

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 瀬尾 海渡

研究背景

生命とその誕生についてより理解するための一つの方法に人工細胞の作成がある。自己を再生産できる細胞のようなシステムを作ることによって、生命という現象が起こる条件を明らかにすることができる。もう一つの方法として生命誕生以前の環境を再現することで、生命誕生の条件を調べる研究がある。本研究ではこれら二つの異なる方法を用いて、生命が成立するための条件を実証するための研究を行なった。研究項目 1 では人工細胞の中身として想定されている無細胞転写翻訳 DNA 複製系において、生命にとって重要な DNA 複製、転写、翻訳反応について非タンパク質成分の組成条件について調べることで、これらの反応の共存を可能にする条件を探索した。研究項目 2 では原始地球で起きた可能性のある熱と界面による分子濃集システムと RNA 複製系を組み合わせることで、熱と界面による分子濃集システムが原始の細胞構造として働く可能性を検証した。

研究項目 1 無細胞系における複製・転写・翻訳の共存条件の研究

先行研究により、無細胞系を用いて DNA 複製、転写、翻訳の三つの反応を共役させた系が開発されている。しかしこれらの系では転写翻訳と DNA 複製を組み合わせる際に無細胞系に含まれる成分について濃度の調整をする必要がある

ことが報告されていた(Sakatani et al. 2015; van Nies et al. 2018; Han et al. 2022). 特に RNA の基質である rNTP と翻訳に必要な不可欠な tRNA について、DNA 複製反応を進めるために量を下げることが必要であった。しかし、これらの成分を下げると転写と翻訳の効率も下がってしまうため、複製・転写・翻訳という生命にとって必須の反応をすべて動かすためには、三つの反応がより高い活性を保った状態で共存できる状態を探ることが重要となる。そこで本研究では無細胞系に含まれる 11 種の非タンパク質成分を対象に、様々な成分の濃度に対する転写、翻訳、DNA 複製反応それぞれへの影響を調べることによって、三つの反応のどれかにとって重要な成分でありながら、他の反応には阻害効果を持つ成分を特定した(図 1)。

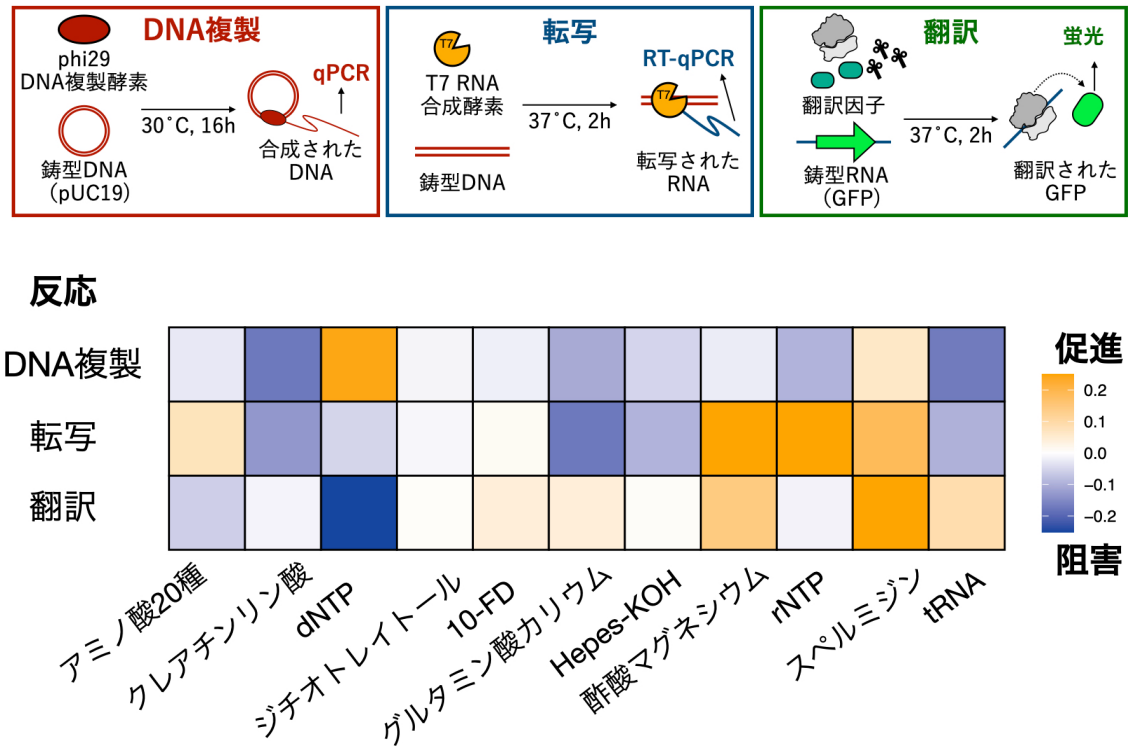


図 1. DNA 複製、転写、翻訳反応に対する非タンパク質成分の影響

11 種類の非タンパク質成分について DNA 複製、転写、翻訳反応に対する影響を調べた(上図)。いくつかの成分濃度に対する影響を調べた上で、傾向を抽出するためそれぞれの図に回帰直線を引き、そこから得られた回帰係数をヒートマップとして表した(下図)。

具体的な阻害物質は DNA 複製に阻害効果が認められたリボヌクレオチド (rNTP) と tRNA、転写反応に阻害効果が認められたグルタミン酸カリウム、翻訳反応に阻害効果が認められたデオキシリボヌクレオチド(dNTP)である。次に

これらの成分について詳しい分析を試みた。すると翻訳反応に対する dNTP の阻害効果について、加える Mg^{2+} 濃度を $dNTP : Mg^{2+} = 1:2$ の比率になるように調整することで阻害効果を回避できることを発見した。DNA 複製に対する rNTP の阻害効果も同様に Mg^{2+} 濃度を適切な濃度比で加えることによって打ち消せることがわかった。

以上の知見をもとに無細胞転写翻訳 DNA 複製共役系において、rNTP と dNTP 濃度を増やしつつ Mg^{2+} 濃度を調整することで、阻害効果を打ち消し全体の反応量を向上することを目論んだ (図 2)。その結果、 Mg^{2+} 濃度を調整していない条件と比較すると全ての反応で反応量が向上していることがわかった。また一定の DNA 複製量を保ちながら転写と翻訳量を向上させることに成功した。今後はこの共役系に複数の遺伝子を発現し、自己を再生産することができるより複雑な人工細胞システムの開発が期待される。

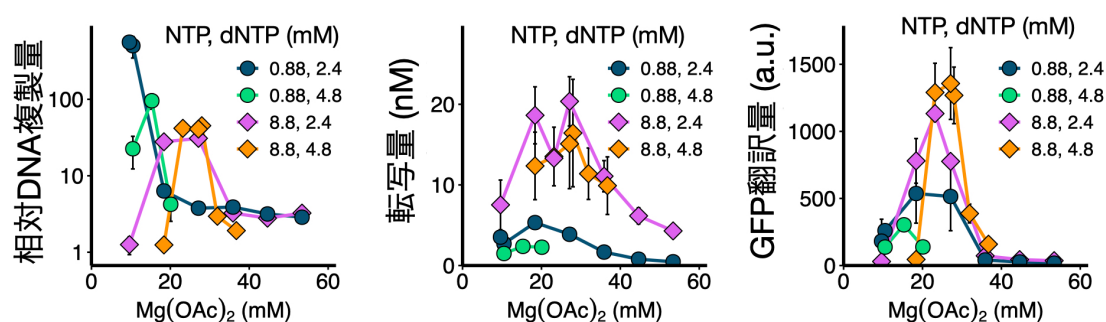


図 2. 無細胞転写翻訳 DNA 複製での異なる rNTP・dNTP 濃度における Mg^{2+} 濃度の影響

無細胞転写翻訳 DNA 複製共役系に DNA 複製酵素の遺伝子と GFP の遺伝子を発現させ、DNA 複製量は自己複製された DNA 複製酵素がコードされた DNA を、転写量は GFP の遺伝子がコードされた RNA を、翻訳量は発現された GFP を測定した。rNTP 0.88 mM, dNTP 2.4 mM が先行研究で示された DNA 複製量を最大にするための最適条件である。エラーバーは標準誤差を示す (n=3)。

研究項目 2 熱と界面による分子濃集を用いた RNA 複製の研究

原始の自己複製体は寄生体 (利己的な複製体) によって複製リソースを取られてしまうことが報告されており, その対処法として細胞のような区画構造が必要であることが示されている (Szathmáry and Demeter 1987; Ichihashi et al. 2013). したがって, 原始の自己複製体が生まれてすぐに区画構造が存在する必要がある。原始地球に存在しうる区画構造のひとつとして, 熱と界面を用いることによって溶液中の分子を物理的に濃集するシステムが提案されている (Morasch et al. 2019). このシステムをうまく利用すれば, 自己複製系を区画構造に閉じ込めることなく寄生体から守ることができるのではないかと考えた。そこで本研究では熱と界面による分子濃集システムを用いて, 実際に RNA 複製が起きるか検証を行い, さらに寄生体 RNA と比較した際の宿主 RNA の選択的な濃集について調べた。サーマルトラップ (熱と界面によって分子濃集を起こす装置の名称) に RNA を含む溶液を入れ, 30–40°C の温度勾配で反応させた。サーマルトラップ内部を傾向顕微鏡で撮影したところ, 蛍光染色した RNA が界面付近に濃集している様子を確認することができた (図 3)。

次に宿主 RNA と寄生体 RNA の存在下における精製 Q β 複製酵素による RNA 複製をサーマルトラップ内で行なったところ, 特に 20–40°C の温度勾配条件で寄生体 RNA にくらべて宿主 RNA が選択的に濃集されるという結果を得た。本研究は原始地球で起き得た熱と界面による分子濃集が原始の RNA 複製系のモデルとした RNA 複製系に対して区画構造の働きの代わりとなり, 寄生体の抑制を達成したことを初めて実験的に示した。

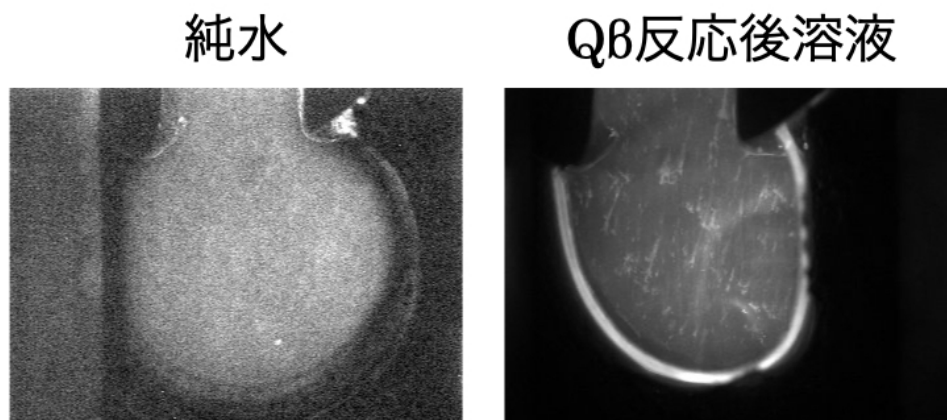


図 3. 熱と界面による RNA 濃集の様子

左は純水のみ, 右は精製 Q β RNA 複製酵素によって宿主 RNA を複製させた溶液を蛍光染色したもの。それぞれをサーマルトラップ内で反応させ, 蛍光顕微鏡で撮影した。