

(海外特別研究員事業)

平成 31 年 4 月 1 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年

受付番号 201860107

氏 名 水内良

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ポートランド州立大学 （国名： アメリカ合衆国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

短いランダム配列 RNA から自己複製体が創発する可能性の探求

3. 派遣期間：平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 22 日

4. 受入機関名及び部局名

ポートランド州立大学化学科

5. 所期の目的の遂行状況及び成果...書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6.研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

海外特別研究員最終報告書 5. 所期の目的の遂行状況及び成果

採用年度：平成 30 年度 受付番号：201860107 氏名：水内良

研究課題名：短いランダム配列 RNA から自己複製体が創発する可能性の探求

研究期間：平成 30 年 4 月 ～ 平成 31 年 3 月（短縮）

受入機関：ポートランド州立大学化学科

1. 研究開始当初の背景

生命の最も重要な特徴の一つは遺伝情報の複製である。そのため生命の起源の理解には、原始地球における、遺伝情報を担う分子の複製の理解が欠かせない。そのような情報分子の最たる候補は RNA（リボ核酸）である。RNA は遺伝情報を担うことに加え、化学反応を触媒するなどの機能をもつことができ、複製反応も触媒する可能性があるからである。実際、原始地球で非生物学的な（非酵素的な）反応で RNA が誕生したことを示唆する証拠も集まっている。ただし、そのような反応で合成される RNA は恐らく、様々な配列の短い分子だったと考えられている。

では短いランダム配列の RNA 集団からどのように複製が始まったのだろうか？Kauffman らの理論によると、それが十分多様な配列集団であれば、複数の分子が互いに互いの合成を促進する「自己触媒ネットワーク」とよばれる分子クラスターが形成され、そのネットワーク全体が複製すると示唆されている（Kauffman, 1986）。合成反応は、原始的な連結反応（ligation）や組み換え反応（recombination）などが想定されている。この理論研究は今もよく支持されており、また自己触媒ネットワークは実験的にも人工的に構築されたもの、未だ本当に短いランダム配列 RNA の集団から自発的に自己複製体が出現する—創発することが可能であるかは明らかでなかった。

2. 研究目的

本研究では、原始的な短い RNA 集団から、自己複製可能な長い RNA 集団が自発的に出現可能かどうかを知る。

3. 研究方法、研究成果

3.1. 原始環境の短い RNA 集団で起こり得る反応の探索と最適化

まず短いランダム RNA 配列集団で実際に起こり得る反応を調べ、反応条件の最適化を行った（本項目は大学院生と共同で行った成果である）。この時、特に組み換え反応に着目した。組み換え反応は $2\text{-mer} + 2\text{-mer} \rightarrow 3\text{-mer} + 1\text{-mer}$ のように進行するエステル交換反応であり、エネルギー的にほぼ中立であるため、非酵素的にも起こりやすいと考えられる。我々はこれまでに知られていた 1 種類の反応に加え新たに 3 種類の反応を発見し、またそれぞれの反応を最適化した（例：図 1 A）。いずれの反応も鋳型に二本の基質 RNA が結合することで安定化し、反応は促進され、また高 pH かつ高 Mg^{2+} 濃度条件でよく進行した。さらに我々はランダム配列においても、そのような組み換え反応が起き、様々な長さの産物が出現することを、次世代シーケンサー解析によって確かめた。以上から、短いランダム RNA 配列集団で組み換え反応がよく起きるとわか

った。これらの研究成果は論文として、派遣者（水内良）を著者の一人として学術雑誌 *RNA* に掲載された。

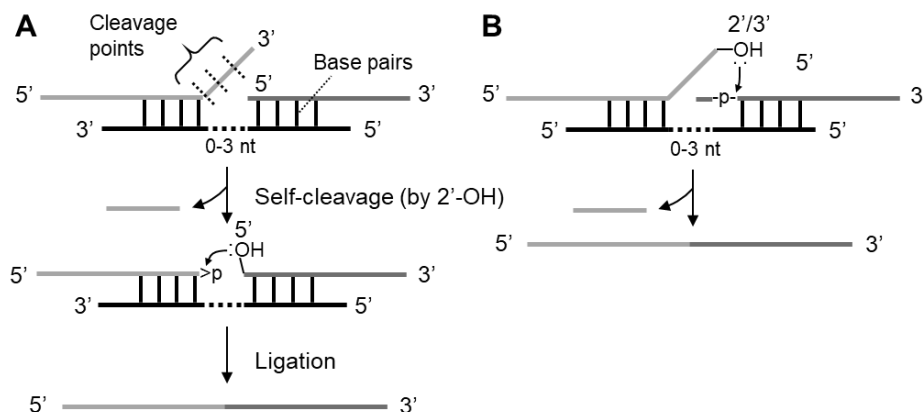


図 1. 組み換えの機構の例：(A) 自己切断反応による 2', 3'-cyclic phosphate (“>p”) の形成とそれに続く連結反応で起きる二段階反応。(B) 2', 3'-cyclic phosphate の形成を介さない 1 段階反応。

3.2. 短いランダム RNA の継代実験

次に、実際に短いランダム配列 RNA の集団から自発的に自己複製体が出現するかを実験的に調べた。実験の概念を図 2 に示した。ランダム配列を反応させ、もし自己触媒ネットワークが現れれば、それは進化の原理によって、反応と希釈・栄養供給を繰り返すにつれて徐々に濃縮され、検出可能になるはずである。ランダム RNA としては、完全にランダムな 8-, 12-, 16-, 20-, 24-mer を用いた。

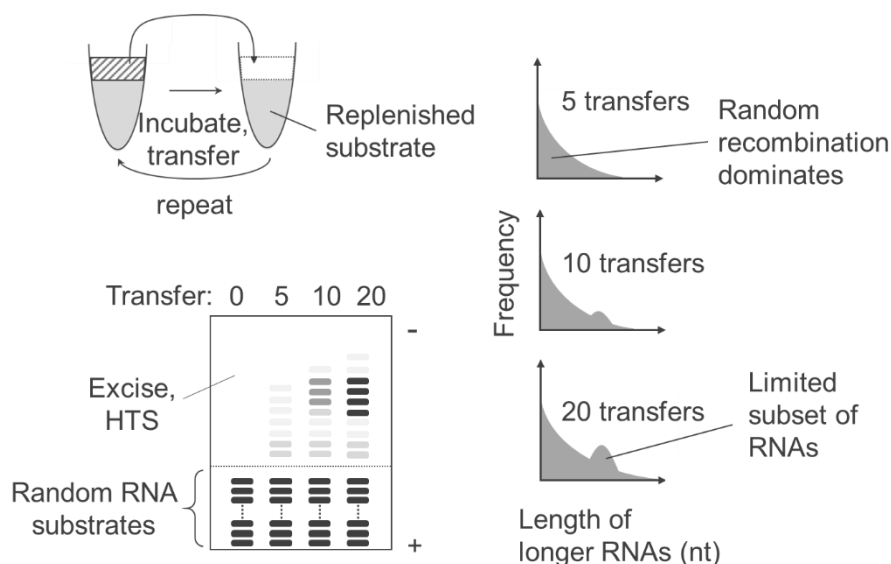


図 2. 実験による自己触媒ネットワークの検出：ランダム RNA の反応と希釈、栄養供給を繰り返し、各サイクルの RNA の配列長をポリアクリルアミド電気泳動（および次世代シーケンサー）によって調べる。もし配列長が伸びて自己触媒ネットワークが形成されれば、次第に濃縮され、検出できるはずである。配列が短いと、初期 RNA 集団にマスクされるので、検出困難であると

考えられる。

上記の実験を、様々な条件（反応時間、温度、他の RNA の存在下など）で約一か月サイクルを繰り返して行ったが、特定の配列が濃縮される様子は観察されなかった。自己触媒ネットワークが形成されていないか、形成されても何らかの理由で検出感度以上にならなかったと考えられる。以下の 3.3 および 3.4 項では、この結果を基に反応条件を再考察することにした。

3.3. より現実的な理論モデルの構築

上記 3.2 の実験で自己触媒ネットワークの兆候を検出することはできなかった。そこで、この実験の元となっている Kauffman の理論研究が本研究に適用できないのではないかと考えた。特に彼のモデルで暗に仮定されている、「ある長さ以下のある種のポリマー配列が全種類、無限かつ同時に存在する」という条件に着目し、これをより現実的な、また実験的に行うことが可能な、「有限の配列集団」について再考察することにした。また反応を上述の組み換え反応で明示し、より現実的な条件に近づけ、シミュレーションモデルを構築した（図 3）。

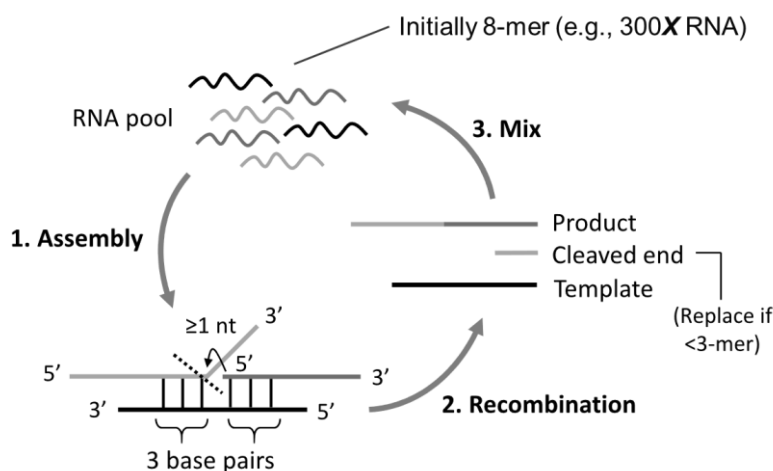


図 3. 組み換え反応に基づくより現実的なシミュレーションモデル：有限の RNA プール（例えば X 種類の 8-mer を 300 分子集めた配列集団）を用意し、上述の組み換え機構（図 1）に基づいて組み換え反応を繰り返す。

次にこのモデルを用いて、自己触媒ネットワークが出現するための最重要なパラメーターは集団の多様性であると明らかにした。今、多様性 X を X 種類の RNA 配列とし、例えば 300 X 分子の 8-mer RNA 集団を用意してシミュレーションを行ったところ、 X が低すぎても高すぎても自己触媒ネットワークは出現せず、 X がある中間領域にある場合のみ、高確率で自己触媒ネットワークが出現するとわかった（図 4 A）。さらなる解析によりこれは、 X が低い場合には反応が起きる可能性がとても低く、また X が高い場合は可能な反応の数が多すぎて、有限の RNA 集団ではそれぞれの反応はほとんど一度しか起き得なくなってしまう（ため複製はありえない）からであるとわかった。 X が中間領域で出現する自己触媒ネットワークは、とても複雑な、例えば数十個

の異なる配列が互いの合成を促進することで複製するような、自己触媒ネットワークを構築する可能性が高いと示された (図 4 B)。自己触媒ネットワーク例を図 4 C に示した。また、RNA 集団の多様性 X の最適な中間領域が何によって決まっているかを調べたところ、集団サイズであるとわかった。つまり、集団サイズが大きくなるにつれて、 X の範囲は高い方に「広がって」いくとわかった。さらに、これらの結果は本研究で着目した組み換え反応に限ったことではなく連結反応 (ligation) にも適用できると見出した。

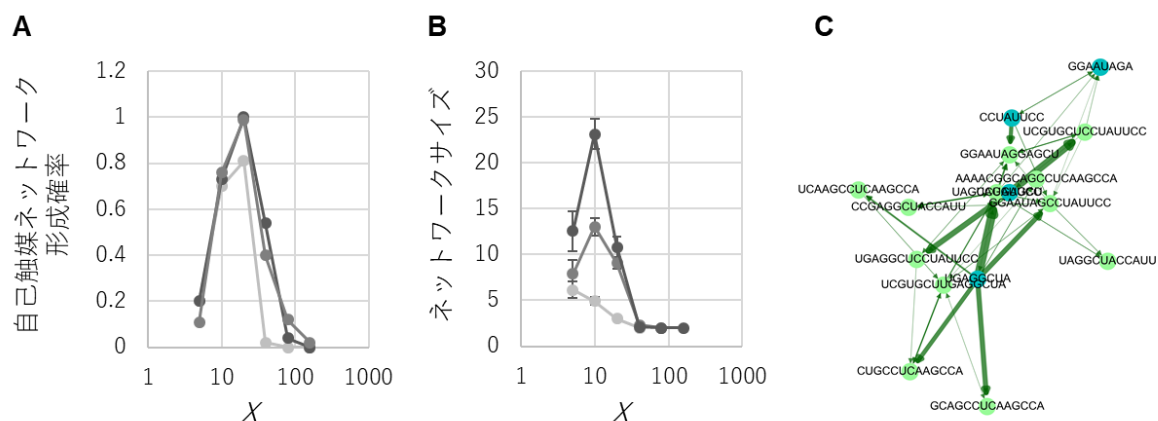


図 4. 自己触媒ネットワーク形成のための集団の多様性の最適値：初期集団を 300 X 分子の 8-mer RNA として 10,000 X , 30,000 X , and 100,000 X サイクル (図 3) のシミュレーションを行った。

(A) 自己複製ネットワーク形成確率の X 依存性、(B) 自己触媒ネットワークのサイズ (異なる配列の種類)、(C) 形成される自己触媒ネットワークの例。矢印が組み換えによる合成反応を示す。

以上から、有限の短い RNA 配列集団において、その集団の多様性がある中間値にあるとき、自己触媒ネットワークが出現することが予測された。実は、原始地球であり得た RNA 配列は完全にランダムでなく、大きくバイアスがあると考えられている。また原始的な反応では RNA は豊富に合成できない。そのため本研究は、量も種類も限られた原始地球の RNA 集団をよく模擬しており、そのような乏しい資源からでも複製体が現れ得ることを示唆している。これらの研究成果は論文として、派遣者を筆頭著者として学術雑誌 *Life* に掲載された。

3.4. 長い RNA を選択可能な環境条件の探索

図 4 から、自己触媒ネットワークの構成配列の大部分は供給した RNA よりも長い配列であると予想された。また実験的に自己触媒ネットワークを検出する場合、初期配列に埋もれない、長くなった RNA の方が、高感度で配列を決定できる (図 2)。そのため長い RNA を選択的に濃縮できる環境は、自己触媒ネットワークの出現および検出に有利であると考えられる。さらに、長い RNA を選択できれば、生命の起源における他の問題も解決できる可能性がある。例えば非生物学的に合成される RNA は往々にして極めて短いと知られているが、長い RNA を選択する方法があれば、そのバイアスを打ち消すことができるかもしれない。また複製する RNA は遺伝情

報をできるだけ減らすことで複製速度を上げる傾向があるが、長い RNA を好む環境があれば、それらを遺伝情報の損失から守り、生命の初期進化において、その複雑性の維持に繋がるかもしれない。

そこで、原始地球にあり得た環境のうち、長い RNA を選択可能な要素を探索することにした（本項目はアメリカの別大学のチーム、フランスのチームと共同で行った成果である）。その結果、原始地球において広範に存在していたと考えられる鉱物表面が長い RNA を選択的に吸着し濃縮できると見出した（図 5）しかも、調べた五種類の鉱物のうち全てで同様の傾向が見られた。また長い RNA の選択効率は温度依存性があり、例えば 48℃で 24-mer は 8-mer と比べて約 9 倍よく選択されることがわかった。さらに我々はこの鉱物による長い RNA の選択は、触媒 RNA（リボザイム）による組み換え反応と組み合わせて、長い反応産物を実際に選択できることも見出した。

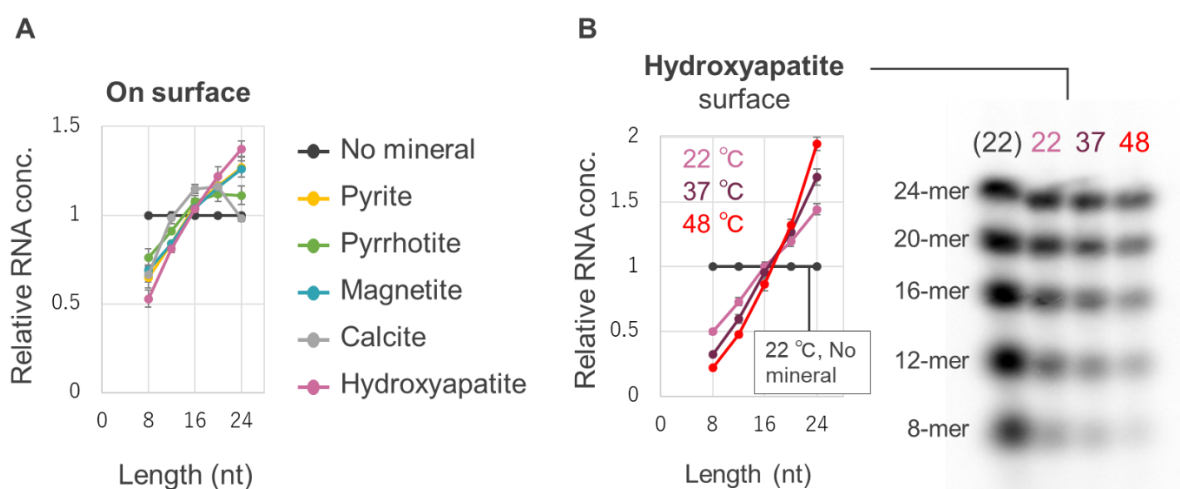


図 5. 鉱物表面での長い RNA の選択：(A) 五種類の鉱物での長い RNA の選択。(B) 温度依存性の例。

次に、鉱物が長い RNA を選択できる原理を調べるため、熱力学に基づいた数理モデルの構築を試みた。その結果、ある長さ k および j の RNA の濃度比 (r_k/r_j) は

$$\frac{r_k}{r_j} = \left(\frac{\theta_0}{\theta_w} \right)^{k-j} \exp(-\beta \delta (k - j)).$$

で表されると証明した。ただし、 θ_0 : 空いている表面領域、 θ_w : 空いている表面領域と吸着分子数の総和、 $\beta = 1/k_B T$ (k_B : Boltzmann 定数、 T : 熱力学温度) である。また (θ_0/θ_w) は RNA 分子が鉱物表面に吸着する際の $\varepsilon > 0$ 、 $\delta < 0$ という二種類のエネルギーに関するパラメーターによって決まる。上式はもともと一次元の鉱物表面を仮定して導出されたが、それは ε 、 δ 値を調整するだけで二次元表面に拡張可能であるとわかった。また温度依存性 $d(r_k/r_j)/dT$ についても ε 、 δ をエンタルピーとエントロピーに分解し、導出できた。その結果、理論モデルから求めた鉱物表面における各長さの RNA 濃度（図 6）はよく実験結果（図 5）と一致した。この結果は、鉱物の長い RNA を選択するという傾向は、各鉱物の化学的な性質によるのではなく、物理的な表面

構造によって決まっていると示唆する。

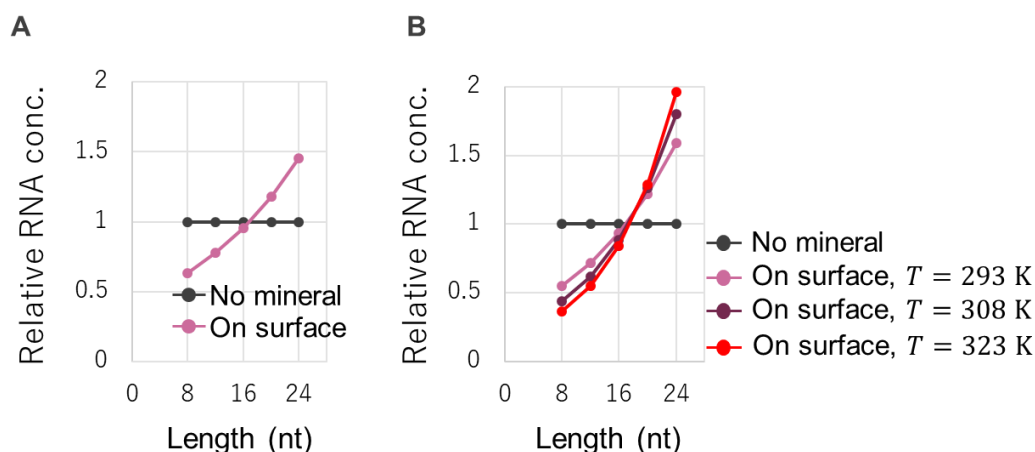


図 6. 理論モデルによる鉱物表面での長い RNA の選択の例：(A) 温度依存性を考慮しない場合、(B) 温度依存性を考慮する場合。

以上から、実験と理論の両方で、鉱物表面という地球上の普遍的な環境で、長い RNA が選択的に濃縮されると示すことができた。これまでに同様の選択が可能な環境条件は、熱水噴出孔などに見られる熱拡散と対流を組み合わせた環境しかしられていなかったが、本研究により、同様な効果は一部、地球上のはるかに広い環境で得られることが示された。これらの成果は論文として、派遣者を筆頭著者として学術雑誌 *Chemical Communications* に掲載された。また同論文は Royal Society of Chemistry が刊行する一般向けのニュースマガジン *Chemistry World* で特集された。

4. 本研究に関する発表論文

1. **Ryo Mizuuchi***, Alex Blokhuis, Lena Vincent, Philippe Nghe, Niles Lehman, and David Baum. Mineral surfaces select for longer RNA molecules. *Chemical Communications*, 2019, 55, 2090-2093. (*Corresponding author)

Featured in Chemistry World by Eve Rooks: Mineral surfaces promoted variation in prebiotic RNA (<https://www.chemistryworld.com/news/mineral-surfaces-promoted-variation-in-prebiotic-rna/3010167.article>)

2. **Ryo Mizuuchi***, Niles Lehman. Limited Sequence Diversity Within a Population Supports Prebiotic RNA Reproduction. *Life*, 2019, 9 (1), 20. (*Corresponding author)
3. Benedict A. Smail, Bryce E. Clifton, **Ryo Mizuuchi***, Niles Lehman. Spontaneous advent of genetic diversity in RNA populations through multiple recombination mechanisms. *RNA*, 2019, 25, 453–464. (*Corresponding author)