

総説

人工RNA複製システムの実験進化による物質から生命への複雑化プロセスの探求

古林太郎^{1,2}, 市橋伯一³

¹東京大学工学系研究科

²日本学術振興会特別研究員(PD)

³東京大学総合文化研究科・先進科学研究機構・生物普遍性研究機構

How can evolution shape a diverse biological world from a lifeless molecular world? *In vitro* evolution of artificial molecular replication systems is an attractive approach to investigate possible pathways of a simple molecular system developing towards biological complexity. We describe the progress of experimental investigation to test evolvability of molecules from the pioneering Spiegelman's work to our studies on an artificial RNA replication system. Especially, we found that coevolution with parasitic molecules is a key to extend evolvability for emergence of diversity and continuous evolution.

origins of life / molecular evolution / parasite / coevolution / emergence of diversity / open-ended evolution

1. 物質から生命へと至るプロセスを誰が見たのか

「生命は物質から自然発生したものである」と言われて、あなたはすんなりと受け入れられるだろうか。今や地球上を埋め尽くす多種多様な生命も、元をたどれば単一の共通祖先細胞へと遡り、さらにその誕生に至るまでにはRNA様の分子を中心とした複製システム(RNAワールド)が先行していたものと信じられている。しかし物質から生命が自然に誕生したとするこの世界観は、かの有名なパスツールの白鳥の首フラスコ実験による「生命は自然発生しない」という結論と真っ向から対立する。本当にただの有機分子の集まりから生命のような複雑なシステムが自然に生まれるのだろうか? 太古の複製システムの化石証拠は存在せず、また現存生物のゲノム情報から生命史をたどる方法でも祖先細胞よりも以前の歴史にはアクセスできない。何か物質から生命が誕生するプロセスを直接調べるよい方法はないだろうか?

2. 試験管内で再現する「物質から生命に至る旅」

物理学者ファインマンは「自分で作れないものは、

自分が理解できていないものだ」と言った。この考え方は生命システムの理解にも当てはまり、国際的にも人工的に細胞を合成して生命を理解しようとする機運が高まっている。しかし現存の生命は最も単純な細菌でも生化学的には信じがたいほど複雑怪奇であり、合理的に分子を組み合わせてゼロから生きた細胞を設計するのは困難を極める。

ここでカギとなるのは「進化」である。現存の複雑な生命システムは決して地球上に突然登場したわけではなく、より単純な分子システムが進化により数十億年にわたって磨き上げられた結果である。そこで我々は、進化可能な最小限の機能を持つ分子システムを構築し、試験管内で進化に生命を「作らせる」過程を観察することで、生命が誕生するプロセスを理解できるのではないかと考えた。もし生命が本当に物質から進化してきたのならば、適切な条件を設定してやれば分子の集まりが生命のように複雑化していく現象の本質的な部分を再現できるはずである。そしてその途上でのどのような困難が存在し、それらがいかに克服されるかを理解する道筋が開けてくるに違いない。本稿では先駆けとなったスピーゲルマンの試験管内進化実験を振り返ったのち、それに連なる我々の翻訳共役型

An *in vitro* Evolutionary Journey of an Artificial RNA Replication System Towards Biological Complexity

Taro FURUBAYASHI^{1,2} and Norikazu ICHIHASHI³

¹Department of Applied Chemistry, School of Engineering, The University of Tokyo

²Japan Society for the Promotion of Science, Research Fellow PD

³Graduate School of Arts and Science, Komaba Institute for Science, Universal Biology Institute, The University of Tokyo

RNA の進化実験を紹介しつつ、物質が生命へと近づいていくための条件について考察する。

3. 世界初の試験管内分子進化

ここで述べる進化とは、①複製、②変異、③選択（淘汰）という3つのプロセスを繰り返して集団の性質が変化していく現象を指す。生物の場合は個体が子供を作り（①）、その過程で突然変異（②）が生じて遺伝型に多様性が生まれ、環境に応じて有利なものがより多く子孫を残してゆく（③）ことに相当する。これら3つの基本プロセスを経ることが可能な物質の集団があれば、たとえ生物でなくても進化することになる。

1967年、スピーゲルマンらのグループによって初めて分子の人工進化が報告された¹⁾。彼らは1本鎖RNAウイルスであるQ β ファージのゲノムRNAを精製し、これをRNAの基質とRNA複製酵素を含む反応液に加えてRNA複製を継代することで、RNAを進化させることを考えた。RNAは複製の過程で突然変異や組み換えを起こすので、最初に加えたRNAよりも速く増える変異体が生じれば、これらが徐々に集団内に広がり進化が起こるはずである。彼らはこの概念実証に見事成功し、74回の継代実験を通じて最初のRNAよりも時間あたり約15倍も速く増幅するRNAを進化させた。この研究により物質が進化能を持つことが初めて明らかとなった。

4. 情報を失う進化、そして進化の袋小路

それでは、このRNA複製システムをずっと継代していけば、生命のような複雑なシステムへと進化していくのだろうか。答えはおそらくノーである。なぜなら、RNAは継代するにつれてどんどん短くなり、およそ4000塩基あった配列は最後にはたった600塩基程度しかない小さなRNAへと単純化してしまったからである。たとえこの継代実験をさらに続けたとしても、生命の持つ複雑さは生まれそうにもない。また、そもそも継代を続けたとしても進化が続くことも期待できない。74回の継代後にはRNAは単一の配列に収束し、進化は止まってしまったように見えるからである。このように進化が袋小路に陥ってしまったのは、この複製システムの持つ進化能の低さに起因すると思われる。つまりRNAやDNAの複製は鋳型配列が短くなるほど速くなる傾向があるため、ひとたび鋳型として機能する限界の長さまで短くなってしまえば、その配列が最適となってしまうそれ以上は進化できなく

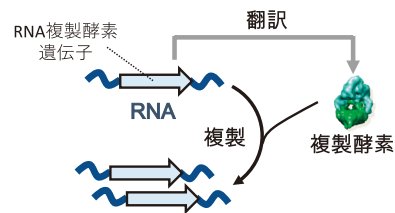


図1 翻訳共役型のRNA自己複製システム。

なつたと考えられる。さらなる進化を可能とするためには何が足りないのだろうか？

5. 遺伝情報を翻訳するRNA自己複製体の登場

スピーゲルマンらのRNA複製システムでは、複製機能を担う酵素は外部から与えられており、RNA自身にはコードされていなかった。したがって、この環境で進化できるのはRNAが持つ複製されやすさ（複製鋳型としての能力）のみである。一方、生物は自分のゲノムに複製酵素などのタンパク質の情報をコードしており、その情報を翻訳して複製する。もしスピーゲルマンの系に翻訳システムを導入し、RNAは自身にコードされた複製酵素を翻訳しながら複製するにすれば、どうなるだろうか？まずRNAが短くなると複製酵素の遺伝子が失われて複製できなくなってしまうので、短くなり続けることはできないだろう。また、RNAの持つ鋳型としての機能とそこにコードされた酵素の能力が共進化するに違いない。おそらくRNAの進化の仕方は大きく変わってくるはずである。そこで我々は、スピーゲルマンらのRNA複製システムに無細胞翻訳系²⁾（翻訳タンパク質群や栄養を含む溶液）を導入し、複製酵素を自ら作りながら複製する翻訳共役型のRNA自己複製システムを構築した（図1）。

ただし、この翻訳と共役したRNA複製を継代し持続的に複製させるためには、もう1つの要素が必要になる。細胞のような区画構造である。複製時にRNAに導入されるほとんどの変異は複製酵素遺伝子の機能を破壊する。もし区画構造がないと、そのような壊れた複製酵素遺伝子を持つRNAであっても、ほかの正常なRNAが作ってくれた複製酵素に相乗りして増えることができってしまう。いわば寄生的なRNAが生まれる。こうした寄生体RNAはもう自分で複製酵素遺伝子を持つ必要がないのですぐに短くなり、急速に複製することによって宿主となる元のRNAの複製を阻害してしまう。しかし、もし細胞のような区画構造が

あり、かつ RNA が区画あたり 1 分子だけしか存在しなければ、自分で複製酵素を作ることのできない寄生体 RNA は複製することができず淘汰されるはずである。

6. 情報を失わない進化, しかし進化の袋小路

そこで我々は、細胞のような区画構造として、油の中に分散した微小な水滴 (エマルション) を導入した。宿主 RNA を含む無細胞翻訳系を界面活性剤入りのオイル中に分散させて区画化し、翻訳共役型 RNA 複製反応を長期継代した (図 2a)。この実験では、反応液中の RNA 数を区画数よりも小さくすることで、区画あたり平均 RNA 分子数を 1 分子へと制限した。すると狙い通り、宿主 RNA 集団は寄生体 RNA に負けることなく複製を続け、時間あたりの RNA 増幅率を最初の 100 倍以上へと進化させた (図 2b)³⁾。また進化後の配列では鋳型情報 (RNA 配列) と酵素情報 (タンパク質配列) が共進化し、自己複製能力の向上に寄与していることも見出した。翻訳能力と区画化の導入によって、スピーゲルマンらの進化実験よりも複雑性の高い RNA の進化を達成できた。

しかし、残念ながらこの自己複製システムの進化も次第にスローダウンし、約 600 世代後には複製機能の向上も変異の蓄積もほとんど止まってしまった。また、最終的に RNA 集団の配列組成は多様性に乏しいほぼ単一の宿主 RNA に収束してしまっただけに見える。遺伝情報を翻訳する能力の導入だけで

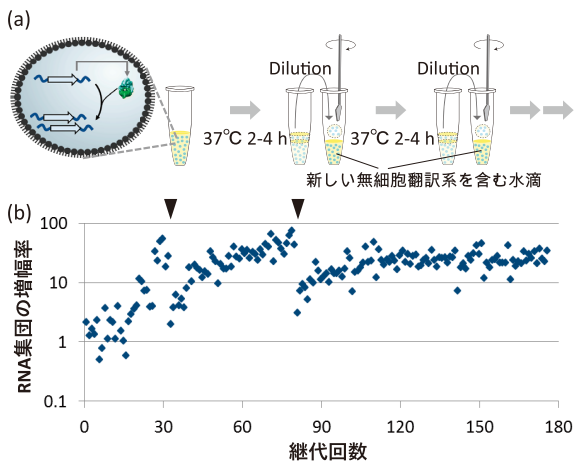


図 2 翻訳共役型 RNA 複製の区画内継代実験。(a) エマルションで区画化された宿主 RNA 集団の継代サイクル (b) 宿主 RNA 集団の自己複製能力の変化。矢じりで示す継代回数で実験条件を変えたため、一時的に増幅率が低下している。

はまだ足りない。生物のように際限がなく、多種多様な系統へと多様化する豊かな進化を達成するには一体何が必要なのだろうか？

7. 宿主・寄生体の分子「共進化」実験

ウイルスなどの寄生体は生物進化における重要なプレイヤーだと言われている⁴⁾。たとえば宿主は寄生体の感染をうまく避けようと、寄生体はよりよく宿主に感染しようとして相互の進化を促進するという進化的軍拡競争⁵⁾が起こる。これにより生物進化は止まることなく続いていくと推測されている。さて、前の実験では我々は寄生体 RNA を邪魔者とみなし、区画化を用いて複製システムから (実質的に) 除いた。ここで、もし宿主 RNA が寄生体 RNA と共存できる条件で進化実験ができるとしたらどうだろうか？共進化によって何か新しいことが起きるだろうか？

実は宿主と寄生体を共存させながら進化実験を行うことは可能である。先の継代実験の際には、平均 RNA 数を区画数より小さくなるように制御していたが、これを止めて、区画の中に多数の宿主と寄生体 RNA が存在する条件で継代実験を行えばよい。そうするとまず寄生体が急速に増えることにより宿主 RNA の複製が著しく阻害されて濃度が減少する。しかしそのまま継代が続くと寄生体 RNA も宿主なしでは複製できないため、宿主を迫るように濃度が下がってくる。すると宿主と寄生体をあわせた RNA の数が区画の数を下回ったところで RNA が 1 分子封入される条件が実現し、宿主は寄生体がない区画内で再び複製可能となる。宿主が増えると寄生体もまた増えてくるので、結果として宿主と寄生体の濃度が振動しながら複製が存続できる (筆者らの別の研究では理論モデルを用いてこの挙動を調べている⁶⁾)。次に我々は、このような宿主と寄生体が共存している条件で継代実験を行った。

8. 寄生体との共進化が継続進化と多様化の扉を開く

実験の結果、宿主と寄生体の個体数 (RNA 濃度) がおよそ 10 ラウンド周期で振動するパターンが現れた (図 3a)。この継代実験のスタート RNA は、先の進化実験の最後の RNA (ほとんど進化が止まっているもの) であったが、この寄生体との共存条件においては宿主 RNA に再び変異が蓄積し始めた。約 40 回の継代の後には、宿主 RNA のコードする複製酵素のアミノ酸組成が変化し、寄生体よりも宿主をより選択

的に認識して複製するような宿主 RNA が現れた⁷⁾。さらに 100 回近く継代した後は、配列長が大きく異なる新しい寄生体 RNA (β 寄生体・γ 寄生体) が出現した (図 3a)⁸⁾。驚くべきことに、これらは進化初期に登場した α 寄生体よりも長い配列を持っていた (図 3b)。これは、寄生体配列は遺伝情報を失い単調に単純化するという、従来観察されていた進化パターンに反する興味深い現象であった。

また、これら RNA 集団の進化パターンはこれまでの進化実験と比べて遥かに多様性に富むものであった。次世代シーケンサーを用いて進化中に存在した RNA 配列を網羅的に解析した結果、宿主は配列空間上で複数の系統に分岐進化していることが判明した (図 3c)⁸⁾。これは寄生体なしの進化実験で見られた一方向で多様性に乏しい進化パターンとは大きく異なっていた。寄生体もまた継代実験を通じて進化し続けた。α 寄生体は、初期に生まれたものが存続し、宿主

には見られない独自の変異を蓄積していた。また、新しく出現した β 寄生体と γ 寄生体は、それぞれの出現タイミング (99 および 115 ラウンド) で共存していた宿主 RNA の一部と同一の配列を持つことから、各々が独立に異なる宿主から生まれたものであることが示唆された。

次に我々は宿主と寄生体の相性が共進化していることを直接的に検証するため、宿主 RNA の祖先型配列・99 ラウンド配列・115 ラウンド配列のうち 1 種と、寄生体 RNA の α 型・β 型・γ 型のうち 1 種をそれぞれ選んでペアを作り、無細胞翻訳系に等濃度で共存させた状態で複製反応を行った。すると、最初は寄生体に負けていた宿主が寄生体の複製を抑えるように進化する、続いて寄生体が再び複製率を上げるように進化する (図 3d 上)、という適応を相互に繰り返す進化的軍拡競争を起こしているという結果 (図 3d 下)⁸⁾ が得られた。

なぜ寄生体は継続進化と多様性を生む進化を可能にしたのか？それは「動的な環境」の導入であると考えられる。これまでの分子進化実験では、複製体が進化する環境は一定であり、その環境下での最適な配列が見つかった時点で進化は停止してしまっただけであろう。一方、今回の実験では宿主から見た寄生体は進化により変動する動的な環境であり、ある時に最適であった宿主は図 3d にも示されるような新たな寄生体の搾取により最適ではなくなる。こうして宿主と寄生体が共進化しながら配列空間でいちごっこを続けるので進化は簡単には収束せず、異なる寄生体に対応して多様な宿主配列が生まれてくるものと考えられる。寄生体は一定の複雑さを持つシステムには避けがたく発生するものであり、原始の複製システムが複雑性を増し生命へと近づくために重要な役割を果たしていた可能性がある。

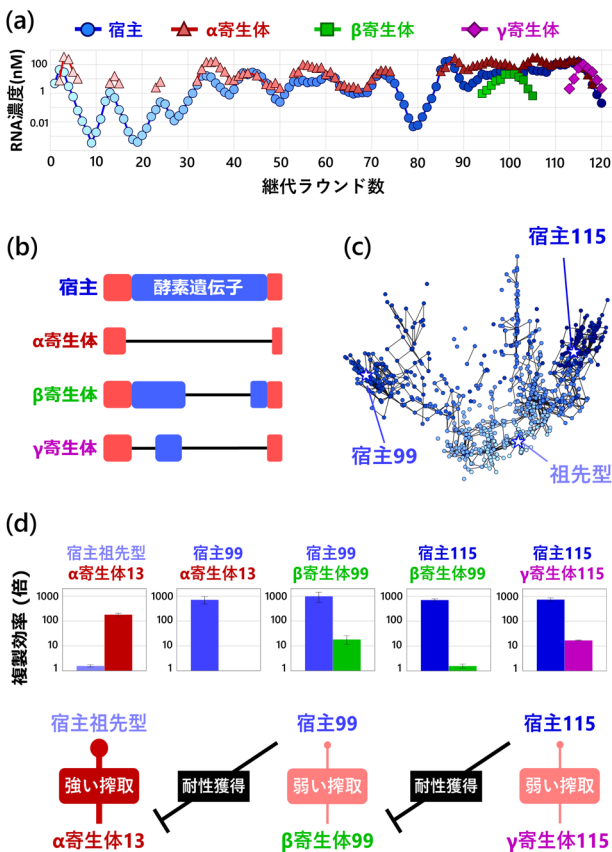


図 3 (a) 宿主・寄生体 RNA の濃度ダイナミクス (b) 宿主・寄生体 RNA のアラインメント模式図 (c) 宿主 RNA 配列の 2 次元マップ。点は 1 つの遺伝型を表し、点の色の濃さが継代ラウンド数に対応。ハミング距離 1 の遺伝型は線で結んでいる。(d) 宿主と寄生体の競合複製実験。棒グラフは 2 時間で各 RNA がどれだけ増幅できたかを示している。

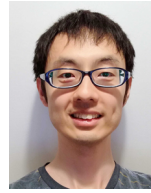
9. おわりに—2021 年進化の旅—

本稿で紹介した我々の人工 RNA 複製システムの進化は今もまだ続いており、宿主と寄生体の多様性はまだ増加を続けている。この進化はどこに辿り着くのだろうか？生命に近づくための次なるキーワードの 1 つは「協力」であると我々は考えている。異なる要素の協力関係は分子から生態系に至る生命システム全ての階層で普遍的に現れ、新たな機能や構造の創出に欠かせない。果たして RNA たちは熾烈な生存競争の果てに、相互の生存を相補するような新しい関係に辿り着くことができるのだろうか？それとも、単純な生存競

争から抜け出せずに、いずれ再び停滞してしまうだろうか。試験管内を往くRNA進化の旅は、まだ続く。

文献

- 1) Mills, D. R. *et al.* (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 217-224. DOI: 10.1038/319618a0.
- 2) Shimizu, Y. *et al.* (2001) *Nat. Biotechnol.* **19**, 751-755. DOI: 10.1038/90802.
- 3) Ichihashi, N. *et al.* (2013) *Nat. Commun.* **4**, 2494. DOI: 10.1038/ncomms3494.
- 4) Koonin, E. V., Dolja, V. V. (2013) *Curr. Opin. Virol.* **3**, 546-557. DOI: 10.1016/j.coviro.2013.06.008.
- 5) Dawkins, R., Krebs, J. R. (1979) *Proc. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* **205**, 489-511. DOI: 10.1098/rspb.1979.0081.
- 6) Furubayashi, T., Ichihashi, N. (2018) *Life* **8**, 3. DOI: 10.3390/life8010003.
- 7) Bansho, Y. *et al.* (2016) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **19**, 4045-4050. DOI: 10.1073/pnas.1524404113.
- 8) Furubayashi, T. *et al.* (2020) *Elife* **9**, e56038. DOI: 10.7554/eLife.56038.



古林太郎

古林太郎 (ふるばやし たろう)

東京大学工学系研究科・日本学術振興会特別研究員 (PD)

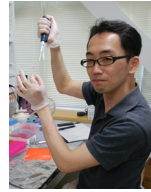
2018年大阪大学生命機能研究科修了 (博士・理学), 2019年フランスCNRSポスドク, 2020年東京大学工学系研究科特任研究員を経て現職.

研究内容: 構成的システム生物学, 実験分子進化, 理論生物学

連絡先: 〒 113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学工学部 3号館 6階 6B03

E-mail: furubayashi.t20@smb.t.u-tokyo.ac.jp

URL: <http://www.nojilab.t.u-tokyo.ac.jp/>



市橋伯一

市橋伯一 (いちはし のりかず)

東京大学総合文化研究科・先進科学研究機構・生物普遍性機構教授

研究内容: 人工細胞, 生命の起源と進化

連絡先: 〒 153-8505 東京都目黒区駒場 4-6-1 T棟 303

E-mail: ichihashi@g.ecc.u-tokyo.ac.jp

URL: http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/ichihashi_lab/