 1971; Eigen and Schuster 1977)。

ハイパーサイクルのモデルでは、複数の自己複製体がお互いの触媒となる形で存在している。これにより、それぞれの自己複製体が短い配列長を維持しながら、全体としては多くの情報を保持することが可能となった。このネットワーク構造によって進化が進み、生命の誕生に寄与したのではないかとするのがハイパーサイクル仮説である。一方この仮説にもネットワーク中に自己を複製する能力を持たず、他の自己複製体によって複製される寄生体が発生すると、自己複製体の複製リソースが寄生体によって使用されてしまうため、ネットワークが崩壊してしまうという弱点がある。

寄生体問題は実験的にも確認されている。Q $\beta$  バクテリオファージから自らの

ゲノムのみを複製する複製酵素を発見した Spiegelman は (Pace and Spiegelman 1966), これを用いて継代実験を行った (Mills, Peterson, and Spiegelman 1967). まず精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素と鋳型 RNA を溶液中に混ぜ, 一定の温度と時間で複製反応を行う. 次のラウンドでは, 鋳型 RNA の代わりに初回の反応後溶液を少し取って新しい反応溶液に混ぜ, 反応させる. これを繰り返すことを継代実験と呼ぶ. 継代を続けると, 元の鋳型 RNA よりも短い RNA 配列 (寄生体) が登場し, RNA の集団がこれによって占められてしまうことがわかった. また他の研究者によっても同様に短い配列による占有が確認された (Sumper and Luce 1975). この短い配列からなる寄生体は Spiegelman's monster として知られるようになった (Furubayashi and Ichihashi 2022).

この寄生体問題に対する解決策が区画構造の利用である. 区画構造中に自己複製体と, 自己複製体によってのみ複製され, かつ自己複製体よりも複製されやすい寄生体があると仮定する. 複製反応が一定時間進んだのち, 区画構造内の自己複製体と寄生体は, 多数の新たな区画構造の中に分配される. 区画構造がない条件では, 寄生体の複製反応が複製リソースを勝ち取るため場を寄生体が占有する. 区画構造の中でも寄生体が多く配分された区画では同様の現象が起こるものの, 中には自己複製体が生き残れるバランスで寄生体が配分された区画がある. 自己複製体は寄生体に邪魔されずに自己を複製し, それが次の区画構造への配分へつながることで, 自己複製体が環境中で生き残ることができる. 以上の内容は, 区画構造があれば寄生体が発生しても自己複製体が生き残れることを理論的に示した Stochastic Corrector モデルとして提案されている (Szathmáry and Demeter 1987; Grey, Hutson, and Szathmáry 1995).

さらに区画構造による寄生体増殖の抑圧を実験的に行なったのが市橋らによる研究である (Ichihashi et al. 2013). 彼らは複製体として Q $\beta$  複製酵素と PURE システムを組み合わせた RNA 自己複製系を, 区画構造には油中水滴を用いて Spiegelman と同様に継代実験を行なった. その結果, Spiegelman's monster と同様の寄生体が発生した上で, さらに区画構造があると寄生体存在下でも自己複製体 (Q $\beta$  複製酵素をコードした RNA) の複製が十分に起こり, 継代が続けられることを示した. 継代実験は現在でも続けられており, 自己複製体と寄生体がそれぞれ進化を果たしネットワーク構造を構築したことや, その理論的な側面, 自動継代を用いた条件についても研究が行われている (Furubayashi et al. 2020; Mizuuchi, Furubayashi, and Ichihashi 2022; Kamiura, Mizuuchi, and

Ichihashi 2022; Yoshiyama et al. 2016).

## 1.4 熱と界面を用いた分子濃集

### 1.4.1 分子濃集のメカニズム

自己複製システムが持続するためには寄生体を抑える区画構造が重要だというのは既に述べた通りである。しかし、これまで細胞を模擬するために使用されている油中水滴、リポソーム、LLPSなどは少なくとも生物に依存しない環境での生成は、脂質分子の生成や油膜が金属イオンの存在下では不安定であることなどの問題点がある。他にも鉱物表面による濃集なども提案されているが、あまり研究が進んでいないのが現状である(Mizuuchi and Ichihashi 2021; Jia 2023; Toparlak et al. 2023)。ここで原始地球でも起きうるメカニズムとして着目したのが熱と気液界面の物理的作用を用いた分子濃集機構による原始細胞である。まずは分子濃集が起きるメカニズムについて紹介する。本研究で取り上げるのは温度勾配によるメカニズムと、気液界面における分子濃集メカニズムである。(図 1.2)。

非平衡状態を利用して分子は濃集することができる。温度勾配による分子の濃集は熱拡散によるものである。これは微粒子が温度勾配に沿って(多くの場合は暖かい方から冷たい方へ)移動する現象であり、発見者に由来して Ludwig-Soret 効果とも呼ばれている(Rahman and Saghir 2014)。熱拡散によって溶液中のヌクレオチドや DNA が濃集することが発見されている(Braun and Libchaber 2002; Baaske et al. 2007)。また、この熱拡散効果と熱による溶液の対流を利用して溶液中の DNA が冷たい領域と熱い領域を交互に移動する状態を作ることによって、PCR 反応を行う系も開発されている(Mast and Braun 2010)。

気液界面による分子の濃集はコーヒーリング効果によるものである(Deegan et al. 1997)。固体表面に水滴が隣接している時、水の蒸発と共に溶液中の成分は毛細管現象によって辺縁部へと運ばれる。そして水分は蒸発するため、成分が水滴の辺縁部に蓄積することで分子の濃集が起こるという効果である。こぼれたコーヒーが蒸発するにつれて同様の現象が起こり、リング状の跡を形成することからこの名前が付けられている。

熱と気液界面による分子濃集メカニズムは自然界、特に原始地球で起き得た効果であると考えられている(Baaske et al. 2007; Dirscherl et al. 2023; Ianeselli et al. 2022; Salditt et al. 2023; Tekin et al. 2022)。熱はマグマなどの熱源から供給され、海や池などの冷たい水が温度勾配を提供してくれる(Arndt

and Nisbet 2012; Moore and Webb 2013). さらに火山岩のような岩石には微細な穴が空いており，そこに水を含むことで温度勾配による対流と熱拡散が起きうる無数の空間を提供してくれる．空気に関してはマグマ由来の脱ガス反応であったり，液体に溶存する気体や熱水によって温められた液体から生じた気体が泡となることで，気液界面が生じると考えられている(Morasch et al. 2019).

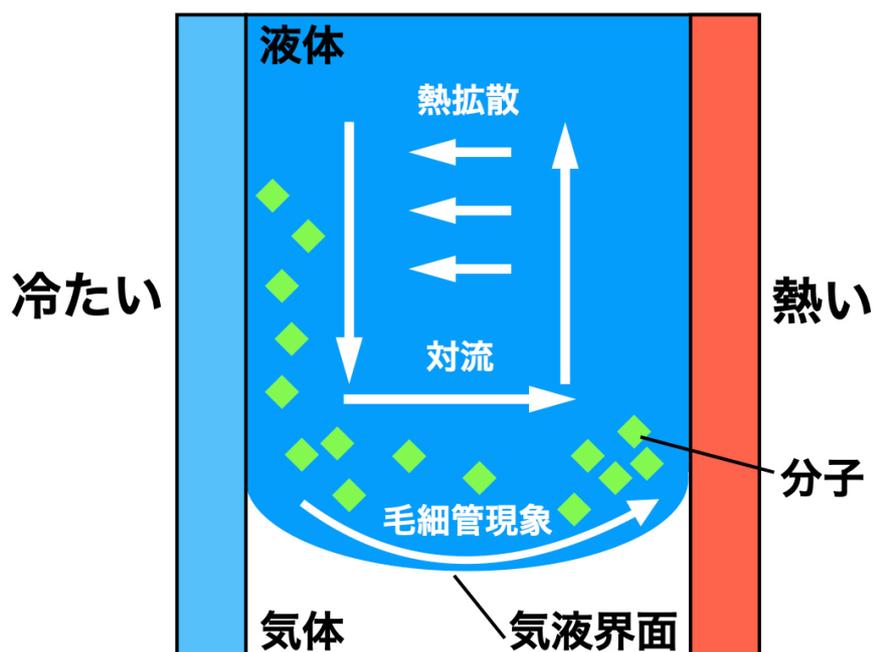


図 1.2 分子濃集メカニズムの概要

熱と気液界面による分子濃集のメカニズムを示す．緑色の正方形は溶液中に含まれている分子を，白い矢印は熱拡散や対流，界面の毛細管現象によって分子が移動する方向を示す．

#### 1.4.2 分子濃集による区画構造の代替と RNA 複製システム

生物が関与しない環境でも熱と気液界面による分子濃集は起こりうると考えられていることから，前生物的な RNA 自己複製システムと組み合わせることができる．RNA 自己複製システムにおいて，自己複製体である宿主 RNA と比較すると寄生体の配列長は短い．このことから水溶液中で短い RNA はより拡散され，同様の分子濃集効果を受ける宿主 RNA がより濃集することが実験的にも示されている(Ianeselli et al. 2022)．宿主 RNA が濃集したことによって RNA 自己複製システムは寄生体 RNA に邪魔されずに宿主 RNA の複製を行うことが可

能になる。このようなメカニズムによって寄生体 RNA 分子濃集機構が区画構造の代わりに原始細胞としての効果を発揮することが考えられる。そこで本研究の第 3 章では熱と界面による分子濃集機構を QB 複製酵素からなる RNA 複製系と組み合わせ、実際に RNA の複製が起きるのか、また区画構造の代わりに分子濃集機構が寄生体 RNA を抑えることができるのか調べた。

## 1.5 本研究の目的

本研究では初めに無細胞系における DNA 複製・転写・翻訳に着目し、三つの反応による産物の量を同時に上げることのできる非タンパク質成分の組成を調べた。そして次に、RNA 複製系において熱と界面による分子濃集機構が区画構造の代わりを果たしうるか、という点について調べた。前者は人工的に細胞を作ることによって生命現象とその成り立ちを理解しようということが大きな目的として存在する。また、後者は自己複製系における区画構造の新たな形を模索することで、生命誕生以前の現象について理解しようということを大きな目的としている。これらの共通項、すなわち本研究の目的は、化学反応によって構成される非生命のシステムを通して生命と生命誕生以前の状態の理解を進めることである (図 1.3)。

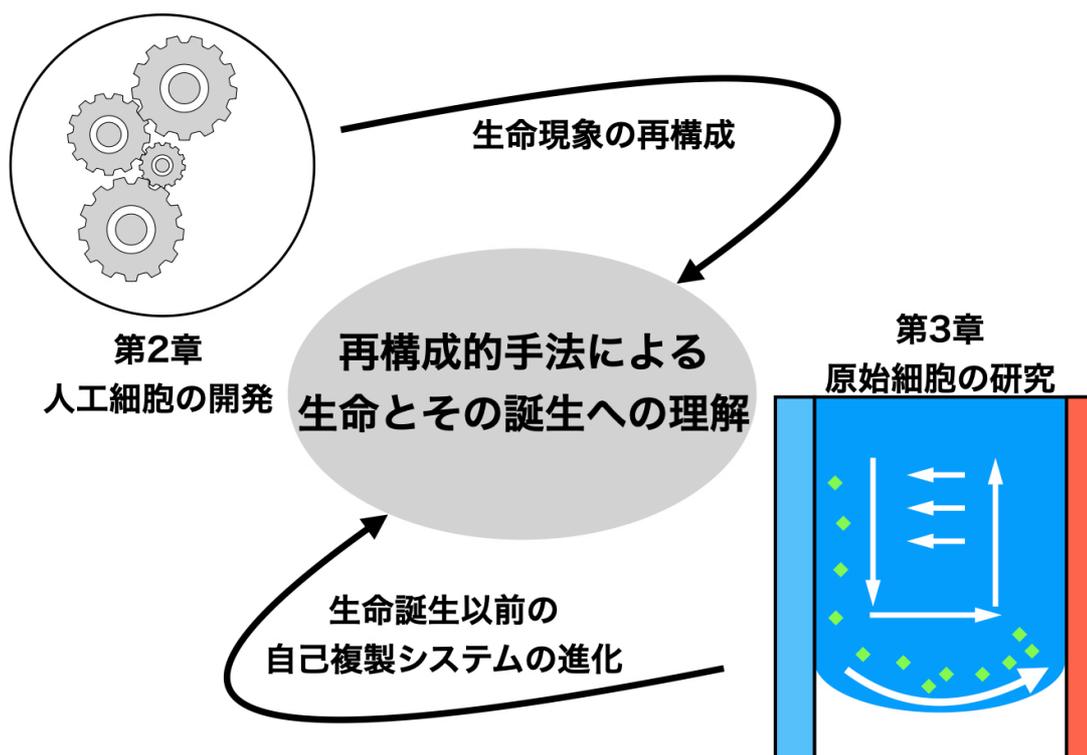


図 1.3 本研究の目的の概要

## 2 無細胞系における複製・転写・翻訳反応の共存条件

### 2.1 本章の研究目的

PURE システムは大腸菌由来の組み換えタンパク質から構成された無細胞転写翻訳系である。このシステムに DNA 複製機構を組み合わせると、DNA 複製と転写翻訳反応の共存が難しくなることはすでに述べたとおりである。この原因として、リボヌクレオチド (rNTP) と tRNA が挙げられている。これらの物質が具体的にどのプロセスに寄与しているかはまだ明らかになっていない。PURE システム内には rNTP と tRNA 以外にもいくつかの非タンパク質成分が含まれているが、これらの成分が複製、転写、翻訳の各プロセスにどのように影響するかもまだ解明されていない。そこで、本研究では PURE システムに含まれる主な非タンパク質成分に焦点を当て、これらの成分濃度が複製、転写、翻訳の各反応に与える影響を調べ、阻害成分を明らかにすることを一つ目の目的とした。さらに阻害成分に対する解決策を考案し、複製・転写・翻訳プロセスを高い生産性を保った状態で共存させることを二つ目の目的とした。

## 2.2 阻害効果を持つ成分の探索

DNA 複製・転写・翻訳反応に対するそれぞれの影響を明らかにするため、各反応を独立に調べた。DNA 複製は環状 DNA である pUC19 を鋳型に phi29 DNA 複製酵素を用いたローリングサークル型複製を行い、定量 PCR によって複製量を測定した。転写反応については線形 DNA を鋳型とした T7 RNA 複製酵素による *in vitro* 転写を行い、cDNA に逆転写したのち、定量 PCR によって転写量を測定した。翻訳反応は大腸菌由来の再構成型無細胞翻訳系 (T7 RNA 複製酵素を抜いた PURE システム) に精製した mRNA から GFP を発現させ、その蛍光を測定することで翻訳量を測定した (図 2.1)。

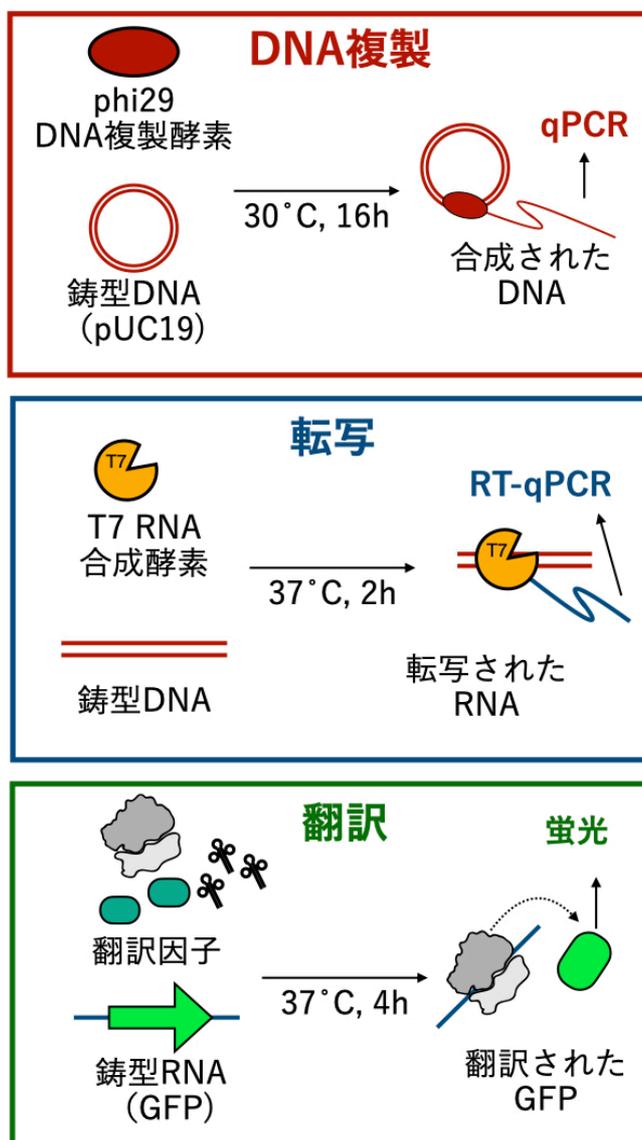


図 2.1 DNA 複製・転写・翻訳反応アッセイのスキーム

DNA 複製反応では phi29 DNA 複製酵素を用いて環状 DNA (pUC19, 0.1 nM) を鋳型に 30°C で 16 時間の DNA 複製を行った後、定量 PCR で測定した。転写反応は線形 RNA (1 nM) を鋳型に T7 RNA 合成酵素によって 37°C, 2 時間の条件で行われ、逆転写後に定量 PCR で測定した。翻訳反応については GFP をコードした鋳型 RNA (100 nM) を元に無細胞翻訳系によって GFP が 37°C, 4 時間の反応で合成した GFP の蛍光を測定した。

調査対象の物質は PURE システム中の主要な非タンパク質と DNA 複製に用いられるデオキシリボヌクレオチド (dNTP) を含めた 11 種類の成分とした。具体的には、必須アミノ酸 20 種類、クレアチンリン酸, 4 種類の dNTP, dithiothreitol (DTT), 10-formyl-5,6,7,8-tetrahydrofolic acid (FD), グルタミン酸カリウム (Glu-K), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid potassium salt (HEPES-KOH), Mg(OAc)<sub>2</sub>, 4 種類のリボヌクレオチド (rNTP), スペルミジン, そして大腸菌由来の tRNA である。これらの成分の濃度は転写翻訳共役型 DNA 複製 (Transcription-translation coupled DNA replication; TTcDR) に最適化された溶液組成を基準とし、基準の半分, または二倍の条件で DNA 複製・転写・翻訳に対する影響が調べられた。さらにタンパク質合成に最適化された溶液組成の濃度条件 (DTT, Glu-K, Mg(OAc)<sub>2</sub>, rNTP, スペルミジン, tRNA) も加えて調べた (図 2.2, 図 2.3, 図 2.4)。そして基準濃度における測定値を元に各反応の結果を標準化した。それぞれ rNTP と dNTP の濃度を変更する際は、それに伴い Mg(OAc)<sub>2</sub> も同濃度の変更を行った (e.g. rNTP 濃度を 1mM 増やす時は Mg(OAc)<sub>2</sub> も 1mM 増やす)。すると 11 種類の非タンパク質成分の多くは各反応に異なる影響を与えることがわかった (図 2.5)。

アミノ酸, DTT, FD が三つの反応に与える効果は一様に同じだった。一方, dNTP, Glu-K, rNTP と tRNA は反応によって大きな影響を与えることがわかった。それぞれの効果を具体的に述べる。高濃度の dNTP は基質として使用される DNA 複製反応を促進した一方で、翻訳反応を阻害した。次に Glu-K は高濃度で翻訳反応を促進した一方で、転写反応を阻害した。そして rNTP は転写反応を、tRNA は翻訳反応を高濃度で促進した一方で、どちらも DNA 複製反応を阻害した。

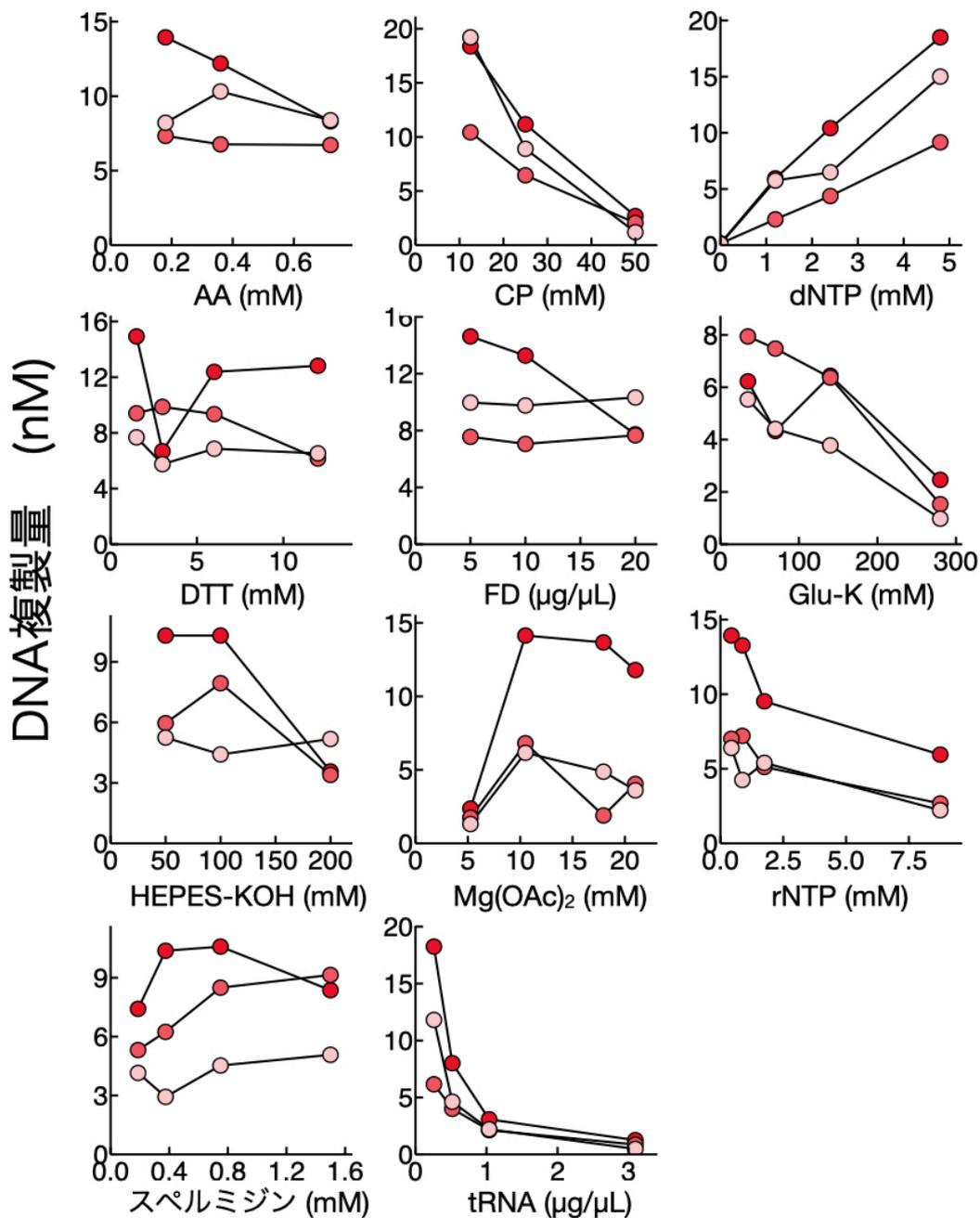


図 2.2 DNA 複製反応に対する各成分の影響

様々な非タンパク質成分濃度における DNA 複製の反応量を図 2.1 のスキームで測定した。独立して 3 回実験を行っており、各色は独立した実験の結果を示す。rNTP は 4 種類のリボヌクレオチド三リン酸が (rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25)、dNTP は 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸が (dATP/dGTP/dCTP/dTTP = 1:1:1:1) が含まれている。

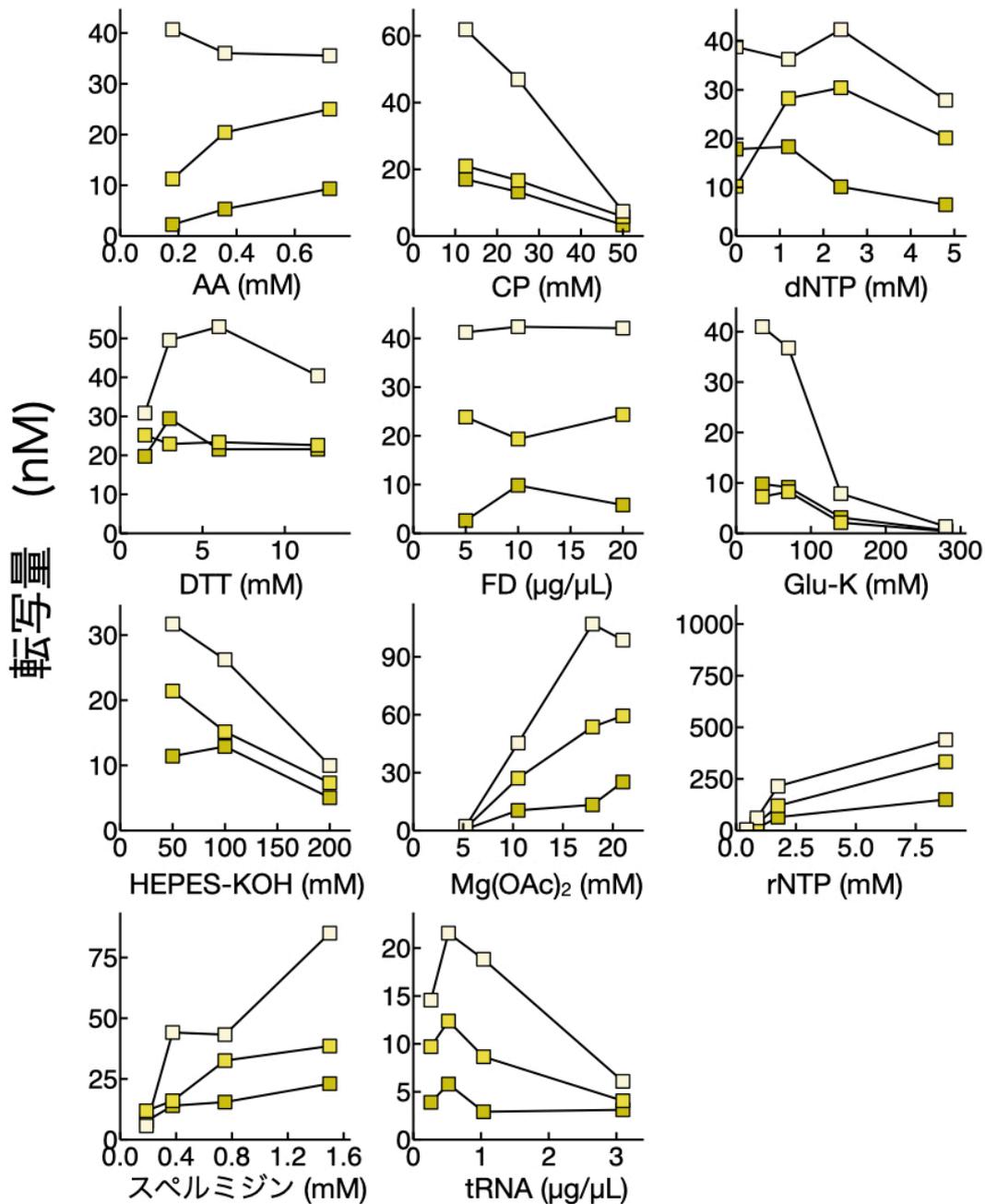


図 2.3 転写反応に対する各成分の影響

様々な非タンパク質成分濃度における転写の反応量を図 2.1 のスキームで測定した。独立して 3 回実験を行っており、各色は独立した実験の結果を示す。rNTP は 4 種類のリボヌクレオチド三リン酸が (rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25)、dNTP は 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸が (dATP/dGTP/dCTP/dTTP = 1:1:1:1) が含まれている。

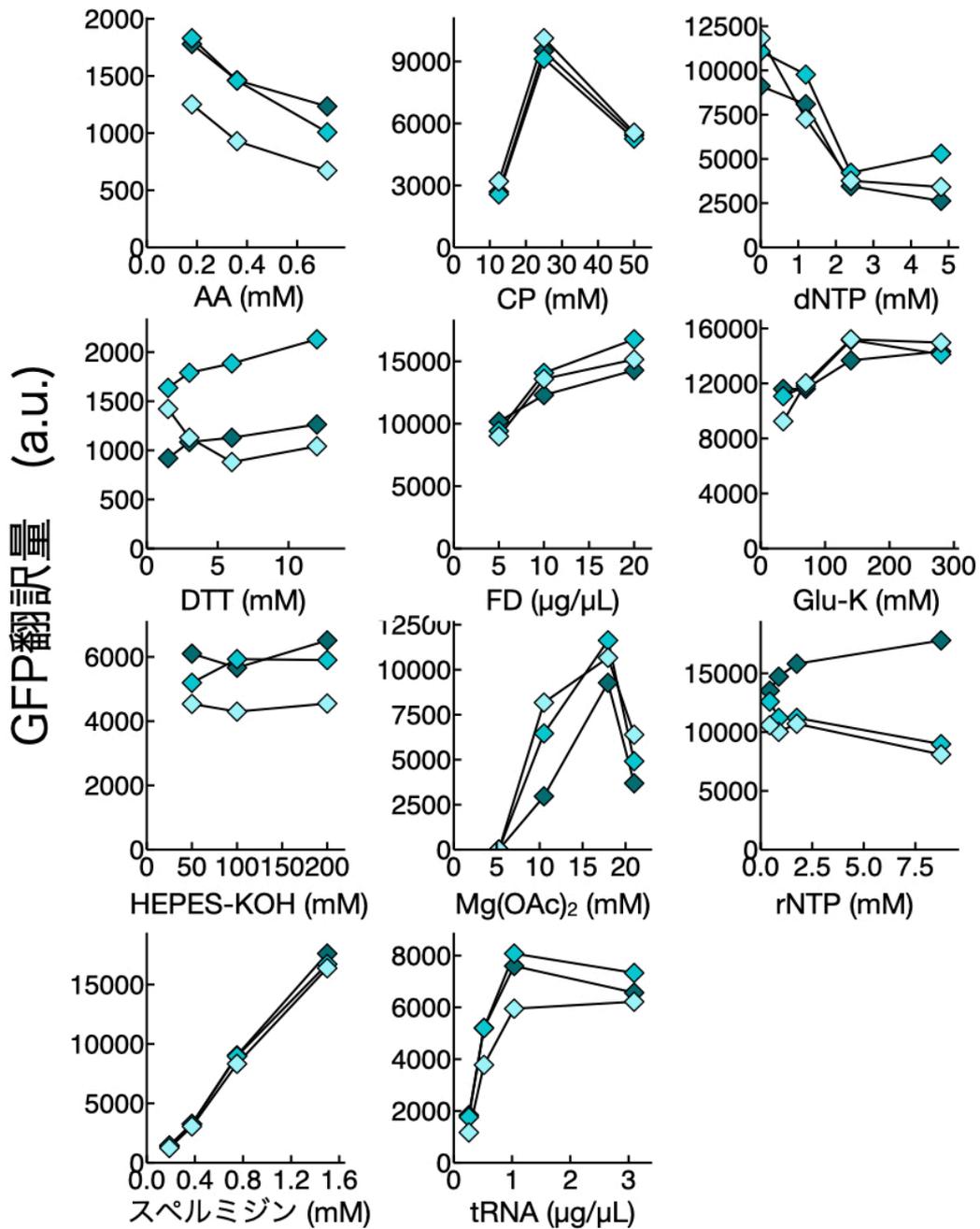


図 2.4 翻訳反応に対する各成分の影響

様々な非タンパク質成分濃度における翻訳の反応量を図 2.1 のスキームで測定した。独立して 3 回実験を行っており、各色は独立した実験の結果を示す。rNTP は 4 種類のリボヌクレオチド三リン酸が (rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25), dNTP は 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸が (dATP/dGTP/dCTP/dTTP = 1:1:1:1) が含まれている。

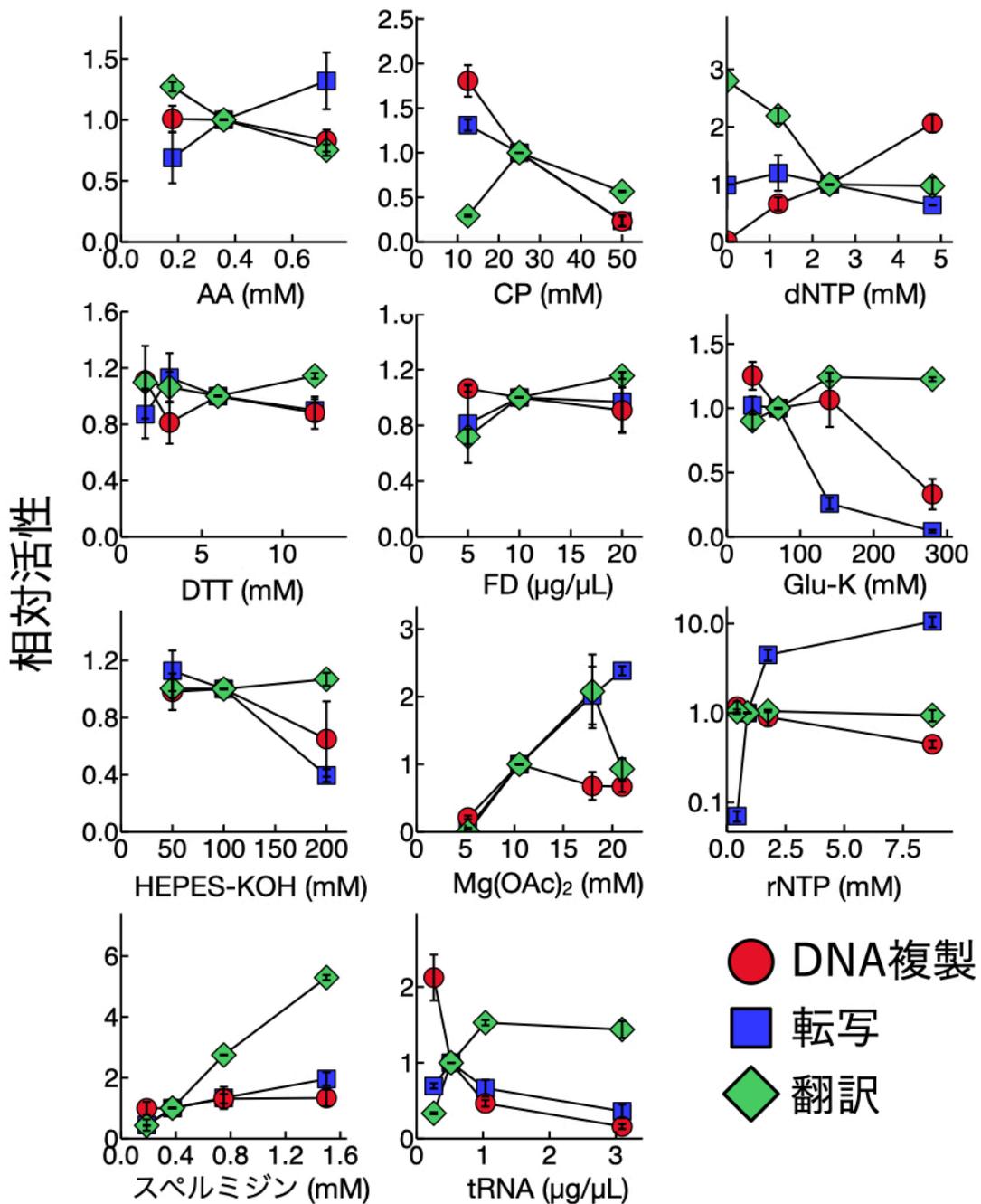


図 2.5 非タンパク質成分 11 種類が各反応に与える影響

各反応の活性は、基準とした濃度の活性を元に標準化を行った。具体的な基準濃度は手法の節にて後述する。rNTP は 4 種類のリボヌクレオチド三リン酸が (rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25), dNTP は 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸が (dATP/dGTP/dCTP/dTTP = 1:1:1:1) が含まれている。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

非タンパク質成分が三反応に与える影響をよりわかりやすく可視化するため、図 2.5 のデータに線形回帰を行い、回帰係数をヒートマップで表した(図 2.6)。その中で促進効果(橙)と阻害効果(青)を両方持った成分は AA, FD, rNTP, dNTP, Glu-K, HEPES-KOH, Mg(OAc)<sub>2</sub>, dNTP だった。その中でも回帰係数の差が 0.2 以上見られた四つの成分(rNTP, tRNA, Glu-K, dNTP)についてさらに分析を進めた。

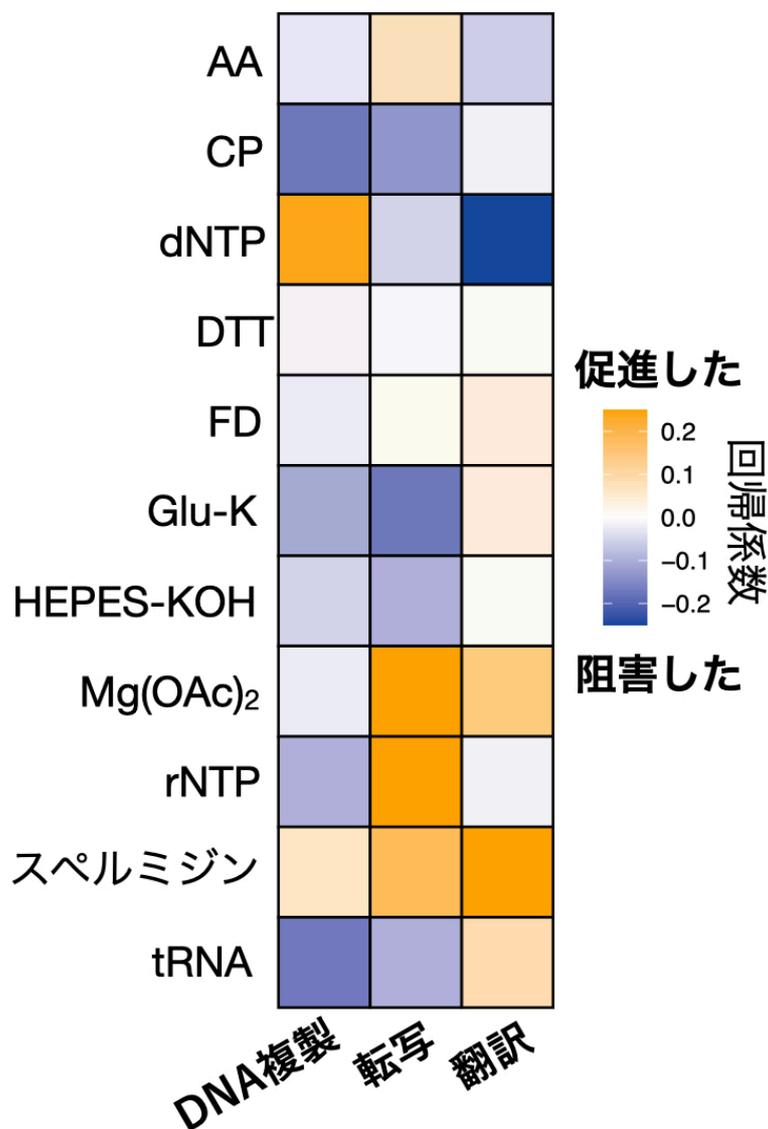


図 2.6 非タンパク質成分の各反応に対する促進効果と阻害効果

上の図 2.5 のデータを線形回帰した時の回帰係数をヒートマップで表した。

## 2.3 阻害物質の調査

### 2.3.1 DNA複製反応への阻害効果について

DNA複製反応を阻害した二つの成分のうち、まず rNTP について詳しい分析を行った。4種類のリボヌクレオチド三リン酸とアデノシン一リン酸を用いて DNA複製に対する阻害効果を調べたところ、rUTP が最も阻害すること、そしてその次に rATP, rGTP, rCTP と続いた後、rAMP が最も阻害効果が低いことがわかった (図 2.7)。以上のことから4種類の rNTP がそれぞれ異なる阻害効果を持つこと、そして rAMP との違いからリン酸基の数が阻害効果に関係することが示唆された。

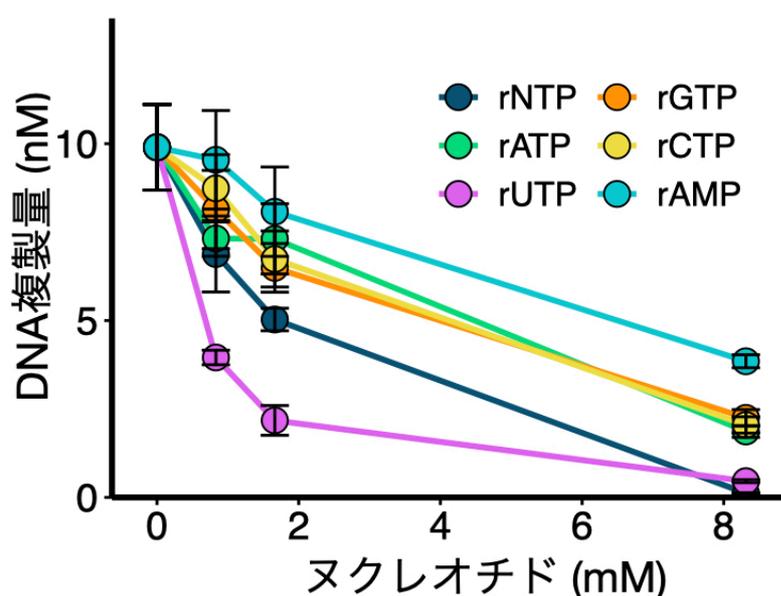


図 2.7 DNA複製反応に対するリボヌクレオチドの影響

DNA複製反応は図 2.1と同様に phi29 DNA複製酵素による 0.1 nM pUC19 DNAの複製が、それぞれ rNTP, rUTP, rGTP, rCTP, AMPの存在下で行われた。rNTPは4種類のリボヌクレオチド三リン酸が以下の比で含まれているものを指す (rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25)。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

次に tRNA の阻害効果について詳しく調べた。大腸菌由来の tRNA 溶液を使用していることから tRNA 以外の阻害物質のコンタミネーションを疑い、シリカゲルカラムによる精製と DNase による処理を行った。しかしどれも阻害効果に影響はなく (図 2.8 上)、コンタミネーションが原因である可能性は低いこと

が示唆された。阻害が tRNA 配列特異的な効果であるか調べるために GFP をコードした RNA を用いて DNA 複製を行ったところ、tRNA と同様の阻害効果が得られた (図 2.8 下)。このことから阻害効果は tRNA に特異的でないことが示唆された。

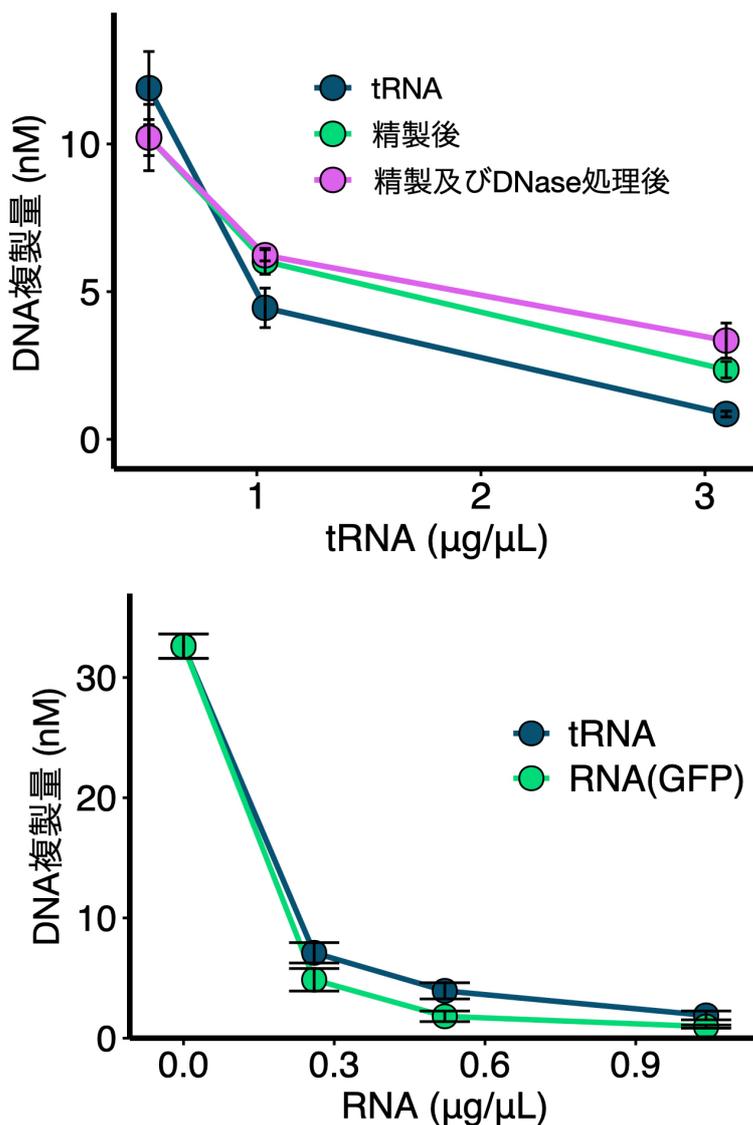


図 2.8 tRNA 及び RNA が DNA 複製反応を阻害する効果について

DNA 複製反応は図 2.1 と同様に phi29 DNA 複製酵素による 0.1 nM pUC19 DNA の複製を 30°C, 16 時間行った。上：大腸菌由来の tRNA, シリカゲルカラムによって精製した tRNA, さらに DNase で処理した精製 tRNA を反応溶液に加えて複製反応を行い, DNA 複製量を測定した。下：GFP がコードされた DNA を鋳型に, T7 RNA 合成酵素による *in vitro* 転写を行って mRNA を得た。mRNA をシリカゲルカラムによって精製, DNase で処理し

た後に DNA 複製反応溶液に加えることで、DNA 複製反応に与える影響を tRNA と比較した。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

これまでの DNA 複製実験では phi29 DNA 複製酵素を用いていた。阻害効果の酵素特異性を調べるため、ニック入り（二本鎖 DNA の片方の鎖において、隣接するヌクレオチドの間にホスホジエステル結合が存在せず、切れ目が入っていること）の鋳型 DNA を用いて、クレノウ断片（野生型と 3'→5'エクソヌクレアーゼ活性が無い変異型）と枯草菌の DNA ポリメラーゼ I による DNA 複製を行った。本スキームでは鋳型 DNA のニックから複製を始めた DNA 複製酵素は、401 塩基の一本鎖 DNA を剥がしながら二本鎖 DNA の合成を行う。溶液中に予め入れたニッキングエンドヌクレアーゼが再びニックを入れることで上記の複製プロセスが繰り返し、一本鎖 DNA フラグメントの増幅が起こる（図 2.9）。複製反応後、一本鎖 DNA の生成をアガロース電気泳動によって調べた。DNA 複製酵素の全てにおいて、rNTP または tRNA を入れない条件では増幅した一本鎖 DNA が確認できたのに対し、rNTP (8.8 mM) または tRNA (3.1 µg/µL) がある条件では一本鎖 DNA のバンドは薄くなっている、あるいは全く確認できなかった（図 2.11）。これは rNTP と tRNA がこれらの DNA 複製酵素も阻害していることを示唆している。

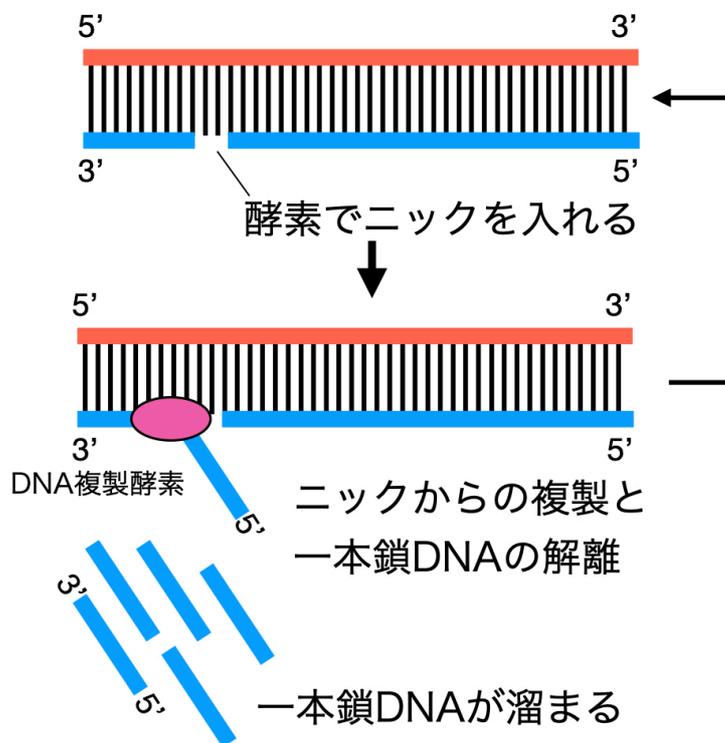


図 2.9 ニックを用いた一本鎖 DNA の複製スキーム

クレノウ断片と枯草菌 DNA 複製酵素のための DNA 複製スキーム。この反応ではまずニックキングエンドヌクレアーゼによって鋳型 DNA (25 nM) にニックが入る。各 DNA 複製酵素はニック箇所から鎖置換しながら複製を行うため、元々結合していた一本鎖 DNA が剥がれる。複製後はまたニックが入ることで同様の反応が繰り返し行われ、一本鎖 DNA が複製産物として増幅される。

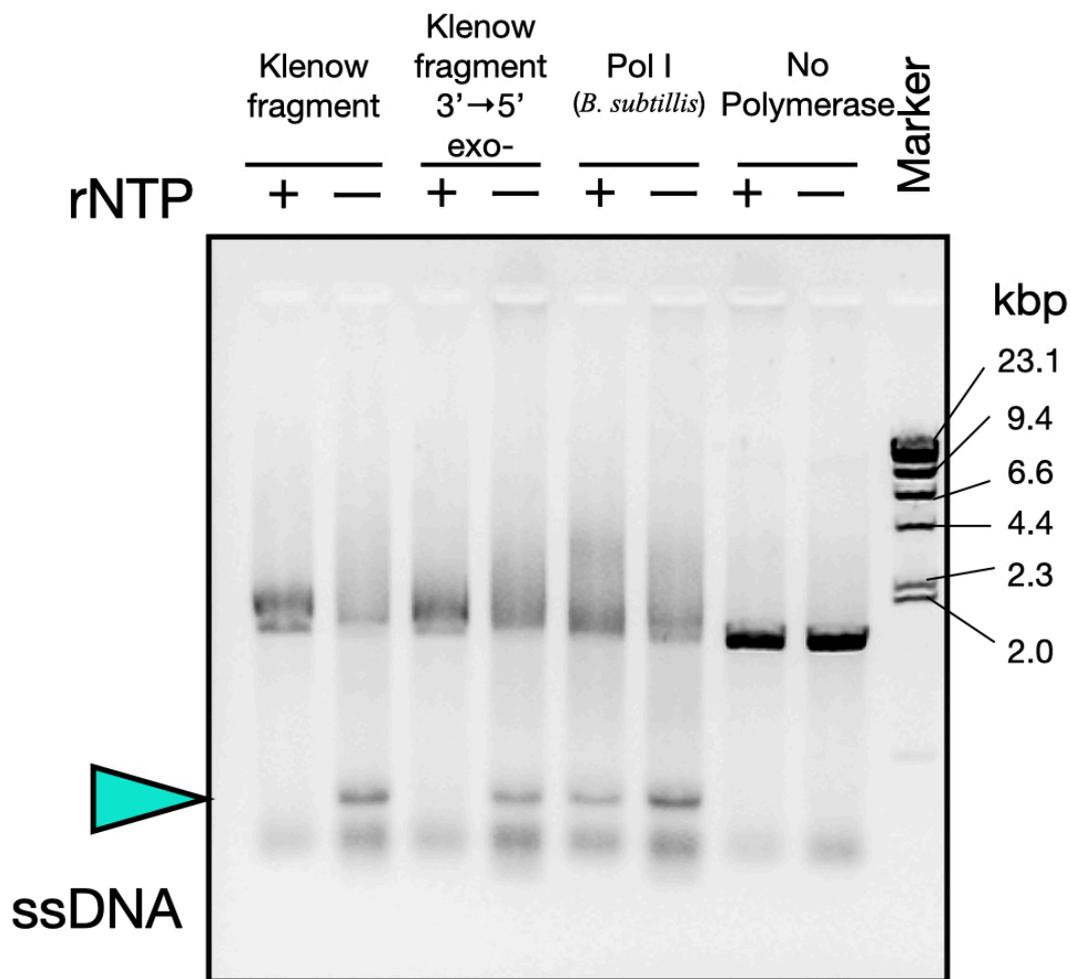


図 2.10 一本鎖 DNA 合成スキームによる様々な DNA 複製酵素の複製反応に対する rNTP の効果

野生型のクレノウ断片，変異型のクレノウ断片（3'→5'のエクソヌクレアーゼ活性なし），枯草菌の DNA ポリメラーゼ I を用いた DNA 複製反応による一本鎖 DNA 産物をアガロース電気泳動した。DNA 複製反応は 37°C，15 分の条件で行われた。矢印は目的のバンドの位置を示している。rNTP（8.8 mM）の有無による違いを調べた。rNTP は 4 種類のリボヌクレオチド三リン酸が含まれており（rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25），同濃度の Mg<sup>2+</sup>についても同時に変更した。



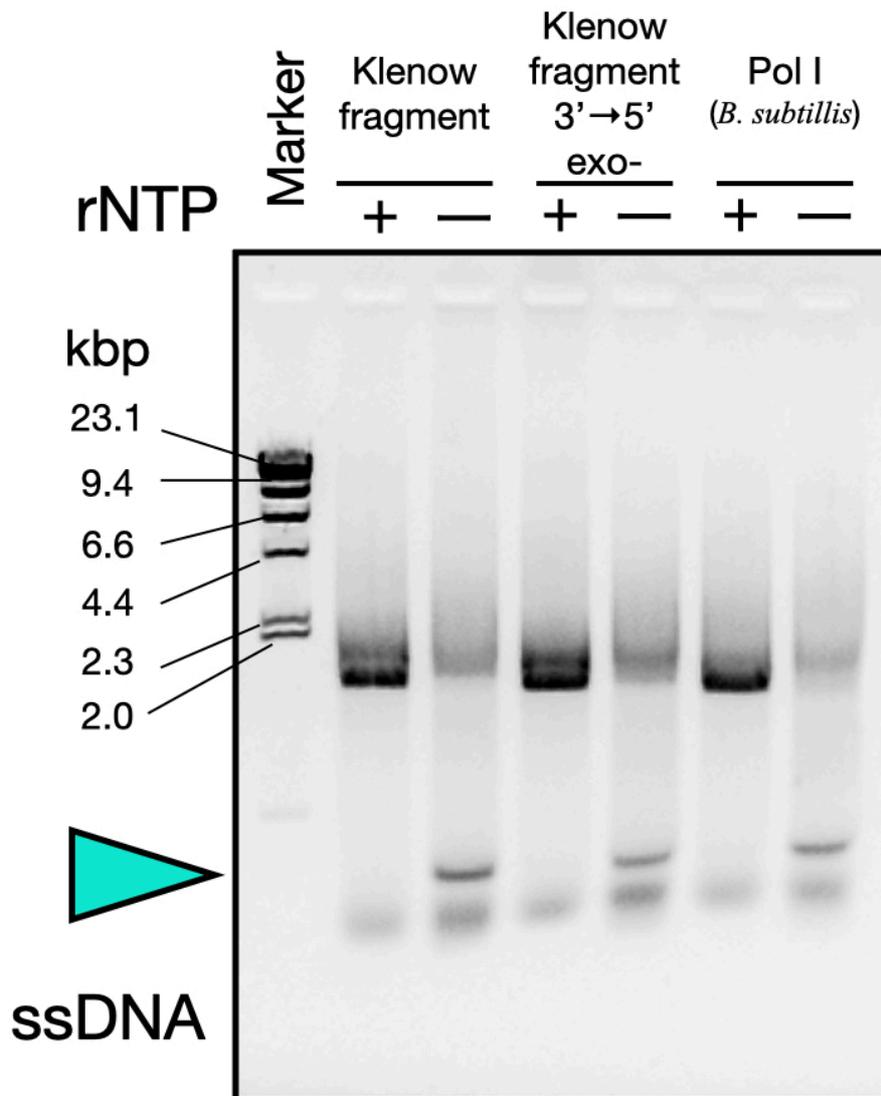


図 2.12 一本鎖 DNA 合成スキームによる様々な DNA 複製酵素の複製反応に対する rNTP のみの効果

野生型のクレノウ断片, 変異型のクレノウ断片 (3'→5'のエクソヌクレアーゼ活性なし), 枯草菌の DNA ポリメラーゼ I を用いた DNA 複製反応による一本鎖 DNA 産物をアガロース電気泳動した。DNA 複製反応は 37°C, 15 分の条件で行った。矢印は目的のバンドの位置を示している。rNTP (8.8 mM) の有無による違いを調べた。rNTP は 4 種類のリボヌクレオチド三リン酸が含まれている (rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25)。

さらに異なる DNA 複製スキームを試すため, PCR 反応に広く用いられる *Thermus aquaticus* の DNA ポリメラーゼ I を用いて, PCR による DNA (1442

bp) の複製反応を(Chien, Edgar, and Trela 1976), 大腸菌の DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素と他の複製タンパク質を用いて oriC プラスミド(7.8 kbp)の複製を行った(Su'etsugu et al. 2017). すると, どちらにおいても rNTP と tRNA は DNA 複製を阻害した. 以上の結果から, 本研究で試した全ての DNA 複製酵素に対して rNTP と tRNA の阻害効果が働くことがわかった ( 図 2.13).

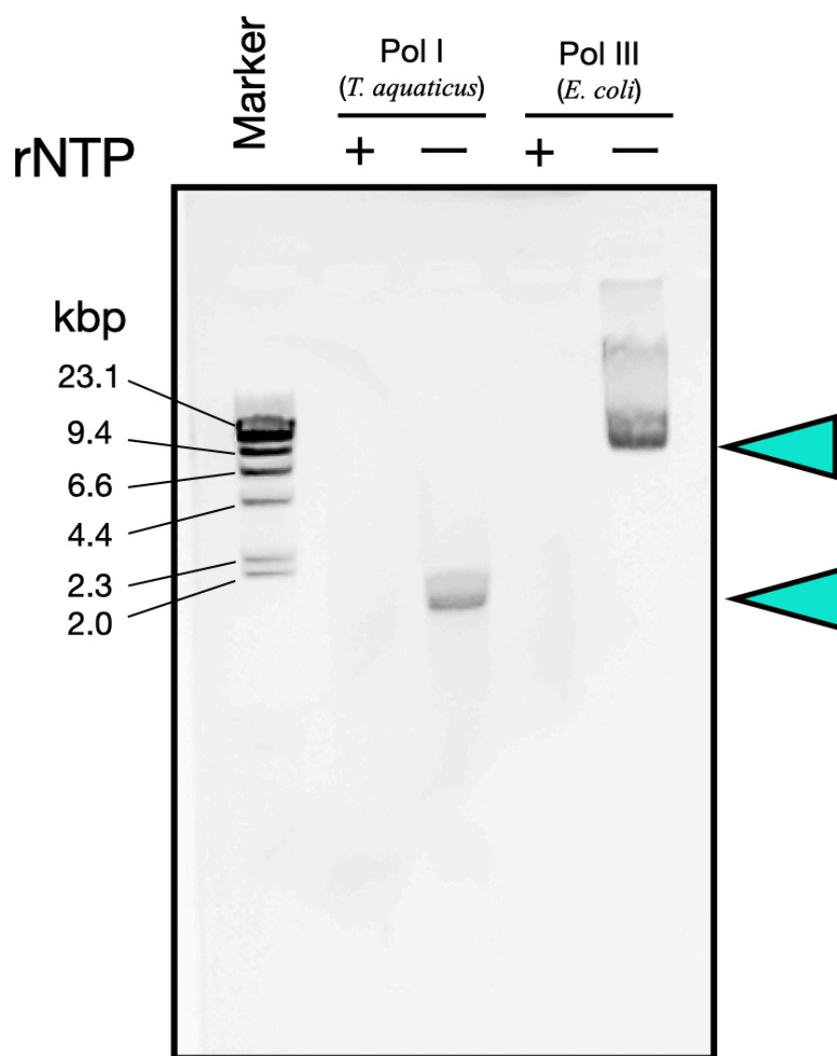


図 2.13 様々な DNA 複製酵素の複製反応に対する rNTP の効果

DNA 複製反応は *T. aquaticus* YT-1 の DNA ポリメラーゼ I (Taq) と大腸菌 DNA ポリメラーゼ III によって行われた. Taq ポリメラーゼは PCR 反応, 大腸菌 DNA ポリメラーゼ III は oriC プラスミドの複製によって調べられた. 生成産物はアガロース電気泳動によって確認した. 矢印は目的のバンドの位置を示している. rNTP (8.8 mM) の有無による違

いを調べた。

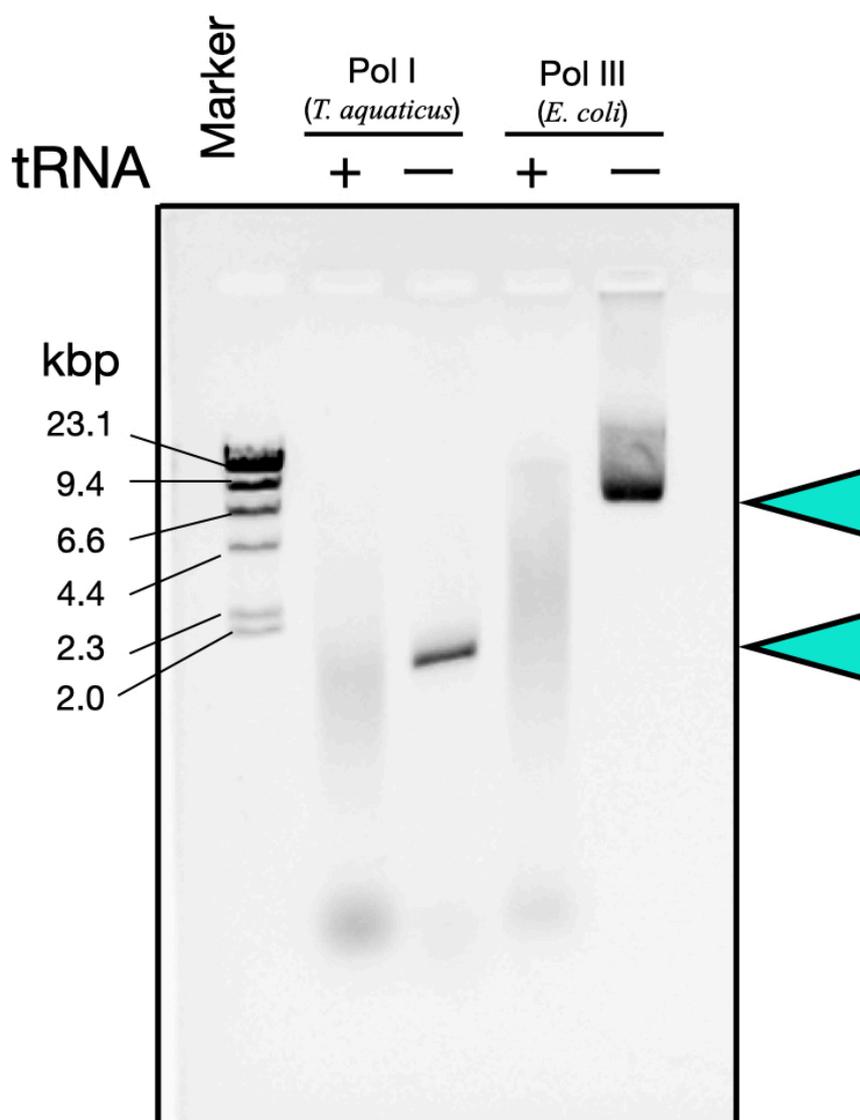


図 2.14 様々な DNA 複製酵素の複製反応に対する tRNA の効果

DNA 複製反応は *T. aquaticus* YT-1 の DNA ポリメラーゼ I (Taq) と大腸菌 DNA ポリメラーゼ III によって行われた。Taq ポリメラーゼは PCR 反応、大腸菌 DNA ポリメラーゼ III は oriC プラスミドの複製によって調べられた。生成産物はアガロース電気泳動によって確認した。矢印は目的のバンドの位置を示している。tRNA (3.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) の有無による違いを調べた。

### 2.3.2 転写反応への阻害効果について

転写反応に対する阻害効果を持つ Glu-K の特異性について調べるため、他の塩（アスパラギン酸カリウム; Asp-K, グルタミン酸ナトリウム; Glu-Na, 酢酸ナトリウム; NaOAc）を用いた転写実験を行った。するとこれら全ての塩において Glu-K と同様の阻害効果が見られ、塩全般に阻害効果があることが示唆された（図 2.15）。次にこれまでの実験で用いられて来た T7 RNA 合成酵素とは異なる種類の酵素（T3, SP6, 大腸菌由来）で Glu-K による阻害効果を調べた（図 2.16）。T3 と SP6 RNA 合成酵素においては、T7 と同様の阻害効果が見られたのに対し、大腸菌由来の RNA 合成酵素は 0–280 mM という広範囲の Glu-K 濃度においても活性に変化は見られなかった。そこでさらに Glu-K 濃度を 1200 mM まで上げたところ、活性が下がるどころか少し上昇した。このことは Glu-K が大腸菌由来 RNA 合成酵素に対して負の影響を与えなかったことを示している。転写量の絶対値は図 2.17 に示す。

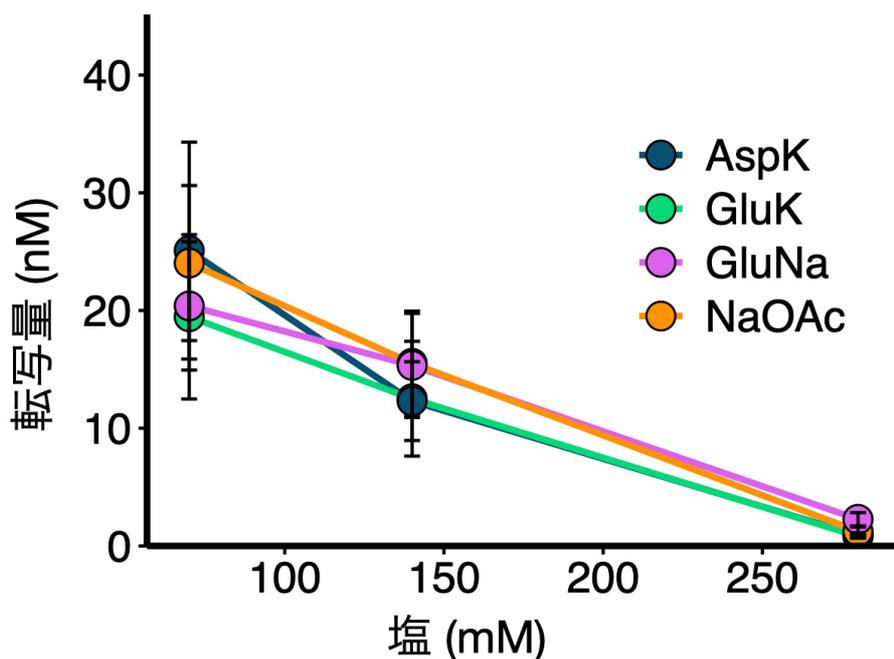


図 2.15 転写反応に対する様々な塩の阻害効果

転写反応は図 2.1 で示したように、1 nM 鋳型 DNA と T7 RNA 合成酵素による反応を 37°C、1 時間の条件で行った。転写産物は逆転写定量 PCR にて測定した。異なる塩の存在下で転写反応を行い、測定して得られた結果は、TTcDR 反応における最適濃度である 70 mM Glu-K を基準として正規化した。使用した鋳型 DNA は各 RNA 合成酵素特異的なプロモーター

配列を付与して調製された。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

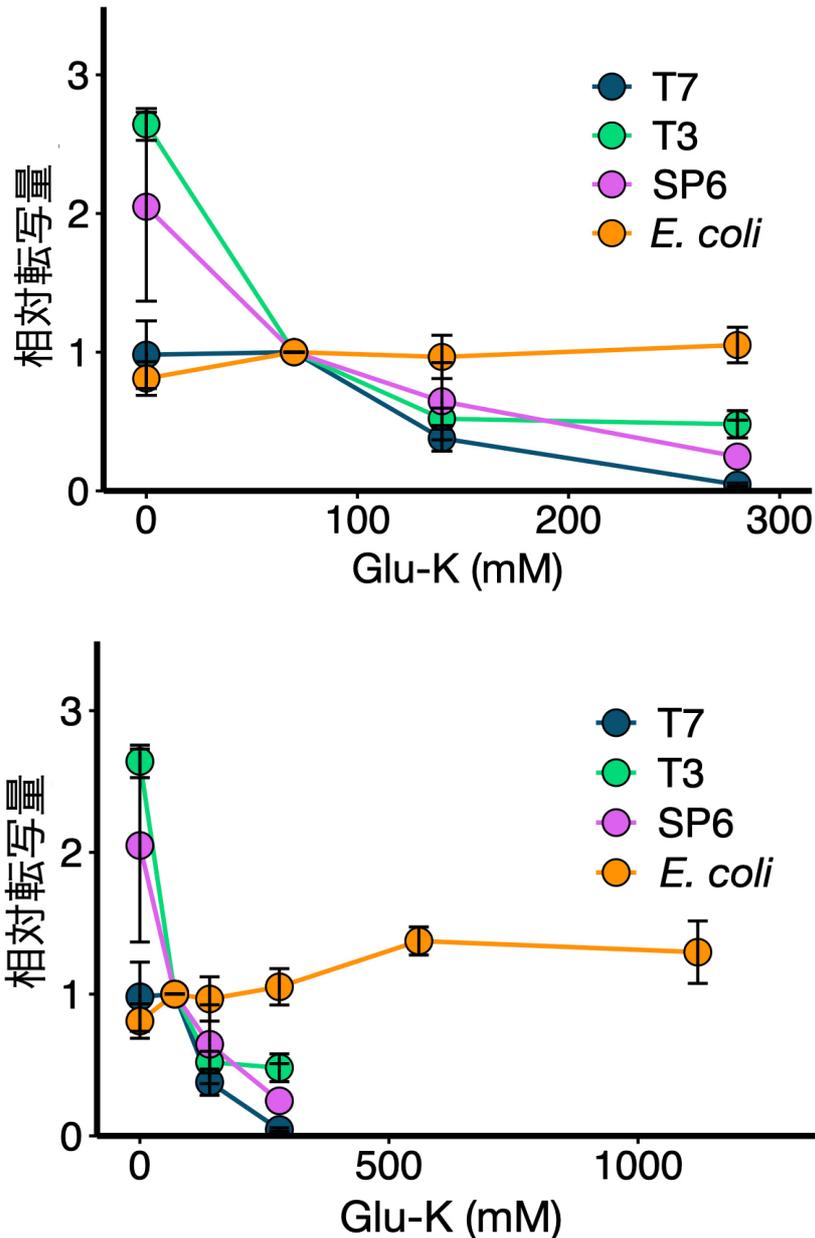


図 2.16 様々な RNA 合成酵素に対する Glu-K の阻害効果

転写反応は図 2.1 で示したように、1 nM 鋳型 DNA と T7 RNA 合成酵素による反応を 37°C、1 時間の条件で行った。転写産物は逆転写定量 PCR にて測定した。T7、T3、SP6、大腸菌 RNA 合成酵素のホロ酵素の 4 種類で転写反応を行い、測定して得られた結果は、TTcDR 反応における最適濃度である 70 mM Glu-K を基準として正規化した。上：Glu-K 濃度が 300 mM までの結果。下：大腸菌 RNA 合成酵素のみ Glu-K 濃度を 1200 mM まで上げた時の結果。使用した鋳型 DNA は各 RNA 合成酵素特異的なプロモーター配列を付与して調製さ

れた。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

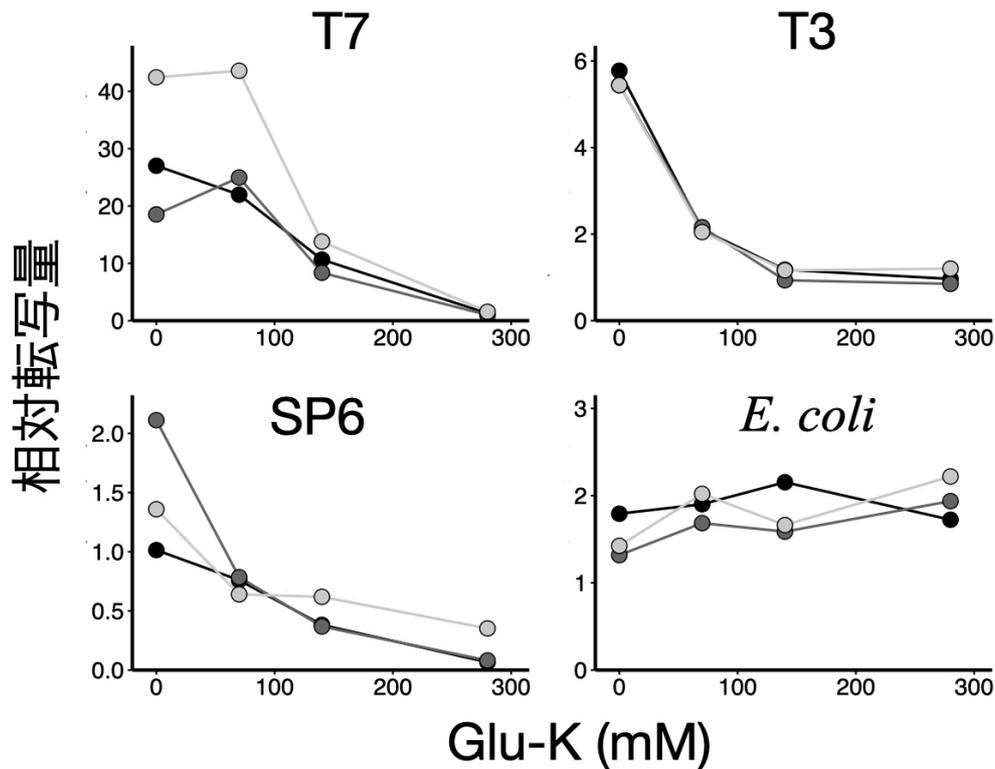


図 2.17 様々な RNA 合成酵素に対する Glu-K 阻害時の転写量の絶対値

転写反応は図 2.1 で示したように、1 nM 鋳型 DNA と T7 RNA 合成酵素による反応を 37°C、1 時間の条件で行った。転写産物は逆転写定量 PCR にて測定した。T7、T3、SP6、大腸菌 RNA 合成酵素のホロ酵素の 4 種類で転写反応を行い、測定して得られた結果の絶対値を示す。使用した鋳型 DNA は各 RNA 合成酵素特異的なプロモーター配列を付与して調製された。

### 2.3.3 翻訳反応への阻害効果について

翻訳反応に対する dNTP の阻害効果を詳しく調べるために、dATP, dTTP, dGTP, dCTP, そして dAMP の効果について調べた (図 2.18)。すると dATP, dTTP, dGTP, dCTP は翻訳反応をそれぞれ阻害したのに対し、dAMP は阻害効果がほぼ見られなかった。この結果から、デオキシリボヌクレオチドに付いた三リン酸が阻害効果に関係があることが示唆された。この傾向は DNA 複製に対する rNTP の阻害効果を詳しく調べた際に見つけたものと似ているが、リン酸基の違いによる差はより大きかった。

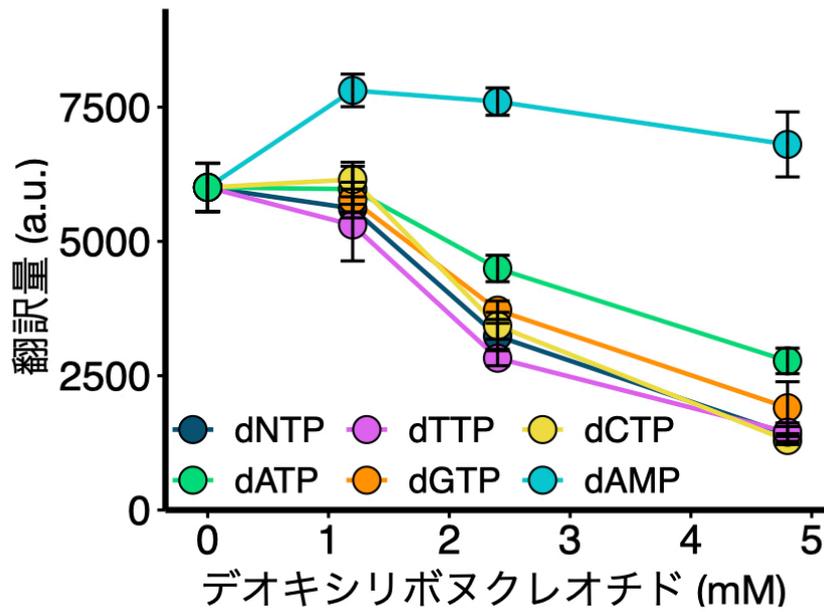


図 2.18 翻訳反応におけるデオキシリボヌクレオチドの影響

翻訳反応は図 2.1 で示されたように 100 nM 鋳型 RNA と無細胞翻訳系による GFP 発現で、それぞれ dNTP, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, dAMP の存在下で行われた。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

## 2.4 Mg<sup>2+</sup>濃度による阻害効果の回復と共役系への応用

### 2.4.1 Mg<sup>2+</sup>濃度の調整による rNTP と dNTP の阻害効果の回避

これまでに阻害効果を持つ成分と阻害効果に対する詳しい分析を行った。その知見を元に阻害効果を打ち消す方法を考えることとした。rNTP と dNTP の阻害効果に対しては、これらのリン酸基が Mg<sup>2+</sup>をキレートすることが知られているため、遊離 Mg<sup>2+</sup>の濃度が関係しているのではないかと考えた。ヌクレオチド三リン酸よりヌクレオチド一リン酸の方が阻害効果は低いというこれまでの結果も、この仮説を支持している。これまでの実験において rNTP または dNTP 濃度を変化させる時は等量の Mg(OAc)<sub>2</sub> 濃度も同様に变化させていたものの、等量の濃度では不十分な可能性がある。そこで様々な Mg<sup>2+</sup>濃度において rNTP (8.8 mM) による DNA 複製への阻害効果を調べた。すると TTeDR の最適濃度 (10.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>) では高い阻害効果が見られたものの、27 mM Mg(OAc)<sub>2</sub> では阻害効果がほとんど打ち消されることがわかった (図 2.19)。このことは Mg<sup>2+</sup>濃度を調整することで DNA 複製における rNTP の阻害効果を解消できることを示唆している。

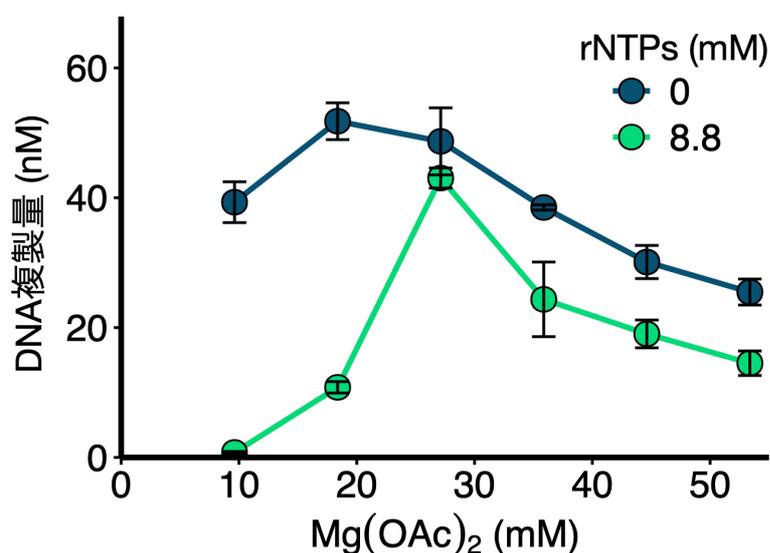


図 2.19 rNTP の DNA 複製反応に対する阻害効果における Mg<sup>2+</sup>濃度の影響

DNA 複製反応は図 2.1 で示したように phi29 DNA 複製酵素を用いて 0.1nM pUC19 DNA を鋳型の複製反応を 30°C, 16 時間の条件で行った。この時、rNTP (8.8 mM) の有無による違いを様々な Mg(OAc)<sub>2</sub> 濃度条件下で比較した。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

DNA 複製を阻害する成分である RNA についても同様に  $Mg^{2+}$ 濃度の調整によって阻害効果が打ち消されるか調べたところ、tRNA (3.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )を含む溶液中では 54 mM の  $Mg(\text{OAc})_2$ を加えても DNA 複製に対する阻害効果が打ち消されることはなかった (図 2.20). これは RNA の阻害が rNTP とは異なるメカニズムによるものだというを示唆している.

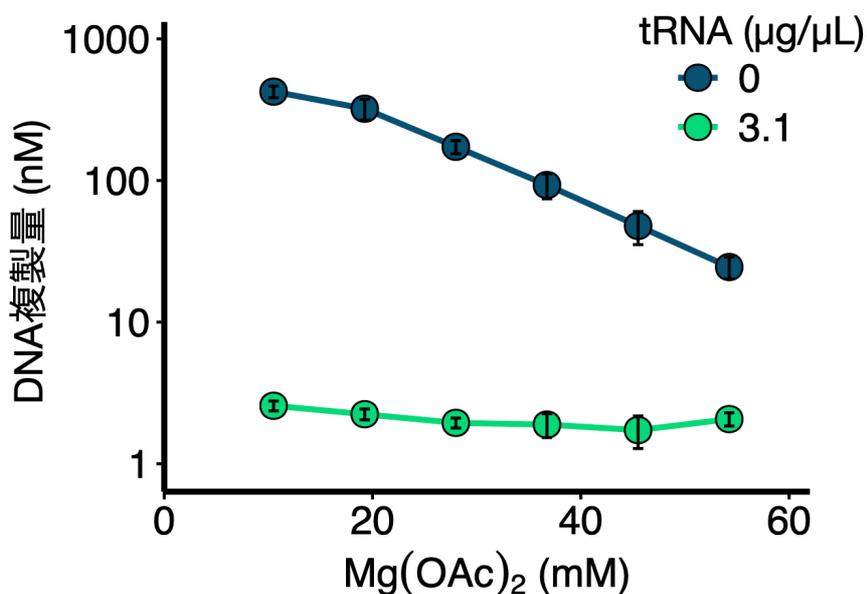


図 2.20 tRNA の DNA 複製反応に対する阻害効果における  $Mg^{2+}$ 濃度の影響

DNA 複製反応は図 2.1 で示したように phi29 DNA 複製酵素を用いて 0.1nM pUC19 DNA を鋳型の複製反応を 30°C, 16 時間の条件で行った. この時, tRNA (3.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )の有無による違いを様々な  $Mg(\text{OAc})_2$ 濃度条件下で比較した. エラーバーは標準誤差を示す (n=3).

翻訳反応に対する dNTP の阻害効果が  $Mg^{2+}$ 濃度の調整によって解消されるか調べるために, 様々な  $Mg(\text{OAc})_2$ 濃度下で dNTP による翻訳反応の阻害効果を調べた. すると dNTP 濃度が高い条件でも  $Mg^{2+}$ 濃度を変化させれば同等の翻訳量が得られることがわかった (図 2.21). これは  $Mg^{2+}$ 濃度を調整することで翻訳反応における dNTP の阻害効果を打ち消せることを示唆している.

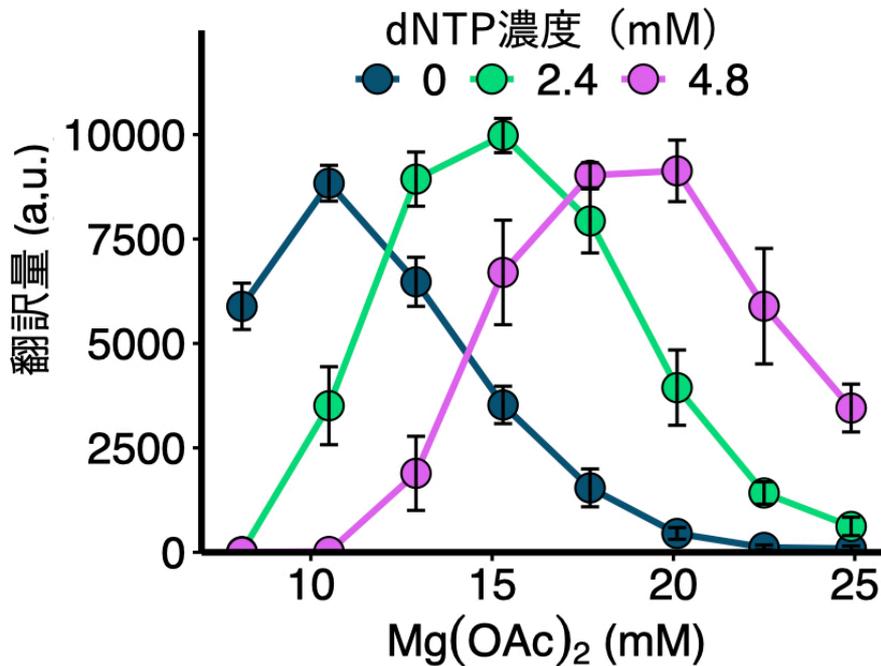


図 2.21 dNTP の翻訳反応に対する阻害効果における  $Mg^{2+}$ 濃度の影響

翻訳反応は図 2.1 で示されたように 100 nM 鋳型 RNA と無細胞翻訳系による GFP 発現測定された。3 つの dNTP 濃度 (0, 2.4, 4.8 mM) と様々な  $Mg(OAc)_2$  濃度の条件を調べた。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

#### 2.4.2 $Mg^{2+}$ 濃度による TTcDR への応用

$Mg^{2+}$ 濃度を調整することによって TTcDR (転写翻訳共役 DNA 複製) 反応の改善を試した。これまでの TTcDR 反応の最適条件は rNTP と dNTP 濃度はそれぞれ 0.88 と 2.4 mM であり、転写量と翻訳量のある程度低く保つことによって DNA 複製量を最大化させるものであった。様々な  $Mg^{2+}$ 濃度において高濃度の rNTP と dNTP による影響を調べるため、TTcDR 反応を行った上で、DNA 複製量、転写量、GFP の翻訳量を測定した(図 2.22, 図 2.23)。DNA の複製量を最大にする成分濃度は変わらなかった(10.5 mM  $Mg(OAc)_2$ , 0.88 mM rNTP, 2.4 mM dNTP)。一方で、高濃度の  $Mg^{2+}$ 条件においては高濃度の rNTP と dNTP (8.8 mM rNTP, 4.8 mM dNTP)を加えても一定の DNA 複製量を保ちつつ、転写量と翻訳量をこれまでの TTcDR 反応における最適条件よりも上げることに成功した (図 2.24)。以上の結果から TTcDR 反応においても  $Mg^{2+}$ 濃度の調整によって rNTP と dNTP による転写と翻訳の阻害効果を打ち消せることが示唆

された。

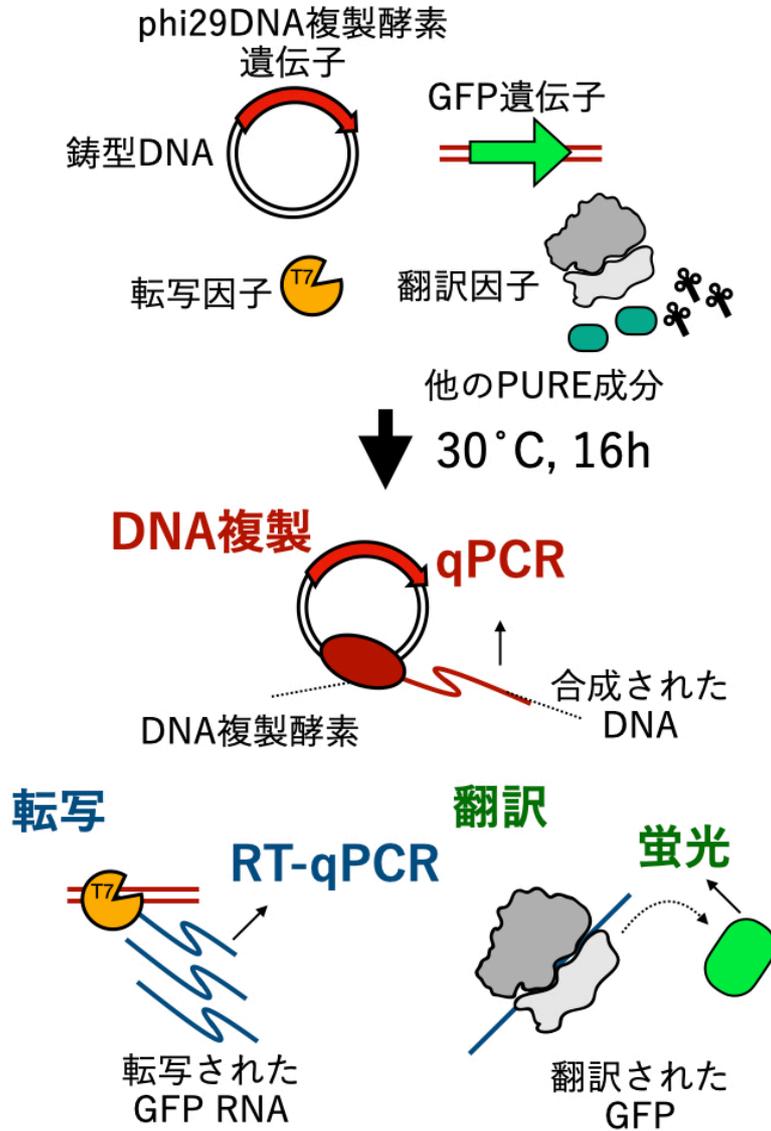


図 2.22 TTcDR 反応における DNA 複製・転写・翻訳の測定

鋳型として phi29 DNA 複製酵素をコードした環状 DNA (0.05 nM) と GFP をコードした線形 DNA (0.05 nM) を用いて、PURE システムで 30°C, 16 時間反応させた。Phi29 DNA 複製酵素がコードされた DNA の量、GFP がコードされた RNA の量 (GFP RNA)、発現した GFP の蛍光を測定することで、それぞれ DNA 複製・転写・翻訳量の定量を行なった。

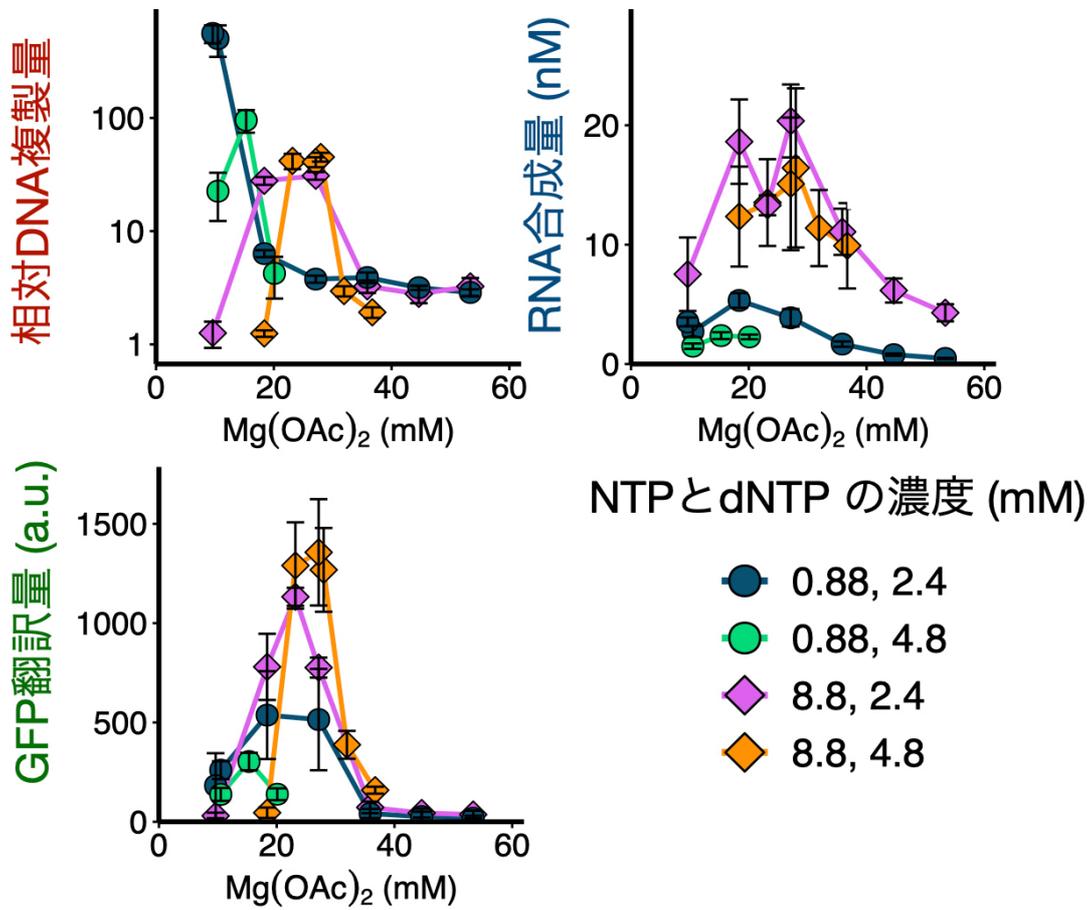


図 2.23 TTcDR 反応で rNTP と dNTP を加えた際の  $\text{Mg}^{2+}$  濃度による効果

TTcDR 反応において rNTP と dNTP, あるいはどちらかを DNA 複製量の最適条件 (rNTP 0.88 mM, dNTP 2.4 mM) から増やした場合の様々な  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  濃度の効果を示す. 実験と定量の手法は図 2.22 の通り. rNTP は 4 種類のリボヌクレオチド三リン酸が (rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25), dNTP は 4 種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸が (dATP/dGTP/dCTP/dTTP = 1:1:1:1) が含まれている. エラーバーは標準誤差を示す (n = 3) .

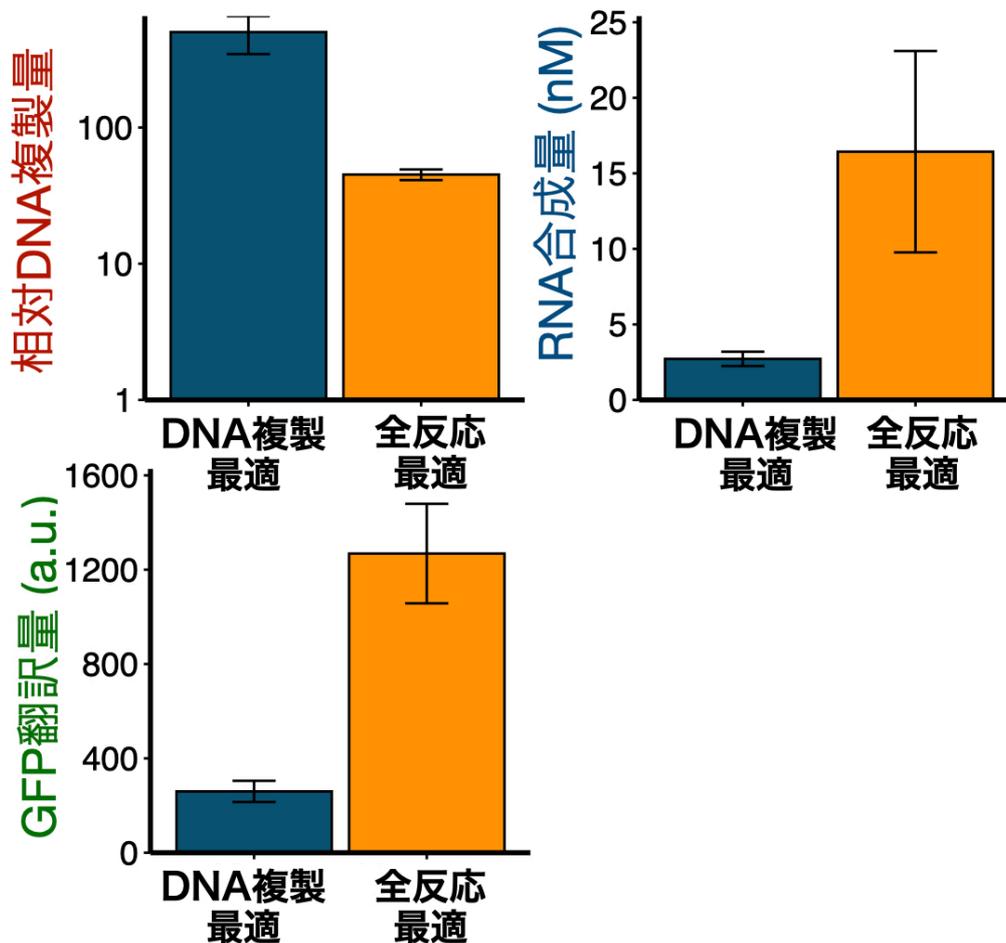


図 2.24 TTcDR における各反応の DNA 複製量最適条件と rNTP・dNTP 追加後、Mg<sup>2+</sup> 濃度調整後の比較

TTcDR 反応における DNA 複製量の最適条件 (rNTP 0.88 mM, dNTP 2.4 mM) と、rNTP を 10 倍、dNTP を 2 倍に増やして Mg<sup>2+</sup>濃度を最適化させた条件の各反応の比較。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。

スペルミジンは DNA 複製、転写、翻訳という三つの反応を阻害せず、そのうちどれか一つ以上を促進するという条件に該当する。このことから TTcDR 反応系でスペルミジンを増やせば反応が促進され、最終的な DNA 複製量が上がるのではないかと考えた。しかし、DNA 複製量最適濃度からスペルミジン濃度を上げるにつれて、DNA 複製量は下がった (図 2.25)。

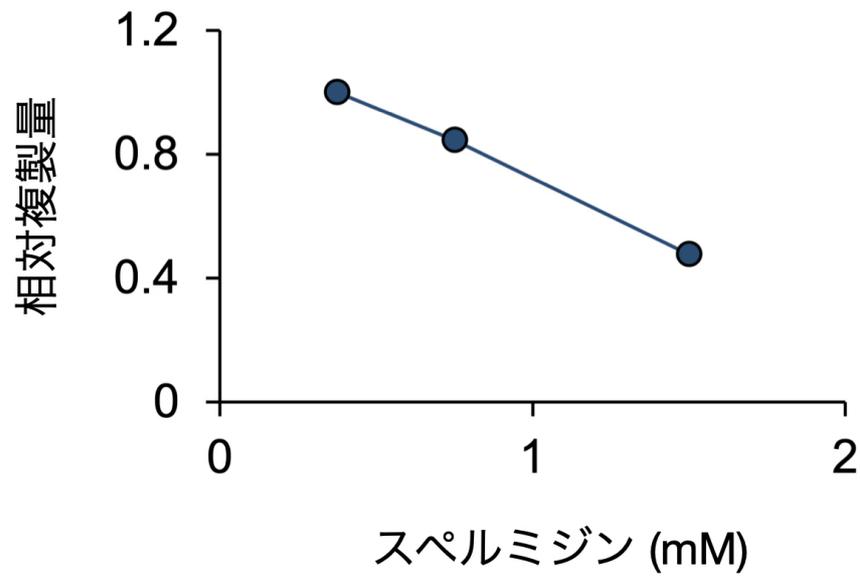


図 2.25 様々なスぺルミジン濃度での TTcDR 反応による相対 DNA 複製量

鋳型として phi29 DNA 複製酵素をコードした環状 DNA (0.05 nM) を用いて、様々なスぺルミジン濃度に調製した PURE システムを 30°C, 16 時間反応させた。複製された DNA の量は定量 PCR によって測定された。(n = 1)

## 2.5 考察

本章では PURE システムを用いた DNA 複製, 転写, 翻訳において全ての反応効率がより高い状態で共存できる条件を探するため, PURE システムに含まれる 11 種類の非タンパク質成分に着目し, DNA 複製, 転写, 翻訳に対するそれぞれの影響を調べた. その結果, 三つの反応を阻害する効果を持つ成分 (rNTP, tRNA, Glu-K, dNTP) を特定した. この中で rNTP と dNTP の阻害効果に対しては, 二倍量の  $Mg^{2+}$  を同時に添加することによって阻害効果が解消されることを示した. さらに TTeDR 反応において rNTP と dNTP を従来の DNA 複製量最適濃度よりも増やしつつ,  $Mg^{2+}$  濃度を調整したところ, 転写と翻訳の反応量を上げることに成功した.

### 2.5.1 DNA 複製に対する rNTP と tRNA の阻害効果について

DNA 複製に対する rNTP の阻害効果は先行研究において言及されていたものの, 高濃度 rNTP 条件における DNA と RNA 合成酵素の衝突が仮説として提示されていた (Han et al. 2022; van Nies et al. 2018). 実際に細胞内でも酵素同士の衝突を回避するための機構があると考えられている (Merrikh et al. 2012; Lang and Merrikh 2018). しかし, 本研究で行った実験では転写反応と独立して DNA 複製反応を行っているため, 異なるメカニズムによって阻害が起きたと考えられる. rNTP は  $Mg^{2+}$  と結合することが知られているため, rNTP のみを追加することで遊離  $Mg^{2+}$  濃度が変化し, それが DNA 複製反応に影響を与えたのではないかと考えた. 実際に rNTP と共に  $Mg(OAc)_2$  を追加することで一定まで DNA 複製量を回復することができた (図 2.19). しかし, 高濃度 rNTP 条件ではピークが鋭くなったことや,  $Mg^{2+}$  濃度を調整しても rNTP を入れない条件と比較して DNA 複製量が低かったことは, 遊離  $Mg^{2+}$  濃度意外にも阻害の原因がある可能性を示している. 他の可能性として考えられるのは DNA 合成酵素の基質ポケットへ rNTP が誤って取り込まれることである. 低効率ではあるものの, rNTP が DNA 複製酵素に取り込まれることが報告されている (Nick McElhinny et al. 2010). rNTP が誤って取り込まれると DNA 合成の進行が阻害され, 複製量が下がることが考えられる. 4 種類の DNA 複製酵素を対象とした研究では, 対象の酵素全てにおいて rCTP と比べて rUTP を厳密に判別したことが報告されている (Patel and Loeb 2000). 厳しい判別を行うためにより多

くの時間がかかっていることが DNA 複製の阻害につながっている可能性もある (図 2.7). また枯草菌の DNA ポリメラーゼ I への rNTP 阻害効果は低く, 他のポリメラーゼと比べると最適な  $Mg^{2+}$ 濃度の範囲が異なる, あるいは rNTP の取込みによる合成阻害の影響が薄いことが考えられる.

DNA 複製に対する tRNA の阻害効果について, GFP をコードした RNA でも同様に DNA 複製を阻害したことから, 配列由来ではなく RNA の物性によるものだと考えられる. またこの阻害効果は複数の DNA 複製酵素に対しても共通して見られた. クレノウ断片 (exo-) による複製も阻害したことは, エクソヌクレアーゼ活性は必要ないことを示している. この RNA による阻害のメカニズムは現状不明だが, 更に気になるのは生物の細胞内でどうやってこの問題に対処しているか, である. 細菌の細胞内 tRNA 濃度は多くて約  $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  と言われており, これは本研究の結果によると DNA 複製を十分に阻害する濃度であった. 生体分子は細胞内環境に適応していると広く考えられているが, RNA による阻害効果についても同様だとすると, 細胞内では阻害効果を回避するためにまだ知られてない機構が働いていると考えられる. DNA 複製に対する RNA の阻害効果を詳しく調べることによって, RNA 存在下でも十分な DNA 複製を可能とする細胞の新たな機構の解明につながるかもしれない.

### 2.5.2 転写反応に対する Glu-K の阻害効果について

転写反応の場合, Glu-K を始めとして他の塩についても阻害効果が見られた. また T7, T3, SP6 バクテリオファージ由来の RNA 合成酵素に対しては阻害効果があったものの, 大腸菌由来の RNA 合成酵素は阻害されなかった. 水溶液中のイオン強度が高いと RNA 合成酵素と鋳型 DNA, あるいは合成された RNA との静電結合を不安定にさせることが知られている (Cavac, Ramírez-Tapia, and Martin 2021). さらにプロモーター配列との親和性を示す結合定数 (高いほど親和性が低く, 低いほど親和性が高い) は, T7 RNA 合成酵素が  $220 \text{ nM}$  (Tunitskaya and Kochetkov 2002), 大腸菌 RNA 合成酵素が  $1 \text{ nM}$  (Vogel, Schulz, and Rippe 2002) と大きく異なる. これは大腸菌 RNA 合成酵素がプロモーター配列に対してより高い親和性を持っていることを示しており, 高塩濃度に対する耐性の理由の可能性がある.

高塩濃度耐性のメカニズムははっきりとわからないものの, 大腸菌 RNA 合成酵素を用いることで Glu-K による阻害を回避することができる. しかし,  $70 \text{ mM}$

の Glu-K 濃度において大腸菌 RNA 合成酵素は T7 RNA 合成酵素と比較すると 6% 程度の転写量しかなく、有効な解決策にはなっていない。翻訳反応は Glu-K が高い (150 nM) とよくなる傾向が見られたことから、大腸菌 RNA 合成酵素の改良による転写量の大幅な増加か、高塩濃度耐性を持つ T7 RNA 合成酵素の開発が行われれば、より良い条件で翻訳反応を進めることができるようになるだろう。

また本研究では DNA 複製反応も 280 nM の Glu-K で阻害されることがわかったが、一方で翻訳反応の活性は 150 mM の時とほとんど変わらなかった (図 2.5)。そのため、Glu-K と DNA 複製反応の関係については調べていない。

### 2.5.3 翻訳反応に対する dNTP の阻害効果について

翻訳反応を dNTP と共に行う際に  $Mg(OAc)_2$  を入れると阻害効果が解消されたことから、遊離  $Mg^{2+}$  濃度の減少が阻害効果の原因だという仮説を立てた。細胞抽出液を用いた他の無細胞系においても、無機リン酸の蓄積が遊離  $Mg^{2+}$  濃度を変動させることで翻訳反応を阻害するという、似た報告がある (Kim and Swartz 1999; Jewett and Swartz 2004)。遊離  $Mg^{2+}$  濃度は翻訳系においてリボソームや翻訳因子を安定化する役割を持つことから、dNTP の追加が阻害を引き起こしたのだと考えられた。そこで実験により詳しく調べた結果、dNTP 分子一つにつき  $Mg^{2+}$  が二つあると阻害がなくなることがわかった。この濃度比が効果的である理由については、いくつかの説が考えられる。一つ目は dNTP と  $Mg^{2+}$  を全て結合させるために必要な濃度比が 1:2 であった可能性である。水溶液中の  $Mg^{2+}$  と ATP の複合体については、 $Mg^{2+}$  が ATP のリン酸部位にある負電荷を持つ 4 つの酸素原子のうち、中心の二つ、あるいは三つと結合している状態が一般的であることが知られている (Liao et al. 2004)。dNTP についても 1 分子に対して  $Mg^{2+}$  が 1 分子結合することで阻害効果がなくなると仮定した際、結合親和性 ( $K_D$ ) の観点から等濃度ではそれが達成できない可能性がある。そこで  $Mg^{2+}$  を二倍入れておくことによって結合が十分に起き、阻害効果が解消されたことが考えられる。

二つ目は電荷が中和されたことによってリボソームの安定化が図られた、という説である。NTP は一分子に対して一つの  $Mg^{2+}$  が結合することが知られているが、二つ結合する場合も報告されている (Sari et al. 1982; Bishop et al. 1981)。また複数の NTP 分子によって複数の  $Mg^{2+}$  の電荷を相殺している可能性

も考えられる。実際にイオン価を見ると整合が取れている（例えば  $dATP^{4-}$  に  $2Mg^{2+}$ ）。今後はリン酸基と  $Mg^{2+}$  の関係について分子レベルの解析を行うことでこの阻害効果について明らかにすることができるだろう。

#### 2.5.4 TTcDR 反応への応用について

DNA 複製，転写，翻訳を共役させた TTcDR 反応においてポリアミンの一種であるスペルミジンを足すと DNA 複製量が下がったことについて，DNA 複製酵素とポリアミンの関係について調べた研究では，一定量のポリアミンは DNA 複製を促進するのに対し過度な量は DNA 複製を阻害することが報告されている。しかし，本研究で DNA 複製とスペルミジンの関係について調べたところ，ほとんど影響を与えないという結果になった。これは転写翻訳と DNA 複製を共役させて成分濃度を変えた場合，必ずしもそれぞれの反応に対する効果が反映されるわけではないことを示している。

TTcDR 反応において  $Mg^{2+}$  濃度を調整することは rNTP と dNTP を追加することによる基質の追加に効果的だった。これにより， $Mg^{2+}$  調整前は基質を追加しても反応量が上がらなかった転写と翻訳についても上げることができた。DNA 複製については基質追加前よりも複製量は低かった。これは mRNA も多く生産されることから，DNA 複製を阻害したことによるものではないかと予想される。また DNA 複製量は約 40 倍とこれまで行われてきた継代実験には十分であることから，一定の複製量を保つことに成功したと考えられる (Okauchi and Ichihashi 2021; Hagino and Ichihashi 2023; Libicher and Mutschler 2020)。



## 2.6 手法

### 標準反応溶液の組成

PURE システムに含まれる 11 種類の非タンパク質因子からなる反応溶液成分の標準濃度は以下の通りである： 0.36 mM システインとチロシンを除く 18 種類のアミノ酸 (和光), 0.3 mM システイン (和光), 0.3 mM チロシン (和光), 25 mM クレアチンリン酸 (ナカライテスク, 日本), 0.6 mM の dNTPs (Takara), 6 mM のジチオスレイトール (ナカライテスク), 10 ng/μL の 10-ホルミル-5,6,7,8-テトラヒドロ葉酸 (先行研究に従って調製 (Yoshihiro Shimizu and Ueda 2010)), 70 mM グルタミン酸カリウム (和光), 100 mM HEPES-KOH (pH 7.6, Sigma-Aldrich), 10.5 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0.38 mM rATP (GE ヘルスケア), 0.25 mM rGTP (GE ヘルスケア), 0.125 mM rCTP (GE Healthcare), 0.125 mM rUTP (GE Healthcare), 0.38 mM スペルミジン (ナカライテスク), 0.52 μg/μL 大腸菌 tRNA 混合物 (Roche). 以上の濃度は先行研究を参考にした (Okauchi and Ichihashi 2021).

20 種類のアミノ酸, 4 種類の rNTP はすべて混合してから濃度を変更した. また rNTP と dNTP を増やす (または減らす) 場合, Mg(OAc)<sub>2</sub> 濃度も同じモル数まで増やした (または減らした). すなわち, rNTP と dNTP が同じモル数のマグネシウムイオンと結合すると仮定していたが, 本研究によってそれでは不十分だということが示された (議論部分を参照のこと).

### Phi29 DNA ポリメラーゼによる DNA 複製アッセイ

反応溶液 (10 μL) は, 0.1 nM 鋳型プラスミド (pUC19), 1 U/μL の精製 Φ29 DNA ポリメラーゼ (EquiPhi29 DNA ポリメラーゼ, Thermo Fisher), 5 μM のランダム ssDNA ヘキサマー, 1 U/μL RNase インヒビター (Promega), および様々な濃度の 11 種の非タンパク質成分からなる. 反応後, 混合物の一定量を 1 mM EDTA (pH 8.0) で 1000 倍に希釈し, Mx3005P (Agilent Technologies) を用いて, TB Green Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) (Takara) とプライマー 1 および 2 を用いた定量 PCR により DNA 濃度を測定した. tRNA の影響を調べる場合, 大腸菌 tRNA 混合物 (Roche) を PureLink RNA Mini Kit (Thermo Fisher) を用いて精製し, DNase I (Takara) と 37°C で 30 分間反応させた後, 反応溶液に加えた. ヌクレオチドについて調べるために AMP (ナカライテスク) を追加

で使用した.

### 各種 DNA ポリメラーゼを用いた DNA 複製アッセイ

ニッキング酵素を用いた複製アッセイには, 0.5 U/ $\mu$ L のクレノウ断片 (大腸菌 DNA ポリメラーゼ I のラージフラグメント) (Takara), 0.5U/ $\mu$ L のクレノウ断片 (3'→5'エキソ, New England BioLabs), および 0.5U/ $\mu$ L の枯草菌由来 Pol I (Bsu DNA ポリメラーゼ, ラージフラグメント, New England BioLabs) を用いた. 反応混合物は, プライマー3 および 4 を使用して, ニッキング部位を含むプラスミド (pUC-phi29DNAP-loxP\_Nick1) から調製した Nb.BbvCI 部位を含む 25 nM の直鎖 DNA を含む. 0.5 U/ $\mu$ L のニッキングエンドヌクレアーゼ (Nb. BbvCI, New England BioLabs), 2.5 mM の各 dNTP (Takara), および様々な濃度の 11 の非タンパク質因子を含む混合物を 37°C で 15 分間反応させた後, 1% アガロースゲル電気泳動にかけた. DNA を蛍光色素 (SAFELOOK Load-Green, 富士フイルム, 日本) で染色し, 化学発光イメージングシステムで検出した. *T. aquaticus* YT-1 (rTaq DNA Polymerase, Takara, 0.5 U/ $\mu$ L) の Pol I のアッセイには, プラスミド pUC-phi29DNA- P\_loxP\_Nick1, プライマー3 および 4 を用い, 94°C で 2 分間インキュベートした後, 98°C で 10 秒間/60°C で 5 秒間/72°C で 2 分間のサーマルサイクリングを 15 回行った. 大腸菌 Pol III のアッセイには, oriC 依存性の環状 DNA 複製を, 大腸菌の他の複製因子を用いて, メーカーのプロトコルに従って行った (OriCiro Cell-free Cloning System, OriCiro Genomics). PCR とローリングサークル増幅からの反応溶液を 1% アガロースゲル電気泳動にかけ, 上述の方法で染色した.

### 転写反応のアッセイ

異なるプロモーターを持つ GFP をコードする直鎖 DNA 断片を鋳型として用いた. T7, T3, または SP6 プロモーターを持つ DNA 断片は, T7 プロモーター下で GFP 遺伝子を含む先に構築したプラスミド (pET-GFP) を鋳型として (Sunami et al. 2010), それぞれプライマー5 と 6, プライマー5 と 7, またはプライマー5 と 8 を用いて PCR により調製した. 同様に, pUC-GFP を鋳型とし, プライマー9 と 10 を用いて PCR を行い, 大腸菌 T5 プロモーターの DNA 断片を調製した. 反応混合物は, 直鎖 DNA 断片各 1 nM, 1.75 U/ $\mu$ L T7 RNA ポリメラーゼ (Takara), 5 U/ $\mu$ L T3 RNA ポリメラーゼ (New England BioLabs),

5 U/ $\mu$ L SP6 RNA ポリメラーゼ (Takara), または 0.1 U/ $\mu$ L 大腸菌 RNA ポリメラーゼホロ酵素 (New England BioLabs), 1 U/ $\mu$ L RNase 阻害剤, および 11 種類の非タンパク質因子を様々な濃度で含む. 他の塩の影響を調べるために, アスパラギン酸カリウム (ナカライ), グルタミン酸ナトリウム (ナカライ),  $Mg(OAc)_2$  (ナカライ) を混合した. 混合物を 37°C で 2 時間反応させた. 混合物のアリコートに 1mM EDTA (pH8.0) で 1000 倍に希釈した後, プライマー-11 を用いて 65°C で 5 分間反応させ, 氷上で急速に冷却した. この混合物を, PrimeScript 逆転写酵素 (Takara) を用いて, 42°C で 30 分間, 70°C で 15 分間逆転写した. SP6 と大腸菌 RNA ポリメラーゼで反応させた溶液は, さらに 1mM EDTA (pH8.0) で 100 倍に希釈した. 次に溶液の一部を, プライマー-12 および 13 を用いて, Mx3005P (Agilent Technologies) を用いた TB Green Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus) (Takara) による定量 PCR で測定した. プライマー-14 および 15 を用いて, pET-GFP を鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により調製した, GFP 遺伝子をコードする既知の濃度の RNA 断片を, 定量のための標準試料として用いた.

### 翻訳のアッセイ

GFP をコードする RNA 断片は, pET-GFP を鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用い, プライマー-14 と 15 を用いて *in vitro* 転写により調製した. 反応溶液には, RNA 断片 (100 nM), 実験室で調製した PURE システムの全タンパク質因子 (表 2.1), リボソーム, 前述した濃度の tRNA (調製方法は以下を参照 (Okauchi et al. 2020)), および前述した 11 種類の非タンパク質因子を含む. この溶液を 37°C で 4 時間反応させ, Mx3005P (Agilent Technologies) を用いて GFP 蛍光を測定した.

### TTcDR 反応のアッセイ

先行研究で得られた変異型 phi29 DNA ポリメラーゼをコードするプラスミド (Evo3) を環状の鋳型 DNA として用いた (Okauchi and Ichihashi 2021). pET-GFP を鋳型として T7 RNA ポリメラーゼを用い, プライマー-14 と 15 を用いて GFP をコードする DNA 断片を調製した. 反応溶液には, 環状鋳型 DNA (0.05 nM), GFP をコードする DNA 断片 (0.05 nM), T7 RNA ポリメラーゼ (Takara), PURE システムに含まれる全てのタンパク質因子 (表 2.1), リボソーム, tRNA,

および 11 の非タンパク質因子を上記の標準濃度で添加した。その後反応溶液を 30°C で 16 時間反応させた。複製、転写、翻訳反応は上記のそれぞれのアッセイと同様に測定した。スペル微塵を追加した際は GFP の鋳型 DNA 入れておらず、DNA 複製反応についてのみ測定を行なった。rNTP は 4 つのリボヌクレオチド三リン酸を以下の比率で含む ( rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 3.75:2.5:1.25:1.25)。また dNTP は 4 つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸を以下の比率で含む ( dATP/dGTP/dCTP/dTTP = 1:1:1:1)。

表 2.1 PURE システムに含まれるタンパク質成分の一覧

名前	濃度	名前	濃度
Initiation factor 1	25 $\mu$ M	Glycyl-tRNA synthetase	86 nM
Initiation factor 2	1 $\mu$ M	Histidyl-tRNA synthetase	85 nM
Initiation factor 3	4.9 $\mu$ M	Isoleucyl-tRNA synthetase	370 nM
Elongation factor G	1.1 $\mu$ M	Leucyl-tRNA synthetase	41 nM
Elongation factor Tu	80 $\mu$ M	Lysyl-tRNA synthetase	120 nM
Elongation factor Ts	3.3 $\mu$ M	Methionyl-tRNA synthetase	110 nM
Release factor 1	49 nM	Phenylalanyl-tRNA synthetase	130 nM
Release factor 2	48 nM	Valyl-tRNA synthetase	17 nM
Release factor 3	170 nM	Methionyl-tRNA formyltransferase	590 nM
Ribosome recycling factor	3.9 $\mu$ M	Myokinase	1.4 $\mu$ M
Alanyl-tRNA synthetase	730 nM	Creatine kinase	250 nM
Arginyl-tRNA synthetase	31 nM	Nucleoside diphosphate kinase	16 nM
Asparaginyl-tRNA synthetase	420 nM	E. coli pyrophosphatase	41 nM
Asparagyl-tRNA synthetase	120 nM	Trigger factor	1 $\mu$ M
Cysteinyl-tRNA synthetase	24 nM	E. coli DEAH type RNA helicase A	100 nM
Glutamininyl-tRNA synthetase	60 nM	Ribosome	1 $\mu$ M
Glutamyl-tRNA synthetase	230 nM		

表 2.2 プライマー配列

プライマー	配列
プライマー1	CGAGCGCAGAAGTGGTCC
プライマー2	CAAACGACGAGCGTGACACC
プライマー3	GACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG
プライマー4	CATACAGCATATCAGATGTGAGTTCG
プライマー5	GCGTCCGGCGTAGAGGATC
プライマー6	TCCGGATATAGTTCCTCCTTTCAG
プライマー7	CGATCCTAATTAACCCTCACTAAAGACTATAGGGGAATTGTGAGCGG
プライマー8	CGATCCTATTTAGGTGACACTATAGACTATAGGGGAATTGTGAGCGG
プライマー9	GGCGATTAAGTTGGGTAACGCC
プライマー10	CCGGCTCGTATGTTGTGTGG
プライマー11	TAAGCGAATGTTGCGAGCACGACTTCAGCACGCGTCTTG
プライマー12	TAAGCGAATGTTGCGAGCAC
プライマー13	CTGTTCCATGGCCAACACTTG
プライマー14	GCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG
プライマー15	GGTTATGCTAGTTATTGCTCAGCGG

### 3 熱と界面による分子濃集を用いた RNA 複製

#### 3.1 本章の研究目的

自己複製を行うシステムにおいて寄生体による乗っ取りを防ぐために有効な手段として区画構造が理論と実験の両面から検証された(Szathmáry and Demeter 1987; Ichihashi et al. 2013). 一方で閉じた区画構造は外部からの栄養供給を困難にさせる点や(Oberholzer, Nierhaus, and Luisi 1999), 区画構造としてよく使われるリポソームや油中水滴, 液液相分離 (Liquid-Liquid Phase Separation; LLPS) による区画などは実験的には簡単に作成できるものの自然界での発生については研究が少ない点などの問題がある. そこで物理的な区画を使わずして分子濃集を可能とするのが熱と界面による分子濃集システムを原始地球の区画構造の代わりとして提案する. このシステムは温度差のある液体と気液界面で生じる物理的な効果を利用したものである. また, この分子濃集は, 実際に確認までは至っていないものの自然界においての発生も想定されている(Morasch et al. 2019; Salditt et al. 2023). これまで分子濃集機構を用いていくつかの生化学反応が試されて来たが, 複製体と寄生体の関係に着目した研究はまだない. そこで原始地球における自己複製体のモデルとして QB RNA 複製酵素による RNA 複製系を使用することとした(Mills, Peterson, and Spiegelman 1967; Ichihashi 2019). この RNA 複製系を対象として区画構造による寄生体の抑制に関する研究がいくつか行われており, 区画構造と寄生体の関係性を調べるために適していると考えたためである(Kita et al. 2008; Urabe et al. 2010; Bansho et al. 2012; Ichihashi et al. 2013; Furubayashi et al. 2020; Mizuuchi, Furubayashi, and Ichihashi 2022). 分子濃集効果によって RNA は界面付近に集まるが, 配列の短い寄生体 RNA はより拡散してしまうため, 配列の長い宿主 RNA が多く濃集する. この効果を用いることで寄生体 RNA による複製阻害を受けることなく宿主 RNA は複製できると考えられる. そこで本研究では, 熱と界面による分子濃集機構が RNA の複製系において宿主と寄生体の分離に及ぼす効果を調べることを目的とした.

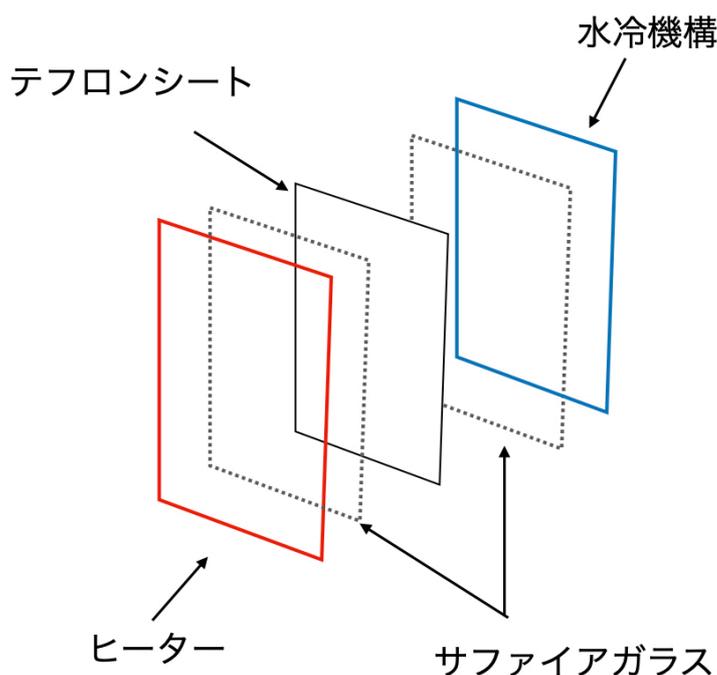


ードされた宿主 RNA (N96, 5 nM) と寄生体 RNA (s222, 5 nM) の両方, あるいはそのどちらかが鋳型 RNA として用いられた. 鋳型 RNA を入れず, 精製酵素のみで反応も行った. アガロース電気泳動によって RNA のバンドを検出した. 上の矢印は複製した宿主 RNA のバンドを, 下の矢印は寄生体 RNA のバンドを示す.

### 3.2.2 分子濃集に用いる装置の種類と概要

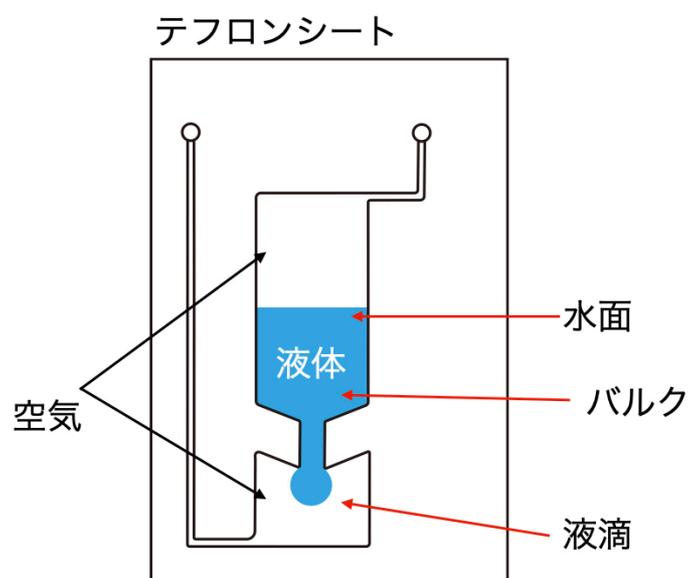
実際に対象とする RNA が熱と界面による分子濃集システムによって実際に濃集するか確認を行う必要がある. 今後, 分子濃集を行う装置をサーマルトラップと呼称する. このサーマルトラップについての概要と, 本研究で用いた種類について説明する.

サーマルトラップは水溶液を平べったい空間の中に閉じ込め, 両面の温度をコントロールすることで温度勾配を作り出す装置である. 片方の面には熱を加えるためにヒーターが, もう片方には水冷機構が取り付けられている. サファイアガラスで挟み込むテフロンシートに任意の形状で反応場を切り出し, そこに溶液を注入することで熱と界面による分子濃集を実現する. 今回は液滴状の気液界面を作り出すドロップレット式 (図 3.3) と, 溶液中の脱ガス反応によって底面の凹凸部分に生じる泡と上部の水面部分という二つの場所で気液界面ができるバブル式 (図 3.4) の二つの形状を使用した.



### 図 3.2 サーマルトラップ装置の概要

熱と界面による分子濃集を行うためのサーマルトラップ装置の概略図。温度勾配を作り出すために片方の面には加熱用のヒーターを、もう片方は低温を保つために水冷機構を取り付けている。中の様子を目視かつ顕微鏡撮影をするため、サファイアガラスでテフロンシートが挟まれている。テフロンシートは必要な形状に切り取られており、この形状によって内部に注入する溶液への効果が異なる。上図では略しているが、サファイアガラスとヒーター及び水冷機構の間には熱を均等に伝えるためのグラファイト製シートがつけられている。



### 図 3.3 ドロップレット式サーマルトラップの概要

テフロンシートの形状を示す。上部の穴から液体を注入することで液滴を形成する。赤矢印は、凍結抽出の際に抽出した箇所を示している。以降のドロップレット式サーマルトラップを用いた実験の結果では液滴界面部分を IF, バルク部分を Bulk と記載した。

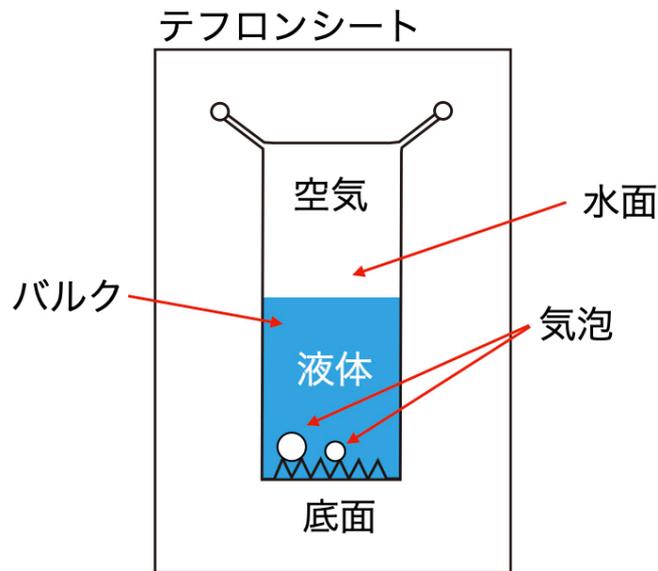


図 3.4 バブル式サーマルトラップの概要

テフロンシートの形状を示す。上部の穴から液体を注入することで液滴を形成する。赤矢印は、凍結抽出の際に抽出した箇所を示している。底面には凹凸の形状が切り出されており、時間経過によって脱ガスに由来する気泡が生じる。以降のバブル式サーマルトラップを用いた実験の結果では底面の気泡部分を Bubble、上部の水面部分を IF、それ以外のバルク部分を Bulk と記載した。

### 3.2.3 サーマルトラップを用いた RNA の濃集条件の検討

引き続き宿主 RNA (N96) と寄生体 RNA (s222) を用いてサーマルトラップ内での分子濃集について検討した。まず宿主 RNA と寄生体 RNA が 500 nM 入った溶液を調製し、ドロップレット式のサーマルトラップ内で 30°C–40°C の温度勾配で 2 時間反応後、凍結させて切り出した界面とバルクのサンプルをアガロース電気泳動で確認した。すると宿主 RNA と寄生体 RNA のバンドはそれぞれ確認できたものの、宿主 RNA が濃集効果により濃縮されて濃度が高くなっている様子は確認できなかった (図 3.5)。

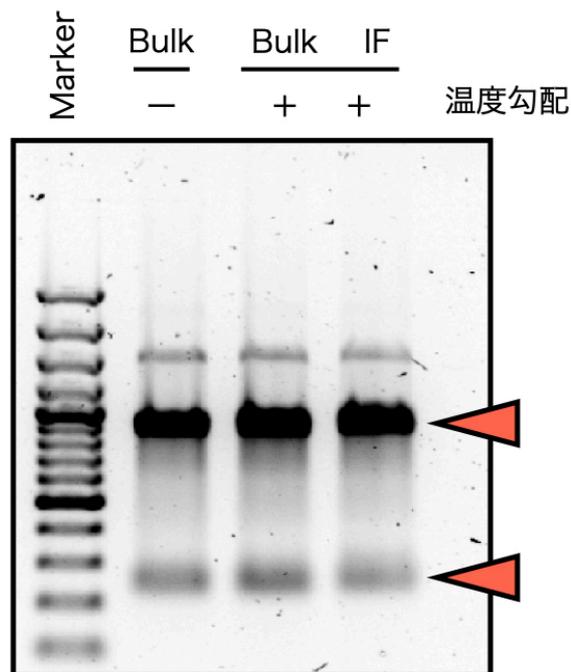


図 3.5 アガロース電気泳動による高濃度の宿主 RNA 溶液検出と濃集の条件検討

QB RNA 複製酵素遺伝子がコードされた宿主 RNA (N96, 50 nM) と寄生体 RNA (s222, 50 nM) の溶液をドロップレット式のサーマルトラップ内で反応させた後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結させ、液滴界面部分 (IF) とそれ以外 (バルク) に分けて抽出を行った。コントロールとして RNA 溶液をチューブに入れ、室温で放置した。その後、アガロース電気泳動で RNA のバンドを検出した。上の矢印は複製した宿主 RNA のバンドを、下の矢印は寄生体 RNA のバンドを示す。

濃集による濃度の差が確認できなかったのは初期濃度が高かったからだと考えた。そこで初期濃度を低くした上で (25 nM) 再び同様の実験を行った。すると室温に置いた RNA のバンドは確認できる一方で、抽出した RNA のバンドがほとんど確認できなかった (図 3.6)。考えられる原因の一つとして、温度勾配による RNA の熱分解があった。バンドの消失が RNA の熱分解によるものか検証するために、温度勾配の最大値である  $40^{\circ}\text{C}$  で RNA 溶液をインキュベートしたが、室温に置いたものとはほぼ変わりなかった (図 3.7)。バンドが消失した原因としてもう一つ考えられるのは、そもそも抽出した溶液に RNA が含まれていない場合である。今回の実験系において温度勾配をかけると液滴が縮小し界面

が移動することが確認されていた。一度は界面に RNA が濃集したとしてもガラス壁面などに付着してしまい、RNA がロスするためではないかと考えた。実験中にガラス壁面に無数の水滴が生じる。この液滴の縮小による界面の移動は、蒸発量が多く、液滴側への凝結量が少ないことが原因ではないかと考えた。そこで水滴がガラス面に付着せず、液滴への凝結量が増える条件を探るため、気液界面の上下方向の逆転、純水のみでの反応、ガラスに界面活性剤を塗布しないという条件でそれぞれ RNA 溶液を用いた実験を行った (図 3.8)。しかしどの条件においても水滴の発生と液滴の縮小は確認された。界面活性剤を塗布しない条件において RNA のバンドが確認できたものの、液滴と呼べる界面は存在しなかった。他、界面における RNA の濃集も起きている様子はない。

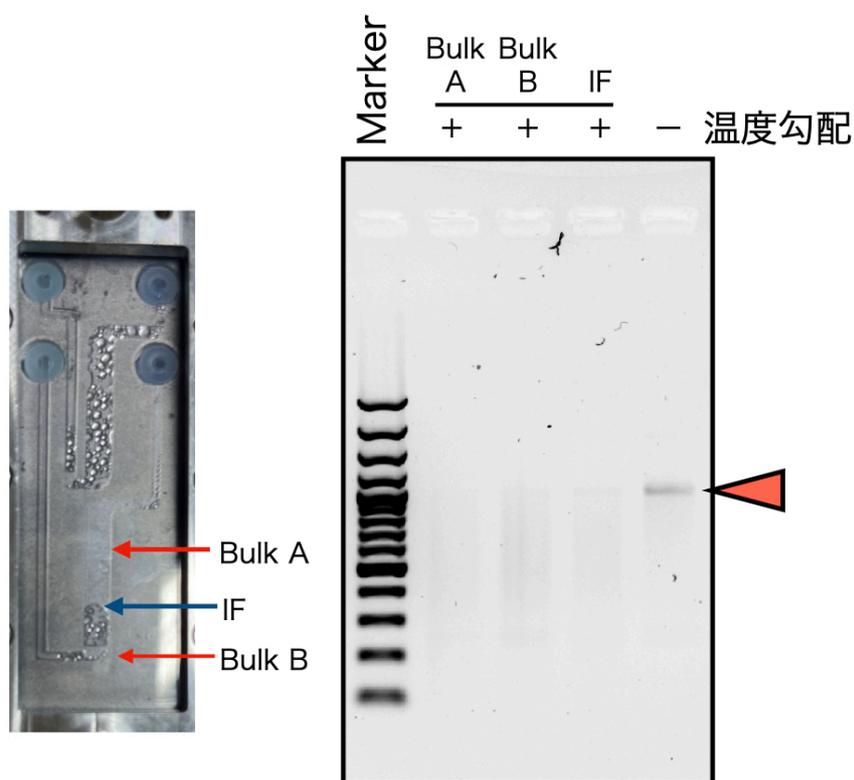


図 3.6 アガロース電気泳動による低濃度の宿主 RNA 溶液検出と濃集の条件検討

QB RNA 複製酵素遺伝子がコードされた宿主 RNA (N96, 25 nM) と寄生体 RNA (s222, 25 nM) の溶液をドロップレット式のサーマルチップ内で反応させた後、 $-80^{\circ}\text{C}$  で凍結させた。二つのバルク部分 (Bulk) と液滴界面部分 (IF) に分けて抽出を行った。その後、アガロース電気泳動で RNA のバンドを検出した。矢印は宿主 RNA のバンドを示す。

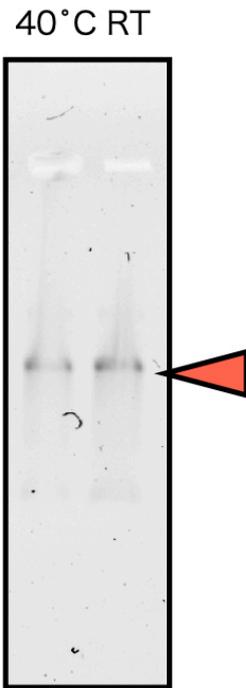


図 3.7 RNA 溶液の熱分解条件の検討

Q $\beta$  RNA 複製酵素遺伝子がコードされた宿主 RNA (N96, 25 nM) の溶液を 40°C と室温で 1 時間インキュベートしたものをアガロース電気泳動にかけた。矢印は宿主 RNA のバンドを示す。

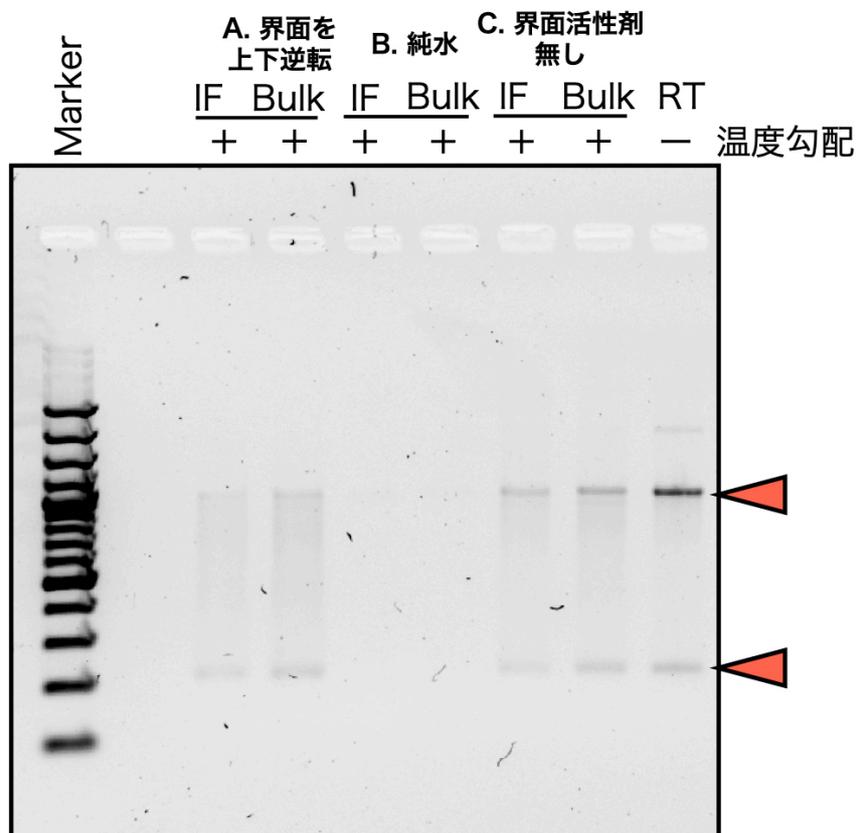
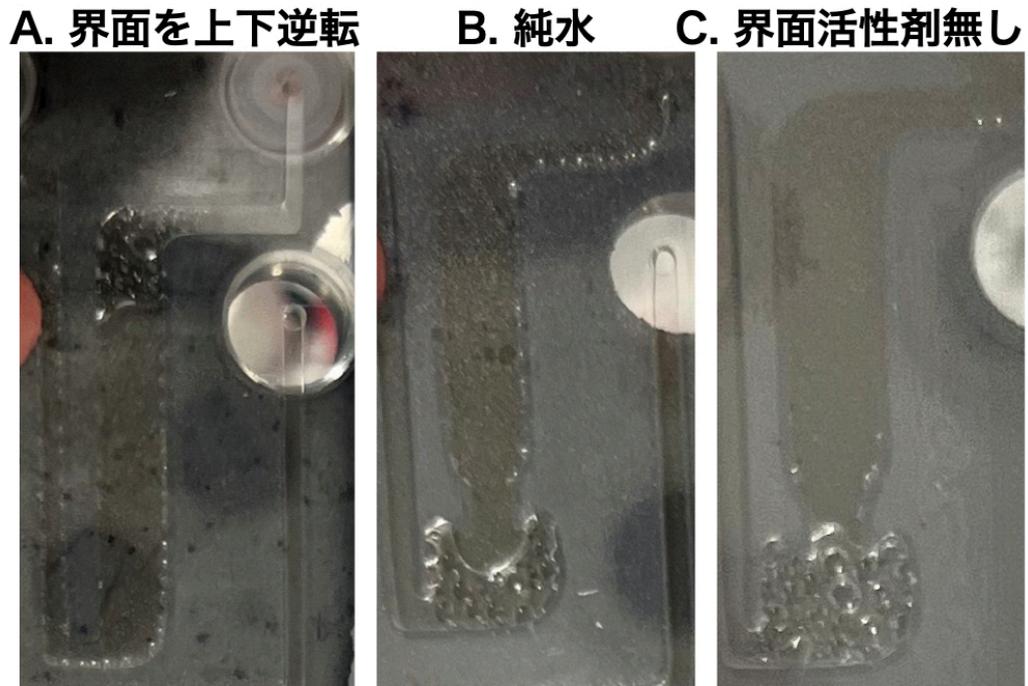


図 3.8 様々な条件によるドロップレット式サーマルトラップでの界面安定化条件の検討

Q $\beta$  RNA 複製酵素遺伝子がコードされた宿主 RNA (N96, 25 nM) と寄生体 RNA (s222, 250 nM) の溶液を上下逆転させたトラップ、ガラスへの界面活性剤の塗布を行わなかったトラップで反応させた。また純水のみを入れたサーマルトラップでの反応も行った。その後、 $-80^{\circ}\text{C}$  による凍結を経て液滴界面(IF)、それ以外のバルク(Bulk)、室温で放置したコントロール (RT) で抽出を行い、アガロースゲル電気泳動で RNA の検出を行った。上の矢印は宿主 RNA のバンドを、下の矢印は寄生体 RNA のバンドを示す。

以上の条件を試したものの、アガロースゲル電気泳動による RNA 濃集効果の検出はできなかつたため、次に蛍光顕微鏡を用いることで蛍光試薬によって染色した RNA を観察した。宿主 RNA がそれぞれ 2.5 nM, 50 nM 含まれる溶液と、Q $\beta$  RNA 合成酵素によって RNA を複製させた溶液を蛍光試薬によって染色した上でドロップレット式サーマルトラップに封入し、蛍光顕微鏡で観察を行った(図 3.9)。すると全ての溶液において気液界面に強い蛍光が見られた。次に純水と Q $\beta$  RNA 合成酵素の反応液を染色して比較してみたところ、純水の方では 30 分以降の液滴界面にて弱い蛍光が確認できた。一方で Q $\beta$  RNA 合成酵素による反応液からなる液滴には 0 分時から強い蛍光が確認できた。以上のことから宿主 RNA が実際に気液界面に濃集していることが示唆された。

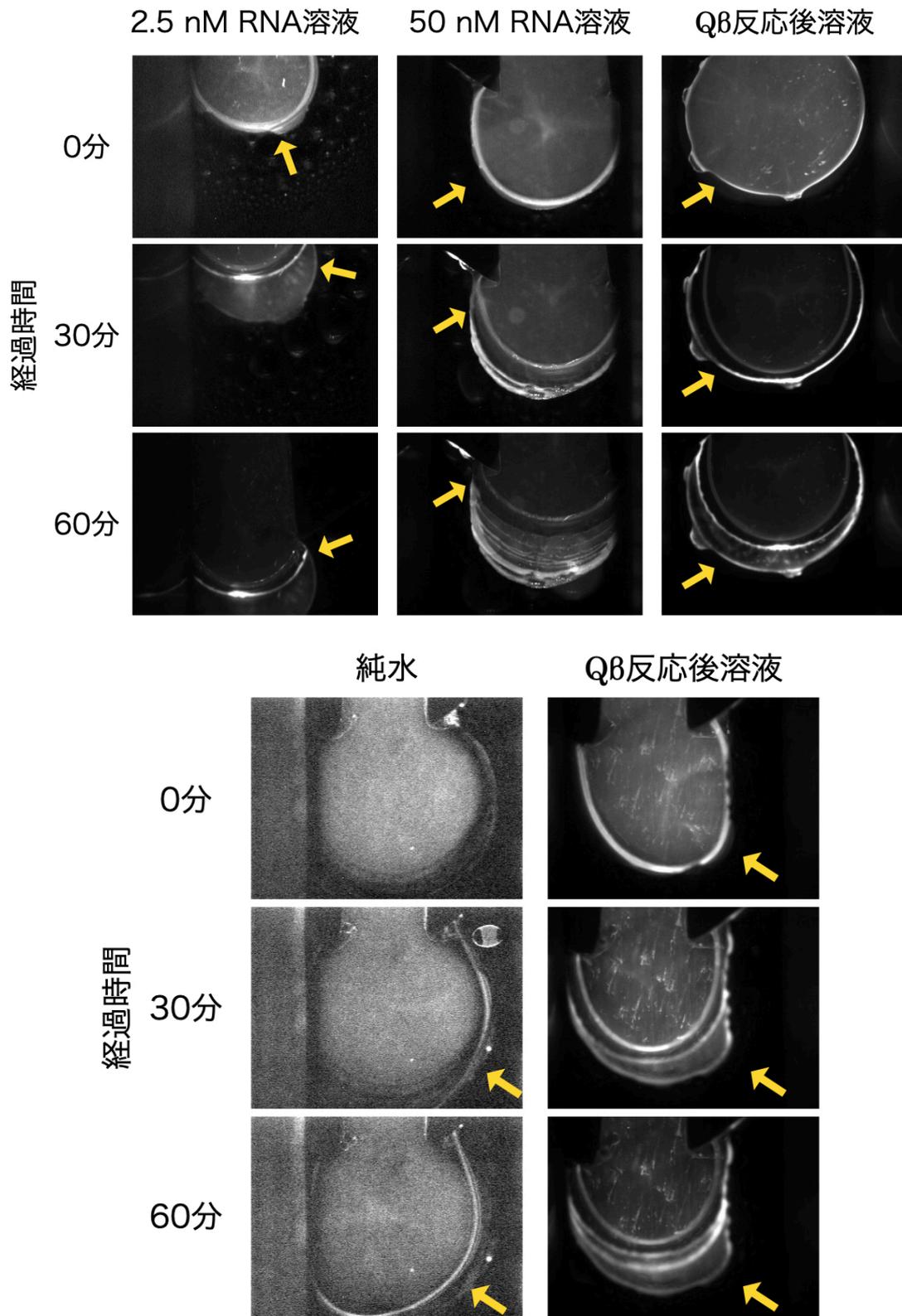


図 3.9 ドロップレット式サーマルトラップを用いた熱と界面による RNA 分子濃集の蛍光顕微鏡観察

ドロップレット式サーマルトラップ内に核酸染色試薬 (SYBR Green II) を加えた様々な溶液を封入し、蛍光顕微鏡で1時間の間、10分置きに顕微鏡撮影を行った。蛍光強度は自動で調整される。液滴界面に蛍光が見られる箇所は黄色い矢印で示した。上：Q $\beta$  RNA 複製酵素遺伝子がコードされた宿主 RNA 溶液 (N96, 2.5 nM と 50 nM) と、宿主 RNA (N96, 5 nM) を鋳型として精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素により 37°C, 1時間の条件で反応させた RNA 複製後溶液を用いた。下：同様の RNA 複製後溶液と純水の比較を行った。

熱と界面による分子濃集機構による RNA の濃縮が確認できたもののドロップレット式では界面が安定しないことから濃集した RNA の抽出が安定して行えないことが問題であった。そこで気液界面を作る別の方法としてバブル式に着目した。バブル式サーマルトラップは脱ガス反応による気泡が底面にできるというシステムで、上部の水面部分と合わせて二つの気液界面を観察することができる。バブル式のサーマルトラップを用いて Q $\beta$  RNA 合成酵素による RNA 複製溶液を反応前後でサーマルトラップに封入し、30–40°C の温度勾配で反応させ、蛍光顕微鏡で観察したところ、反応後の溶液において底面の泡と水面部分の両方において RNA の蛍光が確認できた (図 3.10)。実際にこのサーマルトラップを凍結させ、泡部分、水面部分、バルクに分けて抽出し、アガロース電気泳動を行ったところ、水面部分と泡部分で宿主 RNA のバンドが見られた (図 3.11)。バルクについては宿主 RNA のバンドが見られなかったことから、宿主 RNA の濃集が界面で起きていることが示唆された。

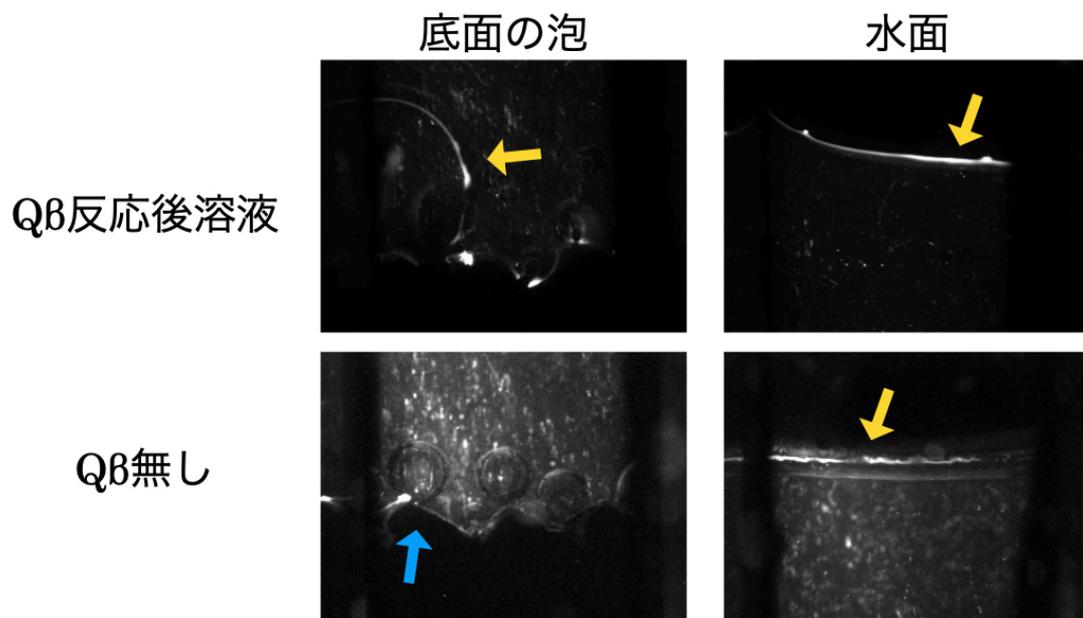


図 3.10 バブル式における熱と界面による RNA 分子濃集の蛍光顕微鏡を用いた観察  
 宿主 RNA (N96, 5 nM) を鋳型として精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素を入れた溶液と入れない溶液で 37°C, 1 時間の条件で反応させ, それらを, バブル式サーマルトラップ内に核酸染色試薬 (SYBR Green II) を加えた上で封入し, 蛍光顕微鏡で撮影を行った. 気液界面ができる箇所として底面部分にできる泡と水面を対象に, 6 時間経過後に撮影した. 蛍光強度は自動で調整される. 蛍光が見える部分は黄色い矢印で, 蛍光は見えていないが気泡が見える部分は青い矢印で示した.

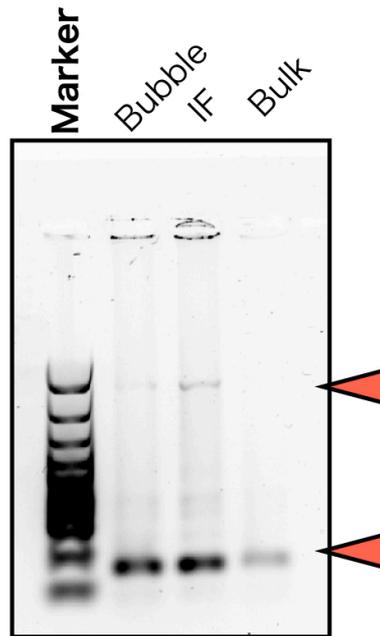


図 3.11 熱と界面で濃集した RNA の分析

宿主 RNA (N96, 2.5 nM) を鋳型として精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素を入れ, 37°C, 1 時間の条件で反応させた溶液をバブル式のサーマルトラップに封入し, 反応させた. その後, -80°C による凍結を経て底面部の泡 (Bubble), 水面(IF), それ以外のバルク(Bulk)に分けて抽出を行い, アガロースゲル電気泳動で RNA の検出を行った. 上の矢印は複製した宿主 RNA のバンドを, 下の矢印は寄生体 RNA のバンドを示す.

### 3.3 分子濃集システム中での RNA 複製反応

ドロップレット式及びバブル式サーマルトラップの両方で用いることで RNA の濃集が確認できたため、次に精製 Q $\beta$  RNA 合成酵素を用いた RNA 複製をサーマルトラップ内で分子濃集させながら行った。通常の濃度条件では溶液の全体で RNA 複製が起きてしまい、分子濃集の効果の検出が困難になる。そこで溶液を希釈することで全体の反応率を下げ、分子濃集が起きている場合に高い RNA 複製が起きることを期待し、適当な希釈率の検討を行った。精製 Q $\beta$  RNA 合成酵素を宿主 RNA が含まれる反応溶液と混ぜ、純水で希釈系列を作成した後、反応させた。その後アガロース電気泳動を行うと、二倍希釈した反応溶液で薄いバンドしか見られないという結果となった (図 3.12)。そこで二倍希釈を採用した。

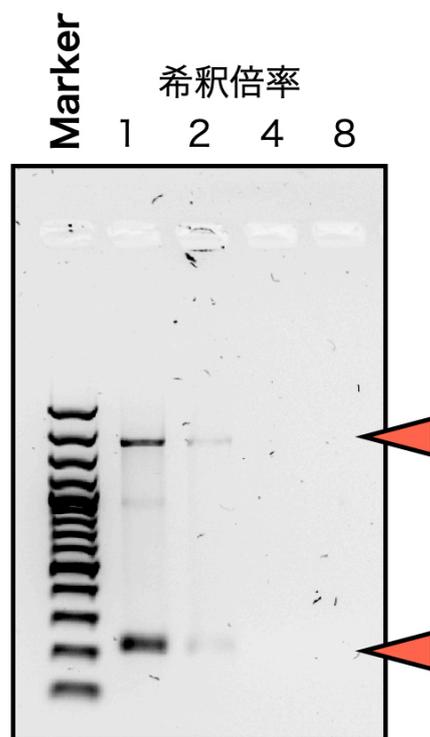


図 3.12 精製 Q $\beta$ RNA 複製酵素を用いた複製反応溶液の希釈倍率の検討

宿主 RNA (N96, 5 nM) を鋳型とする精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素の反応溶液を調製した後、純水を用いて 2, 4, 8 倍の希釈系列を調製した。それらを 37°C, 1 時間の条件で反応させた後、アガロースゲル電気泳動を用いて RNA の検出を行った。上の矢印は複製した宿主 RNA のバンドを、下の矢印は寄生体 RNA のバンドを示す。

次に、ドロップレット式サーマルトラップの形状を微調整することによってこれまでの課題だった界面の安定性を改善することに成功した。それと同時に $-80^{\circ}\text{C}$ で急速冷凍する際に冷やされた気体部分の素早い体積圧縮によって、液滴界面が移動してしまう問題も新たに見つかった。そこでこれまでは溶液注入のために取り付けて、冷凍後のサンプル抽出時まで外していなかったテフロンチューブを、サンプル注入後にすぐ外すことにした。代わりに穴部分にテフロン製の栓を詰めることで圧縮される気体がほとんどなくなり、急速に冷凍をしても界面の移動がほぼ見られなくなった。そこでドロップレット式を使いつつ、反応時間を短くした状態で宿主 RNA と寄生体 RNA が濃集した上での複製を調べるため、実験を行った。

精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素による RNA 複製系において鑄型として 2.5 nM の宿主 RNA を加え、さらに 0.025 nM あるいは 2.5 nM の寄生体 RNA を混ぜた二倍希釈溶液をドロップレット式サーマルトラップ内に封入した。そして 30–40 $^{\circ}\text{C}$  あるいは 20–40 $^{\circ}\text{C}$  の温度勾配で 2 時間反応させた。コントロールとして 0.2 mL チューブに入れた希釈前と希釈後溶液を 37 $^{\circ}\text{C}$  で 2 時間反応させ、これをバッチ条件とした（つまりこの時の希釈前溶液における宿主 RNA 濃度は 5 nM、寄生体 RNA は 0.05 nM か 5 nM）。どちらも反応後に $-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍し、抽出を行なった後、RNA を検出した（図 3.13, 図 3.14）。さらにアガロースゲル電気泳動の結果を元にバンド強度を測り（図 3.15, 図 3.16）、そこから寄生体 RNA と宿主 RNA の濃度比を計算した（図 3.17）。この濃度比の値が小さいほど、宿主 RNA の量が寄生体 RNA より多く検出されていることを示す。

まず全体的に濃度比を見た時、寄生体 RNA の初期濃度が 0.025 nM の条件（赤）よりも 2.5 nM の条件（青）で複製した場合の方が寄生体・宿主 RNA の濃度比が小さく、宿主 RNA の方が多く検出されていることがわかる。次により詳しく比較を行う。比べるべきは分子濃集が起きる条件である液滴界面の値 (IF) と分子濃集が起きないコントロール条件 (Batch) の値である。寄生体 RNA の初期濃度が 0.025 nM の場合、温度勾配 30–40 $^{\circ}\text{C}$  で反応させた条件では液滴界面とコントロールの値はほぼ変わらない。一方で温度勾配 20–40 $^{\circ}\text{C}$  で反応させた際の濃度比はコントロールよりも小さく、宿主 RNA が寄生体 RNA と比較して多く検出されている。寄生体 RNA の初期濃度が 2.5 nM の場合でも温度勾配 20–40 $^{\circ}\text{C}$  で反応させた時に液滴界面での値がコントロール条件 (Batch) よりも低く、分子濃集効果によって宿主 RNA が複製されていることが示された。また

サーマルトラップ内で反応させる時は分子濃集が起きる部分以外での反応量を低くするために二倍希釈を行っている。希釈によって寄生体 RNA の阻害効果が小さくなる可能性を考え、二倍希釈した条件の溶液も 0.2 mL チューブで反応させた (Batch 二倍希釈)。希釈無しと有りの条件で比較すると、希釈無しの方が濃度比は低いことから、希釈による宿主 RNA 選択の効果はないことがわかった。以上のことから熱と界面による分子濃集によって宿主 RNA を選択的に濃縮することが示された。

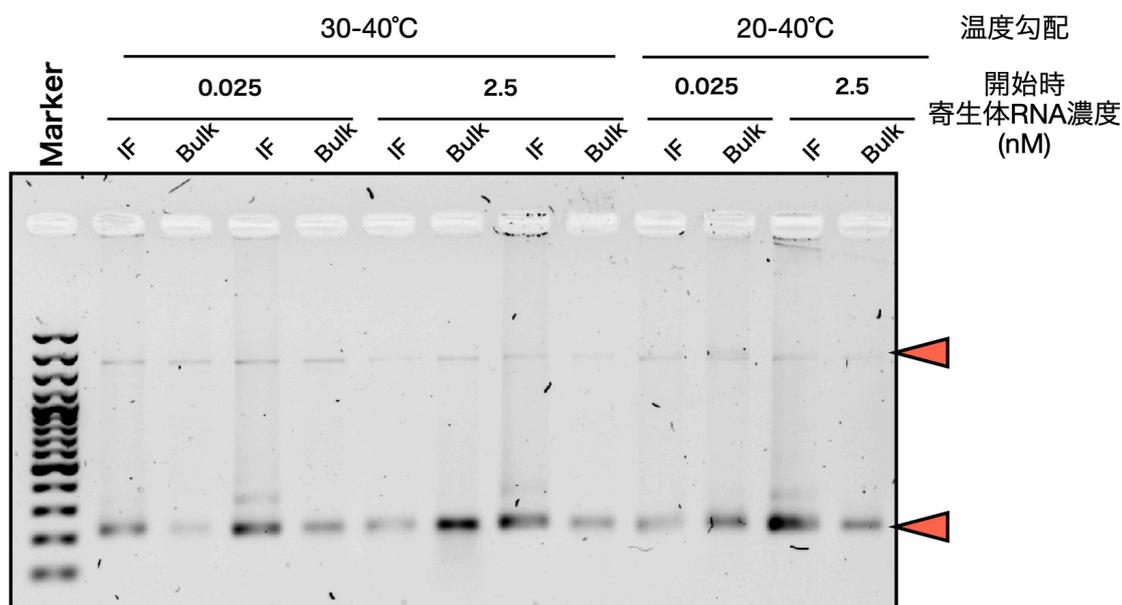


図 3.13 ドロップレット式サーマルトラップを用いた RNA 複製反応

最終濃度が 2.5 nM になるように宿主 RNA (N96) と 2.5 nM あるいは 0.025 nM になるように寄生体 RNA (s222) を加えて鋳型とする精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素の反応溶液を調製し、純水による二倍希釈を行った。それらをドロップレット式サーマルトラップに封入し、30–40°C あるいは 20–40°C の温度勾配で 2 時間反応させた。その後–80°C で凍結を行い、液滴界面 (IF) とそれ以外 (Bulk) に分けて抽出し、アガロースゲル電気泳動を用いて RNA を検出した。バルクのサンプルについては RNA 濃度が薄くそのままだとバンドが検出できないため、他よりも 3–5 倍量の液量で検出を行なった。上の矢印は複製した宿主 RNA のバンドを、下の矢印は寄生体 RNA のバンドを示す。

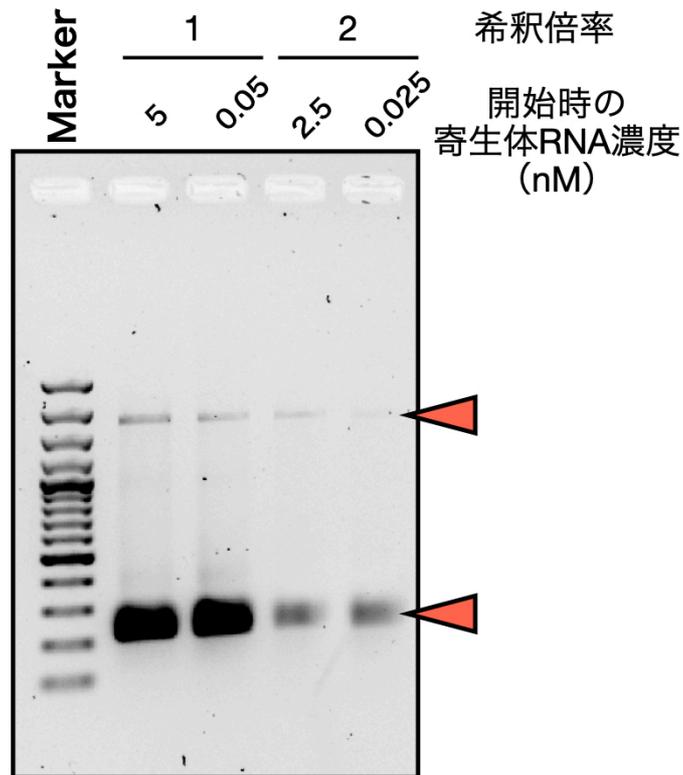


図 3.14 バッチにおける RNA 複製反応

宿主 RNA (N96, 2.5 nM) と寄生体 RNA (s222, 2.5 nM または 0.025 nM) を加えて鋳型とする精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素の反応溶液を調製した後、希釈したものとそうでない溶液を PCR チューブに入れ、37°C で 2 時間反応させた。その後 -80°C で凍結を行い、アガロースゲル電気泳動を用いて RNA を検出した。上の矢印は複製した宿主 RNA のバンドを、下の矢印は寄生体 RNA のバンドを示す。

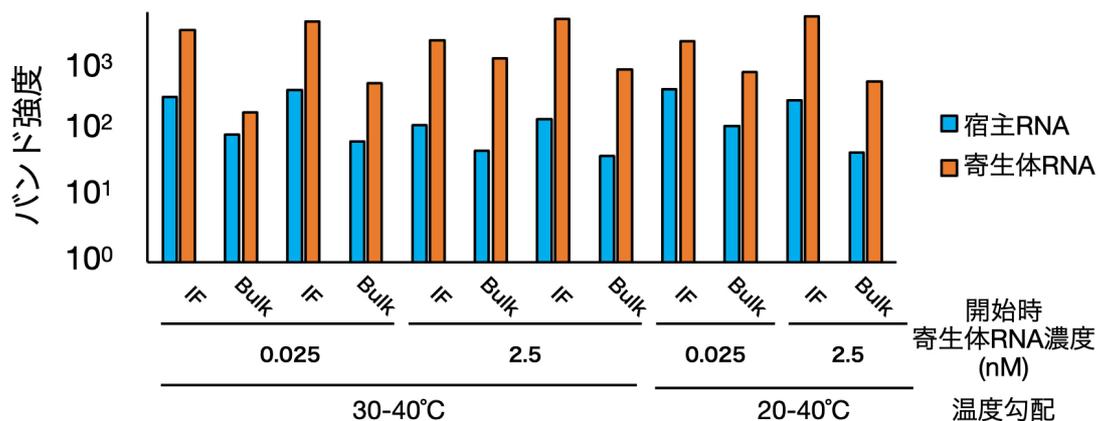


図 3.15 ドロップレット式サーマルトラップを用いた RNA 複製反応結果のバンド強度による定量

アガロースゲル電気泳動の結果 (図 3.13) から, Fiji を用いてバンド強度を調べた. バルクのサンプルについては RNA 濃度が薄くそのままだとバンドが検出できないため, 他よりも 3-5 倍量の液量で検出を行っていたが, その分の補正をした.

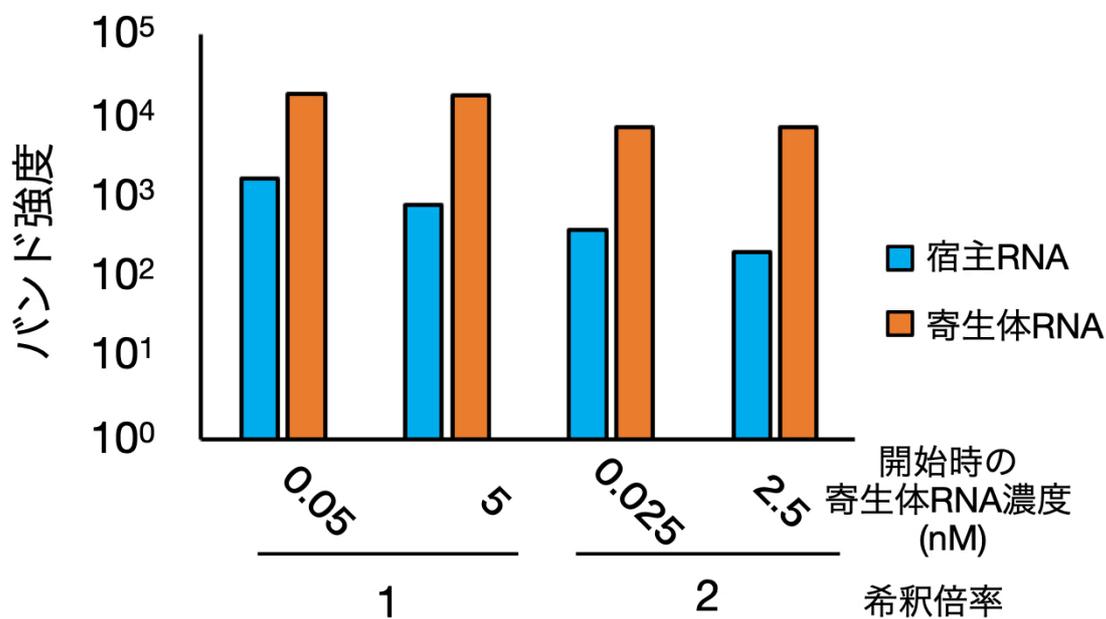


図 3.16 精製 Q $\beta$  RNA 複製酵素を用いた RNA 複製反応のバッチにおける結果のバンド強度による定量

アガロースゲル電気泳動の結果 (図 3.14) から, Fiji を用いてバンド強度を調べた.

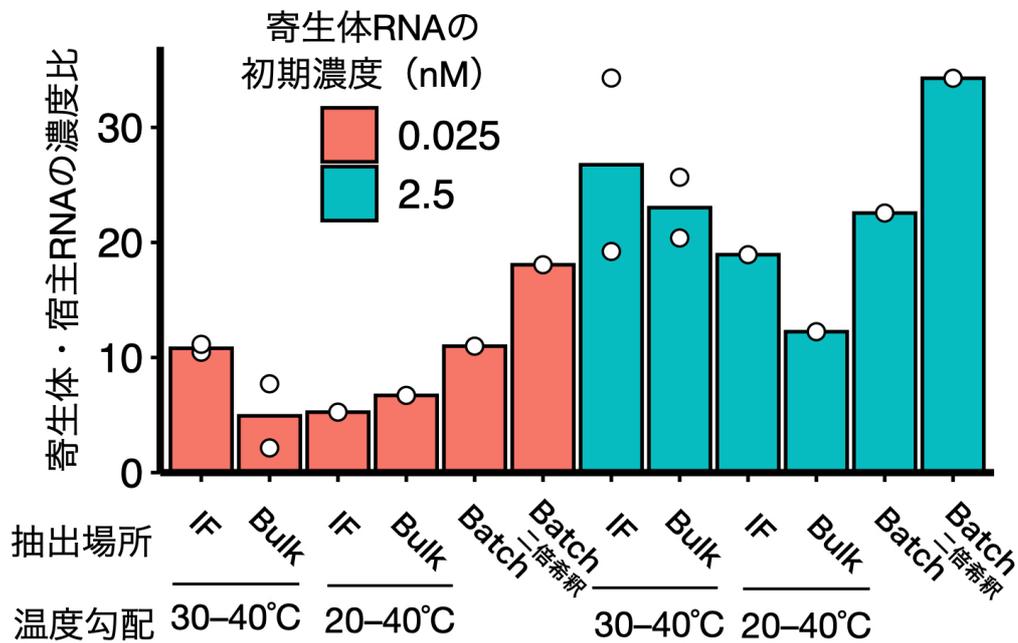


図 3.17 ドロップレット式サーマルトラップを用いた RNA 複製反応における寄生体宿主 RNA 比による比較

アガロースゲル電気泳動の結果から調べたバンド強度 (図 3.15, 図 3.16) を元に, 寄生体 RNA と宿主 RNA の濃度比を計算した. 界面は液滴界面由来, バルクはそれ以外の部分から抽出したサンプル, バッチはコントロールとして 0.2 mL チューブで反応させたサンプルのことを指す. 白い点はそれぞれの実験値を示す.

## 3.4 考察

### 3.4.1 RNA 濃集の検出について

宿主 RNA と寄生体 RNA, あるいは宿主 RNA のみを混ぜた溶液をサーマルトラップ内で反応させ, 抽出を行っても RNA が検出されなかった (図 3.6, 図 3.8). 一方, 蛍光顕微鏡でサーマルトラップ内の撮影を行うと, RNA が界面付近に濃集している様子が確認できた. また温度勾配をかけた際, 時間経過によって界面の移動がしていることとそれに伴って蛍光箇所が跡を残すように移動していることが確認された. これは濃集した RNA が界面の移動に伴ってガラス壁面に付着していたことを示唆している. つまり界面の移動が RNA の抽出ができなかった理由だと考えられる.

### 3.4.2 パラサイト宿主 RNA 濃度比の変化について

ドロップレット式のサーマルトラップ内で分子濃集を起こしながら精製 QB RNA 合成酵素を用いた RNA 複製を行い, 装置内部の異なる地点から溶液を抽出した. それらに含まれる RNA を検出するためにアガロースゲル電気泳動を行い, その結果からバンド強度を調べ, 寄生体 RNA と宿主 RNA の濃度比を求めた. この濃度比が低いほど宿主 RNA が寄生体 RNA に比べてより多く検出されたことを示している. それは宿主 RNA が分子濃集によって寄生体 RNA よりも選択された結果, RNA 複製が進んだことによるものと考えられる. 結果を見ると寄生体 RNA の初期濃度が 0.025 nM と 2.5 nM の両方の場合において, 20–40°C の温度勾配で反応させた場合の液滴界面から抽出した方が, 分子濃集がない条件で反応させた時よりも寄生体と宿主 RNA の濃度比が低かった (図 3.17). 温度勾配が 30–40°C の際は濃度比が液滴界面と分子濃集がない条件で同じ程度になっていたことから, 30–40°C では RNA が濃集するための熱拡散及び対流の力が弱く, 配列の長さをもたらす RNA の拡散速度の違いによって宿主 RNA の濃集が十分に起きなかったことが原因だと考えられる.

液滴界面以外の部分であるバルクにおける寄生体と宿主 RNA の濃度比は, 温度勾配 20–40°C の結果を見ると寄生体 RNA の初期濃度が 2.5 nM の条件では界面部分よりも低いことがわかった. バルク部分は分子濃集効果を受けていないため, ここでは宿主 RNA の選択は起きていないはずである. バルク部分は RNA 濃度が低いため, 電気泳動を行う際バンドを検出するために他の 3–5 倍量

の溶液をゲルに流していることから、実際に含まれる RNA 濃度は低い (図 3.15)。またバルク部分で検出される RNA は、液滴界面部分で複製された後、溶液中の拡散によってバルク部分に移動したのも含まれる。以上のことから温度勾配 20–40°C かつ寄生体 RNA 初期濃度 2.5 nM の条件でバルク部分の寄生体宿主 RNA 濃度比が小さいのは低濃度の RNA が拡散によりバルク部分に移動した結果によるものであり、分子濃集による選択が起きているわけではないと考えている。実際に分子濃集が起こらない条件 (Batch, Batch 二倍希釈) では濃度比は高く出ている。今後は実験回数を増やし、再現性を確かめる必要がある。また抽出時の手技によって結果がばらつくことが確認されている。より濃度比の差が大きくなる条件、つまり温度勾配が大きい条件で実験を行うことでこれまでよりさらに宿主 RNA の選択率を上げ、抽出時のばらつきを考慮した上でも濃度比の差が見えやすくなると考えられる。

## 3.5 手法

### RNA濃集条件の検討

宿主 RNA として先行研究によって得られた Q $\beta$  RNA 複製酵素をコードしている N96 を (Ichihashi et al. 2013), 寄生体 RNA を先行研究によって得られた s222 を使用した (Hosoda et al. 2007). 電気泳動は 1% アガロースゲルを使用した. また先行研究と同様の手順で精製された Q $\beta$  RNA 複製酵素 1 $\mu$ M (Kita et al. 2006) は鋳型 RNA と反応溶液 (125 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mg/mL bovine serum albumin, 1.25 mM の rNTP) 中にて 37°C で反応が行われた. rNTP はリボヌクレオチドが以下の比率で含まれている

(rATP/rGTP/rCTP/rUTP = 1:1:1:1).

### サーマルトラップ装置の概要

サーマルトラップ装置は目的の形状に切り取られた薄いテフロンシート (厚さ 0.5 mm, FEP-Teflon, Holscot) を反応場とする形で作られた. テフロンは透明なサファイアガラスに挟まれており, 冷やされた背面側のガラス (厚さ 0.5 mm, Kyburz, レーザーによって開けられた穴あり) と熱せられる正面のガラス (厚さ 2mm, Kyburz, 穴なし) によって構成される. テフロンシートの形状はインベントア (Autodesk) によって設計され, カットプロッター (CE6000-40 Plus, Graphtec) によって切り取られた. ドロップレット式の設計は Alexander Floroni に, バブル式の形状に関する設計は Felix Dänekamp にお願した. サファイアガラスに水冷部分のアルミニウムプレートとヒーターから熱を均等に伝導させるため二種類のグラファイトシート (背面部には厚さ 25 mm, EYGS091203DP, 1600 W mK<sup>-1</sup>, Panasonic, 正面部には厚さ 200 mm, EYGS0811ZLGH, 400 W mK<sup>-1</sup>, Panasonic) が貼り付けられた. これらの層はステンレス製のフレームにネジで組み込まれた. 溶液の注入はサファイアガラスに開いた穴を通して, マイクロ流体用のインレット/アウトレットテフロン製チュービング (KAP 100.969, Techlab), フィッティングとフェルール (VBM 100.823 と VBM 100.632, Techlab) を用いて行われた. 撮影は蛍光顕微鏡 (Axiotec, Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH), LED (622 nm, ThorLabs), 励起光フィルター (470 nm/622 nm), 吸収フィルター (537 nm/694 nm) によって行われた. 温度のコントロールと撮影は LabVIEW により自作さ

れたプログラムが用いられた。反応後のサーマルトラップは即座に-80°C 冷凍庫で冷凍された。溶液の抽出時はサーマルトラップを取り出し、装置を分解した上で、溶液が溶けないようにドライアイスで保冷しつつ、溶液の該当部分に当たる氷をステンレスナイフで切り出し、回収した。

表 3.1 プライマー配列

プライマー16	GCTGCCTAAACAGCTGCAAC
プライマー17	CGCTCTTGGTCCCTTGTATG
プライマー18	TCTAGAAAGTCTCCGGCTGA
プライマー19	GCAGTGACGCAACATATCC

## 4 まとめ

### 4.1 無細胞系における DNA 複製, 転写, 翻訳の共存条件に関する研究についてのまとめと展望

DNA 複製, 転写, 翻訳反応の共存条件の探索を行った. その結果, 三つの反応に必要なが他方を阻害する 4 つの成分を発見した. それらは DNA 複製を阻害する rNTP と tRNA, 転写反応を阻害する Glu-K, 翻訳反応を阻害する dNTP だった. これらの成分について詳しい分析を行った結果, dNTP と rNTP の阻害効果について適切な  $Mg^{2+}$  濃度比 (1 分子の dNTP · rNTP に対して 2 分子の  $Mg^{2+}$ ) があれば阻害効果を十分に打ち消せることがわかった. DNA 複製反応において  $Mg^{2+}$  濃度の最適化は一般的に知られる手法であるが, 本研究では基質として用いられることはない rNTP による阻害効果について対応した点, 反応を回復することができる濃度比を明らかにしたという点の 2 点が新たに示された. また翻訳反応に対する dNTP の阻害効果を回復したことについても同様の点について新たに示すことができた. また適切な  $Mg^{2+}$  濃度による反応の回復を応用するため, 次の実験を行なった. まず三つの反応を共役させた TTcDR 反応において, dNTP と rNTP 濃度のみを上げた. すると転写反応と複製反応の基質濃度を上げたにも関わらず, 三つの反応はほとんど起こらない状態だった. そこで同じ条件で  $Mg^{2+}$  濃度を適切な濃度比に従い調整したところ, 一定の DNA 複製量を保ちながら転写と翻訳量を上げることに成功した.

また本研究では RNA の阻害効果に対する解決策を発見することは出来なかった. 一方でこの阻害効果は試験管内の再構成実験を行うことによって発見されたことであり, 新たな疑問の創出に貢献している. 細胞内には tRNA や mRNA, rRNA など様々な RNA が存在している. 生物がこれらの RNA の阻害効果を回避する術を持っているのであれば, それらを改めて利用することで TTcDR システムをより効率的に動かすことができる様になると考えられる.

今後は TTcDR システムを元に, 自律的に自らを複製する人工細胞に近づけるため, さらに複雑にすることが考えられている. TTcDR 反応では phi29 DNA 複製酵素のみが PURE システムによって発現されていたが, 今後は PURE システムに含まれる転写翻訳因子も自身で生産することができる自己生産能力の開発が求められる. すでにアミノアシル化酵素や tRNA の遺伝子をあらかじめ

入れておいた PURE システムで発現,あるいは転写する.そこでアミノアシル化酵素や tRNA を抜いた PURE システムを供給すると,自己再生産した成分を利用して翻訳を行うようなシステムが開発されている(Miyachi, Shimizu, and Ichihashi 2022; Hagino and Ichihashi 2023). またリボソームについても,修飾酵素が完全に解明されていない 23S rRNA 以外については PURE システムを用いた再構成が実現している(Shimojo et al. 2020; Aoyama et al. 2022). また大腸菌抽出液を使うことで 23S rRNA の問題も解決されていることから,完全に *in vitro* でリボソームが再構成される日も近いだろう(Kosaka et al. 2022). 他の翻訳因子に関しても現在研究が進められている(Doerr et al. 2021; Wei and Endy 2021). 細胞の他の要素として分裂や外部からのエネルギー取り込みなどがあり,生命とするには高い壁があるものの,セントラルドグマと自己複製系の再構成及び再生産ができれば,人工細胞の根幹部分は作れたと考えられる(De Capitani and Mutschler 2023). 自己を再生産して自律的に複製する人工細胞の作成によって非生命と生命の境界条件についての理解が深まることが期待される.

## 4.2 熱と界面による分子濃集を用いた RNA 複製に関する研究 についてのまとめと展望

熱と界面による分子濃集を用いた RNA 複製に関する研究を行なった。まず分子濃集システムを用いた RNA 濃集を試みた。いくつかの条件を試した後、RNA が液滴の界面に濃集している様子を蛍光顕微鏡で撮影し、観察すること成功した。次に宿主 RNA と寄生体 RNA を鋳型とした精製 Q $\beta$  RNA 合成酵素による RNA 複製を熱と界面による分子濃集機構の中で行なった。反応後、RNA を抽出して宿主 RNA と寄生体 RNA の濃度比を調べたところ、特に 20–40°C の温度勾配条件で宿主 RNA が選択的に濃集されるという結果が得られた。これは熱と界面による分子濃集機構が宿主 RNA の選択率に影響を及ぼすことを示している。本研究の結果は原始地球で起こりうる区画構造の様なシステムが寄生体による複製阻害から自己複製体を守ることができる点を初めて実験的に示した。

さらに熱と界面による分子濃集はこれまでの区画構造における弱点だった金属イオンによる影響を受けず(Chen, Salehi-Ashtiani, and Szostak 2005; Jin et al. 2018), 複製に必要な栄養供給もバルク部分から行うことができる。先行研究では溶液中に作り出した気泡をまるで細胞膜のように脂肪酸で補強することで、より気泡を安定させた状態で分子濃集を行っている(Tekin et al. 2022)。熱と界面による分子濃集によって自己複製体の配列が進化し、化学進化がある程度進んだ状態になってから、膜のような細胞に似た区画構造が導入されたと考えることもできるだろう。

次の段階として複製酵素を用いた RNA 複製系に翻訳系を組み合わせることが考えられる。これにより自己複製系が達成される。自己複製が行われれば宿主 RNA の複製は指数関数的に進行するため、これまでより寄生体と宿主 RNA の濃度比が顕著に現れると考えられる。一方で翻訳系を組み合わせると必要な反応物質の数が増え、システムが複雑になることから、分子濃集システムとの両立は難しくなる。より頑健性のある条件を見つけることが課題となるだろう。

ここで生命の起源研究の目的について述べる。今後は生物誕生以前の状態に関する知見を組み合わせながら、研究を進めることになる。前提として生命誕生以前の状態については物質証拠が見つかっておらず、見つかる希望も現在のところはない(Morrison, Runyon, and Hazen 2018)。そのため、我々はあり得た物理化学的な現象から過去の状態を推定するしかない。よって RNA ワールドの

ような推定された状態は起こり得たか証明しようがない。一方で、実際には起こらなかった道筋を通して生命の誕生を再現したとすれば、それは十分に価値があることだと考える。生命誕生の道筋は複数あっても構わず、そのうちの一つでも明らかになれば、より過去の環境で起こりやすそうな道筋を推定することに役に立つからである。そのために生命の起源についての研究は行われるべきである。

話を戻すと、本研究で用いられた RNA 複製系は複製酵素というタンパク質が用いられていることから、RNA ワールド以降の原始細胞を想定している。特に Q $\beta$  複製酵素は翻訳因子を持っているため、現在の翻訳システムの完成以降に誕生したと考えるのが自然である。また自己複製する最小 RNA として 20 塩基程度の長さを持つものが見つかっている(Mizuuchi and Ichihashi 2023)。これであれば不安定であるために非生物的反応であまり配列長を長くすることができない RNA でも達成しうる長さである(Rajamani et al. 2008; Cafferty and Hud 2014)。こういった化学的なシステムと生命由来の部品からなるシステムの溝を少しずつ埋めていくことによって、原始細胞とそれ以前の間の景色が解明されることが期待される。

## 謝辞

本論文の研究は多くの方の支えと助けの上で行われました

市橋伯一教授には研究活動の基礎である問題の提起, 研究の進め方, そして最後にどう形にするかといった一連のプロセスを学ばせていただきました. また修士時代までは主に別分野の研究を行っていた私に, 丁寧に生化学分野についての知識と手法をご教示いただきました. 多大なる感謝を申し上げます.

水内良さんは学部生の時からの知り合いで, 大変長いことお世話になりました. 同じ研究室になってからは私の研究に対して鋭い指摘やコメントを何度も頂きました. 感謝を申し上げます.

岡内宏樹さん, 上浦陸十さん, 萩野勝己さん, 宮地亮多さんには研究及び研究外でも楽しく緻密な議論をさせていただきました. また湯川香東さん, 植田健介さん, 太田和樹さん, 前田祐太郎さん, 土井航一さん, 谷口慶悟さん, 岡田健成さん, 平田隼大さん, 武田朋大さんといった研究室のメンバーにも大変お世話になりました. 感謝を申し上げます.

また第 3 章の研究はミュンヘン, ドイツにある Ludwig-Maximilians 大学の Braun グループと共に行いました. 2 ヶ月という短い間ではありましたが, 共同研究を提案してくれた Prof. Dieter Braun, 忙しい中実験を手取り足取り教えてくれた Alexander Floroni, そして私を快く受け入れてくれた AG Braun のメンバーである Thomas Matreux, Adriana Serrao, Annalena Salditt, Sreekar Wunnava, Philipp Schwintek, Maxmilian Weingart, Juliette Langlais, Paula Aikkliä, Felix Dänekamp, Jara Hintz, Katharina Enghofer, Emma Schwarze, Saroj Rout, Christof Mast と 1 歳でありながら Mensa で何度も RNA 昼食を共にし, 楽しませてくれた Anika Salditt には大変お世話になりました. 感謝を申し上げます. さらに 2 ヶ月の間, 私を滞在させてくれた Renata と Julian にもここで感謝を申し上げます.

修士課程の研究を指導していただいた渋谷岳造さん, 生命の起源に興味を持つきっかけをいただいた藤島皓介さん, 冨田勝さんにここで感謝を申し上げます. 父と母にはこれまで長い間, 研究生生活の基盤を支えていただきました. 感謝致します.

最後に私のパートナーである岩崎みどりさんには私生活の面から本当に支えていただきました. 心から感謝致します.

## 参考文献

- Aoyama, Ryo, Keiko Masuda, Masaru Shimojo, Takashi Kanamori, Takuya Ueda, and Yoshihiro Shimizu. 2022. "In Vitro Reconstitution of the Escherichia Coli 70S Ribosome with a Full Set of Recombinant Ribosomal Proteins." *Journal of Biochemistry* 171 (2): 227–37.
- Arndt, Nicholas T., and Euan G. Nisbet. 2012. "Processes on the Young Earth and the Habitats of Early Life." *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 40 (1): 521–49.
- Baaske, Philipp, Franz M. Weinert, Stefan Duhr, Kono H. Lemke, Michael J. Russell, and Dieter Braun. 2007. "Extreme Accumulation of Nucleotides in Simulated Hydrothermal Pore Systems." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (22): 9346–51.
- Baba, Tomoya, Takeshi Ara, Miki Hasegawa, Yuki Takai, Yoshiko Okumura, Miki Baba, Kirill A. Datsenko, Masaru Tomita, Barry L. Wanner, and Hirotsada Mori. 2006. "Construction of Escherichia Coli K-12 in-Frame, Single-Gene Knockout Mutants: The Keio Collection." *Molecular Systems Biology* 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>.
- Baba, Tomoya, Shigeyuki Kakisawa, Hiroshi Mori, Yutetsu Kuruma, Ken Kurokawa, and Taku Ooshima. 2020. "最小ゲノム." *地学雑誌* 129 (6): 805–24.
- Bansho, Yohsuke, Norikazu Ichihashi, Yasuaki Kazuta, Tomoaki Matsuura, Hiroaki Suzuki, and Tetsuya Yomo. 2012. "Importance of Parasite RNA Species Repression for Prolonged Translation-Coupled RNA Self-Replication." *Chemistry & Biology* 19 (4): 478–87.
- Bennett, Gordon M., and Nancy A. Moran. 2013. "Small, Smaller, Smallest: The Origins and Evolution of Ancient Dual Symbioses in a Phloem-Feeding Insect." *Genome Biology and Evolution* 5 (9): 1675–88.
- Berhanu, Samuel, Takuya Ueda, and Yutetsu Kuruma. 2019. "Artificial Photosynthetic Cell Producing Energy for Protein Synthesis." *Nature Communications* 10 (1): 1325.
- Bishop, Edward O., Stephen J. Kimber, David Orchard, and Barry E. Smith. 1981. "A <sup>31</sup>P-NMR Study of Mono- and Dimagnesium Complexes of Adenosine 5'-Triphosphate and Model Systems." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 635 (1): 63–72.

- Bordenave, Guy. 2003. "Louis Pasteur (1822–1895)." *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 5 (6): 553–60.
- Braun, Dieter, and Albert Libchaber. 2002. "Trapping of DNA by Thermophoretic Depletion and Convection." *Physical Review Letters* 89 (18): 188103.
- Brookwell, August, Javin P. Oza, and Filippo Caschera. 2021. "Biotechnology Applications of Cell-Free Expression Systems." *Life* 11 (12). <https://doi.org/10.3390/life11121367>.
- Cafferty, Brian J., and Nicholas V. Hud. 2014. "Abiotic Synthesis of RNA in Water: A Common Goal of Prebiotic Chemistry and Bottom-up Synthetic Biology." *Current Opinion in Chemical Biology* 22 (October): 146–57.
- Cavac, Elvan, Luis E. Ramírez-Tapia, and Craig T. Martin. 2021. "High-Salt Transcription of DNA Cotethered with T7 RNA Polymerase to Beads Generates Increased Yields of Highly Pure RNA." *The Journal of Biological Chemistry* 297 (3): 100999.
- Chakrabarti, A. C., R. R. Breaker, G. F. Joyce, and D. W. Deamer. 1994. "Production of RNA by a Polymerase Protein Encapsulated within Phospholipid Vesicles." *Journal of Molecular Evolution* 39 (6): 555–59.
- Chen, Irene A., Kourosch Salehi-Ashtiani, and Jack W. Szostak. 2005. "RNA Catalysis in Model protocell vesicles." *Journal of the American Chemical Society* 127 (38): 13213–19.
- Chien, A., D. B. Edgar, and J. M. Trela. 1976. "Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus Aquaticus*." *Journal of Bacteriology* 127 (3): 1550–57.
- Cui, Yi, Xinjie Chen, Ze Wang, and Yuan Lu. 2022. "Cell-Free PURE System: Evolution and Achievements." *BioDesign Research* 2022. <https://doi.org/10.34133/2022/9847014>.
- Cui, Zhenling, Wayne A. Johnston, and Kirill Alexandrov. 2020. "Cell-Free Approach for Non-Canonical Amino Acids Incorporation Into Polypeptides." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (September): 1031.
- De Capitani, Jacopo, and Hannes Mutschler. 2023. "The Long Road to a Synthetic Self-Replicating Central Dogma." *Biochemistry* 62 (7): 1221–32.
- Deegan, Robert D., Olgica Bakajin, Todd F. Dupont, Greb Huber, Sidney R. Nagel, and Thomas A. Witten. 1997. "Capillary Flow as the Cause of Ring Stains from Dried

- Liquid Drops.” *Nature* 389 (6653): 827–29.
- Dirscherl, Christina F., Alan Ianeselli, Damla Tetiker, Thomas Matreux, Robbin M. Queener, Christof B. Mast, and Dieter Braun. 2023. “A Heated Rock Crack Captures and Polymerizes Primordial DNA and RNA.” *Physical Chemistry Chemical Physics: PCCP* 25 (4): 3375–86.
- Doerr, Anne, David Foschepoth, Anthony C. Forster, and Christophe Danelon. 2021. “In Vitro Synthesis of 32 Translation-Factor Proteins from a Single Template Reveals Impaired Ribosomal Processivity.” *Scientific Reports* 11 (1): 1898.
- Eigen, M. 1971. “Selforganization of Matter and the Evolution of Biological Macromolecules.” *Die Naturwissenschaften* 58 (10): 465–523.
- Eigen, M., and P. Schuster. 1977. “The Hypercycle. A Principle of Natural Self-Organization. Part A: Emergence of the Hypercycle.” *Die Naturwissenschaften* 64 (11): 541–65.
- Eto, Sumie, Rumie Matsumura, Yasuhiro Shimane, Mai Fujimi, Samuel Berhanu, Takeshi Kasama, and Yutetsu Kuruma. 2022. “Phospholipid Synthesis inside Phospholipid Membrane Vesicles.” *Communications Biology* 5 (1): 1016.
- Fraser, C. M., J. D. Gocayne, O. White, M. D. Adams, R. A. Clayton, R. D. Fleischmann, C. J. Bult, et al. 1995. “The Minimal Gene Complement of *Mycoplasma Genitalium*.” *Science* 270 (5235): 397–403.
- Fujiwara, Kei, and Shin-Ichiro M. Nomura. 2013. “Condensation of an Additive-Free Cell Extract to Mimic the Conditions of Live Cells.” *PloS One* 8 (1): e54155.
- Furubayashi, Taro, and Norikazu Ichihashi. 2022. “How Evolution Builds up Complexity?: In Vitro Evolution Approaches to Witness Complexification in Artificial Molecular Replication Systems.” *Biophysics and Physicobiology* 19 (February): 1–10.
- Furubayashi, Taro, Kensuke Ueda, Yohsuke Bansho, Daisuke Motooka, Shota Nakamura, Ryo Mizuuchi, and Norikazu Ichihashi. 2020. “Emergence and Diversification of a Host-Parasite RNA Ecosystem through Darwinian Evolution.” *ELife* 9 (July): 1–15.
- Furusato, Takumi, Fumihiro Horie, Hideaki T. Matsubayashi, Kazuaki Amikura, Yutetsu Kuruma, and Takuya Ueda. 2018. “De Novo Synthesis of Basal Bacterial Cell Division Proteins FtsZ, FtsA, and ZipA Inside Giant Vesicles.” *ACS Synthetic Biology* 7 (4): 953–61.

- Ganoza, M. C., C. Cunningham, and R. M. Green. 1995. "A New Factor from Escherichia Coli Affects Translocation of mRNA." *The Journal of Biological Chemistry* 270 (44): 26377–81.
- Gaut, Nathaniel J., and Katarzyna P. Adamala. 2021. "Reconstituting Natural Cell Elements in Synthetic Cells." *Advanced Biology* 5 (3): e2000188.
- Gibson, Daniel G., Gwynedd A. Benders, Cynthia Andrews-Pfannkoch, Evgeniya A. Denisova, Holly Baden-Tillson, Jayshree Zaveri, Timothy B. Stockwell, et al. 2008. "Complete Chemical Synthesis, Assembly, and Cloning of a Mycoplasma Genitalium Genome." *Science* 319 (5867): 1215–20.
- Gibson, Daniel G., John I. Glass, Carole Lartigue, Vladimir N. Noskov, Ray-Yuan Chuang, Mikkel A. Algire, Gwynedd A. Benders, et al. 2010. "Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome." *Science* 329 (5987): 52–56.
- Gil Rosario, Silva Francisco J., Peretó Juli, and Moya Andrés. 2004. "Determination of the Core of a Minimal Bacterial Gene Set." *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR* 68 (3): 518–37.
- Gilbert, Walter. 1986. "Origin of Life: The RNA World." *Nature* 319 (6055): 618.
- Glass, John I., Nacyra Assad-Garcia, Nina Alperovich, Shibu Yooseph, Matthew R. Lewis, Mahir Maruf, Clyde A. Hutchison 3rd, Hamilton O. Smith, and J. Craig Venter. 2006. "Essential Genes of a Minimal Bacterium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2): 425–30.
- Grey, David, Vivian Hutson, and Eörs Szathmáry. 1995. "A Re-Examination of the Stochastic Corrector Model." *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 262 (1363): 29–35.
- Guerrier-Takada, Cecilia, Katheleen Gardiner, Terry Marsh, Norman Pace, and Sidney Altman. 1983. "The RNA Moiety of Ribonuclease P Is the Catalytic Subunit of the Enzyme." *Cell* 35 (3): 849–57.
- Hagino, Katsumi, and Norikazu Ichihashi. 2023. "In Vitro Transcription/Translation-Coupled DNA Replication through Partial Regeneration of 20 Aminoacyl-TRNA Synthetases." *ACS Synthetic Biology* 12 (4): 1252–63.
- Han, Fuhai, Boying Xu, Nan Lu, Adriano Caliarì, Hui Lu, Yang Xia, Masayuki Su'etsugu, Jian Xu, and Tetsuya Yomo. 2022. "Optimization and Compartmentalization of a Cell-Free Mixture of DNA Amplification and Protein Translation." *Applied*

- Microbiology and Biotechnology*, November. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12278-2>.
- Hanczyc, Martin M., Shelly M. Fujikawa, and Jack W. Szostak. 2003. "Experimental Models of Primitive Cellular Compartments: Encapsulation, Growth, and Division." *Science* 302 (5645): 618–22.
- Hosoda, Kazufumi, Tomoaki Matsuura, Hiroshi Kita, Norikazu Ichihashi, Koji Tsukada, and Tetsuya Yomo. 2007. "Kinetic Analysis of the Entire RNA Amplification Process by Q $\beta$  Replicase\*." *The Journal of Biological Chemistry* 282 (21): 15516–27.
- Hutchison, C. A., S. N. Peterson, S. R. Gill, R. T. Cline, O. White, C. M. Fraser, H. O. Smith, and J. C. Venter. 1999. "Global Transposon Mutagenesis and a Minimal Mycoplasma Genome." *Science* 286 (5447): 2165–69.
- Hutchison, Clyde A., 3rd, Ray-Yuan Chuang, Vladimir N. Noskov, Nacyra Assad-Garcia, Thomas J. Deerinck, Mark H. Ellisman, John Gill, et al. 2016. "Design and Synthesis of a Minimal Bacterial Genome." *Science* 351 (6280): aad6253.
- Ianeselli, Alan, Miguel Atienza, Patrick W. Kudella, Ulrich Gerland, Christof B. Mast, and Dieter Braun. 2022. "Water Cycles in a Hadean CO<sub>2</sub> Atmosphere Drive the Evolution of Long DNA." *Nature Physics* 18 (5): 579–85.
- Ichihashi, Norikazu. 2019. "What Can We Learn from the Construction of in Vitro Replication Systems?" *Annals of the New York Academy of Sciences* 1447 (1): 144–56.
- Ichihashi, Norikazu, Kimihito Usui, Yasuaki Kazuta, Takeshi Sunami, Tomoaki Matsuura, and Tetsuya Yomo. 2013. "Darwinian Evolution in a Translation-Coupled RNA Replication System within a Cell-like Compartment." *Nature Communications* 4 (1): 1–7.
- Jackson, Kirsten, Takashi Kanamori, Takuya Ueda, and Z. Hugh Fan. 2014. "Protein Synthesis Yield Increased 72 Times in the Cell-Free PURE System." *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 6 (8): 781–88.
- Jay, D. G., and W. Gilbert. 1987. "Basic Protein Enhances the Incorporation of DNA into Lipid Vesicles: Model for the Formation of Primordial Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (7): 1978–80.
- Jewett, Michael C., and Anthony C. Forster. 2010. "Update on Designing and Building Minimal Cells." *Current Opinion in Biotechnology* 21 (5): 697–703.

- Jewett, Michael C., and James R. Swartz. 2004. "Mimicking the Escherichia Coli Cytoplasmic Environment Activates Long-Lived and Efficient Cell-Free Protein Synthesis." *Biotechnology and Bioengineering* 86 (1): 19–26.
- Jia, Tony Z. 2023. "Primitive Membraneless Compartments as a Window into the Earliest Cells." *Biophysical Reviews*, September. <https://doi.org/10.1007/s12551-023-01135-9>.
- Jin, Lin, Neha P. Kamat, Siddhartha Jena, and Jack W. Szostak. 2018. "Fatty Acid/Phospholipid Blended Membranes: A Potential Intermediate State in Protocellular Evolution." *Small* 14 (15): e1704077.
- Juhas, Mario, Daniel R. Reuß, Bingyao Zhu, and Fabian M. Commichau. 2014. "Bacillus Subtilis and Escherichia Coli Essential Genes and Minimal Cell Factories after One Decade of Genome Engineering." *Microbiology* 160 (Pt 11): 2341–51.
- Kamiura, Rikuto, Ryo Mizuuchi, and Norikazu Ichihashi. 2022. "Plausible Pathway for a Host-Parasite Molecular Replication Network to Increase Its Complexity through Darwinian Evolution." *PLoS Computational Biology* 18 (12): e1010709.
- Karig, David K. 2017. "Cell-Free Synthetic Biology for Environmental Sensing and Remediation." *Current Opinion in Biotechnology* 45 (June): 69–75.
- Kazuta, Yasuaki, Tomoaki Matsuura, Norikazu Ichihashi, and Tetsuya Yomo. 2014. "Synthesis of Milligram Quantities of Proteins Using a Reconstituted in Vitro Protein Synthesis System." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 118 (5): 554–57.
- Kim, D. M., and J. R. Swartz. 1999. "Prolonging Cell-Free Protein Synthesis with a Novel ATP Regeneration System." *Biotechnology and Bioengineering* 66 (3): 180–88.
- Kita, Hiroshi, Junghwa Cho, Tomoaki Matsuura, Tomoyuki Nakaishi, Ichiro Taniguchi, Takehiko Ichikawa, Yasuhumi Shima, Itaru Urabe, and Tetsuya Yomo. 2006. "Functional Qbeta Replicase Genetically Fusing Essential Subunits EF-Ts and EF-Tu with Beta-Subunit." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101 (5): 421–26.
- Kita, Hiroshi, Tomoaki Matsuura, Takeshi Sunami, Kazufumi Hosoda, Norikazu Ichihashi, Koji Tsukada, Itaru Urabe, and Tetsuya Yomo. 2008. "Replication of Genetic Information with Self-Encoded Replicase in Liposomes." *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 9 (15): 2403–10.
- Kobayashi, K., S. D. Ehrlich, A. Albertini, G. Amati, K. K. Andersen, M. Arnaud, K. Asai,

- et al. 2003. “Essential *Bacillus Subtilis* Genes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (8): 4678–83.
- Kosaka, Yuishin, Yumi Miyawaki, Megumi Mori, Shunsuke Aburaya, Mao Fukuyama, Mitsuyoshi Ueda, and Wataru Aoki. 2022. “Reconstitution of Ribosome Self-Replication Outside a Living Cell.” *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.08.29.505692>.
- Kovtun, Oleksiy, Sergey Mureev, Wooram Jung, Marta H. Kubala, Wayne Johnston, and Kirill Alexandrov. 2011. “Leishmania Cell-Free Protein Expression System.” *Methods* 55 (1): 58–64.
- Kruger, Kelly, Paula J. Grabowski, Arthur J. Zaugg, Julie Sands, Daniel E. Gottschling, and Thomas R. Cech. 1982. “Self-Splicing RNA: Autoexcision and Autocyclization of the Ribosomal RNA Intervening Sequence of Tetrahymena.” *Cell* 31 (1): 147–57.
- Kung, H. F., B. Redfield, B. V. Treadwell, B. Eskin, C. Spears, and H. Weissbach. 1977. “DNA-Directed in Vitro Synthesis of Beta-Galactosidase. Studies with Purified Factors.” *The Journal of Biological Chemistry* 252 (19): 6889–94.
- Kuruma, Yutetsu, Pasquale Stano, Takuya Ueda, and Pier Luigi Luisi. 2009. “A Synthetic Biology Approach to the Construction of Membrane Proteins in Semi-Synthetic Minimal Cells.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1788 (2): 567–74.
- Lang, Kevin S., and Houra Merrikh. 2018. “The Clash of Macromolecular Titans: Replication-Transcription Conflicts in Bacteria.” *Annual Review of Microbiology* 72 (September): 71–88.
- Lartigue, Carole, John I. Glass, Nina Alperovich, Rembert Pieper, Prashanth P. Parmar, Clyde A. Hutchison 3rd, Hamilton O. Smith, and J. Craig Venter. 2007. “Genome Transplantation in Bacteria: Changing One Species to Another.” *Science* 317 (5838): 632–38.
- Lavickova, Barbora, Laura Grasemann, and Sebastian J. Maerkl. 2022. “Improved Cell-Free Transcription–Translation Reactions in Microfluidic Chemostats Augmented with Hydrogel Membranes for Continuous Small Molecule Dialysis.” *ACS Synthetic Biology* 11 (12): 4134–41.
- Lavickova, Barbora, and Sebastian J. Maerkl. 2019. “A Simple, Robust, and Low-Cost Method To Produce the PURE Cell-Free System.” *ACS Synthetic Biology* 8 (2): 455–62.

- LeBlanc, Nicole, and Trevor C. Charles. 2022. "Bacterial Genome Reductions: Tools, Applications, and Challenges." *Frontiers in Genome Editing* 4 (August): 957289.
- Lee, Joongoo, Jaime N. Coronado, Namjin Cho, Jongdoo Lim, Brandon M. Hosford, Sangwon Seo, Do Soon Kim, et al. 2022. "Ribosome-Mediated Biosynthesis of Pyridazinone Oligomers in Vitro." *Nature Communications* 13 (1): 6322.
- Li, Jun, Liangcai Gu, John Aach, and George M. Church. 2014. "Improved Cell-Free RNA and Protein Synthesis System." *PloS One* 9 (9): e106232.
- Liao, Jung-Chi, Sean Sun, David Chandler, and George Oster. 2004. "The Conformational States of Mg·ATP in Water." *European Biophysics Journal: EBJ* 33 (1): 29–37.
- Libicher, Kai, and Hannes Mutschler. 2020. "Probing Self-Regeneration of Essential Protein Factors Required for in Vitro Translation Activity by Serial Transfer." *Chemical Communications* 56 (98): 15426–29.
- Luisi, Pier Luigi. 2002. "Emergence in Chemistry: Chemistry as the Embodiment of Emergence." *Foundations of Chemistry* 4 (3): 183–200.
- Mast, Christof B., and Dieter Braun. 2010. "Thermal Trap for DNA Replication." *Physical Review Letters* 104 (18): 188102.
- Matsumoto, Rena, Tatsuya Niwa, Yasuhiro Shimane, Yutetsu Kuruma, Hideki Taguchi, and Takashi Kanamori. 2023. "Regulated N-Terminal Modification of Proteins Synthesized Using a Reconstituted Cell-Free Protein Synthesis System." *ACS Synthetic Biology* 12 (7): 1935–42.
- Matthaei, J. H., and M. W. Nirenberg. 1961. "Characteristics and Stabilization of DNAase-Sensitive Protein Synthesis in E. Coli Extracts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47 (10): 1580–88.
- Merrikh, Houra, Yan Zhang, Alan D. Grossman, and Jue D. Wang. 2012. "Replication-Transcription Conflicts in Bacteria." *Nature Reviews. Microbiology* 10 (7): 449–58.
- Mills, D. R., R. L. Peterson, and S. Spiegelman. 1967. "An Extracellular Darwinian Experiment with a Self-Duplicating Nucleic Acid Molecule." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58 (1): 217–24.
- Miyachi, Ryota, Yoshihiro Shimizu, and Norikazu Ichihashi. 2022. "Transfer RNA Synthesis-Coupled Translation and DNA Replication in a Reconstituted Transcription/Translation System." *ACS Synthetic Biology* 11 (8): 2791–99.

- Mizuuchi, Ryo, Taro Furubayashi, and Norikazu Ichihashi. 2022. “Evolutionary Transition from a Single RNA Replicator to a Multiple Replicator Network.” *Nature Communications* 13 (1): 1460.
- Mizuuchi, Ryo, and Norikazu Ichihashi. 2021. “Primitive Compartmentalization for the Sustainable Replication of Genetic Molecules.” *Life* 11 (3): 191.
- . 2023. “Minimal RNA Self-Reproduction Discovered from a Random Pool of Oligomers.” *Chemical Science* 14 (28): 7656–64.
- Moore, William B., and A. Alexander G. Webb. 2013. “Heat-Pipe Earth.” *Nature* 501 (7468): 501–5.
- Morasch, Matthias, Jonathan Liu, Christina F. Dirscherl, Alan Ianeselli, Alexandra Kühnlein, Kristian Le Vay, Philipp Schwintek, et al. 2019. “Heated Gas Bubbles Enrich, Crystallize, Dry, Phosphorylate and Encapsulate Prebiotic Molecules.” *Nature Chemistry* 11 (9): 779–88.
- Morowitz, H. J. 1984. “The Completeness of Molecular Biology.” *Israel Journal of Medical Sciences* 20 (9): 750–53.
- Morrison, Shaunna M., Simone E. Runyon, and Robert M. Hazen. 2018. “The Paleomineralogy of the Hadean Eon Revisited.” *Life* 8 (4): 1–20.
- Murtas, Giovanni. 2009. “Artificial Assembly of a Minimal Cell.” *Molecular BioSystems* 5 (11): 1292–97.
- Mushegian, A. R., and E. V. Koonin. 1996. “A Minimal Gene Set for Cellular Life Derived by Comparison of Complete Bacterial Genomes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (19): 10268–73.
- Nakabachi, Atsushi, Atsushi Yamashita, Hidehiro Toh, Hajime Ishikawa, Helen E. Dunbar, Nancy A. Moran, and Masahira Hattori. 2006. “The 160-Kilobase Genome of the Bacterial Endosymbiont Carsonella.” *Science* 314 (5797): 267.
- Nick McElhinny, Stephanie A., Brian E. Watts, Dinesh Kumar, Danielle L. Watt, Else-Britt Lundström, Peter M. J. Burgers, Erik Johansson, Andrei Chabes, and Thomas A. Kunkel. 2010. “Abundant Ribonucleotide Incorporation into DNA by Yeast Replicative Polymerases.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11): 4949–54.
- Nies, Pauline van, Ilja Westerlaken, Duco Blanken, Margarita Salas, Mario Mencía, and Christophe Danelon. 2018. “Self-Replication of DNA by Its Encoded Proteins in Liposome-Based Synthetic Cells.” *Nature Communications* 9 (1): 1583.

- Noireaux, Vincent, and Albert Libchaber. 2004. "A Vesicle Bioreactor as a Step toward an Artificial Cell Assembly." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (51): 17669–74.
- Nomura, Shin-Ichiro M., Kanta Tsumoto, Tsutomu Hamada, Kazunari Akiyoshi, Yoichi Nakatani, and Kenichi Yoshikawa. 2003. "Gene Expression within Cell-Sized Lipid Vesicles." *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 4 (11): 1172–75.
- Oberholzer, T., M. Albrizio, and P. L. Luisi. 1995. "Polymerase Chain Reaction in Liposomes." *Chemistry & Biology* 2 (10): 677–82.
- Oberholzer, T., K. H. Nierhaus, and P. L. Luisi. 1999. "Protein Expression in Liposomes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 261 (2): 238–41.
- Okauchi, Hiroki, and Norikazu Ichihashi. 2021. "Continuous Cell-Free Replication and Evolution of Artificial Genomic DNA in a Compartmentalized Gene Expression System." *ACS Synthetic Biology* 10 (12): 3507–17.
- Okauchi, Hiroki, Yoshihiro Sakatani, Kensuke Otsuka, and Norikazu Ichihashi. 2020. "Minimization of Elements for Isothermal DNA Replication by an Evolutionary Approach." *ACS Synthetic Biology* 9 (7): 1771–80.
- Oliver, C. L., and C. D. Boyd. 1985. "In Vitro Translation of Messenger RNA in a Rabbit Reticulocyte Lysate Cell-Free System." *Methods in Molecular Biology* 2: 145–55.
- Pace, N. R., and S. Spiegelman. 1966. "In Vitro Synthesis of an Infectious Mutant RNA with a Normal RNA Replicase." *Science* 153 (3731): 64–67.
- Patel, Premal H., and Lawrence A. Loeb. 2000. "Multiple Amino Acid Substitutions Allow DNA Polymerases to Synthesize RNA\*." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (51): 40266–72.
- Perez, Jessica G., Jessica C. Stark, and Michael C. Jewett. 2016. "Cell-Free Synthetic Biology: Engineering Beyond the Cell." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (12). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023853>.
- Powers, Jackson, and Yeongseon Jang. 2023. "Advancing Biomimetic Functions of Synthetic Cells through Compartmentalized Cell-Free Protein Synthesis." *Biomacromolecules*, November. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00879>.
- Rahman, M. A., and M. Z. Saghir. 2014. "Thermodiffusion or Soret Effect: Historical Review." *International Journal of Heat and Mass Transfer* 73 (June): 693–705.

- Rajamani, Sudha, Alexander Vlassov, Seico Benner, Amy Coombs, Felix Olasagasti, and David Deamer. 2008. "Lipid-Assisted Synthesis of RNA-like Polymers from Mononucleotides." *Origins of Life and Evolution of the Biosphere: The Journal of the International Society for the Study of the Origin of Life* 38 (1): 57–74.
- Roberts, B. E., and B. M. Paterson. 1973. "Efficient Translation of Tobacco Mosaic Virus RNA and Rabbit Globin 9S RNA in a Cell-Free System from Commercial Wheat Germ." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (8): 2330–34.
- Sakai, Andrei, Aafke J. Jonker, Frank H. T. Nelissen, Evan M. Kalb, Bob van Sluijs, Hans A. Heus, Katarzyna P. Adamala, John I. Glass, and Wilhelm T. S. Huck. 2023. "Cell-Free Expression System Derived from a Near-Minimal Synthetic Bacterium." *ACS Synthetic Biology*, June. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00114>.
- Sakatani, Yoshihiro, Norikazu Ichihashi, Yasuaki Kazuta, and Tetsuya Yomo. 2015. "A Transcription and Translation-Coupled DNA Replication System Using Rolling-Circle Replication." *Scientific Reports* 5: 1–5.
- Salditt, Annalena, Leonie Karr, Elia Salibi, Kristian Le Vay, Dieter Braun, and Hannes Mutschler. 2023. "Ribozyme-Mediated RNA Synthesis and Replication in a Model Hadean Microenvironment." *Nature Communications* 14 (1): 1495.
- Sari, Jean Claude, Michèle Hadida, Anne Marie Chauvet-Monges, and Aimé Crevat. 1982. "Microcalorimetric Study of Magnesium-Adenosine Triphosphate Ternary Complex." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 14 (3): 171–79.
- Schramm, Marina, Stephanie Friedrich, Kai-Uwe Schmidtke, Jan Kiebist, Paul Panzer, Harald Kellner, René Ullrich, Martin Hofrichter, and Katrin Scheibner. 2022. "Cell-Free Protein Synthesis with Fungal Lysates for the Rapid Production of Unspecific Peroxygenases." *Antioxidants (Basel, Switzerland)* 11 (2). <https://doi.org/10.3390/antiox11020284>.
- Scott, Andrew, Marek J. Noga, Paul de Graaf, Ilja Westerlaken, Esengul Yildirim, and Christophe Danelon. 2016. "Cell-Free Phospholipid Biosynthesis by Gene-Encoded Enzymes Reconstituted in Liposomes." *PloS One* 11 (10): e0163058.
- Shimizu, Y., A. Inoue, Y. Tomari, T. Suzuki, T. Yokogawa, K. Nishikawa, and T. Ueda. 2001. "Cell-Free Translation Reconstituted with Purified Components." *Nature Biotechnology* 19 (8): 751–55.

- Shimizu, Yoshihiro, Takashi Kanamori, and Takuya Ueda. 2005. "Protein Synthesis by Pure Translation Systems." *Methods* 36 (3): 299–304.
- Shimizu, Yoshihiro, and Takuya Ueda. 2010. "PURE Technology." *Methods in Molecular Biology* 607: 11–21.
- Shimojo, Masaru, Kazuaki Amikura, Keiko Masuda, Takashi Kanamori, Takuya Ueda, and Yoshihiro Shimizu. 2020. "In Vitro Reconstitution of Functional Small Ribosomal Subunit Assembly for Comprehensive Analysis of Ribosomal Elements in E. Coli." *Communications Biology* 3 (1): 142.
- Smith, Mark Thomas, Scott D. Berkheimer, Christopher J. Werner, and Bradley C. Bundy. 2014. "Lyophilized Escherichia Coli-Based Cell-Free Systems for Robust, High-Density, Long-Term Storage." *BioTechniques* 56 (4): 186–93.
- Spirin, A. S., V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov, and Y. B. Alakhov. 1988. "A Continuous Cell-Free Translation System Capable of Producing Polypeptides in High Yield." *Science* 242 (4882): 1162–64.
- Stech, Marlitt, Robert B. Quast, Rita Sachse, Corina Schulze, Doreen A. Wüstenhagen, and Stefan Kubick. 2014. "A Continuous-Exchange Cell-Free Protein Synthesis System Based on Extracts from Cultured Insect Cells." *PloS One* 9 (5): e96635.
- Su'etsugu, Masayuki, Hiraku Takada, Tsutomu Katayama, and Hiroko Tsujimoto. 2017. "Exponential Propagation of Large Circular DNA by Reconstitution of a Chromosome-Replication Cycle." *Nucleic Acids Research* 45 (20): 11525–34.
- Sumper, M., and R. Luce. 1975. "Evidence for de Novo Production of Self-Replicating and Environmentally Adapted RNA Structures by Bacteriophage Qbeta Replicase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (1): 162–66.
- Sunami, Takeshi, Tomoaki Matsuura, Hiroaki Suzuki, and Tetsuya Yomo. 2010. "Synthesis of Functional Proteins within Liposomes." *Methods in Molecular Biology* 607: 243–56.
- Suzuki, Yo, Nacyra Assad-Garcia, Maxim Kostylev, Vladimir N. Noskov, Kim S. Wise, Bogumil J. Karas, Jason Stam, et al. 2015. "Bacterial Genome Reduction Using the Progressive Clustering of Deletions via Yeast Sexual Cycling." *Genome Research* 25 (3): 435–44.
- Szathmáry, E., and L. Demeter. 1987. "Group Selection of Early Replicators and the Origin of Life." *Journal of Theoretical Biology* 128 (4): 463–86.

- Szostak, J. W., D. P. Bartel, and P. L. Luisi. 2001. "Synthesizing Life." *Nature* 409 (6818): 387–90.
- Takada, Sakura, Natsuhiko Yoshinaga, Nobuhide Doi, and Kei Fujiwara. 2022. "Mode Selection Mechanism in Traveling and Standing Waves Revealed by Min Wave Reconstituted in Artificial Cells." *Science Advances* 8 (23): eabm8460.
- Takai, Kazuyuki, and Yaeta Endo. 2010. "The Cell-Free Protein Synthesis System from Wheat Germ." In *Cell-Free Protein Production: Methods and Protocols*, edited by Yaeta Endo, Kazuyuki Takai, and Takuya Ueda, 23–30. Totowa, NJ: Humana Press.
- Tekin, Emre, Annalena Salditt, Philipp Schwintek, Sreekar Wunnava, Juliette Langlais, James Saenz, Dora Tang, Petra Schwille, Christof Mast, and Dieter Braun. 2022. "Prebiotic Foam Environments to Oligomerize and Accumulate RNA." *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 23 (24): e202200423.
- Toparlak, Ö. Duhan, Lorenzo Sebastianelli, Veronica Egas Ortuno, Megha Karki, Yanfeng Xing, Jack W. Szostak, Ramanarayanan Krishnamurthy, and Sheref S. Mansy. 2023. "Cyclophospholipids Enable a Protocellular Life Cycle." *ACS Nano*, December. <https://doi.org/10.1021/acsnano.3c07706>.
- Tunitskaya, V. L., and S. N. Kochetkov. 2002. "Structural-Functional Analysis of Bacteriophage T7 RNA Polymerase." *Biochemistry. Biokhimiia* 67 (10): 1124–35.
- Urabe, Hiroya, Norikazu Ichihashi, Tomoaki Matsuura, Kazufumi Hosoda, Yasuaki Kazuta, Hiroshi Kita, and Tetsuya Yomo. 2010. "Compartmentalization in a Water-in-Oil Emulsion Repressed the Spontaneous Amplification of RNA by Q Beta Replicase." *Biochemistry* 49 (9): 1809–13.
- Villarreal, Fernando, and Cheemeng Tan. 2017. "Cell-Free Systems in the New Age of Synthetic Biology." *Frontiers of Chemical Science and Engineering* 11 (1): 58–65.
- Vogel, Sabine K., Alexandra Schulz, and Karsten Rippe. 2002. "Binding Affinity of Escherichia Coli RNA Polymerase\*sigma54 Holoenzyme for the GlnAp2, NifH and NifL Promoters." *Nucleic Acids Research* 30 (18): 4094–4101.
- Wang, Ting, and Yuan Lu. 2023. "Toward Minimal Transcription-Translation Machinery." *ACS Synthetic Biology*, October. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.3c00324>.
- Wei, Eric, and Drew Endy. 2021. "Experimental Tests of Functional Molecular Regeneration via a Standard Framework for Coordinating Synthetic Cell Building." *BioRxiv*. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.03.03.433818>.

- Wu, Yang, Zhaoguan Wang, Xin Qiao, Jiaojiao Li, Xiangrong Shu, and Hao Qi. 2020. “Emerging Methods for Efficient and Extensive Incorporation of Non-Canonical Amino Acids Using Cell-Free Systems.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (July): 863.
- Yoshiyama, Tomoaki, Chika Motohashi, Norikazu Ichihashi, Tetsuo Ichii, and Tetsuya Yomo. 2016. “Maintenance of a Translation-Coupled RNA Replication in Dynamic Micro-Sized Compartments under Continuous Stirring and Flow.” *Chemical Engineering Journal* 283 (January): 896–902.
- Yu, W., K. Sato, M. Wakabayashi, T. Nakaishi, E. P. Ko-Mitamura, Y. Shima, I. Urabe, and T. Yomo. 2001. “Synthesis of Functional Protein in Liposome.” *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92 (6): 590–93.
- Zawada, James F., David Burgenson, Gang Yin, Trevor J. Hallam, James R. Swartz, and Robert D. Kiss. 2022. “Cell-Free Technologies for Biopharmaceutical Research and Production.” *Current Opinion in Biotechnology* 76 (August): 102719.
- Zubay, Geoffrey. 1973. “IN VITRO SYNTHESIS OF PROTEIN IN MICROBIAL SYSTEMS.” *Annual Review of Genetics* 7 (1): 267–87.