

①

遺伝子型／表現型対応付けにおける ウイルス型戦略の研究

1 9 9 6 年 3 月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

生物環境科学専攻(主指導教官 伏見譲)

根本直人

目次

序論	-----	1
第1章 翻訳のある分子進化の初期段階におけるウイルス型戦略	-----	6
A Model of the Virus-type Strategy in the Early Stage of Encoded Molecular Evolution		
1.1 緒言 Introduction	-----	7
1.2 ウイルス型メンバーをともなったハイパーサイクルモデル	-----	9
Description of the Models		
1.3 シミュレーション結果	-----	17
Results of Computer Simulation		
1.4 考察 Discussions	-----	24
1.5 結論 Conclusion	-----	28
第2章 対応付け戦略における細胞型の問題点	-----	30
2.1 緒言	-----	31
2.2 原始的細胞型モデル	-----	31
2.3 平均化効果・偏倚効果・ランダム複製効果	-----	33
2.4 淘汰過程のシミュレーション	-----	33
2.5 考察	-----	40
第3章 無細胞蛋白合成系で合成された蛋白と それをコードするRNAの結合法の実現にむけて ―― <i>in vitro</i> Virus へのアプローチ	-----	42
3.1 緒言	-----	43
3.2 材料と方法	-----	46
3.3 結果と考察	-----	54
3.4 展望	-----	57
総括	-----	59
要旨	-----	61
参考文献	-----	63
謝辞	-----	67

序論

生命の起源及び進化の問題は、物理学的にも生物学的にも重要な課題となっている。特に分子進化は物理科学と生命科学の統合へ向けて、非生命に源をもち、生命にとって普遍的な分子進化現象の駆動原理の解明を追究する意味で、生物物理本来の課題のひとつである。また、この駆動原理の解明は、実験室内での高速分子進化の指導原理にもなるため、機能性生体高分子の機能最適化技術とも関わり、工学的な利用の道が開けている。

本論文では、人工的な分子の進化実験から得た知見を生命の起源に適用し、「ウイルス型戦略分子」という概念が複製・翻訳系の初期進化において重要な役割を演じることを示した。これは、人為的に設定した実験から得られた観察をもとに、複雑な自然現象を記述するに際しての物理科学本来の精神に基づいたものである。

従来の生命の起源論は細胞の存在を前提にしたものであった。これは化学進化研究の初期におけるコアセルベートやプロテノイドといった細胞様構造体の発見や現在のウイルスの特徴は宿主に寄生する存在であるという一般的な通念によるものと思われる。しかし、蛋白合成系自体の起源が問題になる生命の起源の分野においては、蛋白合成系の有無で細胞とウイルスを分類する現在の細胞・ウイルス概念は適用できない。本論文では、進化分子工学から得られた新たなウイルスの定義に基づき、細胞型生命体より先にウイルス型生命体の出現を提案するものである。本論文ではさらに、このウイルス型戦略分子は、進化分子工学そのものにおいても極めて有効な手段を提供するため、この実験的創製へ向けてのいくつかの試みを報告する。

ウイルス概念の歴史的変遷

1899年に Beijerinck は、タバコモザイクウイルス (TMV) の研究を通し、最初のウイルスの基本的概念を展開した。このときすでに Beijerinck は、ウイルスを濾過性で、しかも細菌の菌体外毒素とは明らかに異なる細胞より小さい生命体と考えて「伝染性の生きた液体 (Contagium vivum fluidum)」と呼んだ。同じ頃、Loeffler と Erosch とも動物の口蹄疫の病原体が TMV と同じ性質を持つことを発見した。そこで、したいに「濾過性病原体」という概念が成立した [Waterson & Wilkinson, 1978; Primrose & Dimmock, 1980]。当初から、分類や性状の不明確さを反映し様々な批判があったものの、この名前は一般に通用する総称となり、ウイルス概念が成熟し、“ウイルス”なる言葉が固有の明確な意味を獲得するまで続いた。微生物のウイルスであるバクテリオファージは、赤痢菌を研究していた d'Hérelle によって 1917 年に命名された。d'Hérelle は直ちにバクテリオファージの医学への応用に向けて努力したが実を結ばなかった。ただ、その研究過程で溶原性細菌を発見することになった。これは、バクテリオファージつまりウイルスが宿主と共生できることを意味するため、ウイルスの増殖が細菌を病的にすると考えていた d'Hérelle を含めた当時の細菌学者のウイルス概念とは真っ向から矛盾するものであった。そのため、1950年に Lwoff

によって再度取り上げられるまで、溶原菌は黙殺されることになった。つまり、それまではウイルスが病原体という概念と強く結び付いていたことを意味する。さらに、ウイルスの概念を複雑にしたのは、1935年のStanleyによるTMVの結晶化であった。結晶化されることが非生物的事実であることの論理的根拠にはならない。しかし、このことは生命の本質に関する多くの議論ないし疑問を生むことになり、ウイルスは生物ではないという通念を生むことになった。一方、1939年にDelbrückらは、ウイルスが遺伝的には他の全ての地球上の生物と共通する遺伝物質と遺伝機構をもっているという見通しのもとに分子遺伝学の建設を始めた。ウイルスは遺伝現象の解明と同時に分子生物学そのものに大きな役割を演じたが、このために、ウイルスは宿主細胞の破片であるとか、退化したものであるという見解が支配的になっていった。万が一、それが細胞起源でない生命体であったとしても、細胞なくして増殖できないものであるから、ウイルスは進化的には細胞より後に登場したとする素朴な見解が現在も支配的である。ウイルスの定義は、1950年代にHersheyらによって定義されて以来今日まで、核酸としてDNAかRNAのどちらかを持つ感染性の偏性寄生性の構造体ということになった。つまり、ウイルスは核酸というウイルスを構成するために必須な化学物質の側面と宿主細胞に寄生する属性によって定義される。これは、現在のウイルスのみを定義する上では妥当かもしれない。しかし、新しく成立しつつある生命の起源や進化分子工学といった学問分野で、つまり過去から未来に渡る時間軸のなかでウイルスを取り扱う場合、現在のウイルスの属性による定義が普遍性をもつかは大いに議論の余地がある。これは次のようなことを考えてみれば明らかである。ウイルスの寄生する属性の具体的内容は、ウイルスはそれがコードする遺伝子を翻訳する場合に必ず宿主細胞のリボゾームを利用し、ウイルス自身は翻訳系を持ち得ないということである。これこそが、ウイルスが同じ濾過性病原体であるリケッチアやマイコプラズマなどの寄生性生物と明確に区別される理由であった。ところが、翻訳系の起源自体が問題とされる生命の起源においては、もっとも初期のコアセルベートのような単に膜構造をもった前原始細胞は始めから翻訳系を持つことは想定されていない。このことは、翻訳系を持つことが“細胞”の条件であるならば、膜をもった細胞様構造体は細胞ではないことを意味する。つまり、このような細胞以前の原始生命世界における構造体を現在の細胞やウイルスの本質的でない属性によって定義することは不適切である。

1981年のCechによるリボザイムの発見は、従来の生命の起源論に対し新しい視点を提供した。つまり、従来の生命の起源論が自己複製単位として「細胞」のみを念頭に置いたために抱えていた核酸（情報）と蛋白質（機能）のどちらが先に生じたかというニワトリとタマゴのジレンマを、両者を1つの分子に乗せることで解消した。すでにCrickやEigenらによって理論的には予想されていたことではあったが、RNAが触媒活性を持つという実験的裏付けができたことで自己複製するリボザイムを仮定したRNAワールド仮説が提案された。そして、リボザイムの様々な機能を分子生物学の手法を使って試験管内で創出しようとする人々によって、1990年以降のRNAの進化分子工学が用意されることになった。一方、時を同じくして、今度は伏見らやScott&Smithらによってウイルスを使った進化分子工学が準備された。

これらの進化分子工学による成果は、ウイルスの進化機構上の独特の地位を明確にした。それは、非エンベロープ型ウイルスが分子のある機能を進化させるために不可欠な表現型（機能）とそれをコードする遺伝子型（情報）との対応付け戦略のひとつを採用していることである。したがって、対応付け戦略はそれを採用する代表的な進化分子系の名称をつけて、表現型と遺伝子型を同一分子上に載せたりリボザイム型、表現型と遺伝子型を単純に結合させたウイルス型、表現型と遺伝子型を1つの袋に入れた細胞型の3つに分類されることがわかってきた。このような分類法でウイルス型を定義した場合、RNAワールドの自己複製するリボザイムの後に出現する自己複製単位として必ずしも細胞を考える必然性はない。むしろ、構造的に簡単なウイルス型戦略をもつ自己複製単位を考えてもよい。

ウイルスの起源に関しては、すでに述べたように細胞の退化したものという見方がほとんどだが、中には全く異なった見解を提出しているものもある。その代表的な考えは、ワトソンの『遺伝子の分子生物学』に書かれてあるもので、RNAウイルスの中には、単純な（たぶん前細胞状態の）生命系の中で発生し、より原始的な生命の特徴をもっているものがある可能性があるというものである。ただし、この文脈の中でもRNAワールドにおいて膜構造をもった細胞様構造体は想定されており、また、RNAワールドの後に出現するRNPワールドは単にRNA酵素のみによってできたRNAワールドからRNAとタンパク質よりなる核タンパク酵素によって形成される生命世界を想定している。そこで、われわれはすでに述べた対応付け戦略の進化的な観点から、RNAワールドはRNAよりなる自己複製リボザイムが主役をなした世界であり、RNPワールドとはRNAとそれがコードするタンパクが単純に結合したウイルス型の自己複製単位が進化をした世界であると提案したい。

現在のウイルスは極めて多彩で、同一の祖先から進化したとは考えにくい。また、一般にウイルスは複製忠実度が低いために進化速度が速く、ゲノムから進化系統樹を作ることは困難である。したがって、初期の分子進化におけるウイルス型戦略分子の役割を研究する上で、実験室内分子進化実験は不可欠な研究手段となる。

分子進化への実験的アプローチと進化分子工学の発展

分子進化という場合の分子は生体高分子を意味し、化学進化で扱う分子とは著しく異なった特徴をもつ。分子生物学が明らかにしたことは、この生体高分子が特有の1次配列を有していることであった。そして、その1次配列（一次構造）が特有の3次構造あるいは立体構造に対応し、機能を発現するということである。実験室内分子進化の研究の目的の一つは、環境との相互作用を通し環境情報をこの1次配列に書き込む機構を分子レベルで解明することであった。これは、生物進化におけるダーウィンの自然淘汰の概念を分子レベルに適用することにより、生命の起源及び進化を生体高分子の物理化学に帰着させることでもある。一方、物質の自己組織化を取り上げるうえで熱力学的な観点から、Prigogineの開放系で平衡から遠く離れた非平衡条件は不可欠である。

以上の観点から、理論及び実験の両面において体系的に研究を推し進めたのがEigenであ

る。しかし、分子進化実験として最初に先鞭をつけたのはシュピーゲルマンらで、1960年代のことであった[Mills *et al.*, 1967]。彼らは大腸菌のRNAフェージQ β のレプリカーゼが特異的にそのRNAゲノムを複製することに注目した。そして、試験管内でヌクレオチド三リン酸とQ β レプリカーゼを加えた反応溶液にQ β の4200塩基の一本鎖RNAゲノムを投入し一定時間反応させ後、その合成物の一部を採取し、新しい反応溶液が入った試験管に植え継ぐ実験を繰り返した。この植え継ぎ実験は、試験管内分子進化実験を行なう上で重要な2つの点を示唆している。1つは、一定時間反応させた試験管から常に一定量の反応液を採取し新しい反応液に加えることで、流量一定という淘汰の束縛状態が近似的に実現し、分子レベルでのダーウィン進化を可能にしているということ、言葉を替えれば環境情報をRNAに書き込むプロセスになっているということである。2つめは、このような植え継ぎは、同時に、この自己複製分子系を自己秩序化の必要条件である開放系で平衡から遠く離れた非平衡状態(散逸構造)に導くということである。この実験の結果は劇的であった。まず、合成されたRNAの大腸菌への感染性は4回目で失われ、74回の植え換えを繰り返した後得られたRNAは元のサイズの27%しかなかった。これは、試験管という環境下でQ β レプリカーゼの基質として優れ、より速く増殖できる短いRNAのみが急激に“進化”し、もはや不必要な大腸菌の感染能などをもつRNAは逆に急速に淘汰されていったことを示している。この研究は、試験管内でRNAという生体高分子がダーウィン進化することを初めて塩基配列レベルで明らかにしたことになる。

アイゲンらは、この植え継ぎ実験を発展させ、1984年には、RNAを作業レプリコンとする進化分子工学を提唱した[Eigen&Gardiner, 1984]。現在、シュピーゲルマンの継代植え継ぎ法を自動化した自然淘汰型RNA進化リアクターをはじめとする、RNA進化分子工学のためのいろいろな装置を試作している。

また、1982年、伏見らはバクテリオフェージF1族を用いた自然淘汰型進化リアクターを開発した[Husimi *et al.*, 1982]。これは、ウイルスを連続培養するシステムでセルスタットと名付けられた。セルスタットは、上流に宿主細胞のタービドスタットという培養槽をおくことと、セルスタットの希釈率を宿主細胞の比増殖速度より十分大きくしておくことで、ウイルスのみの自然淘汰を観察するのに成功した。伏見らは、漸進的高速進化のためには生体高分子の物性、特にその配列空間上の適応度の地形が重要であるという認識に基づき、この地形の測定に努力を傾けてきた。このように1980年代において、ドイツと日本において試験管内分子進化実験の研究から進化分子工学への成立に向けて地道な努力がなされ、生体高分子が進化する条件として、(1)開放系、(2)自己増殖系、(3)突然変異系、(4)高分子の適切な適応度の地形の存在、(5)遺伝子型と表現型の対応付け戦略の存在、の5条件がまとめられた。

1990年に進化分子工学に関わる様々な取り組みと成果がアメリカを中心に具体化された。これらの主なものを次ページにまとめた。

このような、進化分子工学の成功例から明らかになったことの一つは、遺伝子型と表現型の対応付け戦略における『効率』の問題であった。進化機構上の「細胞」の意味は翻訳のある分子進化における遺伝子型分子と表現型分子を同じ一つの袋にいれることによって対応

る分子進化における遺伝子型分子と表現型分子を同じ一つの袋に入れることによって対応付けようとする、その袋に他ならない。これは、ウイルス型に比べて効率の悪い方式であることがわかってきた。そこで、無批判に細胞の存在が前提となっている現在の生命の起源論に対し、進化分子工学で明らかにされたウイルスの概念を細胞と対等の位置に置いて比較検討する必要がある。

戦 略	最適化速度	生命体の例	進化分子工学の例
同一分子上に乗せる (RNA型)	大	RNAワールドの 機能性RNA ウイロイド?	RNA進化リアクター in vitro 遺伝学 SELEX
一つの結合体とする (ウイルス型)	中	ウイルス粒子	セルスタット フェージ・ディスプレイ in vitro ウイルス・ コード化タグ付き組合せ論的重合法
一つの袋に入れる (細胞型)	小	細胞	ケモスタット (プラスミド) クローニング型進化リアクター 細胞表面ディスプレイ法 リボソーム内PCR/翻訳系
(袋+結合体)		多細胞	
外部知性による 対応付け	小~大	ヒト?	着地付け並列固相重合法 組合せ論的固相重合法 コード化タグ付き組合せ論的重合法

本論文の構成

第1章では、進化分子工学において蛋白質の単一機能を最適化する上で細胞型より有利なウイルス型戦略の重要性に注目し、従来の生命の起源論では提案されなかった virus early/cell late モデルを Eigen のハイパーサイクル理論の中で構築できることを示した。また、そのウイルス型戦略分子により、複製・翻訳系が漸進的に共進化する図式を示した。

第2章では前章の結果を踏まえ、ウイルス型生命体と細胞型生命体の単純な数理モデルを使い、淘汰速度の比較をおこなった。これにより、対応付け戦略の観点からの問題点として、1. 平均化効果、2. 偏倚効果、3. ランダム複製効果、の3つが挙げられる。特に、3のランダム複製効果は細胞型戦略にとって致命的な影響を与えることがわかった。

第3章では単一機能を最適化する上でのウイルス型戦略分子の有効性に基づき、従来の細胞に依拠したウイルス型の進化分子工学の限界を乗り越えるために、無細胞蛋白合成系を利用した *in vitro* Virus の創製に向けておこなったいくつかの試みを報告する。

第 1 章

翻訳のある分子進化の初期段階における
ウイルス型戦略

**A Model of the Virus-type Strategy in the Early Stage of
Encoded Molecular Evolution**

1.1 INTRODUCTION

Non-enveloped viruses such as simple bacteriophages have an unique strategy of assignment of a genotype to its phenotype. The molecule of genotype is bound to some of molecules of the phenotype. In short, genomic DNA (or RNA) is bound to coat proteins. On the other hand, the cellular organisms adopt another kind of the strategy, namely the compartmentalizing of both genotype and phenotype molecules in a single compartment enclosed with a cell membrane. The simplest strategy is that adopted by ribozymes in the RNA world. A single molecule carries both genotype and its phenotype.

Recent advances in evolutionary molecular engineering has demonstrated that the strategy adopted by the simple virus is very efficient for molecular evolution of a single protein. Examples are the phage display method (Scott & Smith, 1990), the cellstat method (Husimi, 1989), and the encoded combinatorial library method (Brenner & Lerner, 1992). An "*in vitro* virus" process, which simulates a life cycle of a retrovirus in a cell-free test tube, are being tried in order to prepare for the rapid adaptive design of a protein molecule as the coat protein of the "*in vitro* virus" (Suzuki et al., 1993).

In the evolutionary molecular engineering, the ribozyme-type and the cell-type strategies have also been adopted. The ribozyme-type strategy is the most effective, but the cell-type strategy is not so effective. The efficiency of the virus-type evolutionary molecular engineering process must correspond to faster evolution of a virus in nature than a cellular organism.

Maizels & Weiner (1993) suggested that some contemporary viruses preserve a record of the replication strategy used by a cellular organism in the RNA world and that contemporary viruses are older as living fossils than contemporary cellular organisms in this sense. Many authors, however, believe that viruses emerged after

the evolution of cellular organisms, because viruses are cell parasites. Indeed, the contemporary virus can not reproduce without the host cell. The "*in vitro* virus", however, can reproduce without a cell. What of ancient viruses? This depends on the definition of the virus. The original medical definition of a virus was a filterable self-reproducible parasitic pathogen (Beijerinck, 1898). Some bacterial viruses -- filamentous phages -- however, are trapped by a filter and they sometimes become a symbiont rather than a parasitic pathogen. Based on the success of virus-type evolutionary molecular engineering, we propose here that the essential nature of virus in the evolutionary aspect is its strategy of the assignment of the phenotype to its genotype. The degree of conservation of this nature of the contemporary virus is wide. Almost all contemporary viruses adopt more-or-less both virus-type and cell-type strategies.

Now we can imagine a "filterable self-reproducible parasitic pathogen" to a pool of the RNA world, which adopted the virus-type strategy in its pure form before the emergence of a cellular organism. In this chapter we show that the introduction of such a virus-like organism between the occurrence of the RNA polymer organism and the single cellular organism in the early history of life makes it easy to explain a gradual and rapid evolution of a molecular system of encoded protein synthesis.

Some authors (e.g., Weiner, 1988) have suggested the presence of the ribonucleoprotein(RNP) world after the RNA world without comment on the assignment strategy of encoded protein synthesis. They tacitly assume the presence of cell-type strategy.

The presence of the RNA world -- that is, the living world consisting of self-replicating RNA without encoded protein -- is widely accepted (Gilbert, 1986). This hypothesis is reinforced by the recent inventions of various functional ribozymes through the evolutionary molecular engineering of ribozyme-type (e.g., Bartel & Szostak, 1993). Presence of the cell is not essential in the RNA world. Several self-

replicating ribozymes can coexist as members of a hypercycle (Eigen, 1971) without competitive exclusion in a pool of the RNA world.

In the original model of the hypercycle with translation, the synthesized proteins are assumed to be isolated molecules. This situation leads to dichotomy between genotype and phenotype. To overcome this difficulty, the hypercycle has to be compartmentalized into a cell (Eigen & Schuster, 1979; Buchholtz & Schneider, 1985).

Here we introduce a member with virus-type strategy into the hypercycle. Based on the discovery of peptidyl transferase activity of ribosomal RNA (Noller, Hoffarth & Zimniak, 1992), we also introduce a ribozyme with translation activity into the hypercycle. We show that such a hypercycle with virus-like members could enable both the replicase activity of the first protein and the translation activity evolve gradually out of the RNA world.

1.2 DESCRIPTION OF THE MODELS

1.2.1 A hypercycle with virus-like members at the end of the RNA world.

Based on the following postulates, we consider a hypercycle model demonstrating that the replication system and the translation system evolve together in Darwinian sense at the end of the RNA world. The most unique postulate in this model is postulate- 4.

Postulate-1. There were the replication ribozymes in the RNA world. They catalyzed the replication reaction of RNAs including themselves. The length of the ribozyme was not so long because of the poor fidelity of replication. The ribozymes constituted a hypercycle to coexist [Fig1.1(a)] (Eigen & Schuster, 1979).

Postulate-2. The first protein which was encoded in an RNA emerged as a co-factor of the replication ribozyme. Translation was performed by ribozymes

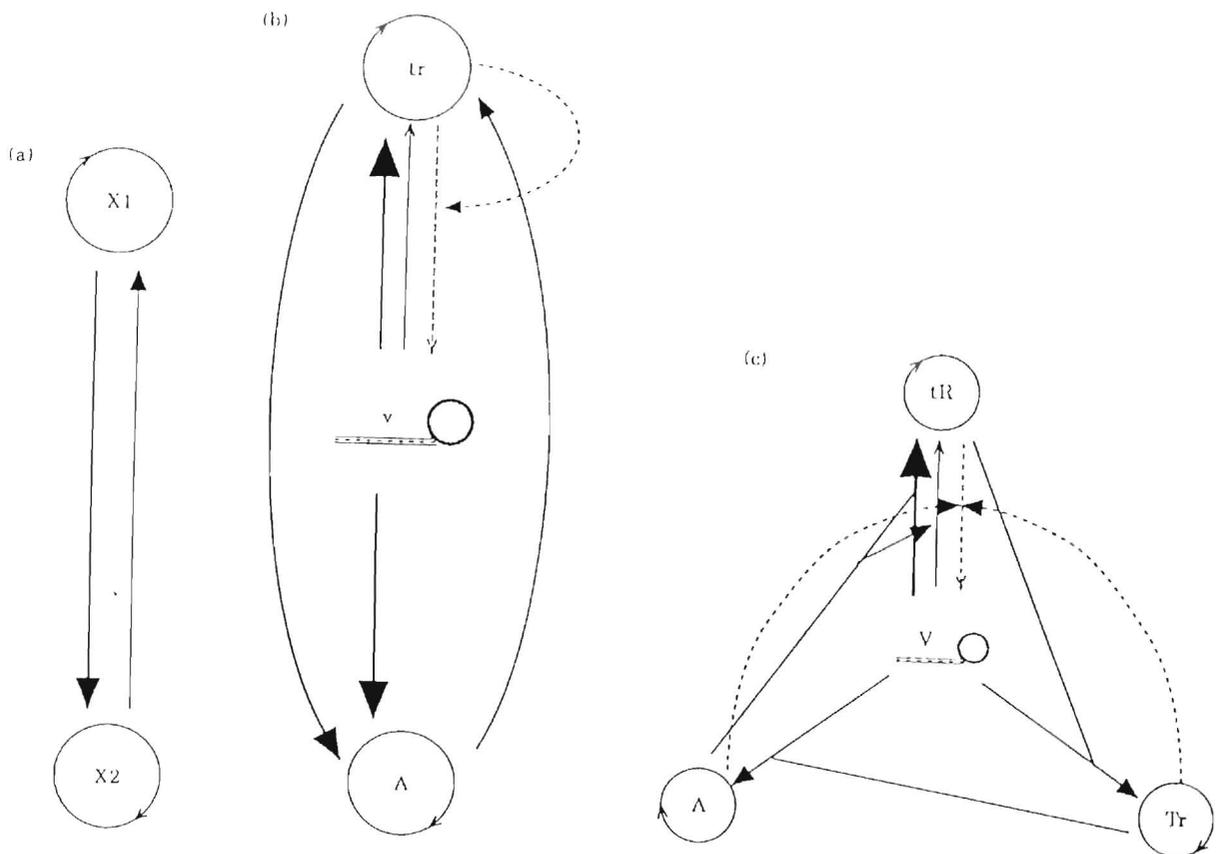


Fig.1.1 Various hypercycles.

Solid and open arrows denote catalytic reaction and chemical reaction, respectively. Solid lines and broken lines denote replication and translation, respectively.

(a) An elementary hypercycle in the RNA world. X1 and X2 are replicase ribozymes.

(b) A hypercycle with a virus-like member. "tr" is a ribozyme, which has both replicase activity and peptidyl transferase activity and carries a gene for a cofactor of the replicase ribozyme. "A" is another replication ribozyme which serves also as an adapter. "v" is a complex of tr (RNA gene) and the replicase cofactor (translated protein), that is, a "virus" particle. In this figure, only "tr" catalyzes a translation for simplicity. "A" also catalyzes translation in the computer simulation described in the text.

(c) A specialists hypercycle. Tr is a descendant of tr which has improved the peptidyl transferase activity. tR is a descendant of tr which has improved the replicase activity of the replicase virus. V has a greater replicase activity than v in (b) The mutual catalysis of replication among Tr, tR and A is neglected

(Noller et al., 1992). Some ribozymes in the hypercycle were aminoacylated with a specific amino acid (Shimizu, 1982; Piccirilli et al., 1992). They served as tRNAs. A translation ribozyme, which had both replicase activity and peptidyltransferase activity, also had a gene for the first protein

Postulate-3. The environment of the hypercycle is modeled by a continuously stirred tank flow reactor into which substrate small molecules flow, and from which excess polymers flow out. We assume the dilution rate D is regulated to keep constant the total population of polymers in the reactor for simplicity (a turbidostat model).

Postulate-4. The translated protein was bound to the gene. Our system adopted the virus-like strategy of assignment of genotype to phenotype. We call the bound entity as a "virus" and the hypercycle as a "hypercycle with a virus-like member" [Fig1.1(b)] A virus-like member is defined as a set of the naked coding RNA and the virus. The dynamics of the hypercycle with a virus-like member of Fig1.1(b) is described as follows:

$$\frac{dx_1}{dt} = \sum_{i=1,v} \sum_{j=1,2,v} k_{ij}x_i x_j + k_v x_v - k_t x_1 x_2 - x_1 D, \quad (1)$$

$$\frac{dx_2}{dt} = \sum_{i=1,2,v} k_{2i} x_2 x_i - x_2 D, \quad (2)$$

$$\frac{dx_v}{dt} = k_t x_1 x_2 - x_v D, \quad (3)$$

$$D = \sum_{i,j=1,2,v} k_{ij} x_i x_j + k_v x_v, \quad (4)$$

where x_1 , x_2 and x_v denote the population density of the replication/translation/coding ribozyme (tr), another replication/translation ribozyme (A)

and virus (v), respectively. We arbitrarily set the total population in the turbidostat to be 1. Thus population density of each member means the mole fraction within total RNA polymers. The k_{ij} s denote the rate constant of replication reaction for the i -th member catalyzed by the j -th member. k_v denotes the rate constant of replication reaction for RNA moiety of the virus catalyzed by itself. k_t and D denote the translation rate constant and the dilution rate, respectively.

1.2.2 The evolution of a replicase-virus member in the hypercycle

We extend the above mentioned model [Fig.1.1(b)] to treat a case that an advantageous mutant of the replicase-virus member emerged in the hypercycle (Fig.1.2) and to observe how the population changeover occurs for the virus-like member. The dynamics in this case is described as follows:

$$\begin{aligned} \frac{dx_{1n}}{dt} = & \sum_{m=0}^1 (k_{1n1m}x_{1n}x_{1m} + k_{vn1m}x_{vn}x_{1m} + k_{1nvm}x_{1n}x_{vm} \\ & + k_{vnvm}x_{vn}x_{vm}) + k_{vn}x_{vn} - k_t x_2 x_{1n} - x_{1n}D, \end{aligned} \quad (5)$$

for $n=1,2$,

$$\frac{dx_{vn}}{dt} = k_t x_2 x_{1n} - x_{vn}D, \quad (6)$$

for $n=1,2$,

$$\frac{dx_2}{dt} = \sum_{m=0}^1 (k_{21m}x_2x_{1m} + k_{2vm}x_2x_{vm}) + k_{22}x_2x_2 - x_2D, \quad (7)$$

where D denotes dilution rate. x_{10} and x_{v0} are population densities (or mole fraction) of the ribozyme and its virus, respectively. x_{11} and x_{v1} denote

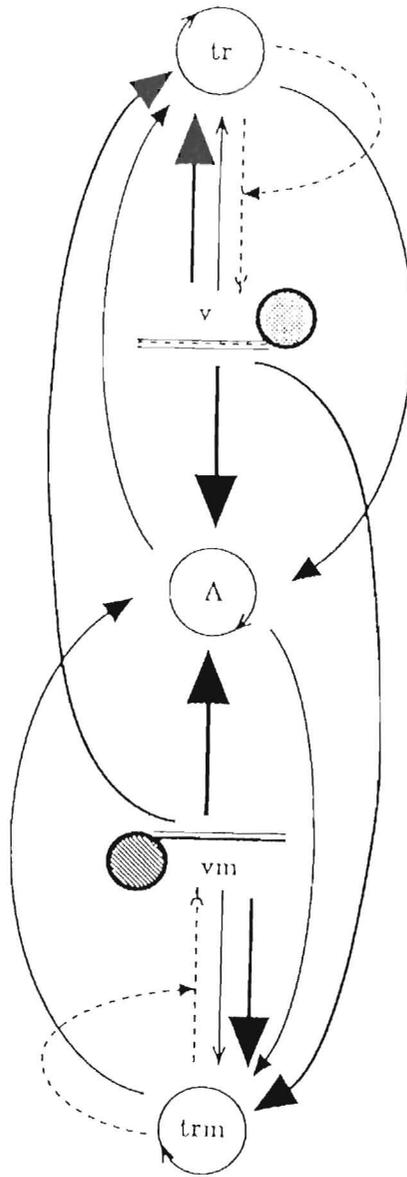


Fig.1.2

A model describing the elementary step of evolution of the replicase virus (v) in Fig.1(b) tr and v are wildtypes. trm and vm are advantageous mutants.

population densities of the advantageous mutant of the tr and its virus v, respectively x_2 denotes the population density of the ribozyme "A". Equations (5)-(7) include all cross-terms of replication reactions catalyzed by each other.

1.2.3 The evolution of two additive replicase-viruses in the hypercycle

We extend the model to the case where the hypercycle has two kinds of the replicase-virus members which serve additively two different functions for RNA handling (Fig.1.3). Here we treat a case where the replicase-virus evolved to have a much greater activity than that of ribozymes. Thus the k_{1n1m} and k_{21m} terms ($n=0,1, m=0,1$) and k_{vn1m} and k_{vm2} terms ($m=0,1, n=0,1$) are negligibly smaller than other k terms in the above eqs (5)-(7).

The dynamics of this model, when each advantageous mutant of both replicase-virus members emerged, is described as follows:

$$\begin{aligned}
 dx_{in}/dt = & \sum_{j=1}^2 \sum_{m=0}^1 k_{invj,m} x_{in} x_{vj,m} + k_{vi,n} x_{vi,n} \\
 & + \sum_{j=1}^2 \sum_{m=0}^1 k_{vi,nvj,m} x_{vi,n} x_{vj,m} - k_t x_3 x_{in} - x_{in} D, \quad (8)
 \end{aligned}$$

for $i=1,2$ and $n=0,1$

$$dx_{vi,n}/dt = k_t x_3 x_{in} - x_{vi,n} D, \quad (9)$$

for $i=1,2$ and $n=0,1$

$$dx_3/dt = \sum_{i=1}^2 \sum_{n=0}^1 k_{3vi,n} x_3 x_{vi,n} + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{m=0}^1 \sum_{n=0}^1 k_{3vi,mvj,n} x_3 x_{vi,m} x_{vj,n}$$

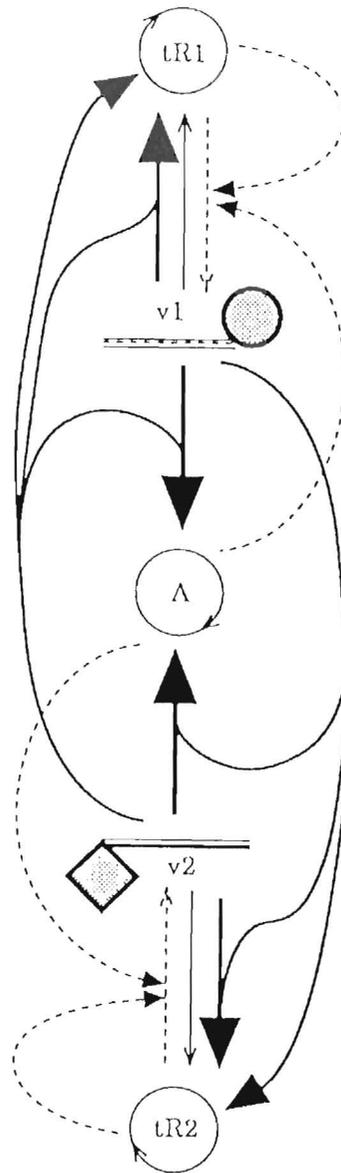


Fig.1.3

A hypercycle consisting of two additive virus-like members, v1 and v2 are replicase viruses. They replicate RNAs additively. "A" is a ribozyme which has both replicase activity and adapter activity.

$$-x_3D. \tag{10}$$

The dilution rate D is determined based on the condition of constant total population. x_{10} and x_{20} are the population densities (or mole fractions) of the wildtype of two kinds of replication/translation/coding ribozymes $tr1$ and $tr2$; each encodes a differently functioning protein of RNA handling. x_{11} and x_{21} denote the population densities of the advantageous mutants of $tr1$ and $tr2$, respectively. $x_{vi,n}$ denotes the population density of the virus made from $x_{i,n}$. x_3 denotes the population density of another replication/translation ribozyme "A"

The emergence of the additive partner is explained by the model itself. The first molecule named $tr2$ may be a mutant of $tr1$ or a migrant from another pool. If the virus-like member $tr2$ is not a competitor against the virus-like member $tr1$ but a mutual enhancer with it, then $tr2$ becomes a member of a stable hypercycle shown in Fig.1.3.

1.2.4 Making of two specialist ribozymes from the doubly functioning ribozyme (tr).

Finally, we extend the model to the case that, after some improvements of replicase activity, the additionally doubly functioning ribozyme (tr) was replaced by two specialized ribozymes, a translation ribozyme (Tr) and a replicase-cofactor encoding ribozyme (tR). Note that all these ribozymes also have the replicase activity. The hypercyclic couplings between members were rearranged to meet the new structure called a specialist hypercycle [Fig.1.1(c)]. The dynamics of the model is described as follows:

$$\frac{dx_1}{dt} = \sum_{i=1,v} k_{iV3}x_i x_v x_3 + k_{V3}x_v x_3 - k_t x_1 x_2 x_3 - x_1 D, \tag{11}$$

$$\frac{dx_v}{dt} = k_t x_1 x_2 x_3 - x_v D, \tag{12}$$

$$dx_i/dt = k_{iV}(i-1)x_i x_V x_{(i-1)} - x_i D, \quad (13)$$

for $i=2,3$

where

$$D = \sum_{i=1,v} k_{iV} x_i x_V x_3 + \sum_{j=2}^3 k_{jV}(j-1)x_j x_V x_{(j-1)} + k_V x_V x_3, \quad (14)$$

denotes dilution rate. x_1 , x_V , x_2 and x_3 are the population densities of the replicase-cofactor encoding ribozyme (tR), its virus (V), the translation ribozyme (Tr) and another translation ribozyme (A), respectively. k_{iV} denotes the rate constant of replication reaction for the i -th member by both the virus-member and j -th member.

Computer simulations were performed using Mathematica ver.2.2 on Sun SPARC Station 2.

1.3 RESULTS OF COMPUTER SIMULATION

The stability and selection process of the hypercycle with virus-like member.

As is well-known, the dynamics of the elementary hypercycle model [Fig.1.1(a)] is stable in the wide range of parameters (data not shown).

Fig.1.4 shows a time-course of mole fractions in the flow reactor for the model of Fig.1.1(b). Each member coexists stably. The virus survives even if the dimensionless replication rate constant of virus $k_V \times 55.6$ is considerably smaller than the dimensionless replication rate constants of ribozymes and the translation rate constant k_t is fairly small (e.g., 1000 replications per 1 translation). Therefore, when the translated protein can bind the gene RNA (tr) and enhance its own replication reaction slightly, the bound entity (virus-like member) can coexist in the hypercycle. This simulation shows that a virus-like member could emerge as a

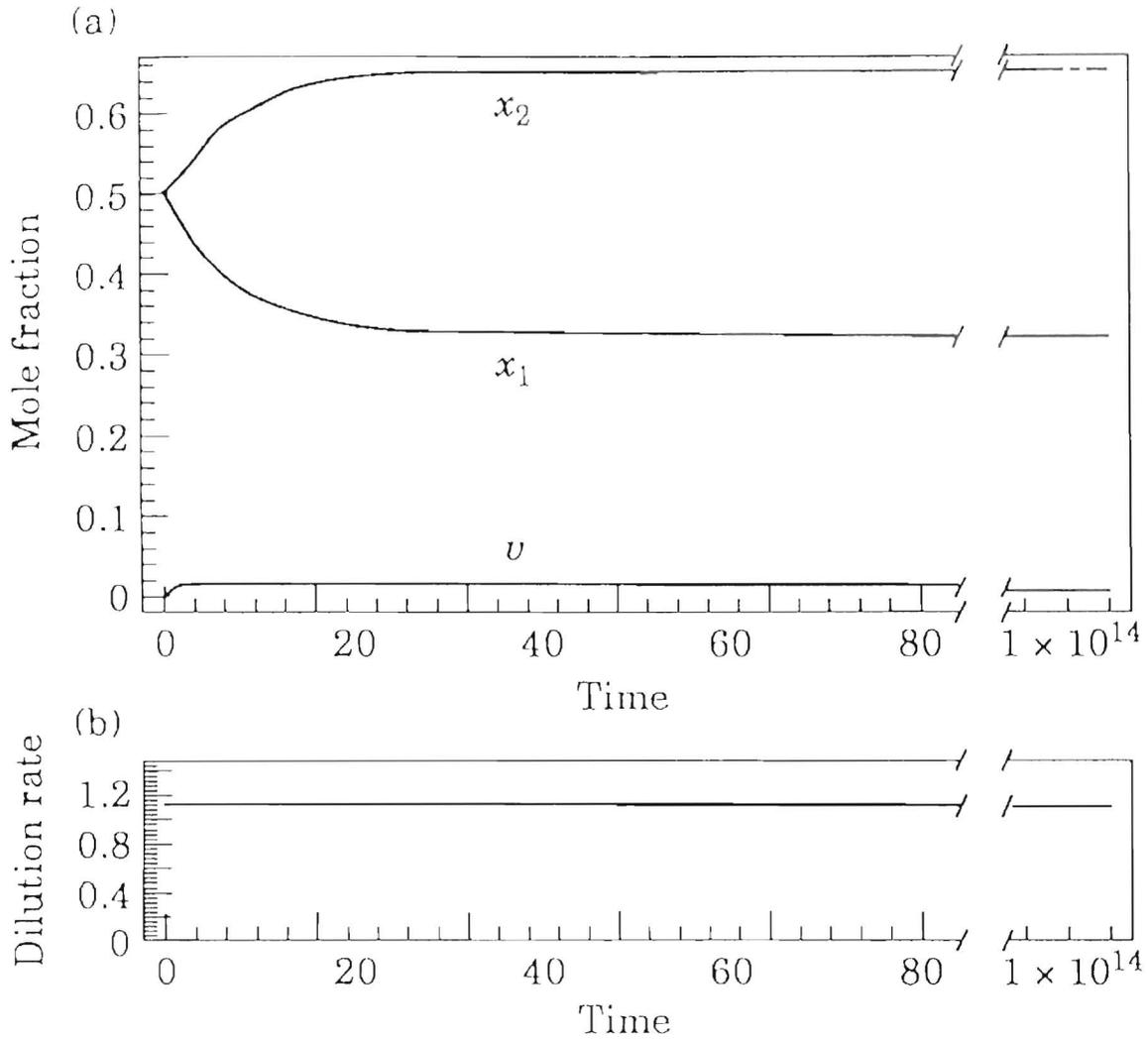


Fig.1.4

Stability of the hypercycle with a virus-like member (Fig1(b) and eqs (1)-(4)). A time course of population dynamics in a flow reactor is shown. Top: x_1 ($=x_1$), x_2 ($=x_2$), and v ($=x_v$) are mole fraction of tr, A and v, respectively. Bottom: Dilution rate D is plotted against time for monitoring the stability of total population
 Translation rate constant: $k_t=0.1$; replication rate constants: $k_{11}=k_{22}=k_{v1}=1$, $k_{21}=1.2$, $k_{12}=k_{v2}=1.4$, $k_v=k_{vv}=0.01$, $k_{1v}=0.02$, $k_{2v}=0.03$ Initial conditions: $x_1(0)=x_2(0)=0.5$, $x_v(0)=0$.

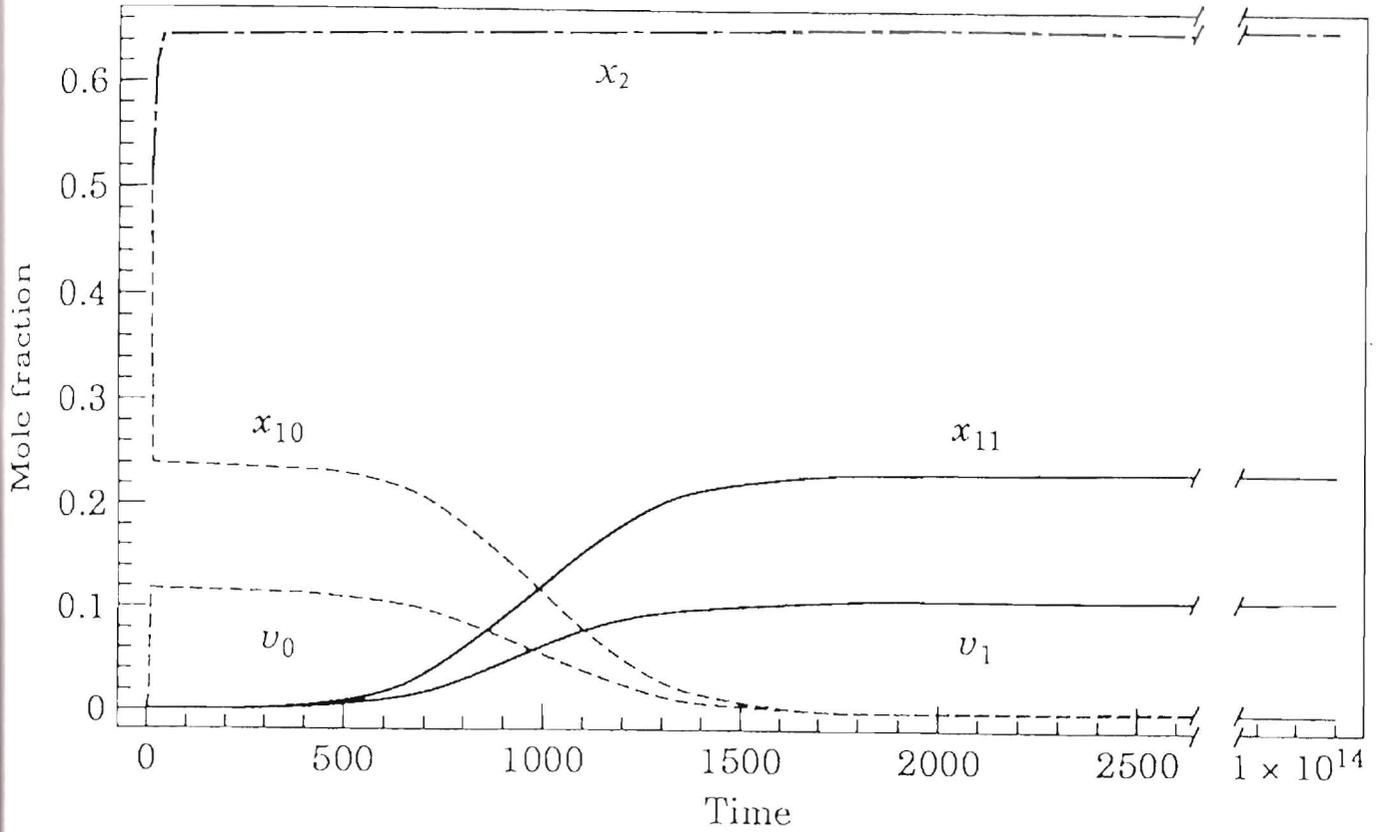


Fig.1.5

A population changeover dynamics from the wild-type to an advantageous mutant in the hypercycle (Fig.2). x_{10} ($=x_{10}$), x_{11} ($=x_{11}$), x_2 ($=x_2$), v_0 ($=x_{v0}$) and v_1 ($=x_{v1}$) denote mole fraction of tr, trm, A, v and vm, respectively. Translation rate constants: $k_t=1$; replication rate constants: $k_{1010}=k_{1111}=k_{22}=1$, $k_{v010}=k_{v111}=k_{v02}=k_{v12}=1$, $k_{210}=k_{211}=2$, $k_{v0}=0.1$, $k_{v0v0}=1$, $k_{10v0}=1$, $k_{2v0}=2$, $k_{v1}=0.12$, $k_{v1v1}=k_{11v1}=1.2$, $k_{2v1}=2.4$, $k_{1110}=k_{1011}=1$, $k_{v110}=k_{v011}=1$, $k_{11v0}=k_{v1v0}=1$, $k_{v0v1}=k_{10v1}=1.2$. .
 Initial conditions: $x_{10}(0)=0.499$, $x_{11}(0)=0.001$, $x_2(0)=0.5$, $x_{v0}(0)=x_{v1}(0)=0$

parasite to an elementary hypercycle in the RNA world.

Fig. 1.5 shows that a slightly advantageous mutant ($k_{vi}=0.12$) population took over the wildtype ($k_{vi}=0.10$) population. The virus-like member can improve its replicase activity (k_v and k_{vi}) gradually in the hypercycle. The ribozyme moiety of the virus-like member can also improve its translational activity (k_t) (data not shown).

On the other hand, the replicase protein cannot evolve in the hypercycle without adopting the virus-like strategy. Consider a model where the virus was replaced with the isolated replicase protein. The single isolated protein makes the hypercycle unstable, because it does not contribute the hypercyclic coupling. The dilution rate decreases gradually and tends to the final constant value corresponding to the growth of 'A' (x2) without the protein replicase. Replicase proteins in the original hypercycle with translation are also isolated molecules, but the hypercycle is stable because of the mutual enhancement mechanism. However they cannot improve their activity because of lack of genotype/phenotype assignment strategy.

Fig. 1.6 shows a time course of population dynamics in the flow reactor for the model in Fig. 1.3. Two additive replicase-virus members could coexist stably in the hypercycle. Fig. 1.7 shows a population changeover dynamics from the wild-types to advantageous mutants of two additive replicase-virus members. We naturally assumed that mutants are competitive with its wild-type and are cooperative with each other. Since mutants could take over the wildtypes and coexist with other translation members, each replicase-virus member in an cooperation set could evolve. The same result was obtained for the case that each advantageous mutant emerged independently.

Fig. 1.8 shows the range of parameters which make the specialist hypercycle [Fig. 1.1(c)] stable. Because several kinds of tRNA are required and several translation ribozymes are required in order to evolve to a more elaborate translation

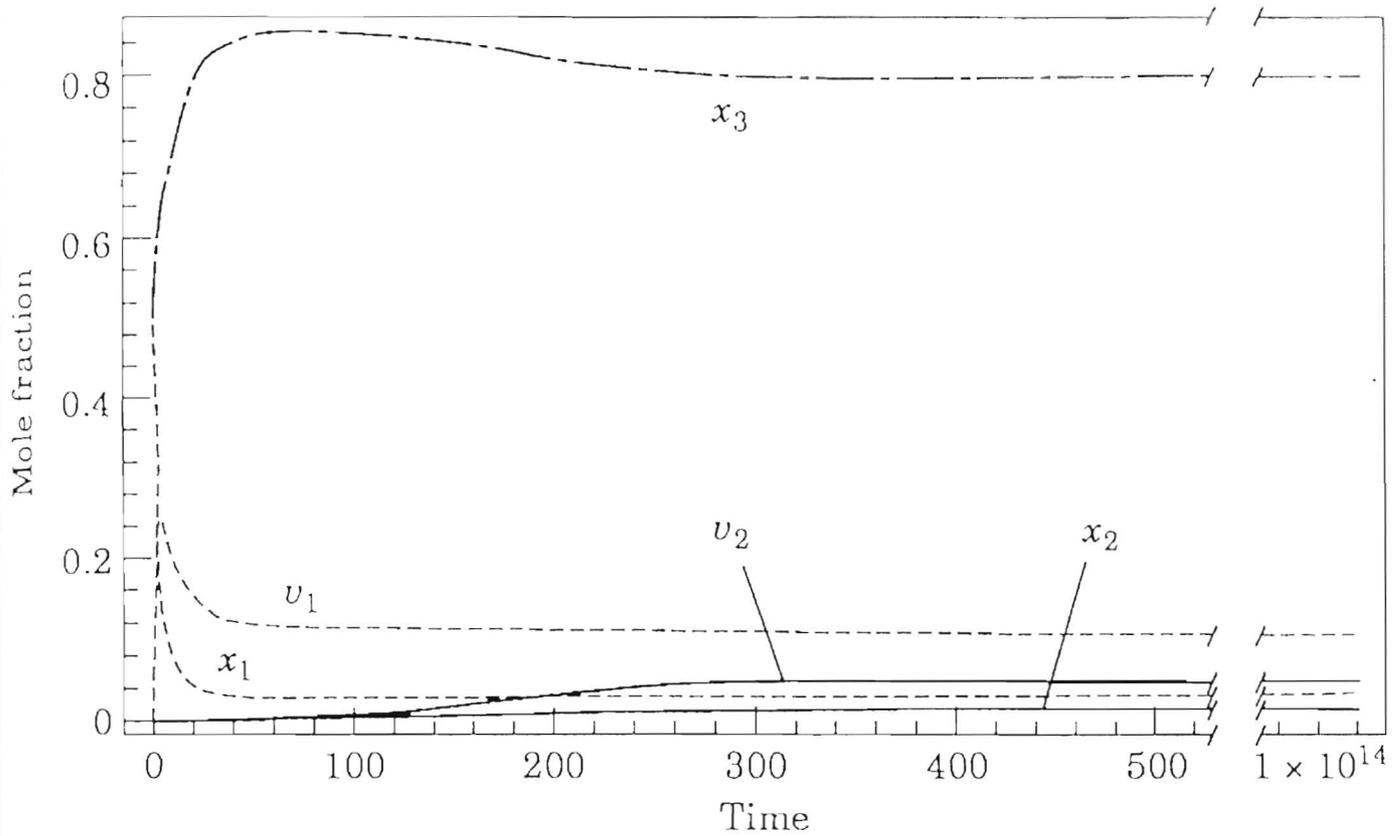


Fig.1.6

Coexistence of two kinds of replicase virus-members in the hypercycle (Fig.3). A time course of population dynamics in the flow reactor is shown. x_1 ($=x_1$), x_2 ($=x_2$), x_3 ($=x_3$), v_1 ($=x_{v1}$) and v_2 ($=x_{v2}$) denote mole fraction of tr1, tr2, A, v1 and v2, respectively. Dilution rate is also stable (not shown). Translation rate constant: $k_t=1$; replication rate constants: $k_{11}=k_{22}=k_{33}=k_{12}=k_{23}=k_{31}=k_{13}=k_{21}=k_{32}=0$, $k_{v11}=k_{v12}=k_{v21}=k_{v22}=k_{v13}=k_{v23}=0$, $k_{v1}=0.1$, $k_{v1v1}=k_{1v1}=1$, $k_{3v1}=1.7$, $k_{v2}=0.08$, $k_{v2v2}=k_{2v2}=0.8$, $k_{3v2}=1.36$, $k_{2v1}=1$, $k_{v2v1}=1.5$, $k_{1v2}=0.8$, $k_{v1v2}=1.5$. Initial conditions: $x_1(0)=0.499$, $x_2(0)=0.001$, $x_3(0)=0.5$, $x_{v1}(0)=x_{v2}(0)=0$.

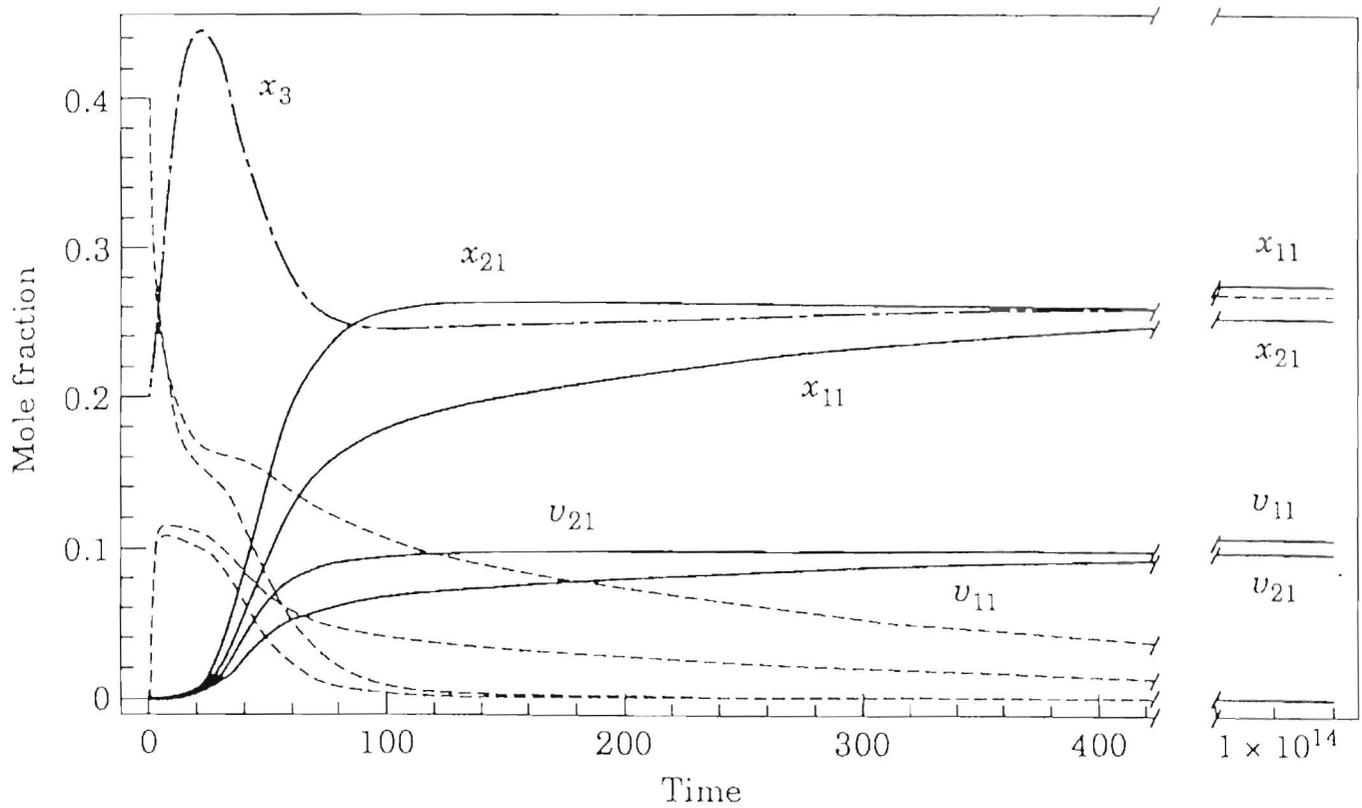


Fig.1.7

A population changeover dynamics from the wild-type (broken line) to an advantageous mutant (solid line) of two additive replicase virus-members in the hypercycle (Fig.3). x_{11} ($=x_{11}$), x_{21} ($=x_{21}$), v_{11} ($=x_{v1,1}$) and v_{21} ($=x_{v2,1}$) denote mole fraction of advantageous mutants of tr1, tr2, v1, and v2, respectively. x_3 ($=x_3$) denotes mole fraction of A. Population changeover occurs at $t_{pco}=45$ time units.

Translation rate constant; $k_t=1$, replication rate constants; $k_{10v1,0}=k_{v1,0v1,0}=k_{11v1,0}=1.2$, $k_{1,0v1,1}=k_{1,1v1,1}=k_{v1,1v1,1}=1.4$, $k_{v1,0}=0.12$, $k_{v1,1}=0.14$, $k_{20v2,0}=k_{v2,0v2,0}=k_{21v2,0}=1$, $k_{20v2,1}=k_{2,1v2,1}=k_{v2,1v2,1}=1.2$, $k_{v2,0}=0.1$, $k_{v2,1}=0.12$, $k_{20v1,0}=k_{21v1,0}=1$, $k_{20v1,1}=k_{21v1,1}=1.1$, $k_{10v2,0}=k_{11v2,0}=1$, $k_{10v2,1}=k_{11v2,1}=1.2$, $k_{3v1,0}=k_{3v1,1}=k_{3v2,0}=k_{3v2,1}=1$, $k_{v1,0v2,0}=k_{v2,0v1,0}=10$, $k_{v1,0v2,1}=k_{v2,1v1,0}=15$, $k_{v1,1v2,0}=k_{v2,0v1,1}=15$, $k_{v1,0v1,1}=k_{v1,1v1,0}=1.44$, $k_{v2,0v2,1}=k_{v2,1v2,0}=1.2$, $k_{v1,1v2,1}=k_{v2,1v1,1}=15$, $k_{3v1,0v1,0}=1.3$, $k_{3v2,0v2,0}=1.1$, $k_{3v1,0v2,0}=36$, $k_{3v1,0v1,1}=1.4$, $k_{3v1,0v2,1}=39$, $k_{3v2,0v1,1}=40$, $k_{3v2,0v2,1}=1.2$, $k_{3v1,1v2,1}=43$, $k_{3v1,1v1,1}=1.5$, $k_{3v2,1v2,1}=1.3$. Initial conditions; $x_{10}(0)=0.4$, $x_{11}(0)=0.001$, $x_{v1,0}(0)=0$, $x_{v1,1}(0)=0$, $x_{20}(0)=0.4$, $x_{21}(0)=0.001$, $x_{v2,0}(0)=0$, $x_{v2,1}(0)=0$, $x_3(0)=0.2$

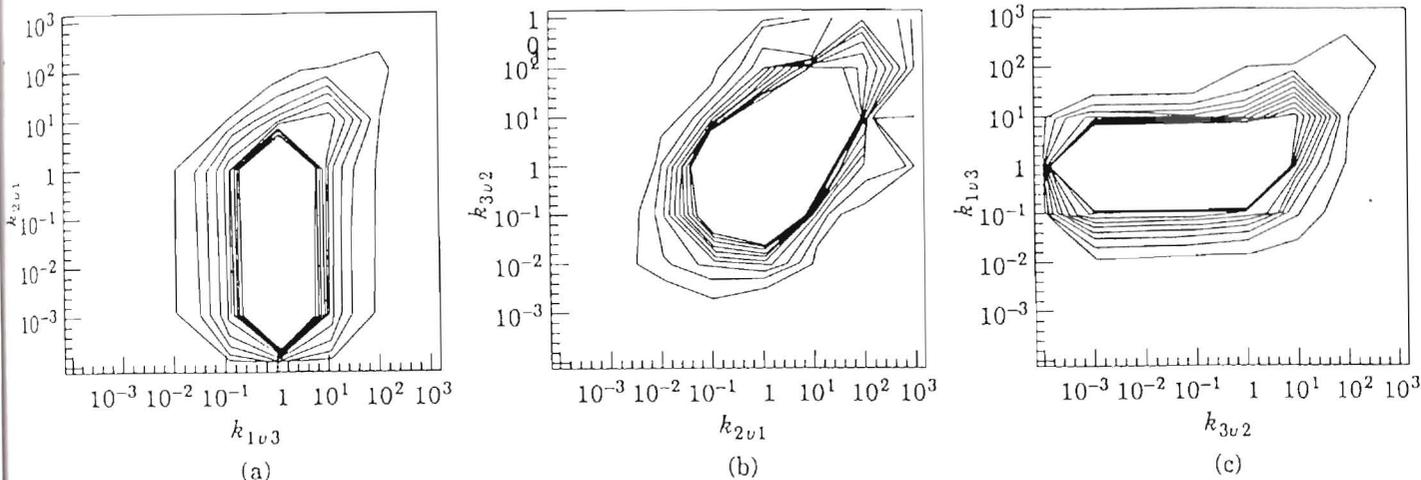


Fig.1.8

Stable range of parameters for the specialists hypercycle (Fig. 1(c)). Contour lines of the mole fraction of the member of the smallest size at the long time (10^{16} units) are drawn on the three planes where each replication rate constant of two members varies independently and all other parameters are fixed (translation rate constant; $k_t=1$, replication rate constants; $k_{VV3}=1$, $k_{V3}=0.1$) Initial conditions; $x_1(0)=0.333$, $x_2(0)=0.333$, $x_3(0)=0.333$, $v(0)=0$.) . Values of innermost contour line is 0.25 and the outermost is 0.025.

(a) the (k_{1v3}) - (k_{2v1}) plane. (b) the (k_{2v1}) - (k_{3v2}) plane (c) the (k_{3v2}) - (k_{1v3}) plane, where k_{1v3} denotes the replication rate constant of tR catalyzed by V and A, k_{2v1} denotes that of Tr by V and tR and k_{3v2} denotes that of A by V and Tr

machinery like modern ribosomal RNAs, we introduced two translation members into the hypercycle through making the doubly functioning RNA split into two specialized RNAs, a replication ribozyme (tR) and a translation ribozyme (Tr). We assumed that the replication reaction of each member was catalyzed by the replicase-virus and another ribozyme in the hypercycle. As shown in Fig.1.8, all the member can coexist stably in the wide range of parameters. Note that cyclic catalysis is not necessarily required for the stability of the hypercycle. For instance, a situation that A and Tr catalyze each other replication and A and tR catalyze each other replication is possible. Without this mutual enhancement among members, however, two translation members (A and Tr) could not coexist in the hypercycle.

1.4 DISCUSSIONS

1.4.1 Comments on assumptions of the hypercycle model

Eigen et al.(1991) demonstrated that the system composed of Q β replicase and Q β RNA can be regarded as a hypercycle in the host cell. Our model of a hypercycle with virus-like members is quite different with such a viral hypercycle.

We have assumed the existence of replication ribozymes in the RNA world. A ribozyme with RNA ligase activity has been designed by evolutionary molecular engineering (Bartel & Szostak, 1993). It is expected that A ribozyme with replicase activity will be designed also by the engineering and it will suggest the existence of an ancient replicase ribozyme and the RNA world itself. It is likely that the replication ribozymes made a hypercyclic coupling to increase their information contents.

We can expect that a ribozyme catalyzing peptidyl transferase reaction emerged in the hypercycle, because the RNA transesterase reaction and the peptidyl transferase reaction have a similar reaction mechanism. Discovery of a ribozyme which

catalyzes aminoacyl esterase reaction suggests that the first aminoacyl RNA synthetase was a ribozyme (Piccirilli et al., 1992). Recently a ribozyme of aminoacyl-RNA synthesis have been made by evolutionary molecular engineering (Illangaskare et al., 1995). A translation ribozyme that catalyzes peptidyl transferase reaction could perform the translation using these aminoacyl ribozymes as aminoacyl tRNAs.

We assumed that the first encoded protein attaches to its coding RNA (the virus-like strategy). Some molecular mechanisms of the bonding can be speculated. These mechanisms will be also useful for the evolutionary molecular engineering using the cell-free translational system. An example is a method using RNA genome (single gene) in which a suppresser tRNA is fused to 3' end of mRNA which has two tandem termination codons.

A natural counterpart of the flow reactor model might be the surrounding temperature-gradient region of an undersea volcano because of the constant flow of energy from volcano and resources from both the volcano and the surrounding "primitive soup".

1.4.2 Co-evolution of replicase protein and translation machinery

We assumed that the first encoded protein catalyzed replication reaction. If the first protein had catalyzed only the translation reaction instead, it would be impossible for the protein to evolve. The reason is that the replication rate of its encoding RNA (genotype) was not enhanced. The replication ribozyme might evolve to catalyze translation reactions (Weiner & Maizels, 1987). In fact, by evolutionary molecular engineering, a double functioning ribozyme has been made, that has optimized phosphoester transfer activity and also has amide-bond cleavage activity (Dai et al., 1995). Similarly, the first protein which catalyzed replication reaction might evolve to catalyze translation reactions also, because both reactions

require similar RNA handling techniques. Q β replicase and other RNA-dependent RNA polymerases of RNA viruses contain the ribosome-related proteins (Quadt et al., 1993). These contemporary translation proteins may be a relic of the replicase proteins of the first virus-like organism at the end of the RNA world.

We have assumed triple functions for tr RNA. It is not so difficult for the molecule with double or triple functions to improve each function. Phage ϕ x174, for example, has a genome region coding three overlapping genes using all three coding frames. Triple functions have been evolving simultaneously.

We have shown that the molecule which has both replicase activity and translational activity can optimize both functions in the hypercycle with virus-like members. However, it is difficult for an isolated protein that catalyzes the replication reaction to evolve, because the encoded protein has no assignment strategy of phenotype to genotype.

We now discuss the evolution of members other than the virus-like member is discussed. In the model in Fig.1.1(b), member A is not required to participate the translation reaction directly, although the results shown in the previous section were based on participation of A to translation. The model in which only tr (virus genome) catalyzes the translation reaction [Fig.1.1(b)] provided the same results. "A" can be regarded as a tRNA-like adapter between polynucleotide and polypeptides, which bound some ubiquitous amino acids (e.g., glycine and alanine etc.). When the replicase activity of the virus became greater than that of the replication/adaptor ribozyme, a new hypercycle modeled in Fig.1.1(c) emerged stably, as shown in our results. The replication reaction in this model is a ternary reaction in which the replicase virus and another replication/translation (or adapter) ribozyme catalyze additively the replication of an RNA. This higher order growth reaction leads to the "once-for-ever" selection.

The tr translation ribozyme could make use of other replication/adaptor ribozymes

At the same time, the replicase virus could catalyze the replication reaction of these new replication/adaptor ribozymes. This entails an increase of tRNA species in the hypercycle. The establishment of the genetic codes is explained in this context (Eigen & Schuster, 1979).

1.4.3 Darwinian evolution in the hypercycle

The virus-like member could introduce Darwinian evolution into the hypercycle with translation. Here "Darwinian" means "based on the population-independent selection rather than the once-for-ever selection". It enables the single function of the molecule to evolve gradually and rapidly in the hypercycle. Adoption of the virus-like strategy for the assignment strategy of phenotype to genotype -- that is, bonding the phenotype molecule (replicase protein) to the genotype molecule (coding RNA) -- is the key to Darwinian evolution of the replicase protein.

The same is true for the hypercycle consisting of replication ribozymes in the RNA world. We can consider this case as replacing the replicase protein in the previous case with the replication ribozyme itself. Each replication ribozyme that carries both phenotype and genotype can optimize its replicase activity independently of other members unless the extreme Darwinian growth of a member destroys the hypercyclic coupling. Thus, the "ribozyme hypercycle" is a Darwinian hypercycle in which the replicase activity of each member evolves gradually and rapidly. We can imagine the ribozyme hypercycle might gradually evolved into the hypercycle with the virus-like member at the end of the RNA world

Our results also show also another aspect of Darwinian stepwise evolution. If the replicase activity of primitive protein units (e.g., module (Go,1981)) is additive, several primitive protein units each having a different function can coexist and evolve independently in the hypercycle. This give rise to the possibility that early proteins might be an assembly of smaller units to serve as a better machinery. Such

a structure may correspond to Q β replicase or other RNA replicases that consist of several different subunits.

1.4.4 Mutation

Our present mathematical model describes only the selection process after the emergence of an appropriate mutant. The stability and the rate of evolution of our hypercycle or the proto-cell are also dependent on the mutation rate and the probability of getting which type of mutant (an advantageous or deleterious competitor or a symbiont or a parasite or a antibiont). In this comparative study we have neglected the difference between the mutation effects between on the virus-type strategy and on the cell-type strategy, although the virus-type can take advantage of the vast size of mutant pool.

For physical chemistry of the origin of life, however, the mutation effects are critical. The type of the mutant is described formally in the table of k 's (reaction rate constants). The dependence of the table of k 's on the RNA sequence determines the fitness landscape. The above-mentioned probability is dependent on the k landscape around the wildtype sequence. A study that determines the yet unknown statistical characteristics of the real biopolymers would be one of the most important works of the evolutionary molecular engineering.

1.5 CONCLUSION

The virus-early/cell-late hypothesis of the history of life cannot be discarded if the terms "virus" and "cell" are properly defined. The replication ribozymes emerged in the initial stage of the RNA world and performed Darwinian evolution. The translation ribozyme with virus-type strategy emerged at the end of the RNA world. The virus-like members in the hypercycle improved their replicase activity and translation activity gradually, in Darwinian sense while the genetic codes were being

established in the once-for-ever fashion. This "virus"-like nucleoprotein was the mother molecule of the "RNP" world. Although virus-type strategy is essential to the early stage of encoded protein synthesis and is more efficient in natural selection than the cell-type strategy, the variety of virus phenotype is limited. After the replication system and the translation system were improved to the level at which the genomic RNA could be a single long molecule and the hypercyclic coupling was not necessary, a new assignment strategy -- the cell-type strategy -- could be adopted, because both the random replication effect and the segregation effect vanished. The compartmentalization of phenotype with its genotype permitted various types of phenotype and opened the way to complex organisms.

第2章

対応付け戦略における細胞型の問題点

2.1 緒言

前章において、われわれは virus-early/cell-late モデルを提案した。しかし、これは cell-early/virus-late モデルを否定するものではない。Cell-early/virus-late モデルは、オパーリンのコアセルベート以来、もっぱら化学進化の延長上にある細胞状構造体の発見に基づいており、その代謝における意義等は実験的にも理論的にも論じられてきているが、その複製に関する議論はあまりなされていない(Oparin, 1924; Fox & Harada, 1958; Tanford, 1978, Dyson, 1985)。

この章の目的は、無批判に受け入れられている“原始細胞”の概念に対し単純な細胞型対応付けモデルを使って、その進化機構論的側面からの問題点を浮き彫りにしようとする試みである。その結果、細胞型の淘汰速度は[突然変異率が同じ場合にはダーウィン進化速度も]ウイルス型に比べ極めて遅いことが結論された。

2.2 原始的細胞型モデル

ここで考察する細胞型生命体は、RNAと、それがコードし、それを複製する機能をもつ蛋白およびRNA ワールドの翻訳系が一つの袋(細胞)に包まれたものとする。一方、比較するウイルス型生命体は、RNAと、それがコードし、それを複製する機能をもつ蛋白との結合体とする。ウイルス増殖の素材の供給と、その合成機能の不足する部分は培地のRNAワールドの機能に頼る。

原始的細胞は次のような数理モデルを仮定する。

(1) RNAゲノムが多数(L)にセグメント化され、しかも、セグメントのそれぞれが多数(n)コピーをもつとする*。

(2) RNAと生産物が2倍になったとき、物理的に分裂する。

(3) 分裂の際、2個の娘細胞にRNAと生産物が等量ずつ分配される。

◎これらの条件は細胞型のモデルに有利であるが、不利にすることはない。

(4) ウイルス型生命体、細胞型生命体とも連続培養モデルを仮定し、同数の個体群密度でフローリアクター中に存在する。

脚注(*)

原始細胞を4つのタイプに分類した(表1)。まず、この遺伝子群を一本のRNAにのせるか、いくつかの短いRNA (segments)に分けてのせるか2つに分類し、ついで、各セグメントのコピー数が1本か多数本かで分類した。

これらの細胞の示す性質を表1に示した。原始的なRNAレプリカーゼでは、複製エラー率がかかなり高いと考えられる。長いRNAはエラーカタストロフィーに陥り種が安定に存続できない(Eigen, *et al.* 1972)。また、原始細胞においては高度な分裂機構は持ち得

ここで、遷移確率行列 G_{ij} は、母細胞 C_j から娘細胞 C_i に遷移する確率をあらわす。さらに、平均化効果を考慮した細胞成長反応速度定数 κ_{ij} を次のように定義する。

$$\kappa_{ij} = \frac{jK + (n-j)k}{n} \cdot G_{ij} \dots (2)$$

ここで、 k 、 K は、それぞれ野生型と有利突然変異体の複製反応速度定数である。これらを使って n 個のゲノムをもつ細胞のフローリアクター中の淘汰方程式は次のように表現できる。

$$\frac{d C_i}{d t} = \sum_{j=0} \kappa_{ij} C_j - D C_i \dots (3)$$

$$(i = 0, 1, 2, \dots, n)$$

ここで、 C は全細胞密度であり、 D は希釈率をあらわす。

実際に、 $n=10$ の場合にシミュレーションしたものが図 2.3 である。これは1000分の1の細胞の中の1つのゲノムにたまたま有利突然変異体が生じたときに、分裂を繰り返すうちに序々に有利突然変異体のゲノムをもつ細胞が増殖し、ついに全てのゲノムが有利突然変異体になった“有利突然変異体細胞”が野生型だけのゲノムをもつ細胞と個体群置換を起す過程をあらわしている。コピー数 n と個体群置換時間の関係をあらわしたのが、図 2.4 である。

次に、分裂の際、娘細胞に1種類以上のセグメントが $n/2$ 個以下しか含まれないときに、その細胞は死滅すると仮定して、セグメント数 L と各セグメントのコピー数 n の関係を考える。この場合、セグメントが L 個ある場合の生存率は次の式で与えられる。

$$\text{segmentが } L \text{ 個ある場合の生存率} = \frac{\left(\sum_{x=n/2}^{2n} \binom{2n}{x} \right)^L}{\left(\sum_{x=1}^{2n} \binom{2n}{x} \right)^L} \dots (4)$$

この式に従い、 L が1, 10, 100, 1000の値に対し、 n を変数とした場合の生存率の変化をあらわしたのが、図 2.5 である。

ここで、適当なセグメントの数を概算する。そのためには、細胞の最小ゲノムサイズについて知らなくてはならないが、これについて現在予測することは極めて難しい。ただ、ゲノムサイズが長くなるとセグメント数が増えることになり、ランダム複製効果によって細胞に

ないので、細胞内のRNAと生成物の増加によって物理的に分裂すると考えた場合、必要なRNAをうまく振り分けられるかどうかの (segregation) の問題がある。単一コピーでは segregation しやすく、コピー数が多いれば統計的に回避できる。この問題はプラスミドの segregation や不和合性の問題と似ている。以上のことから、I、II、III型細胞モデルは極めて不利である。そこで、IV型細胞モデルを採用する。

原始的細胞の4タイプ

	ウイルス型 生命体	細胞型生命体			
		I	II	III	IV
Genome Type	Non-segmented single copy	Non-segmented single copy	Non-segmented multi copy	segmented single copy	segmented multi copy
segment数	1	1	1	極めて大	大
copy数	1	1	大	1	大
遺伝子型と表現型 の一致	○	○	△	○	△
RNAの長さ エラーカストロフィー	短 ○	長 ×	長 ×	短 ×	短 ○
segregation		する ×	しない ○	する ×	しない ○
集団サイズ比	> 10 ³	: 1			

(表. 1)

2.3 平均化効果、偏倚効果、ランダム複製効果

細胞型対応付けモデルの連続培養動力学を考察する際に、細胞外化学に加え細胞内化学を考慮しなくてはならない。細胞内化学として、①平均化効果 (averaging effect), ②偏倚効果 (segregation effect), ③ランダム複製効果 (random replication effect), と名付けた3つの効果の存在が以下に述べる考察によって明らかになった。

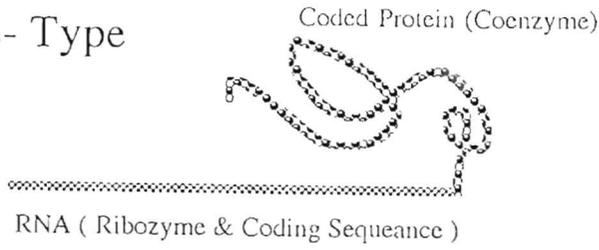
①の平均化効果は原始細胞のゲノムのコピー数が多い場合、遺伝子型と表現型の対応付けが統計的に平均化され、あいまいになるために生じる。例えば、RNAレプリカーゼの性能の上がった有利突然変異が生じたとする。ウイルス型の場合、その個体は性能向上比 ($s + 1$) に応じた淘汰係数 s で生存競争を始める。この原始細胞では、コピー数 n の中の一つにすぎないために性能向上は平均化され、淘汰係数 s/n で細胞集団内生存競争を始めることになる。そこで、コピー数 n はできるだけ小さい方が細胞型に有利であるが、②の偏倚効果があるために、セグメント数が多い場合、segregationを防ぐために n は非常に大きくなくてはならない。従って、細胞集団内生存競争におけるみかけの淘汰係数はウイルス型に比べて極めて小さいことが予想される。淘汰に要する時間は淘汰係数の逆数に比例するから、進化速度はウイルス型に比し極めて遅くなる (Husimi *et al.*, 1993)。③のランダム複製効果は、必要な情報がセグメント化されている場合に、母細胞はその娘細胞にランダムに複製しながらも全てのセグメントを受け渡さなくてはならないという要請から生じる。レプリカーゼが既に複製したセグメントにタグをつけて冗長に複製しないようにするメカニズムは高級なので、原始細胞ではレプリカーゼは特定のセグメントによらずランダムに各セグメントを複製することが要求される。このため、ゲノムRNA分子数が2倍になったときに、必要な全てのセグメントが複製される確率はセグメント数が増えるにしたがい極めて小さくなる。

2.4 淘汰過程のシミュレーション

前節のモデルに、上記の3つの効果のうち①、②を考慮し、原始細胞中のセグメントのコピー数 n は、どのくらいの数になるべきかをシミュレーションにより調べた。細胞型は図 2.1 にあるように、セグメント数 (L) とコピー数 (n) により特徴づける。まず、平均化効果と偏倚効果を調べるために $L=1$ で n 個のコピー数で特徴付けされる細胞のなかに、1 個の有利突然変異体ゲノムが生じ、複製と分裂を繰り返し n 個全てのゲノムが有利突然変異体になった“有利突然変異体細胞”が野生型の細胞と個体群置換を起す時間をシミュレーションした。そのために、 n 個のゲノムのなかに i 個の有利突然変異体ゲノムを含む細胞を C_i と表すことにする (図 2.2)。この細胞は、単純に2倍にゲノムを複製した後、分裂の際、有利突然変異体ゲノムを式 (1) の遷移確率行列に従い、娘細胞にランダムに振り分けられると考えた。

$$G_{ij} = \frac{\binom{2j}{i} \binom{2n-2j}{n-i}}{\binom{2n}{n}} \cdots (1)$$

Virus- Type



Cell- Type

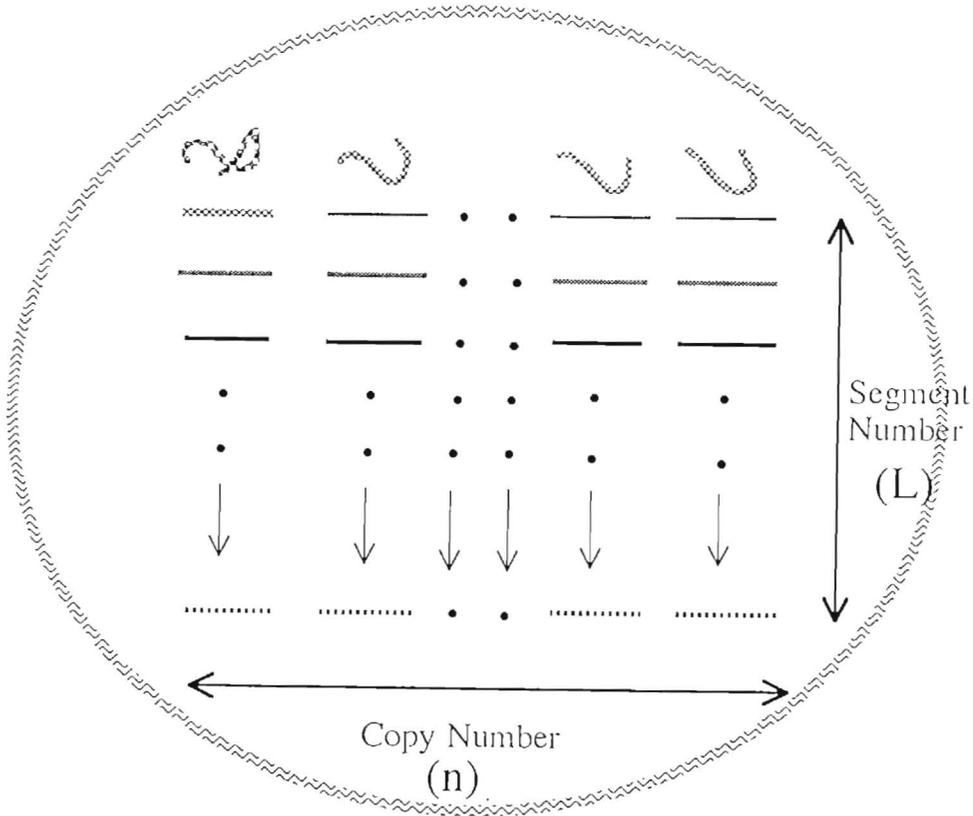
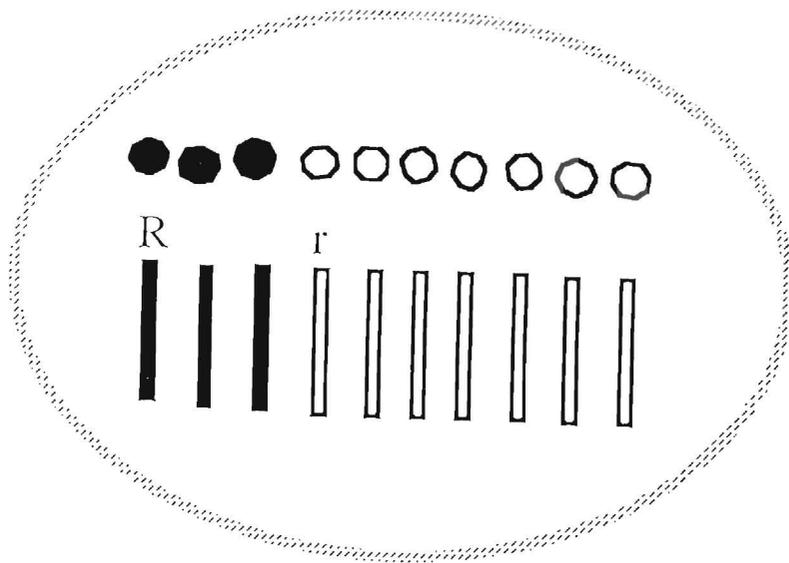


図 2. 1 原始的なウイルス型と細胞型のモデル

原始型細胞は、セグメント数(L)とコピー数(n)で特徴づけられる。



\parallel
 C_3

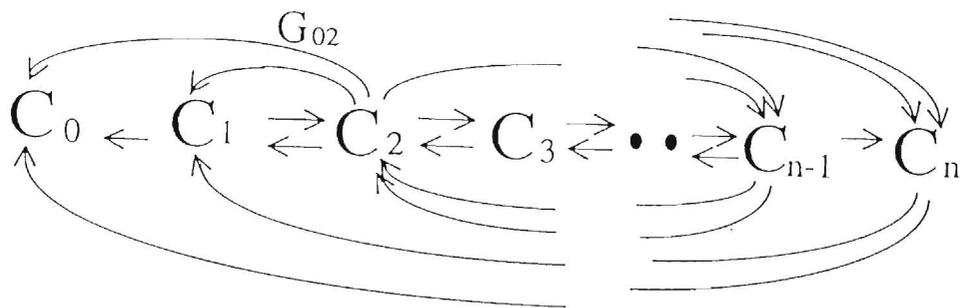


図2. 2 偏倚効果で使われる C_i の説明

Rは、有利突然変異体レプリカーゼの補酵素をコードするRNA、rは、野生型レプリカーゼの補酵素をコードするRNA。 C_i には、 i 個のRが含まれる。下の図は、細胞分裂の際に、様々なRをもった娘細胞になることを表している。

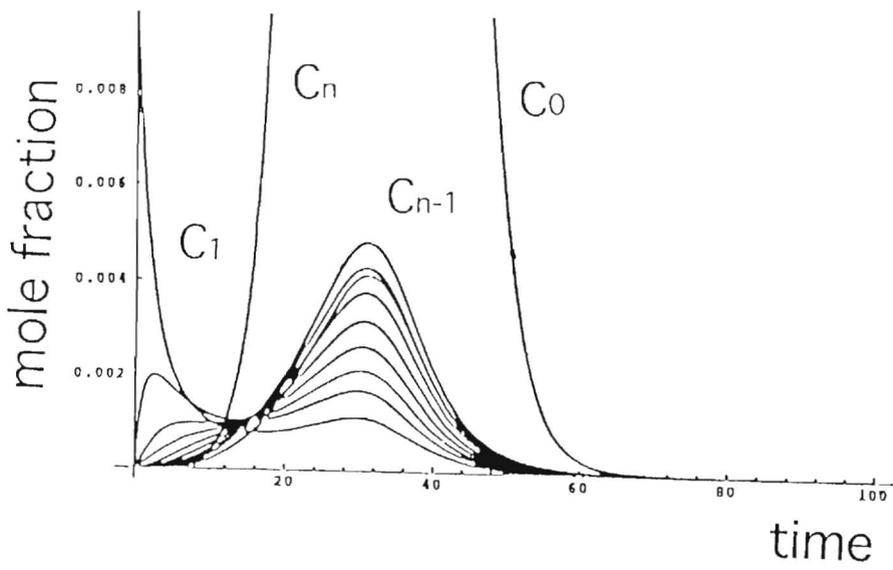
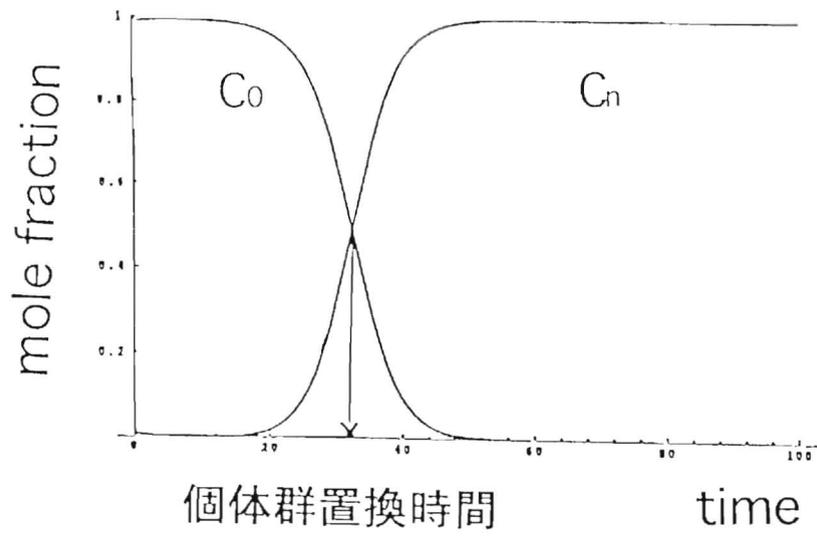


図 2. 3 野生型細胞と有利突然変異体細胞の個体群置換
 下の図は、上の図のモル分率が低い領域を拡大した。有利突然変異体をもった細胞が順番に立ち上がって来るところがわかる。

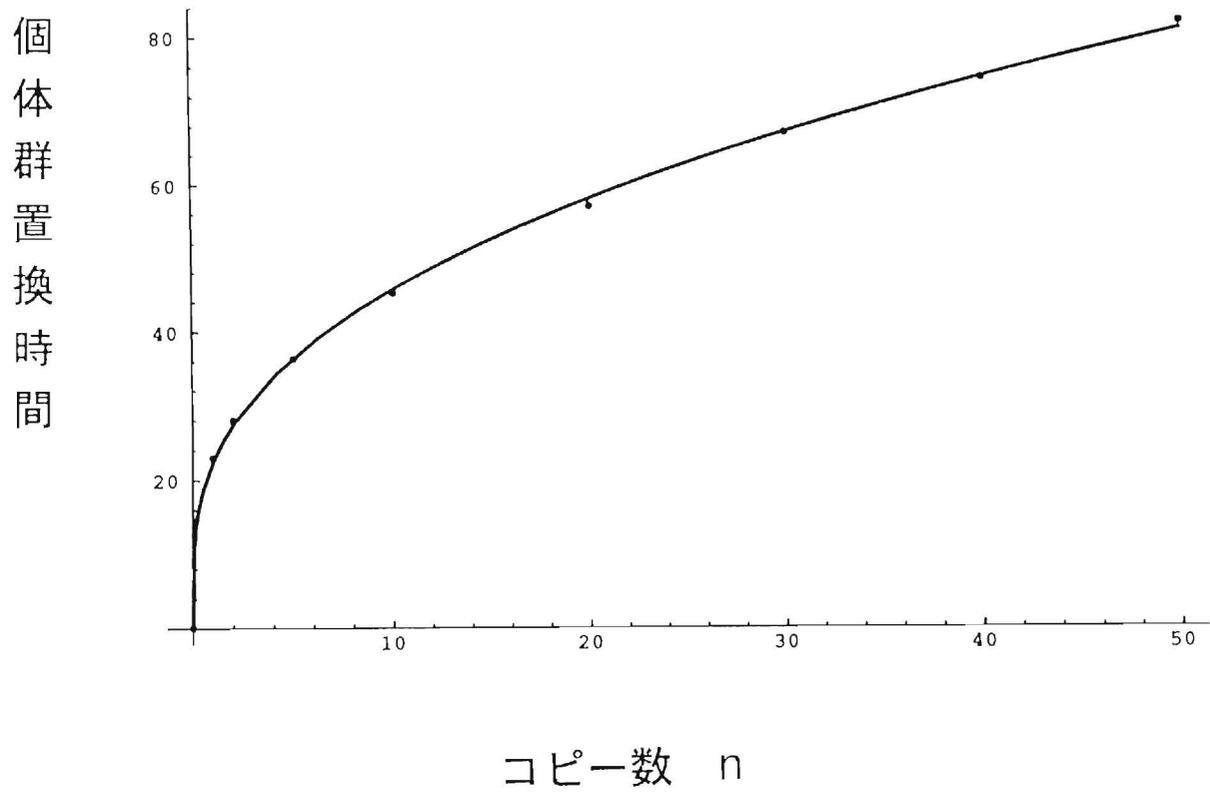


図2. 4 コピー数 n と個体群時間の関係

生存率

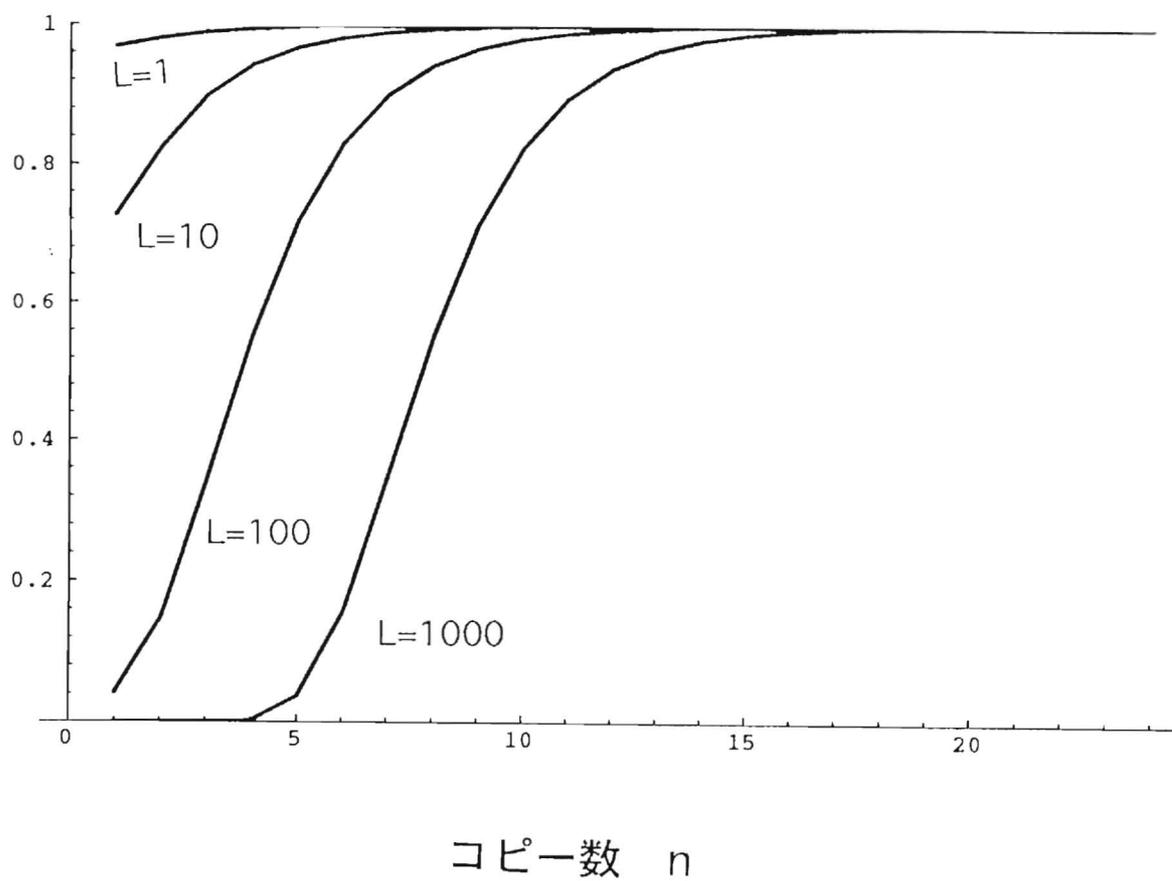


図2. 5 各セグメント数 L に対し、 n を変数とした生存率の変化

不利になる。このためゲノムサイズを短く見積もることは細胞型を不利にしない。そこで参考として、リボゾームRNAを考える。現在のリボゾームRNAは6,500塩基である。原始リボゾームはこの10分の1の長さで、600塩基ぐらいと考えた場合、原始の Zn^{2+} , Pb^{2+} などによる複製忠実度 (Orgel, cited in Schuster, 1981) から Eigen のエラーカタストロフィーの式から求めた最長RNAは、現在の tRNA ぐらいの長さであるから、セグメント数 L を10ぐらいに仮定することは可能であろう。 L がこの値を持つとき、ランダムに分裂しても生存するコピー数の数 n は、図 2.5 から $n=20$ であることがわかる。これから、図 2.4 によって個体群置換の時間を調べると、ウイルス型に比べ数倍遅れることがわかった。

2.5 考察

前節のシミュレーションでは、複製の際、細胞内のゲノムRNA分子はそれぞれがちょうど2倍になることを前提にし、さらに分裂の際、娘細胞にゲノムRNAのみならずレプリカーゼも同様に等量分配されると仮定した。このような仮定は予想以上に細胞型に有利に働くことがわかった。そのひとつの理由として、偏倚効果が挙げられる。2つの娘細胞にゲノムが分配される場合、片方の娘細胞が不利な遺伝子を受け取ると、もう一方は、必ず有利な遺伝子を受け取ることになる。したがって、細胞はある確率で自分自身の有利な遺伝子のみを多くもった優秀な子孫を残すことになる。つまり、偏倚効果は平均化効果を相殺する効果であることがわかる。今回のシミュレーションで採用した仮定は、原始的な細胞より現在の細胞に近いメカニズムを取り入れたためにむしろ、エンベロープ型ウイルスの進化メカニズムの参考になるかもしれない。実際、これらウイルスは自分自身のゲノムを特異的に複製するレプリカーゼのサブユニットをビリオンになんらかの形で取り込んでいるものがある。原始的な細胞では、レプリカーゼを分配するメカニズムはむしろ遅いので、さらに淘汰速度は遅くなると考えられる。

実際には2,3節で述べたように、ランダム複製効果が問題となる。ランダムに各セグメントが複製されると考えた場合、セグメント数 L が増加するに従い各ゲノムをちょうど2倍に複製することは極めて困難になる。例えば、 $n=1$ のときセグメント数を L とすると、この確率は、 $L! / (2L-1)!$ であり、指数的に減少する。例えば、 $L=5$ の場合には、 $1/126$ であり、 $L=10$ の場合には、 $1/92378$ の確率でしか娘細胞を生むことができないということになる。これは、細胞型にとって極めて不利な効果となる。そこで、この困難を乗り越えるにはコピー数を増やすことと、2倍になったとき分裂するのではなく数10倍になったとき分裂をするような条件を導入することになるが、これらはいずれも細胞型の進化を遅らせることになる。コピー数 $n=20$ なので、ランダム複製効果は若干弱まると考えられるが、少なくとも L の2乗以上の効果がでると考えられるので、 $L=10$ の場合、100倍以上遅くなる。平均化効果と偏倚効果を合わせると、ウイルス型に比べ少なくとも1000倍以上遅いと予想される。

Eigen は、そのハイパーサイクル理論のなかで、翻訳のあるハイパーサイクルの出現は、genotype-phenotype dichotomy を解決するために、それがコンパートメントに入る必要性を

主張している。これに対し、1章ですでに論じたように、我々はこの問題をウイルス型の対応付けで解決できることを示した。そこで、ウイルス型と細胞型との淘汰速度の比較は重要な課題となる。本来は、ハイパーサイクルを細胞の中に入れて行なうべきだが、複雑なために、単純化した。複製するRNAを複数種、細胞に取り入れても、その中で最も有利なRNAのみが最後に残る。Eigenは、情報の減少が生じないように、RNA同志にハイパーサイクル的なカップリングが不可欠であることを指摘している。本章のモデルでは、ハイパーサイクルを使わなかったが、その替わり細胞内でセグメント同志が淘汰しないということであらかじめ仮定した。

最近、自己増殖できる最小の細胞のゲノムとしてマイコプラズマの全ゲノム配列583 kbpが解読され、各遺伝子の分類がおこなわれた (Fraser, *et al.*, 1995)。それによると蛋白合成系に関わるものは全体の3割程度で、それよりやや少ないものの、細胞膜と細胞プロセスに関係する遺伝子が同程度あるということがわかってきた。このことから、現代の細胞にとって細胞であるための機構が複雑であることがわかる。本章で論じたように、この複雑なことを単純な原始の細胞が行うには無理がある。内容物を単に、複製と翻訳系の情報を載せたRNAとその翻訳産物に限っても、セグメント化された場合、「流産」する細胞が大量に発生する。この問題を回避するには、ゲノムRNAの一本化が最も有効な手段になる。そのためには、レプリカーゼの忠実度を上げなくてはならない。そこで、すでに1章で論じたような単一の機能を進化させることに都合が良いウイルス型の分子によって、複製翻訳系を十分に進化させる必要がある。ある程度、複製翻訳系を進化させた後に、より複雑な表現形を獲得できる細胞型によって、より多様な生命系が構築されたと思われる。

第3章

無細胞蛋白合成系中で合成された蛋白と

それをコードするRNAの結合法の実現に向けて

—— *in vitro* Virus へのアプローチ

3.1 緒言

第1, 2章では蛋白質の単一機能を進化させる場合、ウイルス型戦略が細胞型戦略に比べ有利であることが示された。すでにウイルス型進化分子工学として、ファージ・ディスプレイ (Scott&Smith, 1990) やセルスタット (Husimi, *et al.*, 1982) をはじめ、様々な手法が提案され開発されつつある。進化分子工学においては探査可能な配列空間の大きさが極めて重要であるにもかかわらず、現在のところウイルス型において、リボザイム型並みの配列空間のグローバルな探査法は確立していない。その理由として、ファージ・ディスプレイのように現在のウイルスを利用した場合、宿主の細胞によって合成される蛋白の多様性にバイアスがかかることが挙げられる。また、有機的合成による組み合わせ論的固相重合法の場合、現在の有機合成技術では100残基程度の蛋白は収率が悪いため合成できない。

そこで、これらの問題点を乗り越える一つの方法として無細胞翻訳系の利用が考えられる。われわれは遺伝子型 (RNA) と表現型 (タンパク) を単純に結合した分子を「ウイルス型戦略分子」と名付け、これを無細胞蛋白合成系を利用して試験管内で創製する試みを始めた。

ウイルス型戦略分子の長所を挙げてみると、①リボザイム型にせまる莫大な変異体集団を合成できる。②宿主細胞によって制限を受けないことによる蛋白の多様性の確保。③膜透過性の問題がない。④21番目のコードを利用した非天然のアミノ酸の導入 [Robertson *et al.*, 1991], 等である。短所として、Spirin の連続式無細胞翻訳系 [Spirin *et al.*, 1988] があるものの、蛋白の生産量が少ないこと、無細胞翻訳系が働く条件がかなり厳しい、などが挙げられる。そこで、図3. 1に示した“*in vitro* Virus”というプロセスを提案した。これは、リボザイムにおける *in vitro* Selection 法と同様に、選択してきた極少量の分子 (ウイルス型分子) の遺伝子部分を逆転写PCRを使って増幅し、再度、変異を入れながら、莫大な配列空間を探索しようというものである。現在、このようなウイルス型分子を作るために、図3. 1にあるように、ピオチン様ペプチドとアビジンを利用して、mRNAとそれにコードされた蛋白を結合させる試みがなされている。しかし、この場合、アビジンとピオチンの結合は有機的な結合ではないために、選択のプロセスで様々な制限を受ける。

我々は、mRNAと蛋白を直接的に結合させる方法として、図3. 2のような方式を考えた。これは、mRNAの3'末端側にサプレッサー tRNAをスペーサを介してつなげたものである。この sup tRNA様部分が蛋白を合成してきたリボゾームのAサイトに stop コドンに対応して入り、ペプチジルトランスフェラーゼ活性を受ければ、合成された蛋白と結合することになる。この3'末端の sup tRNA様構造を作成するために、tRNAのアイデンティティを利用した。Ala, His, Leu, Ser のアミノアシルシントターゼはこれらのアンチコドンを認識していない (Tamura *et al.*, 1991; Shimizu *et al.*, 1992; Himeno *et al.*, 1990; McClain, 1993)。したがってこれらのアンチコドンアンバーに変えても、これら4種類のtRNAはアミノアシル化されることになる。本実験では、Ala-amber sup tRNAをコーディング領域の3'側にスペーサを介しコードしたDNAを有機合成し、これを転写することにより sup tRNAを3'側領域にもつmRNAを作成した。通常のtRNAと異なり、RNAase Pなどによって5'側が整形されていない異常に長いtRNAでもリボゾームのAサイトに入りペプチ

in vitro Virus

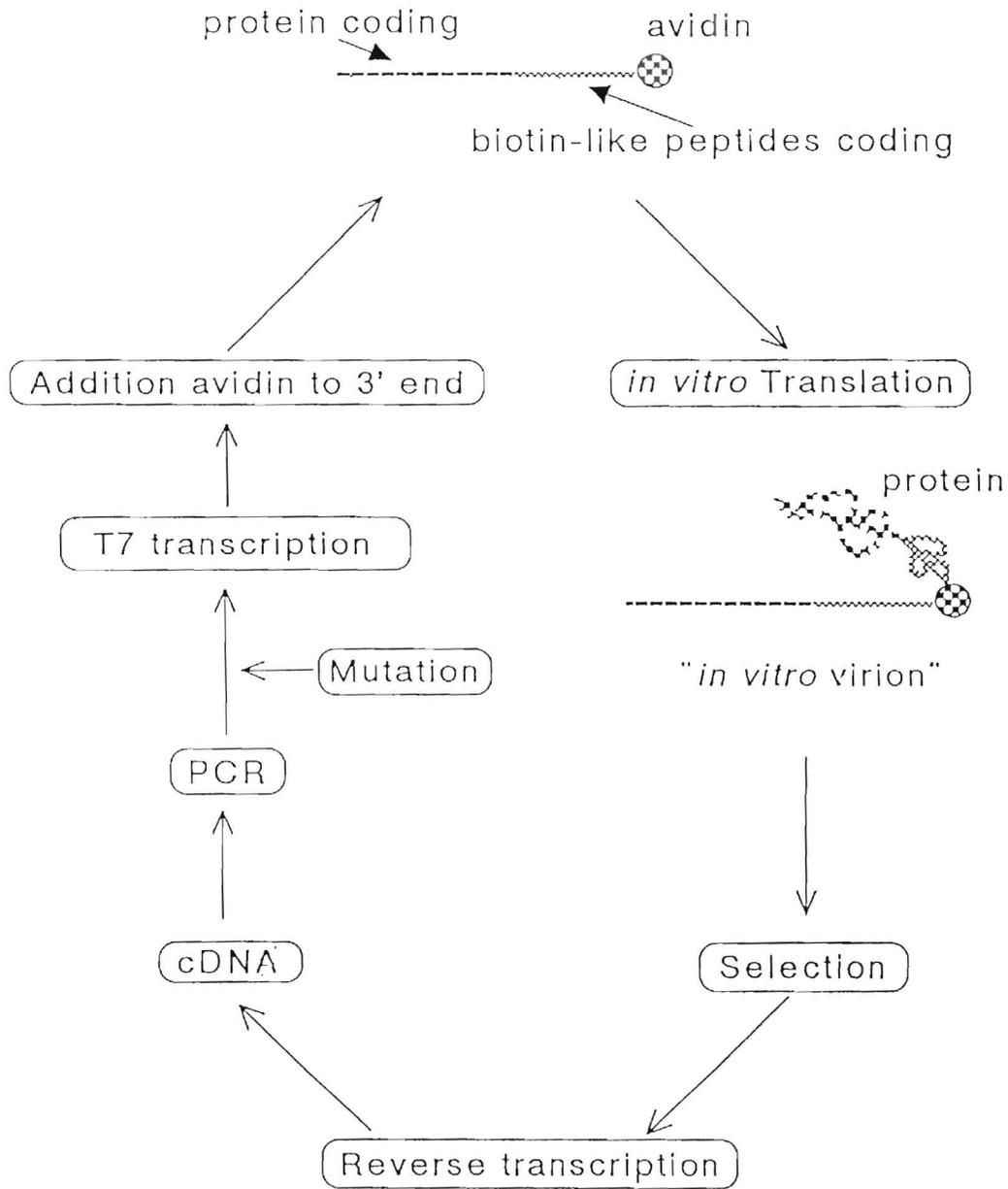


図3. 1 *in vitro* Virus の生活環

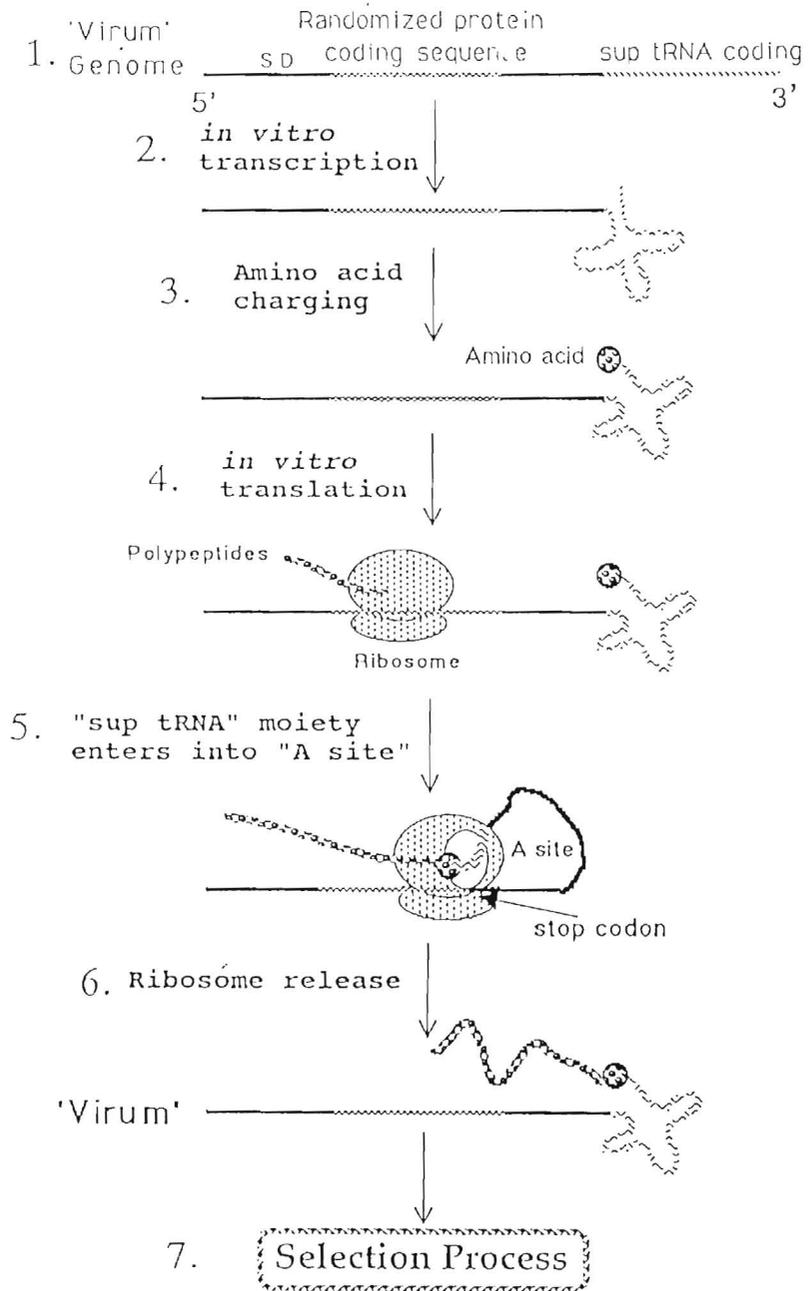


図3. 2 sup tRNA を利用した *in vitro* Virus

ジルトランスフェラーゼ活性を受けるかどうか、本実験の可否を決定する上で最も重要な課題である。

3.2 材料と方法

3.2.1 方法の概略

“*in vitro* Virus”の mRNA の 3' 末端の sup tRNA がリボゾームの A サイトに入り、ペプチジルトランスフェラーゼ活性を受けるかどうかを次のように判定する。*in vitro* Virus の mRNA のコーディング領域は Ala コドンを含まない配列にし終始コドンは Amber にする。そして、3' 末端の Amber-sup tRNA は、すでに述べたように Ala の tRNA の配列をもつ。リボゾームがこの mRNA に結合し翻訳の終わりで A サイトに Amber コドンがきたときに、この sup tRNA にチャージした Ala がペプチドの C 末端に付加されるかどうかはペプチドに¹⁴C-Ala の放射能があるかどうかで調べた。

コーディング領域は、Tau 蛋白の一部である 4 Repeat を使った。この 127 残基にわたる領域はすでに *in vivo* で翻訳されることがわかっており、しかも、Ala が含まれていない。この実験に先立ち 5' 側が伸びた異常 sup tRNA がどのくらいアミノアシル化されるかを調べた。その結果、ある程度アミノアシル化されることがわかったが、アミノアシル化によるエステル結合は弱く、無細胞翻訳系に持ち込む前の精製段階でかなり結合が離れる傾向があったので、本実験では無細胞翻訳系の中で、同時にアミノアシル化も行なう。図 3.3 に実験の概略を示す。

3.2.2 材料

E. coli S30 Extract System for Linear Templates は Promega (Madison, WI) 製、T7 RNA polymerase, T4 DNA ligase, T4 DNA Kinase, Human placenta RNase Inhibitor, EcoR I, BamH I, Deoxyribonucleotides は Takara 製、Bst N I, Bgl II は New England Biolabs (Beverly, MA) 製。[¹⁴C]alanine, [³H]- or [³⁵S]methionine は Amersham (England). Taq DNA polymerase は クラボウとグライナーのものを使用。ATP, GTP, CTP, UTP は 生化学工業、各 L-アミノ酸は 国産化学のものを使った。アミノアシルシンテターゼは、朝原治一博士 (宇宙科学研究所) より提供していただいた。また、Tau 蛋白の一部、4Repeat を組み込んだプラスミド pAR3040 は 柳川弘志博士 (三菱化学生命科学研究所) から提供していただいた。PCR 装置は、すべて PTC-100 Programable Thermal Controller (MJ Reserch. Inc.) を使用した。

3.2.3 *in vitro* Virus ゲノムの作成

in vitro Virus のゲノムとして (V1) と (V2) の 2 種類作成した。

(1) はアミノアシル化を調べるために使った (Milligan *et al.*, 1987; Boni *et al.*, 1990)。(2) は 5' 側上流部分に T7 プロモーター及び Shine-Dargano 配列をもつ Tau 蛋白の一部、4Repeat 部分をコードしたプラスミド pAR3040 を利用して、*in vitro* Virus 用のゲノムに加工したものである。

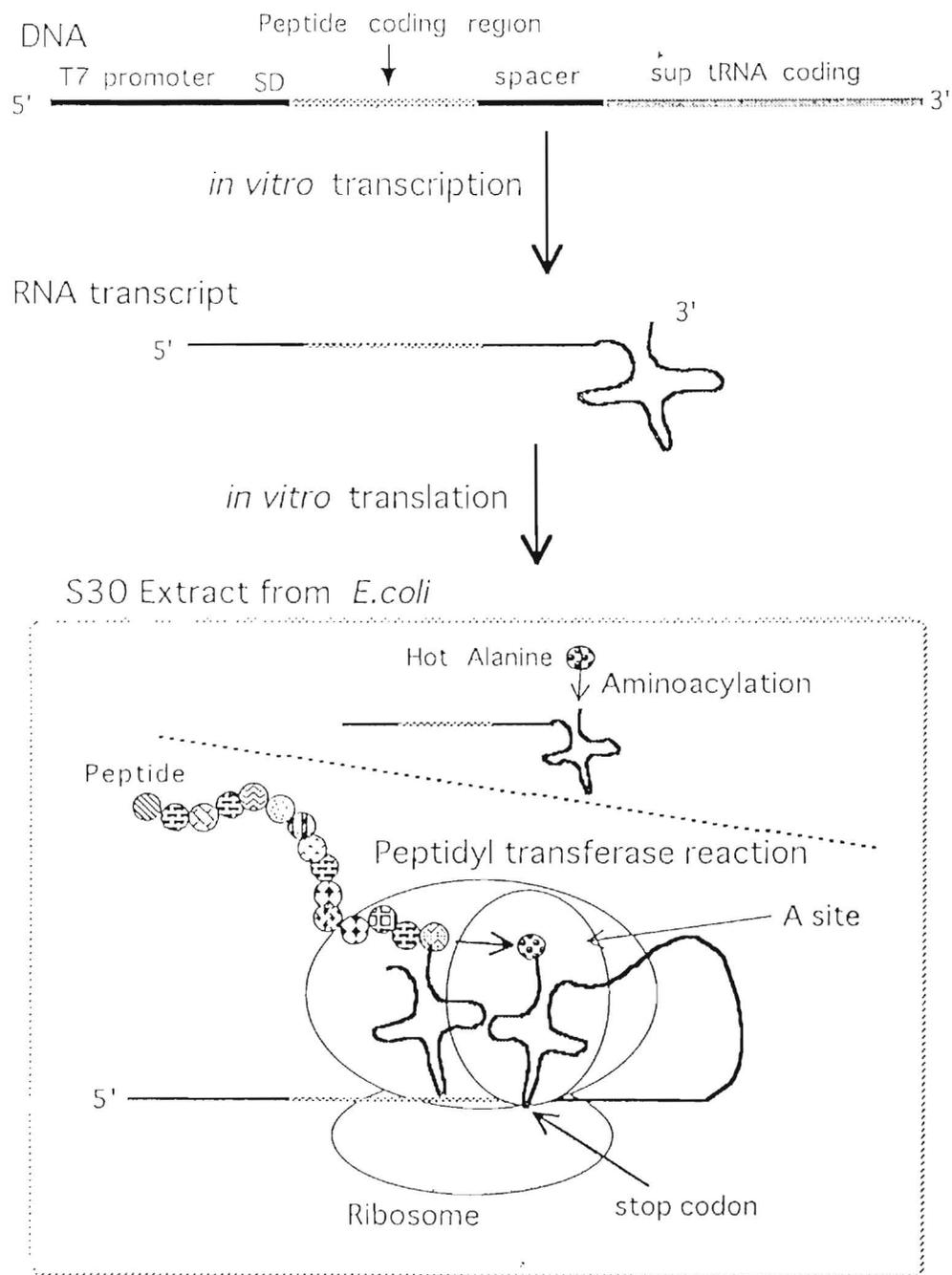


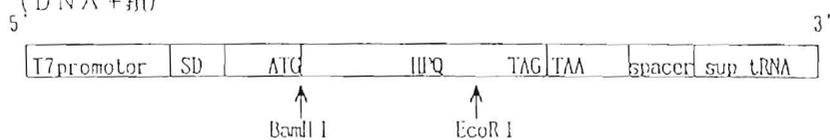
図3. 3 本実験の概念図。

sup tRNA 様 mRNA を無細胞蛋白質合成系に投入し、アミノアシル化と同時に、ペプチジルトランスフェラーゼ活性を受けるかどうか調べた

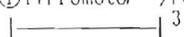
3.2.3.1 (V1)のゲノム構成と作成

(1) のゲノム構成

(DNA + 鎖)



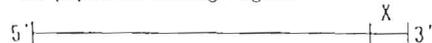
① T7 Promotor / PCR Primer (+)



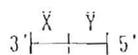
② Fish-hook · Ribosome Inhibitor / Ligation Adapter



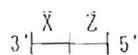
③ Biotin-linked-peptides coding region



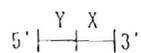
④ Trailer extender (-)



⑤ Trailer stopper / PCR Primer (-)



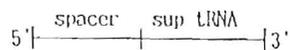
⑥ Trailer extender (+)



⑦ Spacer / PCR Primer (-)
RT Primer (-)



⑧ sup tRNA



⑨ tRNA Primer (-)



下記①から⑨までの部品を有機合成した（日本製粉）。②は、①と③をライゲーションする際に、効率を上げるためのアダプターとしての役割の他、*in vitro* Virion の分離にも用いる。この部品②の3'のBiotinは、磁性体ビーズの表面にあるアビジンと結合させることにより、部品②を磁性体ビーズの表面に固定するためである。

②を使って①と T4 DNA Kinase であらかじめリン酸化した③を T4DNA ligase を使って、50 μ l で 16 $^{\circ}$ C、2時間反応させた。その反応液から 1 μ l 採取し、①と⑤によって PCR (92 $^{\circ}$ C, 30 s: 60 $^{\circ}$ C, 30 s: 73 $^{\circ}$ C, 30 s: 30 cycle) を行なった。次に、この PCR 産物からテンプレートを精製するために、4.6% PAGE (8M Urea) の後、バンドを切り出し、1.5 ml チューブに入れて、蒸留水 1 ml を加えた後 1 時間静置することにより、ゲルに含まれる尿素等を除く。その後、蒸留水を捨てゲルをホモジナイズする。100 μ l の滅菌水を加え、1,3000 cpm で 5 min 遠心の上清を PCR 用テンプレートとする。次に、このテンプレート溶液を 1 μ l とり①のプライマーのみを使って、非対称 PCR (前回と同じ条件) を行ないフェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈殿させ、+鎖を作る。この+鎖とリン酸化した部品⑧に⑦の部品を等モル加えて、T4 DNA ligase で前回と同じ条件で ligation をおこなった。この反応液 1 μ l を採取しテンプレートとし、部品①と部品⑨により、PCR (92 $^{\circ}$ C, 30 s: 62 $^{\circ}$ C, 30 s: 73 $^{\circ}$ C, 40 s: 30 cycle) を行なった。4.6% PAGE (8M Urea) によりバンドの位置を確認した。

次に、転写用の DNA テンプレートを精製するために、プライマー①と⑨の 20 pmol を 50 μ l の PCR 反応液に加えたものを 10 本用意し、反応後、エタノール沈殿し、2 mm 厚、20 \times 20 cm のゲル板を使って、PCR 産物を 4 つのウェルに分けて泳動後、目的のバンドのゲルを切り出した。1 つのウェルから切り出したゲルは、ホモジナイズ後、200 μ l の滅菌水を加え、Spin-X (Costar社) に移して、15,000 cpm で 3 分間遠心した。Spin-X で抽出したろ液は、エタノール沈殿後、100 μ l の蒸留水で溶かした。3' 末端を tRNA 様の CCA 3' にするために、この溶液を 25 μ l とり、100 μ l の反応液中で BstN I (150 units) を使って、60 $^{\circ}$ C 5 時間反応させた。これを再度、2 mm 厚、20 \times 20 cm のゲル板を使って、CCA 3' 末端になったテンプレートを切り出し、上述のやり方で精製し、エタノール沈殿後、DEPC 水に溶解し、転写用テンプレートとする。この CCA 3' 末端を作るための BstN I 処理は、後に、CCA 3' 末端を持ったマイナスプライマー (これを新・部品⑨とする) を使ってもアミノアシル化の効率に問題がないということがわかったので、省略することができる。

各部品の配列

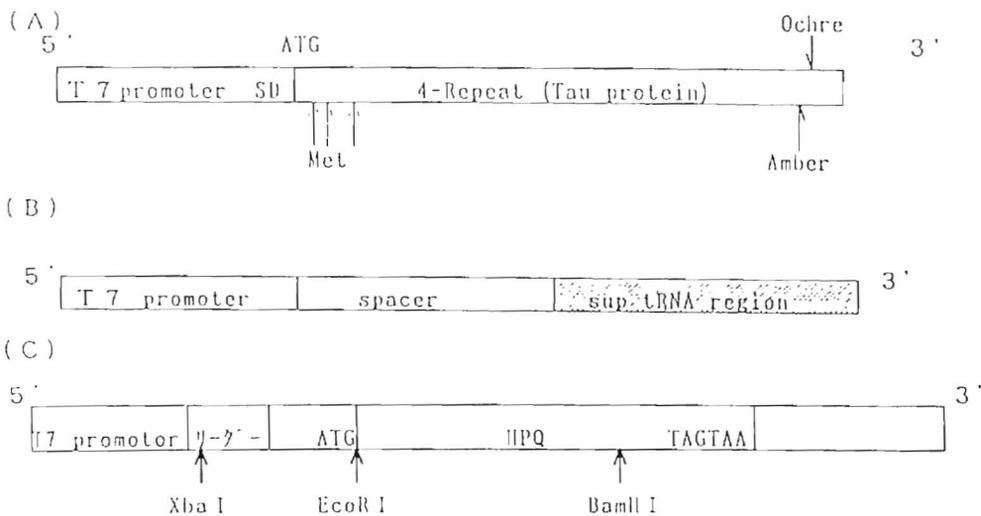
- ① 5' TAA/TAC/GAC/TCA/CTA/TAG/GGA/GAT/CT 3'
- ② 5' CTC/CTG/AAA/AAA/AGA/TCT/CCC 3'
- ③ 5' TTT/TTT/CAG/GAG/ACA/CGA/ACA/TGG/ATC/CGC/TGT/GGC/ATC/CGC
/AGT/TCA/GCT/CTG/AAT/TCT/CCA/ACT/AG 3'
- ④ 5' AAG/AAA/TTA/CTA/GTT/GGA 3'

- ⑤ 5' TGC/AGG/AGC/CTA/GTT/GGA 3'
- ⑥ 5' TAA/TTT/CTT/TCC/AAC/TAG 3'
- ⑦ 5' GGG/TAA/ACG/AAT/GAA/CAA/TGC/AGG/AGC/CTA 3'
- ⑧ 5' TTG/TTC/ATT/CGT/TTA/CCC/GGG/GCT/ATA/GCT/CAG/CTG/GGA/GAG/
CGC/CTG/CTT/CTA/ACG/CAG/GAG/GTC/TGC/GGT/TCG/ATC/CCG/CGT/
AGC/TCC/ACC/AGG/AGG/CGA/CTA/GCT 3'
- ⑨ 5' GTG/CTG/AGC/TAG/TCG/CCT 3'
- 新・⑨ 5' TGG/TGG/AGC/TAC/GCG/GGA/TC 5'

3.2.3.2 (V 2) のゲノム構成と作成

T7 プロモーター領域を含む 4 Repeat 部分は、抽出したプラスミドをリニアライズしたものをテンプレートとして PCR した。その際プライマーによる突然変異導入法を使って、4 Repeat の Met の数を増やすとともに終止コドンを Amber に加工したものが (A) である。また、Shine-Dargano 配列をもたない 5' 側が異常に伸びた sup t RNA を作るために、すでに以前、Rabbit reticulocyte の無細胞蛋白合成系用に作った (C) のゲノムを利用した。これは Mammal のリボゾーム用のため Shine-Dargano 配列を含んでいない。これとすでに (1) で作ったゲノムの両方を EcoRI で切析し、(C) の 5' 側と (1) の 3' 側をライゲーションしたものが (B) である。

(2) のゲノムの構成



(A) のゲノム構成と作成

Tau 蛋白の 4 Repeat 部分を挿入したプラスミド pAR3040 がトランスフォームされた *E. coli* BL21(OE3) 株を Ampicillin 100 μ g/ml の LB 培地 20 ml \times 4 本を一晩培養後、プラスミドを抽出、精製した。プラスミドの抽出、精製は九州大学理学部生物学研究科、谷研究室のプロトコールによった。精製したプラスミド DNA は、Bgl II によりリニア

ライズした。これをテンプレートとして、プライマー(Left+)と(Left-)により、5'側の領域をPCRで増幅し、これを「Left」とする。次に、プライマー(Right+)と(Right-)を使い3'側の領域を増幅し、「Right」とする。このときのPCR条件は、(92° C, 30s: 65° C, 30s: 73° C, 30s: 30cycle)で、プライマーは各20 pmol 使用。これらの産物を4%PAGE (8M Urea)をして、バンドから切り出し、抽出する。エタノール沈殿後、これら「Left」と「Right」を等量加え、プライマーなしで、先の条件でPCRをした。プライマー(Left-)と(Right+)は相補なので、このPCRで「Left」と「Right」は連結されたことがPAGEよりわかった。次に、そのPCR反応液から1 μ l 取りテンプレートとし、プライマーLeft+と Right-を使って、前述のPCR条件を73° C, 30 sから73° C, 40 sに変更してPCRし、目的の(A)のテンプレートができていることを4%PAGE (8M Urea)で確認した。次に、転写用のDNAテンプレートを精製するために、プライマー(Left+)と(Right-)を各20 pmol を50 μ l のPCR反応液に加えたものを4本用意し、反応後、エタノール沈殿し、2 mm厚、20×20 cmのゲル板を使って、PCR産物を2つのウェルに分けて泳動後、目的のバンドのゲルを切り出した。1つのレーンから切り出したゲルは、ホモジナイズ後、200 μ l の蒸留水を加え、Spin-Xに移して、15, 000 rpm で5分間遠心し、抽出したろ液は、エタノール沈殿後、100 μ l の滅菌水で溶かし、保存、転写用のテンプレートとする。

使用した primer の配列

① Left + primer

5' GAG/CAT/AGA/TCT/CGA/TCC/CGC/GAA/ATT/AAT/ACG 3'

② Left - primer

5' GGA/CAT/GAC/ATT/CAT/CAT/GTC/TGG/CAT/ATG/TAT 3'

③ Right + primer

5' ATA/CAT/ATG/CCA/GAC/ATG/ATG/AAT/GTC/ATG/TCC 3'

④ Right - primer

5' GCA/GCC/GGA/TCC/TTA/CTA/CTT/GTG/GGT/TTC/AAT 3'

(B) の作成

EcoR Iで切断した (C) の5'側領域と EcoR Iで切断した (1) の3'側領域をライゲートする。バンドから切り出し抽出した (1) を EcoR Iで切断し、エタノール沈殿後、2 mm厚のガラス板を使って4.6% PAGEをおこない、(1) の3'側の切断断片を含むゲル断片を切り出す。切り出したゲルは、ホモジナイズ後、200 μ lの蒸留水を加え、Spinner-Xに移して、15,000 rpmで5分間遠心後、抽出したろ液は、エタノール沈殿させ40 μ lの蒸留水で溶かした。次にこの溶液5 μ lと (C) を EcoR Iで切断し、エタノール沈殿したものをT4 DNA Ligaseを使って、50 μ l、16 $^{\circ}$ C、2時間反応させた。そして、その反応溶液からテンプレートとして1 μ lとり、プライマーとして、(1) の①と⑨を使い、(61.5 $^{\circ}$ C, 30 s: 73 $^{\circ}$ C, 40 s:, 92 $^{\circ}$ C, 30 s: 30 cycle) でPCRをおこなった。このPCR反応溶液を4.6% PAGEすると、目的のメインバンド以外にいくつかのバンドが確認されるが、これは、このPCRでは常に発生するバンドである。そこで、このPCRをある程度大量に行なった後、前述の方法でPAGEから目的のバンドをゲルから切り出し、精製し転写用のテンプレートとした。

3.2.4 転写

V1, V2 DNAテンプレート(1 nmol/ml)に対して、最適なNTP濃度とT7ポリメラーゼ濃度は以下のものであった。(50 μ l反応溶液)

1 $^{\circ}$ 10 \times T7polymerase Buffer (pH 8.1)	5 μ l
2 $^{\circ}$ 50 mM DTT	5 μ l
3 $^{\circ}$ RNase Inhibitor (50units/ μ l)	0.5 μ l
4 $^{\circ}$ 20 mM 各NTP (pH 7.5以上)	4 μ l
5 $^{\circ}$ DNA template	1 μ l
6 $^{\circ}$ T7 polymerase (40units/ μ l)	4 μ l
7 $^{\circ}$ 滅菌水	30.5 μ l

反応後、フェノール/クロロホルム抽出を1回、クロロホルムで2回抽出した後、反応液の0.1倍容の3M酢酸ナトリウム(pH 5.0)と2.5倍容のエタノールを加えて-20 $^{\circ}$ Cで一晩放置する。15000 rpmで15分間遠心し、沈殿を-20 $^{\circ}$ Cの70%エタノールでリンスして脱塩後、真空乾燥し、20 μ lないし40 μ lの滅菌水に溶かした。

3.2.5 アミノアシル化の活性検定

sup tRNA様 mRNAのアミノアシル化活性の測定は以下のようにおこなう。反応溶液は全量40 μ lで組成は、60 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM 塩化マグネシウム, 30 mM 塩化カリウム, 50 mM DTT, 2.5 mM ATP, 25 μ M [14 C]Alanine(5.5 GBq/mmol)で、基質の転写産物とアミノアシルシンテターゼの濃度をいろいろ変え、37 $^{\circ}$ Cで反応させた。アミノアシル-tRNA合成酵素を加えて反応を開始する。5分、20分、40分、60分ごとに、各9 μ l採

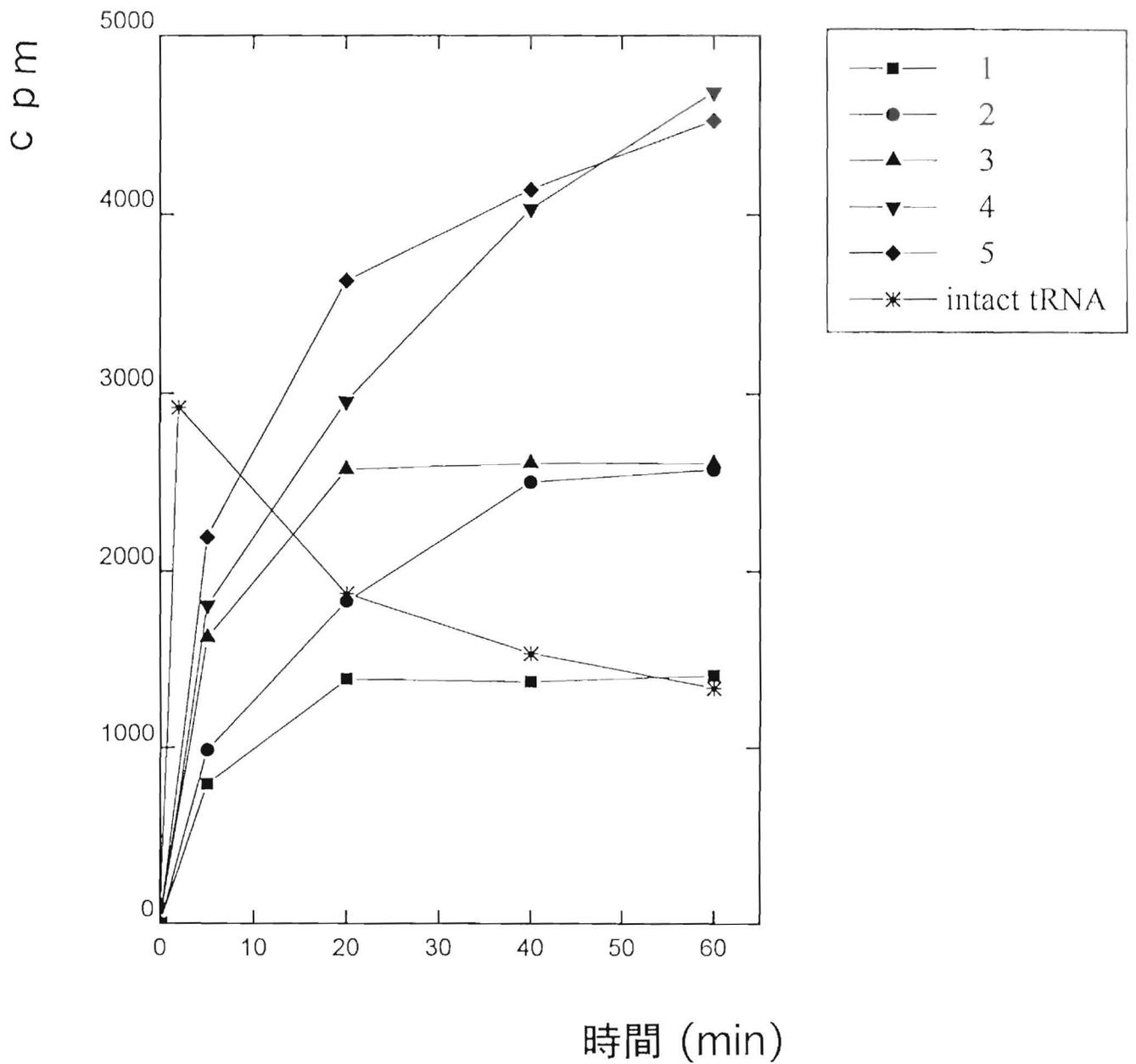


図3. 4 sup tRNA 様 mRNA のアミノアシル化の時間依存性。

各 Mg^{2+} と基質濃度は、次の通りである。① $6 \mu M$, $1.0 mM$ ② $1.5 \mu M$, $1.0 mM$ ③ $1.5 \mu M$, $1.5 mM$ ④ $3.0 \mu M$, $1.0 mM$ ⑤ $3.0 \mu M$, $1.5 mM$ 。
 反応の条件は、本文の「材料と方法」を参照。

取し、1/4に切ったワットマン3MM円形濾紙に垂らし、5%トリクロロ酢酸に浸す。濾紙はあらかじめ5%トリクロロ酢酸を一滴垂らして乾かしておく。反応液を垂らした濾紙は5%トリクロロ酢酸で10分間ずつ3回洗う。次に、50%エタノール+50%ジエチルエーテルで10分間、ジエチルエーテルで5分間洗って脱水する。白熱電球で濾紙を乾燥し、1.1当りDPOを4g、POPOPを0.1g溶かしたトルエンが入ったバイアル瓶に入れ、液体シンチレーションカウンターで、アラニンがアミノアシル化したtRNA様 mRNAの量を測定する。

3.2.6 無細胞蛋白合成及び5'側が異常に伸びたAla-sup tRNA部分の抑制効率

50 μ lの無細胞蛋白合成反応液中、20 μ lはすでに調製済みのPremixであり、15 μ lのS30 extract,すでに転写した(2)の(A)のmRNA(2.6 μ g/ μ l)1 μ lをRNAテンプレートとして使った。Ala, Trpなしの18種のアミノ酸混合液(2.5mM)とさらにMetなしの17種類のアミノ酸混合液(2.5mM)は調製後、40分オートクレーブし、さらに、0.2 μ mのメンブレン・フィルターで濾過したものを2 μ l加えた。[14C]Alaまたは、[35S]Metを加えた上で、sup tRNA様 mRNAと酢酸マグネシウムをいろいろ変えて、37°Cで、3時間反応させた。反応は、氷上で止めた。反応物へのMet或いは、合成されたペプチドへのAlaの付加は、15%PAGE(SDS 0.1%)で1時間、20mV定電圧、100Vで泳動後、ゲルをラップで包み、イメージアナライザーBAS2000(富士フィルム)で読み取った。

3.3 結果と考察

3.3.1 ゲノムの作成

3.2.3.1の(1)のように、ゲノム全体を有機的にDNA合成した部品をライゲーションとPCRを使うことにより、効率良く作成できることがわかった。ただし、作成したプライマー等の問題により、各PCR段階で主なバンド以外のバンドが立ち上がることが多い。これらのバンドは、後の制限酵素処理やライゲーション反応及びPCRの各ステップを経た場合、目的の生産物と見分けがつかなくなり、コンタミネーションの原因となることが多いため、PCR後は、PAGEの移動度から、目的のバンドを切り出し、後の反応に利用した。

3.3.2 転写

3.2.1で作成したDNAテンプレートは、約数百倍から一千倍ぐらいの転写効率を得ることができた。前述の方法でDNAテンプレートを精製するたびに、最適なNTP濃度とT7ポリメラーゼ濃度を調べた。

3.3.3 アミノアシル化

提供を受けたアミノアシルシンターゼは、活性が落ちているため、正確な比活性を知ることはできなかった。IntactなアラニンtRNAのアミノアシル化をコントロールとして実験を行なった。基質は、(V1)を転写したRNAテンプレートである。IntactなtRNA

の濃度は、 $2.5 \mu\text{M}$ で、塩化マグネシウムは加えていない。基質と加えた塩化マグネシウムの量によって、次の5通りの反応を行なった。

	基質濃度	塩化マグネシウム濃度
①	$6 \mu\text{M}$	1.0mM
②	$1.5 \mu\text{M}$	1.0mM
③	$1.5 \mu\text{M}$	1.5mM
④	$3.0 \mu\text{M}$	1.0mM
⑤	$3.0 \mu\text{M}$	1.5mM

結果は、図3. 5のようになった。

このことから、まず、intactなtRNAは、数分のうちにほとんどのアミノアシル化されるが、その後、エステル結合は分解される方向にすすむ、一方、sup tRNA様mRNAは、時間と共に序々にアミノアシル化されることがわかった。アミノアシル化される速度は、マグネシウム濃度に依存し、濃いほど速いことがわかる。しかし、最終的に基質がアミノアシル化される割合は変わらないようである。また、基質濃度に比例して、アミノアシル化される程度も増えていることから、基質に対し、酵素量は十分であると考えられるので、各基質はこの値以上アミノアシル化されることはないと考えられる。以上のことから、sup tRNA様mRNAのアミノアシル化の効率は、intactなtRNAの約25%である。尚、このアミノアシル化の効率は、アミノアシルシンターゼのロットによって、かなり値が異なった。

3.3.4 無細胞蛋白合成及び5'側が異常に伸びたAla-sup tRNA部分の抑制効率

(V1)のDNAテンプレートを転写したRNAテンプレートを基質として、S30 Extractで反応させた場合、反応温度、マグネシウム濃度、pH、基質であるRNAの量、等、考えられる条件をできる限り検討してみたが翻訳産物の確認ができず、従って、アラニン付加の確認もできなかつた。S30 Extract自体が活性を失っていることも考えられたので、ルシフェラーゼ・アッセイによって活性のあるルシフェラーゼが発現するかどうかを調べたところ、ルミノメーターにより発光を確認できた。また、 ^{35}S Metを使ってラベルしたところ、ルシフェラーゼの分子量である6万ぐらいのところにバンドが確認できたため、S30 Extractには問題がないことがわかった。そこで、基質としてのRNAテンプレートに問題があると考えられた。このテンプレートは、15残基のペプチドしかコードしていない。翻訳できない理由として、翻訳産物が短いためなのか、開始コドンより上流のSD配列を含めた部分が問題なのかを同定することはできなかつた。このShine-Darganoを含むその上流の配列に関しては、Boni, *et al.*らの文献を参考にして作成したものである。(V1)テンプレートのようにmRNAとsup tRNAの両方の役割を同時に果たす場合、大量に無細胞蛋白合成系に投入したことにより、蛋白合成を阻害する可能性も考えられる。

*E. coli*の無細胞翻訳系を使う長所は、大腸菌のゲノムにすでに、T7ポリメラーゼを組み込み、IPTGによって誘導できるBL21(DE3)株などがあり、T7プロモーターをもつ

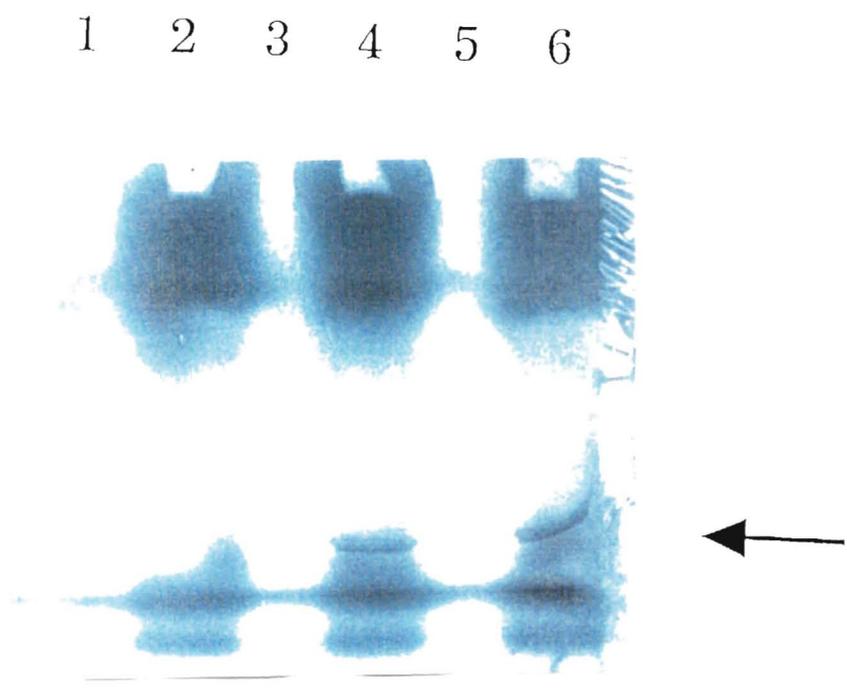


図3. 5 合成された蛋白へのアラニンの付加を調べるゲル電気泳動結果
 mRNAとして (V 2) の (A) の転写産物は、すべて 20pmol/50 μ l。
 sup tRNA 様 RNA として (V 2) の (B) の転写産物は、2nmol/50 μ l。Mg²⁺濃度は、
 lane 1, 2 は 40mM, lane 3, 4 は 20mM, lane 5, 6 は 10mM である。また、lane 1, 3, 5 は ¹⁴C-
 Ala (1 μ Ci) でラベルし、lane 2, 4, 6 は ³⁵S-Met (1 μ Ci) でラベルした。矢印が産物である 4
 Repeat のバンドである。

ラスミドを使って、ペプチドなり蛋白の発現を *in vivo* で確認できることである。(V 2) のゲノムは、このゲノム構造を作成する前に予備実験で、すでに *in vivo* で発現することがわかっている 4Repeat のプラスミドを抽出、精製し、Bgl II でリニアライズしたものを、T 7 ポリメラーゼとともに無細胞翻訳系に投入して、4 Repeat が翻訳されることが確認できた。そこで、(V 1) の T 7 プロモーターや Shine-Dargano 配列を使わずに、このプラスミドの T 7 プロモータ配列と Shine-Dargano 配列をそのまま使用することを考え、PCR を利用して作成した。大腸菌の無細胞系で人工的にデザインした蛋白を発現しようとする場合、このような方法であらかじめ *in vivo* で確認することは、大変有効であることがわかった。

(V 2) の (A) のような DNA 構成をもつテンプレートを PCR を使って、すでに述べたような方法で作成し、PCR によって得られた DNA テンプレートを T 7 ポリメラーゼと S 3 0 E x t r a c t に入れて翻訳させたところ産物のバンドが得られた。また、その DNA テンプレートを T 7 ポリメラーゼを使って転写し、RNA テンプレートにした後に S 3 0 E x t r a c t で翻訳させたところ、DNA テンプレートのときより、大量の産物が翻訳されていた。これは、DNA テンプレートより、RNA テンプレートの方がモル数にして 1 0 0 倍ほど多いことが反映したと思われる。以上の実験結果を踏まえて、A l a 付加の実験には、mRNA として (V 2) の (A) を転写した RNA テンプレートを使い、また、sup tRNA 様 RNA として (V 2) の (B) を使った。未修飾の tRNA のリボゾームによる翻訳効率は、 Mg^{2+} の濃度に強く依存するという Ma らの報告がある (Ma *et al.*, 1993)。sup tRNA 様 RNA のモル数と Mg^{2+} 濃度をいくつか変えて、合成されたペプチドへの Ala の付加実験を行なった結果が図 3. 6 である。Met でラベルしたペプチドの位置にラベルした Ala が付加したペプチドのバンドが確認できないため、この実験では、5' 側が伸びた sup tRNA 部分の A サイトへの結合は確認できなかった。理由として、① 5' 側が伸びた sup tRNA 部分のアミノアシル化の効率の悪さ。② 大量の sup tRNA 構造をもった RNA の投入による翻訳系因子 (EF-Tu など) への影響。③ Ala-sup tRNA と mRNA は分子間反応であるために Release Factor との競合に勝てない。などが考えられる。さらに、合成される 4 Repeat は Met が 4 ケあるのに対し、A l a は 1 ケであるためバンドが検出しにくいと考えられる。

3.4 展望

今回の実験に関する従来の状況的知見には次のようなものがある。Brome Mosaic Virus (BMV) や Turnip Yellow Mosaic Virus (TYMV) は、その 3' 末端が tRNA 様構造をしていて、アミノアシルシンターゼの基質として認識され、チロシンなどがアミノアシル化される。すでに発見された当時から、これらのウイルスの RNA ゲノムが mRNA として以外に、tRNA として使われているのかが問題にされていた。Chen & Hall らは、1972 年に初めてアミノアシル化された BMV の RNA が無細胞翻訳系で tRNA として使われるかどうかを調べた。その結果、約 1% ほどしかアミノアシル化した BMV の RNA ゲノムのアミノ酸は取り込まれないということがわかった。従って、彼らは tRNA として翻訳には使われていないと結論した。その後、様々な RNA ウイルスに tRNA 様構造が発見され

精力的に研究されているが、これがどのような役割をしているのかは今までのところわかっていない。BMVの3'末端のtRNAの2次構造も2, 3提案されているが(Ahquist *et al.*, 1981; Perret *et al.*, 1989; Rietveld *et al.*, 1983; Mans *et al.*, 1991)、それらは、通常のtRNAの2次構造とはかなり異なっている。また、アンチコドンを持っていない。このことを考慮すると、Chenらの実験で、BMVのRNAがリボゾームに1%でも入るならば、3'末端に intact な tRNA をもった RNA ならば、もう少し効率良く入る可能性が示唆される。

そこで、すでに考察で述べたような問題点を次のような方法で克服することが考えられる。sup tRNA の3'末端のアデニル酸の2'か3'にアミノ酸を何らかの方法でより強固に結合させると同時に、sup tRNA と mRNA の間のスペーサの長さ及び配列を最適化する。mRNA と sup tRNA 様部分は分子間ではなく分子内で反応することにより、仮に、intact な tRNA の1/10以下の効率でAサイトに入る場合にも、sup tRNA 部分は濃度効果で十分に Release Factor との競争に勝って、Aサイトに入る可能性があると思われる。

総括

進化分子工学の進展は遺伝子型と表現型の対応付け戦略の重要性、並びに、リボザイム型、ウイルス型、細胞型の3つの戦略の位置づけを明確にした。われわれはこの知見から得られた新たなウイルスと細胞の定義に基づき、virus-early/cell-lateモデルを提案した。

第1章では、「ウイルス型戦略分子」という概念をEigenのハイパーサイクル理論に導入し、次のような結果を得た。

- ①発生したウイルス型分子が、ハイパーサイクルの中心概念である自分自身より他のメンバーをより多く複製するという性質を持つならば、レプリカーゼ・リボザイムの複製効率の $1/10^3$ 以下でも、安定に存在し続ける。
- ②ウイルス型分子はハイパーサイクル内で漸進的に、その複製機能や翻訳機能を共進化させる。
- ③ウイルス型分子がハイパーサイクルに複数存在する場合、同一の機能に対し加算的に働くかどうかで、共存するか、競争的排除が起るかが決定される。
- ④ウイルス型分子が漸進的に進化した後、複製系と翻訳系が機能分化するモデルが可能である。

以上のことから、Eigenのハイパーサイクル理論において不可能だった複製・翻訳系のダーウィン進化が、ウイルス型戦略分子によって自然な形で導入できることがわかった。

第2章では、原始的な細胞型生命体とウイルス型生命体との淘汰速度を数理モデルを使って比較した。その結果、ウイルス型は細胞型より 10^3 倍以上速く有利突然変異体が淘汰された。細胞型の問題点として、①平均化効果、②偏倚効果、③ランダム複製効果、が考えられる。特に、「ランダム複製効果」は細胞型にとって致命的であることがわかった。この効果は、セグメント化された必須遺伝子がランダムに複製されるために、細胞分裂前に必須遺伝子全てを複製することが極めて困難なことによる。このことは、仮に有利突然変異があるセグメント（必須遺伝子）に生じても、それが複製されて娘細胞に伝わる確率は極めて小さいことを意味する。このため、巧妙な分裂機構を持たない原始細胞は、レプリカーゼの複製忠実度を向上させゲノムを一本化する必要がある。しかし、このレプリカーゼの進化では、すでに第1章で明らかにしたウイルス型戦略分子が最も重要な役割を果たすと考えられる。

したがって、翻訳のある初期分子進化のダーウィンの過程について、次のようなシナリオが描くことができる。RNAワールドにおける自己複製するリボザイムが漸進的にその能力を高めることにより、わずかながらペプチド結合を触媒する機能を獲得した。その結果、RNAワールド末期に単一機能を進化させることに有利なウイルス型戦略分子が出現し、さらに複製・翻訳系を漸進的に共進化させた。その後、細胞型生命体は複製忠実度を向上させたレプリカーゼと翻訳系を使い、様々な機能(表現型)

を獲得した。

われわれは、第1章で、最初のタンパクは翻訳-複製リボザイムの補酵素であると仮定した。つまり、現在の翻訳系の蛋白の一部は、その当初から複製系の蛋白としても働いていたと考えた。これは、現在のQ β などのRNAウイルスのレプリカーゼが、翻訳系の蛋白質をそのサブユニットにもつことの進化的根拠を与えられる。

最後に、われわれはウイルス型戦略分子を試験管内で実現すべく、“*in vitro* Virus”と称する無細胞蛋白合成系を利用した進化分子工学の方法を提案した。遺伝子型と表現型を結合する方法としては、mRNAと伸長中のペプチドを直接、リボゾーム上で結合させる。これは、終止コドンに対応したsup tRNAをスペーサ部分を介しmRNAの3'末端に接続しておき、このsup tRNA部分が合成を終えたペプチドのC末端とリボゾーム上で共有結合させようというものである。このプロセスで最も重要な5'側が伸びた異常なsup tRNAがリボゾームのAサイトにはいり、Pサイトにある伸長中のペプチドを受け取ることができるかどうかを検討した。その結果、5'側が伸びたsup tRNAはアミノアシル・シンターゼによって、intactなtRNAと比べ最高20%程度アミノアシル化されることがわかった。5'側が伸びた異常なsup tRNAをそのまま無細胞翻訳系に投入し、アミノアシル化されてAサイトへの取り込まれる割合を調べたところ、イメージアナライザの測定限界以下であった。理由として、①5'側が伸びたsup tRNA部分のアミノアシル化の効率の悪さ。②大量のsup tRNA構造をもったRNAの投入による翻訳系因子(EF-Tuなど)への影響。③Ala-sup tRNAとmRNAは分子間反応であるためにRelease Factorとの競合できない。などが考えられる。さらに、合成される4 RepeatはMetが4ヶあるのに対し、Alaは1ヶであるためバンドが検出しにくいと考えられる。そこで、解決策として、①sup tRNAの3'末端のアデニル酸の2'か3'にアミノ酸を何らかの方法でより強固に結合させる。②sup tRNAとmRNAの間のスペーサの長さ及び配列を最適化する、等が考えられる。これらにより、sup tRNA構造とリボゾームのAサイトの反応を分子内反応にすることで、濃度効果により上記の問題が解消できると思われる。

要旨

進化分子工学が明らかにした進化する高分子系の条件は、①開放系、②自己増殖、③突然変異、④適切な生体高分子の適応度の地形、⑤遺伝子型と表現型の対応付け戦略の存在、である。本研究は、この⑤に注目し、生命の進化史を捉え直すとともに、この工学を発展させる試みをした。進化分子工学における対応付け戦略は、遺伝子型と表現型が同一分子上に存在するリボザイム型から、単純に結合したウイルス型を経て、一つの袋に入った細胞型へと、単純なものから順に成功をおさめている。これを既存の生命の起源論と比較した場合、リボザイム型に対応したRNAワールド仮説は提案されているが、ウイルス型の対応付け戦略をとるウイルス型生命体という概念は存在せず、いわゆる原始細胞という細胞型戦略をとる生命体のみが論じられている。これは、ウイルスは細胞に寄生する病原体であるという概念が支配的であったためと思われる。そこでウイルス型生命体を上記のように進化的側面から定義した場合の初期コード化分子進化において果たす役割を理論的に考察した。また、淘汰速度の比較から細胞型の問題点を理論的に検討した。最後に、これらの研究から明らかにされたウイルス型戦略分子の有用性を、*in vitro* Virus と称する無細胞蛋白質合成系を使った実験系で実現すべく、合成された蛋白とそれをコードするRNAの結合法の検討を行なった。

1. 翻訳のある分子進化の初期段階におけるウイルス型戦略

進化分子工学によって、RNAのライゲーション反応を含む様々な機能が明らかにされ、また、リボゾームの機能もRNAが担っていることが示唆されたことから、RNAワールド仮説はより強固になった。しかし、RNAワールドから翻訳系の成立に関しては未だ解決には至っていない。この中で、ハイパーサイクル理論は、限られた複製忠実度のもとでの情報蓄積や遺伝コードの普遍性に関し合理的に説明したが、複製系や翻訳系自体の漸進的進化に困難があった。Eigenは、このハイパーサイクルが遺伝子型と表現型の対応付けのために細胞様の袋に入ると考えた。われわれは、これに対しウイルス型の戦略をとると仮定し、最初のコード化されたタンパクは、レプリカーゼ・リボザイムの補因子として出現するとした。ハイパーサイクルの式に、新たに「ウイルス項」を導入し、シミュレーションをおこなった結果、次のような知見を得た。①発生したウイルス型分子が、ハイパーサイクルの中心概念である自分自身より他のメンバーをより多く複製するという性質を持つならば、レプリカーゼ・リボザイムの複製効率の $1/10^3$ 以下でも、安定に存在し続ける。②ウイルス型分子はハイパーサイクル内で漸進的に、その複製機能や翻訳機能を進化させると同時に、それらの共進化を可能にする。③ウイルス型分子がハイパーサイクルに複数存在する場合、同一の機能に対し加算的に働くかどうかで、共存するか、競争的排除が起るかが決定される。④ウイルス型分子が漸進的に進化し、複製系と翻訳系が機能分化するモデルが可能である。本モデルにおける前提「RNAワールド末期におけるウイルス型分子の発生」に都合のよいデータが、進化分子工学の最近の成果から得られた。RNAワ

ールド末期にウイルス型分子が複製・翻訳系を十分に進化させた後、細胞が可能となり多様な表現型を獲得した可能性がある。すなわち、virus-early/cell-late モデルが提案できた。

II. 対応付け戦略における細胞型の問題点

前章の結果は、cell-early/virus-late モデルを否定するものではない。そこで、ウイルス型と細胞型が同時に存在した場合に、その機能を最適化する速度を比較してみた。極めて単純なモデルとして、複製・翻訳機能をもつタンパクとRNAからなる、ウイルス型生命体、細胞型生命体を考え、それらが同数存在する2つのフローリアクターを考える。それぞれに有利突然変異体が生じた場合、それが野生型と個体群置換を起す時間を比較した。原始細胞のモデルは、ゲノムの数が元の2倍になったとき物理的に分裂すると仮定し、このような細胞の細胞内化学と細胞外化学の考察から、遺伝子型と表現型の対応付けに関する細胞型戦略の問題点として、(1)平均化効果(2)偏倚効果、(3)ランダム複製効果、の3つがあることがわかった。特に、(3)の効果はゲノムのセグメント化でセグメント数の2乗で不利に作用し、重大であった。この困難を乗り越えるためには、複製忠実度をあげ、ゲノムの1本化が必要である。そのためには、ウイルス型分子が原始細胞より先に生じ、複製忠実度を進化させることが最も有効な手段となる。つまり、細胞型よりウイルス型が先に生じる理論的根拠が示された。

III. 無細胞蛋白合成系中で合成された蛋白とそれをコードするRNAの結合法の実現に向けて ——— *in vitro* Virus へのアプローチ

前章でウイルス型戦略の有利性が示され、また、ファージ・ディスプレイ法のようにすでに成功している進化分子工学の例がある。しかし、現在のウイルスを利用した対応付け戦略は、宿主細胞によって発現される蛋白の量や種類が制限される。探査できる配列空間の大きさが重要な意味をもつ進化分子工学において、この問題は乗り越えなくてはならない。そこで無細胞蛋白合成系を利用し、"*in vitro* Virus"と称する試験管内でウイルス型分子を発生する方法を提案した。すでに、ビオチン様ペプチドとアビジンを利用して結合する方法などが検討されているが、共有結合ではないために選択の段階で制限を受ける。そこで、mRNAと伸長中のペプチドを直接、リボゾーム上で結合する方法を提案した。これは、終止コドンに対応したsup tRNAをmRNAの3'末端に接続しておき、このsup tRNA部分が合成を終えたペプチドのC末端と共有結合しウイルス型分子となる。このプロセスで最も重要な5'側が伸びたsup tRNAがリボゾームのAサイトにはいり、Pサイトにある伸長中のペプチドを受け取るかどうかを検討した。まず、5'側が伸びたsup tRNAはアミノアシル・シンターゼによって、intactなものの20%程度アミノアシル化されることがわかった。このsup tRNAをそのまま、無細胞翻訳系に投入し、Aサイトへの取り込みを調べたところ、イメージアナライザの測定限界以下であった。これは、sup tRNA部分がアミノアシル化の際にはintactなtRNAと競合し、Aサイトへの取り込みの際には、Release factorとの競合があるためと思われる。

参考文献

- Ahlquist, P., Dasgupta, R. & Kacsberg, P. (1981). *Cell* **23**, 183-189.
- Bartel, D. P. & Szostak, J. W. (1993). Isolation of New Ribozymes from a large Pool of Random Sequences. *Science* **261**, 1411-1418.
- Beijerinck, M. N. cited in Waterson, A. P. & Wilkinson, L. (1978) *An introduction to the history of virology*. Cambridge Univ. Press.
- Boni, I. V., Isaeva, D. M., Musychenko, M. L. & Tzareva, N. V. (1990). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucl. Acids Res.*, **19**, 155-154.
- Brenner, S. & Lerner, R. A. (1992). Encoded combinatorial chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **89**, 5381-5383
- Buchholtz, F & Schneider, F. W. (1985). A Hypercycle in a Bioreactor and in a Compartment: A Self-Maintaining System. *Phys. Chem.* **89**, 685-691.
- Chen, J. M. & Hall, T. C. (1973). Comparison of Tyrocy Transfer Ribonucleic Acid Acid as Amino Acid Doners in Protein Synthesis. *Biochemistry*, **12** (23), 4570-4574.
- Dai, X., Mesmaeker, A. D. & Joyce, G. F. (1995). Cleavage of an amide bond by a ribozyme. *Science* **267**, 237- 240
- Eigen, M. (1971). Selforganization of Matter and the Evolution of Biological Macromolecules. *Naturwissenschaften*. **58**, 465-523.
- Eigen, M. & Schuster, P. (1979). *The Hypercycle*. Springer-Verlag.
- Eigen, M. & Gardiner, W. C. (1984) Evolutionary molecular engineering based on RNA replication. *Pure & Appl. Chem.* **56**, 967-978.
- Eigen, M., McCaskill, J. & Schuster, P. (1988) Molecular quasispecies. *J. Physical Chemistry* **92**, 6881-6891.
- Eigen, M., Biebricher, C. K., Gebinoga, M. & Gardiner, W. C. (1991). The Hypercycle. Coupling of RNA and Protein Biosynthesis in the Infection Cycle of an RNA Bacteriophage. *Biochemistry* **30**, 46, 11005-11018.
- Eigen, M. (1992). *Steps towards Life*. Oxford Univ. Press
- Fleischmann, R. D. et al. (1995). Whole-Genome Random Sequencing and Assembly of Haemophilus influenzae Rd. *Science* **269**, 496-512.
- Fox, S. W. & Harada, K. (1958). Thermal Copolymerization of Amino Acids to a Product Resembling Protein. *Science* **128**, 1214.
- Fraser, C. M. et al. (1995) The Minimal Gene Complement of Mycoplasma genitalium. *Science* **270**, 397-403
- Gilbert, W. (1986). The RNA world. *Nature* **319**, 618.
- Go, M. (1981). Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in hemoglobin. *Nature* **291**, 90-92.
- Green, R. & Szostak, J. W. (1992). Selection of a Ribozyme That Function as a Superior Template in a Self-Copying reaction. *Science* **258**, 1910-1915.
- Haldane, J.B.S. (1929). The Origin of Life ; in Deamer, D.W., Fleischaker, G.R eds. (1994) *Origins of Life*:

- the central concepts* Jones and Bartlett Publishers,
- Hershey, A. D. (1969). Idiosyncrasies of DNA structure. In: *Nobel Lectures in Physiology or Medicine 1963-1970*, 417-424 Amsterdam, N.Y. and London. Elsevier
- Hirao, I and Ellington, A. D. (1995) Re-creating the RNA world. *Current Biology* 5, No.9, 1017-1022.
- Husimi, Y., Nishigaki, K., Kinoshita, Y. and Tanaka, T. (1982) Cellstat: a continuous culture system of a bacteriophage for the study of the mutation rate and the selection process at the DNA level. *Rev. Sci. Instrum.* 53, 517-522.
- Husimi, Y. (1989). Selection and Evolution of Bacteriophages in Cellstat. *Adv. Biophys* 25, 1-43.
- Husimi, Y., Mori, T., Ushijima, S. & Aita, T. (1993). Modes of Population Changeovers in Continuous Culture of Bacterial and Viral Mutants Spectrum. *J. theoret. Biol.*, 165, 577-591.
- Illangaskare, M., Sanchez, G., Nickles, T. & Yarus, M. (1995) Aminoacyl-RNA synthesis catalyzed by an RNA. *Science* 267, 643-647.
- Ma, C., Kudlicki, W., Odom, O. W., Kramer, G. & Hardesty, B. (1993). *In Vitro* Protein Engineering Using Synthetic tRNA^{Ala} with Different Anticodons. *Biochemistry* 32, 7939-7945.
- Maizels, N. & Weiner, A. M. (1993). The Genomic Tag Hypothesis: Modern Viruses as Molecular Fossils of Ancient Strategies for Genomic Replication. In: *The RNA World* (Gesteland, R. F. & Atkins, J. F., ed.) pp. 577-602. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mans, R. M. W. Pleij, C. W. A. & Bosch, L. (1991). tRNA-like structures. *Eur. J. Biochem.* 201, 303-324.
- Margulis, L. (1970). *Origin of Eukaryotic Cells*. New Heaven. Yale Univ Press.
- McClain, W. H. (1993) Rules that Govern tRNA Identity in Protein Synthesis. *J. Mol. Biol* 234, 257-280.
- Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W. & Uhlenbeck, O. C. (1987). Oligoribonucleotides synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA template. *Nucl. Acids Res* 15 (21), 8783-8798.
- Mills, D. R., Peterson, R. L. & Spiegelman, S., (1967). An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 58, 217
- Noller, H. F., Hoffarth, V. & Zimniak, L. (1992). Unusual Resistance of Peptidyl Transferase to Protein Extraction Procedures. *Science* 256, 1416-1419.
- Oparin, A. I. (1924) The origin of Life.; In Bernal, J. D. (1967). *Origin of Life*. 199-234. London: Weidenfeld & Nicolson
- Perret, V., Florentz, C., Dreher, T. & Giege, R. (1989). *Eur. J. Biochem.* 185, 331-339.
- Piccirilli, J. A., McConnell, T. S., Zang, A. J., Noller, Harry F. & Cech, T. R. (1992). Aminoacyl Esterase Activity of the Tetrahymena Ribozyme. *Science* 256, 1420-1424
- Prigogine, I. & Stengers, I (1984) *Order out of Chaos* Bantam Books, New York.
- Quadt, R. K., Cheng, C., Browning, K. S., Hershberger, R. P. & Ahlquist, P. (1993). Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1498-1502.
- Rietveld, K., Pleij, C. W. A. & Bosch, L. (1983). *EMBO J.* 2, 1079-1085
- Schrödinger, E. (1944) *What is Life?* Cambridge Univ. Press.
- Schuster, P. (1981). cited in Prebiotic evolution In: Gutfreund, H ed "Biochemical Evolution" Cambridge

- Univ. Press.
- Scott, J. K. & Smith, G. P. (1990). Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science* **249**, 386-390.
- Shimizu, M. (1982). Molecular Basis for the Genetic Code. *J Mol Evol.* **18**, 297-303.
- Shimizu, M., Asahara, H., Tamura, K., Hasegawa, T. & Himeno, H. (1992) The role of anticodon bases and the discriminator nucleotide in the recognition of some E.coli tRNAs by their aminoacyl-tRNAs synthetase. *J. Mol. Evol.* **35**, 436-443.
- Suzuki, M., Nemoto, N. & Husimi, Y. (1993). Adaptive Design of Protein using virus like strategy. In: Abstracts of EMBO IRBM workshop on Molecular Repertoires and Methods of Selection. p 76, held at Gabbio, Italy.
- Tamura, K., Asahara, H., Himeno, H., Hasegawa, T. & Shimizu, M. (1991). Identity elements of Escherichia coli tRNA Ala. *J. Mol. Recog.* **4**, 129-132.
- Tanford, C., (1978). The Hydrophobic Effect and the Organization of Living Matter. *Science* **200**, 1012-1018.
- Volkenstein, M.V. (1994) *Physical Approaches to Biological Evolution* Springer-Verlag
- Watson, J. D., et al. (1987) *Molecular Biology of The Gene* (Fourth Edition) The Benjamin/Cumming Company, Inc.
- Weiner, A. M. (1988). Eukaryotic Nuclear Telomeres: Molecular Fossils of the RNP World?. *Cell* **52**. 155-157.
- Weiner, A. M. & Maizels, N. (1987). 3' terminal tRNA-like structures tag genomic RNA molecules for replication: implications for the origin of the protein synthesis. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7383-7387.

- アイゲン：物質の自己組織化と生体高分子の進化（瀬川、伏見訳）（日本生物物理学会編「自己組織化」所収、東京大学出版会 1977）
- 木村資生 生物進化を考える、岩波新書、1988
- 木村資生、近藤宗平編：生命の起源と分子進化、岩波講座 現代生物科学 7、1976
- 沢井宏明、石神正浩「一次高分子の生成」（講座進化 第5巻所収、東京大学出版会 1991）
- 清水幹夫 「遺伝暗号—研究史と展望」（講座進化 第5巻所収、東京大学出版会 1991）
- ジャドソン, H.F. (1982) 分子生物学の夜明け(上、下)、東京化学同人(野田春彦訳) [Jadson, H.F. *The Eight Day of Creation: The Makers of the Revolution in Biology* Simon and Schuster, New York. 1979]
- ステント, G. S. (1972) バクテリオファージ; その分子生物学, 岩波書店 (渡辺, 三宅, 柳沢訳) [Stent, Gunther S. *Molecular Biology of Bacterial Viruses* W.H. Freeman and Company San Francisco, 1963]
- ダイソン, F.J. (1989) 生命の起源、共立出版(大島泰郎、木原祐訳) [Dyson, F.J. *Origins of Life* Cambridge Univ Press, 1985]
- 原田馨: 生命の起源; 化学進化からのアプローチ、東京大学出版会、1977
- 伏見讓「実験室における分子進化」(1991) 科学, **61**(5), 333-340
- 伏見讓「人工的自己増殖系」(三浦謹一郎編「生命分子工学」所収 裳華房 1992)
- 伏見讓「進化分子工学」(講座進化 第6巻所収、東京大学出版会 1992)

- プリゴジン, I., スタンジェール, I (1987) 混沌からの秩序 みすず書房 (伏見康治、伏見、松枝訳)
 [Prigogine, I., Stengers, I. *Order Out of Chaos* Bantam Books, New York, 1984]
- プリムローズ, S.B. and デイモック, N.J. (1983) ウイルス学入門、培風館 (河野晴也、山崎修道訳)
 [Primrose, S.B. and Dimmock, N.J. *Introduction to Modern Virology* 2ed Blackwell Scientific Publications, 1980]
- ボルケンシュタイン, M.V. (1991) 生命現象の物理、啓学出版 (石坂昭三監訳、宇佐美、伊藤訳)
 [Volkenstein, M.V. *Physics and Biology* Academic Press, Inc. 1982.]
- ボワバン, A (1968) 微生物、白水社クセジュ文庫、江上不二夫、板橋美智子訳 [Boivin, Andre
Les Micobes Que Sais-Je? N° 53, 1968]
- ニコルス, G.、プリゴジン, I. : 散逸構造、岩波、1980 (小島陽之助、相沢洋二訳) [Nicolis, G. and
 Prigogine, I. *Self-Organization in Nonequilibrium Systems: From Dissipative Structures to Order through
 Fluctuations* John Wiley & Sons, Inc. 1977]
- 柳川弘志、 (1989) 生命の起源を探る 岩波新書
- 柳川弘志 「生命の初期進化とRNA」 (講座進化 第5巻所収、東京大学出版会 1991)

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導、御校閲を賜りました埼玉大学工学部教授、伏見譲博士に甚大なる謝意を表すとともに、御好意ある御教示を下さいました埼玉大学工学部助教授、西垣功一博士に深く感謝致します。

また、埼玉大学工学部助手鈴木美穂博士にはRI関係でご協力いただきました。ここに、感謝致します。また、宇宙科学研究所の朝原治一博士には、本研究の趣旨をよく理解していただき、酵素等の提供、有益な討論等をしていただいたことを深く感謝いたします。同じく、三菱化学生命科学研究所の柳川弘志博士にも、数々の助言、討論を通し有益な実験上の示唆をいただきました。ここに、深く感謝いたします。

その他、埼玉大学研究室の伏見研究室、三菱化学生命科学研究所の柳川研究室のスタッフや学生の方々に、厚く御礼申し上げます。