The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	原始細胞モデルとしてのリポソームとRNA複製反応のダイナミクスに関する研究
Author(s)	細田, 一史
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1497
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

原始細胞モデルとしての

リポソームとRNA複製反応のダイナミクスに関する研究

大阪大学大学院　生命機能研究科

細田　一史

平成 20 年　3 月　25 日　修了

本論文の要旨

原始細胞がどのように誕生し、繁殖したか？これは生命の起源に直結する問いである。生命の起源説の中で最も有力であるのが RNA ワールド仮説である。この仮説における原始細胞は、遺伝情報担体と代謝触媒をともに RNA が担っており、これが脂質二重膜小胞（リポソーム）内に封入されているというものである。一方、その材料に関わらず原始細胞に必要な性質として少数ゲノム性がある。これは現在の細胞が制御を用いて共通に持っている特長であり、進化能を持つために必要であることが知られている。生物の進化過程のいつかの時点において、このような制御をもたない原始細胞は存在したと考えられ、制御無しに少数ゲノム性を持つには、ゲノム複製と細胞分裂の動的つりあいが重要だったと考えられる。ゲノム複製と細胞分裂それぞれのダイナミクスにはそれを構成する生化学物質の特長が大きく影響したと考えられるため、原始細胞膜モデルとしてのリポソーム、および原始細胞ゲノムモデルとしての RNA 複製のダイナミクスに関する知見は、原始細胞の理解に重要である。

先行研究で提唱されているリポソームの分裂モデルでは、生成されたリポソームのサイズ分布を矛盾なく説明できない。また、原始細胞はその少数ゲノム性により、RNA 複製の確率的ゆらぎにその生存が大きく影響されたと考えられるが、RNA 複製の確率論的解析はこれまでに報告されていない。さらに、RNA 複製反応がリポソームという微小空間内で起こりうることは定性的に示されたが、その効率を定量的に解析されたことはない。本研究では、リポソームのサイズ分布解析による動的挙動の推定、RNA 複製反応の速度論的および確率論的解析、さらにはリポソーム内での RNA 複製反応の定量的解析を行うことで、原始細胞に関しての知見を得ることを目的とした。

具体的には、まず人為的制御の少ない方法でリポソームを作成し、このサイズ分布を蛍光セルソータを用いて精度よく測定して解析することで、リポソームの動的挙動の理解を試みた。結果、リポソームには細胞周期のような制御がないにもかかわらず、そのサイズ分布形状が一定であることを示し、これを生み出すダイナミクスのモデルを提唱できた。さらに、大腸菌のサイズも同様の分布形状に従うことを発見し、大腸菌は分裂の制御機構を用いずにサイズ分布を一定に保っている可能性があることを示した。次に、ゲノム RNA 複製モデルとして、その原始的な反応機構から実験モデルとして最適とされる Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応を選択し、この反応の経時変化を速度論的および確率論的に解析した。さらに、この RNA 複製反応をリポソーム内で行い、その反応効率を試験管内と比較した。結果、その複製反応がポアソン過程であるとするだけで実験結果を説明できる RNA 複製反応が実在することを示した。また、この RNA 複製反応がリポソーム内で、リポソームに悪影響を受けることなく行われることを示した。最後に、これら再構成実験を考慮して、単純な原始細胞の理論モデルを作り、細胞内許容ゲノム分子数と変異率の関係、原始細胞繁殖に対する RNA 分子間親和性および細胞サイズのばらつきの寄与を示した。

目次

第 1 章：緒論 **1**

1.1 生命の起源･原始細胞に関する研究 **1**

1.2 原始細胞に関する考察 **1**

1.2.1 原始細胞の構成成分―RNA と脂質二重膜 1

1.2.2 原始細胞が細胞性である必要―複数自己複製分子系 2

1.2.3 細胞が持つ性質―少数ゲノム性 2

1.2.4 原始細胞におけるゲノム複製と細胞分裂のダイナミクスの重要性 3

1.3 原始細胞を理解するための再構成的アプローチ **4**

1.3.1 再構成実験と理論モデルの重要性 4

1.3.2 細胞膜モデルとしてのリポソーム 4

1.3.3 ゲノム複製モデルとしての Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応 5

1.4 本論文の目的と構成 **6**

1.5 参考文献 **7**

第 2 章：FACS を用いた細胞サイズリポソーム形成過程の解析 **10**

2.1 概要および本論文での位置づけ **10**

2.2 背景 **10**

2.2.1 リポソーム形成過程の重要性 10

2.2.2 形成過程とサイズ分布の関係 11

2.2.3 リポソームの内部区画構造 11

2.2.4 研究の概要 12

2.3 試料と方法 **13**

2.3.1 計算機シミュレーション 13

2.3.2 モデルの数式 13

2.3.3 プラスミドの調整 16

2.3.4 凍結乾燥リポソームの調整 17

2.3.5 試験管内転写翻訳反応 17

2.3.6 リポソーム内転写翻訳反応 17

2.3.7 FACS によるリポソームの体積測定 18

2.3.8 FACS データの解析 18

2.4 結果 **19**

2.4.1 リポソームの分裂および融合モデルの提唱 19

2.4.2 計算機シミュレーションによるモデルの検証 21
2.4.3 分裂モデルおよび分裂と成長との定常分布の近似解析解 23
2.4.4 リポソームの全体積と内部区画体積の同時計測系の概要 24
2.4.5 試験管内における反応の確認 26
2.4.6 FACS を用いた実験系の確認 28
2.4.7 リポソームの全体積と内部区画体積の関係 31
2.4.8 実験結果によるモデルの検証 33
2.4.9 内部区画の定量的指標の提唱と凍結乾燥法での値 35
2.5 考察 36
2.5.1 第 2 章の結論 36
2.5.2 細菌のサイズ分布 37
2.5.3 対数スケールでの解析 37
2.5.4 分裂および融合におけるリポソームの総表面積量保存について 38
2.5.5 モデルの一般性 38
2.5.6 モデルから導かれるサイズ分布の形成原理 39
2.5.7 サイズが均一なリポソーム調整法 39
2.5.8 全体積と内部区画体積の関係 40
2.5.9 内部区画の定量的指標の測定 40
2.5.10まとめと展望 40
2.6 参考文献 41
2.7 補足資料 43

第 3 章：Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応の速度論的解析 46
3.1 概要および本論文での位置づけ 46
3.2 背景 46
3.2.1 Qβレプリカーゼとは 46
3.2.2 過去の研究と速度論モデルの重要性 47
3.2.3 研究の概要 47
3.3 試料と方法 48
3.3.1 Qβレプリカーゼの調整 48
3.3.2 プラスミドの調整 48
3.3.3 鋳型 RNA の調整 48
3.3.4 複製反応のリアルタイム検出 49
3.3.5 指数期の解析 49
3.3.6 飽和点の解析 50
3.3.7 線形期の解析 51

3.3.8 酵素失活の解析 53
3.4 結果 53
3.4.1 RNA 複製反応の 2 つの反応段階とリアルタイム測定 53
3.4.2 新しい反応速度論モデルの提唱 54
3.4.3 指数期の解析 54
3.4.4 飽和点の解析 59
3.4.5 線形期の解析 59
3.4.6 酵素失活の解析 63
3.5 考察 65
3.5.1 第 3 章の結論 65
3.5.2 求めたミカエリス定数の値に対する考察 66
3.5.3 速度論定数と RNA 長の関係 67
3.5.4 宿主大腸菌内での非生産的結合の影響 67
3.5.5 Qβレプリカーゼの 3 量体について 68
3.5.6 非生産的結合の分子機構 68
3.5.7 非生産的結合による伸長反応の阻害 69
3.5.8 二本鎖合成反応 69
3.5.9 まとめと展望 70
3.6 参考文献 70
3.7 補足資料 75

第 4 章：Qβレプリカーゼによるリポソーム内 RNA 複製反応の確率論的解析 76
4.1 概要および本論文での位置づけ 76
4.2 背景 76
4.2.1 生命の起源と RNA ワールド仮説における原始細胞 76
4.2.2 原始細胞モデルとしての Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応 77
4.2.3 脂質二重膜小胞内での反応の重要性 77
4.2.4 確率論的解析の重要性 78
4.2.5 研究の概要 78
4.2 試料と方法 79
4.3.1 Qβレプリカーゼの調整 79
4.3.2 鋳型 RNA の調整 79
4.3.3 試験管内複製反応の測定と解析 79
4.3.4 リポソーム内複製反応の測定と解析 80
4.3.5 リポソームの全体積から反応体積への変換 80
4.3.6 リポソーム内複製反応の分散分析 82

4.4 結果 **84**
4.4.1 反応モデルの提唱および数値シミュレーション 84
4.4.2 試験管内複製反応の確率論的解析 87
4.4.3 リポソーム内複製反応の FACS を用いた計測 89
4.4.4 リポソーム内複製反応の平均的代表値の解析 92
4.4.5 リポソーム内複製反応の分散分析 93
4.5 考察 **97**
4.5.1 第 4 章の結論 97
4.5.2 原始細胞における RNA 複製反応の可能性 97
4.5.3 原始細胞における RNA 複製反応に対する体積の効果 97
4.5.4 RNA 複製反応のばらつきの寄与 98
4.5.5 リポソームの全体積の反応体積への変換 99
4.5.6 まとめと展望 99
4.6 参考文献 **99**
4.7 補足資料 **102**

第 5 章：原始細胞繁殖に対する理論的考察 **105**
5.1 概要および本論文での位置づけ **105**
5.2 背景 **105**
5.2.1 生命の起源と RNA ワールド仮説における原始細胞 105
5.2.2 原始細胞におけるゲノム複製と細胞分裂のダイナミクスの重要性 106
5.2.3 再構成実験に基づいた理論モデルの重要性 106
5.2.4 研究の概要 107
5.3 原始環境下における自己複製モデル **107**
5.3.1 モデルの概要 107
5.3.2 細胞膜のダイナミクス設定 108
5.3.3 内部 RNA 分子の反応設定 108
5.3.4 モデルにおける評価 109
5.4 計算結果 **110**
5.4.1 静的な原始細胞繁殖条件―RNA 分子数と変異率の関係 110
5.4.2 動的な原始細胞繁殖条件―RNA の分子間親和性が高い場合 112
5.4.3 動的な原始細胞繁殖条件―RNA の分子間親和性が低い場合 116
5.5 考察 **119**
5.5.1 第 5 章の結論 119
5.5.2 物質制限による原始細胞繁殖 119
5.5.3 RNA 分子数と変異率の関係の一般性 120

5.5.4 動的な原始細胞繁殖 120
5.5.5 初期条件の違いによる原始細胞繁殖への貢献 120
5.5.6 全ての生細胞を観察する系 120
5.5.7 細胞サイズのゆらぎについて 121
5.5.8 まとめと展望 121
5.6 参考文献 121

第 6 章：総括 124
6.1 本論文のまとめ 124
6.2 最後に 125

業績 126

謝辞 128

本論文で用いた記号

a_{capsul} ：凍結乾燥法による物質封入率
b ：対数の底
Boole[φ] ：Boole 関数（Iverson's convention）
C_A ：P(A)の規格化定数
C_{BA} ：P(B|A)の規格化定数
C_{DNA} ：リポソーム封入前反応溶液中のプラスミド DNA 濃度
d ：二本鎖合成率
E ：酵素
E-Rp ：生産的結合部位に結合している酵素
E-Rn ：非生産的結合部位に結合している酵素
$[E_{280}]$ ：280 nm の吸光度から求めた酵素濃度
$f(x,t)$ ：時間 t、サイズ x におけるリポソームの頻度
$f_w(v_w)$ ：全てのリポソームにおける全体積 v_w のリポソームの確率密度関数
$f_p(v_p,v_w)$ ：全体積 v_w のリポソーム中での v_p の確率密度関数
$f_p(v_p/v_w)$ ：全体積 v_w のリポソーム中での v_p の確率密度関数
$f_{wp}(v_w,v_p)$ ：あるリポソーム内の v_p の区画に 1 分子の RNA が封入されているとき、そのリポソームの全体積 v_w の確率密度関数
$F(X,t)$ ：時間 t、サイズ X におけるリポソームの頻度
$F_w(v_w)$ ：全体積 v_w をもつ全リポソームの頻度
$F_{wreac}(v_w)$ ：反応したリポソームの頻度（v_w に対する関数）
$F_{preac}(v_p)$ ：反応したリポソームの頻度（v_p に対する関数）
$F_{wp}(v_w,v_p)$ ：全体積 v_w をもち区画体積 v_p で反応がおこるリポソームの頻度
$F_{xw}(v_w)$ ：任意のリポソーム集団の全体積 v_w をもつ頻度
$F_{xp}(v_p)$ ：任意のリポソーム集団の内部区画体積（反応体積）v_p をもつ頻度
FWHM ：半値全幅（頻度が最大の半分であるときの分布の全幅）
$G(m, s, x)$ ：平均値 m、標準偏差 s の x に対する正規分布。
$\langle Gr(v_p)\rangle$ ：反応体積 v_p のリポソームにおける緑色蛍光の平均的代表値
J_A ：反応体積 v_p の階級にあるリポソームの$\langle N_{RNA60}(v_p)\rangle$との偏差平方和の、全 v_p についての総和
J_B ：$\langle N_{RNA60}(v_p)\rangle$と$\langle\langle N_{RNA60}\rangle\rangle$との、全 v_p についての偏差平方和
J_{AV} ：J_A のうち v_p の階級の幅に依存するもの
J_{total} ：反応したリポソーム全てについての RNA 分子数の$\langle\langle N_{RNA60}\rangle\rangle$との偏差

	平方和
J_{reac}	：反応のばらつきに依存するもの
J_{vol}	：J_{total} のうち体積のばらつきが寄与するもの
k_1	：生産的結合の会合速度定数
k_{-1}	：生産的結合の解離速度定数
k_2	：非生産的結合の会合速度定数
k_{-2}	：非生産的結合の解離速度定数
k_{cat}	：触媒速度定数
k_{div}	：分裂の確率（速度）係数
k_{fus}	：融合の確率（速度）係数
k_{inact}	：失活速度定数
$k_{inactmax}$	：最大失活速度定数
k_{obs}	：観測指数増幅率
k_{pol}	：1 塩基の平均伸長速度定数
k_{others}	：伸長反応以外（伸長開始や RNA と酵素の解離など）の速度定数
Ki	：非生産的結合の解離平衡定数 k_{-2}/k_2
$K\mathrm{i}_{NTP}$	：NTP による失活阻害定数
K_M	：生産的結合のミカエリス定数$(k_{-1} + k_{cat})/ k_1$
K_{M2}	：非生産的結合のミカエリス定数様の平衡定数$(k_{-2}+2k_{cat})/k_2$
K_{MGDP}	：GDP 依存性失活のミカエリス定数
MODE-v_p	：v_w における v_p の分布の最頻値となる v_p
Mut	：Rep の変異体（Mutant）RNA
n	：1 分子の RNA あたりの非生産的結合部位数
n_{div}	：分裂に依存するサイズの乗数
n_{fus}	：融合に依存するサイズの乗数
N	：鋳型 RNA の塩基長
N_{enz}	：酵素分子数
N_R	：細胞内の Rep の分子数
N_M	：細胞内の Mut の分子数
N_R*	：定常状態の条件を満たす細胞内の Rep の分子数
N_{max}	：細胞内の複製増幅可能な最大分子数
$N_{RNA}(t)$	：時間 t での RNA の分子数
$<N_{RNA}(v_p)>$	：反応体積 v_p のリポソームにおけるある時間での RNA 分子数の平均的代表値
$<N_{RNA60}(v_p)>$	：反応体積 v_p のリポソームにおける反応時間 60 分での RNA 分子数の平均的代表値

$<<N_{RNA60}>>$	：反応したリポソーム全てについての反応時間 60 分での RNA 分子数の平均的代表値
p_{cat}	：単位時間あたりに触媒反応が起こる確率
p_{div}	：原始細胞が単位時間当たりに分裂する確率
$p_{div}(x)$	：サイズ x のリポソームにおける単位時間当たりに分裂する確率
$p_{fus}(x,\xi)$	：2 つのサイズ x と ξ のリポソームが融合する単位時間当たりかつ頻度あたりの確率
$P_{size}(x,t)$	：時間 t、サイズ x におけるリポソームの確率密度
$P_{reac}(v_w)$	：ある体積 v_w をもつリポソーム内で反応が起こる確率
P_1	：反応したリポソームのうちプラスミドが 1 分子封入される確率
P_{prop}	：原始細胞繁殖の確率
Poisson(k)	：ポアソン分布において、事象が k 回起こる確率
P(A)	：全リポソームのうち、全体積 v_w をもち反応したリポソームの確率
P(B)	：全リポソームのうち、区画体積 v_p をもち、かつその区画内で反応したリポソームの確率
$P(A \cap B)$	：全リポソームのうち、全体積 v_w および区画体積 v_p をもち、かつその区画 v_p 内で反応したリポソームの確率
P(B|A)	：反応した v_w のリポソームのうち、その反応が行われた内部区画体積が v_p である確率
Rt	：全 RNA
R_{free}	：遊離 RNA
Rp	：RNA における空の生産的結合部位
Rn	：RNA における空の非生産的結合部位
$[R_{sat}]$	：飽和点における RNA 濃度
$[R_0]$	：リポソーム封入前反応溶液中の RNA 濃度
Rep	：RNA 複製の鋳型にも合成触媒にもなれる自己複製（Replicator）RNA
S	：分裂モデルにおける分裂後の正規分布の標準偏差係数
SD_{lnRNA}	：指数期における対数スケールでの RNA 分子数の標準偏差
SD_{RNA}	：線形期における線形スケールでの RNA 分子数の標準偏差
SD_{τ}	：ある RNA 分子数に達する時間 τ の標準偏差
[Substance]	：Substance の濃度
t	：時間
t_{sat}	：飽和点に達する時間
v_w	： 1 つのリポソームの全内部体積（whole volume）
v_p	：リポソーム内部区画の個々の内部体積（partial volume）。 つまり 1 分子の物質を起点としたリポソーム内反応の反応体積。

v_{cell}	：細胞体積
$V(t)$	：酵素失活を補正した時間 t における反応速度
$V_{cor}(t)$	：酵素失活を考慮しない場合の時間 t における反応速度
x	：任意のサイズ
X	：x の対数表記（底 b）
$XMAX$	：X がとりうる最大値
$XMIN$	：X がとりうる最小値
α	：$[E_{280}]$に対する[Et]の比（$\alpha = [Et]/[E_{280}]$）
λ	：指数関数の平均値の逆数
μ	：変異率
τ	：ある RNA 分子数に達する時間
ξ	：任意のサイズ
Ξ	：ξの対数表記（底 b）

第 1 章：緒論

1.1. 生命の起源・原始細胞に関する研究

人類は古くから生命の起源に対して問いかけてきた。様々な科学的アプローチが行われているが、未だ大多数の意見が一致するような事象は少ない。生命の起源や原始細胞について議論するため、ここではまず、生命、原始細胞についての定義を述べる。生命（生物も同様とする）の定義は難しい[1]が、自然科学においては、生物がもつ性質を次の 3 点をもって定義とすることが多く、私もこれに従う。(i) 代謝能（構成材料やエネルギーなどを生産する)、(ii) 自己複製能（遺伝情報を含む細胞全体を複製する)、(iii) 進化能（遺伝情報に変異が導入されて生じた変異体がその遺伝情報に基づく機能により選択される）である[2]。このような性質を持つ現在の生物は、突如として現在の状態になったのではなく、進化によって現在の状態になったと考えられている[3]。また、現存する生物は全て細胞性であり、私たち生物は共通祖先を持っていたと考えられている[4]。よって、初めて上記の 3 つの性質を有した有機化学物質の集合体が、原始細胞であると考えることができる[5-10]。最初の細胞性生物としての原始細胞についての知見は、生命の起源の理解に直接繋がるだけでなく、生物の生物たる特徴、また生物がその生存および繁殖のために利用している戦略を理解するために非常に重要である。

1.2. 原始細胞に関する考察

1.2.1. 原始細胞の構成成分―RNA と脂質二重膜

現在の生物を構成する最小単位である細胞は、核酸（DNA）をゲノムとして脂質二重膜内に保持し、その状態を複製するものである[4]。これまでに、様々なタイプの生命の起源とその過程が提唱されているが、その中でも有力であるのが、RNAワールド仮説である[4, 7, 11]。RNAワールド仮説における原始細胞は、現在の細胞に対してDNAおよびタンパク質を欠いており、遺伝情報担体と代謝触媒をともにRNAが担っている。これが有力であるのは、RNAはDNA同様に遺伝情報担体として使用される（ウィルスなどは実際に使用している[12]）ことに加え、RNAは十分強い触媒活性を持つことが知られている（触媒活性を持つRNAはリボザイムと呼ばれる[13]）からである。実際に、RNAを鋳型としてその相補鎖RNAを合成するRNAが存在する（ただし自分自身を複製することはできていない[14]）。なお、RNAに似た物質が原始環境下で生物に使用されたとされる報告もある[15]が、本論文ではRNAとこれらの違いを区別せずに、単にRNAと記述することにする。

一方、脂質二重膜小胞（リポソーム[16]）は、生物による制御がなくても、自発的に成

長や融合、分裂を繰り返すことが知られている[17, 18]。リポソームは、その構成状態によって性質が決定されるため、その構成状態が遺伝情報となり、原始細胞になり得たとするLipidワールド仮説もある[19]。ただし、脂質は生物の構成要素である両親媒性物質（界面活性剤）という定義があるが、本論文では原始細胞もしくはそれになりうる両親媒性物質も脂質として記述する。いずれにせよ、RNAワールド仮説では、いつかの時点からは、RNAを遺伝情報担体および代謝触媒として、リポソーム内部に有した原始細胞になったと考えられており[9]、私たちもこの仮説に従う。ただし、RNAワールド仮説においては、遺伝情報担体と代謝触媒をともにRNAが担っているため、現在の細胞のようにゲノムと触媒酵素のように明確に分けることは難しく、どのRNAも遺伝情報担体であると考えられる。

1.2.2. 原始細胞が細胞性である必要―複数自己複製分子系

原始細胞において細胞性が必要であった理由は、遺伝情報担体の複製に複数の分子が必要であったからと考えられている[9]。RNAワールド仮説に従い、遺伝情報担体および触媒分子がともにRNAであると考えた場合、その生化学的な性質から、RNAの複製反応には、合成を触媒するRNA分子と鋳型となるRNA分子の最低でも 2 分子（同じ種類の分子でも良い）が必要であると考えられている[9, 14]。もし、細胞膜がなかったならば、拡散によりこれら 2 分子が反応する確率は限りなく小さくなるため、これらRNAが非常に濃い条件下でない限り細胞性であることが必要だったとされている。また、たとえこれらRNAが非常に濃い条件下であっても、細胞性は進化のためにも必要であったと考えられている[20]。進化における選択とは、遺伝情報に基づく機能が選択されるということである。よって、遺伝情報担体の複製に、合成触媒分子と鋳型分子のように複数の分子が必要である場合は、これら複数の分子の機能が全て反映される機能単位を作るために、細胞性が必要である。逆に、遺伝情報担体の複製が 1 分子で行われる場合など、その遺伝情報担体分子自体の機能のみを選択する場合には、細胞性である必要はない。以上のように、複数分子の拡散を防ぐため、および機能単位を区分けて進化を可能にするために細胞性が必要であると考えられている。

1.2.3. 細胞が持つ性質―少数ゲノム性

現存する細胞は、そのゲノム（全遺伝情報）を少数コピーしかもたない[4]。これは進化の効率を高くするためと考えられている。例えば、優れた（生存に有利な機能を細胞に付加する）ゲノムをもつ細胞が存在したとしても、その細胞が 1 つの細胞内に異なる複数のゲノムを保持していた場合、優れたゲノム由来の機能が細胞の形質として十分に表現されないことが考えられる[21, 22]。この場合、選択にかかる機能単位は細胞であるため、その優れたゲノムが選択される効率は低下し得る。さらに、たとえ細胞の形質として十分に表現され、その細胞が選択されても、選択される単位は細胞であるため、優れ

たゲノムとは異なるゲノムも選択されることになる[20]。ただし、ここでの異なるゲノムというものは、由来は同じであるが、ゲノム複製時の変異により違いが生まれたものであり、ゲノムが複数あれば生じ得るものである。以上のように、進化における機能選択の効率を高くするために、選択の機能単位である細胞内に、複数のゲノムが存在しないことが望ましいと考えられる。実際に、少数ゲノムの状態を安定的に保持するために、現在の細胞は主に以下の 2 つのことをほぼ確実に制御していることが知られている。1 つはゲノム複製と細胞分裂の同期[23]、もう 1 つは細胞分裂時のゲノム分配[24]である。現存するほぼ全ての細胞がこれら”同期と分配”を制御して少数ゲノム性を保っていることからも、少数ゲノム性が重要であることがわかる。さらに、原始細胞における遺伝情報の複製は、現存する細胞よりも不正確（変異が多い）であったと考えられており[25]、機能が重複する遺伝情報担体が複数であるときに変異遺伝情報の存在を許しやすいと考えられる。よって、原始細胞にとって、遺伝情報担体の少数性はより重要であったと考えられる。ただし、上述のように原始細胞におけるゲノムの定義は難しいが、細胞内においてその機能を保持する分子数が最も少ないような分子がゲノム担体としての特徴をもち、この分子が少数であることが進化にとって重要であるという報告がある[22]。よって、私たちもこれに従い、原始細胞におけるゲノム担体とは、細胞内においてその機能を保持する分子数が最も少ないような分子として記述する。

1.2.4. 原始細胞におけるゲノム複製と細胞分裂のダイナミクスの重要性

原始細胞がその誕生当時から、上記のような”同期と分配”の制御機構をもち、少数ゲノム性を保持していたとは考えにくく、生物の進化過程のいつかの時点において、これら”同期と分配”の制御を持たない原始細胞の段階は存在したと考えられる[9, 21]。つまり、細胞膜の分裂が内部のゲノムの複製に依存せず独立に起こっているような細胞である。細胞内に異なる複数のゲノムが無限に多く存在していた場合には、前述のように進化不可能であるため、このような原始細胞でもゲノムは有限のコピー数であったと考えられる。このためには、少なくともゲノム複製と細胞分裂の速度がなんらかの要因でつりあっている必要があると考えられる。ゲノム複製が細胞分裂よりも常に速ければ、原始細胞内のゲノムのコピー数は無限に多くなり、逆に細胞分裂がゲノム複製に関わる内部の代謝反応よりも十分に速ければ、細胞内に複数の分子を保つことはできなくなる（ゲノム複製に複数の分子が必要である）からである。以上のように、原始細胞が進化能を持つには、ゲノム複製と細胞分裂のダイナミクスが重要な役割を果たしたと考えられる[9, 26]。前述のように、進化能を持つことが原始細胞にとっては必要条件であるので、原始細胞のゲノムとなりえる分子の複製と、原始細胞の細胞膜となりえる小胞のダイナミクスは、原始細胞誕生に対し、重要な要素である。本論文では、これらのダイナミクスを原始細胞のダイナミクスと呼び、これに注目する。

1.3. 原始細胞を理解するための再構成的アプローチ

1.3.1. 再構成実験と理論モデルの重要性

原始細胞のダイナミクスを理解するためには、現存する生物の観察に加え、理論モデル（数値計算シミュレーションを含む）と再構成実験の両面から検証することが重要である[9, 27, 28]。現存する生物は複雑であり、これを観察するだけでその本質を捉えることは難しい。さらに、現存する生物に対する研究とは異なり、原始細胞は現存しないため、観察することすらできない。このようなときに、理論モデルが有効である。複雑な系を単純化して理解することが可能であり、また現存しないものも含め、あらゆる条件を仮定し、その条件下での結論を得ることができるからである。この理論モデルを作る際に根拠となるものが実験事実であり、また作成後の理論モデルの正当化及びその条件の限定を行うのもまた実験事実である。生物は分子の中でも比較的複雑な高分子によって構成されており、これらの生化学的特長が生物の特徴に寄与することが大きいため、実験事実が特に重要になる。例えば、現存する生物の遺伝情報担体がDNAであるという実験事実[29]が、生物の理解に大きく寄与したことからも、構成材料がいかに生物の理解に重要であるかが想像できる。原始細胞は実在しないため、これを理解するうえで、実在しうる材料を用いて、実現可能な条件下（温度など）において、想定される仮説を再構成する実験が重要である。実際に、生命の起源に関係したと思われる条件を実験的に検証した再構成実験は盛んに行われている[9, 28, 30]。前述したように、RNAを鋳型としてその相補鎖RNAを合成するRNAの存在[14]、自発的に成長や融合、分裂を繰り返すリポソームの存在[17]を発見した研究が再構成実験によるものであり、これらは生命の起源にとって重要な知見をもたらしている。また、人工細胞の構築を試みる研究もあり、その計画なかで、最も簡単な反応系からなる人工細胞は、“RNA cell”である[9, 26]。これは前述のように、リポソーム内部において、RNA分子が情報媒体および反応触媒をともに担うような細胞である。以上のように、現存しない原始細胞のダイナミクスに対する理解は、現存する生物の観察に加え、理論モデルおよび再構成実験が効果的であると考えられる。

1.3.2. 細胞膜モデルとしてのリポソーム

前述のように、生物の進化過程におけるいつかの時点において現在のような分裂制御機構を持たない原始細胞が存在したと考えると、このような原始細胞の細胞膜のダイナミクスは、それを構成する脂質（両親媒性分子）による自己組織化のみに依存していたと考えられる[18]。よって、原始細胞のダイナミクスに関する考察を行う際に、人工リポソームをその細胞膜の実験モデルとして採用し、そのダイナミクスを理解することが有用となる[18]。この際に、注目すべきは、以下に説明するように、リポソームのダイナミクスを確率論的に理解することの重要性である。前述のように、原始細胞における細胞膜のダイナミクスは、有限でありおそらく少数であるそのゲノム数に影響する。細胞分裂

により少数分子が 2 つに分かれる際には、大数の法則による平均化が少ないために確率的ゆらぎを大きく受けるため、確率論的理解が重要になるのである[31]。これまで、前述した研究も含め、リポソームを用いた生命の起源に対する構成的アプローチによる結果は様々ある[17, 18, 32]が、そのほとんどが顕微鏡観察によるものである。顕微鏡観察では、比較的稀な事象（例えば融合など）であっても詳細に研究することができるが、サイズなどが広く分布しているリポソームを、条件をそろえて高精度で大量に観察することは困難であり、それがどの程度頻繁に起こるかなど統計的に解析することは難しい。また、通常再構成的アプローチで用いられるリポソームは 1 枚膜の細胞サイズリポソーム（Unilamellar Giant Vesicle: UGV）であるが、これを作成するためには人為的制御を要する[16]。しかしながら、自己組織化によって形成されるリポソームは膜層構造の制御がないため、多層かつ内部区画が存在する[16, 33]。よって、少ない制御において作成されるリポソームについて、内部区画構造も考慮した上で、そのダイナミクスを確率論的に理解することが重要である。

1.3.3. ゲノム複製モデルとしてのQβレプリカーゼによるRNA複製反応

RNAを鋳型としてその相補鎖RNAを合成するRNA[14]は、短鎖RNA（< 30 塩基長）しか合成できず、未だ自らと同じ配列を持つRNAを鋳型として複製することができない。一方、RNAゲノムの複製モデルとして多くの研究が行われてきたRNA複製反応が、Qβレプリカーゼによる RNA複製反応である[34-37]。Qβレプリカーゼは、RNA依存性RNAポリメラーゼ（RNAを鋳型としてRNA合成する酵素）であり、大腸菌 1 本鎖RNAファージQβのゲノムRNAを複製する酵素である[12]。Qβレプリカーゼは、単体でRNAを鋳型としてその相補鎖RNAを合成することができ、さらにその新規相補鎖RNAを鋳型にして、最初の鋳型と同じRNAを複製することができる。つまり、単体でRNAの指数増幅を触媒することができる酵素である。通常、生物やウィルスにおけるDNAやRNAの複製は、複数の酵素が複合体を形成し、複雑な機構を持って触媒される[4]。また、PCRにおけるDNA複製反応は、DNAの伸長にオリゴプライマーを必要とするうえに、指数的に増幅するためには周期的に温度を変更する必要がある[38]。その一方で、Qβレプリカーゼは常温条件下において、単体で核酸（RNA）を指数増幅できる稀な酵素であり、その複製には、この酵素以外に、他の酵素や核酸オリゴプライマー等を必要としないことに注目されたい。よって、この反応は他の核酸複製反応と比べて原始的であると考えられており、実際に再構成実験としてこの反応を用いて研究することによって、既に分子進化[39]やハイパーサイクル[40]、生命の起源[34]に対する理解などが深められている。しかしながら、この反応は他の核酸複製反応と比べて簡単である上に、古くから多くの研究がなされているにもかかわらず、未だその反応を全て簡単に説明できる速度論モデルが存在せず、未解決の点が複数残っている。さらに、前述のリポソームのダイナミクス同様、反応のダイナミクスの確率論的解析が重要であるが、これも行われたことがない。よって、原

始細胞のゲノム複製モデルとしてQβレプリカーゼによるRNA複製反応を研究する際には、実験データをよく説明できる反応モデルを立証し、さらにその確率論的解析を行うことが重要である。

1.4. 本論文の目的と構成

本論文では、RNA ゲノムをリポソーム内に有し、細胞分裂がゲノム複製に依存しない原始細胞を想定し、これのダイナミクスに対する基礎的知見を得ることを目的とした。このために、原始細胞の細胞膜およびゲノム複製の再構成実験モデルをそれぞれ人工リポソームおよびQβレプリカーゼによる RNA 複製反応とし、これらを解析した。先行研究で提唱されているリポソームの分裂モデルでは、生成されたリポソームのサイズ分布を矛盾なく説明できない。また、原始細胞はその少数ゲノム性により、RNA 複製の確率的ゆらぎにその生存が大きく影響されたと考えられるが、RNA 複製の確率論的解析はこれまでに報告されていない。さらに、RNA 複製反応がリポソームという微小空間内で起こりうることは定性的に示されたが、その効率を定量的に解析されたことはない。そこで以下のような研究を行った。

第 2 章では、人為的制御の少ない方法で作成したリポソームのサイズおよび内部区画構造の分布を計測し、これを解析することによりリポソームのダイナミクスの理解を試みた。結果、リポソームのサイズ分布をよく説明できる形成過程の条件が明らかになった。また、リポソームの内部区画構造の相似性を発見し、リポソームのダイナミクスを考える際に、その内部区画構造は無視できることが示された。

第 3 章では、Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応を試験管内で行い、この速度論的解析を行った。結果、未解決であった点を含め、実験結果を全て説明できる簡単な反応動力学モデルを提唱することができ、その速度定数や平衡定数を解析的手法により求めた。

第 4 章では、まずQβレプリカーゼによる RNA 複製反応を試験管内で行い、この反応のばらつきを測定して確率論的に解析した。結果、その反応のばらつきまで定量的に説明できる簡単な反応モデルを提唱することができた。さらに、原始細胞を模倣して、実際にリポソーム内でこの反応を行い、試験管内での反応と比較することで、RNA 複製反応がリポソーム内で起こる場合のリポソームによる影響を調べた。結果、RNA 複製反応の効率は、微小空間であるリポソーム内でも試験管内とほとんど変わらないことが示された。

第 5 章では、2-4 章で示された結果をもとに原始細胞の理論モデルを立て、計算機シミュレーションのみを用いて原始細胞繁殖に重要であろう条件を考察した。

これらを第 6 章にまとめた。ただし、第 2 章から第 5 章までの各章は、本論文の目的である原始細胞のダイナミクスに対する理解のために行われた研究であるが、それぞれ

の研究が独立してそれぞれのより専門的な分野において貢献しているため、これを各章の背景に記述した。

1.5. 参考文献

1. Ruiz-Mirazo, K., Pereto, J. & Moreno, A. A universal definition of life: autonomy and open-ended evolution. *Orig Life Evol Biosph* **34**, 323-346 (2004).
2. Luisi, P.L., Ferri, F. & Stano, P. Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften* **93**, 1-13 (2006).
3. Ayala, F.J. Darwin's greatest discovery: design without designer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104 Suppl 1**, 8567-8573 (2007).
4. Alberts, B. Molecular biology of the cell, Edn. 4th. (Garland Science, New York; 2002).
5. Oro, J. & Lazcano, A. A minimal living system and the origin of a protocell. *Adv Space Res* **4**, 167-176 (1984).
6. Schwegler, H., Tarumi, K. & Gerstmann, B. Physico-chemical model of a protocell. *J Math Biol* **22**, 335-348 (1985).
7. Gilbert, W. Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**, 618 (1986).
8. Morowitz, H.J., Heinz, B. & Deamer, D.W. The chemical logic of a minimum protocell. *Orig Life Evol Biosph* **18**, 281-287 (1988).
9. Szostak, J.W., Bartel, D.P. & Luisi, P.L. Synthesizing life. *Nature* **409**, 387-390 (2001).
10. Szathmary, E., Santos, M. & Fernando, C. Evolutionary potential and requirements for minimal protocells. *Topics Curr Chem* **259**, 167−211 (2005).
11. Joyce, G.F. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **418**, 214-221 (2002).
12. Calendar, R. The bacteriophages, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2006).
13. Kruger, K. et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157 (1982).
14. Johnston, W.K., Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Glasner, M.E. & Bartel, D.P. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**, 1319-1325 (2001).
15. Orgel, L. Origin of life. A simpler nucleic acid. *Science* **290**, 1306-1307 (2000).
16. Torchilin, V.P. & Weissig, V. Liposomes : a practical approach, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2003).
17. Takakura, K., Toyota, T. & Sugawara, T. A novel system of self-reproducing giant vesicles. *J Am Chem Soc* **125**, 8134-8140 (2003).

18. Hanczyc, M.M. & Szostak, J.W. Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 660-664 (2004).
19. Segre, D., Ben-Eli, D., Deamer, D.W. & Lancet, D. The lipid world. *Orig Life Evol Biosph* **31**, 119-145 (2001).
20. Matsuura, T. et al. Importance of compartment formation for a self-encoding system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7514-7517 (2002).
21. Koch, A.L. Evolution vs the number of gene copies per primitive cell. *J Mol Evol* **20**, 71-76 (1984).
22. Kaneko, K. & Yomo, T. On a kinetic origin of heredity: minority control in a replicating system with mutually catalytic molecules. *J Theor Biol* **214**, 563-576 (2002).
23. Prozorov, A.A. The Bacterial Cell Cycle: DNA Replication, Nucleoid Segregation, and Cell Division. *Microbiology* **74**, 375-387 (2005).
24. Yamaichi, Y. & Niki, H. migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the Escherichia coli chromosome. *Embo J* **23**, 221-233 (2004).
25. Biebricher, C.K. & Eigen, M. The error threshold. *Virus Res* **107**, 117-127 (2005).
26. Luisi, P.L. Toward the engineering of minimal living cells. *Anat Rec* **268**, 208-214 (2002).
27. Szabo, P., Scheuring, I., Czaran, T. & Szathmary, E. In silico simulations reveal that replicators with limited dispersal evolve towards higher efficiency and fidelity. *Nature* **420**, 340-343 (2002).
28. Ball, P. Synthetic biology: designs for life. *Nature* **448**, 32-33 (2007).
29. Watson, J.D. & Crick, F.H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**, 737-738 (1953).
30. Kita, H. et al. Construction of in liposome RNA-protein self-replication system: a step toward artificial cell assembly. *J Am Chem Soc* **Submitted**.
31. Fedoroff, N. & Fontana, W. Genetic networks. Small numbers of big molecules. *Science* **297**, 1129-1131 (2002).
32. Luisi, P.L. & Walde, P. Giant vesicles. (Wiley, Chichester ; New York; 2000).
33. Sato, K., Obinata, K., Sugawara, T., Urabe, I. & Yomo, T. Quantification of structural properties of cell-sized individual liposomes by flow cytometry. *J Biosci Bioeng* **102**, 171-178 (2006).
34. Haruna, I. & Spiegelman, S. Autocatalytic synthesis of a viral RNA in vitro. *Science* **150**, 884-886 (1965).
35. Biebricher, C.K., Eigen, M. & Luce, R. Template-free RNA synthesis by Q beta replicase. *Nature* **321**, 89-91 (1986).
36. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A. & Ugarov, V.I. Nonhomologous

RNA recombination in a cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell* **88**, 503-513 (1997).

37. Chetverin, A.B. Replicable and recombinogenic RNAs. *FEBS Lett* **567**, 35-41 (2004).
38. Bartlett, J.M. & Stirling, D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol* **226**, 3-6 (2003).
39. Mills, D.R., Peterson, R.L. & Spiegelman, S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 217-224 (1967).
40. Eigen, M., Biebricher, C.K., Gebinoga, M. & Gardiner, W.C. The hypercycle. Coupling of RNA and protein biosynthesis in the infection cycle of an RNA bacteriophage. *Biochemistry* **30**, 11005-11018 (1991).

第 2 章：FACSを用いた細胞サイズリポソーム形成過程の解析

2.1. 概要及び本論文での位置づけ

本章では、サイズや膜層構造の制御機構がないような原始細胞の細胞膜モデルとして細胞サイズリポソームに関する研究を行った。特に、原始細胞の細胞分裂のダイナミクスに対する知見を得るために、リポソームのサイズ分布を解析することでその分裂過程の理解を試みた。リポソームのサイズが分布するのは、確率過程である形成素過程の結果であるため、サイズ分布の理解は分裂（および融合）ダイナミクスの理解に直接繋がる。リポソームのサイズ分布に関する研究は古くから理論的にも実験的にも多く見られ、サイズ分布の分布関数としては主に LogNormal と Weibull 分布が知られているが、どちらも実験結果を矛盾なく説明できないことが多い。また、リポソームはその内部にも小さな区画を持つものがあり(Multi Vesicular Vesicle: MVV)、これがリポソームの融合・分裂に深く関与しているとの考えがある。よって私達は、まず過去の研究に良く見られるサイズ分布を説明することができるリポソーム形成過程の理論モデルを探索した。結果、先行研究でよく見られる典型的なリポソームのサイズ分布は、大きいほどよく分裂し、その分裂は比較的 2 等分であるという形成過程のみで説明できることがわかった。またこの分布は定常状態でも同じ形であることもわかった。さらにこれは大腸菌のサイズ分布も説明することができる。また、リポソームの体積分布と、そのリポソームの内部区画の体積分布を同時に測定できる実験系を構築し、これを解析することで、内部区画構造を考慮したうえでこの理論モデルが有効であることを確かめた。さらに、リポソームの内部区画構造の相似性を発見した。以上のことは原始細胞について、細胞サイズの制御機構を持たない原始細胞であっても、大腸菌と同様のサイズ分布をとることができることを示唆している。

2.2. 背景

2.2.1. リポソーム形成過程の重要性

リポソームは、脂質二重膜によって構成された、閉じた空間内に水溶液を内封した小胞であり、細胞膜の実験モデルとして幅広く研究されている[1]。そのなかでも巨大リポソーム（直径>100 μm）と呼ばれる細胞サイズリポソームは、脂質のみからなる最も簡単な細胞モデルとして、現存する細胞膜の性質に関する研究だけでなく、原始細胞および生命の起源に関する再構成実験系としても盛んに研究されている[2]。特に、リポソームの成長や分裂などのダイナミクスは、現在の生物のような制御を一切もたない原始細胞の成長や分裂を模倣しているとされ、注目を集めている。これまで、細胞サイズリポ

ソームの動的挙動として、具体的には融合[3]、吸着[4]、分裂[5]などが研究されている。さらにリポソームは、ドラッグデリバリー等への利用も行われているため、その分布を正確に記述することは実用面での応用性も高い[6]。

2.2.2. 形成過程とサイズ分布の関係

リポソームのダイナミクスに関する研究が数多く存在するが、そのほとんどが顕微鏡観察を用いたものである。顕微鏡観察では、比較的稀な動的挙動（例えば分裂など）であってもリアルタイムに観測することができるが、サイズなどの性質が広く分布しているリポソームを、条件をそろえて高精度で大量に観察することは困難であり、統計的に解析することは難しい。一方、リポソームのダイナミクスを確率論的に理解するために用いられる結果が、サイズ分布である。リポソームのサイズは測定が容易であり、リポソームの性質の中でも最も重要なものの一つである[7]。そのサイズ分布は、それが静的な状態のものであっても、形成過程を経た結果生じた分布であるので、リポソームの形成過程を理解するうえで有用である[8]。

リポソームのサイズ分布に関する研究は、様々な手法でサイズ分布を求めた実験的な研究と、リポソームの形成モデルを仮定した理論的な研究がある。サイズ分布の分布関数としては、主にLogNormal [9]およびWeibull分布[8]が知られており、その形成モデルとしては、それぞれ“単位時間当たりに、サイズ非依存的で一定の確率で起こる分裂”および“サイズに比例した確率で起こる、ランダムな分裂”である。しかしながら、どちらの形成モデルも実験結果を矛盾なく説明できず、議論の収束にはいたっていない。実験結果におけるサイズ分布は、LogNormal様な分布、つまり対数スケールのヒストグラムが左右対称である分布が多く見られる[7, 10-14]が、LogNormalが導かれる形成モデルにおいては、分裂によりサイズが小さくなっていくほど対数スケールでの分布の幅は大きくなっていくはずである。しかしどの過去の研究においても、サイズ分布の幅に優位な違いは観測されない。また、対数スケールでのWeibull分布は、そのサイズ分布の幅が常に一定であるが、左右非対称性が大きいという点で、実験結果とは一致しない。さらに、これらの研究は主に分裂のみによるサイズ分布についてのものが多く、リポソームの融合などを加味した定常状態のサイズ分布については考慮されていない。よって、リポソームのサイズ分布の実験結果としてよく見られる特徴である、対数スケールのヒストグラムが左右非対称かつ幅が一定であるサイズ分布が生じるような、リポソームの形成モデルが必要である。

2.2.3. リポソームの内部区画構造

通常再構成的アプローチで用いられるリポソームは 1 枚膜の細胞サイズリポソーム（Unilamellar Giant Vesicle: UGV）であるが、リポソームは多重膜のもの（Multi Lamellar Vesicle: MLV）やその内部にもまた小さな区画を持つもの（Multi Vesicular Vesicle: MVV）

があり、その程度はリポソーム作成法や脂質組成などによって異なる[1]。単純水和でリポソームを形成すると、乾燥脂質が水溶液中で自己組織化する際に形態制御がないため、通常多くの内部区画が形成される[1, 14]。このような内部区画は、特殊な方法でない限り、どのようなリポソーム形成法においてもある程度含まれると考えられるため、リポソームの幾何学的性質を決める重要な要素である。また、原始細胞における細胞膜は、膜層構造の制御がなく、自己組織化のみによって形成されると考えられるため、多くの内部区画が形成されていたと考えられる。またこれら内部区画構造が原始細胞の分裂に寄与したのではないかという考察もされている[15]。よって、原始細胞の成長および分裂のダイナミクスに対する理解を得るためには、このような内部区画を考慮したリポソームの形成過程の理解、つまりリポソーム全体のサイズ分布だけでなく、その内部区画のサイズ分布の理解もまた重要である。

従来、最も代表的な幾何学的パラメタであるリポソームサイズ（または体積）の分布は、顕微鏡観察や動的光散乱法などの方法によって計測されてきた。しかし、前者は分布を得るために多数の計測を行うことが困難である。また、後者の方法では、原理的にリポソームの膜多重度および内部区画を定量することはできない。従って、リポソームの内部区画のサイズ分布に関する知見は得られていない。一方、近年のflow cytometry（FCM）の技術的発展に伴って、リポソームの複数のパラメタを同時かつ高速に計測することが可能となってきた[12, 14, 16, 17]。レーザー光を個々のリポソームに照射した場合、前方散乱光および側方散乱光がそれぞれサイズおよび膜量に相関する。また蛍光マーカを脂質膜や内部体積に導入することにより、蛍光強度からこれらの量を定量できる。

2.2.4. 研究の概要

私達は過去の研究に多く見られるサイズ分布をよく説明できるリポソーム形成の確率論的モデルを提唱した。さらに、個々のリポソームの全体積と内部区画体積を同時にかつ大量に測定できる実験系を構築し、これら 2 次元のサイズ分布を得た。具体的にはまず、LogNormal や Weibull 分布になる形成モデルを網羅でき、かつ拡張できるモデルを立て、これの数値シミュレーションを用いて解析した。結果、”サイズに比例した確率で起こる、比較的 2 等分な分裂”を仮定したときに、私達の結果を含め、先行研究の実験結果でよく見られる対数スケールのヒストグラムが左右非対称かつ幅が一定であるサイズ分布が生じることがわかった。さらにこれが、融合を考慮した定常状態においても保存されることがわかった。また、私達は蛍光セルソータ（FACS）を用いて、リポソームの全体体積と内部区画体積の同時計測を行った。前者は赤色蛍光マーカを封入することにより、後者は翻訳反応における DNA を低濃度で封入し、ひとつの区画のみで緑色蛍光をもつ反応産物を生成させることにより、定量を行った。リポソームの全体体積と、内部体積の 2 次元ヒストグラムを解析したところ、内部区画体積は、その全体体積に比例して変化することが示された。また、その分布形状はリポソームの全体体積

に依存せず同一であり、相似性を持つことが示された。このことはさらに、リポソームの分裂および融合（吸着）は、内部区画構造とは独立におこっており、内部区画構造はその絶対サイズに依存せず決定されることを示唆している。

2.3. 試料と方法

2.3.1. 計算機シミュレーション

分裂では一回の試行によって平均 2 分の 1 になる、つまりサイズが乗算で変化するため、幅広いサイズレンジを評価する必要がある。よって、計算機シミュレーションは、結果において後述する式 2.1 を対数スケールで階級を区切り、以下の式に変換して行った。

$$F(X,t+1)-F(X,t)=\sum_{\Xi=X}^{XMAX}\left(2\,p_{\mathrm{div}}(b^{\Xi})F(\Xi)(\ln b)b^{X}\,G(\frac{b^{\Xi}}{2},S\,b^{\Xi},b^{X})\right)$$
$$-\,p_{\mathrm{div}}(b^{X})F(X)$$

ただし、$G(m, s, x)$は平均値m、標準偏差sのxに対する正規分布であり、あるサイズxのリポソームにおける単位時間当たりに分裂する確率を$p_{\mathrm{div}}(x)$とした。またX及びΞはそれぞれxおよびξの対数（底b）、$XMAX$および$XMIN$はそれぞれシミュレーション時に用いたXがとりうる最大値および最小値であり、$F(X,t)$は時間t、サイズXにおけるリポソームの頻度である。具体的には、$b = 1.1$ において、階級幅を 1 にして行った。ただし、これら対数スケールの階級を採用したシミュレーションで得られた結果は、式 2.1 を用いた線形スケールの階級を採用したシミュレーションで得られた結果を対数スケールの階級に直したものと同じ結果が得られることは確認した。

2.3.2. モデルの数式

私たちが 2.4.1 で提唱するモデルは、基本的には数値計算シミュレーションを用いて解析した（2.4.2）が、解ける部分は解析的に行った（2.4.3）ので、この詳細を以下に示す。

単位時間当たりの分裂確率がサイズ x に比例し、分裂が 2 等分であるとき、あるサイズ x をもつリポソーム（x 付近の幅Δx）の時間 t における頻度 $f(x,t)$は、そのΔt 後に対して、以下のような収支式で表される。

$$x\Delta x\big(f(x,t+\Delta t)-f(x,t)\big)=2(k_{div}\,2x)\Delta t(2x\Delta x)\,f(2x,t)-(k_{div}\,x)\Delta t(x\Delta x)\,f(x,t)$$

$$\therefore\frac{df(x,t)}{dt}=8k_{div}xf(2x,t)-k_{div}xf(x,t)$$

ただし、k_{div}は単位時間当たり、かつ単位サイズあたりの分裂の確率（速度）係数である。注目すべきことは、リポソームの数は、分裂するごとに増えていくということであ

り、リポソームの総数の時間変化は以下のようにかける。

$$\frac{d}{dt}\int_0^\infty f(x,t)dx = 4k_{div}\int_0^\infty 2xf(2x,t)dx - k_{div}\int_0^\infty xf(x,t)dx = k_{div}\,\bar{x}\int_0^\infty f(x,t)dx$$

ただし、$\bar{x}$はサイズのx平均値である。この総数によって頻度の関数$f(x,t)$を規格化し、確率密度関数$p(x,t)$に変換すると、

$$\frac{dp(x,t)}{dt} = \frac{d}{dt}\frac{f(x,t)}{\int_0^\infty f(x,t)dx} = \frac{\frac{d}{dt}f(x,t)}{\int_0^\infty f(x,t)dx} - \frac{f(x,t)}{\int_0^\infty f(x,t)dx}\frac{\frac{d}{dt}\int_0^\infty f(x,t)dx}{\int_0^\infty f(x,t)dx}$$

$$= 8k_{div}xp(2x,t) - k_{div}xp(x,t) - k_{div}\,\bar{x}p(x,t) \qquad \text{式 2.M1}$$

となる。よって、平均値の時間変化は、

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = \frac{d}{dt}\int_0^\infty xp(x,t)dx\frac{d\bar{x}}{dt} = -k_{div}\bar{x}^2$$

$$\therefore \bar{x} = \frac{\bar{x}_0}{1+k_{div}\,\bar{x}_0 t} \xrightarrow{t\to\infty} \frac{1}{k_{div}\,t}$$

と書き下せる。ただし、$\bar{x}_0$は初期（t=0）における平均値である。以上から、十分に時間がたったときの$p(x,t)$の時間変化は以下のように記述できる。

$$\frac{dp(x,t)}{dt} = 8k_{div}xp(2x,t) - k_{div}xp(x,t) - \frac{1}{t}p(x,t)$$

これを近似的に見たす解が、以下のように示される（ただし解析的証明は無い。後続の研究に期待）。

$$p(x,t) = \frac{k_{div}\,tK_2(2)}{2K_1(2)^2}\exp\left[-\frac{k_{div}\,tK_2(2)}{K_1(2)}x - \frac{K_1(2)}{k_{div}\,tK_2(2)\,x}\right] \qquad \text{式 2.M2}$$

ただし、$K_n(\phi)$はn次の第二種変形ベッセル関数である。

次に、成長モデルを加味する場合の数式について記述する。リポソームは 1 回の成長でΔx だけサイズが増加するとし、その成長確率がサイズに比例するとする。このとき、$p(x,t)$は、そのΔt 後に対して、以下のような収支式で表される。

$$p(x,t+\Delta t) - p(x,t) = k_{growth}\,(x-\Delta x)\Delta t\;p(x-\Delta x,t) - k_{growth}\,x\Delta t\;p(x,t)$$

$$\therefore \frac{dp(x,t)}{dt} = k_{growth}\,(x-\Delta x)\,p(x-\Delta x,t) - k_{growth}\,x\,p(x,t)$$

ただし、k_{growth}は単位時間あたり、かつ単位サイズあたり、Δxだけ成長する確率（速度）係数である。このとき、テーラー展開を用いて、$p(x-\Delta x,t)$をxのまわりで 1 次関数に近似すると、

$$p(x-\Delta x,t) = p(x,t) - \Delta x \frac{dp(x,t)}{dx}$$

より、

$$\frac{dp(x,t)}{dt} = -k_{growth}\Delta x\, p(x,t) - k_{growth}\,(x-\Delta x)\,\Delta x \frac{dp(x,t)}{dx}$$
$$\approx -\mu\left\{ p(x,t) + x\frac{dp(x,t)}{dx} \right\}$$

とかける。ただし、$\mu = k_{growth}\,\Delta x$であり、また$x >> \Delta x$より$x - \Delta x \fallingdotseq x$という近似を用いた。この成長のダイナミクスを、式 2.M1 で記述される分裂に加味すると、$p(x,t)$の時間変化は以下のようにかける。

$$\frac{dp(x,t)}{dt} = \left[\frac{dp(x,t)}{dt}\right]_{div} + \left[\frac{dp(x,t)}{dt}\right]_{growth}$$
$$= \left[8k_{div}xp(2x,t) - k_{div}xp(x,t) - k_{div}\,\bar{x}p(x,t)\right] - \mu\left\{ p(x,t) + x\frac{dp(x,t)}{dx} \right\} \qquad \text{式 2.M3}$$

定常状態における平均値は、

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = \frac{d}{dt}\int_0^\infty xp(x,t)dx = \int_0^\infty x\frac{dp(x,t)}{dt}dx$$
$$= -k_{div}\bar{x}^2 - \mu\bar{x} - \mu\left(\left[x^2 p(x,t)\right]_0^\infty - \int_0^\infty 2xp(x,t)dx\right)$$
$$= \bar{x}(\mu - k_{div}\bar{x})$$
$$\therefore \bar{x} = \frac{\mu\,\bar{x}_0}{\mu\,\mathrm{e}^{-\mu t} + k_{div}\,\bar{x}_0(1-\mathrm{e}^{-\mu t})} \xrightarrow{t\to\infty} \frac{\mu}{k_{div}}$$

ただし、境界条件 $p(\infty,t) = p(0,t) = 0$ を仮定した。これより、式 2.M3 は以下のようにかける。

$$\frac{dp(x,t)}{dt} = 8k_{div}xp(2x,t) - k_{div}xp(x,t) - k_{div}\,\bar{x}p(x,t) - k_{div}\,\bar{x}\left\{ p(x,t) + x\frac{dp(x,t)}{dx} \right\}$$

ここで、式 2.M2 は、その平均値が $1/(k_{div}\,t)$であるため、

$$\left[\frac{dp(x,t)}{dt}\right]_{div} = k_{div}\,p(x,t)\left[\frac{1}{k_{div}t} + \frac{K_1(2)}{k_{div}{}^2t^2K_2(2)\,x} - \frac{K_2(2)\,x}{K_1(2)}\right]$$
$$= k_{div}\bar{x}\left[p(x,t) + x\frac{dp(x,t)}{dx}\right] = -\left[\frac{dp(x,t)}{dt}\right]_{growth}$$

であり、式 2.M3 から平衡状態を満たすことがわかる。以上より、分裂における確率密度関数が式 2.M2 で示されるとき、平衡状態における確率密度関数も同じく以下のようにかける。

$$p(x) = \frac{K_2(2)}{2\bar{x}K_1(2)^2}\exp\left[-\frac{K_2(2)}{\bar{x}K_1(2)}x - \frac{\bar{x}K_1(2)}{K_2(2)x}\right] \qquad \text{式 2.M4}$$

ただし、平衡状態においては、平均値$\bar{x} = \mu / k_{div}$である。なお、式 2.M4 は平均値が $1/(k_{div} t)$のとき式 2.M2 になる。この確率密度関数の特徴として、パラメタが平均値$\bar{x}$の 1 つのみであることがあげられる。その逆数 $1/\bar{x}$は、サイズxに比例定数として乗してあるもので、サイズのスケールをあらわすものである。つまり、対数スケールに変換した場合、その分布の形を変えるパラメタは無く、常に同じ形（幅も）であることに注目されたい。

2.3.3.　プラスミドの調整

β-galactosidase 発現用プラスミド pET-bGal の調整を以下に示す。プラスミド pSV-bGal (Promega, Madison, WI)上の lacZ 遺伝子部分を Sense primer（5’-ＴＴＧＧＡＴＣＣＡＴＧＣＣＴＴＣＴＧＡＡＣＡＡＴＧＧＡＡ）と Antisense primer（5’-ＴＡＡＡＴＴＡＡＧＣＴＴＴＴＡＴＴＡＴＴＡＴＴＴＴＴＧＡＣＡＣＣ）を用いて PCR で増幅した。この PCR 増幅断片と、ベクターであるプラスミド pET-21a (Novagen, Madison, WI)をそれぞれ BamHI と HindIII で制限酵素処理した後、TAKARA DNA Ligation Kit (Takara, Shiga, Japan) で pET-21a に lacZ 遺伝子をライゲーションした。これによって大腸菌 DH5α を形質転換し、Qiagen Plasmid Midi Kit を用いてプラスミド DNA（pET-bGal）を精製した。

β-glucuronidase 発現用プラスミド（pET-uidA）の調整を以下に示す。pET-21a を EcoRI と HindIII で制限酵素処理したものと、オリゴ DNA1（5’-ＡＡＴＴＣＧＡＧＧＣＣＣＴＧＡＧＧＧＣＣＡＧＧＡＧＧＣＣＴＣＣＴＧＧＣＣＴＡＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡ）とオリゴ DNA2（5’-ＡＧＣＴＴＧＣＧＧＣＣＧＣＡＴＡＧＧＣＣＡＧＧＡＧＧＣＣＴＣＣＴＧＧＣＣＣＴＣＡＧＧＧＣＣＴＣＧ）をハイブリダイゼーションしたものを、TAKARA DNA Ligation Kit でライゲーションして pET-21a-SfiI を作製した。次に、pCA24N_uidA（ASKA library JW1609、National Institute of Genetics よりいただいた）を *Sfi*I で制限酵素処理した後にアガロースゲル電気泳動を行い、uidA 遺伝子部分を断片回収した。pET-21a-SfiI を *Sfi*I で制限酵素処理したものをベクターとして、この uidA 遺伝子部分とライゲーションした。これによって大腸菌 DH5α を形質転換し、Qiagen Plasmid Midi Kit を用いてプラスミド DNA（pET-uidA）を精製した。

2.3.4.　凍結乾燥リポソームの調整

1-Palmitoyl-2-Oleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (POPC; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) 、 cholesterol (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 、 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-

3-Phosphoethanolamine-N- [Methoxy(Polyethylene glycol)-5000] (DSPE-PEG5000; NOF corporation, Tokyo, Japan)を別々のバイアルにそれぞれ 17.6, 6.0, 6.9mg精密天秤を用いて量り取り、ジエチルエーテル(Wako, Osaka, Japan)とジクロロメタン(Wako, Osaka, Japan)を１：１の量比で混合した有機溶媒をそれぞれに 1.0mLずつ注いで溶解させた。POPC、cholesterol、DSPE-PEG5000 の各溶液を 300μLずつナス型フラスコに加えて混合した後、ロータリーエバポレーターに取り付けて装置内部を減圧し、エバポレーターを回転させながら有機溶媒を除去した。有機溶媒がなくなった後、装置内部をアルゴン置換してナス型フラスコを取り外し、パラフィルムを用いてすぐさま栓をした。パラフィルムに注射針で数箇所穴をあけて真空ポンプにつないだデシケーター内に入れ、ナス型フラスコを 90 分間減圧状態に置き有機溶媒を完全に除去した。作製した脂質薄膜にD.W.を 1mL注いで十分になじませるために室温で 20 分間静置した後、20 秒間のボルテックス、5 秒間の超音波処理を行った。リポソーム液を 0.4μm孔径のポリカーボネイトフィルター（Nuclepore Track-Etch Membrane）に通した後、リポソーム液を 40μLずつ新しいエッペンドルフチューブに分注し、凍結乾燥機〔Labconco Corporation〕で一晩凍結乾燥を行った。アルゴン置換を 3 回繰り返した後、パラフィルムで封をして-20℃で保存した。作製した凍結乾燥膜の脂質組成は、POPC:cholesterol:DSPE-PEG5000 = 58:39:3 である[14]。

2.3.5.　試験管内転写翻訳反応

無細胞翻訳系としてはPURESYSTEM classic II (Post genome, Tokyo, Japan)を使用し[18]、その説明書に従って、終濃度 0.2 nMのプラスミドDNA（pET-bGal及びpET-uidA）、50μM の基質（pET-bGal 及び pET-uidA それぞれに対して、5-(pentafluorobenzoylamino)fluorescein di-β-D-galactopyranoside (PFB-FDG; Invitrogen, Carlsbad, CA) 及び 5-(pentafluorobenzoylamino)fluorescein di-β-D-glucuronide (PFB-FDGlcU; Invitrogen, Carlsbad, CA)）を含む反応液を 1 サンプルあたり 20μL氷上で作製した。これをMx3005P™ QPCR System (Stratagene, San Diego, CA)を用いて 37℃で 6 時間反応し、516 nm（励起 492 nm）の蛍光値を検出した。

2.3.6.　リポソーム内転写翻訳反応

上記の試験管内反応に加え、終濃度 500nM APCを含む反応液を 1 サンプルあたり 20μL氷上で作製した。この反応液 10μLを凍結乾燥中空リポソームに添加して良く混合した。上記のリポソーム液を新しいチューブに 1.5μL移し、28.5μLの希釈液（反応溶液のうち、プラスミドDNA、基質、APCを除き、終濃度 1mg/mL Proteaseを加えた溶液）を添加して混合した後、37℃で反応を開始した。時間経過に伴いサンプリングし、FACSFlowで 10 倍希釈した後、FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA)で測定した。また、6hr反応後のリポソーム（プラスミドとしてpET-uidAを使用、基質としてPFB-FDGlcUを使用）をFACSAriaで分取し、蛍光顕微鏡〔IX70、OLYMPUS〕を使用し

て 100 倍の油浸対物レンズにより明視野〔位相差像〕および蛍光視野の画像データを取得した。ただし、希釈液はリポソーム外部で行われた反応産物がリポソームに吸着して蛍光を与えることを防ぐために用いている[16]。希釈液を用いないと、リポソーム内にプラスミドDNAを封入せず、外液に添加しただけで、リポソームが蛍光を持つことが観測されるが、希釈液を用いることでこれに依存した蛍光を完全に抑えることができる（データ不掲載）。

2.3.7. FACS によるリポソームの体積測定

内部体積の求め方は、過去の研究に従い[14]、蛍光ビーズと蛍光色素の蛍光強度の検量線を引き、比例換算することで行った。具体的にはリポソーム内反応産物5-(pentafluorobenzoylamino)fluorescein (PFBフルオロセイン; Invitrogen, Carlsbad, CA)の緑色蛍光強度は、FACSAriaにより半導体レーザーを用いて 488nmで励起し 530±30nmのバンドパスフィルターで測定した。また同じバンドパスフィルターで、既知分子数の緑色蛍光タンパク質EGFPが付いたビーズであるBD Living colors EGFP calibration beads (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を用いて緑色蛍光強度を測定し、EGFP分子数と緑色蛍光強度の検量線を作成した。さらに反応産物PFBフルオロセインとEGFPの検量線を作成し、PFBフルオロセインと緑色蛍光強度の比例関係式を求めた。リポソーム内反応では、基質が完全分解され、PFBフルオロセインの濃度は加えた濃度 50 μ Mであると仮定し、PFBフルオロセイン蛍光色素分子数と体積の比例関係式から、区画体積を求めた。具体的な換算式はv_p = 0.031 FI(G)であり、FI(G)はFACSAriaからFCS2.0 形式で出力した際の緑色蛍光強度である。

リポソームの内封反応液量指標であるAPCの赤色蛍光強度は、FACSAriaによりHeNeレーザーを用いて 633nmで励起し 660±10nmのバンドパスフィルターで測定した。緑色蛍光強度同様、既知分子数の赤色蛍光タンパク質PEが付いたビーズであるQuantiBRITE PE Quantitation kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を用いて赤色蛍光強度を測定し、さらにAPCとPEの検量線を作成し、APCと赤色蛍光強度の比例関係式を求め、全体積を求めた。具体的な換算式はv_w = 0.12 FI(R)であり、FI(R)はFACSAriaからFCS2.0 形式で出力した際の赤色蛍光強度である。

2.3.8. FACS データの解析

FACSariaからFCS2.0 形式で得られるデータは、緑色および赤色蛍光強度共に、線形データにおいては 1-10000 の値、対数データにおいては 1-1024 の値として得られる（対数データは線形データの底が約 1.009 における対数）。私達は、緑色および赤色蛍光強度共に、その対数データを幅 20 で 52 個の階級にわけ、2 次元ヒストグラムにして解析した。なお、図 2.6Aの最頻値は、v_w（赤色蛍光強度に比例）に対して上記のように階級を区切り、それぞれの階級におけるv_pに対するヒストグラムのv_p > 0.16 fLでの最頻値で

ある。また、同様に図 2.6Bの最頻値は、$v_w > 0.12$ fLにおける最頻値である。

図 2.7B灰色実線に用いたフィッティン式 2.10 の導出を以下に示す。リポソームの分裂において、単位時間当たりの分裂確率がサイズに比例し、分裂後のサイズ分布が一様分布になる場合を考える。まず、全てのリポソームのサイズを合わせると 1 であるとする。この 1 をn回、n+1 個に分割したとき、そのn+1 個のサイズxの確率密度関数$f(x,\mathrm{n})$は$n(1-x)^{n-1}$でしめすことができる[8]。ここで、マクローリン展開の 1 次近似を用いると、

$$f(x,\lambda) = \lambda \exp(-\lambda x)$$

と近似することができる[8]。ただし、λはnを連続化した値である。これは指数関数であり、平均値は $1/\lambda$ である。さらに、式 2.8 にあるように、サイズに比例した項を書けると、P(B|A)は式 2.10 のように書ける。ただし、λ^2は規格化定数である。

2.4. 結果

2.4.1. リポソームの分裂モデルの提唱

リポソームは、強い攪拌や超音波などの物理的衝撃を加えられることでそのサイズが小さくなる。リポソームの分裂モデルには、主に二つのものが知られている。分裂の頻度がサイズに依存するものと、しないものである。融合を考えない場合、それぞれの過程が生み出すサイズ分布はそれぞれWeibull分布[8]、Lognormal分布[9]に近似できることが知られている。ただしWeibull分布に近似できる過程は、あるサイズxのものが 1 回の分裂後にとるサイズの確率密度関数を一様分布としている（0 からxまで同じ確率で分布する）。対数スケールにおける、Weibull分布の特徴は、サイズが小さいほうにテールすること、分布の幅が常に一定であることであり、Lognormal分布の特徴は、左右対称であること、分裂するほど（つまり時間がたつほど）幅が大きくなることである。リポソームのサイズ分布を観察した先行研究はいくつかあるが、その典型的な結果は、対数スケールで正規分布のような形をしており、幅はどれも大きく変わらない[7, 10-14]。つまり、形はLognormal様である一方で、幅はWeibull分布のような特徴を持っており、どちらの分布がより適しているかは未だ議論されている[7]。よって私達は、これら 2 つともの物理素過程を網羅・拡張でき、かつ複雑でないモデルを立てることにした。

私達の分裂モデルを図 2.1 に示す。リポソームは二つに分裂する際、分裂前後で総脂質量を保存、つまり表面積を保存すると考えた。つまり、サイズ x は、リポソームにおいて、表面積としている（これは考察における大腸菌の場合は体積であり、分裂時に何を保存するかによって決まる。よってサイズは分裂時に保存されるものであり、リポソーム以外のものに適応する場合は、その点に注意されたい）。また、分裂は二等分に最も分かれやすく、その分裂の確率密度関数を、元サイズの半分を中心とした正規分布と仮定している。ここで、サイズ x（リポソームでは表面積）に対する、ある時間 t での頻度を $f(x,t)$とすると、その時間変化は以下のように記述できる。

図2.1

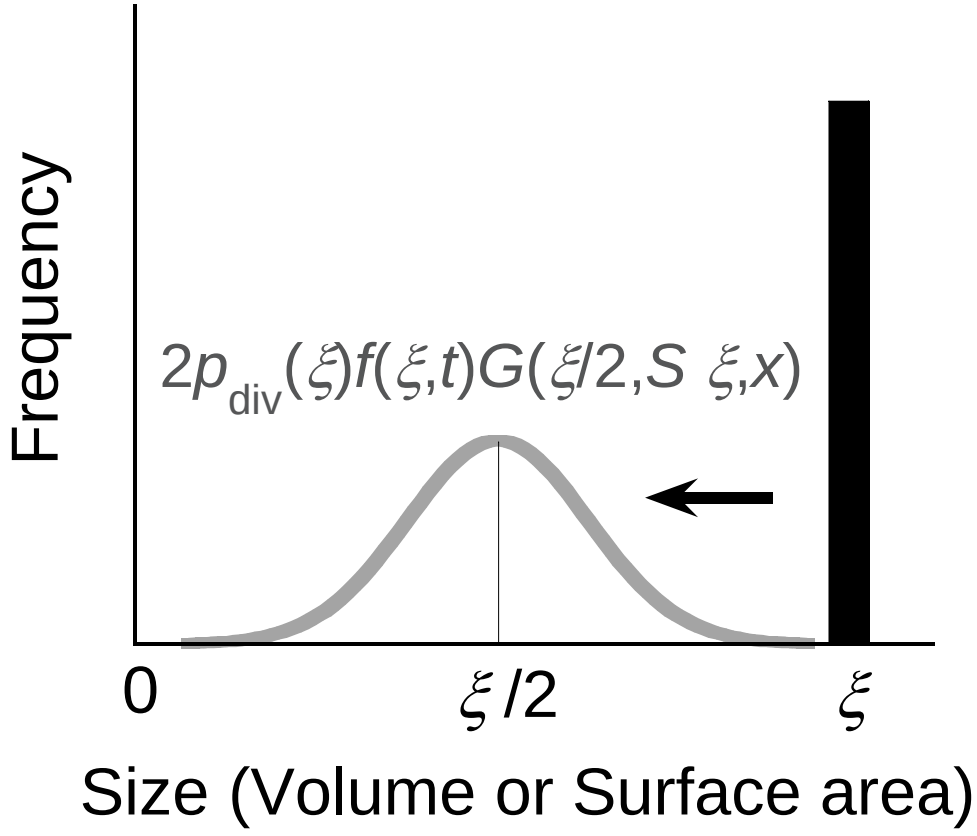


図2.1. リポソームの分裂モデルの概要。あるサイズξをもつリポソームが2つに分裂する際、分裂後のリポソームのサイズxの確率分布は、平均値 $\xi/2$、標準偏差$S\ \xi$の正規分布（$G(\xi/2, S\ \xi, x)$）に従う。また単位時間当たりの分裂確率は、サイズξに依存し、$p_{div}(\xi)$である。

$$\frac{df(x,t)}{dt} = \int_0^\infty 2\,p_{\mathrm{div}}(\xi)\,f(\xi,t)\,G(\frac{\xi}{2}, S\,\xi, x)\,d\xi - p_{\mathrm{div}}(x)\,f(x,t) \qquad \text{式 2.1}$$

ただし、$G(m, s, x)$は平均値m、標準偏差sのxに対する正規分布であり、あるサイズxのリポソームにおける単位時間当たりに分裂する確率を$p_{\mathrm{div}}(x)$、分裂後の正規分布の平均値および標準偏差をそれぞれ$x/2$ および$S\ x$とした。リポソームは分裂して二個になる際、総サイズ(表面積)を保存すると考えると、必ず半分を中心とした対称関数になること、また物理的安定性からあまり小さなリポソームはできにくいことを考えると、妥当であると考えられる。なお、分裂の前後で総サイズxは保存されている、つまり

$$\frac{d}{dt}\int_0^\infty x\,f(x,t)\,dx = 0$$

であることにも注意されたい。私達は、$p_{\mathrm{div}}(x)$がリポソームのサイズの定数乗に比例する場合を考えた。つまり、

$$p_{div}(x) = k_{div}\,x^{n_{div}}$$

であり、k_{div}は分裂の確率（速度）係数、n_{div}は分裂が依存するサイズの乗数である。

以上のような私達のモデルにおいて、分裂に関してSが小さくn_{div}が 0 のときにLognormal分布、Sが大きくn_{div}が 1 のときに指数分布（Weibull分布の特殊な条件）となることが知られている。つまり、私達のモデルは先行研究と相反しているわけではなく、より一般的で先行研究を含んでいる。さらに、先行研究では考慮されていないSが小さくn_{div}が 1 のときなどの分布を調べることができ、実際にこのようなときの分布が実験結果とよく一致する特徴を持つことがわかった（次節参照）。

2.4.2. 計算機シミュレーションによる分裂モデルの検証

私達のモデルがどのようなサイズ分布を形成するか、計算機シミュレーションを用いて調べた。全ての場合において、初期（$t = 0$）にはある一つのサイズから始めた。また、単位時間当たりの分裂および融合の確率はどちらも十分に小さく（<0.1、ポアソン過程）した。モデルのうち、可変定数はk_{div}、n_{div}およびSのみである。このうち、k_{div}はおもにサイズ分布の変化速度およびスケールに寄与し、n_{div}およびSはサイズ分布の形に影響する。図 2.2Aは$n_{\mathrm{div}} = 1$ のときの代表的なサイズ分布の結果を示している。$S = 0.1$ のとき（黒色実線）は$S = \infty$のとき（黒色点線、指数分布（Weibull分布のうちの代表的な分布）になると知られている[8]）と比較して、左右対称に近くLognormalのような形をしていることがわかる。また、これらの分布の幅は時間やサイズのスケールに依存せず、一定であることに注目されたい。このように、Weibull分布を形成すると知られているリポソーム形成過程である“分裂確率はサイズに比例する”に、“比較的 2 等分に分裂する”ということを加味しただけのモデルで、先行研究のサイズ分布の実験結果によくみられる、Lognormal様かつ幅が一定のサイズ分布が形成されることがわかった。

図2.2

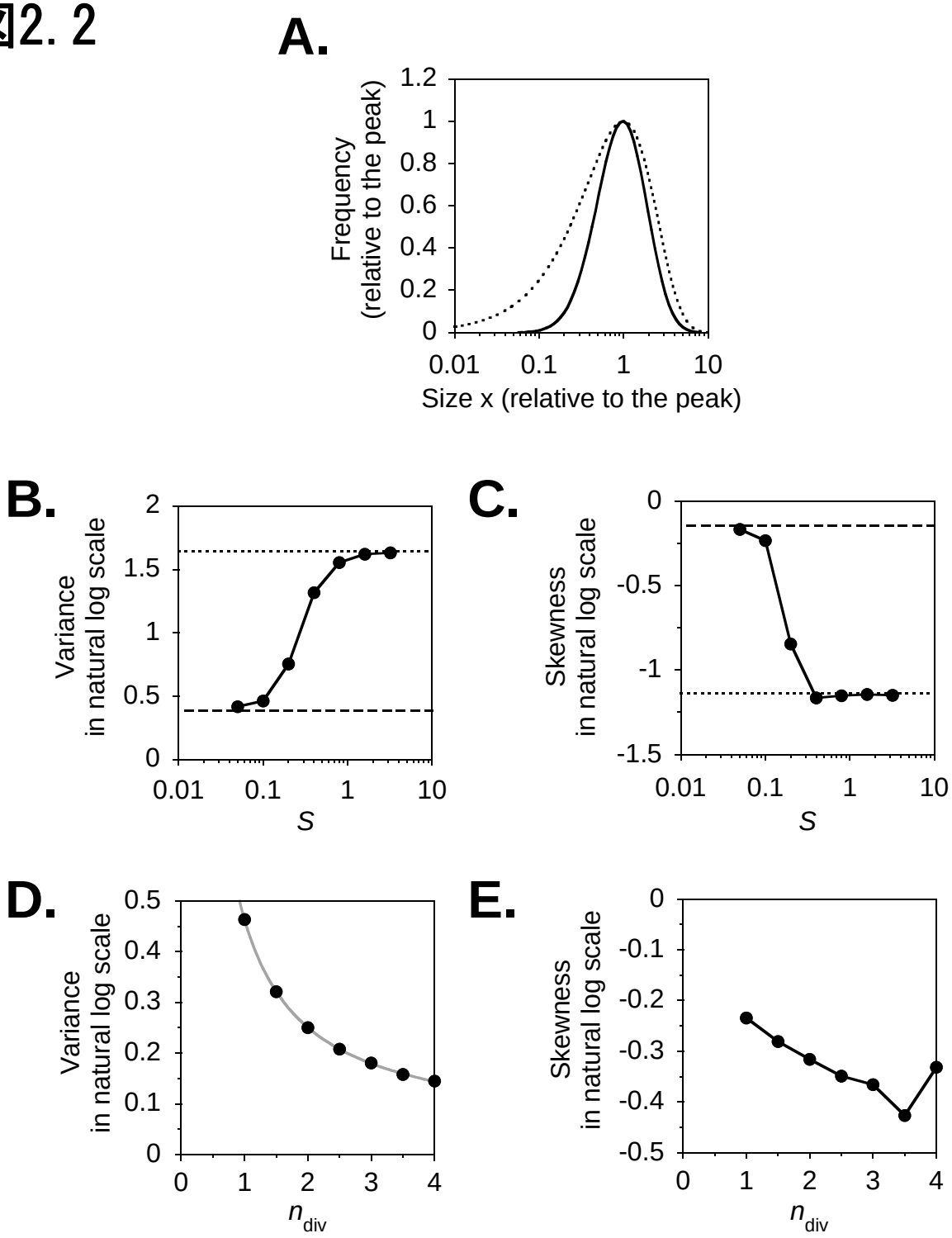


図2.2. リポソーム分裂・融合モデルのシミュレーションの結果。A. サイズ分布。黒色実線、黒色点線はそれぞれ、$S = 0.1$、$n_{div} = 1$において分裂のみで十分に時間がたったときの分布、$n_{div} = 1$で分裂が一様分布である（つまり$S = \infty$）分布である。以下、B-Eにおける●は、分裂のみで十分に時間がたったときの結果。B. 対数スケールでの分散のS依存性。黒色点線、破線はそれぞれ、分裂を一様分布（$S = \infty$）、均等分布（$S = 0$）としたときの結果。C. 対数スケールでの歪度のS依存性。黒色点線、破線はそれぞれ、分裂を一様分布（$S = \infty$）、均等分布（$S = 0$）としたときの結果。 D. $S = 0.1$のときの対数スケールでの分散のn_{div}依存性。灰色実線は反比例によるフィッティング（Variance = 0.43/ n_{div} + 0.038）。 E. $S = 0.1$のときの対数スケールでの歪度のn_{div}依存性。

私達はさらに、分裂の均一性（つまりS）がどのようにサイズ分布の形に寄与するのかを調べた。図 2.2Bおよび 2.2Cはそれぞれ、図 2.2A同様$n_{div} = 1$ のときの、自然対数スケールにおける分散および歪度のS依存性を示している。分散および歪度はそれぞれ、分布の幅および左右非対称性をあらわす統計量である。分散は正規分布のときには分布の幅の 2 乗に比例するものと捉えることができ、歪度は 0、正、負のときにそれぞれ左右対称、右広がり、左広がりの形をとり、その絶対値が大きいほど非対称性が大きいというものである。結果から、分散および歪度はどちらも、Sが大きくなるにつれて指数分布（点線）に漸近し、Sが小さくなるにつれて、指数分布よりも幅が小さく、左右対称に近い$S = 0$ の分布（破線）に漸近している。Sに敏感な範囲は 1 桁程度（$S = 0.1–1$）しか存在せず、それ以外はどちらかの分布とほとんどかわらないことに注目されたい。以上のように、分裂確率がサイズに比例するとき、Sが 0.1 以下であれば、Lognormal様の形で、対数スケールでの分散が一定のサイズ分布になることがわかった（図 2.2A）。

私達は、n_{div}がどのようにサイズ分布に寄与するかを調べた。図 2.2Dおよび 2.2Eはそれぞれ、図 2.2A実線同様$S = 0.1$ のときの、自然対数スケールにおける分散および歪度のn_{div}依存性を示している。ただし$n_{div} < 1$ のときは、分裂が進むにつれて分散は大きくなり、歪度の絶対値は小さくなっていくため、値はプロットしていない。特に$n_{div} = 0$ のときは、対数スケールにおいて、平均値の移動度と分散が比例し、歪度は 0 に近づく。これがEpsteinらの示したLognormalである[9]。結果から、対数スケールにおける分布の幅（分散）はn_{div}が大きくなるほど小さくなり（おおよそ反比例）、左右非対称性（歪度の絶対値）は大きくなることがわかった。注目すべきは、分散および歪度の絶対値はどちらも、指数分布に比べて十分に小さい（図 2.2BおよびC参照）ことである。

2.4.3. *分裂モデルおよび分裂と成長との定常分布の近似解析解*

私たちはさらに、分裂がサイズに比例（$n_{div} = 1$）し、比較的 2 等分（$S < 0.1$）のときには、サイズ分布の確率密度関数$P_{size}(x,t)$が、次の式によってよく近似されることを発見した。

$$P_{size}(x,t) = \frac{k_{div} K_2(2) t}{2 K_1(2)^2} \exp\left[-\frac{k_{div} K_2(2) t\, x}{K_1(2)} - \frac{K_1(2)}{k_{div} K_2(2) t\, x} \right] \qquad \text{式 2.2}$$

ただし、$K_n(\phi)$はn次の第二種変形ベッセル関数。数学解析的証明は無いが、確率密度関数への変形、平均値の時間変化などは、試料と方法に示した。この分布関数の特徴は、対数スケールにおいて、常に形が一定（幅も一定）であることである。なお、この分布関数は全く新しいものである。

定常状態を考えるために、上記分裂に加え、リポソームが成長する場合も考えた。この際、簡単のため、リポソームはサイズx（表面積）が大きいほどよく成長するとした。これは、脂質との相互作用は表面積に比例することを考えると妥当である。この成長の

ダイナミクスにおいて、$P_{size}(x,t)$の時間変化は以下のように記述できる。

$$\frac{dP_{size}(x,t)}{dt} = -\mu\left\{P_{size}(x,t) + x\frac{dP_{size}(x,t)}{dx}\right\}$$

ただし、μはサイズあたりの成長確率（速度）係数である。式の誘導は試料と方法を参照。この成長モデルに従いリポソームが成長する一方で、分裂が式2.2で表されるとき、定常状態での分布も式2.2と同じ形で以下のように表されることがわかった。

$$P_{size}(x) = \frac{k_{div}K_2(2)}{2\mu K_1(2)^2}\exp\left[-\frac{k_{div}K_2(2)x}{\mu K_1(2)} - \frac{\mu K_1(2)}{k_{div}K_2(2)x}\right]$$

なお、この定常状態での分布関数の平均値はμ/k_{div}であり、これらの式の誘導などは試料と方法に示した。以上から、単位時間当たりの分裂確率がサイズに比例し、その分裂が比較的2等分であるとき、初期状態から十分に時間がたった場合、分裂途中において常に対数スケールでのサイズ分布の形が同じこと、さらに単位時間当たりの成長確率がサイズに比例するといった成長を加味した場合にとる定常状態においても、同じく対数スケールのサイズ分布の形が同じになることがわかった。上記モデルが正しいとすれば、初期状態から十分に時間がたっていれば、定常であってもその前であっても、常に対数スケールでの分布の形は1つに決まり、上記の分布関数であらわされるということになる。ただし、数学的証明を欠いているので、この点を補う後続の数学的研究が期待される。なお、これはリポソームだけでなく、大きいほどよく分裂し、その分裂が比較的2等分であるものであれば一般的に応用されることも強調したい。

2.4.4. リポソームの全体積と内部区画体積の同時計測系の概要

私達はこれまで、リポソームの内部体積をFACSで測定する系を構築してきた[14]。これは高濃度（1μM程度）の蛍光タンパク質をリポソーム内に封入して傾向強度を測定することにより、前方散乱光や側方散乱光よりも正確にリポソームの内部体積を計測するというものである。しかしながら、この手法ではリポソーム内に複数の区画が存在していても、これらを個々に測定することはできない。それは蛍光タンパク質が高濃度なため、リポソーム内部全域にほぼ均一な濃度で蛍光タンパク質が封入されるからである。よって、私達がこれまで積み上げてきたリポソーム内生化学反応の技術[16, 17]を用いて、1つのリポソームにおける複数の内部区画のうち、1 つの体積を測定する系を構築した。ここで、物理的に繋がっているものを1つのリポソームと考え、その全体の内部体積をv_w（whole volume）、またある1つのリポソーム内部区画の体積をv_p（partial volume）とする。私達は次に説明する生化学反応を用いて、大量のリポソームについて、個々のリポソームのv_wとv_pを同時に測定できる実験系を考案した。図2.3Aは実験系に使用した生化学反応である。この反応は、再構成無細胞試験管内転写翻訳系PURE SYSTEM[18]を用いている。PURE SYSTEMにある分解酵素をコードしたプラスミドDNAを投入すると、

図2.3

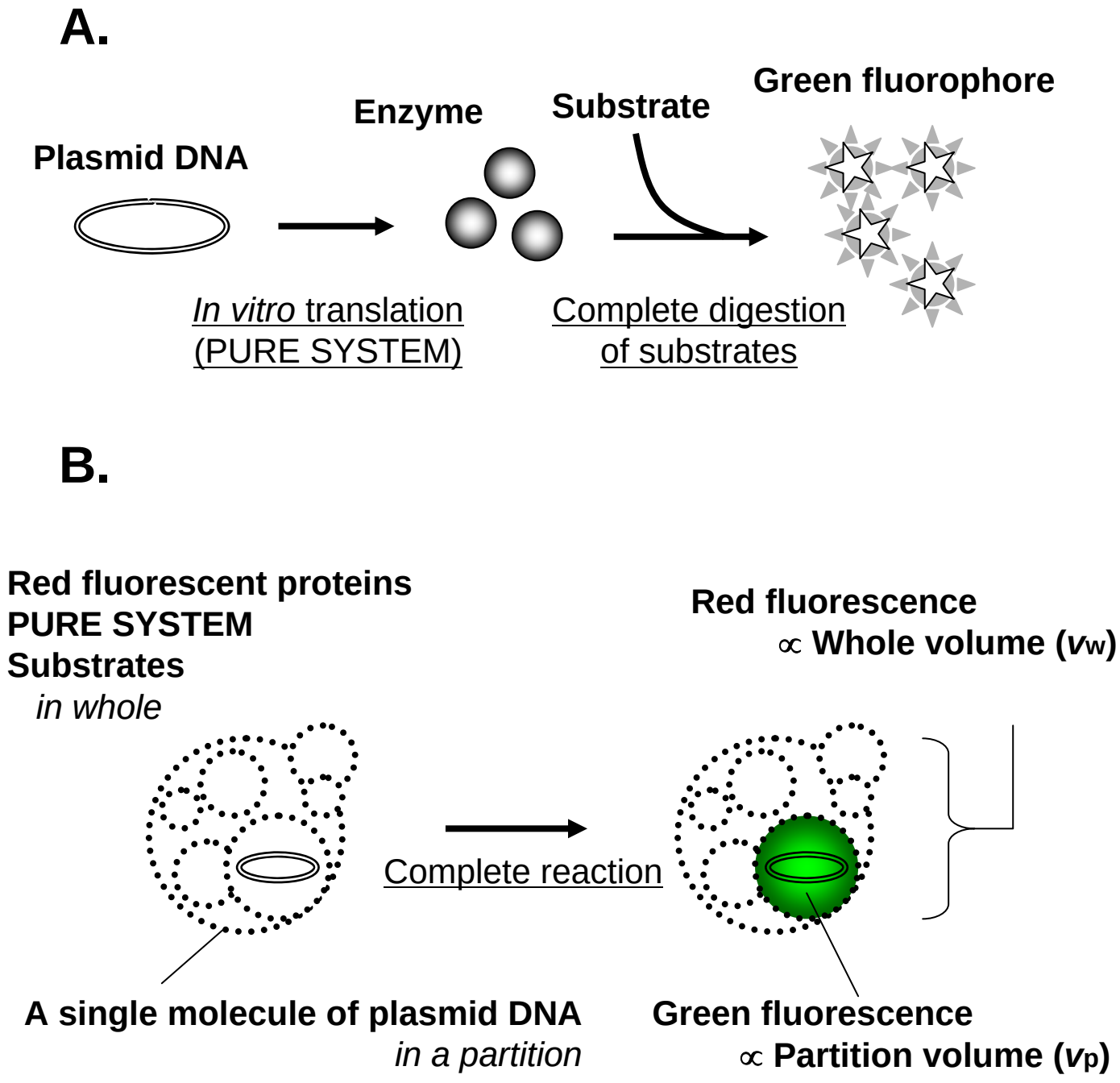


図2.3. 実験系の概要。A. リポソーム内部で行われる生化学反応。プラスミドDNAからPURE SYSTEMにより酵素（具体的にはβグルクロニダーゼもしくはβガラクトシダーゼ）が翻訳され、この酵素が分解すると緑色蛍光色素となる基質を分解することで、緑色蛍光として検出される反応。B. リポソームの全体積v_wおよびそのうちの一つの内部区画体積v_pを同時に測る概要図。低濃度のプラスミドDNAをリポソームに封入することにより、1つのリポソームに1分子プラスミドDNAが封入されるようにする。プラスミドが封入された区画のみでAの反応が行われ、その区画内の全基質が分解されて緑色蛍光色素になる。よって、緑色蛍光強度は区画体積に比例する。一方で、高濃度の赤色蛍光色素を封入することで、リポソームの全体積と赤色蛍光強度が比例する。

分解酵素が翻訳される。さらに、分解されると緑色蛍光産物となるような基質を投入することにより、分解酵素が翻訳されると、緑色蛍光を発する反応系である。この系の特徴は、時間経過に伴い、DNAから複数の分解酵素が翻訳され、その分解酵素はそれぞれが其質を分解するというカスケード反応になっていることであり、1 分子のDNAあたりの蛍光産物合成効率はカスケードでない通常の生化学反応に比べて非常に高い。さらに、私達は分解酵素として、その分解活性が非常に高いβグルクロニダーゼおよびβガラクトシダーゼを使用した。実際にこの反応は、0.2 nMのDNAをもとに、50μMの基質を 3 時間以内に完全に分解することを次の説で示す。以上のような反応を、DNAが 1 つのリポソームに対して平均 1 分子以下しか封入されないような希薄なDNA濃度でリポソームに封入し、十分な時間反応させると、リポソームのうち、DNAが封入された内部区画内の基質だけが完全分解される（図 2.3B）。つまり、DNAが封入された区画内の、反応後の緑色蛍光産物濃度は、反応中の基質の濃度に等しく、一定であるため、緑色蛍光強度からその区画体積v_pを求めることができる（体積∝蛍光強度／蛍光色素濃度）。一方で、反応溶液には十分濃い濃度の赤色蛍光タンパク質が含まれているため、全てのリポソームにほぼ均一な濃度で封入される。よって、赤色傾向強度から、あるリポソーム全体の体積v_wを求めることができる（図 2.3B）。ただし、基質、及びその蛍光産物はともに、脂質膜の透過性が悪く、無視できる程度であることは確かめられている（結果不掲載）。以上のような実験系を用いて、私達はv_w及びv_pの分布を得、これを解析した。

2.4.5. 試験管内における反応の確認

私達はまず、試験管内における図 2.3A の生化学反応を調べた。その結果を図 2.4 に示す。プラスミド DNA は、2 糖分解酵素βグルクロニダーゼもしくはβガラクトシダーゼをコードしているものを用いた（それぞれ●、○）。βグルクロニダーゼおよびβガラクトシダーゼそれぞれの基質として用いた、PFB-FDGlcU および PFB-FDG、の分解産物はどちらも同じで緑色蛍光物質 PFB フルオロセインである。結果から、βグルクロニダーゼおよびβガラクトシダーゼどちらの反応（●および○）も 3 時間以降は蛍光産物 PFB フルオロセイン 50μM（灰色実線）とほぼ等しい蛍光強度に達しており、使用した基質（50μM）が完全分解されていることがわかる。また、基質 PFB-FDG 使用時に、プラスミドがないにもかかわらず（△）蛍光上昇が観察されるのは、PURE SYSTEM 中にβガラクトシダーゼ活性を持つものが混入されているからと考えられる。一方で、PFB-FDGlcU を使用したとき（▲）にはこのようなバックグランドは非常に小さかった。なお、βグルクロニダーゼおよびβガラクトシダーゼの二つの反応（●および○）は 3 時間以降ほぼ完全に停止しているので、これらの最終蛍光強度の差は、それぞれの基質を溶解調整したときの実験誤差であり、反応依存的なものではないと考えられる。以上のように、0.2 nM のプラスミドを基にして、3 時間以内に 50μM の基質を

図2.4

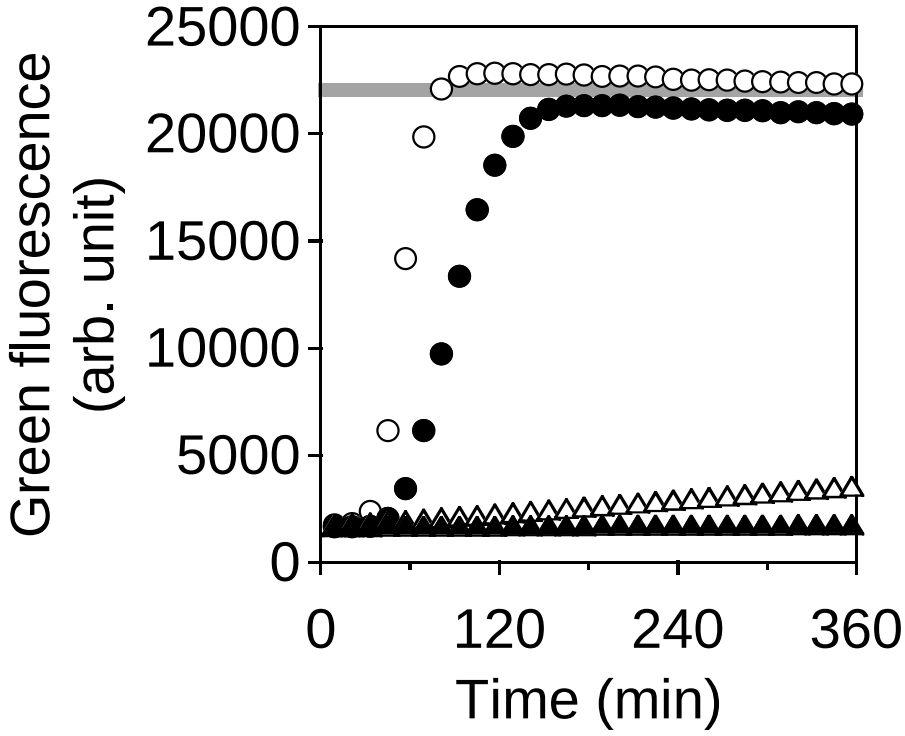


図2.4. 試験管内における図2.3Aの反応の経時変化。●、○はそれぞれ、0.2 nMのβグルクロニダーゼおよびβガラクトシダーゼをコードしたDNAを用い、基質として50μMのPFB-FDGlcUおよびPFB-FDGを用いて37℃で6時間反応した結果。▲、△はそれぞれ、●、○からプラスミドDNAを抜いたもの。

完全分解するような実験系であることがわかった。

2.4.6. FACS を用いた実験系の確認

私達は、図 2.3Bにある生化学反応をリポソーム内で行い、これをFACSによって検出した。図 2.5Aは、0.2 nMのβグルクロニダーゼをコードしたDNAと、50μMのPFB-FDGlcUを用いた反応（図 2.4 の●と同じ）をリポソーム内で 37℃において 6 時間行ったもののFCMの結果である。ただし、試験管内反応同様に、3 時間以降の結果はほとんど変わらなかった（経時変化は補足資料 2.1 を参照）。赤色蛍光強度からv_wを、緑色蛍光強度からv_pを求める（図 2.3B）方法については試料と方法を参照のこと。結果、v_pが小さい、すなわち緑色蛍光強度が小さい集団と、v_pが 0.1 fL程度以上と換算される緑色蛍光強度が大きい集団の 2 つが観察された。緑色蛍光強度が小さい集団は、リポソーム内にDNAが 1 分子も封入されず、図 2.3Aに示した反応が起こっていないリポソームと考えられる。実際に、プラスミドDNAを封入しない反応の結果はこの集団だけが観察される（補足資料 2.2 を参照）。さらに、βガラクトシダーゼをコードしたDNAを用いて同じ実験を行うと、緑色蛍光強度が大きい集団はほとんど同じ結果が得られるが、小さい集団はより緑色蛍光強度が大きいほうへ移動していた（補足資料 2.2 を参照）。これは、試験管内反応において、βグルクロニダーゼの基質PFB-FDGlcUを用いたときよりも、βガラクトシダーゼの基質PFB-FDGを用いたときのほうがバックグランドは高いことと一致している。よって、v_w及びv_pが測定できていると思われるのはv_pが 1 fL程度以上の集団である。この集団を見ると、v_wおよびv_p方向のどちらにもばらついているのがわかる。より詳しく説明すると、同じv_wを持つリポソームでも、そのv_pの値は 1 オーダー程度もばらついている。つまり、全体としては同じ内部体積をもつリポソームでも、その内部区画の体積はばらついており、分布を持つということである。この分布の詳細な解析は次の節以降で行う。なお、灰色実線は$v_w = v_p$を示しており、データ点はこの直線より左上側に存在した。これは、1 つの内部区画体積v_pがそのリポソームの全体積よりも大きくないことを示している。

私達は、図 2.3Bで仮定した、リポソームに 1 分子のみのプラスミドDNAが封入されている、ということが成り立つv_wの領域を確かめた。私達は、凍結乾燥法による物質封入率a_{capsul}が、体積に依存せず一定であることを仮定した。ここでの封入効率の定義は、加えた溶液の物質濃度に対する、リポソーム内に封入された後の物質濃度である。この仮定の下、リポソーム封入前反応溶液中の濃度C_{DNA}のプラスミドDNAが、ある体積v_wをもつリポソーム内に封入されるとき、そのリポソーム内のプラスミドDNA分子数の平均は$a_{capsul}\, C_{DNA}\, v_w$と記述できる。ここで、1 つの分子がある特定のリポソームに封入される確率は非常に小さいため、この封入過程はポアソン過程であると仮定する。このとき、ある体積v_wのリポソームに、1 分子もプラスミドDNAが封入されない確率は$\exp(-a_{capsul}\, C_{DNA}\, v_w)$と表すことができる。これより、ある体積$v_w$をもつリポソーム内で図 2.3Aの反

図2.5

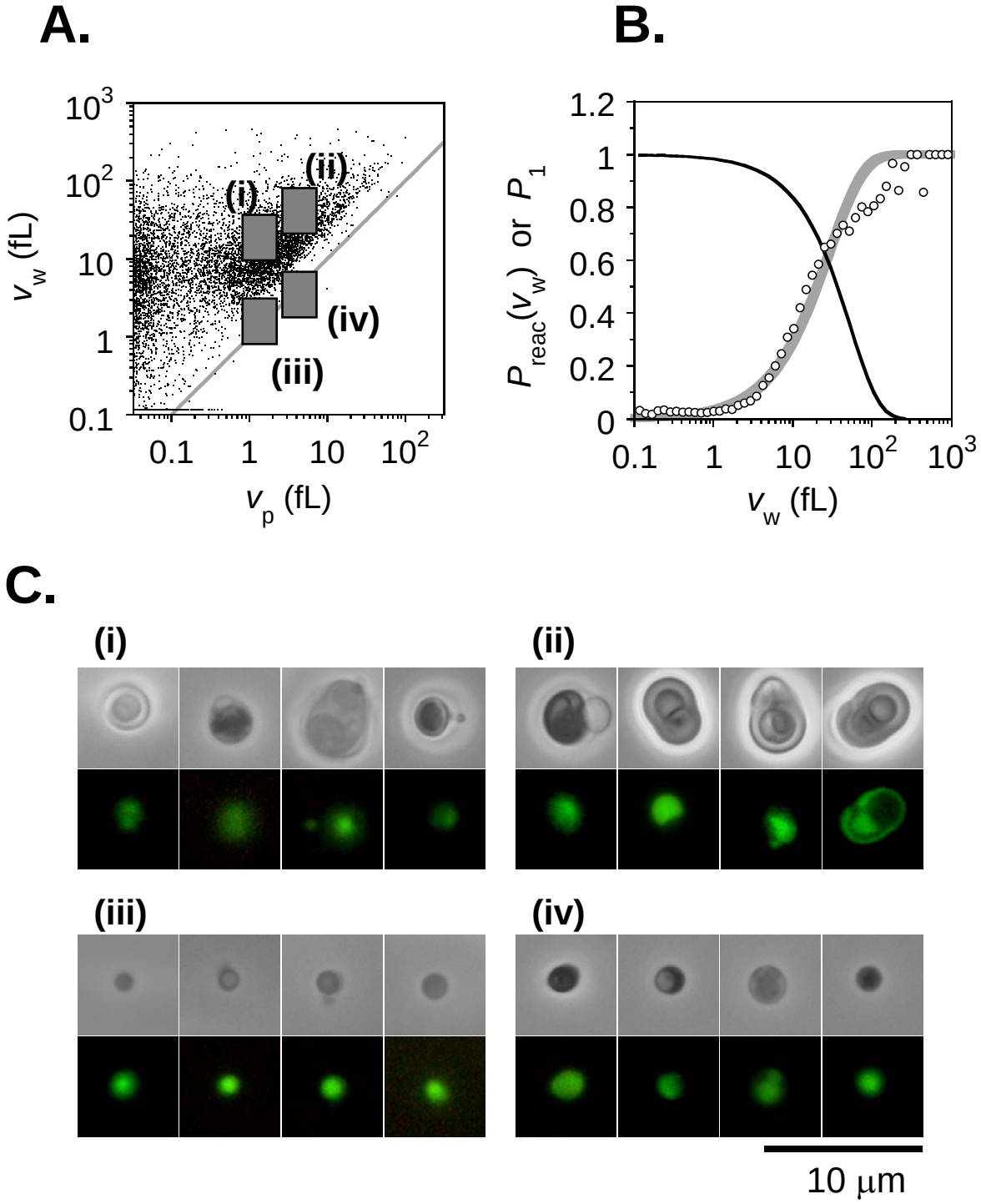


図2.5. リポソーム内反応のFCMの結果と顕微鏡による観察。A.リポソーム内反応のFCMの結果。1つの点が1つのリポソームのデータであり、10万個測定したうちの3万個がプロットされている。B. 反応したリポソームの比のv_w依存性。○は、体積v_wにおけるリポソームのうち、反応したリポソームの確率$P_{reac}(v_w)$。灰色太実線は、○を式2.3にフィットした結果。黒色実線は、そのフィットの結果から推定される、反応したリポソームのうち、プラスミドが1分子しか封入されない確率P_1。C. リポソームの顕微鏡観察結果。(i)-(iv)はそれぞれ、Aの(i)-(iv)の領域をソーティングしたリポソームを観察した結果。上、下段はそれぞれ、明視野、緑色蛍光視野の結果。

応が起こる、すなわちプラスミドが少なくとも 1 分子封入される確率$P_{reac}(v_w)$は、

$$P_{reac}(v_w) = 1- \exp(-a_{capsul}\, C_{DNA}\, v_w) \qquad \text{式 2.3}$$

とかける。図 2.5Bに各v_wのリポソームにおける、$P_{reac}(v_w)$をプロットした（○）。ただし、v_pが 0.06 fL以上に相当する緑色蛍光強度を持つものを反応が起こったリポソームとした。結果、式 2.3 は実験結果と良いフィットを与え（灰色太実線）、封入効率が体積に依存しないという仮定の正当性を示唆している。フィットの結果から$a_{capsul}\, C_{DNA}$ = 0.034/fLを得た。使用したプラスミドDNA濃度C_{DNA} = 0.2 nM（= 0.12 molecule/fL）から、a_{capsul} = 28%が求まった。ここで、反応したリポソームのうち、プラスミドが 1 分子しか封入されない確率（P_1）は、ポアソン分布から以下のように記述できる。

$$P_1 = \frac{\text{Poisson}(1)}{1-\text{Poisson}(0)} = \frac{a_{capsul}\, C_{DNA} v_w \exp(-a_{capsul}\, C_{DNA} v_w)}{1-\exp(-a_{capsul}\, C_{DNA} v_w)}$$

ただしここで、Poisson(k)はポアソン分布において、事象がk回起こる確率である。私達は、式 2.3 へのフィットの結果得た$a_{capsul}\, C_{DNA}$ = 0.034/fLから、P_1を推定した（図 2.5B、黒色実線）。これにより、50 fL程度以下のv_wであれば、半数以上は 1 分子以下しか封入されないということがわかった。図 2.5Aにおいて、100 fLあたりよりも大きいv_wの領域で、データ点数が少ないにもかかわらず比較的灰色実線近くにデータ点が観察されるのは、プラスミドDNAが複数分子封入されているからと考えることができる。一方で、v_wがあまりに小さいと反応リポソーム、つまりv_wとv_pがともに測定できるリポソームの個数が減ってしまうので、次節からの解析にはv_wが 1-100 fL程度のリポソームについてのデータを用いることにした。

リポソーム内に少数分子のプラスミドが封入され、図 2.3Bにあるような実験系が働いているようなので、さらに顕微鏡を用いて確認を行った。前述のように、図 2.5A灰色実線は$v_w = v_p$を示しており、この直線付近のリポソームはほとんど内部区画を持たないものであると予測できる。一方で、この直線よりも大きく左上側のリポソームは、たくさんの内部区画を持つものであると予測される。私達は、セルソータを用いてFCMを行っているので、任意の領域のサンプルを回収することができる。図 2.5Aに示した(i)-(iv)の領域のリポソームを回収し、顕微鏡で観察した結果をそれぞれ図 2.5C(i)-(iv)に示す。明視野の結果を見ると、(i)や(ii)のリポソームが内部区画をたくさん持ち、複雑な形状である一方で、(iii)や(iv)のリポソームは比較的単胞性であることがわかる。また、(iii)や(iv)のリポソームは全体が緑色蛍光を発しているのに対し、(i)や(ii)のリポソームでは一部分が緑色蛍光を発している。さらに、(i)、(ii)、(iii)、(iv)の明視野での直径はそれぞれ 3.5、4.5、1.5、2.0 μm程度（体積 22、48、1.8、4.2 fL程度）で、(i)と(iii)、および(ii)と(iv)のリポソームの緑色蛍光部分はそれぞれ直径が 1.5 および 2.0 μm程度（体積 1.8 および 4.2 fL程度）であった。明視野および緑色蛍光視野の体積はそれぞれ、図 2.5Aに

おけるv_wおよびv_pに対応しているはずであり、精度は低いが実際によく一致していた。以上のように、顕微鏡観察においても私達の実験系（図 2.3B）が有効であることが示された。

2.4.7. リポソームの全体積と内部区画体積の関係

私達は図 2.5Aに示された分布を以下のように簡単に解釈することにした。分布のうち、あるv_w及びv_pの値を持つリポソームとして検出されるためには、次の 2 つの事象AとBをともに満たしていることが必要十分条件であり、図 2.5Aで観察している分布は、AとBをともに満たす確率分布P(A∩B)に総頻度をかけたものであるといえる。A：全体の体積がv_wかつプラスミドDNAを封入している。B：ある区画体積v_pを保持し、かつその中にプラスミドDNAを封入している。これらAとBは、$v_w \geqq v_p$であることからも、独立ではない。ベイズの定理より、AとBがいかなる場合においても、P(A∩B)は以下のように記述できる。

$$P(A \cap B) = P(A)\,P(B|A) \qquad \text{式 2.4}$$

ここで、P(A)は全リポソームのうち、全体積v_wをもち、プラスミドDNAを封入している、つまり反応したリポソームの確率であり、P(B|A)はv_wのリポソームにプラスミドDNAが 1 分子封入されることが決定された後に、それがリポソーム中のv_pの内部区画に封入される確率である。ここで、前述のように封入効率は体積に依存せず、プラスミドDNAが封入される確率はリポソームの内部体積に比例すると仮定する。よって、1 分子のプラスミドDNAが全体積v_wをもつリポソームに封入されるとき、それが体積v_pをもつ、ある特定の内部区画に封入される確率はv_p/v_wである。また、そのリポソーム中にv_pの内部区画が多く存在すれば、その頻度に比例して体積v_pである内部区画のいずれかに封入される確率は高くなる。よって、全体積v_wのリポソーム中でのv_pの確率密度関数を$f_p(v_p,v_w)$とすると規格化定数C_{BA}を用いて

$$P(B \mid A) = C_{BA} \frac{v_p}{v_w} f_p(v_p, v_w) \qquad \text{式 2.5}$$

とかける。つまり、P(B|A)を求めることで、$f_p(v_p,v_w)$を求めることができる。

私達は、反応したリポソームに関して、ある一定のv_wを持つリポソームのv_pの分布（∝P(B|A)）を解析した。この分布は、図 2.5Aを二次元ヒストグラムと考えたときの、横軸に平行な断面のv_pに対する 1 次元ヒストグラムである。この分布の解析結果を図 2.6Aに示した。結果、対数スケールでの分布の最頻値のv_p（MODE-v_p、図 2.6A●、左軸）はv_wに正比例していること（図 2.6Aにおける灰色破線は正比例直線、MODE-v_p = 0.31 v_w）、及び対数スケールでの分布の半値全幅（FWHM、図 2.6A○、右軸）はv_wによらずほぼ一定であること（黒色実線はその平均値 4.5）が観察された。これは、対数スケールの分布において、どのv_wにおいても分布の形は同じであり、そのスケールだけがv_wに比例して異なるということを強く示唆している。つまり、どのv_wに対してもv_p/v_wの分布は同

図2.6

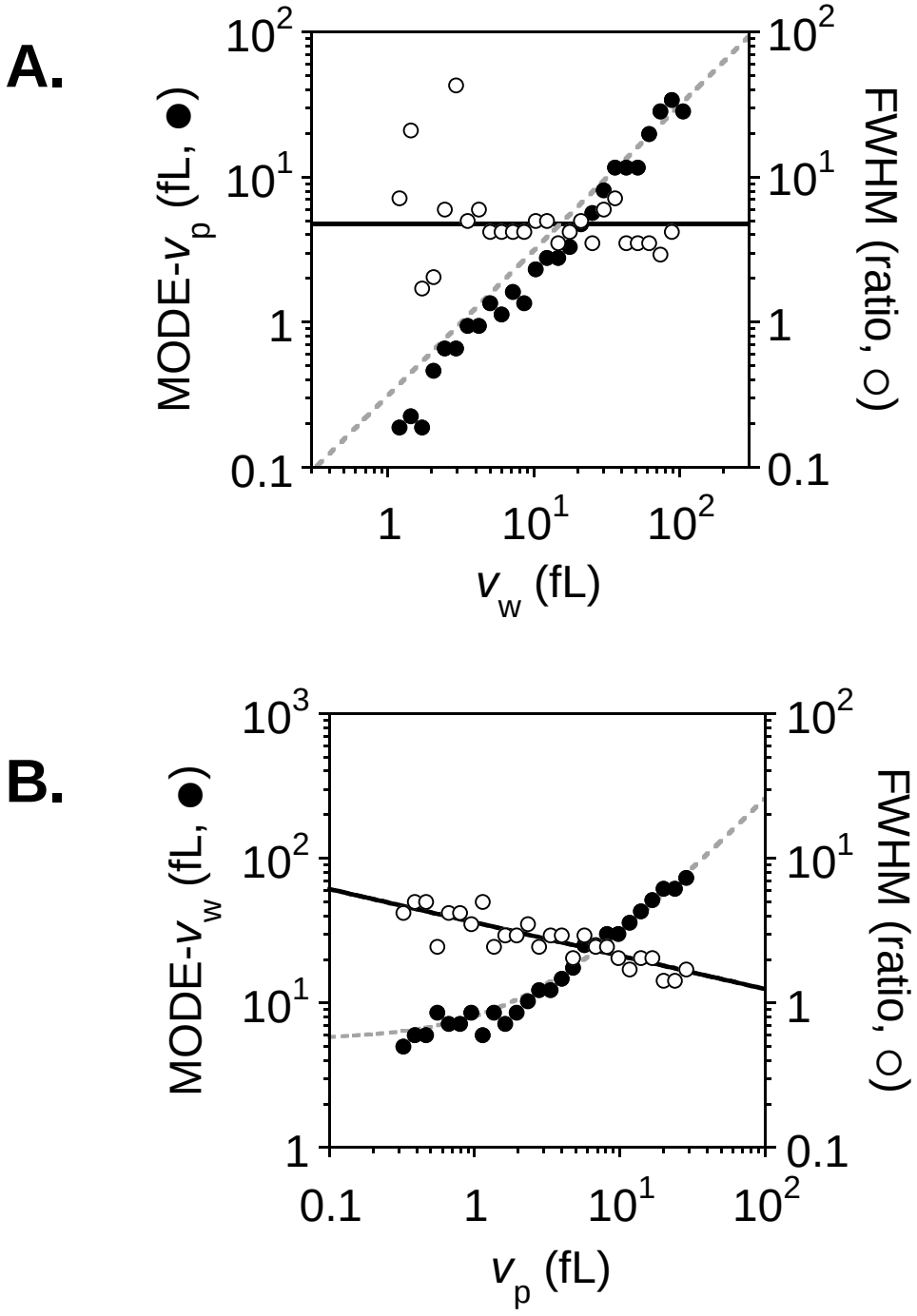


図2.6. FCMの結果の解析。A.一定のv_wにおけるv_pに対するヒストグラムの解析結果。図2.5Aにおいて、ある一定のv_wにおけるv_pに対するヒストグラムの分布の最頻値（MODE (v_p)、●、左軸）および半値全幅（FWHM、○、右軸）のv_w依存性。灰色破線は直線回帰MODE(v_p) = 0.31 v_w ）。黒色実線は○の平均値（= 4.5）。B.一定のv_pにおけるv_wに対するヒストグラムの解析結果。図2.5Aにおいて、ある一定のv_pにおけるv_wに対するヒストグラムの分布の最頻値（MODE (v_w)、●、左軸）および半値全幅（FWHM、○、右軸）のv_w依存性。灰色破線は比例曲線、MODE(v_w) = 2.6 v_p + 5.6）。黒色実線は対数スケールでの比例直線、FWHM = 3.6 $v_p^{0.23}$。ただし、A、B、どちらにおいても最頻値および半値全幅は対数スケールでのヒストグラムに対するものであり、半値全幅は最頻半値をもつv_wのうち、小さいほうに対する大きいほうの比で表記した。

じであるということである。実際に、各一定のv_wにおける、v_p/v_wに対する分布が重なることを後で示す（図 2.7Ｂ）。一方で、ベイズの定理より、

$$P(A \cap B) = P(B)\,P(A|B) \qquad \text{式 2.6}$$

と記述することができ、P(A|B)は図 2.5Aを二次元ヒストグラムと考えたときの、縦軸に平行な断面のＶｗに対する 1 次元ヒストグラムであるが、これに対してP(B|A)と同様の解析を行っても（図 2.6Ｂ）、簡単な理解には至らないことに注意されたい。これに関しては考察に記述する。以上のように、全体積v_wのリポソーム中でのv_pの確率密度関数$f_p(v_p,v_w)$は、v_pとv_wの比v_p/v_wのみで記述できることが示唆された。

2.4.8. 実験結果によるモデルの検証

これまで得られた結果から、式 2.4 に従って考えると、図 2.5Aで得られた分布は次のように考えることができる。まず、式 2.4 から、事象A（全体の体積がv_wかつプラスミドDNAを封入している）は事象Bと独立に考えられる。ここで、v_wに対する事象Aの確率P(A)は、プラスミドDNAを封入しているv_wの確率密度関数と考えることができる。図 2.5Bで求めた$P_{reac}(v_w)$は、ある体積v_wをもつリポソームにおいて、プラスミドDNAを封入している確率であるので、P(A)は、全てのリポソームの全体積v_wに対する確率密度関数を$f_w(v_w)$とすると、

$$\begin{aligned} P(A) &= C_A P_{reac}(v_w) f_w(v_w) \\ &= C_A \left\{1 - \exp(-a_{capsul} C_{DNA} v_w)\right\} f_w(v_w) \end{aligned} \qquad \text{式 2.7}$$

と記述できる（$P_{reac}(v_w)$は式 2.3 参照）。ただしC_Aは規格化定数である。ここで、この確率がv_pには依存せずに考えてよいことに注目されたい。さらに、式 2.5 および、全体積v_wのリポソーム中でのv_pの確率密度関数$f_p(v_p,v_w)$が、v_pとv_wの比のみで記述でき、$f_p(v_p/v_w)$と書けること（図 2.6A）から、

$$P(B \mid A) = C_{BA} \frac{v_p}{v_w} f_p\left(\frac{v_p}{v_w}\right) \qquad \text{式 2.8}$$

と記述できる。以上および式 2.4 から、図 2.5Aの分布を 2 次元確率密度関数として扱ったP(A∩B)と、$f_w(v_w)$及び$f_p(v_p/v_w)$の関係は

$$P(\mathrm{A} \cap \mathrm{B}) = C_A C_{BA} \left\{1 - \exp(-a_{capsul} C_{DNA} v_w)\right\} f_w(v_w) \frac{v_p}{v_w} f_p\left(\frac{v_p}{v_w}\right) \qquad \text{式 2.9}$$

である。

私達は、全体積v_wの確率密度関数$f_w(v_w)$が、提唱したモデルをもちいて説明できるかを確かめた。私たちの提唱したモデルでは、先述のように、サイズは表面積に比例するものと考えている。よって、単位時間当たりのリポソームの分裂確率が表面積に比例し、その分裂が比較的 2 等分であるとすると、単位表面積xの分布は式 2.M4 で記述される。実際に、$f_w(v_w)$に総頻度（10 万個）をかけた頻度分布である、全リポソームのv_wの分布（図 2.7A、●）は、式 2.M4 において$x = v_w^{2/3}$とすると、よくフィットした（図 2.7A、

図2.7

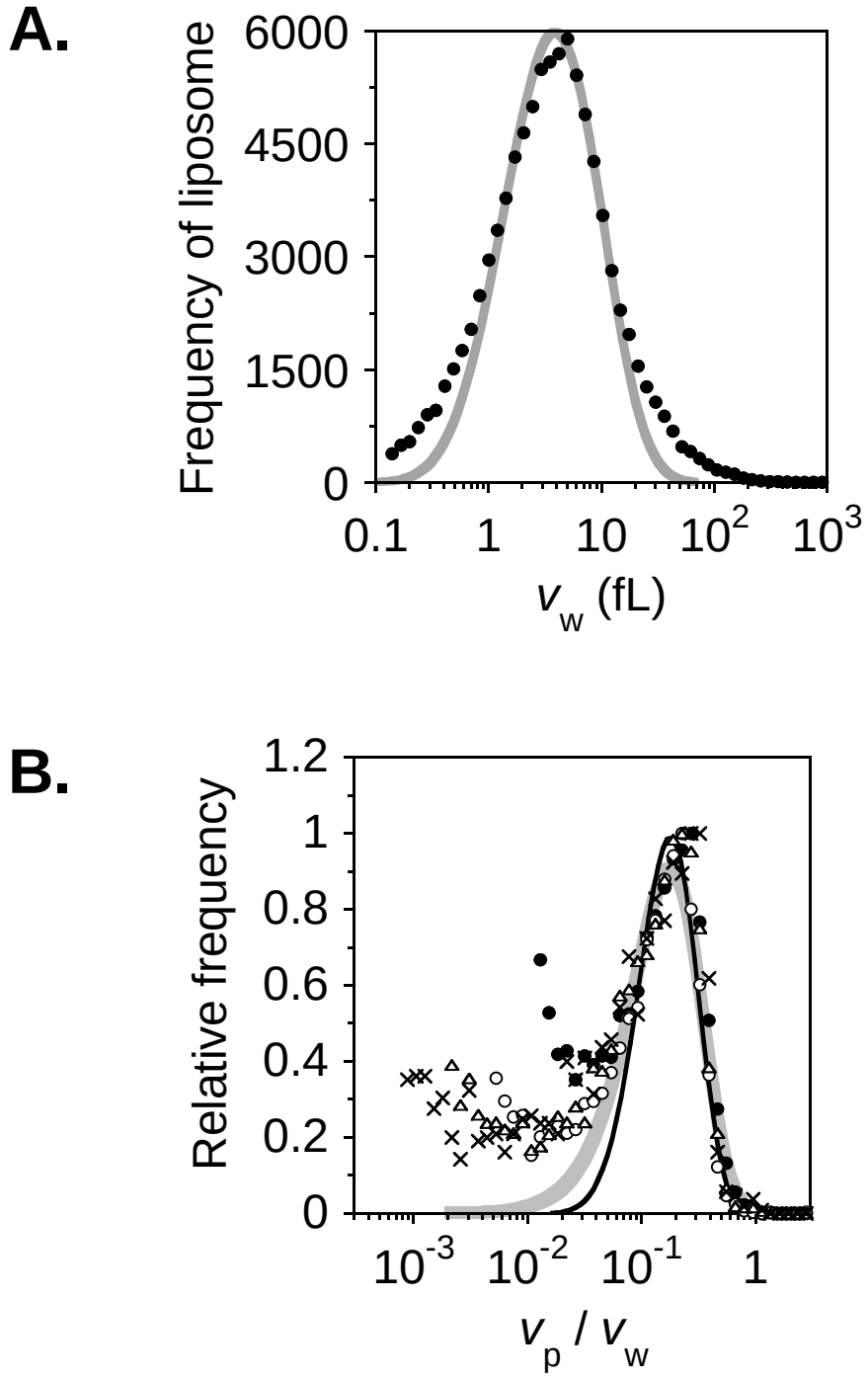


図2.7. モデルを考慮したサイズ分布の解析。A.全リポソームの全体積分布。灰色実線は、式2.M4（ただし、$x = v_w^{2/3}$とした）へのフィッティング。 B. v_p/v_w分布。 ●、○、△、×はそれぞれv_w = 4, 10, 25, 62 fLにおけるv_p/v_wの分布。黒色実線、灰色太実線はそれぞれ、式2.M4、式2.10に○をフィットした結果。

灰色実線、フィットの結果は$\bar{x} = \bar{vw}^{2/3} = 2.8$ (fL$^{2/3}$))。ここで注目すべきは、Lognormalとは異なり、その分布の幅は可変ではなく固定であるにもかかわらず、この程度一致したということである。以上のように、リポソームの全体積v_wの確率密度関数$f_w(v_w)$が、式 2.M4 にある確率密度関数でよく説明できたことから、リポソームの分裂は比較的 2 等分であり、その分裂の頻度は表面積に比例するということが示唆された。また、これが作成法によらずに適応でき得ることを考察に記した。

次に、v_w中の内部区画v_pの分布関数$f_p(v_p/v_w)$ が、提唱したモデルをもちいて説明できるかを確かめた。あるv_wのリポソーム内部に存在する複数の区画が、私達のモデルに従って分裂及び成長を行っていると仮定する。このとき、分裂や融合の前後で総体積量の変化はなく、v_wであると考えることができる。つまり、私達のモデル（図 2.1）におけるサイズxは体積であると考えられる。v_wの分布関数のときと同様に、分裂の頻度は体積に比例し、比較的 2 等分と仮定すると、v_wのリポソームにおける内部区画の体積v_pの分布$f_p(v_p/v_w)$は式 2.M4 になると考えられる。よって、式 2.8 よりP(A|B)の分布関数は、式 2.M4 にv_p/v_wをかけたものであると予想される。私達は、P(A|B)がv_p/v_wにのみ依存するという結果（図 2.6A）のもと、各一定のv_wにおけるv_p/v_wの分布をP(A|B)として求めた。図 2.7Bは、異なる 4 種のv_wにおけるv_p/v_wの分布を示している。ただし、頻度はその最頻値（MODE-v_p）に対する比としてあらわしてある。v_p/v_wが小さくなると再び頻度が上昇しているのが観察されるが、これは前述のとおりバックグラウンドであると考えられる。バックグラウンドを除いて考えると、どのv_wにおいても分布はほぼ一致した。ここからまず、前述のように$f_p(v_p,v_w)$がv_pとv_wの比のみで記述でき、$f_p(v_p/v_w)$とかけることが確認された。また、図 2.7Bの黒色実線は、式 2.M4 を$f_p(v_p/v_w)$とし、式 2.8 に従いv_p/v_wをかけたものにフィットしたものであり、実験結果とよく一致している（フィットの結果は$\bar{x}$ = 0.13）。このように、v_p/v_wのみに依存して内部区画の体積分布が決まることが確認され、また私達のモデルから予想される内部区画分布が実験結果とよく一致することもわかった。このことから、内部区画も体積に比例（もしくはそれに近い依存）して分裂することが示唆された。ただし、以下に記すように、比較的等分に分裂することは示唆していない。

2.4.9. 内部区画の定量的指標の提唱と凍結乾燥法での値

私達は、リポソームの内部区画性を定量的に評価するために、その指標を以下のように求めた。私達のモデル由来の分布（式 2.M4）を$f_p(v_p/v_w)$とし、式 2.8 に従いv_p/v_wをかけたもの（図 2.7B、黒色実線）は、指数分布関数にv_p/v_wをかけた関数とほとんど変わらない（図 2.7B、灰色実線、式 2.10）。それは、v_p/v_wをかける前における私達のモデル由来の分布と指数分布（それぞれ、図 2.2Aの黒色実線と黒色点線）との違いは、主にサ

イズ（ここではv_p/v_w）が小さいところのみであり、v_p/v_wをかけると、この領域の確率（または頻度）は非常に小さくなるからである。これら二つにおけるリポソーム形成過程の共通点は、分裂の頻度が体積に比例するということであり、相違点は、分裂が比較的 2 等分か、ランダム（一様）かである。よって、私達のモデル由来の分布が$f_p(v_p/v_w)$をよく説明できることは、内部区画が体積に比例して分裂することを示唆しているが、比較的等分に分裂することは示唆していない。

私たちは以下のように、指数分布関数を用いて内部区画の定量的指標を求めた。式 2.8 において、$f_p(v_p/v_w)$が指数関数である[8]とすると、以下のように記述できる。

$$P(B \mid A) = \lambda^2 \frac{v_p}{v_w} \exp\left(-\lambda \frac{v_p}{v_w}\right) \qquad \text{式 2.10}$$

ただし、λは指数分布$f_p(v_p/v_w)$における平均値の逆数であり、1 つのリポソームにおける平均区画数に相当する。図 2.7Bにおいて、実験データ（○のv_p/v_w = 0.05-1 のデータ）を式 2.10（正確には頻度に定数をかけたもの）にフィットした結果を灰色実線で示した。黒色実線とほとんど変わらず、結果をよく説明できることがわかる。また、フィット結果からλ = 11 を得た。1/λは指数分布関数の平均値であるため、私達が用いた凍結乾燥法では 1 つのリポソームは平均 11 個に区画化されていることを示している。このλの値は、リポソームの調整法によって異なるものであると考えられる。ここで、v_p/v_wのみに依存して内部区画の体積分布が決まる、つまり内部区画構造は全体の体積v_wに依存せず同じであることから、リポソームの内部区画構造はλのみで記述できることに注目されたい（式 2.10）。また、私達の実験系と式 2.10 を用いてλは簡単に求めることができるため、各調整法によって作成したリポソームの、内部区画性の定量的な指標となることが期待される。なお、式 2.M4 でも全く同じことができるが、先述のように式 2.M4 には数学解析的証明が足りないことに加え、一般的な内部区画測定法という意味で、よく使われる指数関数を用いた。

2.5. 考察

2.5.1. 第 2 章の結論

私達は、リポソームの分裂および融合のダイナミクス、ならびにその内部区画化の影響を理解するために、リポソームのサイズ分布を測定し、解析した。提唱した理論モデルにより、分裂速度がサイズに比例して、かつその分裂が比較的 2 等分であるときに過去の研究で見られるリポソームのサイズ分布の特徴をみたすサイズ分布になることを発見した。また、1 つのリポソームの全体積と内部区画体積を同時に、大量のリポソームに対して測定できる実験系を提案し、この実験系が有効であることを示し、さらに顕微鏡観察を用いて正当化した。私達はこの系を用いて、リポソームの内部区画構造は全

体積に依存せず、そのスケールのみが全体積に比例することを示した。なお、この実験結果から得られるリポソームの全体積の分布、および内部区画体積分布も分裂がサイズに比例すると仮定するとよく説明できることを示した。さらに、私達は内部区画性を定量的に一つのパラメタで評価できることを示した。私達が発見した、分裂速度がサイズに比例して、かつその分裂が比較的 2 等分であるときのサイズ分布は、リポソームのサイズ分布だけでなく、原核細胞のサイズ分布にも適用できる可能性がある。私達の研究結果は、リポソームの形成過程に重要な知見を与えただけでなく、リポソームの内部区画構造に対する一つの指標の測定系を提唱したといえる。

2.5.2. 細菌のサイズ分布

原核細胞は成長、分裂を繰り返す[19]。その成長にはばらつきがなくても、分裂する際に、その分裂確率が常に一定で、確率的ゆらぎがあるとすると、分裂ごとに細胞サイズのばらつきは次第に大きくなっていくはずである[9]。しかしながら、原核細胞についてそのような現象は観察されない。原核細胞はおそらくその細胞サイズを制御しているので、その意味でサイズがそろっていることは当然のように考えられる。しかしながら、サイズがそろっているのは制御があるからとは限らない。細胞は分裂するものなので、私達のモデルを適用することができる。私達のモデルにおいては、分裂速度がサイズに依存せず一定であるときは、分裂を繰り返すごとに対数スケールの分布の幅は大きくなる。しかし、分裂速度がサイズに比例するときには、その幅は一定である。これは定常分布にも当てはまる。ここで、大腸菌の生活環について考えると、大腸菌は栄養を取り込むことによって大きくなり、分裂する。よって、小さい細胞よりも大きい細胞のほうが単位時間当たりに分裂する確率は高いと考えられる。このとき、私達の結果から、サイズ分布の幅は一定であり、分裂回数を重ねても大きくはならない。つまり、サイズはそろっていて当然ということになる。実際に、私たちのモデルは実測した大腸菌のサイズ分布をよく説明することができる（補足資料 2.3）。特別な制御がなくても、大きいほど分裂しやすいというだけでサイズはそろうものなのである。もしかしたら大腸菌および他の原核生物において、サイズをそろえるための特別な制御など存在しないのかもしれない。

2.5.3. 対数スケールでの解析

私達は本研究において、一貫して対数スケールでのサイズ分布を扱ってきた。この理由は主に 2 つある。リポソームのサイズ分布は、線形スケールにおいて、大きいほうに長く尾を引く。つまり、平均値から大きい方に外れたサイズのものも、正規分布などと比べて比較的多く存在する。このようなものの実験データを扱うとき、線形スケールで階級を区切ると、平均値から大きい方に外れたサイズをもつリポソームは、全体的にたくさん存在するにもかかわらず、階級あたりの個数が少ないため、解析時には無視され

る。さらに、私達は一般的な知見を得たかったので、スケールによらない解析をしたというのも理由のうちの一つである。以上のように、リポソームのサイズ分布が大きい方に長く尾を引いていること、スケールによらない解析を目的としたことの二つの理由から、私達は対数スケールでのサイズ分布を解析した。

2.5.4. 分裂および融合におけるリポソームの総表面積量保存について

私達は、リポソームにおける全体の体積の分布を導く際、分裂及び融合の前後で、総脂質量が保存されることから、総面積が保存されると仮定した。その後、体積は面積の3/2 乗に比例するとして、体積分布を導いた。しかし、内部区画構造が全体の体積に依存して異なる場合、脂質量が面積に比例するという仮定はできない。しかしながら、実験結果から、内部区画構造は全体の体積に依存せず、そのスケールのみが全体の体積に比例することがわかったので、脂質量と面積は常に比例の関係にあると考えることができる。よって、分裂及び融合の前後で、総面積が保存されると仮定することは妥当であると考えられる。

2.5.5. モデルの一般性

私達が実験に用いたリポソームは凍結乾燥法を用いて作成したものである[20]。リポソームは、作成法によってサイズのスケールやサイズ分布の形も異なると考えられる。厳密には、作成法によってリポソーム分裂・融合のダイナミクスは異なるので、サイズの分布は作成法に依存すると考えられる。それでもやはり、以下のような理由で大きくは変わらないと考えている。リポソームは、その安定性から考えて、大きいものほど分裂しやすいと考えることができる。その依存性は作成法などによって異なるかもしれないが、私達の結果から、サイズの 1 乗以上に比例すれば、対数スケールでの幅はほとんど変わらない。さらに、膜の曲率による安定性を考えると、リポソームが二つに分裂する際に、あまりに小さいものはできないと考えることはおかしいことではない。私達のモデルでは、これらを満たすとき、そのサイズ分布は幅がモデル定数に対して鈍感であり、形がLognormal様である分布になる。よって、サイズ分布はさほど変わらないであろうと考えられる。ただし、リポソームがその脂質分子のサイズが影響する程度に小さい場合は、最小値が存在することにより分布の幅が小さくなることは考えられる。また、よく採用される超音波による分裂の誘導を行った場合、リポソームは分裂前とほとんど変わらないものと、非常に小さいリポソームに分裂することが知られている。このような時は、分布が 2 山になり、私達のモデルは適用できない。以上のように、特殊な場合を除いて、リポソームのサイズ分布は作成法にあまりよらず、私達のモデルから導かれる分布とよく似たものであることが予想される。さらに、大きいほどその安定性が下がると思われるエマルジョンや、先述のように成長するほど分裂確率が上がると思われる原核細胞などに関しても、同じことが言えると考えられる。

2.5.6.　モデルから導かれるサイズ分布の形成原理

私達のモデルが導くサイズ分布の幅があまり変わらずに一定であることの理由について噛み砕いて議論する。モデルにおける、サイズ分布のばらつきは、それぞれのリポソームが単位時間当たりに分裂などを行う過程を確率過程としていることに由来する。具体例を示して以下に説明する。サイズ 1 のリポソームが 100 個存在したときに、次の瞬間にはそのうちの 10 個が分裂したとする（分裂確率 0.1）。このとき、たとえ分裂が正確に 2 等分であったとしても、次の瞬間には 1 のサイズは 90 個、0.5 のサイズは 20 個（10 個×2）と、ばらついている。このばらつきが私達のモデルにおけるサイズのばらつきの由来である。逆に、単位時間内に、全てのリポソームが分裂すると、次の瞬間は全てのサイズが 0.5 にそろい、この試行を何回繰り返してもばらつきは生じない。このような確率的ばらつきは、本研究のように、分裂などの事象がおこる・おこらないの 2 項であらわされるとき、その確率に依存し、確率が 1 のときにばらつきはなく、確率が 1 よりも十分小さいとき（<0.1 程度）にばらつきは最大である。この確率が十分低い過程をポアソン過程といい、リポソームの分裂だけでなく、系全体に対して平均的な作業（リポソーム作成時の場合攪拌など）を行う場合には事象がそろうとは考えにくいため、一般的にポアソン過程を適用することが妥当である。以上のように、私達のモデルの結果得られるサイズ分布のばらつきは、確率的ばらつきにおける最大値で一定であるということである。

2.5.7.　サイズが均一なリポソーム調整法

上記のように、サイズ分布が作成法にあまりよらないことから、サイズがそろったリポソームを作る条件について推測できる。私達のモデルでは、リポソーム作成時において、そのリポソームが存在する系全体に対して平均的な作業を行うと、それぞれのリポソームの分裂は確率的なばらつきを持つことになり、サイズ分布はあまりかわらず決まった分布になる。つまり、サイズをそろえるためには、個々のリポソームに対して作成を行えばよい。実際に、エマルジョン作成において、油層中で、非常にサイズの均一な細孔に、一度だけ水層を通すと、サイズが均一なエマルジョンができるという報告がある[21]。これは、全てのエマルジョンが、それぞれ一度だけ細孔を通るという分裂過程を経た結果であり、単位時間当たりにある確率で分裂過程を経てその確率的ばらつきを被ることと対照的であることに注目されたい。なお、先述のように、リポソームなどがその構成分子のサイズが影響する程度に小さい場合は、最小値が存在することにより、その最小値付近で分布の幅が小さくなることは考えられる。ただしこの場合は、サイズを調整することができないに注意されたい。以上のように、リポソームのサイズを均一化するためには、個々のリポソームに対して操作をする必要がある。逆に、個々のリポソームに対して操作をしない場合は、どのような作成法であってもサイズを均一化するこ

とは困難であると予想される。

2.5.8.　全体積と内部区画体積の関係

私達は、リポソームの内部区画構造は全体積に依存せず、そのスケールのみが全体積に比例することを示した。このことは、内部区画構造に依存して全体積が決まるというよりはむしろ、全体積に依存して内部区画体積が決まるということを示唆していると考以下のようにえられる。式 2.4 に基づいて解析すると、P(A)は内部区画とは独立に説明でき（図 2.7A）、P(A|B)はスケールのみが全体積に依存していた（図 2.6A）。つまり、全体の体積は内部区画とは独立に決まり、その全体の体積から内部区画の体積分布は容易に求めることができる。一方で、式 2.6 に基づいて解析すると、P(A|B)はv_pの体積を持つある内部区画にプラスミドDNAが封入されたときに、そのリポソームの全体の体積がv_wである確率と考えることができるが、この実験結果は比例や定数などで簡単に表すことができない（図 2.6B）。つまり、内部区画の体積からは、全体の体積分布を容易に予想することはできない。以上のことから、全体の体積は内部区画とは独立に決まり、全体積に依存して内部区画体積が決まると考えることができる。

2.5.9.　内部区画の定量的指標の測定

リポソームの内部区画構造は全体積に依存せず、そのスケールのみが全体積に比例することを示したことは、私達が本研究の中で提唱した内部区画性のパラメタλを、例えば顕微鏡など、私達の実験系以外で簡単に測定することを可能にしたといえる。もし、リポソームの内部区画構造が全体積に依存していたのならば、λを求めるために、様々な全体積をもつものを観察する必要があっただろう。これは、顕微鏡観察などの場合、多大な労力を要する。しかしながら、区画体積と全体積の比のみでその内部構造が決まることがわかっているので、任意の全体積をもつリポソームに対して、その区画体積と全体積の比を求めればよい。さらに、内部区画構造の分布が指数分布であることが示されたので、絶対的な体積を求める必要がなく、観察したリポソームが平均何個程度に区画されているかを調べるだけで、内部区画構造の分布を予想できるようになったといえる。ただし、内部区画構造の相似性が凍結乾燥胞以外の作成法でも成り立つかどうかは、さらなる実験的検証が必要である。

2.5.10.　まとめと展望

以上のように、私達はリポソームの形成過程のモデルを用いて、リポソームの分裂速度がサイズに比例して、かつその分裂が比較的 2 等分であるということを示唆した。さらに、大量のリポソームに対して、それぞれのリポソームの全体積と内部区画体積を同時に測定できる実験系を構築し、リポソームの内部区画構造は全体積に依存せず、そのスケールのみが全体積に比例することを示した。さらに、私達は内部の複雑性を評価で

きるパラメタを提唱した。私達が発見した、分裂速度がサイズに比例して、かつその分裂が比較的 2 等分であるときのサイズ分布は、リポソームのサイズ分布だけでなく、原核細胞のサイズ分布にも適用できる可能性がある。さらに、私達が提唱したパラメタは、様々な作成法によるリポソームを簡単に評価できるので、私達の研究結果は、リポソームの形成過程に重要な知見を与えただけでなく、リポソームの構造に対する一つの指標の測定系を提唱したといえる。

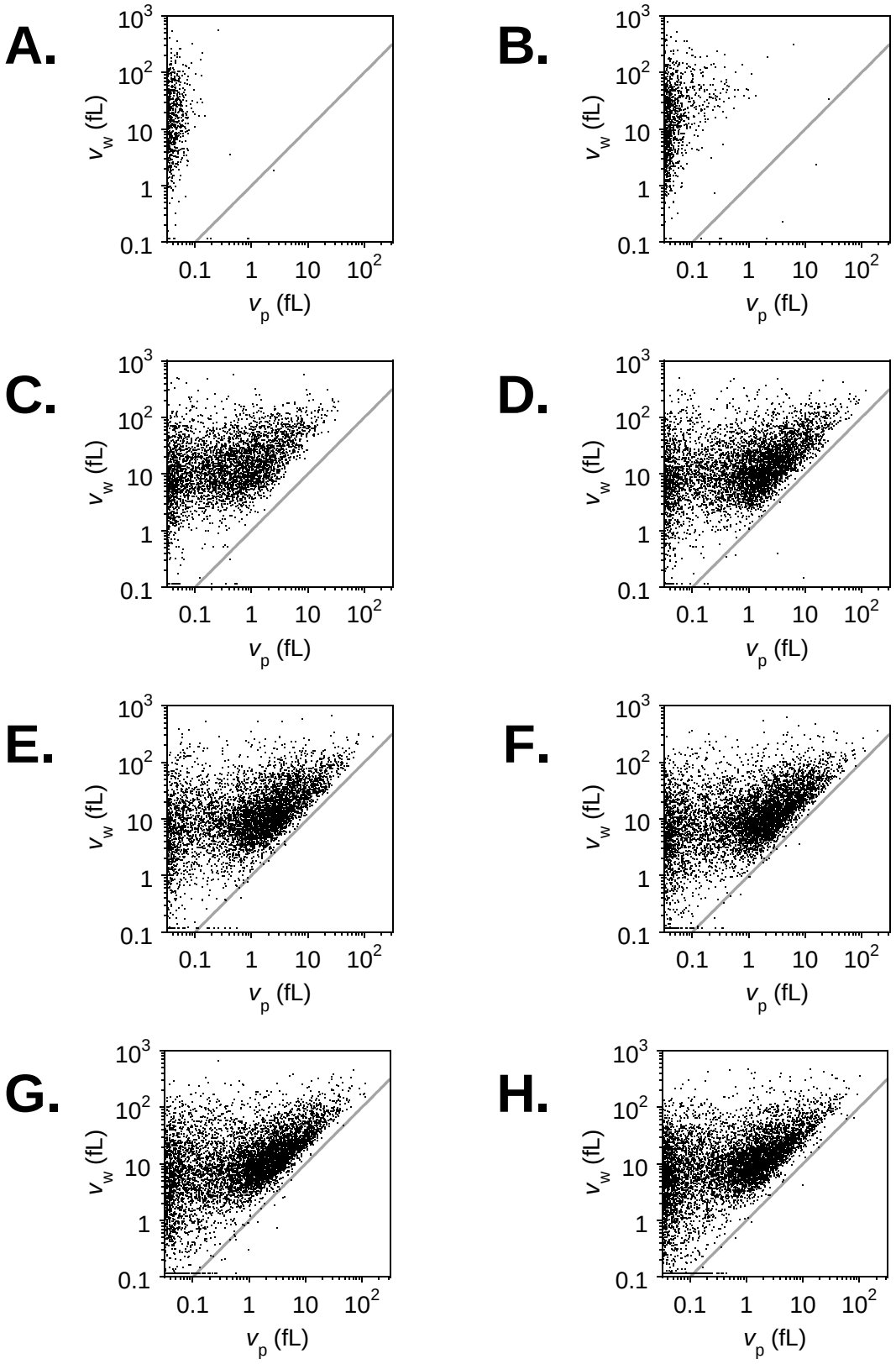
2.6. 参考文献

1. Torchilin, V.P. & Weissig, V. Liposomes : a practical approach, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2003).
2. Luisi, P.L. & Walde, P. Giant vesicles. (Wiley, Chichester ; New York; 2000).
3. Richard, A. et al. Fusogenic supramolecular vesicle systems induced by metal ion binding to amphiphilic ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15279-15284 (2004).
4. Menger, F.M. & Balachander, N. Chemically-induced aggregation, budding, and fusion in giant vesicles: direct observation by light microscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 5862-5863 (1992).
5. Zhou, Y. & Yan, D. Real-time membrane fission of giant polymer vesicles. *Angew Chem Int Ed Engl* **44**, 3223-3226 (2005).
6. Betageri, G.V., Jenkins, S.A. & Parsons, D.L. Liposome drug delivery systems. (Technomic Pub., Lancaster; 1993).
7. Woodbury, D.J., Richardson, E.S., Grigg, A.W., Welling, R.D. & Knudson, B.H. Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *J Liposome Res* **16**, 57-80 (2006).
8. Tenchov, B.G. & Yanev, T.K. Weibull distribution of particle sizes obtained by uniform random fragmentation. *J colloid interface sci* **111**, 1-7 (1986).
9. Epstein, B. Logarithmico-Normal Distribution in Breakage of Solids. *Ind. Eng. Chem.* **40**, 2289-2291 (1948).
10. Tetlow, I.J., Bowsher, C.G. & Emes, M.J. Reconstitution of the hexose phosphate translocator from the envelope membranes of wheat endosperm amyloplasts. *Biochem J* **319 (Pt 3)**, 717-723 (1996).
11. de la Maza, A., Manich, A.M. & Parra, J.L. Intermediate aggregates resulting in the interaction of bile salt with liposomes studied by transmission electron microscopy and light scattering techniques. *Journal of Microscopy* **186**, 75-83 (1997).
12. Vorauer-Uhl, K., Wagner, A., Borth, N. & Katinger, H. Determination of liposome size

distribution by flow cytometry. *Cytometry* **39**, 166-171 (2000).

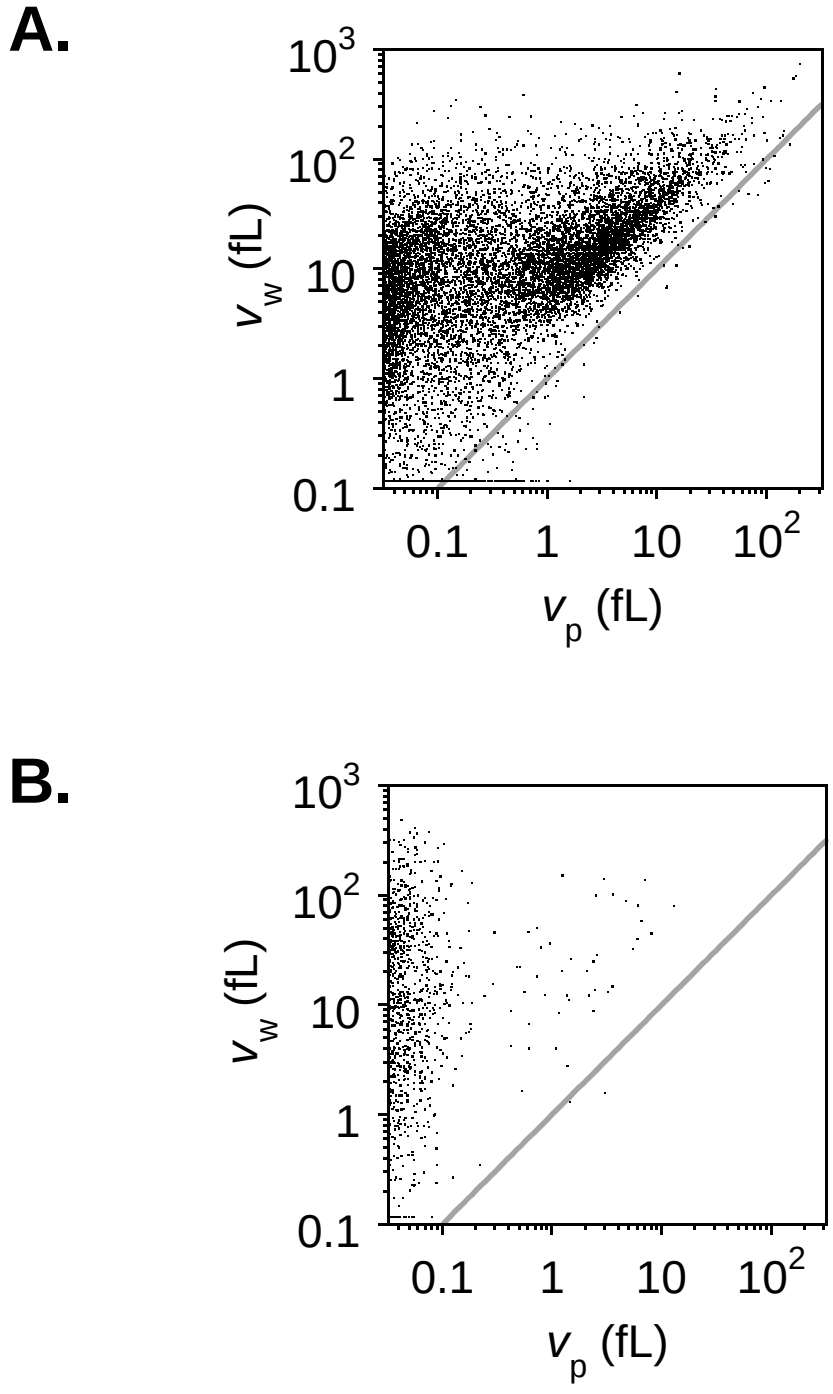
13. Bhatia, A., Kumar, R. & Katare, O.P. Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *J Pharm Pharm Sci* **7**, 252-259 (2004).
14. Sato, K., Obinata, K., Sugawara, T., Urabe, I. & Yomo, T. Quantification of structural properties of cell-sized individual liposomes by flow cytometry. *J Biosci Bioeng* **102**, 171-178 (2006).
15. Hanczyc, M.M. & Szostak, J.W. Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 660-664 (2004).
16. Ishikawa, K., Sato, K., Shima, Y., Urabe, I. & Yomo, T. Expression of a cascading genetic network within liposomes. *FEBS Lett* **576**, 387-390 (2004).
17. Sunami, T. et al. Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins. *Anal Biochem* **357**, 128-136 (2006).
18. Shimizu, Y. et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat Biotechnol* **19**, 751-755 (2001).
19. Alberts, B. Molecular biology of the cell, Edn. 4th. (Garland Science, New York; 2002).
20. Kikuchi, H. et al. Gene delivery using liposome technology. *J Control Release* **62**, 269-277 (1999).
21. Nakashima, T., Shimizu, M. & Kukizaki, M. Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications. *Adv Drug Deliv Rev* **45**, 47-56 (2000).

補足資料2.1



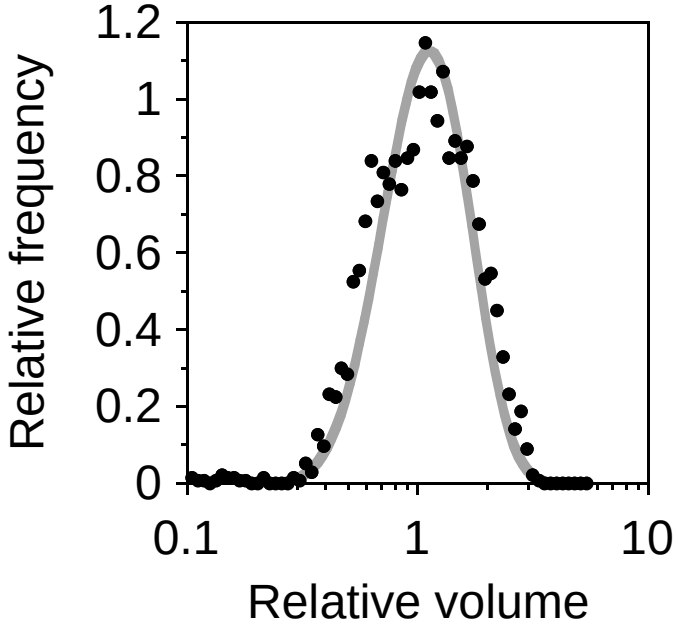
補足資料2.1　βグルクロニダーゼ遺伝子をコードしたプラスミドDNAを用いた実験（図2.5A）の経時変化。A, B, C, D, E, F, G, Hはそれぞれ0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360分でのデータ（ただしHは図2.5Aと同じデータ）。測定は10万個のリポソームについて行ったが、ここでの表示は3万個。

補足資料2.2



補足資料2.2　βガラクトシダーゼ遺伝子をコードしたプラスミドDNAを用いた実験（図2.5Aと同様でプラスミドと基質が異なる）のFCMの結果。A, Bはそれぞれプラスミド DNAあり（0.2 nM）、なし。

補足資料2.3



補足資料2.3　FACSの蛍光強度から測定した大腸菌体積の実験結果（●）と、提唱したモデルの分布（灰色実線）の比較。よく一致することがわかる。

第 3 章：Qβレプリカーゼによる RNA複製反応の速度論的解析

3.1. 概要および本論文での位置づけ

本章において、私達は原始細胞においても行われていたであろう RNA 複製のダイナミクスの実験モデルとして、Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応の速度論を研究した。Qβレプリカーゼは RNA 依存性 RNA ポリメラーゼであり、大腸菌ファージ Qβのゲノム RNA を複製する役割を担っている。この酵素は単体で核酸を複製できる稀な酵素であり、その複製には、酵素以外に核酸プライマーも必要としない。よって、他の核酸複製反応と比べて原始的であると考えられている。本酵素による RNA 複製反応は多くの研究がなされたにも関わらず、その全過程を説明できる速度論モデルは未だ存在しないため、本研究ではそれを可能とする速度論モデルを提唱した。私達が提唱した速度論モデルの特徴は非生産的結合を考慮している点である。非生産的結合とは酵素が RNA 複製反応を開始できないような RNA と酵素との結合である。結果、先行研究で観測された未解決点も含め、複製反応全過程の RNA 経時変化を説明することができ、このモデルに基づいて様々な長さの RNA の複製反応における速度定数や平衡定数などを求めた。これにより、RNA と酵素の親和性は、Qβファージの宿主大腸菌内でそれぞれ 1 分子のみ存在したときにでも結合を維持できるために最低限必要な強さであることがわかった。さらに、短い RNA を複製する反応において、Qβレプリカーゼが高濃度であるとき（>100 nM）、単位時間当たりに RNA が 2 倍になるというだけの最も簡単なモデルで説明できることがわかった。以上のように、原始細胞について、そのゲノム RNA 複製のモデルである RNA 複製反応が、簡単な反応モデルであらわすことが示された。

3.2. 背景

3.2.1. Qβレプリカーゼとは

Qβレプリカーゼは大腸菌ファージQβ[1]の一本鎖RNAゲノム（4217 塩基長）を複製するRNA依存性RNA複製酵素であり、Qβファージの生活観の中で重要な役割を担っている[2, 3]。この酵素は 4 量体でありファージゲノムにコードされているβサブユニットと、3 つの宿主由来サブユニット（Ribosomal protein S1、伸張因子Tu（EF-Tu）およびTs（EF-Ts））から構成される[4]。複製反応は鋳型となる一本鎖RNA（プラス鎖）の 3’末端に結合することから始まり、その相補的一本鎖RNA（マイナス鎖）を合成する。また、このマイナス鎖は新しいプラス鎖を合成する際の鋳型となる[5]。全てのRNAがQβレプリカーゼによって増幅されるというわけではなく、むしろ増幅されるRNAは稀である。増幅されるRNAの必要条件として、3’末端にポリC配列を持つこと[6, 7]および特徴的な 2 次

構造を持つこと[8]などが知られているが、これらを満たしているRNAをデザインしても増幅されるとは限らない[9, 10]。Qβレプリカーゼを用いると、オリゴヌクレオチドプライマーを加える必要なく（*de novo* initiation）、30 分以内に 1 分子のRNAから 10^{12}分子まで指数的に増幅することができる[3]。

3.2.2. 過去の研究と速度論モデルの重要性

Qβレプリカーゼは一本鎖RNA複製酵素の代表として認識されており、一本鎖RNA複製の速度論[11]やRNA非相同性組み換えの解明[12]などに加え、分子進化[13]やハイパーサイクル[14]、生命の起源に対する理解[15]など、様々な目的に利用されてきた。さらに、特定RNAの増幅[16, 17]、ウィルスの検出[18]、RNA配列の同定[19]、変異導入[20]など、分子生物学のツールとしても使用されている。増幅可能なRNAの必要条件については詳細に研究されてきたが、未だにそのRNA複製反応の全過程を説明できる速度論モデルはない。これまで、RNA増幅過程を結合[21, 22]や二本鎖合成反応[23, 24]など、それぞれの過程に分けて速度論的に解析し、速度定数や平衡定数などが求められてきた。一方で、全過程を説明できる速度論モデルについての研究[5, 11, 25]は、主に計算機シミュレーションを用いたものであり、これらの研究は以下の 3 つの未解決な点を残している。1：ファージゲノムRNAの複製はゲノムRNA自身によって何らかの阻害を受けるということ[26, 27]。2：反応速度が反応後期に減少していくこと[5, 28]。3：触媒速度定数はRNA増幅過程の前期と後期で異なっているように観察されること[5]である。これら 3 つの点の原因は、未だ明らかにされていない。また、これまでの速度論的研究は長さの短いRNA（200 塩基長程度）についてのみである。その上、伸張速度定数やミカエリス定数などの重要な速度論定数が求められていない。Qβレプリカーゼの速度論に関する研究は、Qβファージ増幅の基礎的知見を与えるだけでなく、原始環境下において行われていたとされるRNA複製やQβレプリカーゼの工学的利用に関しても重要な情報を与えるものである。

3.2.3. 研究の概要

本研究で、私達は簡単な速度論モデルに基づいてQβレプリカーゼによるRNA増幅の全過程を速度論的に解析した。私達が提起した速度論モデルの特徴は非生産的結合である。非生産的結合とは、反応を開始できないような酵素とRNAの結合であり、生産的結合とは開始できる適切な結合のことである。非生産的結合は生産的結合を行う酵素を競争的に減らすという影響がある。私達は大きく長さの異なる（100-2000 塩基長程度）様々なRNAを用いて、それぞれのRNA複製反応を蛍光色素SYBR® Green IIを用いてリアルタイムかつ正確に測定した[29]。私達のモデルはこれまで未解決であった点を含め、複製反応の全過程から得られた実験結果をよく説明することができた。また、私達は様々な速度論定数を実験から直接求めた。さらに、私達はGDPによって促進され、かつNTPによってその促進を阻害されるという特徴的な酵素失活を発見した。最後に、本研究で得

られた、Qβファージ増幅の理解やQβレプリカーゼの応用に役立つ重要な知見について議論する。

3.3. 試料と方法

3.3.1. Qβレプリカーゼの調整

Qβレプリカーゼの精製は、過去の報告に記載してあるとおりに行った[30]。精製後、酵素溶液はストックバッファー(25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 125mM NaCl, 2.5mM MgCl2, 0.5mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 50% (v/v) glycerol)中で保存した。使用した酵素は主にEF-Tu, EF-Ts, βサブユニットからなる 3 量体であることがSDS-PAGEによって確かめられている。また、使用した酵素は、熱安定性が低いものと高いものの二種類が混在していることが示唆された（補足資料 3.1）ため、本研究では特に記述のない限り、反応前にNTPを含まない状態で酵素を 37℃10 分間前処理することで熱安定性が低い酵素を失活させている。酵素溶液に二種類の酵素が混在していることは、本研究で使用したものと別調整の 3 量体酵素、サブユニットS1 を保持する 4 量体酵素[29]、EF-Tu, EF-Ts, βサブユニットを融合した酵素[30]、そして市販されている酵素の全ての酵素溶液で観察された。また、この二種類の比は酵素調整ごとに異なる。

3.3.2. プラスミドの調整

MDV-poly RNAの調整に使用したプラスミドpUC-MDV-LRは井口教授(帝京大学)から頂いた[31]。このプラスミドはT7 プロモータ配列の下流にMDV-poly RNA配列、そのMDV-poly RNA配列の 3’末端にはSmaI制限酵素サイトを持っている。MDV-poly RNA配列の中にはクローニングのためにBglII制限酵素サイトが挿入してある。MDV-T12、MDV-CAT、MDV-dBETA、MDV-BETA RNAsの調整に使用したプラスミドはそれぞれ、27 塩基配列(5’-GATCATTTTTTTTTTTTGTTTTTTTTA)、chloramphenicol acetyltransferase遺伝子、Qβレプリカーゼβサブユニット遺伝子に存在する 2 つのStyIサイト間の 1072 塩基長を欠損したもの、Qβレプリカーゼβサブユニット遺伝子の相補鎖をpUC-MDV-LRのBglIIサイトに挿入して作成した。S222 RNAはMDV-1 RNAの変異体の相補鎖であり、8 塩基の変異、3 塩基の挿入、2 塩基の欠損がある。S130 RNAはS222 RNAの 5’側とよく似た 130 塩基長のRNAであり、2 塩基の欠損、7 塩基の変異、3’末端へのCCAの付加が異なる点である。S222 およびS130 RNAの 2 つは自然発生RNA[32]を私達がクローン化したものであり、その配列をpUC19 ベクターに挿入した。なお、挿入時には、その上流にT7 プロモータを、3’末端には*Alw*I制限酵素切断サイトを付加した。これらの配列は全て文献[33]の補足情報に示してある。

3.3.3. 鋳型 RNA の調整

鋳型 RNA は *Alw*I（S130 および S222 RNA）もしくは *Sma*I（その他の RNA）によって直鎖化したプラスミド DNA の T7 RNA ポリメラーゼ(Takara, Shiga, Japan)を用いた試験管内転写により合成した。その後、鋳型 DNA は DNase I (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)によって消化した。RNA は RNeasy mini (Qiagen, Tokyo, Japan)を用いて精製し、水に溶出した。RNA 溶液は使用前に、70℃で 2 分間前処理し、5 分間室温においた。

3.3.4. 複製反応のリアルタイム検出

複製反応溶液（20μL）は、氷上で反応緩衝液（125 mM Tris-HCl、pH 7.8、5 mM MgCl2、0.1 mg/mL BSA、各 1.25 mM の ATP、GTP、CTP、UTP、500 nM（ABI PRISM 7700 Sequence Detector 使用時）もしくは 200 nM（Mx3005P™ QPCR System 使用時）の ROX reference dye (5-carboxy-X-rhodamine, Invitrogen, Tokyo, Japan)、1×濃度の SYBR® Green II (Invitrogen, Tokyo, Japan)、5 mg/mL Triton-X100）に鋳型 RNA および 1μL の Qβレプリカーゼ溶液を加えて作成し、これを 37℃で反応を開始した。ROX は試験管の間の誤差を標準化するための内部指標として加えた。指数期および飽和点の解析のための反応は、様々な濃度の酵素（12.5、25、50、100、200、400 nM）、0.004 nM（S130、S222、MDV-poly、MDV-T12 RNA）もしくは 0.4 nM（MDV-CAT、MDV-dBETA、MDV-BETA RNA）の鋳型 RNA を用いて、37℃で 15 分間反応を行った。線形期の反応は、10 nM の酵素と、100 nM（S130、S222 RNA）もしくは 200 nM（MDV-poly、MDV-T12 RNA）もしくは 60 nM（MDV-CAT、MDV-dBETA、MDV-BETA RNA）の鋳型 RNA を用いて、37℃で 2 時間反応を行った。

反応は 37℃において、指数期および飽和点の解析には ABI PRISM 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems, Foster City, CA)を、線形期の解析には Mx3005P™ QPCR System (Stratagene, San Diego, CA)を用いて検出した。ABI7700 において、488 nm の励起光による蛍光スペクトルは、最小二乗法を用いて SYBR® Green II と ROX のそれぞれのスペクトルに分解した。分解したスペクトルのピーク値の比（SYBR® Green II / ROX）をシグナル強度とした。Mx3005P においては、610 nm（励起 585 nm）の蛍光値に対する 516 nm（励起 492 nm）の蛍光値の比をシグナル強度とした。RNA 濃度はどちらの機器に関しても、吸光度から換算した RNA 濃度に対するシグナル強度の検量線により求めた。ABI7700 と Mx3005P の測定時間間隔はそれぞれ、6 秒と 30 秒程度である。ABI7700 は高感度であるが測定レンジが狭く、Mx3005P は低感度であるが測定レンジが広いため使い分けた。

3.3.5. 指数期の解析

酵素がRNAに対して過剰であるとき、RNAは指数増幅率k_{obs}で指数増幅する。ここで、反応はCSTR（連続攪拌槽型反応機）定常状態と仮定することができる[11]。この仮定は、反応系において増殖する全ての要素の濃度が自己触媒的に同じ増幅率で増幅するという状態であり、Rt、E-Rp、E-Rn（それぞれ全RNA、生産的結合に結合している酵素、

非生産的結合に結合している酵素）の濃度は以下のように記述できる。

$$\frac{d[\mathrm{Rt}]}{dt}\frac{1}{[\mathrm{Rt}]}=\frac{d[\text{E-Rp}]}{dt}\frac{1}{[\text{E-Rp}]}=\frac{d[\text{E-Rn}]}{dt}\frac{1}{[\text{E-Rn}]}=k_{\mathrm{obs}} \qquad \text{式 3.1}$$

私達のモデル（モデル 1）において、[Rt]と[E-Rn]に関する反応速度式は、それぞれ以下のように書ける。

$$\frac{d[\mathrm{Rt}]}{dt}=k_{\mathrm{cat}}[\text{E-Rp}] \qquad \text{式 3.2}$$

$$\frac{d[\text{E-Rp}]}{dt}=k_1[\mathrm{E}][\mathrm{Rp}]-(k_{-1}+k_{\mathrm{cat}})[\text{E-Rp}] \qquad \text{式 3.3}$$

ただし、[x]はxの濃度、Eは遊離の酵素（つまり[E] = [Et] - [E-Rp] - [E-Rn]、Etは全酵素）、Rpは空の生産的結合部位、k_1およびk_{-1}はそれぞれ生産的結合の会合及び解離定数、k_{cat}は触媒速度定数である。[E] ≒ [Et]のとき（指数期のとき）、k_{obs}は式 3.1、2.2、2.3 から以下のように解ける。

$$k_{\mathrm{obs}}=\frac{2k_{\mathrm{cat}}[\mathrm{Et}]}{\frac{k_{-1}+k_{\mathrm{cat}}}{k_1}+[\mathrm{Et}]+\sqrt{4[\mathrm{Et}]\frac{k_{\mathrm{cat}}}{k_1}+([\mathrm{Et}]+\frac{k_{-1}+k_{\mathrm{cat}}}{k_1})^2}}$$

ここで、フィッティングパラメタを減らすために、$k_{-1} >> k_{\mathrm{cat}}$もしくは$k_{-1} << k_{\mathrm{cat}}$のどちらかを仮定することにした。2 つの場合、$k_{-1} >> k_{\mathrm{cat}}$および$k_{-1} << k_{\mathrm{cat}}$のときにはそれぞれ、$k_{\mathrm{obs}}$は以下のように解ける。

$$k_{\mathrm{obs}}=\frac{k_{\mathrm{cat}}[\mathrm{E}_{280}]}{[\mathrm{E}_{280}]+K_{\mathrm{M}}/\alpha} \qquad \text{式 3.4}$$

および

$$k_{\mathrm{obs}}=\frac{2k_{\mathrm{cat}}[\mathrm{E}_{280}]}{K_{\mathrm{M}}/\alpha+[\mathrm{E}_{280}]+\sqrt{4[\mathrm{E}_{280}]K_{\mathrm{M}}/\alpha+([\mathrm{E}_{280}]+K_{\mathrm{M}}/\alpha)^2}} \qquad \text{式 3.4'}$$

ただし、K_{M}は$(k_{-1} + k_{\mathrm{cat}})/k_1$であり、$[\mathrm{E}_{280}]$は 280 nmの吸光度から求めた酵素濃度である。α は$[\mathrm{E}_{280}]$に対する[Et]の比（$\alpha = [\mathrm{Et}]/[\mathrm{E}_{280}]$）であり、酵素の調整ごとに異なる（データ不掲載）。式 3.4 および 2.4'のどちらを用いてもk_{cat}とK_{M}を求めることができる。ただし、それぞれの仮定が間違えていた場合、本研究の条件ではk_{cat}は正確に求めることができ、K_{M}についてはと誤評価があるが、最大でも 2 倍程度であった。

3.3.6. 飽和点の解析

飽和点は指数期の終わりであるので、指数期と同じ仮定（CSTR 定常状態）を仮定した。[E-Rn]に対する速度式は以下のように書ける。

$$\frac{d[\text{E-Rn}]}{dt}=k_2[\mathrm{E}][\mathrm{Rn}]-k_{-2}[\text{E-Rn}]-k_{\mathrm{cat}}[\text{E-Rn}]\frac{[\text{E-Rp}]}{[\mathrm{Rt}]} \qquad \text{式 3.5}$$

ただし、Rnは空の非生産的結合部位（$[\mathrm{Rn}] = n\cdot[\mathrm{Rt}] - [\text{E-Rn}]$、$n$は 1 分子のRNAあたりの

非生産的結合部位数)、k_2およびk_{-2}はそれぞれ非生産的結合の会合及び解離定数である。式 3.5 の第 3 項は伸長反応中の酵素による、それと同じRNA上に結合している酵素（E-Rn）の解離である。ここで私達は、飽和点は指数期でもあるということで、[E] ≒ [Et]と仮定する。さらに、フィッティングパラメタを減らすため、ほとんど生産的結合サイトは酵素と結合している（[E-Rp] ≒ [Rt]）と仮定することによって、式 3.5 より以下のようにE-Rnを記述することができる。

$$[\text{E-Rn}] = \frac{n[\text{Et}][\text{Rt}]}{K_{\text{M2}} + [\text{Et}]} \qquad \text{式 3.6}$$

ここで、K_{M2}は$(k_{-2}+2k_{\text{cat}})/k_2$である。飽和点（[Rt] = [Rsat]）においては、酵素は生産的および非生産的結合のどちらかにほとんどが結合していて、遊離のものはほとんどない[11, 24]（[Et] ≒ [E-Rp] + [E-Rn]）と仮定すると、

$$\frac{[\text{R}_{\text{sat}}]}{[\text{E}_{280}]} = \alpha \cdot \frac{K_{\text{M2}}/\alpha + [\text{E}_{280}]}{K_{\text{M2}}/\alpha + (n+1)[\text{E}_{280}]} \qquad \text{式 3.7}$$

を得ることができる。酵素がRNAよりも十分多い（したがって[E] >> [Et]）という指数期での仮定と、酵素はRNAによって飽和されている（[Et] ≒ [E-Rp] + [E-Rn]）という仮定は相反している。それでもなお、以下に示したように、式 3.7 を用いてnおよびK_{M2}を求めることができる。

[Rsat]は[Rt]の経時変化を以下の式にフィットすることで求めた。

$$\begin{aligned}\ln[\text{Rt}] &= \text{Boole}[t < t_{\text{sat}}] \cdot (k(t - t_{\text{sat}}) + \ln(a t_{\text{sat}} + b)) \\ &\quad + \text{Boole}[t_{\text{sat}} \le t] \cdot \ln(a t + b)\end{aligned} \qquad \text{式 3.8}$$

ただし、α、b、k、t_{sat}をフィッティングパラメタとして、Mathematica (Wolfram Research, Inc.)を用いてフィットした。Boole関数（Boole[ϕ]）はIverson's conventionとしても知られており[34]、ϕが真のとき 1 を、偽のとき 0 を返す関数である。よって、式 3.8 において全RNA濃度[Rt]は、$t < t_{\text{sat}}$のときは時間に対して指数的に増加し、$t > t_{\text{sat}}$のときは線形的に増加する。S130, S222, MDV-poly, MDV-T12, MDV-CAT, MDV-dBETA, MDV-BETAのそれぞれのRNAを用いた反応をフィットする際に使用したデータの時間は、2–4, 2–5, 3–7, 3–7, 2–6, 3–7, 2–9 分である。

式 3.7 の正当性と、式 3.7 および式 3.8 を用いた定数同定の精度を確かめるため、モデル 1 の反応を、計算機シミュレーションを用いて再現した。様々なnおよびK_{M2}における、実験と同じ濃度の酵素濃度を用いてシミュレーションを行い、上記の方法で[Rsat]を求めた。結果、実験結果（図 3.3A）と同じように、$[\text{R}_{\text{sat}}]/[\text{E}_{280}]$と$[\text{E}_{280}]$の関係は式 3.7 に従っていた。また、そのフィット結果得られたnおよびK_{M2}の値は、最大でも 2 倍程度の誤差であった。

3.3.7. 線形期の解析

線形期から開始される反応においては、RNAは酵素に対して過剰であり、ほとんどの

酵素との結合部位は空であると仮定できる（[Rp] ≒ [Rt]および[Rn] ≒ n·[Rt]）。まず、私達は生産的結合の会合は非生産的結合の会合よりも十分に速く($k_1 >> n \cdot k_2$)、触媒反応を含めた生産的結合（モデル 1 における $\mathrm{E} \rightleftharpoons \mathrm{E\text{-}Rp} \rightarrow \mathrm{E} + 2\mathrm{R}_{\mathrm{free}}$）は定常状態で記述できると仮定した。これにより、[E-Rp]は以下のように記述できる。

$$[\mathrm{E\text{-}Rp}] = \frac{([\mathrm{Et}]-[\mathrm{E\text{-}Rn}])[\mathrm{Rt}]}{K_{\mathrm{M}}+[\mathrm{Rt}]} \qquad \text{式 3.9}$$

さらに、RNA が酵素に対して過剰であることから、1 分子の RNA には 1 分子の酵素のみが結合すると仮定した。この場合、伸長反応を行っている酵素による、同じ RNA 上の E-Rn の解離（式 3.5 の第 3 項目）は無視できる。これらの仮定の下では、[E-Rn]に関する速度式は次のように書き下せる。

$$\frac{d[\mathrm{E\text{-}Rn}]}{dt} = k_2[\mathrm{E}]n[\mathrm{Rt}] - k_{-2}[\mathrm{E\text{-}Rn}] \qquad \text{式 3.10}$$

式 3.9 および式 3.10、さらに[Rt] >> K_{M}という仮定から、私達は酵素失活を考慮しない場合の時間tにおける反応速度（$V_{\mathrm{cor}}(t)$）を以下のように得た。

$$V_{\mathrm{cor}}(t) = \frac{k_{\mathrm{cat}}[\mathrm{Et}](\mathrm{e}^{-(k_{-2}+nk_2K_{\mathrm{M}})t} + \frac{K_{\mathrm{i}}}{nK_{\mathrm{M}}})}{1+\frac{K_{\mathrm{i}}}{nK_{\mathrm{M}}}} \qquad \text{式 3.11}$$

ただし、Kiはk_{-2}/k_2である。さらに、酵素失活（[Et(t)] = [Et(0)] exp(-k_{inact} t)、k_{inact}は失活速度定数、Et(t)は時間tでの活性酵素濃度）を考慮に入れると、反応速度$V(t)$は以下のように書ける。

$$V(t) = \frac{k_{\mathrm{cat}}\alpha[\mathrm{E}_{280}](\mathrm{e}^{-(k_{-2}+nk_2K_{\mathrm{M}})\cdot t} + \frac{K_{\mathrm{i}}}{nK_{\mathrm{M}}})}{1+\frac{K_{\mathrm{i}}}{nK_{\mathrm{M}}}} \cdot \mathrm{e}^{-k_{\mathrm{inact}}\cdot t} \qquad \text{式 3.12}$$

S130 およびS222 を除くRNAを用いた反応では、式 3.12 は結果を正確にフィットすることができなかった。これには以下の 2 つの理由が考えられる。1 つ目は、酵素濃度がRNAに対して非常に小さいからである。これは初期RNAがもつ蛍光強度に対して、特に低効率で増幅されるRNAに関して、反応がもたらす蛍光強度の増加（反応速度）が小さいことにつながる。よって、蛍光強度の増加に対して、実験誤差が大きくなる。2 つ目は、特に低効率で増幅されるRNAの反応に関しては、自発的RNAが反応の途中で増加し[32]、これによって観測対象である鋳型RNAの反応のみを観察することができなくなってしまうからである。よって、リアルタイム測定の結果は、その自発的RNAが観察される程度に増幅する前だけが信用できるものである。ここで、自発的RNAの増加は、電気泳動だけでなく、リアルタイム測定においても蛍光強度が急に増加することにより検出できることに注目されたい。私達は、$V_{\mathrm{cor}}(0)$および$V_{\mathrm{cor}}(\infty)$をそれぞれ、反応時間 2–10 分の平均および、その時間を中心として 15 分間平均した（前後 7.5 分間）値の最小値として求めた。自発的RNAの増加は突然の速度上昇として観測されるので、私達はそれ

までの速度の最小値を$V_{cor}(\infty)$とした。

3.3.8. 酵素失活の解析

酵素は、本文に記してある溶液中において、37℃で様々な時間前処理し、その後に氷上で 5 分間静置した。その後、反応溶液として欠けているNTPを氷上で加え、37℃で反応を開始した。前処理後の活性酵素濃度の、初期活性酵素濃度に対する比率は、前処理後の初速度の、前処理なしでの初速度の比から得た。失活速度定数は、前処理実験による酵素失活の経時変化の結果を単一指数関数にフィットすることにより求めた。Ki_{NTP}の値は、$Ki_{NTP} = [It]\ k_{inact_inh}/(k_{inact_MAX} - k_{inact_inh})$という関係式を用いて行った。ただし、$k_{inact_MAX}$および$k_{inact_inh}$はそれぞれ、1.25 mMのGDP非存在下および存在下における失活速度定数であり、[It]は全NTPの合計濃度である。

3.4. 結果

3.4.1. RNA 複製反応の 2 つの反応段階とリアルタイム測定

Qβレプリカーゼは少数分子の鋳型RNAを元に、RNAを指数的に増幅することができる。これまでの研究では、主にゲル電気泳動を用いてRNA増幅反応を測定していたが、本研究では蛍光色素SYBR® Green IIを用いたリアルタイム測定を用いた[29]。これにより詳細な速度論的解析が可能となった。Fig. 1 はリアルタイム測定を用いてRNA増幅を測定した際の代表的な結果である。RNA濃度、およびその反応速度の時間経過がそれぞれ黒丸と白丸で示してある。反応速度はRNAの増幅曲線の各時点での傾きから求めた。なお、使用した濃度のSYBR® Green IIによる反応阻害、および蛍光退色や蛍光の遅れは無視できる程度であることは、ゲル電気泳動との比較により確かめてある。

RNA増幅過程は指数期と線形期の二つに分けることができる[5, 24]。Fig. 1 において、速度の急な上昇が見られる間が指数期（初期の 3 分間程度）、速度の上昇が見られる間が線形期である。指数期は酵素分子数がRNA分子数に対して過剰であるときに観察される。この間、制限物質はRNAであり、反応速度はRNA濃度に比例する。またその反応産物はRNAであるので、自己触媒的な反応となり、RNAの経時変化は指数的増幅になる。線形期は、RNA分子数が酵素分子数と同等もしくはそれ以上であるときに観察される。この間、制限物質は酵素であり、反応速度は酵素に比例する。RNAと異なり酵素は反応によって増えるものではない（失活などによって減ることはあるが）ので、RNAの経時変化は線形増幅となる。指数期から線形期に移行する点では、酵素はRNAによって飽和（RNAと結合しており遊離の酵素がほとんどない）しており、またRNAも酵素によって飽和されている。よって私達はこの点を飽和点と呼ぶ。本研究では、指数期・飽和点・線形期をそれぞれ分けて解析した。

3.4.2. 新しい反応速度論モデルの提唱

私達は反応を矛盾なく説明し、その速度論定数を実験から直接求めるために、先行研究に基づいて簡単な速度論モデルを提唱した。増加可能なRNAにとって、3'末端のポリC配列[6, 7]、また 5'と 3'両末端の特徴的な二次構造[8]は必須であることが知られている。このような特徴に依存して、複製反応が開始することのできる酵素とRNAの結合は生産的結合と解釈することができる。一方で、Qβレプリカーゼは増幅できる・できないに関わらず、様々なRNAに結合することが知られている[22]。さらに、ファージゲノムRNAの複製の際には、そのゲノム自身によってなんらかの反応阻害を受けることが報告されている[26, 27]。私達は増幅不可能な 30 塩基のオリゴRNAが、競争的に反応を阻害することを観察した（データ不掲載）。これらの現象は以下のことを示唆しているように思われる。Qβレプリカーゼは生産的結合に加えnonproductiveに結合することもできる。その非生産的結合は、増加可能なRNAであっても、生産的結合以外の部位で存在しうる。そしてこのような非生産的結合が、実質的な有効酵素濃度を下げているということである。このような非生産的結合による競争阻害は他の酵素においても知られており[35]、特にポリマーを基質とする酵素において知られている[36-38]。以上のような理由から私達は次のような速度論モデルを提唱した。

$$\text{E-Rn} \underset{k_2\,\text{Rn}}{\overset{k_{-2}}{\rightleftharpoons}} \text{E} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1\,\text{Rp}}{\rightleftharpoons}} \text{E-Rp} \xrightarrow{k_{\text{cat}}} \text{E} + 2\,\text{R}_{\text{free}} \qquad \text{モデル 1}$$

ここで、Eは酵素、R_{free}は遊離RNA、RpはRNAにおける空の生産的結合部位（[Rp] = [Rt] – [E-Rp]、[x]はxの濃度、Rtは全RNAを示す）、E-Rpは生産的結合部位に結合している酵素、RnはRNAにおける空の非生産的結合部位（[Rn] = n·[Rt] – [E-Rn]、nは 1 分子のRNAにある非生産的結合部位の個数を示す）、E-Rnは非生産的結合部位に結合している酵素、k_1及びk_{-1}はそれぞれ生産的結合の会合及び解離速度定数、k_2及びk_{-2}はそれぞれ非生産的結合の会合及び解離速度定数、そしてk_{cat}は触媒速度定数である。

このモデルの特徴は、非生産的結合による酵素の競争阻害である。私達は非生産的結合部位に結合している酵素は、同じRNA分子における伸長反応を阻害せずk_{cat}の値に影響しないと仮定した。これは実験結果によって正当化される（考察に記述）。本研究で、私達はこの速度論モデルに基づいて、その速度論定数を実験結果から直接求め、またこのモデルの妥当性を検証した。

3.4.3. 指数期の解析

私達は指数期を解析し、k_{cat}及びK_M (= $(k_{-1} + k_{cat})/k_1$)の値を求めた。指数期においては、酵素分子数はRNA分子数に対して過剰であるため、非生産的結合による競争阻害は無視することができる。よって、反応はより簡単なミカエリス・メンテン様モデルとして考えることができ、実際にそのような結果が得られた（図 3.2B）。指数期において、全RNA

図3.1

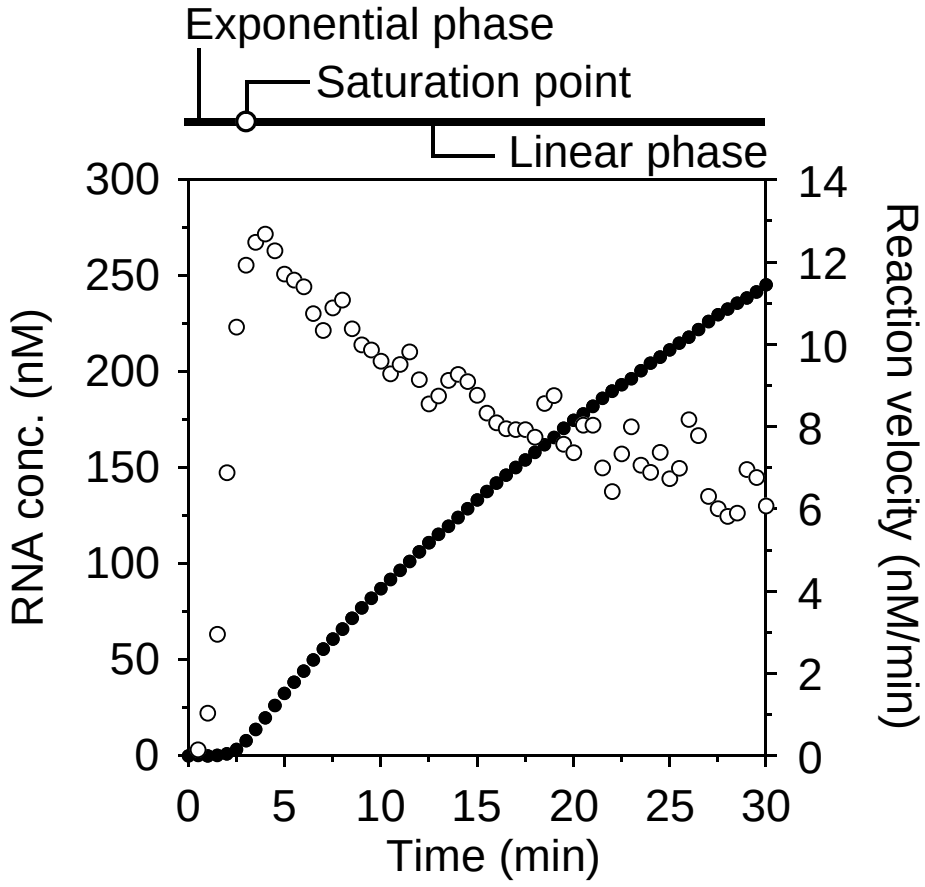


図3.1. Qβレプリカーゼによる RNA複製反応をリアルタイム測定したときの典型的な結果。0.1 nMのS222RNAと20 nMの酵素による反応の、RNAの経時変化は●（左軸）、反応速度の経時変化は○（右軸）である。指数期、線形期、飽和点が図の上に示してある。

濃度[Rt]は時間tの関数で$[Rt] = [Rt_0]\cdot\exp(k_{obs}\cdot t)$と表すことができる。ここで、$[Rt_0]$は初期RNA濃度であり、$k_{obs}$は指数期において観測される指数増加率である。私達は長さが130-2085 塩基まで異なる 7 種の鋳型RNA（表 3.1）についての反応を様々な酵素濃度を用いて測定した。この 7 種のRNAは全て、増加可能なRNAとしてよく知られているMDV-1 RNA由来である[39]。これらのRNAの配列についてのさらに詳細な情報は資料と方法を参照していただきたい。図 3.2Aは同濃度のS222 RNAを初期鋳型RNAとして、様々な酵素濃度を用いて測定した代表的な結果の例である。図 3.2Bでは、使用した酵素濃度$[E_{280}]$に対して、7 種のRNAそれぞれにおいて観測された指数増幅率（k_{obs}、指数期において図 3.2Aのように片自然対数をとったときの傾き）をプロットしてある。ここで$[E_{280}]$は 280 nmの波長の吸光度からもとめた酵素濃度であり、活性酵素率をαとすると、全酵素濃度[Et]は$\alpha[E_{280}]$と記述できる。活性酵素率αは飽和点の解析から求めることができる（次の図 3.3Aを参照）。

指数期の間、k_{obs}は近似解として求めることができる。その解はk_{cat}とk_{-1}の値に依存して異なり、$k_{-1} >> k_{cat}$及び$k_{-1} << k_{cat}$のときそれぞれ、式 3.4 及び 4’として求められる（資料と方法を参照）。K_Mは$(k_{-1} + k_{cat})/k_1$であり、酵素と生産的結合のミカエリス定数である。私達は、$k_{-1} >> k_{cat}$と$k_{-1} << k_{cat}$のどちらかを知る術がなかったため式 3.4 及び 4’の両方で結果をフィットし、式 3.4 によって得られた値を表 3.1 に示した。式 3.4’によって求められた値を式 3.4 のものと比べたとき、7 種全てのRNAについて、k_{cat}は 2%程度大きく、K_Mは 30%程度小さかったので、表 3.1 の値において、k_{cat}は正しいが、K_Mは最高で 30%程度大きく見積もられているかもしれない。

触媒速度定数k_{cat}の逆数は、触媒反応 1 回に平均かかる時間と考えられるため、伸長反応とそれ以外に分けて考えることができる。鋳型RNAの塩基長をN、1 塩基の平均伸長速度定数をk_{pol}、触媒反応のうち、伸長反応以外（伸長開始やRNAと酵素の解離など）の速度定数をk_{others}とすると、$1/k_{cat} = N/k_{pol} + 1/k_{others}$と書ける。図 3.2Cは$1/k_{cat}$と$N$の関係を示しており、これらは比例の関係にあることがわかる。図 3.2Cの回帰直線の傾き及び切片からそれぞれ、$k_{pol} = 28.9$/s、$k_{others} = 0.061$/sが得られた。図 3.2Cにおける比例関係によって、RNAの長さだけでk_{cat}の値がおおよそ予測できるということに注目されたい。

先行研究において、同じ長さをもつRNAが、RNAの配列や構造に依存して、異なる触媒速度定数をもちうることが知られている[23, 40]。事実、私達の結果においても、似たような長さをもつRNA間で、長さの違いだけでは説明できない程度に異なるk_{cat}の値をもつことが観測されている（例えばS222・MDV-poly・MDV-T12 間の違い、表 3.1）。それでもなお、図 3.2Cにみられる比例関係は、長さの大きく異なるRNAの場合、長さ以外の要素（RNAの配列や構造など）のk_{cat}に対する影響は、長さの影響に比べて小さいということを示している。つまり、私達はRNAの長さを大きく変えることによってk_{cat}とNの関係を観察することができ、k_{pol}とk_{others}を分けて得ることができたといえる。得られたk_{pol}の値（28.9/s）は、他の核酸ポリメラーゼの伸長反応速度定数と同程度であった（T7

表 3.1. 実験的に求めた 7 種の鋳型RNAについての速度論定数

Template RNA	N (nt)	k_{cat} [1] (/min)	K_M [1] [4] (nM)	n [2]	K_{M2} [2] [4] (nM)	$V_{cor}(0)$ [3] (nM/min)	$V_{cor}(\infty)$ [3] (nM/min)	K_i [3] (nM)
S130	130	3.6 ± 0.1	1.7 ± 0.3	ND	ND	6.2 ± 0.2	5.8 ± 0.03	19.3 ± 13.8
S222	222	2.6 ± 0.08	1.0 ± 0.3	ND	ND	4.1 ± 0.3	2.4 ± 0.3	1.3 ± 0.1
MDV-poly	244	2.2 ± 0.07	4.2 ± 0.6	0.4 ± 0.2	5.3 ± 10.0	2.9 ± 0.5	1.9 ± 0.2	7.7 ± 2.3
MDV-T12	271	2.0 ± 0.03	2.6 ± 0.2	1.6 ± 0.8	59.2 ± 45.2	3.2 ± 0.4	1.8 ± 0.1	3.8 ± 1.6
MDV-CAT	936	1.2 ± 0.04	4.9 ± 0.7	3.0 ± 0.4	8.3 ± 2.2	1.4 ± 0.2	0.33 ± 0.07	6.0 ± 2.4
MDV-dBETA	1028	1.2 ± 0.05	4.1 ± 0.7	3.2 ± 1.1	29.6 ± 15.7	1.2 ± 0.1	0.38 ± 0.06	7.8 ± 2.0
MDV-BETA	2085	0.67 ± 0.02	1.2 ± 0.3	8.5 ± 5.0	49.6 ± 36.5	1.8 ± 0.2	0.55 ± 0.04	4.4 ± 0.1

(1) 指数期の解析から求めた。
(2) 飽和点の解析から求めた。
(3) 線形期の解析から求めた。
(4) 飽和点の解析から求めた$\alpha = 0.2$ の値を用いて求めた。

表 3.2. 図 3.5Aで求めた異なるヌクレオチド存在下での失活定数

Additives	Inactivation rate (10^{-2}/min)
None	0.26 ± 0.09
U, C, and GTP	0.96 ± 0.04
C, G, and ATP	0.91 ± 0.02
G, A, and UTP	1.00 ± 0.08
A, U, and CTP	0.22 ± 0.04
GTP	1.28 ± 0.12
GDP	3.80 ± 0.35
GMP	0.26 ± 0.18

図3. 2

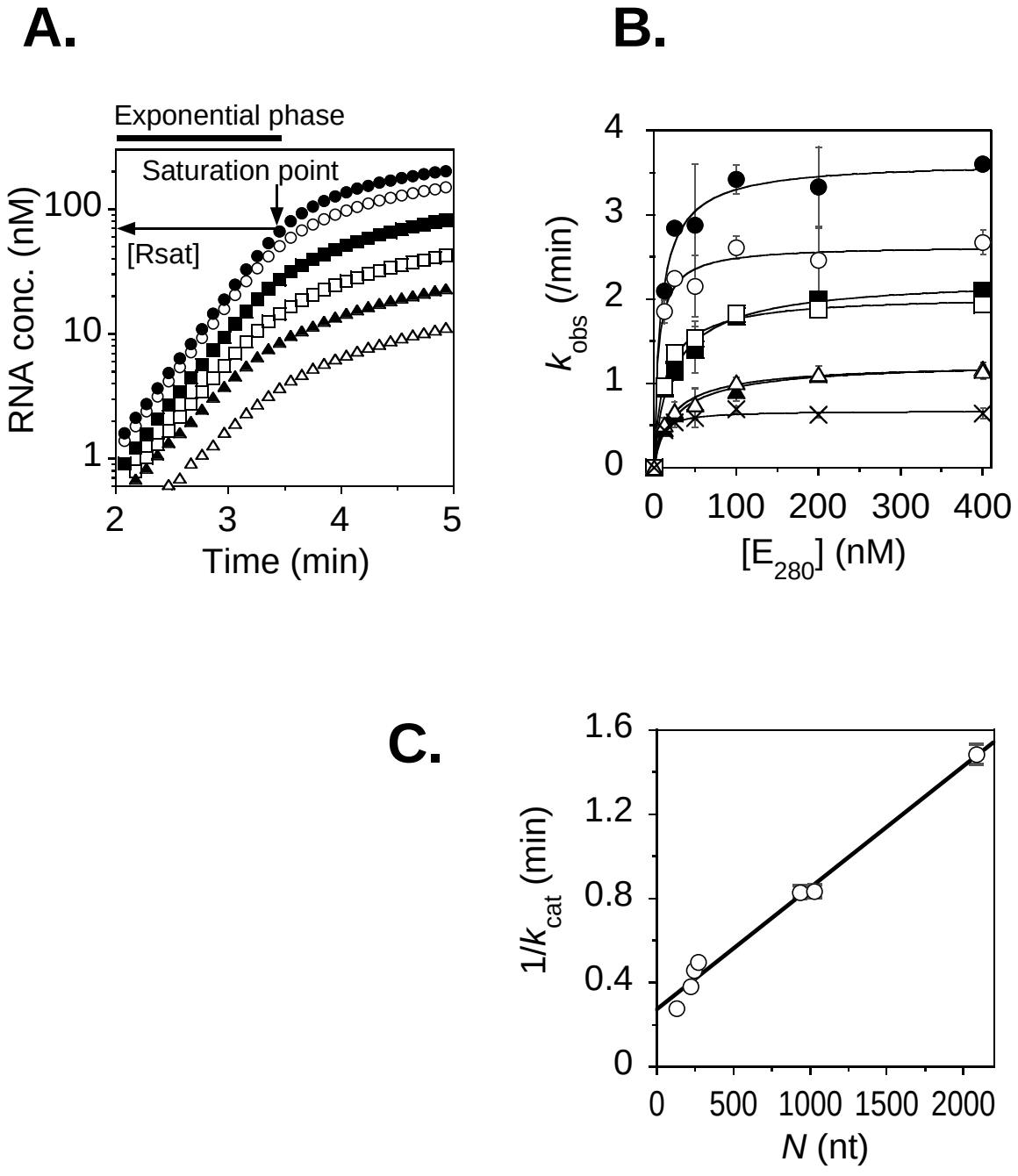


図3.2. 指数期の解析。A. 指数期のRNAの経時変化の結果の一例。0.004 nMのS222RNAと、400 (●)、200 (○)、100 (■)、50 (□)、25 (▲)、12.5 (△) nMの酵素による反応の結果。●の反応についての指数期、飽和点、飽和点でのRNA濃度[Rsat]が示してある。B. 指数増幅率k_{obs}と酵素濃度の関係。それぞれ以下のRNAの複製反応： S130 (●)、S222 (○)、MDV-poly (■)、MDV-T12 (□)、MDV-CAT (▲)、MDV-dBETA (△)、MDV-BETA (×)。実線はそれぞれの反応の結果を式3.4にフィットしたもの。フィットの結果は表3.1に示した。C. $1/k_{cat}$とNの関係。実線は直線回帰であり、この結果得られたk_{pol}およびk_{others}の値は本文に記載。

polymerase[41]、3D polymerase[42]、HIV reverse transcriptase[43]、RNA polymerase II[44]、DNA polymerase I (Klenow) [45]の値はそれぞれ 30、72、13,、20、50/sと知られている）。またk_{cat}とは異なり、K_MについてはRNAの長さと相関が観察されず、7 種のRNAの平均は 2.9 ± 1.6 nMであった。

3.4.4. 飽和点の解析

私達は飽和点を解析し、α、n、K_{M2} (= (k_{-2} + 2 k_{cat})/k_2)の値を得た。飽和点では、RNAの濃度は実働酵素濃度に達しており、遊離の酵素分子はほとんどないと考えられる[24]。正確には、RNAと酵素のアフィニティーは実験に用いた濃度条件下において十分に高いため（K_M値は 1 nMのオーダー、表 3.1）、飽和点でのRNA濃度[Rsat]は実働酵素濃度（生産的結合している酵素濃度[E-Rp]）に等しい。よって、[Rsat]を測定することにより、実働酵素濃度[E-Rp]を求めることができる。図 3.2Aに飽和点とそのときのRNA濃度[Rsat]の一例を、400 nMの酵素を用いたときの結果について示した。[Rsat]を決定する方法の詳細は資料と方法を参照。

速度論モデルに基づくと、実働酵素濃度率[R_{sat}]/[E_{280}]は、式 3.7 で表すことができる。K_{M2}は(k_{-2} + 2·k_{cat})/k_2であり、酵素と非生産的結合部位とのミカエリス定数様の平衡定数である。酵素とRNA間ではなく、酵素と 1 つの非生産的結合部位との間の定数であることに注意されたい。指数期の解析に用いた実験と同じ実験のデータを用いて、指数期同様 7 種のRNAについて、[Rsat]を求め、[R_{sat}]/[E_{280}]と[E_{280}]との関係を図 3.3Aに示した。結果から、[E_{280}]が十分に大きいとき、RNAが長いほど[R_{sat}]/[E_{280}]の値が小さくなっていく、つまり、実働酵素濃度が小さくなっていくことがわかる。S130 とS222 RNAに関しては、[R_{sat}]/[E_{280}]の値は[E_{280}]依存的に有意な違いは観察されなかった。このことは、この 2 つのRNAに関しては、K_M 2/α >> (1+n) [E_{280}]もしくはn = 0 であることを示唆している（式 3.7）。よって、これら 2 つのRNAに関しては、[R_{sat}]/[E_{280}] = α であると近似できる。私達はこれらS130 とS222 RNAの全ての[R_{sat}]/[E_{280}]の値の平均値から、α = 0.20 を得た。なお、[R_{sat}]/[E_{280}]の[E_{280}]に依存しなかったので、これら 2 つのRNAに関してはK_{M2}とnの値は求めることができなかった（表 3.1）。私達は、その他 5 つのRNAについての実験データを、式 3.7 と求めた値 α = 0.20 を用いてフィットし、K_{M2}とnの値を求めた（図 3.3A、表 3.1）。結果、nはRNAの長さNに正比例しており、その関係はn = 0.0038Nであった（図 3.3B）。これは、RNAは平均 263 塩基あたりに 1 つの非生産的結合の結合部位を持っているということである。逆に、[E_{280}]を大きくしたときに、[R_{sat}]/[E_{280}]の値が長いRNAほど小さくなるのは、長いほど非生産的結合のサイト数が多くなるからということでよく説明できると言える。K_{M2}の値には大きな標準誤差がついてはいるが、RNAの長さとの相関は観測されず、5 つのRNAの平均値は 30 ± 23 nMであった（表 3.1）。

3.4.5. 線形期の解析

図3. 3

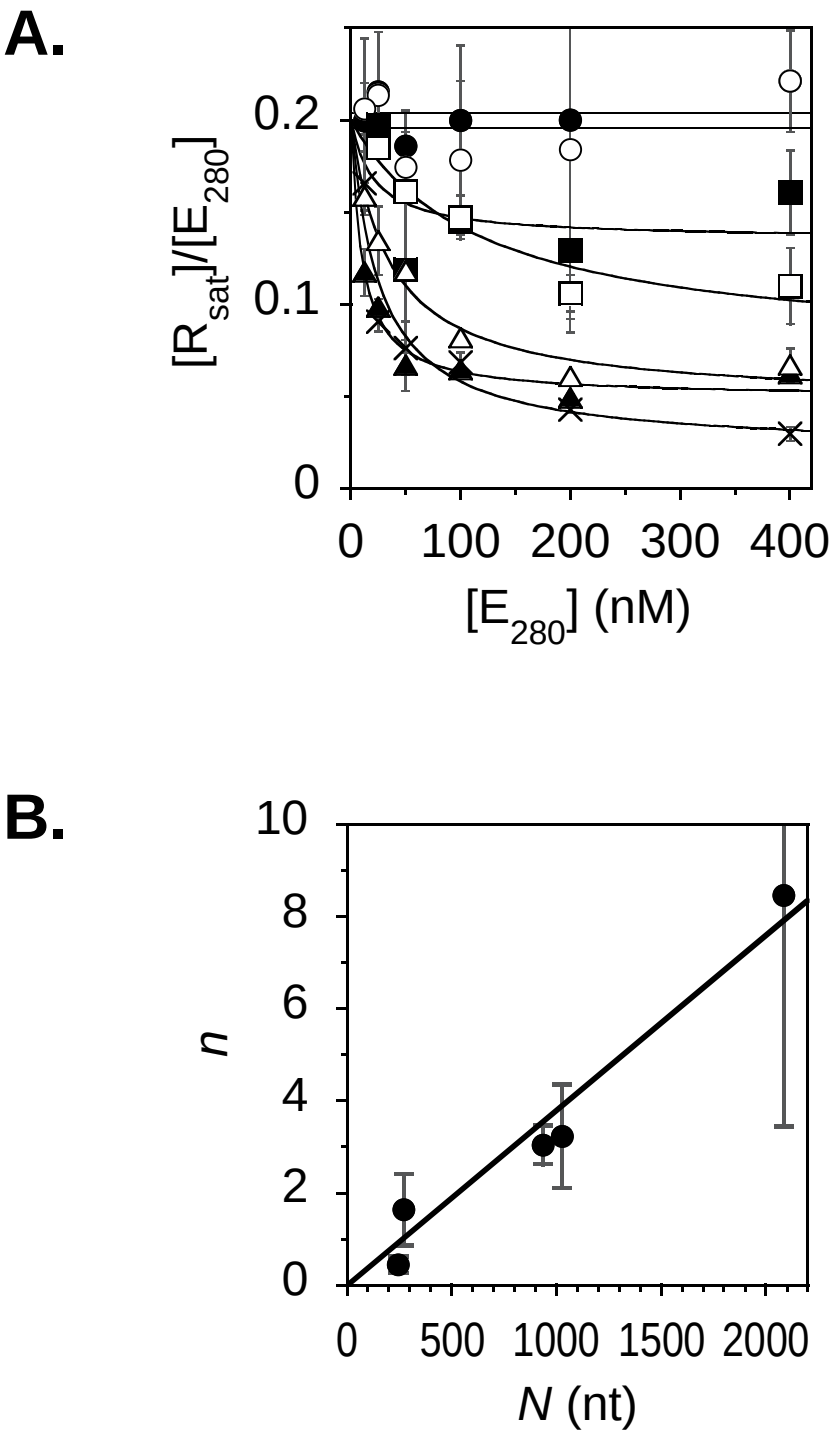


図3.3. 飽和点の解析。A. [Rsat]/[E_{280}] の酵素濃度依存性。それぞれ以下のRNAの複製反応の結果： S130 (●)、S222 (○)、MDV-poly (■)、MDV-T12 (□)、MDV-CAT (▲)、MDV-dBETA (△)、MDV-BETA (×)。実線は、それぞれの反応の結果を式3.7にフィットしたもの。 求まったnとK_{M2}/αの値は表3.1に示してある。B. nとNの関係。実線は直線回帰。その傾きは0.0038/ntであり、1塩基あたりの平均非生産的結合サイトの数を意味する。

私達は、線形期を解析することで、Ki (=k_{-2}/k_2)の値を得、また指数期・飽和点での結果との一貫性を確かめた。線形期の解析には、酵素濃度よりも大きい初期濃度のRNAを加えた反応を用いた。このような条件下では、反応は開始からずっと線形期になる。線形期の間、制限物質は酵素であり、反応速度は実働酵素濃度に比例する。実際、このような線形期から開始される反応における初期速度は、加えた酵素濃度[E_{280}]に対して正比例の関係があった（データ不掲載）。したがって、反応速度を計測することで、実働酵素濃度の変動を観測することが可能であり、これによりKiを求めることができた。

図 3.4Aにおける黒破線は 100 nM S222 RNAと 10 nMの酵素によって開始した反応のRNAの経時変化である。黒丸は、その反応速度$V(t)$の経時変化を片対数表記で示している。反応速度$V(t)$について、線形後期（late stage in linear phase）に単一指数減少（片対数表記における線形現象）、および線形前期（early stage in linear phase）にその単一指数減少からのズレが観察された（図 3.4A）。その指数減少と指数減少からのズレはそれぞれ、酵素失活と非生産的結合に起因すると考えられる。この仮定の下、ある反応時間tにおける反応速度$V(t)$は式 3.12 で記述できる（資料と方法参照）。式 3.12 において、k_{inact}は酵素の失活速度定数、Kiはk_{-2}/k_2であり酵素と非生産的結合部位との解離定数である。式 3.12 は反応速度の経時変化の結果をよくフィットすることができ、用いた速度論モデルと仮定の正当性を示唆している（図 3.4Aの黒実線）。また、フィットの結果からk_{inact} = 0.012 ± 0.002/minが求まった。この値は図 3.5Aの、独立の実験で求めたk_{inact}の値とほぼ一致した（詳細は次の説を参照）。さらに、この線形後期に観察される単一指数減少の値は、酵素とRNAのどちらの濃度にも依存しないことからも、この単一指数減少は酵素の失活に起因すると考えられる[21, 22]。

理想的には、式 3.12 による$V(t)$（図 3.4A、黒丸）のフィットは、$k_{cat}\cdot\alpha$、$n\cdot k_2\cdot K_M$、k_{-2}、k_{inact}の値を使用した 7 種のRNA全てについて得ることができ、これらに加えてnとK_Mの値を用いてKiの値を求めることができる(Ki = k_{-2}/k_2)。しかしながら、RNAに対して酵素が少ないことによるRNA増加率の低さ（長いRNAについては特に低い）から、リアルタイムデータの誤差は大きくなり、式 3.12 でフィットするには十分の精度が得られない（詳細は資料と方法を参照）。よって、私達は 7 種のRNA全てについてKiを求めるために、別の手法を用いた。まず求めた値k_{inact} = 0.012/minを用いて、酵素失活の影響を除いた反応速度$V_{cor}(t) = V(t)\cdot\exp(k_{inact}\cdot t)$をを求めた（図 3.4Aの×、式 3.11 と 12 を参照）。ここで、初期と定常状態（late stage）での$V_{cor}(t)$は、それぞれVcor(0) = $k_{cat}\cdot\alpha\cdot[E_{280}]$、$V_{cor}(\infty) = k_{cat}\cdot\alpha\cdot[E_{280}]/(n\cdot K_M/K\text{i} + 1)$と記述できる（式 3.11 参照）。これらから、$K\text{i} = n\cdot K_M/(V_{cor}(0)/V_{cor}(\infty) - 1)$である。よって、妥当な精度で求めることができる$V_{cor}(0)$と$V_{cor}(\infty)$を測定し（資料と方法を参照）、指数期で求めた$K_M$の値および飽和点から導いた関係式$n = 0.0038N$を用いて、7 つの全てのRNAについて$K$iを求めることができた（表 3.1）。$K_M$や$K_{M2}$同様、$K$iとRNAの長さとは相関が観察されなかった。また 7 つのRNAの平均値は 5.4 ± 3.9 nMであり、これもK_MやK_{M2}の平均値（それぞれ 2.9 ± 1.6 と 30 ± 23 nM）だけで

図3. 4

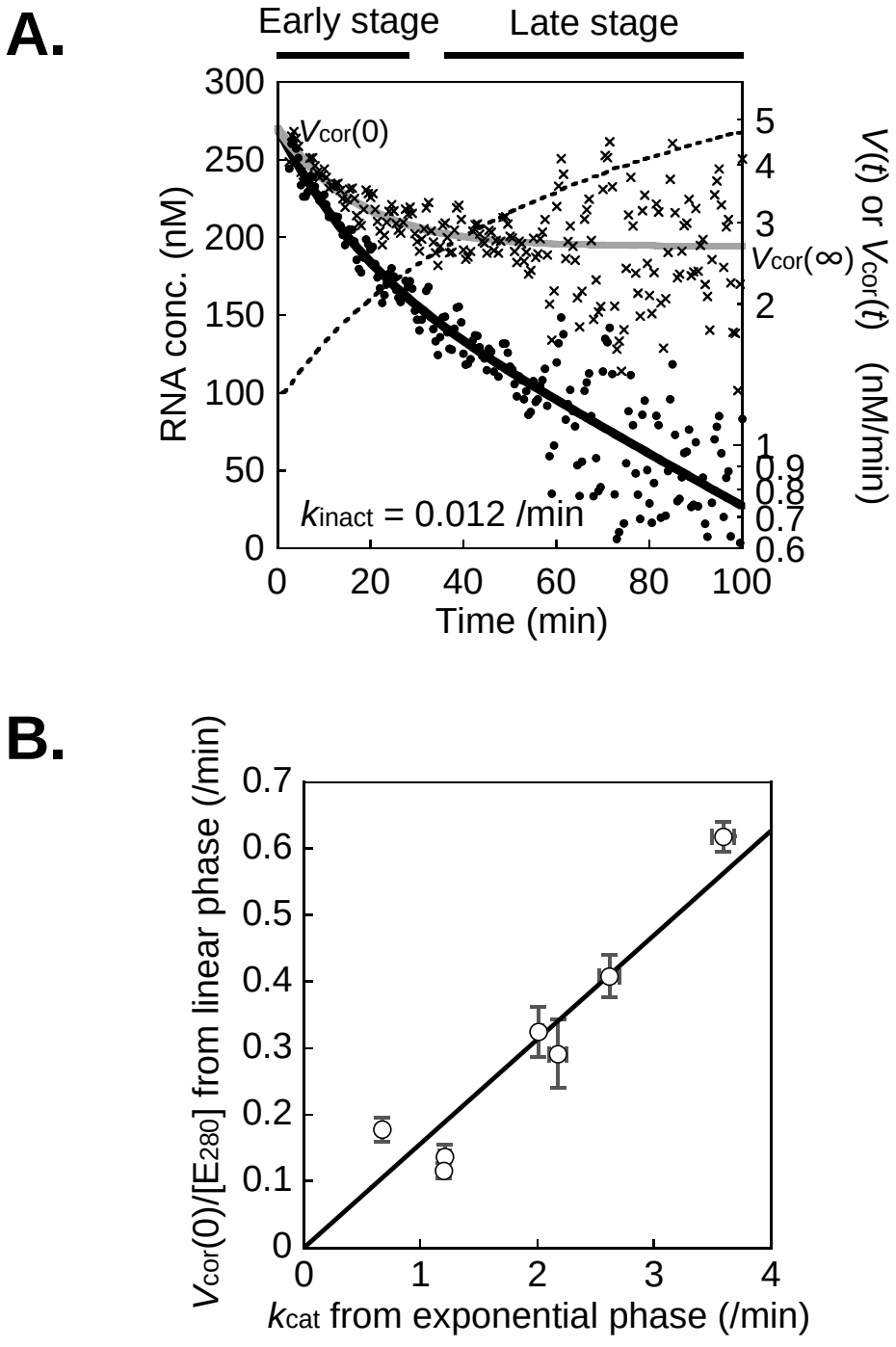


図3.4. 線形期の解析。A. 線形期から開始した反応の経時変化。100 nMのS222RNAと10 nMの酵素を用いた反応の結果である。黒色破線、●、×はそれぞれ、RNA濃度（左軸）、反応速度（右軸）、酵素失活補正後反応速度（右軸）であり、黒色実線は●を式3.12にフィットした結果。これにより、$k_{cat}\alpha$, $n \cdot k_2 \cdot K_M$、k_{-2}、 k_{inact} はそれぞれ0.48 ± 0.02/min、0.030 ± 0.005/min、0.036 ± 0.012/min、0.012 ± 0.002/minともとまった。灰色実線はこの結果を用いた酵素失活補正後速度（式3.11）。B. 7種のRNAに関する、$V_{cor}(0)/[E_{280}]$ と k_{cat}の関係。$V_{cor}(0)/[E_{280}]$とk_{cat}はそれぞれ、線形期と指数期の解析から求まったもの。実線は線形回帰であり、その傾きから α = 0.16が求まった。これは飽和点で求めた α = 0.20とよく一致した。

なく、先行研究で調べられた様々なRNAと酵素の解離定数とも同様のオーダーであった。原理的には、k_2とk_{-2}の値はそれぞれ、$k_2 = 2\ k_{cat}/(K_{M2}\text{-}K\mathrm{i})$および$k_{-2} = k_2 \cdot K\mathrm{i}$として求めることができる。しかしながら、$K_{M2}$に大きな標準誤差があるため（表 3.1）、それぞれのRNAについて正確には求めることができない。しかしながら、全てのRNAの平均値を用いて求めると、k_2/nM/min及びk_{-2}/minはどちらも 0.1 のオーダーであった。一方で、k_1の値は、$k_1 = (k_{-1} + k_{cat})/K_M > k_{cat}/K_M$と記述することができる。私達が$k_{-1}$の値を知る術はなかったが、少なくとも$k_1$は$k_{cat}/K_M$（平均して 1/nM/minのオーダー、表 3.1 参照）よりも大きいということが言える。これらの推定値、$k_2 \approx 0.1$/nM/minおよび$k_1 > 1$/nM/min（生産的結合の会合は非生産的結合よりも十分に速い）は、線形初期に観察される$V_{cor}(t)$の減少を次のように説明することができる。反応直後は、生産的結合の会合が非生産的結合よりも十分に速い（$k_1 >> n \cdot k_2$）という理由から、ほとんどの酵素が生産的結合部位に結合し、初速度$V_{cor}(0)$が大きくなる。その後、酵素は徐々に非生産的結合部位にも結合していき、定常状態に達する。つまり、生産的結合及び非生産的結合部位に結合している酵素の比が 2 つの平衡定数で記述できる状態になる（具体的には生産的 : 非生産的= $K\mathrm{i}/n : K_M$）。このようにして、$V_{cor}(0)$から$V_{cor}(\infty)$への$V_{cor}(t)$のゆるやかな減少が観察され、それらの比から$K\mathrm{i}$が求まったということである。

私達のモデルの正当性を確かめるため、指数期および飽和点での解析と、線形期での解析の一貫性を確かめた。線形期で求めた$V_{cor}(0)$と、指数期で求めたk_{cat}および飽和点で求めたaの関係は、$V_{cor}(0)/[E_{280}] = \alpha \cdot k_{cat}$である。実際に、それぞれのRNAにおける$V_{cor}(0)/[E_{280}]$と$k_{cat}$には正比例の関係があり（図 3.4B）、線形期と指数期の解析に一貫性があることが示された。さらに、その傾きから、αの値は 0.16 と求められた。これは飽和点で求められた$\alpha = 0.20$ とよく一致する結果であった。3 種の異なる実験結果をそれぞれによくフィットできただけでなく、これらから得られた値が一つのモデルに従ったという点において、私達のモデルの正当性をさらに示すことができたといえる。

3.4.6. 酵素失活の解析

私達は、線形期に見られる速度の単一指数減少が酵素失活の影響であるかどうかを調べた。Qβレプリカーゼは生成した状態で安定であることが知られている[3]。一方で、グアニンヌクレオチドはその失活を速くすることも知られている[46]。そこで、私達は酵素失活速度定数に対する、複製反応溶液中に含まれるGTPの影響、ならびにその他のグアニンヌクレオチド（GDPとGMP）の影響を調べた。

失活速度定数は、酵素の反応前 37℃処理による活性酵素率の減少により測定した。反応前 37℃処理後の活性酵素率は、活性酵素濃度と正比例の関係にあることがわかっている（データ不掲載）線形期から始まる反応の初速度から求めた。私達はまず、複製反応のうち、4 種類のNTPのうちどれか一つ、もしくは全てを抜いただけの条件で失活速度定数を求めた。図 3.5Aは 37℃処理における酵素失活の経時変化を片対数表記で示

図3.5

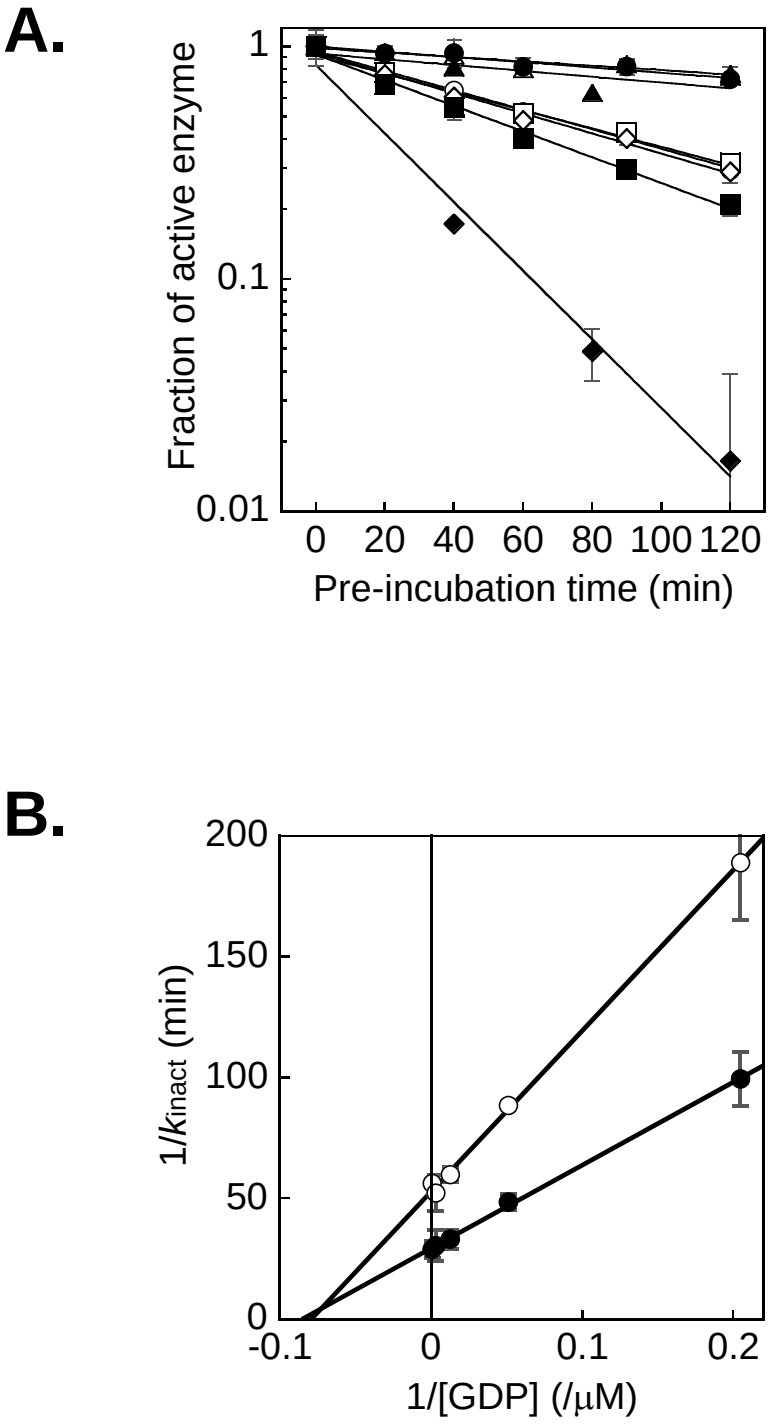


図3.5. Qβレプリカーゼの失活。A. 酵素失活の経時変化。それぞれ、以下のモノヌクレオチド存在下での結果：何もなし(●)、U・C・GTP (○)、A・C・GTP (□)、 A・U・ GTP (◇)、A・U,・CTP (△)、GTP (■)、GDP (◆)、GMP (▲)。それぞれのモノヌクレオチドの濃度は1.25 mMである。実線は単一指数関数へのフィットであり、これによってもとまった失活速度定数は表3.2にまとめた。B. 失活速度のGDP依存性のLineweaver-Burkプロット。●、○はそれぞれ、NTP非存在下での結果、A・U・CTPがそれぞれ1.25 mM存在下での結果。実線は直線回帰であり、ここから$k_{inactmax}$、K_{MGDP}、K_{iNTP}が求まった（結果は本文に記載）。

している。また、図 3.5Aの結果から求めた失活速度定数は表 3.2 に示した。これらの結果から、複製反応溶液と同様の、GTP存在下での失活速度定数はどれも 0.01/min程度であり、図 3.4Aで求めた値（0.012 ± 0.002/min）とよく一致する。複製反応から求めた値（図 3.4A）が反応前 37℃処理から求めたもの（図 3.5A）よりも少し大きいのは、実験誤差だけでなく、polymerase arrest[47]等の他の失活機構が関与しているかもしれない。一方で、GTP非存在下では、失活速度定数はGTP存在下に比べて極端に低く、0.002/min程度であった。さらに、GDPは 0.038/minまで上昇させ、GMPは影響がないことも明らかになった（図 3.5A、表 3.2）。先行研究では、このように失活速度定数は求められておらず、定性的な結果のみが示してあった[46]が、今回の結果は定性的にはそれとよく一致するものであった。

GDP存在下での失活はGTP存在下のものよりも著しく速かったため、私達はGDP依存的な失活について更なる実験を行った。先行研究において、GDP依存的失活はQβレプリカーゼのサブユニットであるEF-TuとGDPとの結合に起因すると報告されている[46]。一方で、βサブユニットは伸長反応を触媒することが知られているため、NTPと結合すると考えられる。よって、私達は様々なGDP濃度で、3 種のNTP存在下（ATP、CTP、UTPそれぞれ 1.25 mM）において失活速度定数を求めることで、GDP依存性失活に対するNTPの影響を調べた。図 3.5Bは、その結果のLineweaver-Burk plotであり、NTPがGDP依存性失活を非競争的に阻害していることを示している。さらに、最大失活速度定数 k_{inactmax}、GDP依存性失活のミカエリス定数K_{MGDP}、NTPによる失活阻害定数$K\mathrm{i}_{\mathrm{NTP}}$（GDP依存的失活の阻害におけるNTPの解離定数、ただしATP、CTP、UTP混合）はそれぞれ 0.034/min、12 μM、4.7 mMと求められた。同様に、私達は 4 種のNTPそれぞれの$K\mathrm{i}_{\mathrm{NTP}}$を、ATP、CTP、UTP、GTPの順にそれぞれ 15.2 ± 0.2、8.3 ± 0.1、3.6 ± 0.3、5.5 ± 0.1 mMと求めた。これらはGTPを含め、4 つのNTPは大差なくGDP依存性失活を阻害することを示している。分子機構は明らかではないが、Qβレプリカーゼの安定性はNTP（宿主大腸菌内では 1 mMオーダー[48]）とGDPの両濃度によって制御されうることが明らかになった。NTPとGDP濃度のバランスはQβファージの感染および増幅の制御機構に使われているのかもしれない。

3.5. 考察

3.5.1. 第3 章の結論

本研究で、私達はQβレプリカーゼによるRNA増幅の全過程を、非生産的結合を考慮した簡単な速度論モデルに基づいて解析し、そのモデルが指数期、飽和点、線形期という反応の全過程から得られる結果をよく説明できることを示した。私達のモデルは今まで未解決であった 3 つの点も説明することができる。1 つめは、ファージゲノムRNA複製の際に、ゲノムRNA自身によって何らかの阻害を受け[26, 27]、その阻害は酵素とゲノム

RNA濃度のどちらにも依存せず、酵素とRNAの比に依存するというものである。これは非生産的結合のアフィニティーが生産的結合よりも高いとき（Ki/nがK_Mよりも小さいとき）、つまりゲノムRNAなどの長いRNAの場合、これによる競争的な阻害によって説明できる。2 つめは、線形期における速度減少[5, 28]であり、これは鋳型RNAによる不競争阻害の効果によると説明されていた[11]。その先行研究のような不競争阻害の場合、阻害の効果及び反応速度はRNA濃度に依存するはずである。しかしながら、速度減少はRNA濃度に非依存的であった（データ不掲載）。これは上記のゲノムRNAの阻害[26, 27]の際にも同様である。私達のモデルでは、この点は非生産的結合と酵素失活の両方による実働酵素濃度の減少によって説明することができる。3 つめは、触媒速度定数k_{cat}が指数期と線形期で異なって観測されるということである。これは、全ての酵素が活性を持っている（つまり、$\alpha = 1$）[5]であるという仮定の下に観察されたものである。この過程は明らかに適当ではなく、活性酵素濃度を大きく見積もりすぎることになる。結果の節にあるように、線形期では反応速度は酵素濃度に比例していると考えられるため、活性酵素濃度の過大評価がk_{cat}の過小評価につながる。一方で、指数期ではk_{cat}は酵素濃度に依存せずに求まるため、k_{cat}は線形期と指数期で異なるという結論になったと考えられる。私達の結果からは、$\alpha \neq 1$ であり、k_{cat}は反応全過程を通して一定であると考えるほうが適当である。

3.5.2. 求めたミカエリス定数の値に対する考察

速度論モデルを提唱しただけでなく、私達はさまざまなRNAについての複製反応の、様々な速度論定数を求めた（表 3.1）。まずは、ミカエリス定数K_Mが 1 nMオーダーであったことの意味を議論する。Qβファージの感染経路の第 1 段階は、ゲノムRNAの侵入である。この際、多重感染は少なく、1 分子のみのゲノムRNAが侵入することが知られている[1]。その後、レプリカーゼが翻訳され、ゲノムRNA複製と新しいRNAからのレプリカーゼ翻訳が同時に行われてゲノムRNAが増幅されていく。ある程度増幅した後は大腸菌内の濃度が高いため、RNAとレプリカーゼは容易に結合するが、ゲノムRNA侵入直後はRNAが 1 分子で、レプリカーゼも数えられる分子数程度にしか翻訳されていないと考えられるため、このときが最も濃度が低く結合が困難であると考えられる。このとき、大腸菌の体積は 1 fLオーダーである[49]ので、その中に 1 分子存在したときの濃度は 1 nMオーダーである。ここで、RNAとレプリカーゼのミカエリス定数が 1 nMオーダーであることは、ゲノムRNA侵入直後であっても十分に結合するに最低限のアフィニティーであるということである。大腸菌内に 1 分子存在するときの濃度と、ミカエリス定数の一致は偶然かもしれないが、Qβファージが進化の過程でこのアフィニティーを得たと考えると納得がいく。それは、高いアフィニティーを持つことは難しく、このアフィニティーを進化の過程において選択されて得たのであれば、必要以上のアフィニティーに対する選択はかからず、ちょうど必要最低限のアフィニティーになると考えられるか

らである。この考察が他のゲノム複製酵素よりも、Qβレプリカーゼについて有効である理由は、Qβレプリカーゼが単体でゲノムを再帰的に複製することができる珍しい酵素だからである。通常のゲノム複製酵素では、つまり大腸菌DNAポリメラーゼや、Qβ同様RNAファージのφ6 由来のRNAレプリカーゼであっても、ゲノムを再帰的に複製するには複合体（多量体ではない）を形成する必要があり、このように簡単に考察できないことに注意されたい。

3.5.3. 速度論定数と RNA 長の関係

私達は速度論定数を直接求めただけでなく、触媒速度定数の逆数 $1/k_{cat}$とRNAの長さNの比例関係（図 3.2C）、および 1 分子のRNA上に存在する非生産的結合部位数nとNの比例関係（図 3.3B）を示した。これらにより、k_{cat}とnの値をRNAの長さNから予測することができるようになった。これらk_{cat}とnの値は、Qβファージ増幅の理解や、Qβレプリカーゼの工学的利用のための重要な情報である。私達の推定では、Qβファージゲノムのk_{cat}は 0.006/sであり、先行研究において計算機シミュレーションにより求められた値 0.01/sともよく一致する[14, 50]。また$n = 0.0038N$より、以下に記す非生産的結合による 2 つの影響の大きさを予測することができる。第 1 に、指数期は長いRNAほど短くなる。正確には、RNA増幅は、RNA濃度が実働可能酵素濃度と等しくなったとき（つまり[Rsat] ≈ [Et]/(1+n)のとき、式 3.7 参照）に指数期の終わり、すなわち飽和点を迎える。第 2 に、RNA分子あたりの非生産的結合のアフィニティーは長いRNAほど強くなり、線形期での著しい速度低下を引き起こす。正確には、1 分子あたりの非生産的結合の解離定数はKi/nであり、nとRNAの長さNは正比例の関係にあるとすると、RNAが長くなるほどKi/nは小さくなる。これらの推定は、本研究で用いた 7 種全てのRNAよりも長い、4217 塩基長のQβファージのゲノム増幅の困難さを暗示している。

3.5.4. 宿主大腸菌内での非生産的結合の影響

長いRNAほどたくさんの非生産的結合部位を持っているという理由から、非生産的結合は宿主大腸菌内でのQβファージゲノム複製の際に大きな影響をもたらしてうたであろう。そのうえ、宿主大腸菌はrRNA、tRNA、mRNAなどのRNAによって埋め尽くされており、これに対する非生産的結合もゲノム増幅を阻害したであろう。このようにたくさんの困難が考えられるが、Qβファージは実際に大腸菌内でゲノムを増幅することができる。私達の結果から、非生産的結合に対して生産的結合の方が会合が速いということが暗示されている。さらに、非生産的結合の遅い会合はQβファージの生活環における調節機構として使われているかもしれない。例えば、ゲノム増幅後、寄生RNA[3]の増幅を抑えるために非生産的結合によるレプリカーゼの不活化が必要なのかもしれない。または、非生産的結合がゲノムRNAを、複製にも遺伝子発現にも必須である一本鎖状態に保っているかもしれない。明らかに、大腸菌内の非生産的結合の役割についてさ

らなる理解が要求される。

3.5.5. Qβレプリカーゼの3量体について

Qβファージゲノムのプラス鎖RNAを鋳型としたマイナス鎖RNAの合成機構は、本研究で扱ったRNAの複製機構よりも複雑であることが知られている[51]。本研究で扱ったRNAや、ゲノムRNAのマイナス鎖を鋳型としたプラス鎖合成など、ゲノムマイナス鎖合成以外で知られている全ての増幅可能なRNAの合成には必要ないが、マイナス鎖合成にはS1 サブユニットとHfqタンパク質が必要であることが知られている[52]。本研究では、S1-lessのQβレプリカーゼを用いており（資料と方法を参照）、その点で大腸菌内とはことなる。それでもなお、非生産的結合は大腸菌内でも存在すると考えられる。なぜなら、S1 サブユニットをもつ 4 量体Qβレプリカーゼも、増幅可能か否かによらず、様々なRNAに結合することが知られており[4, 22]、Hfqタンパク質は、Qβレプリカーゼとゲノムプラス鎖の 3'末端との結合を仲介するだけである[53]ことが知られているからである。

3.5.6. 非生産的結合の分子機構

Qβレプリカーゼについての報告は無いが、非生産的結合（nonspecific bindingとしても知られる[37, 54]）による競争阻害自体は他の酵素について古くから知られている[35]。本研究において、1 分子のRNAに存在する非生産的結合部位数nがRNAの長さNと正比例する（$n = 0.0038N$、図 3.3B）ことの機構は明らかではない。しかしながら、主に以下の 2 つの可能性がある。1 つめは、非生産的結合部位はピリミジン連鎖（連続したCもしくはU塩基の配列）であり、これがRNAの長さに比例して存在するというものである。Qβレプリカーゼは 2 つのRNA結合部位をもち（結合部位IとII）、そのうちサイトIIはサブユニットEF-Tuにあり[4]、ピリミジン連鎖と高いアフィニティーを持つことが知られている[22]。また、Qβレプリカーゼとポリピリミジン（7 及び 20 塩基長）の解離定数は 1–10 nMと知られており[22]、本研究における非生産的結合の 1 サイトあたりの解離定数（平均 5.4 nM、表 3.1）とよく似ている。さらに、本研究で使用したRNA全てのプラス鎖及びマイナス鎖に存在する 7 連ピリミジン配列の数と、求めたnには比例関係があり、その傾きは 0.94（$R^2 = 0.77$）であった。このことは 7 連ピリミジン配列が非生産的結合部位である可能性があることを示唆している。このことは 6 連や 8 連に関しては当てはまらないので、7 連以上であることがレプリカーゼの結合に特殊な役割をもっているということになることに注目されたい。もう 1 つの可能性としては、nはRNA上にレプリカーゼが並んで結合する際の、立体障害による上限によって決定されているということである。この場合、私達の結果から、Qβレプリカーゼは平均して 263 塩基のRNAに対して 1 分子結合できるということになる（$n = 0.0038N$から、図 3.3B）。これは、RNAが高次構造をとらず伸びた状態であれば、Qβレプリカーゼは約 90 nmのRNA[55]に 1 分子結合しうることに相当する。RNAは一般的には伸びた状態では存在せず、かなりコンパクト

に折りたたまれた状態で存在するものなので、263 塩基長というのは 90 nmよりもかなり短くなっていると考えるのが妥当であろう。Qβレプリカーゼの直径は知られていないが、サブユニットであるEF-TuとTsの複合体は約 10 nmであることが知られている[56]ので、Qβレプリカーゼは 10 nmよりも少し大きい程度と考えられる。よって、もし 263 塩基のRNAがQβレプリカーゼの直径と同等の長さ（約 10 nm）であるのならば、n = 0.0038Nの関係は立体障害によって決まっていると考えることができる。ここで、もしn = 0.0038Nが立体障害によって決まっているのであれば、本研究で求めたnの値（またそれに伴い 0.0038 という値）は小さく見積もられている可能性がある。これは最蜜充填（酵素間の隙間無く、RNAが酵素によって埋め尽くされている状態）になることの難しさによるもので、詳しくは過去の研究[57]を参照されたい。いずれにせよ、非生産的結合の分子機構については更なる研究が必要である。

3.5.7. 非生産的結合による伸長反応の阻害

私達は非生産的結合は同じRNA上における酵素の伸長反応を阻害せず、k_{cat}には影響しないと仮定した。この過程は実験結果から以下のように正当化されている。指数期において、非生産的結合部位に結合している酵素（E-Rn）の割合は酵素濃度を上げていくにしたがって上がっていく（式 3.6 参照）。もし非生産的結合が伸長反応を阻害するなら、指数増幅率k_{obs}は酵素濃度をあげるにしたがって下がっていくはずである。しかしながら、実験結果においてk_{obs}は下がっていかなかった（図 3.2B）。このように、非生産的結合による伸長反応阻害は観測されず、もしあったとしても、その効果は無視できるほど十分に小さかったといえる。

3.5.8. 二本鎖合成反応

本研究の目的は、可能な限り簡単にRNA増加過程を説明することである。よって、私達はその存在が知られているRNAのプラス・マイナス鎖の非対称性[25]、および二本鎖合成反応[24]を考慮に入れなかった。実際、私達はいくつかのRNAについてプラス・マイナス鎖の間に速度論定数の違いを観測した。また、それ以降は鋳型となることができない二本鎖RNAの合成も確認した。私達はRNAの相補鎖間の非対称性を無視したので、本研究で求めた値は相補的な 2 つの鎖の平均値を求めたといえる。二本鎖合成反応は、新しく合成されたRNAが、伸長反応直後、鋳型RNAと解離する前に鋳型RNAと完全な二本鎖を形成する反応である。この二本鎖合成反応率、つまり新規RNA合成後、一本鎖として遊離されずに二本鎖を形成してしまう確率は、RNAの構造に依存し[23]、指数増幅率k_{obs}に影響するということが知られている[58]。よって、本研究で求められたk_{cat}の値（これに伴いk_{pol}とk_{others}も）及びaは二本鎖合成反応を考慮することによって影響を受ける。先行研究[58]によると、二本鎖合成反応を考慮すると、真のk_{cat}及びαは、私達が求めたk_{cat}とαを用いるとそれぞれk_{cat} /(1-2d)およびα·(1-2d)と記述することができる。ただし、dは

二本鎖合成率である。二本鎖は伸長反応直後に新規RNAと鋳型RNAが二本鎖形成することによってできるのみで、遊離の 2 つの相補鎖が溶液中で結合して二本鎖を形成することは無いと仮定すると、dの値は全RNA分子数に対する二本鎖RNA分子数の比率として求めることができる。本研究で使用した 7 つ全てのRNAについて、ゲル電気泳動によってdの値を求めたところ、RNA間の違いはほとんどなく、0.2–0.3 程度であった（データ不掲載）。よって、全てのRNAについてのk_{cat}および活性酵素率aはそれぞれ、最大で約 2 倍程度過小および過大評価されているかもしれない。ここで求めたdの値は過大評価されている可能性があることに注意されたい。なぜなら、ゲル電気泳動で観察した二本鎖RNAが、二本鎖合成反応によってできたものであるかどうかは断定できないからである。つまり、溶液中で二本鎖形成したかもしれないし、複製反応を中断したことによって、伸長直後のRNAが二本鎖を形成してしまったのかもしれないなどは免れないということである。よって、k_{cat}やαのズレは 2 倍よりも小さいといえる。一方で、図 3.2Cにみられる $1/k_{cat}$とNの関係及び図 3.4Bに見られる$V_{cor}(0)/[E_{280}]$とk_{cat}の関係、さらに飽和点でもとまったαと図 3.4Bの傾きの値との一致性は、二本鎖合成反応があろうとなかろうと影響しないことに注意されたい。

3.5.9. まとめと展望

私達はQβレプリカーゼによるRNA複製の実験結果をよく説明できる速度論モデルを提唱し、様々な速度論定数を求めた。本研究は非生産的結合を初め、特殊な酵素失活など、Qβファージについて新しい見解をもたらした。またRNAの長さからk_{cat}および非生産的結合部位数が推定できること、その他様々な平衡定数のオーダーを与えたことなど、Qβレプリカーゼの応用の際に役立つ情報を提供した。Qβレプリカーゼについての更なる研究、特に 3 次元構造の解明[59, 60]などが、酵素反応の分子メカニズムのさらなる理解のために期待されるところである。

3.6. 参考文献

1. Calendar, R. The bacteriophages, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2006).
2. Haruna, I. & Spiegelman, S. Specific template requirments of RNA replicases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **54**, 579-587 (1965).
3. Chetverin, A.B. & Spirin, A.S. Replicable RNA vectors: prospects for cell-free gene amplification, expression, and cloning. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **51**, 225-270 (1995).
4. Brown, D. & Gold, L. RNA replication by Q beta replicase: a working model. *Proc Natl*

Acad Sci U S A **93**, 11558-11562 (1996).

5. Biebricher, C.K., Eigen, M. & Luce, R. Kinetic analysis of template-instructed and de novo RNA synthesis by Q beta replicase. *J Mol Biol* **148**, 391-410 (1981).
6. Tretheway, D.M., Yoshinari, S. & Dreher, T.W. Autonomous role of 3'-terminal CCCA in directing transcription of RNAs by Qbeta replicase. *J Virol* **75**, 11373-11383 (2001).
7. Yoshinari, S. & Dreher, T.W. Internal and 3' RNA initiation by Qbeta replicase directed by CCA boxes. *Virology* **271**, 363-370 (2000).
8. Brown, D. & Gold, L. Selection and characterization of RNAs replicated by Q beta replicase. *Biochemistry* **34**, 14775-14782 (1995).
9. Zamora, H., Luce, R. & Biebricher, C.K. Design of artificial short-chained RNA species that are replicated by Q beta replicase. *Biochemistry* **34**, 1261-1266 (1995).
10. Ugarov, V.I., Demidenko, A.A. & Chetverin, A.B. Qbeta replicase discriminates between legitimate and illegitimate templates by having different mechanisms of initiation. *J Biol Chem* **278**, 44139-44146 (2003).
11. Biebricher, C.K., Eigen, M. & Gardiner, W.C., Jr. Kinetics of RNA replication. *Biochemistry* **22**, 2544-2559 (1983).
12. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A. & Ugarov, V.I. Nonhomologous RNA recombination in a cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell* **88**, 503-513 (1997).
13. Mills, D.R., Peterson, R.L. & Spiegelman, S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 217-224 (1967).
14. Eigen, M., Biebricher, C.K., Gebinoga, M. & Gardiner, W.C. The hypercycle. Coupling of RNA and protein biosynthesis in the infection cycle of an RNA bacteriophage. *Biochemistry* **30**, 11005-11018 (1991).
15. Biebricher, C.K., Eigen, M. & Luce, R. Template-free RNA synthesis by Q beta replicase. *Nature* **321**, 89-91 (1986).
16. Abramson, R.D. & Myers, T.W. Nucleic acid amplification technologies. *Curr Opin Biotechnol* **4**, 41-47 (1993).
17. Morozov, I.Y., Ugarov, V.I., Chetverin, A.B. & Spirin, A.S. Synergism in replication and translation of messenger RNA in a cell-free system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9325-9329 (1993).
18. Tyagi, S., Landegren, U., Tazi, M., Lizardi, P.M. & Kramer, F.R. Extremely sensitive, background-free gene detection using binary probes and beta replicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5395-5400 (1996).
19. Mills, D.R. & Kramer, F.R. Structure-independent nucleotide sequence analysis. *Proc*

Natl Acad Sci U S A **76**, 2232-2235 (1979).

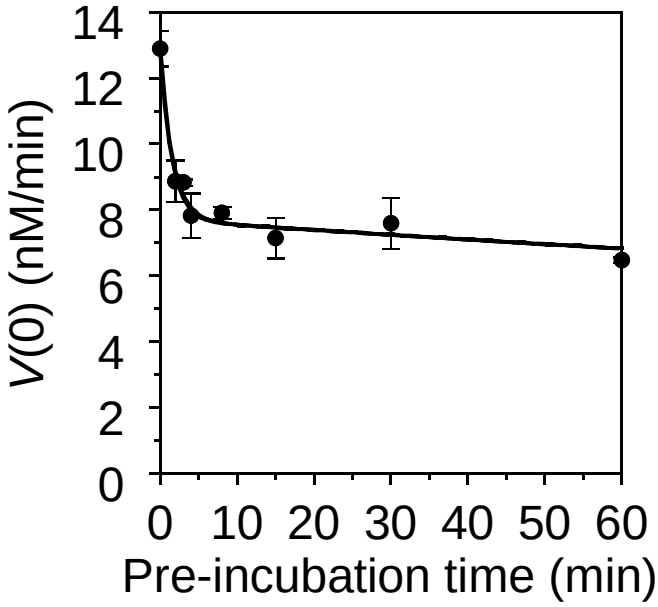
20. Kopsidas, G., Roberts, A.S., Coia, G., Streltsov, V.A. & Nuttall, S.D. In vitro improvement of a shark IgNAR antibody by Qbeta replicase mutation and ribosome display mimics in vivo affinity maturation. *Immunol Lett* **107**, 163-168 (2006).
21. Werner, M. Kinetic and thermodynamic characterization of the interaction between Q beta-replicase and template RNA molecules. *Biochemistry* **30**, 5832-5838 (1991).
22. Preuss, R., Dapprich, J. & Walter, N.G. Probing RNA-protein interactions using pyrene-labeled oligodeoxynucleotides: Qbeta replicase efficiently binds small RNAs by recognizing pyrimidine residues. *J Mol Biol* **273**, 600-613 (1997).
23. Axelrod, V.D., Brown, E., Priano, C. & Mills, D.R. Coliphage Q beta RNA replication: RNA catalytic for single-strand release. *Virology* **184**, 595-608 (1991).
24. Priano, C., Kramer, F.R. & Mills, D.R. Evolution of the RNA coliphages: the role of secondary structures during RNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **52**, 321-330 (1987).
25. Biebricher, C.K., Eigen, M. & Gardiner, W.C., Jr. Kinetics of RNA replication: plus-minus asymmetry and double-strand formation. *Biochemistry* **23**, 3186-3194 (1984).
26. Inokuchi, Y. & Kajitani, M. Deletion analysis of Qbeta replicase. Participation of the carboxyl-terminal region of the beta-subunit protein in template recognition. *J Biol Chem* **272**, 15339-15345 (1997).
27. Kondo, M. & Weissmann, C. Inhibition of Q replicase by excess template. *Eur J Biochem* **24**, 530-537 (1972).
28. Palmenberg, A. & Kaesberg, P. Synthesis of complementary strands of heterologous RNAs with Qbeta replicase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 1371-1375 (1974).
29. Nakaishi, T., Iio, K., Yamamoto, K., Urabe, I. & Yomo, T. Kinetic properties of Qbeta replicase, an RNA dependent RNA polymerase. *J Biosci Bioeng* **93**, 322-327 (2002).
30. Kita, H. et al. Functional Qbeta replicase genetically fusing essential subunits EF-Ts and EF-Tu with beta-subunit. *J Biosci Bioeng* **101**, 421-426 (2006).
31. Inokuchi, Y., Kajitani, M. & Hirashima, A. A study on the function of the glycine residue in the YGDD motif of the RNA-dependent RNA polymerase beta-subunit from RNA coliphage Q beta 1. *J Biochem (Tokyo)* **116**, 1275-1280 (1994).
32. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V. & Munishkin, A.V. On the nature of spontaneous RNA synthesis by Q beta replicase. *J Mol Biol* **222**, 3-9 (1991).
33. Hosoda, K. et al. Kinetic analysis of the entire RNA amplification process by qbeta replicase. *J Biol Chem* **282**, 15516-15527 (2007).
34. Knuth, D.E. Two Notes on Notation. *Am Math Mon* **99**, 403-422 (1992).

35. Fersht, A. Structure and mechanism in protein science : a guide to enzyme catalysis and protein folding. (W.H. Freeman, New York; 1999).
36. Lin, S.Y. & Riggs, A.D. Lac repressor binding to DNA not containing the lac operator and to synthetic poly dAT. *Nature* **228**, 1184-1186 (1970).
37. Langowski, J., Pingoud, A., Goppelt, M. & Maass, G. Inhibition of Eco RI action by polynucleotides. A characterization of the non-specific binding of the enzyme to DNA. *Nucleic Acids Res* **8**, 4727-4736 (1980).
38. Thoma, J.A. & Koshland, D.E. Competitive Inhibition by Substrate during Enzyme Action. Evidence for the Inducedfit Theory. *J Am Chem Soc* **82**, 3329-3333 (1960).
39. Kacian, D.L., Mills, D.R., Kramer, F.R. & Spiegelman, S. A replicating RNA molecule suitable for a detailed analysis of extracellular evolution and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 3038-3042 (1972).
40. Mills, D.R., Dobkin, C. & Kramer, F.R. Template-determined, variable rate of RNA chain elongation. *Cell* **15**, 541-550 (1978).
41. Jia, Y. & Patel, S.S. Kinetic mechanism of transcription initiation by bacteriophage T7 RNA polymerase. *Biochemistry* **36**, 4223-4232 (1997).
42. Arnold, J.J. & Cameron, C.E. Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)). Assembly of stable, elongation-competent complexes by using a symmetrical primer-template substrate (sym/sub). *J Biol Chem* **275**, 5329-5336 (2000).
43. Lanchy, J.M., Ehresmann, C., Le Grice, S.F., Ehresmann, B. & Marquet, R. Binding and kinetic properties of HIV-1 reverse transcriptase markedly differ during initiation and elongation of reverse transcription. *Embo J* **15**, 7178-7187 (1996).
44. Narayan, S., Widen, S.G., Beard, W.A. & Wilson, S.H. RNA polymerase II transcription. Rate of promoter clearance is enhanced by a purified activating transcription factor/cAMP response element-binding protein. *J Biol Chem* **269**, 12755-12763 (1994).
45. Kuchta, R.D., Mizrahi, V., Benkovic, P.A., Johnson, K.A. & Benkovic, S.J. Kinetic mechanism of DNA polymerase I (Klenow). *Biochemistry* **26**, 8410-8417 (1987).
46. Blumenthal, T. Interaction of Q beta RNA replicase with guanine nucleotides. Different modes of inhibition and inactivation. *Biochim Biophys Acta* **478**, 201-208 (1977).
47. Susa, M., Sen, R. & Shimamoto, N. Generality of the branched pathway in transcription initiation by Escherichia coli RNA polymerase. *J Biol Chem* **277**, 15407-15412 (2002).
48. Albe, K.R., Butler, M.H. & Wright, B.E. Cellular concentrations of enzymes and their substrates. *J Theor Biol* **143**, 163-195 (1990).
49. Neidhardt, F.C. & Curtiss, R. Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology, Edn. 2nd. (ASM Press, Washington, D.C.; 1996).
50. Kim, H. & Yin, J. Energy-efficient growth of phage Q Beta in Escherichia coli.

Biotechnol Bioeng **88**, 148-156 (2004).

51. Klovins, J., Berzins, V. & van Duin, J. A long-range interaction in Qbeta RNA that bridges the thousand nucleotides between the M-site and the 3' end is required for replication. *RNA* **4**, 948-957 (1998).
52. Blumenthal, T. & Carmichael, G.G. RNA replication: function and structure of Qbeta-replicase. *Annu Rev Biochem* **48**, 525-548 (1979).
53. Schuppli, D. et al. Altered 3'-terminal RNA structure in phage Qbeta adapted to host factor-less Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10239-10242 (1997).
54. von Hippel, P.H., Revzin, A., Gross, C.A. & Wang, A.C. Non-specific DNA binding of genome regulating proteins as a biological control mechanism: I. The lac operon: equilibrium aspects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4808-4812 (1974).
55. Alberts, B. Molecular biology of the cell, Edn. 4th. (Garland Science, New York; 2002).
56. Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. & Leberman, R. The structure of the Escherichia coli EF-Tu.EF-Ts complex at 2.5 A resolution. *Nature* **379**, 511-518 (1996).
57. McGhee, J.D. & von Hippel, P.H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol* **86**, 469-489 (1974).
58. Davis, B.K. Significance of strand configuration in self-replicating RNA molecules. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **350**, 345-352 (1995).
59. Messias, A.C. & Sattler, M. Structural basis of single-stranded RNA recognition. *Acc Chem Res* **37**, 279-287 (2004).
60. Ortin, J. & Parra, F. Structure and function of RNA replication. *Annu Rev Microbiol* **60**, 305-326 (2006).

補足資料3.1



参考資料3.1. 異なる2種類の失活速度を持つ酵素。20 μ Mの酵素、100 nMのS222RNAを用い、反応溶液からNTPのみを除いた状態で、37℃で横軸に表記の時間だけ前処理した。その後氷上に5分間置いた後、NTPを加えて反応を開始し、その初速度を求めた。実線は、2つの失活速度が異なる酵素が存在していると仮定したときの式へのフィット（5.2 exp(-0.63 t) + 7.7 exp(-$k_{NTP(-)}$ t) 、ただしtは前処理時間、$k_{NTP(-)}$は本文で求めたNTPなしでの失活速度（0.002/min を用いた、図3.5Aおよび表2.2参照）。

第 4 章： Qβレプリカーゼによる リポソーム内RNA複製反応の確率論的解析

4.1. 概要および本論文での位置づけ

本章では、原始細胞内で行われる RNA 複製反応の実験モデルとして、リポソーム内における Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応を研究した。RNA ワールド説において原始環境下で行われたとされる、脂質細胞膜内での RNA 複製反応の効率などを実験的に示すことは重要である。第 3 章において試験管内反応の速度論的解析が行われたので、これと比較することにより、反応が微小な脂質二重膜小胞内に包まれたことによる影響を知ることができる。また少数ゲノム性により、原始細胞の RNA 複製は確率的ゆらぎを大きく受けるため、本研究では RNA 複製反応を確率論的に解析した。具体的にはまず、第 3 章の反応モデルに従い、試験管内反応において反応のばらつきを測定した。結果、RNA が倍化されるという過程がポアソン過程であると仮定するだけで実験結果が良く説明できた。試験管内反応において反応のばらつきを計測することができたのは指数増幅反応であるからであり、この手法は指数増幅する大腸菌の増幅のばらつきを測定することなどにも適応できうる。次にリポソーム内で RNA 複製反応を行い、FACS を用いて測定した。結果、平均の速度論的解析により、反応効率が試験管内反応と同等であることが示された。また、反応のばらつきは試験管内反応と比べて、10 倍程度大きい可能性があることが示された。以上より、原始細胞について、RNA ワールドで想定される RNA と脂質二重膜小胞からなる原始細胞において、RNA が細胞内で障害無く増幅できたことを示唆している。

4.2. 背景

4.2.1. 生命の起源と RNA ワールド仮説における原始細胞

人類は古くから生命の起源に対して問いかけてきた。つまり、有機化学物質の集合体から、どのようにして生物細胞が生まれたのか？という問いである。生命の起源説の中でも有力であるのが、RNAワールド仮説である[1-3]。RNAワールド仮説における原始細胞は、現在の細胞に対してDNAおよびタンパク質を欠いており、遺伝情報担体と代謝触媒をともにRNAが担っている。この説が有力である理由の１つとして、RNA合成を触媒するRNA[4]、および自発的に増殖するリポソーム[5, 6]が実験的に再構成されたことがあげられる。RNAワールド仮説は最も有力な説であるため、これにおいて想定される原始細胞の状況を実験的に再構成して検討することは、生命の起源にとって重要である。

具体的に、原始細胞モデルとしてRNA複製反応をリポソーム内で行うことの重要性が提唱されている[7]。

4.2.2. 原始細胞モデルとしてのQβレプリカーゼによるRNA複製反応

Qβレプリカーゼを用いたRNA複製反応は、他の核酸複製反応と比べて原始的であると考えられており、原始環境を想定したRNA複製反応モデルとして認識されている。Qβレプリカーゼは大腸菌ファージQβ[8]の一本鎖RNAゲノム（4217 塩基長）を複製するRNA依存性RNA複製酵素である[9]。この酵素は一本鎖RNA（プラス鎖）を鋳型として、その相補的の一本鎖RNA（マイナス鎖）を合成する。また、このマイナス鎖を鋳型とし、新しいプラス鎖を合成する[10]。よって、QβレプリカーゼによりRNAは指数的に増幅される。この酵素は、常温条件下において、単体でRNAを指数増幅できる稀な酵素であり、その複製には、この酵素以外に、他の酵素や核酸オリゴプライマー等を必要としない[11]。さらに、このRNA複製反応は、酵素の活性だけでなく、鋳型となるRNAの 2 次構造にも依存する、つまりRNAの触媒機能（鋳型活性）にも依存する[12]。このようにRNAの機能に依存してRNAが複製される反応であることは、RNAワールド[3]を想像させる。以上のように、Qβレプリカーゼを用いたRNA複製反応は、鋳型RNA以外には酵素単体のみを必要とし、あとは鋳型RNAの触媒機能に依存するため、他の核酸複製反応と比べて原始的であると考えられている[13]。実際に再構成実験としてこの反応を実験モデルとして研究することによって、既に分子進化[14]やハイパーサイクル[15]、生命の起源[9, 16, 17]に対する理解などが深められている。以上のように、QβレプリカーゼによるRNA複製反応の理解は、RNAワールドにおけるRNA複製反応、つまり原始細胞におけるゲノムRNAの複製の理解にとって重要である。

4.2.3. 脂質二重膜小胞内での反応の重要性

原始細胞のゲノムRNA複製は脂質もしくはそれに似通った両親媒性分子による細胞膜内で行われたと考えられる。この場合、試験管（10-1000 μL）に比べて細胞サイズの小胞の体積が小さいと予想される[18]（0.1-100 fL）ことから、その体積に対する面積の比は大きく、膜との相互作用の影響が大きくなると考えられる[19]ため、試験管と同様の動力学定数で反応が進むとは限らない。よって、細胞内におけるRNA複製反応の動力学定数を求めることが重要である。しかしながら、宿主大腸菌内においてRNA複製反応を詳細に解析することは難しいため、細胞膜モデルである脂質二重膜小胞（リポソーム）内での反応が、適切なモデル実験であると考えられる。過去の研究において、リポソーム内でこのRNA複製反応が起こることは電気泳動によって定性的に確認された[7]が、定量的に測定されたことはないため、試験管内での反応と比較できず、膜との作用の有無はわかっていない。よって、QβレプリカーゼによるRNA複製反応をリポソーム内で行い、これを定量的に解析することが重要である。

4.2.4.　確率論的解析の重要性

原始細胞におけるゲノムRNAは少数であると考えられている[20, 21]。それはゲノムが少数であるほど、進化の効率が高いからである。ゲノムRNAが少数であるとき、その複製反応は確率的ゆらぎによって強く影響を受ける[22]。実際に、大腸菌内で行われるQβファージゲノムRNAの複製反応も、大腸菌へのゲノムRNAの進入直後においてRNAは 1 分子であるので、各大腸菌内のRNA複製量は、確率的ゆらぎにより大きくばらついていると予想される。これらは、少数であるために大数の法則によって確率的ゆらぎが平均化されないからである。よって、Qβファージにおけるゲノム RNA複製の理解に加え、原始細胞におけるゲノムRNAの複製反応のダイナミクスを理解するためには、Qβレプリカーゼの RNA複製反応を確率論的に解析する必要がある。つまり、多分子のRNAについての平均のダイナミクスによる反応の速度論的解析[10]とは異なり、反応のばらつきまで測定する必要があるということである。私達はこれまで、Qβレプリカーゼによる RNA複製反応におけるRNA濃度の経時変化をよく説明できる速度論モデルを提唱し、速度論的解析を行って伸長反応速度定数や結合定数、ミカエリス定数など、重要な動力学定数を求めた（第 3 章）[23]。また、解離定数[24]や二本鎖合成反応率[25]など、この反応のダイナミクスに関する重要な定数が求められている。しかしながら、これらは全て多数のRNA分子に対する平均のダイナミクスであるので、次はその反応のばらつきまで測定し、確率論的解析を行うことが重要である。

酵素による触媒反応のばらつきを測定するためには、通常酵素の 1 分子観察が理想的であり、ポリメラーゼーションについては、DNAポリメラーゼ[26]やRNAポリメラーゼによる反応[27]が測定されている。しかしながら、RNAレプリカーゼについての報告は一つもない。特に、Qβレプリカーゼは鋳型となるRNAの 2 次構造が重要である[28, 29]ために、他のポリメラーゼと同様の技術は使用できない。なぜなら、他のポリメラーゼの 1 分子観察は、鋳型となる核酸の両端を光ピンセットなどで直線に引き伸ばすことで測定を可能にしているからである。よって、Qβレプリカーゼによる RNA複製反応のばらつきを測定するためには、少数分子のRNAから増幅されたRNA量のばらつきを観測するのが最適であると考えられる。

4.2.5.　研究の概要

私達はこれまでに、Qβレプリカーゼによる RNA複製反応を、蛍光色素SYBR® Green IIを用いてリアルタイムに検出する実験系を開発し、この反応の詳細な速度論的解析を行ってきた（第 3 章[23]）。本研究ではこれに加えて試験管内反応における反応のばらつきを測定し、確率論的解析を行った。具体的にはまず、最も簡単なRNA指数増幅反応の確率論モデルを提唱し、この反応におけるRNA分子数のばらつきに対する初期RNA分子数の依存性を数値計算シミュレーションモデルにより示した。次に試験管内反応におい

て、その初期RNA分子数依存性を測定し、これが反応モデルの数値計算結果と大差ないことから、その最も簡単な反応モデルの正当性を示した。試験管内反応において反応のばらつきを計測することができたのは指数増幅反応であるからであり、この手法は指数増幅する大腸菌などにも適応できうる。

一方で私達はこれまでに、リポソーム内に様々な生化学反応システムを封入し、その個々のリポソーム内反応をfluorescent activated cell sorter (FACS)によって検出する実験系を開発してきた[30-32]。また、リポソームには内部区画が存在するため、リポソームの体積が反応体積、つまり反応が起こっている内部区画の体積を表しているわけではないが、私達はリポソームの全体の体積と内部区画の体積の関係を得ることで、リポソーム全体での内封体積分布から、反応体積分布を推定することができるようになった（第 2 章[18]）。これらにより、細胞サイズ（1-10μm）のリポソーム内における反応過程の経時変化を、リポソーム内の反応体積と相関させて解析することが可能となった。本研究では、リポソーム内にRNAが 1 分子のみ存在するように低濃度のRNA溶液を封入し、これによって 1 分子のRNAを起点としたRNA複製反応をリポソーム内で行い、これを計測した。結果、リポソーム内での反応の平均代表値のダイナミクスは、試験管内反応とほとんど変わらない、つまりRNA複製反応は脂質膜によってあまり影響を受けないことが示された。これは原始細胞においてRNAが脂質二重膜内で障害無く増幅できたことを示唆している。また、リポソーム内反応でのばらつきは、試験管内反応におけるばらつきよりも 10 倍程度大きいという結果を得た。

4.3. 試料と方法

4.3.1. Qβレプリカーゼの調整

Qβレプリカーゼは過去の研究[23]（第 2 章）で用いたものを、Vivaspin 500 30,000 MWCO PES (Sartorius, Paris, France)を用いて、酵素ストックバッファー(25 mM Tris-HCl, pH 7.8, 125mM NaCl, 2.5mM MgCl2, 0.5mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol, 50% (v/v) glycerol)で 14 倍濃縮したものを用いた。

4.3.2. 鋳型RNA の調整

鋳型RNAは過去の研究[23]（第 2 章）と同じものを使用した。

4.3.3. 試験管内複製反応の測定と解析

試験管内リアルタイム検出は、基本的には過去の研究[23]（第 2 章）と同じように行った。ただし、反応温度はリポソーム内反応においてはリアルタイム測定ができないため、反応速度を遅くするために 25℃で行った。触媒速度定数の温度依存性は補足資料 4.1 に示した。

各初期RNA分子数を用いた反応に対し、それぞれ独立の試験管で 12 反応行ったところ、これらには系統誤差を含んでいた。私達が測定に用いた機器Mx3005Pは、8 行 12 列、計 96 ウェル（試験管）の反応を同時に測定することができる。このうち、私達は同じRNA分子数を用いた 12 反応を、1 行に並べて行った。結果、12 反応並べて初めて検知できるほど微小な違いではあるが、ウェルの配置順と τ にはほぼ線形の相関があった（R^2 = 0.73）。よって、その線形回帰直線からの偏差平方和を、サンプル数 12 から 1 を引いた 11 で割ったものを不偏分散とし、これから標準偏差を求めた。

4.3.4. リポソーム内複製反応の測定と解析

リポソームの作成法、検出方法（機器を含む）、および解析方法（ヒストグラムの作成法など）は過去の研究[18]（第 1 章）と同じように行った。リポソーム内反応は、試験管内反応に加え、終濃度 500nM APCを含む反応液を 1 サンプルあたり 30 μL氷上で作製した。この反応液 25 μLを凍結乾燥中空リポソームに添加して良く混合した。上記のリポソーム液を新しいチューブに 5 μL移し、95 μLの希釈液（反応溶液のうち、RNA、酵素、APCを除き、終濃度 10 μg/mLのRNase A (DNase-free; Nippon Gene, Tokyo, Japan)を加えた溶液）を添加して混合した後、25℃で反応を開始した。時間経過に伴い 10 μLサンプリングし、氷上で冷やしたフロー溶液（125 mM Tris-HCl、pH 7.8、0.1 mg/ml BSA）100 μLで希釈し、随時FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA)で測定した。ただし、希釈液はリポソーム外部で行われた反応産物がリポソームに吸着して蛍光を与えることを防ぐために用いているだけでなく、蛍光色素SYBR® Green IIや基質NTPを供給している。希釈液からRNase Aを省くと、内部にRNAを封入しなくても全てのリポソームが経時的に高い緑色蛍光強度を持つ。また、希釈液からSYBR® Green IIやNTPを抜くと、本研究で得られたような、試験管内反応と一致する緑色蛍光強度は観察されない（データ不掲載）。

4.3.5. リポソームの全体積から反応体積への変換

式 4.7 をもとにして全体積v_wに対するヒストグラムを反応体積v_pに対するヒストグラムに変換した方法を記す。実際にはv_wを対数スケールの階級に区切ったヒストグラムをもとに変換しており、また変換後もv_pの対数スケールの階級に対するヒストグラムとして得られる。このように階級を用いて離散的に式 4.7 を示すと、以下のようになる。

$$\begin{bmatrix} W(1) \\ W(2) \\ \vdots \\ W(n) \end{bmatrix} = \sum_{j=1}^{m} R(j) \begin{bmatrix} P_{1j} \\ P_{2j} \\ \vdots \\ P_{nj} \end{bmatrix} = R(1) \begin{bmatrix} P_{11} \\ P_{21} \\ \vdots \\ P_{n1} \end{bmatrix} + R(2) \begin{bmatrix} P_{12} \\ P_{22} \\ \vdots \\ P_{n2} \end{bmatrix} + \cdots + R(m) \begin{bmatrix} P_{1m} \\ P_{2m} \\ \vdots \\ P_{nm} \end{bmatrix}$$

ただし、W(i)はv_wを対数スケールでn個の階級に区切ったときの、i番目の階級における

頻度、R(j)は変換後のv_pを対数スケールでm個の階級に区切ったときの、j番目の階級における頻度、P_{ij}はv_pがj番目の階級であるときの、v_wがi番目の階級である確率密度関数である。このとき、左辺と右辺の平方和Jは以下のように記述できる。

$$J=\sum_{i=1}^{n}\{W(i)-(R(1)P_{i1}+R(2)P_{i2}+\cdots+R(m)P_{im})\}^2$$

ここで、それぞれの R(j)は独立であり、線形に J に寄与しているので、J が最小になるには、全ての R(j)それぞれに対して最小であるということである。よって、J を R(j)それぞれで微分した値は全て 0 であり、以下のように表すことができる。

$$\begin{aligned}\frac{\partial J}{\partial R(j)}&=2\sum_{i=1}^{n}\{W(i)-(R(1)P_{i1}+R(2)P_{i2}+\cdots+R(m)P_{im})\}(-P_{ij})\\&=2\left[-\sum_{i=1}^{n}W(i)P_{ij}+\sum_{i=1}^{n}(R(1)P_{i1}+R(2)P_{i2}+\cdots+R(m)P_{im})P_{ij}\right]\\&=2\left[-\sum_{i=1}^{n}W(i)P_{ij}+R(1)\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{ij}+R(2)\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{ij}+\cdots+R(m)\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{ij}\right]\\&=0\end{aligned}$$

式 4.M1

したがって、以下の式が成り立つ。

$$\sum_{i=1}^{n}W(i)P_{ij}=R(1)\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{ij}+R(2)\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{ij}+\cdots+R(m)\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{ij}$$

ここで、全ての R(j)に対して式 4.M1 が成り立つので、以下のように書ける。

$$\begin{aligned}\begin{bmatrix}\sum_{i=1}^{n}W(i)P_{i1}\\\sum_{i=1}^{n}W(i)P_{i2}\\\vdots\\\sum_{i=1}^{n}W(i)P_{im}\end{bmatrix}&=R(1)\begin{bmatrix}\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{i1}\\\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{i2}\\\vdots\\\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{im}\end{bmatrix}+R(2)\begin{bmatrix}\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{i1}\\\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{i2}\\\vdots\\\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{im}\end{bmatrix}+\cdots+R(m)\begin{bmatrix}\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{i1}\\\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{i2}\\\vdots\\\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{im}\end{bmatrix}\\&=\begin{bmatrix}\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{i1}&\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{i1}&\cdots&\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{i1}\\\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{i2}&\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{i2}&\cdots&\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{i2}\\\vdots&\vdots&\ddots&\vdots\\\sum_{i=1}^{n}P_{i1}P_{im}&\sum_{i=1}^{n}P_{i2}P_{im}&\cdots&\sum_{i=1}^{n}P_{im}P_{im}\end{bmatrix}\begin{bmatrix}R(1)\\R(2)\\\vdots\\R(m)\end{bmatrix}\end{aligned}$$

式 4.M2

ここで、W(i)（iは 1 からn）は実験データ、R(j)（jは 1 からm）は変換後のデータである。また、P_{ij}（iは 1 からn、jは 1 からm）はある 1 分子のRNAが階級jのv_pの区画に封入されているとき、そのリポソームの全体の体積がiの階級のv_wである確率を示しており、式 4.5 および式 4.6 から全てもとまる。よって式 4.M2 は解くことができ、任意のW(i)からR(j)を求めることができる。実際には、各緑色蛍光強度の階級それぞれに対して、v_wに対するヒストグラムをW(i)とし、ガウスの掃き出し法により式 4.M2 を解くことでv_pに対するヒストグラムR(j)を求めた。なお、式 4.M2 を解くとR(j)は負の値をとり得る。この際にはその階級jをのぞき、もう一度式 4.M2 を解き、全てのR(j)が正の値をとるまで

繰り返した。

4.3.6.　リポソーム内複製反応の分散分析

J_{total}、J_A、J_Bはそれぞれ、定義（結果参照）に従って実験データから直接計算した。J_{AV}は以下のように求めた。J_{AV}は、反応体積v_pの階級に幅があることによって、J_Aに寄与する誤差平方和である。ある反応体積v_{j-}からv_{j+}までを一つの階級jとし、そのなかに$v_{j-} < v_{pjk} < v_{j+}$なる体積$v_{pjk}$があると考える。この階級の全頻度を$F_{preac}(v_{pj})$とし（図 4.5A）、階級j内のリポソームの体積の頻度はv_{j-}からv_{j+}まで一様分布で存在しているとする。つまり、v_{pjk}の頻度$F_{preac}(v_{pjk})$は$F_{preac}(v_{pj})/(v_{pj+}-v_{pj-})$と表すことができる。なお、この階級の平均の体積$<v_{pj}>$を$v_{pj-}$と$v_{pj+}$の平均とする。ここで、RNA複製反応を以下のように近似する。反応時間 60 分では飽和点（t_{sat}、約 12 分、図 4.4C）から十分に時間が経過しているので、指数期でのRNA増加分よりも線形期での増加分のほうが十分大きい（$k_{cat}\, N_{enz}\, t >> N_{enz}\,(1 - k_{cat}\, t_{sat})$）とすると、式 4.1 から、平均RNA分子数と酵素分子数は比例関係（$N_{RNA}(t) = k_{cat}\, N_{enz}\, t$、式 4.1）に近似できる。また、酵素分子数は濃度一定と仮定すると反応体積v_pに比例すると考えることができるので、ある反応体積の階級j内においては、反応体積v_{pjk}とその体積での平均RNA分子数$< N_{RNA60}(v_{pjk})>$は比例定数$a_{ave}(j)$で比例すると仮定する（$< N_{RNA60}(j)> = a_{ave}(j)\, v_{pjk}$）。ただし、幅の狭い階級内では線形近似するが、階級間では、実験結果としては反応体積とRNA分子数はちょうど比例しているというわけではないことに注意されたい（図 4.4D、黒色実線）。以上より、この階級内全体でのRNA分子数の平均値を$<< N_{RNA60}(<v_{pj}>)>>$（$= a_{ave}(j)<v_{pj}>$）とすると、反応体積の階級に幅があることによるその階級でのRNA分子数の偏差平方和$J_{AV}(j)$は、階級内の体積の違いによるRNA分子量の偏差平方和なので、

$$J_{AV}(j) = \int_{vpj-}^{vpj+} F_{preac}(v_{pjk})(\langle N_{RNA60}(v_{pjk})\rangle - \langle\langle N_{RNA60}(\langle v_{pj}\rangle)\rangle\rangle)^2 dv_{pjk}$$

と定義される。これより、

$$\begin{aligned} J_{AV}(i) &= \frac{a_{ave}(j)^2 F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpi-}^{vpi+} (v_{pjk} - \langle v_{pj}\rangle)^2 dv_{pjk} \\ &= \left(\frac{\langle\langle N_{RNA60}(\langle v_{pj}\rangle)\rangle\rangle}{\langle v_{pj}\rangle} \right)^2 \frac{F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpi-}^{vpi+} (v_{pjk} - \frac{v_{pj+} + v_{pj-}}{2})^2 dv_{pjk} \\ &= \left(\frac{\langle\langle N_{RNA60}(\langle v_{pj}\rangle)\rangle\rangle}{\langle v_{pj}\rangle} \right)^2 \frac{F_{preac}(v_{pj})(v_{pj+} - v_{pj-})^2}{12} \end{aligned}$$

となる。$<< N_{RNA60}(<v_{pj}>)>>$は図 4.4Dの黒色実線の関係から求まり、$F_{preac}(v_{pj})$は図 4.5Aで求まっているので、J_{AV}は

$$J_{AV} = \sum_{j=1}^{m} J_{AV}(j)$$

としてもとまる。ただし、mはv_pの階級数である。また、J_{reac}は$J_{reac} = J_A - J_{AV}$から求めた。

次に、これらの値からをSD_{lnRNA}求める方法を記述する。上記同様、反応時間 60 分では飽和点から十分に時間が経過しているので、RNA分子数のばらつき（標準偏差SD_{RNA}）は、図 4.1Bと式 4.1 から、RNA増幅速度$k_{cat}\,N_{enz}$に比例して一定であると仮定することができる。ここで、上述のようにある時間においては平均RNA分子数と酵素分子数は比例関係に近似できるので、SD_{RNA}も平均RNA分子数に比例するといえる。よって、反応時間 60 分での、反応体積v_pにおけるRNA分子数の標準偏差$SD_{RNA}(v_p)$とその平均値$<N_{RNA60}(v_p)>$の比例定数をa_{SD}とする（$SD_{RNA}(v_p)= a_{SD} <N_{RNA60}(v_p)>$）。ただし、平均値$<N_{RNA60}(v_p)>$に既に$N_{enz}$が含まれることから、どの反応体積の階級でも同じ比例定数で成り立つと仮定できることに注意されたい。ここで、反応体積の階級j内において、そのRNA分子数の誤差平方和$J_A(j)$に寄与する反応のばらつき分$J_{reac}(j)$は

$$J_{reac}(j) = \int_{vpj-}^{vpj+} \sum_{l=1}^{F_{preac}(v_{pjk})} (N_{RNA60}(v_{pjk}, l) - \langle\langle N_{RNA60}(\langle v_{pj}\rangle)\rangle\rangle)^2 dv_{pjk}$$

と定義される。ただし$N_{RNA60}(v_{pjk},l)$は、$F_{preac}(v_{pjk})$個存在する反応体積v_{pjk}のリポソームのうち、l番目のリポソーム内のRNA分子数である。上述に用いた仮定も用いてこれを計算すると、

$$\begin{aligned}
J_{reac}(j) &= \int_{vpj-}^{vpj+} F_{preac}(v_{pjk}) \frac{\sum_{l=1}^{F_{preac}(v_{pjk})} (N_{RNA60}(v_{pjk}, l) - \langle\langle N_{RNA60}(\langle v_{pj}\rangle)\rangle\rangle)^2}{F_{preac}(v_{pjk})} dv_{pjk} \\
&= \frac{F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpj-}^{vpj+} SD_{RNA}(v_{pjk})^2 dv_{pjk} \\
&= \frac{a_{AVE}(j)^2 a_{SD}{}^2 F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpj-}^{vpj+} v_{pjk}{}^2 dv_{pjk} \\
&= \frac{1}{3}\left(\frac{N_{RNA60}(\langle v_{pj}\rangle)}{\langle v_{pj}\rangle}\right)^2 \frac{a_{SD}{}^2 F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} (v_{pj+}{}^3 - v_{pj-}{}^3)
\end{aligned}$$

である。また、

$$\begin{aligned}
J_{reac} &= \sum_{j=1}^{m} J_{reac}(j) \\
&= \frac{a_{SD}{}^2}{3} \sum_{j=1}^{m} \left(\frac{N_{RNA60}(\langle v_{pj}\rangle)}{\langle v_{pj}\rangle}\right)^2 \frac{F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} (v_{pj+}{}^3 - v_{pj-}{}^3)
\end{aligned}$$

である。$N_{RNA60}(<v_{pj}>)$は図 4.4Dの黒色実線の関係から求まり、$F_{preac}(v_{pj})$は図 4.5Aで求まっているので、上述で求めたJ_{reac}から、$a_{SD}{}^2$が求まる。反応時間 60 分（t = 60 min）にお

いて、$SD_{RNA}(vp) = a_{SD} \langle N_{RNA60}(v_p) \rangle = 60\, a_{SD}\, k_{cat}\, N_{enz}$であり、式 4.2 から$SD_{lnRNA} = 60\, k_{cat}\, a_{SD}$であるので、$a_{SD}$から$SD_{lnRNA}$が求まる。

4.4. 結果

4.4.1. 反応モデルの提唱および数値シミュレーション

私達は以前、実験結果をよく説明できる簡単なQβレプリカーゼによるRNA複製反応の動力学モデルを提起した[23]（第 2 章）。そのモデルは酵素とRNAの結合を生産的結合（複製反応を開始できる）と非生産的結合（複製反応を開始できない）の 2 種類に分けて考えたものであり、以下に示す。

$$\text{E-Rn} \underset{k_2\,\mathrm{Rn}}{\overset{k_{-2}}{\rightleftharpoons}} \text{E} \underset{k_{-1}}{\overset{k_1\,\mathrm{Rp}}{\rightleftharpoons}} \text{E-Rp} \xrightarrow{k_{cat}} \text{E} + 2\,\mathrm{R}_{free} \qquad \text{モデル 1}$$

ここで、Eは遊離酵素、Rfreeは遊離RNA、RpはRNAにおける空の生産的結合サイト、E-Rpは生産的結合している酵素、RnはRNAにおける空の非生産的結合サイト、E-Rnは非生産的結合している酵素、k_1及びk_{-1}はそれぞれ生産的結合の結合及び解離速度定数、k_2及びk_{-2}はそれぞれ非生産的結合の結合及び解離速度定数、そしてk_{cat}は触媒速度定数である（第 2 章参照[23]）。このモデルの特徴は、非生産的結合による酵素の競争阻害である。また、私達はその過去の研究で、S130 という増幅可能なRNAの中では最も短い部類に入る、130 塩基長のRNAを用いたときに、非生産的結合が無視できる（$k_2 \fallingdotseq 0$）ことを示した。さらに、酵素濃度がミカエリス定数（1 nMオーダー）よりも十分に大きいとき、RNAと酵素のうちの少ないほうは必ずもう一方と結合しており、その結合過程は無視して考えることができる。以上より、S130 を鋳型RNAとして用い、ミカエリス定数より十分大きい酵素濃度を用いてRNA複製反応を行うとき、その反応モデルは、

$$\mathrm{Rt} + \mathrm{E} \xrightarrow{k_{cat}} 2\,\mathrm{Rt} + \mathrm{E} \qquad \text{モデル 2}$$

のようにモデル 1 よりもさらに簡単にすることができる。ここで、Rtは反応系内の全RNA、Eは全酵素である（遊離や結合などの状態を考えなくてもよい）。このモデルは、反応過程が 1 つしかなく、不可逆反応であるので、反応速度定数が触媒速度定数k_{cat}しかない最も簡単なモデルである。この反応モデルにおいて、ある時間tでのRNAの分子数$N_{RNA}(t)$は、以下のように表すことができる。

$$\ln(N_{RNA}(t)) = k_{cat}\, t + \ln(N_{RNA}(0)) \qquad (t \leqq t_{sat}\text{のとき})$$

$$N_{RNA}(t) = k_{cat}\, N_{enz}\, t + N_{enz}\,(1 - k_{cat}\, t_{sat}) \qquad (t > t_{sat}\text{のとき}) \qquad \text{式 4.1}$$

ただし、$N_{RNA}(0)$は初期RNA分子数、N_{enz}は酵素分子数である。また、t_{sat}は$R(t_{sat}) = N_{enz}$となるような時間（飽和点での時間）であり、$t_{sat} = \ln(N_{enz}/N_{RNA}(0))/k_{cat}$と記述できる。なお、$t_{sat}$までの間を反応の指数期、$t_{sat}$以降を線形期という。よって、反応に影響する定数は、

k_{cat}およびN_{enz}の 2 つだけである。このような最も簡単なモデルを用いて、Qβレプリカーゼによるリポソーム内RNA複製反応を解析する。

私達の目的は、リポソーム内において、1 分子のRNAから増幅されていくRNA複製反応を、確率論的に解析することである。よって、モデル 2 にある唯一の反応を確率論的に解析するために、この触媒反応が単位時間（試行）あたり、確率p_{cat}で触媒反応するとした。この確率過程モデルをモンテカルロ法により解析した。図 4.1Aおよび図 4.1Bは$N_{RNA}(0) = 1$、$N_{enz} = 10000$、$p_{cat} = 0.1$ での反応シミュレーションを独立に 10 回行った（図中の 10 本の線）ときの経時変化を、それぞれ方対数および線形表記で示したものである。時間に対して、片対数スケールで直線にRNAが増幅するときが指数期（図 4.1A）、それ以降線形増加するときが線形期である（図 4.1B）。同じ反応シミュレーションを独立に 10 万回行った結果を、RNA分子数の対数スケールに対するヒストグラムにしたものが図 4.1Cである。指数期においては、分布の幅が 1-2 オーダー程度であることがわかる。また、図 4.1Aでは、そのばらつきの由来が、RNAが少数分子のときであることがわかる。100 分子以上になったあたりでは、RNAの増幅率にばらつきはほとんど観察されない（図 4.1A）。これは、反応系内のRNA分子数が増加すると、大数の法則に従い、あるstepでの反応の結果は平均値に近づいていくからである。また、この対数スケールでの分布の幅（1-2 オーダー程度）は、100 分子程度以上から、指数期の間、時間に依存せずほぼ一定に保たれる（図 4.1B）。なお、次に説明するように、この分布の幅は、p_{cat}が十分小さい（≦0.1）ときにはp_{cat}にほとんど依存しない。

検出感度の問題で、試験管内での反応を図 4.1Aのように 1 分子から検出すことはできない。しかしながら、あるRNA分子数に達した時間を検出することは可能であり（次節参照）、これによってある時間でのRNA分子数のばらつき（分布）の幅を求めることができる。ただし、十分RNA分子数が多い時（>100 分子など）には、どのRNA分子数でも（指数期、線形期に関わらず）、これに達した時間の分布はほとんど同じであることに注目されたい（図 4.1Aおよび図 4.1B）。また、この反応において、ある時間でのRNA分子数の、指数期における対数スケールおよび線形期における線形スケールでの分布の幅は、あるRNA分子数に達する時間 τ の分布の幅に比例する（それぞれ図 4.1Aおよび図 4.1B参照）。具体的には、ある時間でのRNA分子数の、指数期における対数スケールおよび線形期における線形スケールでの標準偏差をそれぞれSD_{lnRNA}およびSD_{RNA}、あるRNA分子数に達する時間 τ の標準偏差をSD_{τ}とすると、RNA分子数が十分に大きいとき、以下のような関係がある。

$$SD_{\tau} = \frac{SD_{RNA}}{k_{cat}\,N_{enz}} = \frac{SD_{\ln RNA}}{k_{cat}} \qquad \text{式 4.2}$$

ここで、式 4.1 より、指数期および線形期それぞれの、自然対数スケールおよび線形スケールでの直線の傾きはそれぞれk_{cat}および$k_{cat}\ N_{enz}$であることに注意されたい。また、確率過程モデルにおいては、k_{cat} (/sec)に値するものはp_{cat} (/step)である。3 つの標準偏差

図4. 1

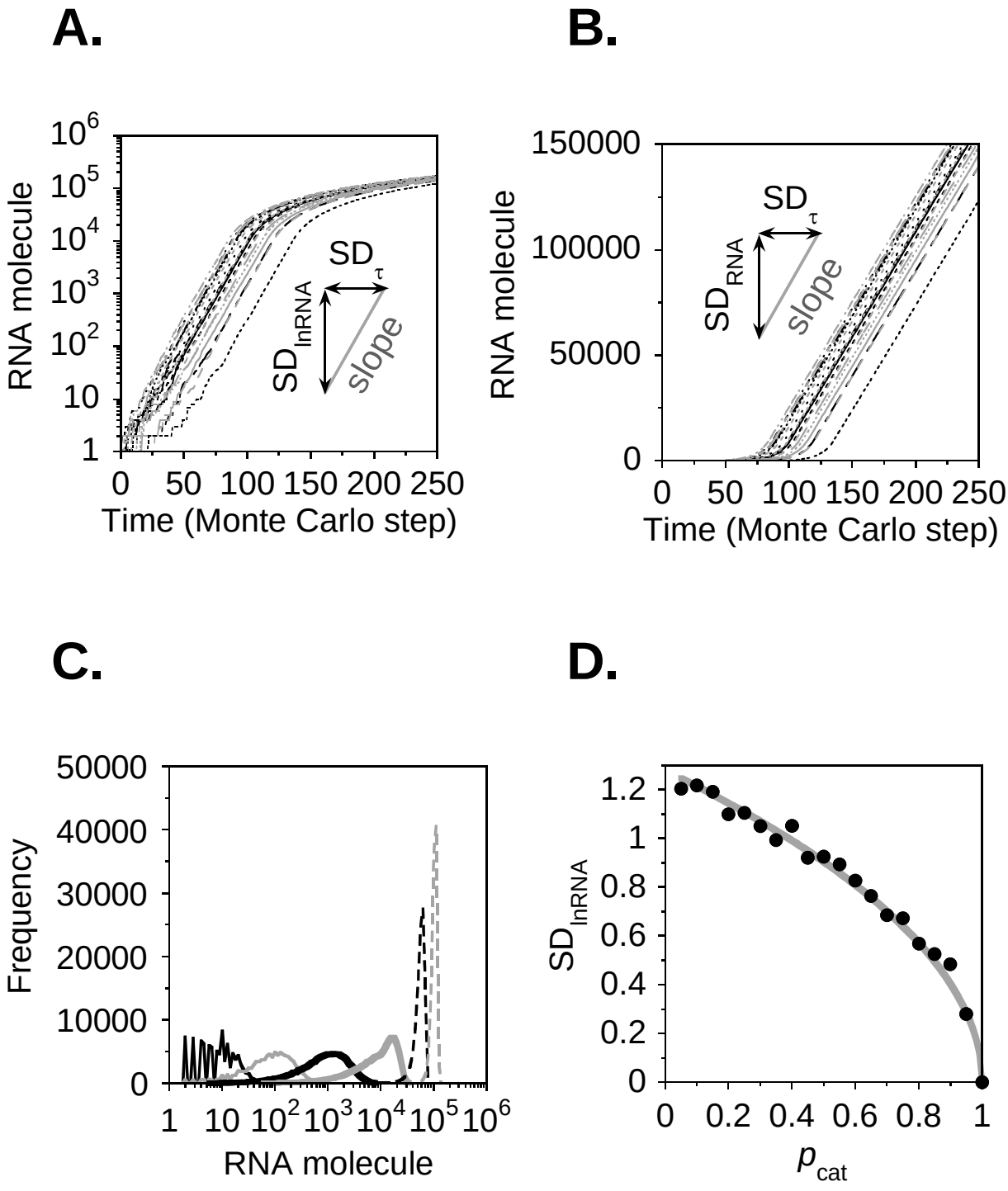


図4.1. RNA複製反応の確率過程モデルの結果。A. RNA分子数の経時変化。p_{cat} = 0.1での反応シミュレーションを独立に10回行い、それらのRNAの経時変化を示した（10種の異なる線）。SD$_\tau$とSD$_{lnRNA}$の関係が記載してある。ただし、RNA分子数は方対数表記である。B. Aの線形表記。 SD$_\tau$とSD$_{RNA}$の関係が記載してある。 C. RNA分子数に対するヒストグラム。RNA1分子から開始した計算機シミュレーションを独立に10万回行い、時間25（黒色実線）、50（灰色実線）、75 （黒色太実線） 、100 （灰色太実線） 、150 （黒色破線） 、200 （灰色破線） Monte Carlo stepにおけるRNAに対するヒストグラムを示してある。D. SD$_{lnRNA}$のp_{cat}依存性。実線のフィット式は本文に記載してある。

のうち、次元が無いものはSD_{lnRNA}であるので、本研究はこれを反応のばらつきの指標とする。計算機シミュレーションにより求めた、SD_{lnRNA}のp_{cat}依存性を図 4.1Dに示した。反応確率p_{cat}が小さくなるほどSD_{lnRNA}が大きくなることがわかる。また、$SD_{lnRNA} = 1.28\sqrt{1-p_{cat}}$という式でよくフィットできた（実線）。このように、SD_{lnRNA}に対するp_{cat}の依存性は対数的ではなく、確率を無限に小さくしていっても（p_{cat} = 0.00001など）、p_{cat} = 0.1 程度とほとんど変わらない。モデル 2 はRNA複製反応が“起こる”もしくは“起こらない”の 2 項だけの確率過程であるので、以降はp_{cat}が十分小さいような状態を、反応がポアソン過程であると呼ぶ。なお、ポアソン過程（p_{cat} = 0.1）における、SD_{lnRNA}の初期RNA分子数依存性を、実験結果と共に次節に示した（図 4.2C、×）。私達は本研究において、以上のような最も簡単なRNA複製反応の確率過程モデルの結果と実験結果を比較する。

4.4.2. 試験管内複製反応の確率論的解析

先述のように、試験管内反応において、あるRNA分子数に達する時間τの標準偏差SD_{τ}を求めることによって、ある時間でのRNA分子数の自然対数スケールでの標準偏差SD_{lnRNA}を求めることができる。図 4.2Aは、25℃において様々な初期RNA分子数から複製反応を行い、その反応をリアルタイムに検出した結果である。リアルタイム検出は蛍光色素SYBR® Green II を用いた系であり、RNA濃度が低いときは蛍光強度とRNA濃度は比例する。詳細は私達の過去の研究を参照のこと（第 2 章）。実線は、蛍光強度が 0.05の線であり、ここに達した時間をτとする。なお、この領域（蛍光強度 0.05 付近）では、RNA濃度（したがって分子数）と蛍光強度は比例する。また、この領域では片対数直線で増幅していることからもわかるように、反応指数期（$t < t_{sat}$のとき、式 4.1）である。結果、初期RNA分子数が少ないほど、あるRNA分子数に達する時間τが遅いことがわかる。なお、初期RNAを加えなくても（×）、RNAの増幅がされているが、このことはQβレプリカーゼに関してよく知られており、混入が原因とされている。初期RNA 1 分子を用いた反応で、その初期RNAを鋳型として増幅されたRNA依存の蛍光シグナルを観察することができないのはこのためである。指数期におけるRNAの増幅は、式 4.1の$t < t_{sat}$のときで表すことができるので、τは

$$\tau = -\frac{1}{k_{cat}}\ln(N_{RNA}(0)) + \frac{\ln(N_{RNA}(\tau))}{k_{cat}} \qquad \text{式 4.3}$$

と記述できる。図 4.2Bは$\ln(N_{RNA}(0))$に対して、τをプロットしたものである。ただし、τはそれぞれの$N_{RNA}(0)$に対して 12 反応おこなった平均値である。灰色実線は、直線回帰線であり、傾きおよび切片はそれぞれ-1.25 min、31.2 min（R^2 = 0.999）であった。式 4.3 から、この傾きが$-1/k_{cat}$であることがわかり、結果からk_{cat} = 0.80/minが求まった。図 4.2Bでのエラーバー（$N_{RNA}(0)$ = 10 以外は小さくて見えない）は 12 反応間でのτの測定

図4. 2

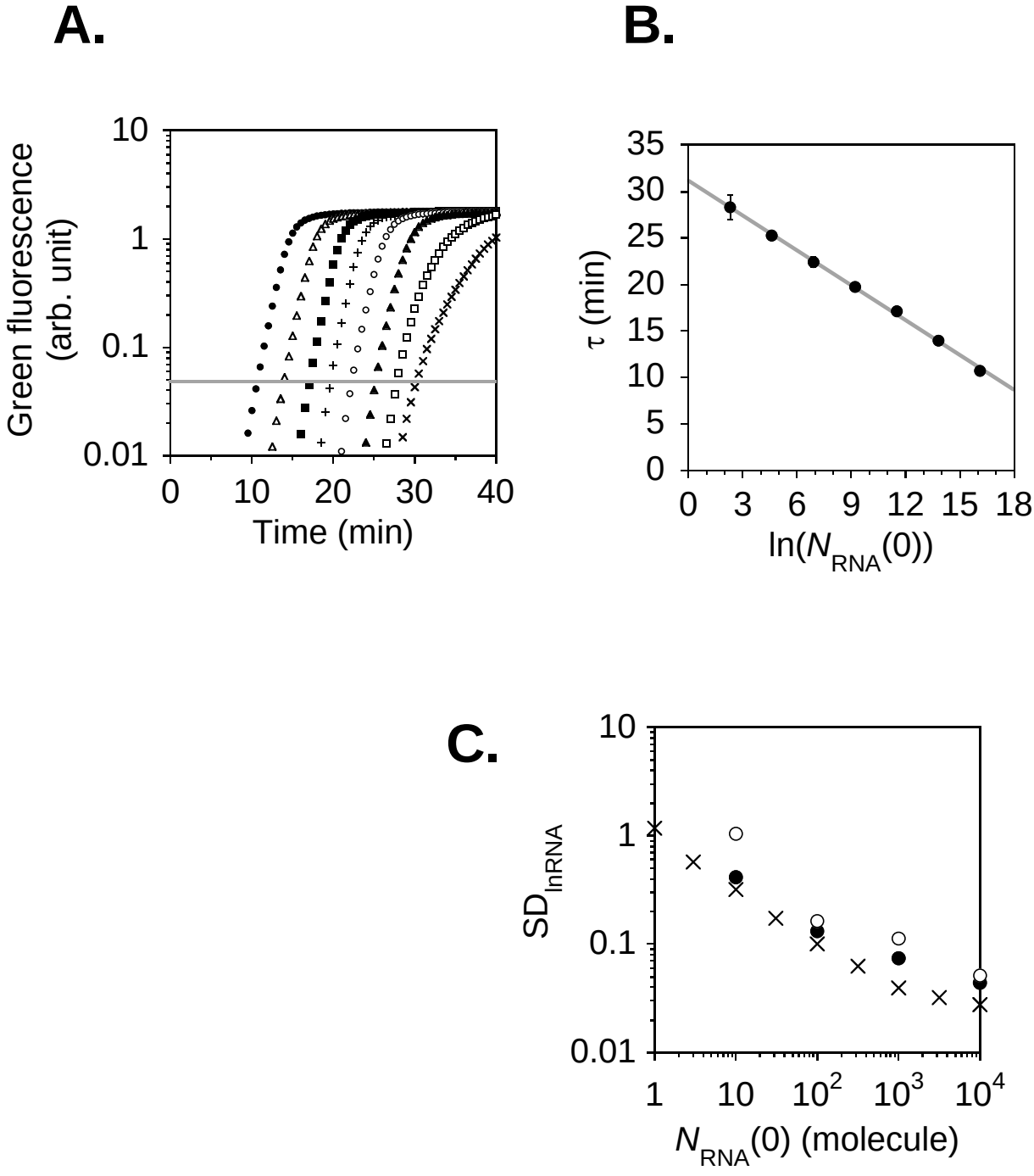


図4.2. 試験管内反応での確率論的解析。A. ことなる初期RNA分子数から開始したRNA複製反応のリアルタイム測定。●、△、■、＋、○、▲、□はそれぞれ、初期RNAを10^7、10^6、10^5、10^4、10^3、10^2、10分子加えた結果。×は初期RNAを加えない結果。全ての結果は、それぞれ独立に12反応行った結果の平均値。灰色実線は、蛍光強度が0.05の線であり、ここに達した時間をτとした。 B. ln(N_{RNA}(0))とτの関係。実線は、直線回帰であり、ここから求まるk_{cat}の値は本文に示した。 C. N_{RNA}(0)とSD_{lnRNA}の関係。●と○は、7種の異なる初期RNA分子数を用いたそれぞれ12反応の実験を、異なる2台の蛍光検出機器（機種は同じ）を用いて独立に検出した実験結果。×は計算機シミュレーションの結果（p_{cat} = 0.1）。

結果の標準偏差である。これには測定機器による系統誤差を含んでいるため、その系統誤差を補正することによってτの標準偏差SD_{τ}を求め、これと求めたk_{cat}から、式 4.2 にしたがいSD_{lnRNA}を求めた。系統誤差補正の詳細は試料と方法を参照。図 4.2Cは、初期RNA分子数に対し、SD_{lnRNA}をプロットしたものである。実験結果（●と○）は、最も簡単な確率過程モデルの結果（×）と比較して 2 倍程度の差しか観察されなかった。測定機器のサンプル間系統誤差は補正している（試料と方法を参照）が、それ他にも誤差が生まれ得る点は様々考えられるので、この実験とシミュレーション 2 つの結果はよく一致しているといえる。以上のように、平均値が最も簡単なモデル（モデル 2）で記述できる、Qβレプリカーゼによる RNA複製反応は、そのばらつきもこのモデルにおける唯一の反応過程をポアソン過程と仮定するだけで、よく説明できた。RNA複製反応は多段階反応にもかかわらず、1 つの確率過程で示すことができたのは、使用している鋳型RNAが短く、伸張反応よりも解離などその他が律速段階になっている（第 3 章）[23]ことを考慮すると、妥当であるといえる。

4.4.3. リポソーム内複製反応の FACS を用いた計測

私達は、リポソーム内での初期RNA1 分子からのRNA複製反応をFACSにより測定した。私達のグループでは、リポソーム内における様々な生化学反応のFACSによる測定に成功している[18, 31]（第 1 章）。図 4.3Aは、有効酵素濃度 2.15 μM、初期RNA濃度 1 nMによるRNA複製反応を、リポソーム内で 25℃において 60 分行ったものを、SYBR® Green IIを用いた検出により、FACSによって測定した結果である。リポソーム内反応の実験操作、およびリポソーム内の全内部体積v_wの求め方については試料と方法を参照のこと。また、緑色蛍光強度はRNA分子数と比例しており、緑色蛍光強度からRNA分子数を求めることができる（換算式は試料と方法を参照）。反応時間 60 分以外の時間の結果は補足資料 4.2 を参照。結果、リポソームは緑色蛍光強度の小さいものと大きいものの 2 つの集団に分かれていることが観察されている。これは、他の生化学反応同様（第 1 章を参照）、それぞれRNA分子が封入されたリポソームと、されていないリポソームである。実際に、初期RNA濃度と、緑色蛍光強度が大きいリポソームの集団の頻度は相関し、比例する領域があった（補足資料 4.3 参照）。

私達は、初期RNAが 1 分子になっているv_wの領域を求めた。用いたリポソーム内反応の系では、核酸の封入効率a_{capsul}は体積に依存せず一定で、10%程度であることが知られている[18]（第 1 章参照）。ここでの封入効率の定義は、加えた核酸溶液の濃度に対する、リポソーム内に封入された核酸の濃度である。よって、リポソーム封入前反応溶液中の濃度$[R_0]$のRNAが、ある体積v_wをもつリポソーム内に封入されるとき、そのリポソーム内のRNA分子数の平均は$a_{capsul}\,[R_0]\,v_w$ である。ここで、1 つの分子がある特定のリポソームに封入される確率は非常に小さいため、この封入過程はポアソン過程であると仮定できる。よって、ある体積v_wのリポソームに、1 分子もRNAが封入されない確率は

図4. 3

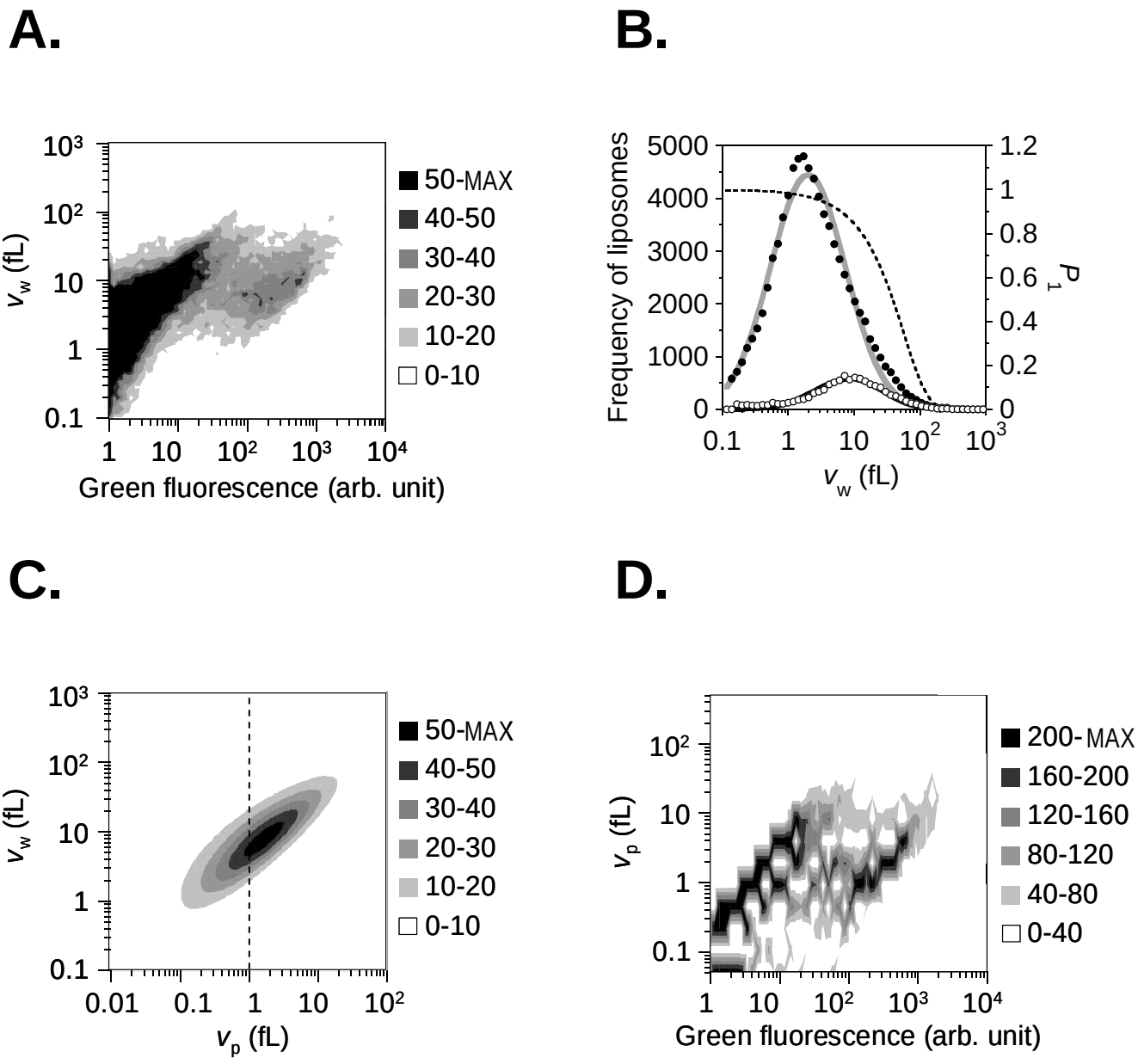


図4.3.リポソーム内反応のFCMデータと反応体積補正。A.FCMの結果の緑色蛍光強度とv_wについての二次元ヒストグラム。有効酵素濃度2.15μM、初期RNA濃度1 nMによるRNA複製反応を、リポソーム内で25℃において60分行ったものを、FCMによって10万個のリポソームについて測定した結果。B.全てのリポソーム（●）および、反応したリポソーム（○）についての、対数スケールのv_wに対するヒストグラム（頻度、左軸）。灰色実線は●のLognormalへのフィット。黒色実線は、このフィットの結果を用いて、○を式4.4にフィットした結果。得られた$a_{capsul}C_{DNA}$は本文に記載。黒色破線は、反応したリポソームのうち、RNAが1分子しか封入されない確率（P_1）。得られた$a_{capsul}C_{DNA}$を用いたポアソン分布によって推定した。C.推定されるv_wとv_pに対する二次元ヒストグラム。二次元の頻度分布関数は本文に記載。D. v_wをv_pに補正した二次元ヒストグラム。補正方法の詳細は本文に記載。

exp(-a_{capsul} [R_0] v_w)と表すことができ、逆にRNAが少なくとも 1 分子封入される確率は、1- exp(-a_{capsul} [R_0] v_w)で表すことができる。これらより、全体積v_wをもつリポソームの全頻度を$F_w(v_w)$とすると、全体積v_wをもち反応したリポソームの頻度$F_{wreac}(v_w)$は

$$F_{wreac}(v_w) = F_w(v_w)\{1 - \exp(-a_{capsul}[R_0]v_w)\} \qquad \text{式 4.4}$$

と記述できる。図 4.3Bは全てのリポソーム（●）および、反応したリポソーム（○）についての、対数スケールのv_wに対するヒストグラム（頻度、左軸）である。反応したリポソームと、してないリポソームの区別の方法については、試料と方法を参照。私達の過去の報告[18]（第 1 章）により、全リポソームのv_wに対する頻度はLognormalに似た形であることが示されているため、結果をLognormalにフィットした（図 4.3B灰色実線）。また、このフィットの結果得られた$F_w(v_w)$を用いて、反応したリポソームの分布結果を式 4.4 でフィットした結果、a_{capsul} [R_0] = 0.054 nMを得た（黒色実線）。[R_0] = 1 nMより、a_{capsul} = 5.4%であり、これは過去の研究における核酸の封入効率（10%程度）とよく一致した。得られたa_{capsul} [R_0] = 0.054 nMから、反応したリポソームのうち、RNAが 1 分子しか封入されない確率（P_1）を、ポアソン分布から推定することができる（図 4.3B、黒色破線）。ここから、50 fl程度以下のv_wであれば、半数以上は 1 分子以下しか封入されないということがわかった。なお、100 fl程度でもほとんどが少数分子のみである。100 flを超えるv_wをもつリポソームの頻度は非常に小さいことから、反応リポソームのほとんどはRNAを 1 分子しか封入していないことが示された。

リポソームは、その内部にも複数の区画を持っていることが知られている。リポソーム内にRNAが 1 分子封入されるとき、これが封入された 1 つの閉ざされた区画体積が反応体積v_pであるため、反応体積v_pとリポソームの全体積v_wとは異なる。しかしながら、私達の過去の研究[18]（第 1 章参照）により、以下に説明するように、v_wの頻度分布からv_pの頻度分布を推定することが可能となっている。リポソーム内に 1 分子のRNAが封入されるとき、そのRNAが封入されたリポソームの全体積がv_wであり、かつそのRNAが封入されたリポソーム内の 1 つの区画体積がv_pである頻度$F_{wp}(v_w,v_p)$は、以下のように表せられることが示されている[18]（第 1 章参照）。

$$F_{wp}(v_w, v_p) = \lambda^2 \frac{v_p}{v_w} \exp(-\lambda \frac{v_p}{v_w}) F_{wreac}(v_w) \qquad \text{式 4.5}$$

ただし、λは指数分布関数の平均値の逆数である。今、$F_{wreac}(v_w)$が実験からもとまっているので（図 4.3B、黒色実線）、式 4.5 より$F_{wp}(v_w,v_p)$を求めることができる。図 4.3Cに、式 4.5 および$F_{wreac}(v_w)$、および別で求めたλの値 9.2（試料と方法参照）を用いて推定した$F_{wp}(v_w,v_p)$を示した。ここで、$F_{wp}(v_w,v_p)$を求めるということは、ある 1 分子のRNAがあるv_pの区画に封入されているとき、そのリポソームのv_wがいくらであるか、その確率密度関数$f_{wp}(v_w,v_p)$（例えば図 4.3Cの黒色破線上での頻度分布は、v_p = 1 flのときの、v_wの確率密度関数と同じ形）を求めることができるということに注目されたい。$f_{wp}(v_w,v_p)$は

$F_{wp}(v_w,v_p)$を用いて、以下のように表すことができる。

$$f_{wp}(v_w,v_p)=\frac{F_{wp}(v_w,v_p)}{\int_0^\infty F_{wp}(v_w,v_p)\,dv_w} \qquad \text{式 4.6}$$

この$f_{wp}(v_w,v_p)$により、任意のリポソーム集団の全体積v_wをもつ頻度$F_{xw}(v_w)$は、同じくv_pをもつ頻度$F_{xp}(v_p)$を用いて以下のように表すことができる。

$$F_{xw}(v_w)=\int_0^\infty F_{xp}(v_p)\,f_{wp}(v_w,v_p)\,dv_p \qquad \text{式 4.7}$$

ただし、$F_{xw}(v_w)$が実験データ、$F_{xp}(v_p)$が補正後に得られるデータ（共にヒストグラム）であることに注意されたい。実際には、v_wおよびv_pともに対数スケールの階級で区切った離散的なものであり、式 4.7 における左辺と右辺の偏差平方和を最小にするような$F_{xp}(v_p)$を求めることで、任意の$F_{xw}(v_w)$を$F_{xp}(v_p)$に変換することができる（詳細は試料と方法）。このようにして私達は、図 4.3Aの結果における、緑色蛍光強度の階級ごとのリポソーム全体積v_wに関する頻度分布$F_{xw}(v_w)$を、反応体積v_pに対する頻度分布$F_{xp}(v_p)$に変換した（図 4.3D）。この変換方法の詳細に関しては、試料と方法を参照のこと。図 4.3Aと図 4.3Dの反応したリポソーム（緑色蛍光が大きい集団、上記参照）の分布を比較すると、図 4.3Dは図 4.3Aに比べ、分布の幅が小さくなっている。正確には、図 4.3Dにおいて、ある反応体積v_pを持つ反応したリポソーム集団の緑色蛍光に対する頻度分布の幅は、図 4.3Aにおいて、あるリポソーム全体積v_wを持つ反応したリポソーム集団のその分布の幅よりも小さい。これは、リポソームの内部区画構造が、図 4.3Aの緑色蛍光に対する頻度分布の幅に寄与している分を差し引いたからである。なお、体積補正感度の都合上、図 4.3Dは図 4.3Aに比べて体積の階級数が 4 分の 1 に減らしてあるため、連続性が減少しており、また階級あたりの頻度は約 4 倍になっている。私達は、以上のようにして求められた反応体積と緑色蛍光強度に関する 2 次元ヒストグラム（図 4.3D）を以降に解析した。

4.4.4. リポソーム内複製反応の平均的代表値の解析

リポソーム内反応と試験管内反応の平均代表値を比較した。図 4.3Dにおいて、反応体積v_pは、そのリポソーム内の酵素分子数N_{enz}を決定すると考えられる。これは、封入効率が体積によらず一定であるため（上記参照）、どの体積のリポソームにおいても、酵素濃度[E]は一定であり、N_{enz} = [E] v_pであると考えられるからである。また、図 4.3Dにおける緑色蛍光強度は、リポソーム内RNA分子数と比例している。私達は、各反応体積v_pにおける、緑色蛍光の平均的代表値$\langle Gr(v_p)\rangle$から換算されるRNA分子数の平均的代表値$\langle N_{RNA}(v_p)\rangle$の経時変化から、モデル 2 において反応に依存する全 2 つの定数、触媒反応速度定数k_{cat}および酵素分子数N_{enz}を求めた。各反応時間における$\langle N_{RNA}(v_p)\rangle$は以下のように求めた。反応時間 29 分および 60 分以外のFCMの結果では、RNAが封入され

て反応が起こっているリポソームと、そうでないリポソーム（バックグランド）の差を見分けることが難しい（各時間のFCMの結果は補足資料 4.2 を参照）。よって、まずは 60 分のデータについて、各v_pの階級における反応リポソームの<Gr(v_p)>をもとめ、その順位（蛍光強度の高いほうから数えたときの、<Gr(v_p)>をもつリポソームの順位）を求めた。その後各v_pにおけるこの 60 分での順位を、他の反応時間にも適用し、<Gr(v_p)>とした。その詳細については試料と方法を参照のこと。図 4.4Aの黒色実線は反応時間 60 分の結果（図 4.3D）のうち、v_p = 4.2 flの階級における緑色蛍光強度のヒストグラムである。これを、2 つのLognormalでフィットした結果が灰色実線である（ただしLognormalにおける標準偏差を 1.7 倍に固定）。このように、2 つのLognormalでフィットし、緑色蛍光強度が高いほうのLognormalの平均値を<Gr(v_p)>とした。このようにして得た各v_pの階級に対する<Gr(v_p)>を、図 4.4Bに示した。それぞれの自然対数を直線回帰することにより、ln(<Gr(v_p)>) = 0.76 ln(v_p) + 5.1（R^2 = 0.98）という関係を得た（灰色実線）。60 分のデータについて、この関係式に基づいて<Gr(v_p)>を再計算し、その順位を求めた。60 分以外の時間の結果については、各v_pの階級におけるこの順位に相当するリポソームの緑色蛍光強度を<Gr(v_p)>とした。これら各時間、各v_pにおける<Gr(v_p)>をRNA分子数に変換し（換算式は試料と方法）、得られた<N_{RNA}(v_p)>の経時変化を図 4.4Cにプロットした。これを、式 4.1 によりフィットし、k_{cat}およびN_{enz}を得た（式 4.1 は時間tの条件によって式が異なり、そのフィットは少し特殊である、詳細は試料と方法を参照のこと）。図 4.4Dに、各反応体積における経時変化をフィットして得たk_{cat}（○、左軸）およびN_{enz}（●、右軸）を示した。得られたk_{cat}は、v_pにほぼ依存せず、試験管内反応の結果（0.80/min、黒色点線）とよく一致した。N_{enz}は、封入した濃度（[E] = 2.15 μM = 3600 molecule/fL）から想定される分子数（N_{enz} = [E] v_p =3600 v_p、灰色破線）に対して 49%程度（[E] = 1.1 μM = 1800 molecule/fL）であった（灰色実線は線形回帰直線N_{enz} = 1800 v_p、ただし対数スケールでの偏差平方和を最小にした）。ただし、対数スケールで直線回帰した場合は傾きが 1 ではなかったが、実験誤差か体積補正時の誤差と考えられる（黒色実線）。以上のように、リポソーム内でのRNA複製反応は、その平均的代表値について解析した結果、試験管内の反応とほぼ変わらないことが示された。

4.4.5. リポソーム内複製反応の分散分析

次に、リポソーム内反応のばらつきを統計的解析により求めた。この解析は、反応したリポソームとしていないリポソームがはっきりと分かれている反応時間 60 分のデータについてのみ行った。リポソーム内でのRNA複製反応は、反応そのもの以外にも、リポソームの反応体積に依存する。それは、Qβレプリカーゼが高濃度でほぼ一定であるため、リポソームの反応体積にその分子数が比例するからである。式 4.1 から、線形期においてはRNA分子数が酵素分子数N_{enz}に依存することがわかるため、線形期である 60 分では、リポソームの反応体積に依存する。図 4.3Dの実験結果における反応したリポ

図4. 4

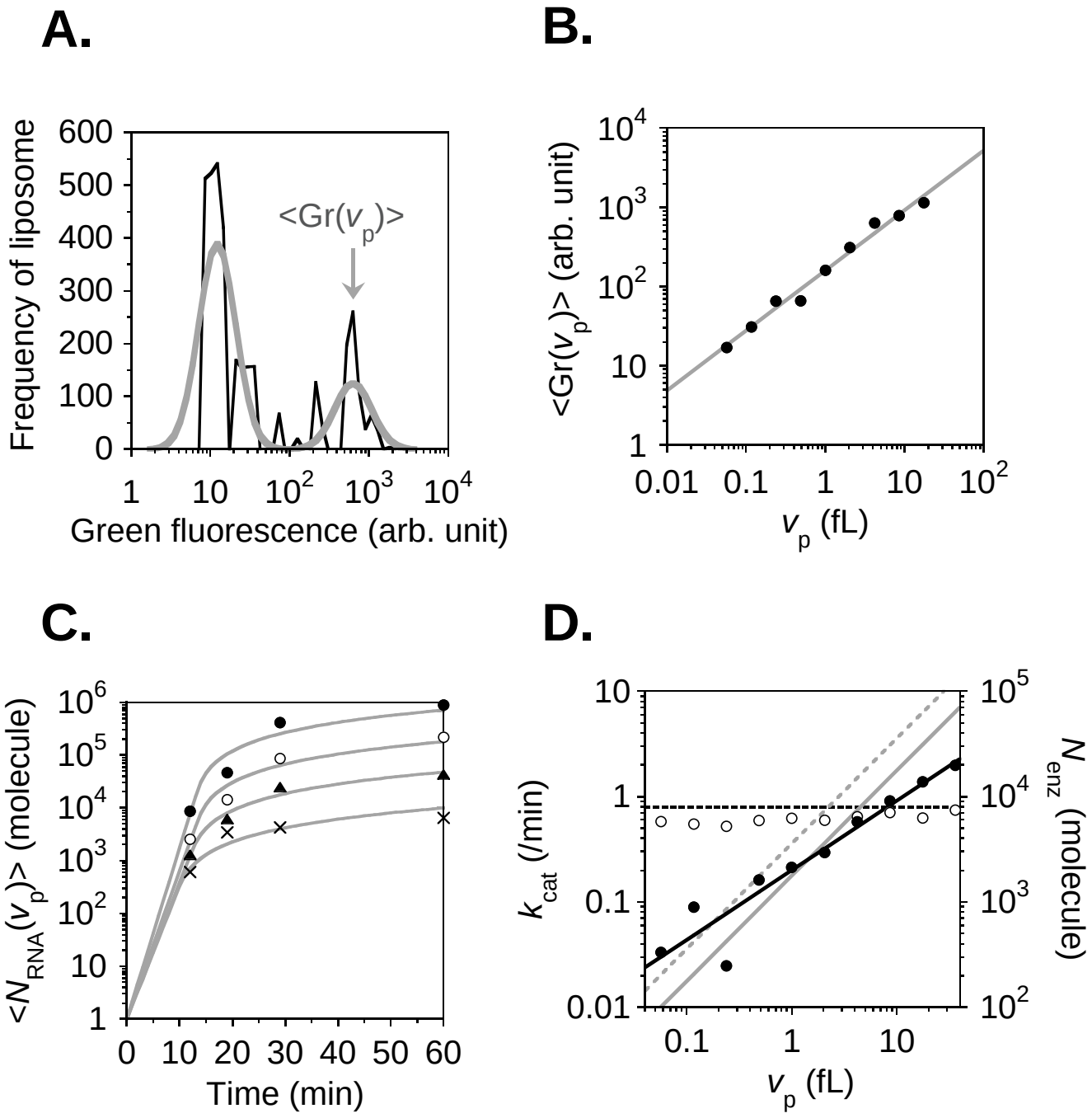


図4.4.体積補正後の平均的代表値の解析。A. 反応時間60分の結果の、v_p = 4.2 fLの階級における緑色蛍光強度のヒストグラム（黒色実線）。これを、2つのLognormalでフィットした結果が灰色実線（詳細は資料と方法を参照）。フィットの結果得られた$<G_r(v_p)>$が示してある。B. $<G_r(v_p)>$とv_pの関係。実線は対数スケールでの直線回帰。フィットの結果は本文に記載。C. $<N_{RNA}(v_p)>$の経時変化。●、○、▲、×はそれぞれ、 v_pが0.057、0.49、4.2、36 flのときの 結果。実線はそれぞれを式4.1にフィットした結果（詳細は資料と方法を参照）。D. $<N_{RNA}(v_p)>$の経時変化のフィットにより得られたk_{cat}およびN_{enz}のv_p依存性。○、●はそれぞれk_{cat} （左軸）、 N_{enz}（右軸）。黒、灰色破線はそれぞれ、試験管内反応で求めたk_{cat} （0.80/min）、酵素濃度（2.15 μ M）から推定されるN_{enz} 。灰色実線は対数スケールにおける傾き1での直線回帰であり、結果は本文に記載。 黒色実線は対数スケールにおける直線回帰$\ln(N_{enz}) = 0.67\ln(v_p) + 7.6$。

ソームについての反応体積v_pに対する頻度$F_{preac}(v_p)$を図 4.5Aに示した（●）。これは図4.3Dにおける縦軸への投影である。なお、灰色実線は、反応したリポソームの全体の体積v_wに対する頻度$F_{wreac}(v_w)$（図 4.3B黒色実線）から推定した反応体積v_pに対するヒストグラムである。また、同じく図 4.3Dの実験結果における反応したリポソームについて、RNA分子数に対するヒストグラムを図 4.5Bに示した（●）。これは図 4.3Dにおける反応したリポソームについての横軸への投影である。また、図 4.5Bの灰色実線は、推定された各反応体積（図 4.5Aの灰色実線）において、反応のばらつきがなく、平均的な反応（図 4.4D黒色実線）が行われたときとして推定されるRNA分子数の分布である。この推定値は、実験データとほぼ一致している。つまり、線形期である反応時間 60 分においては、反応したリポソーム全てについてのRNA分子数のばらつきは、RNA複製反応自体のばらつきよりも主として反応体積のばらつきに依存していることがわかる。

私達は、実験結果得られた反応したリポソーム全てについてのRNA分子数のばらつきに対する、反応体積およびRNA複製反応それぞれのばらつきの寄与度を以下に定量的に求めた。反応したリポソーム全てについての、反応時間 60 分でのRNA分子数の平均を$<<N_{RNA60}>>$、これに対する全ての偏差平方和をJ_{total}とする。また、ある反応体積v_pでのRNA分子数と、そのv_pでの平均RNA分子数$<N_{RNA60}(v_p)>$のv_p間の偏差平方和を、さらに全v_pについて足し合わせたものをJ_Aとする。さらに、$<N_{RNA60}(v_p)>$の$<<N_{RNA60}>>$に対する偏差平方和をJ_Bとする。このとき、これらの関係は以下のようになる。

$J_{total} = J_A + J_B$

J_AおよびJ_Vはそれぞれ、J_{total}に寄与しているばらつきのうち、反応のばらつきおよび体積のばらつきを意味する。ただし、J_Aには、体積v_pの階級の幅による偏差も含まれるので、J_Aをそのv_pの階級の幅に依存するものJ_{AV}と、反応のばらつきに依存するものJ_{reac}に分けることができる。すなわち、$J_A = J_{AV} + J_{reac}$である（詳細は試料と方法）。よって、J_{total}に寄与しているばらつきのうち、反応のばらつきおよび体積のばらつきを意味するものはそれぞれ、$J_{reac} = J_A - J_{AV}$および$J_{vol} = J_{AV} + J_B$であり、

$J_{total} = J_{reac} + J_{vol}$

である。これらの求め方の詳細は試料と方法を参照のこと。全体のばらつきを意味するJ_{total}、そのうち反応および体積それぞれのばらつきを意味するJ_{reac}およびJ_{vol}を求め、図4.5Cに示した。黒色は全て実験から得られたデータ、灰色は推定された反応体積の分布（図 4.5A灰色実線）および反応モデルから推定されるRNA複製反応自体がもつばらつき（モデル 2）から計算されたデータである。やはり、反応したリポソーム全てについてのRNA分子数のばらつきへの寄与は、反応由来よりも体積由来のほうが大きいことがわかるが、反応由来のばらつき（J_{reac}）が実験結果では 2 オーダー程度大きいことがわかる。なお、このような分散分析から図 4.1Dや図 4.2Cで反応のばらつきの指標として使用したSD_{lnRNA}を求めることができる（詳細は試料と方法）。結果、$SD_{lnRNA} = 21$ が求まった。これは、モデルから予想される値（約 1、図 4.2Cの×、$N_{RNA}(0) = 1$ での値）の

図4. 5

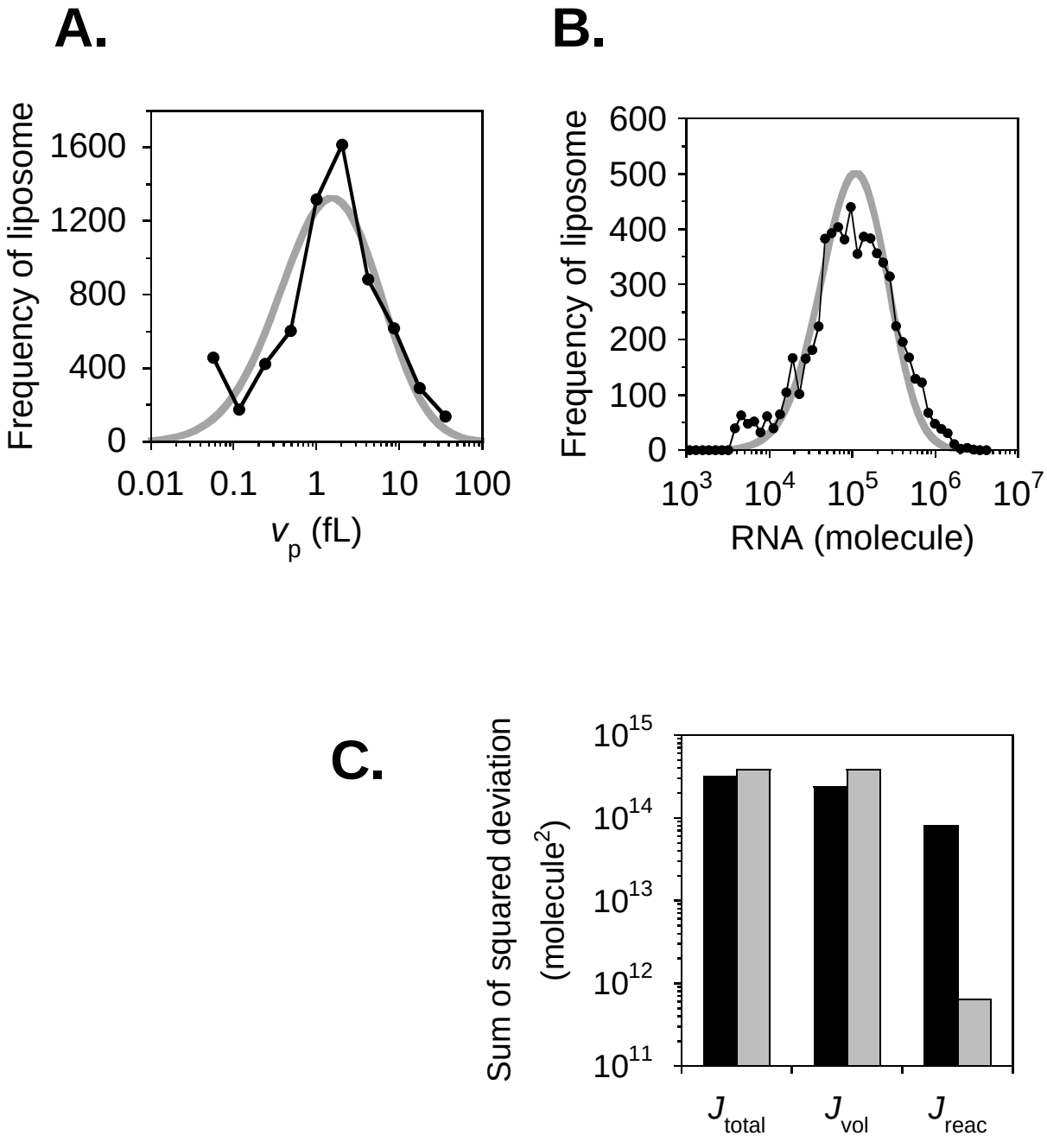


図4.5. A. 反応体積に対するヒストグラム。●は図4.3Dの反応したリポソームについてのヒストグラム。灰色実線は反応したリポソームのv_wに対するヒストグラムから内部区画構造を考慮して推定したヒストグラム。B. RNA分子数に対するヒストグラム。 ●は図4.3Dの反応したリポソームについてのヒストグラム。灰色実線は反応体積のヒストグラムと、図4.4Dの反応体積と酵素分子数の関係から推定した、反応ゆらぎがないときのヒストグラム。C. リポソーム内反応におけるRNA分子数のばらつきへの寄与。黒色は実験データ、灰色は反応体積のヒストグラムと、図4.4Dの反応体積と酵素分子数の関係、さらに反応モデルから推定された反応ゆらぎの3つから推定されたデータ。

10 倍程度大きい。この理由としては、実験誤差や、体積補正時の誤差なども考えられるが、少なくとも、リポソームの影響で、反応自体のばらつきが大きくなっているということを否定はできない結果が得られた。

4.5. 考察

4.5.1. 第 4 章の結論

本研究では、原始細胞内で行われる RNA 複製反応の実験モデルとして、リポソーム内における Qβ レプリカーゼによる RNA 複製反応を研究した。リポソーム内反応を測定し、試験管内反応と比較することにより、原始細胞においておこったであろう微小な脂質二重膜小胞内に包まれた RNA 複製反応の知見を得ることを目的とした。原始細胞の RNA 複製反応を理解するためには確率論的理解が必要であるため、まずは試験管内反応で反応ゆらぎを計測した。結果、RNA が倍化されるという過程がポアソン過程であると仮定するだけで実験結果が良く説明できた。試験管内反応において反応のばらつきを計測することができたのは指数増幅反応であるからであり、この手法は指数増幅する大腸菌などにも適応できうる。次にリポソーム内で RNA 複製反応を行い、FACS を用いて測定した。結果、平均の速度論的解析により、反応効率が試験管内反応と同等であることが示された。また、反応のばらつきは試験管内反応と比べて、10 倍程度大きい可能性があることが示された。

4.5.2. 原始細胞における RNA 複製反応の可能性

リポソーム内と試験管内で、RNA 複製反応の効率がほぼ同じであったことについて考察する。通常の試験管内反応（10-100μL オーダー）では、体積に対する面積比、つまり面積濃度が非常に小さいが、1 fL のリポソームでは、この面積濃度が 1000 倍濃い。よって、膜と内部分子が接する確率は高い。通常プラスチックチューブなどでも、タンパク質などが吸着して、反応を阻害することは多々あり、マイクロウェルやガラス基盤などの微小空間での反応はさらにこの影響が著しく、実験の際には最も大きな壁となることが多い。その上で、RNA はリポソームによる影響を受けないことは注目すべきであり、RNA とリポソームは物質特性として相性が良いといえる。そもそも再構成実験でつかう材料が生物由来なので、RNA とリポソームが生物によって最適化された産物なのか、それとも RNA とリポソームの相性が良かったから生物になれたのかは謎であるが、これら材料の特性が生物と深く関わることは間違いない。

4.5.3. 原始細胞における RNA 複製反応に対する体積の効果

RNA 複製反応は、最終的には反応体積にほぼ比例した RNA 分子数まで増幅される。それは反応体積と酵素分子数が比例しているからである。これは原始細胞においても同

じことが言えると考えられる。それは酵素ではないが、例えばモノヌクレオチドなど、RNA の材料となる物質が細胞体積に比例して存在したと考えることはおかしいことではない。つまり、体積に比例した物質制限による反応の抑止である。ここで、原始細胞にも少数ゲノム性が必要であったことを考慮すると、この少数ゲノム性を保つことに寄与した可能性がある。現在の細胞のように、細胞分裂と内部分子の複製が制御によってリンクされていない原始細胞を考えると、原始内ゲノム数が有限もしくはさらに少数に保たれるためには、ゲノム複製による増加と細胞分裂による希釈減少の速度がちょうどつりあう必要がある。しかしながら、これら増加および減少はともに自己触媒的、つまり、増加および減少量がゲノムの量に比例する。このとき、ゲノムの量が一定に保たれるのは、平均的には両者の速度が完全に一致するときのみであり、難しいといえる。一方で、物質制限によるゲノム複製反応の抑止、つまり、反応が材料枯渇で止まる、もしくは材料や触媒が不足することにより反応速度が遅くなる、という効果が存在すると、物質制限までは分裂よりもゲノム複製のほうが速く、制限まで増加すると分裂のほうが速くなりその中間のゲノム数で安定することができる（詳細は第 5 章）。このように、物質制限による反応の抑止は原始細胞にとって重要であったと考えられ、実際に本研究の実験系においても、物質制限の上限が体積に比例するという形で観測された。

4.5.4. RNA 複製反応のばらつきの寄与

全体のばらつきには、リポソームサイズのばらつきの寄与が大きかったことについて考察する。本研究でもちいたQβレプリカーゼによるRNA複製反応は、RNAが 1 分子から増幅されるとき、RNAが酵素濃度に達するまでは時間に対して指数的に増幅し、それ以降は酵素濃度に比例した速度で時間に対して線形的に増幅される。よって、線形期に入ると酵素分子が多く存在する反応区画では、多くのRNAが増幅される。本研究では酵素濃度が一定であるため、体積の大きい区画が多くの酵素を保持することになり、体積のばらつきがRNAの分子数のばらつきに大きく影響することとなった。一方でこの反応は、通常の酵素反応（基質分解反応など）と比較して、指数期におけるばらつきは非常に大きく、反応回数を重ねても指数期である間はそのばらつきが保たれるという特徴がある。本研究では、バックグランドの影響で指数期を観察することができなかったが、指数期であれば反応は酵素分子数に依存しないので、リポソームサイズのばらつきによって反応の影響は受けない。しかし反応のばらつきが大きいので、これが全体のばらつきに大きく寄与していただろう。ここで、図 4.1C黒色太実線と図 4.5A灰色実線はそれぞれ、指数期における反応のばらつきと、リポソームの体積のばらつきを示しているが、これらは半値全幅が 1 オーダー程度でほとんど同じ幅である。つまり、指数期では反応のばらつきが、線形期ではリポソームの体積のばらつきが主に全体のばらつきに寄与するが、その全体のばらつきの大きさは、どちらもあまり変わらないと推測される。したがって、例えばQβファージのゲノムRNAが大腸菌内に 1 分子侵入し、これが大腸菌内

で増幅するとき、ある時間におけるRNA分子数に対する確率密度関数のばらつき（対数スケールで）は、それが指数期であれ、線形期であれ、常に 1 オーダー程度であると推測できる（大腸菌の体積のばらつきも 1 オーダー程度[33]、第 1 章参照）。

4.5.5.　リポソームの全体積の反応体積への変換

本研究において、リポソーム内反応を詳細に解析できた大きな理由として、反応体積を測定することができたことが挙げられる。このために必要な知識は内部区画構造であった。内部区画構造が解明されておらず、反応体積としてv_wが扱われていたなら、内部区画の分布があるため、反応のばらつきは全く測ることができない。また、平均値の解析も異なった結果が得られる。実際に体積補正を行わずに平均値の解析（図 4.4）を同様に行ったところ、k_{cat}はあまり変わらないが、N_{enz}が加えた酵素に対して 2 オーダー程度低く見積もられた。これは、v_pの平均体積とv_wが 1 オーダー強異なることが原因であり、体積を大きく見積もったことによる濃度の低下に起因する。一方で、それでもやはりk_{cat}は変わらない、つまりRNA複製反応としては試験管内とほとんど同じ効率であるという結論は変わらない。ただし、体積補正なしに酵素分子数が 2 オーダー程度も試験管内反応と異なっていたならば、k_{cat}が変わらないという結論の信頼性は下がっていたと考えられる。

4.5.6.　まとめと展望

本研究は、RNA 複製反応がリポソーム内で、リポソームによってほとんど阻害を受けることなく反応しうることを示した。これは、RNA 合成を触媒できる RNA の発見、自己複製するリポソームの発見によって、有力な生命の起源説となっている RNA ワールド説において、原始環境下で行われたとされる、脂質細胞膜内での RNA 複製反応を協力に後押しする結果である。また、一つのポアソン過程のみで説明することができる RNA 複製反応の 1 例を示したことは、RNA 複製反応の簡単な理解に貢献する。今後さらに、融合および分裂を繰り返すリポソーム内で RNA 複製反応を行うことが再構成できれば、原始細胞や生命の起源について、重要な知見をもたらすことができると期待される。

4.6.　参考文献

1. Joyce, G.F. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **418**, 214-221 (2002).
2. Szostak, J.W., Bartel, D.P. & Luisi, P.L. Synthesizing life. *Nature* **409**, 387-390 (2001).
3. Gilbert, W. Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**, 618 (1986).
4. Johnston, W.K., Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Glasner, M.E. & Bartel, D.P.

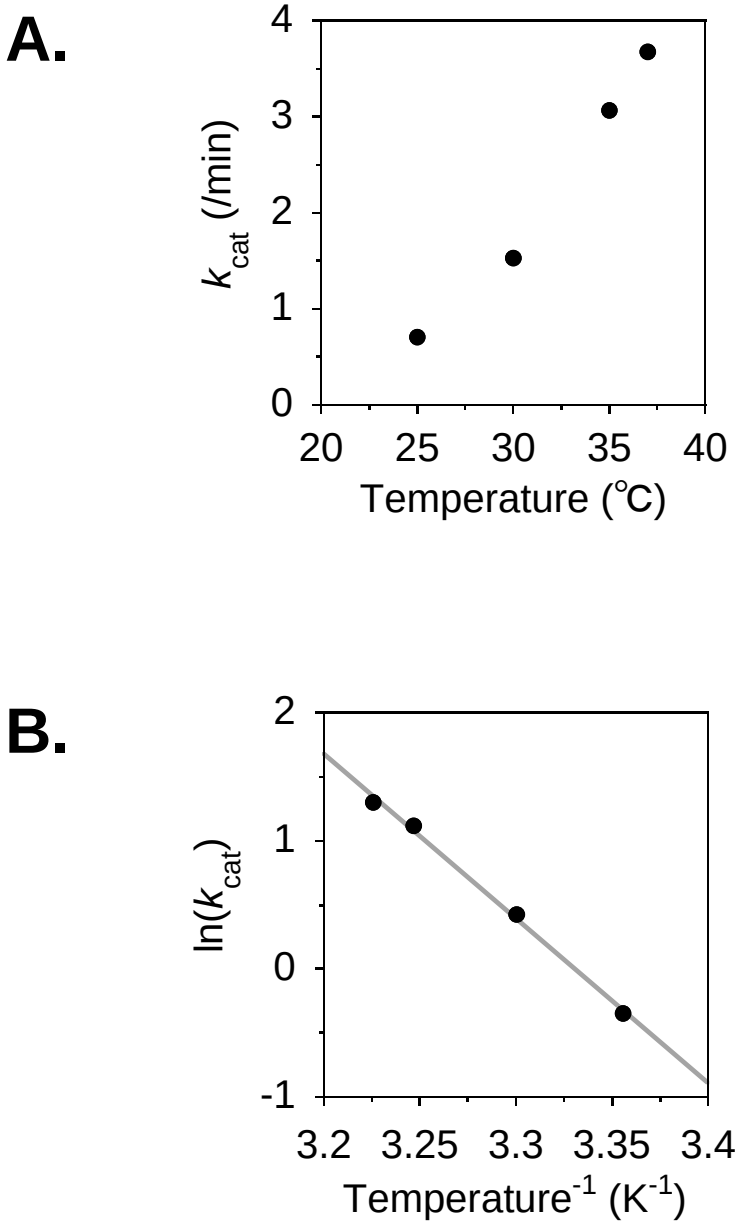
RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**, 1319-1325 (2001).

5. Takakura, K., Toyota, T. & Sugawara, T. A novel system of self-reproducing giant vesicles. *J Am Chem Soc* **125**, 8134-8140 (2003).
6. Hanczyc, M.M. & Szostak, J.W. Replicating vesicles as models of primitive cell growth and division. *Curr Opin Chem Biol* **8**, 660-664 (2004).
7. Oberholzer, T., Wick, R., Luisi, P.L. & Biebricher, C.K. Enzymatic RNA replication in self-reproducing vesicles: an approach to a minimal cell. *Biochem Biophys Res Commun* **207**, 250-257 (1995).
8. Calendar, R. The bacteriophages, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2006).
9. Haruna, I. & Spiegelman, S. Autocatalytic synthesis of a viral RNA in vitro. *Science* **150**, 884-886 (1965).
10. Biebricher, C.K., Eigen, M. & Luce, R. Kinetic analysis of template-instructed and de novo RNA synthesis by Q beta replicase. *J Mol Biol* **148**, 391-410 (1981).
11. Chetverina, H.V. & Chetverin, A.B. Cloning of RNA molecules in vitro. *Nucleic Acids Res* **21**, 2349-2353 (1993).
12. Brown, D. & Gold, L. Template recognition by an RNA-dependent RNA polymerase: identification and characterization of two RNA binding sites on Q beta replicase. *Biochemistry* **34**, 14765-14774 (1995).
13. Spiegelman, S. et al. The mechanism of RNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **33**, 101-124 (1968).
14. Mills, D.R., Peterson, R.L. & Spiegelman, S. An extracellular Darwinian experiment with a self-duplicating nucleic acid molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**, 217-224 (1967).
15. Eigen, M., Biebricher, C.K., Gebinoga, M. & Gardiner, W.C. The hypercycle. Coupling of RNA and protein biosynthesis in the infection cycle of an RNA bacteriophage. *Biochemistry* **30**, 11005-11018 (1991).
16. Biebricher, C.K., Eigen, M. & Luce, R. Template-free RNA synthesis by Q beta replicase. *Nature* **321**, 89-91 (1986).
17. Chetverin, A.B., Chetverina, H.V., Demidenko, A.A. & Ugarov, V.I. Nonhomologous RNA recombination in a cell-free system: evidence for a transesterification mechanism guided by secondary structure. *Cell* **88**, 503-513 (1997).
18. Hosoda, K., Sunami, T., Suzuki, H., Matsuura, T. & Yomo, T. Geometrical similarity in multi-vesicular giant liposomes measured by flow cytometry. *In preparation*.
19. Sunami, T. et al. Composition of phospholipids affects the encapsulation and reaction of

the biochemical systems in cell-sized liposomes. *In preparation*.

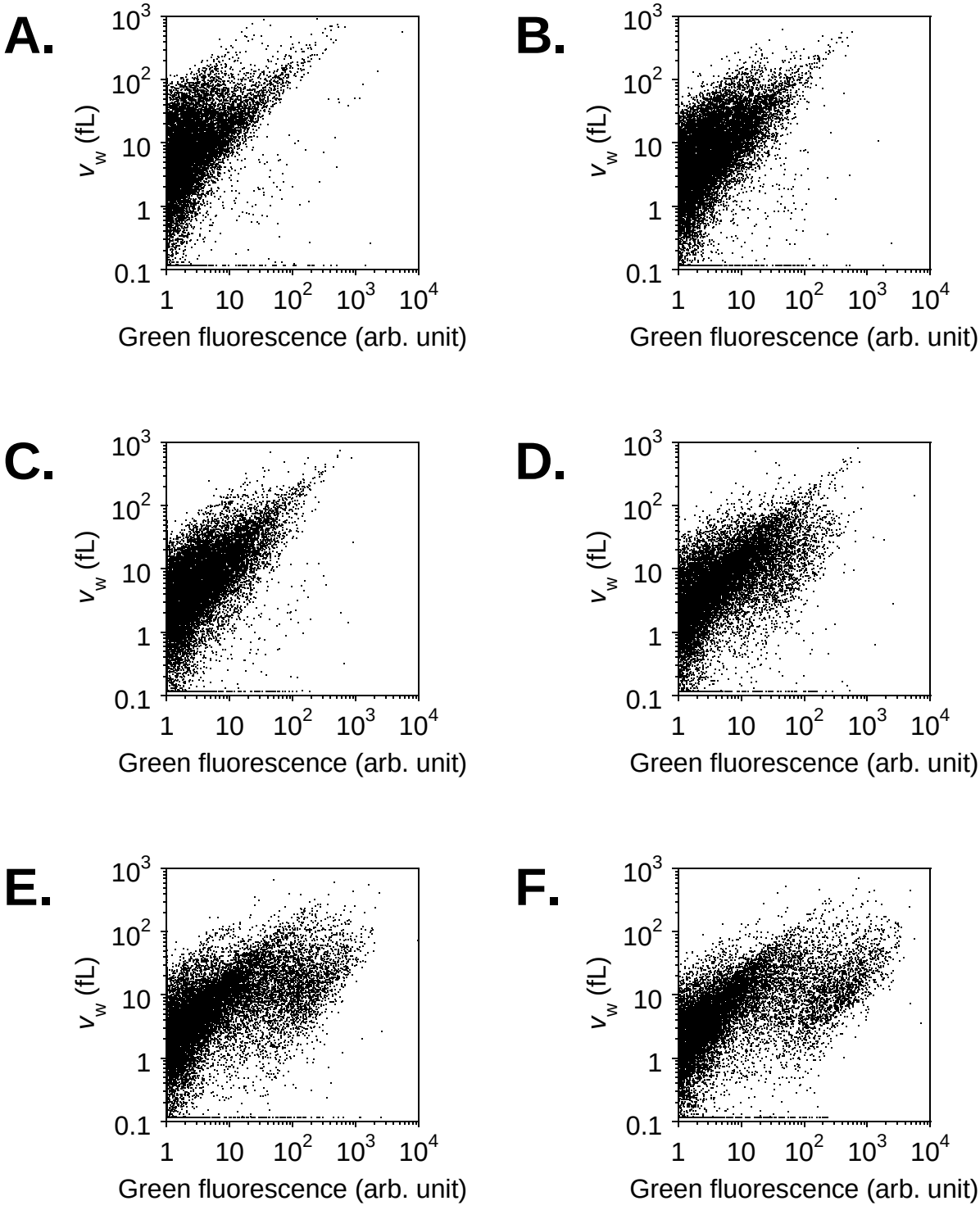
20. Koch, A.L. Evolution vs the number of gene copies per primitive cell. *J Mol Evol* **20**, 71-76 (1984).
21. Kaneko, K. & Yomo, T. On a kinetic origin of heredity: minority control in a replicating system with mutually catalytic molecules. *J Theor Biol* **214**, 563-576 (2002).
22. Fedoroff, N. & Fontana, W. Genetic networks. Small numbers of big molecules. *Science* **297**, 1129-1131 (2002).
23. Hosoda, K. et al. Kinetic analysis of the entire RNA amplification process by qbeta replicase. *J Biol Chem* **282**, 15516-15527 (2007).
24. Preuss, R., Dapprich, J. & Walter, N.G. Probing RNA-protein interactions using pyrene-labeled oligodeoxynucleotides: Qbeta replicase efficiently binds small RNAs by recognizing pyrimidine residues. *J Mol Biol* **273**, 600-613 (1997).
25. Axelrod, V.D., Brown, E., Priano, C. & Mills, D.R. Coliphage Q beta RNA replication: RNA catalytic for single-strand release. *Virology* **184**, 595-608 (1991).
26. Wuite, G.J., Smith, S.B., Young, M., Keller, D. & Bustamante, C. Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity. *Nature* **404**, 103-106 (2000).
27. Tolic-Norrelykke, S.F., Engh, A.M., Landick, R. & Gelles, J. Diversity in the rates of transcript elongation by single RNA polymerase molecules. *J Biol Chem* **279**, 3292-3299 (2004).
28. Brown, D. & Gold, L. Selection and characterization of RNAs replicated by Q beta replicase. *Biochemistry* **34**, 14775-14782 (1995).
29. Ugarov, V.I., Demidenko, A.A. & Chetverin, A.B. Qbeta replicase discriminates between legitimate and illegitimate templates by having different mechanisms of initiation. *J Biol Chem* **278**, 44139-44146 (2003).
30. Sato, K., Obinata, K., Sugawara, T., Urabe, I. & Yomo, T. Quantification of structural properties of cell-sized individual liposomes by flow cytometry. *J Biosci Bioeng* **102**, 171-178 (2006).
31. Ishikawa, K., Sato, K., Shima, Y., Urabe, I. & Yomo, T. Expression of a cascading genetic network within liposomes. *FEBS Lett* **576**, 387-390 (2004).
32. Sunami, T. et al. Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins. *Anal Biochem* **357**, 128-136 (2006).
33. Hosoda, K. et al. A division-induced lognormal-like size distribution for Escherichia coli and liposome. *In preparation*.

補足資料4.1



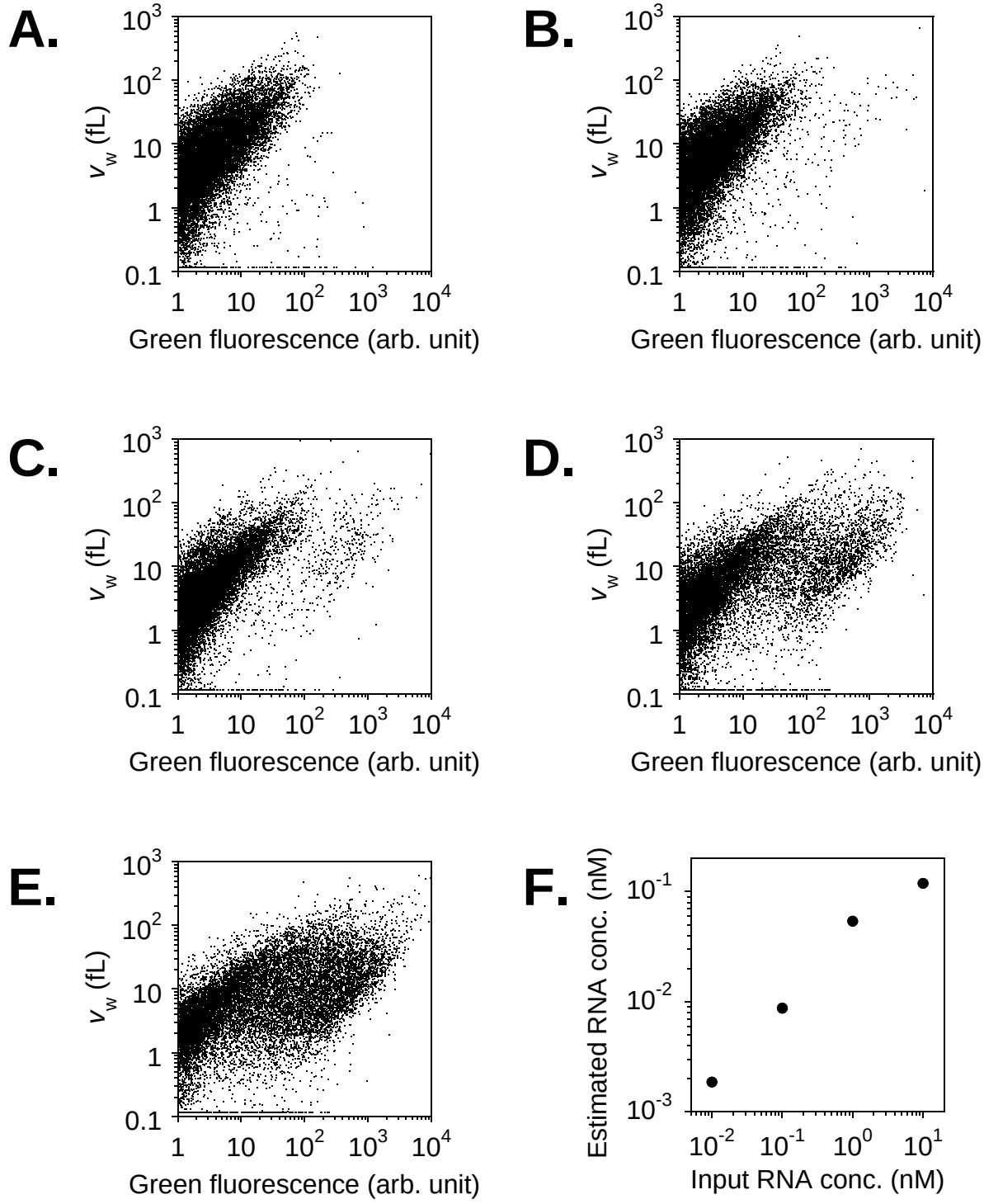
補足資料4.1　触媒速度定数k_{cat}の反応温度依存性。A. 反応温度に対するk_{cat}の値。図4.2B同様にして求めた。B. 温度依存性はArrheniusの式でよく説明できる。

補足資料4.2



補足資料4.2　リポソーム内RNA複製反応の経時変化。A, B, C, D, E, Fはそれぞれ0, 5, 12, 19, 29, 60分の結果。

補足資料4.3



補足資料4.3　反応したリポソームの封入前反応溶液中RNA濃度依存性。A, B, C, D, Eはそれぞれ、封入前RNA濃度0, 0.01, 0.1, 1, 10 nMの反応時間60分でのFCMの結果（ただしDは図4.3Aと同じ結果）。F. 封入後と封入前のRNA濃度の関係。A-Eのそれぞれについて、図4.3Bと同様にして封入されたRNAの濃度を求めた。

第 5 章：原始細胞繁殖に対する理論的考察

5.1. 概要および本論文での位置づけ

本章では、RNA ゲノムをリポソーム内に有し、細胞分裂がゲノム複製に依存しない原始細胞を想定し、計算期シミュレーションを用いてこれの繁殖に対する理論的考察を行った。原始細胞のモデルとしては、第 2-4 章の再構成実験の結果を踏まえ単純なものを作成した。それは、RNA が時間に対して一定の確率で倍化し、細胞膜も時間に対して一定の確率で分裂するというものである。結果、主に以下の 5 つのことが示された。1 : 細胞内の RNA 分子数に、物質制限による上限が存在する場合にはダイナミクスに関係なく安定に繁殖できる。2 : 細胞内の許容 RNA 分子数は変異率に反比例する。3 : RNA 分子間の親和性が高い場合には RNA 複製と細胞膜分裂がつりあったときに比較的高い確率で繁殖が可能である。4 : RNA 分子間の親和性が低い場合にはダイナミクスのつりあいによる原始細胞の繁殖は難しいが、細胞サイズのばらつきがこれに寄与する可能性がある。の 4 つである。

5.2. 背景

5.2.1. 生命の起源と RNA ワールド仮説における原始細胞

人類は古くから生命の起源に対して問いかけてきた。つまり、有機化学物質の集合体から、どのようにして生物細胞が生まれたのか？という問いである。これを議論する際に、まずは、生物ついての定義する必要がある。生物の定義は難しい[1]が、自然科学においては、生物がもつ性質を次の 3 点をもって定義とすることが多く、本研究でもこれに従う。(i) 代謝能（構成材料やエネルギーなどを生産する）、(ii) 自己複製能（遺伝情報を含む細胞全体を複製する）、(iii) 進化能（遺伝情報に変異が導入されて生じた変異体がその遺伝情報に基づく機能により選択される）である[2]。これら 3 つの特徴をはじめて持った細胞、つまり原始細胞がどのようにして繁殖したかは、自然科学において重要な問いである。

これまでに、様々なタイプの生命の起源とその過程が提唱されているが、その中でも有力であるのが、RNAワールド仮説である[3-6]。RNAワールド仮説における原始細胞は、現在の細胞に対してDNAおよびタンパク質を欠いており、遺伝情報担体と代謝触媒をともにRNAが担っている。これが有力であるのは、RNAはDNA同様に遺伝情報担体として使用される（ウィルスなどは実際に使用している[7]）ことに加え、RNAは十分強い触媒活性を持つことが知られている（触媒活性を持つRNAはリボザイムと呼ばれる[8]）からである。また、RNAの生化学的特長から、RNA複製反応は最低でも 2 分子必要であったとされ、そのために脂質二重膜小胞（リポソーム）が必要であったとされる[4]。

実際に、RNAを鋳型としてその相補鎖RNAの合成を触媒するRNA[9]および、自発的に成長や分裂を繰り返し自己複製するリポソーム[10]が実験的に再構成されたことより、RNAワールド仮説で想定されているリポソームとRNAからなる原始細胞が存在したことの可能性が示されている。RNAワールド仮説は最も有力な説であるため、これにおいて想定される原始細胞繁殖の可能性を検討することは、生命の起源にとって重要である。

5.2.2. 少数ゲノム性に関わる原始細胞のダイナミクスの重要性

現存する細胞は、そのゲノム（全遺伝情報）を少数コピーしかもたない[3]。これは進化の効率を高くするためと考えられている[11-13]。ゲノムが少数であることは、確率的ゆらぎによって影響を受けやすい、つまり不安定であることを意味する[14]。少数ゲノムの状態を安定的に保持するために、現在の細胞は主に以下の 2 つのことを制御している。1 つはゲノム複製と細胞分裂の同期[15]、もう 1 つは細胞分裂時のゲノム分配[16]である。現存するほぼ全ての細胞がこれら”同期と分配”を制御して少数ゲノム性を保っていることからも、少数ゲノム性が重要であることがわかる。進化するということが生物の定義である以上、原始細胞も完全ではないにしろ、少数ゲノム性を持つことが好ましいと考えられる。しかしながら、原始細胞がその繁殖当時から、上記のような”同期と分配”の制御機構をもち、少数ゲノム性を保持していたとは考えにくく、これら”同期と分配”の制御を持たない原始細胞の段階は存在し、これが進化したと考えられる[17, 18]。つまり、細胞膜の分裂が内部のゲノムの複製に依存せず独立に起こっているような細胞である。このような原始細胞が少数ゲノム性を持つためには、少なくともゲノム複製と細胞分裂の速度がなんらかの要因でつりあっている必要があると考えられる。なぜなら、ゲノム複製が細胞分裂よりも常に速ければ、原始細胞内のゲノムのコピー数は無限に多くなり、逆に細胞分裂がゲノム複製に関わる内部の代謝反応よりも十分に速ければ、細胞内に複数の分子を保つことはできなくなる（ゲノム複製に複数の分子が必要である[4]）からである。以上のように、原始細胞が進化能を持つには、そのゲノム複製と細胞分裂のダイナミクスが重要な役割を果たしたと考えられる。本研究では、これらのダイナミクスを原始細胞のダイナミクスと呼び、これに注目する。ただし、RNAワールド仮説におけるゲノムの定義は難しいので、ここでは自己複製能を持つ内部RNA分子とする。

5.2.3. 再構成実験に基づいた理論モデルの重要性

原始細胞のダイナミクスを理解するための理論研究には、再構成実験[19]に基づいた理論モデルを用いることが重要である。理論の上では、現存しない原始細胞など、あらゆる条件を仮定し、その条件下での結論を得ることができる。一方で、具体的に原始細胞のダイナミクスにとって重要な要素を決定するためには、あらゆる条件を特定の条件に絞る必要がある。このように条件を特定するために必要なのが、実験事実である。生物は分子の中でも比較的複雑な高分子によって構成されており、これらの生化学的特長が

生物の特徴に寄与することが大きい。よって、可能な条件を材料の生化学的特長を考慮して絞ることができる。このように、生命の起源に関係したと思われる条件を実験的に検証する、再構成実験が盛んに行われている。前述したように、RNAを鋳型としてその相補鎖RNAを合成するRNAの存在[9]、自発的に成長や融合、分裂を繰り返すリポソームの存在[10]の可能性を示した研究が再構成実験によるものである。このような再構成実験で得られた結果に基づいた理論モデルを用いることは原始細胞の理解にとって重要である。

5.2.4. 研究の概要

私達はこれまで、脂質二重膜によって構成された細胞膜の分裂が内部RNA分子の複製に依存せず独立に起こる原始細胞を想定し、この細胞膜モデルとしてリポソームのダイナミクス[20]を、またこのRNAの複製反応モデルとしてQβレプリカーゼによるRNA複製反応のダイナミクス[21, 22]を、それぞれ再構成実験を行い、詳細に解析してきた。これにより、前者において、生物による制御がなく自己組織化のみによって形成されるリポソームが持ちうるダイナミクスとその結果とりえるサイズ分布を、後者において、RNAの機能に依存してRNAが指数増幅する反応が、単位時間当たりに低い確率で倍加するという簡単な反応モデルで記述しうること等を示した。よって本研究では、これら再構成実験の結果を踏まえた上で、原始細胞が繁殖しうる原始環境の理論モデルをたて、原始細胞が繁殖するための条件、および繁殖に使用されうる戦略を考察した。結果、原始細胞繁殖に関して、以下のようなことが示唆された。細胞体積に依存した物質制限によるRNA分子量の制限は、RNA複製反応と細胞分裂のダイナミクスに依存せず、安定に原始細胞繁殖を導くことができる。細胞内で許容されるRNA分子数は、変異率の逆数に比例する。原始細胞内において 2 分子のRNA分子が衝突してその複製反応を行う際、この 2 分子間の親和性が高い場合は、複製速度と細胞分裂速度がつりあうときに安定に原始細胞繁殖を導くことができる。一方で 2 分子間の親和性が低い場合は、原始細胞が繁殖する確率が極端に下がるが、そのときに細胞サイズのゆらぎが重要な役割を持ちうる。これらは、原始細胞とはどのような条件を満たしたものであるかを考察する際に重要な知見と考えられる。

5.3. 原始環境下における自己複製モデル

5.3.1. モデルの概要

私達は、脂質二重膜によって構成された細胞膜（リポソーム）の分裂が内部RNA分子の複製に依存せず独立に起こる原始細胞を想定した。内部RNAとしては、過去の提案[4]に従い、複製時の鋳型になることができると同時に、他のRNA分子（種類は同じであっても）を鋳型としてその複製を行うことができるRNAを仮定した。RNA分子は、このよ

うなことが可能であったと考えられており、実際に他のRNAを鋳型として、この相補鎖を合成できる触媒活性を持つRNAの存在が確かめられている[9]。ただし、複製は 2 分子反応、つまり鋳型と合成それぞれにRNA分子が必要であるということに注目されたい。このようなRNAが細胞膜内で反応し、その細胞膜は内部のRNAの反応とは独立に分裂や融合（成長）を繰り返しているような原始環境を想定する（図 5.1A）。ただし、この原始細胞は、RNAが触媒反応を起こすこと、リポソームがRNAを保持したまま分裂することで複製できること、細胞膜によってRNAが区画化されていることから、背景に説明した生物の 3 つの特徴（i）代謝能、（ii）自己複製能、（iii）進化能を満たしているため、原始細胞と呼んでいる。この原始細胞が絶滅せずに繁殖する条件についての知見を得ることが本研究の目的である。

5.3.2. 細胞膜のダイナミクス設定

まず、モデルにおける細胞膜のダイナミクスを説明する。私達は過去の研究[23]（第 2 章）において、サイズの制御がない状態においても、分裂と融合によって定常分布を取りえるという結果を得た。よって、細胞膜サイズは一定を保てるものと考え、単位時間当たりに一定の確率p_{div}（1 よりも十分小さい）で 2 つに分裂し、分裂直後に融合によりサイズが一定に保たれるという単純なものにした。ただし、融合されるリポソームはRNAが封入されていない空のリポソームである。さらに、第 2 章において分裂が比較的等分であるという結果を得たので、細胞内のRNAは、分裂後の 2 つのリポソームに等確率で分配されるとした。この細胞膜の分裂（融合）は、内部のRNAによる反応とはまったく独立に起こるという点に注意されたい。なお、リポソームの分裂速度はサイズに依存するという結果も得られているので、これについては考察で議論を行う。

5.3.3. 内部 RNA 分子の反応設定

次に、モデルにおける内部RNA分子の反応を説明する（図 5.1B）。私達は、モデルを単純にするために、以下の 3 つの反応（反応 5.1-5.3）だけを含むことにした。私達はこれまでに、Qβ レプリカーゼによるRNA複製反応は、単位時間当たりに一定の確率で倍化し、その確率が十分低い（≦0.1）という仮定のみで、実験結果をよく説明できることを示した[22]（第 4 章参照）。本研究においては合成反応の触媒もRNAを想定しているので、その点は異なるが、RNAを鋳型としてRNAが合成される反応という点では同じ反応であるため、これらに従った。先述のように、内部のRNAは鋳型にも、複製反応の触媒にもなることができると仮定する（これをRepとする）。さらに、この複製は完全ではなく、確率μで性質が異なるRNA分子（Mut）が合成されることもあるとする。RNA複製における変異と考えれば妥当である。よって、これらの反応は

$$\mathrm{Rep}+\mathrm{Rep}\rightarrow\begin{cases}2\mathrm{Rep}+\mathrm{Rep} & (\text{確率}1-\mu)\\ \mathrm{Rep}+\mathrm{Mut}+\mathrm{Rep} & (\text{確率}\ \mu)\end{cases}\qquad \text{反応 5.1}$$

と記述できる。なお、Repの分子数をN_Rとし、RepとRepが衝突したときに、この触媒反応が単位時間当たりに起こる触媒確率をp_{cat}とする（1 よりも十分小さい）。これは、生化学反応における触媒速度定数と考えることができる。RepとRepの衝突確率については結果における各条件で述べる。また、このMutは他のRNAを合成することはできないが、鋳型となることはでき、Repによって複製されるとする。よって、

$$\mathrm{Mut} + \mathrm{Rep} \rightarrow 2\mathrm{Mut} + \mathrm{Rep} \qquad \text{反応 5.2}$$

と書ける。なお、Mutの分子数をN_Mとし、この反応の触媒確率も反応 5.1 と同様にp_{cat}とする。ただし、Mutを鋳型としてRepが合成されるということはないとする。これは、多くの研究がなされているにもかかわらず、Repのような性質を持つRNAが未だ発見されないことから、Repを鋳型にして他の状態が合成されることに比べ、他のRNA分子に変異が入ってRepの状態を取ることが非常に稀であり、無視できるとするのは妥当であると考えられる。さらに、Mutは、Repを消失する反応を触媒するとする。つまり、

$$\mathrm{Rep} + \mathrm{Mut} \rightarrow \mathrm{Mut} \qquad \text{反応 5.3}$$

である。単純化のためにこの触媒確率もp_{cat}とする。この反応は、区画による効果、つまり進化能が顕著に現れるために仮定した反応であり、この反応でなくても、Mutの存在がRepの増幅効率を下げるという効果を仮定すれば本研究の結果は定性的には同じである。また、RNAの生化学的性質から、この反応は以下のようなことから妥当であると考えられる。RNAが合成されるには、大量の化学エネルギー、および高性能の触媒を要する。一方で、RNAは熱不安定であり、容易に分解される。つまり、RNA合成よりも、RNA分解のほうが熱的に容易（活性化エネルギーが低い）であると考えられる。よって、RNAが合成され、これがなんらかの反応の触媒活性をもつとき、その活性はRNA合成よりもRNA分解であることのほうが多いと考えられる。実際に、RNAがRNA合成活性を持つことは非常に稀である一方で、RNA分解を触媒するRNAは多く発見されている。また、比較的容易であるRNA分解を触媒するRNAは、RNA合成を触媒するRNAよりも情報量が少なくてよい、つまり短鎖でよいと考えられる。実際に、RNA合成を触媒するRNAは、RNA分解を触媒するRNAと比較して長鎖である。熱安定性から、RNAは長鎖のほうが分解されやすいと考えることができるので、Repの分解に対して、Mutの分解は無視できるほど小さいと考えることはおかしいことではない。さらに、Qβレプリカーゼによる RNA複製反応のように、Repが一本鎖RNAであり、二本鎖になるとその機能を全て失うとすると、MutはRNA合成活性を持つが鋳型RNAを二本鎖にしてしまうと考えることによって、この反応と同様になる。実際に、新規RNAを一本鎖として遊離させることができるRNAとできないRNAが存在することは、Qβレプリカーゼによる RNA複製反応においても確認されている[24]。

5.3.4. モデルにおける評価

以上のように、2 種類のRNA分子（RepとMut）によって 3 種類の反応（反応 5.1-5.3、

図 5.1B）が、その反応とは独立に分裂・融合を繰り返すリポソーム内で行われるとき、どのような条件下でこの原始細胞が絶滅せずに繁殖できるかを考える。繁殖するとは、細胞内にRepを 2 分子以上保持した原始細胞（以降、生細胞と呼ぶ）が、リポソームの分裂にともない増幅していくことである。複製反応には 2 分子必要なので、Repを 2 分子以上保持していないと自己複製能を持たないことに注意されたい。逆に、絶滅する、つまり生細胞がいなくなるというのはどのようにして起こりえるかを説明する。生細胞が生細胞でなくなる、つまり死亡する理由には以下の 2 つがある。1 つめは細胞分裂によってRepが 2 つの小胞に分けられる際に 1 分子以下になる場合であり、2 つめはMutによってRepが消失され、1 分子以下になる場合である。つまり、1 細胞あたりのRepの分子数が少ない場合は前者の理由で絶滅し、多い場合は細胞内にMutが出現することで後者の理由により絶滅し得る。前者の理由を詳細に説明すると、例えばRepの複製よりも細胞分裂が速い場合、細胞内のRepの分子数は次第に減っていき、最終的には 2 分子を保てなくなるということである。後者の理由を詳細に説明する。RepとMutが共に同一細胞内に存在し、変異がない場合、反応 5.1 と反応 5.2 における触媒確率（触媒速度）が同じであるので、RepおよびMutあたりのそれぞれの増幅率（単位時間当たりに倍加する割合）は同じである。しかしながら、反応 5.3 ではRepのみが減少するので、必ずMutのほうが増幅率は大きい。また、反応 5.1 および反応 5.2 の複製と、反応 5.3 の分解の触媒確率が同じであるため、Mutが増えるにつれて、Repの分解速度が大きくなり、いずれはRepが 0 になる。よって、細胞内に常にMutが存在する場合は、細胞は必ず死亡する系になっている。つまり、細胞内のRepの分子数が多いと、反応 5.2 によりMutの出現率が高くなるため、この理由で細胞は死亡しえる。以上のような場合に、Repを 2 分子もつ生細胞を初期状態として、生細胞が 1000 個まで増幅することを繁殖と定義した。ただし、この間に死細胞がどれだけ生まれてもかまわないことに注意されたい。様々な条件下でこの試行を繰り返し、繁殖の確率（P_{prop}）を求めることでその条件の評価とした。

5.4. 計算結果

5.4.1. 静的な原始細胞繁殖条件―RNA 分子数と変異率の関係

まずは、RNAの複製と細胞膜の分裂速度に依存せず（静的）、原始細胞が繁殖しうるモデルとして以下のような場合を想定した。リポソーム内でのRNA複製反応に量的制限がある場合、つまり 1 つのリポソーム内においてある一定以上は増幅できないという制限がある場合である。現実的には、RNAを構成する単量体であるリボヌクレオチドが、次々と融合してくる空のリポソーム内に一定量しかない等と考えることができる。実際、私達の再構成的実験において、リポソーム内においてQβレプリカーゼによるRNA複製反応を行ったときは、最終的なRNA合成量を決定するのは、主にリポソーム内に存在す

図5. 1

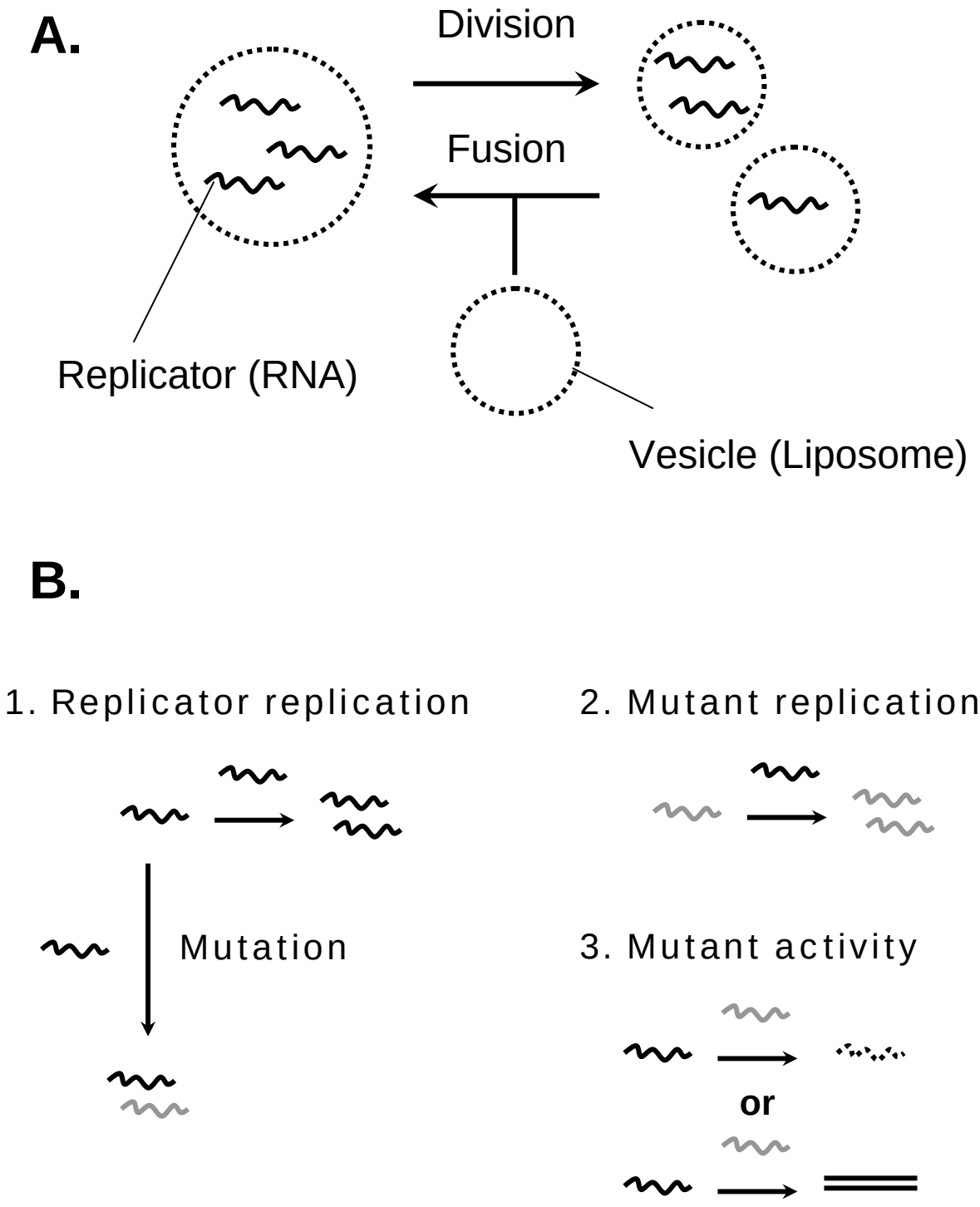


図5.1.モデルの概要。A.モデルにおいて想定している小胞内部に複製子が存在している原始細胞。小胞の分裂・融合は小胞内部分子の反応とは独立に行われる。B. 小胞内部分子による3つの反応。詳細は本文に記載。

るQβレプリカーゼの量によって制限されるという結果が得られている[22]（第4章参照）。よって、細胞内の複製増幅可能な最大分子数N_{max}が存在するという条件の下、計算機シミュレーションを行った。ただし、RNA複製反応と細胞膜の分裂速度に依存しない場合を考えたいため、前者が後者よりも十分に速い（p_{cat} >> p_{div}）いとした。このとき、細胞内のRNAは以下のような状態になる。細胞内にMutが存在しない場合、細胞膜が分裂する直前には常にN_{max}分子のRepが存在し、分裂直後にはその約半分になる。さらにまた次の分裂の直前までにはRepがN_{max}分子まで増幅する。細胞内にMutが 1 分子でも出現した場合には、細胞内のRepが全て分解される、つまり生細胞が死亡する。

上記のような場合、シミュレーション結果に依存するモデル定数はμとN_{max}だけである。これら定数の原始細胞繁殖の確率（P_{prop}）に対する依存性を図 5.2Aに示した。結果から、N_{max} = 3 のときは、Repが 2 分子以上の生細胞を新しく生み出すことができないのでP_{prop} = 0 となっているが、N_{max}がそれより大きいときは、全てのμにおいてN_{max}が小さいほどP_{prop}が大きいことがわかる。これは少数分子性によって、Mutの出現を抑えることができるからである。また、p_{cat} >> p_{div}を仮定しているため、例えばN_{max} = 3 であっても、p_{cat} >> p_{div}であるために、分裂直前の細胞内には必ずRepが 3 分子存在し、分裂によって片方は死亡しても、変異がなければもう片方は必ず生き残ることに注意されたい。図 5.2Aはまた、μが小さいほどN_{max}の許容範囲が広いことを示している。これは以下のように考えることができる。変異体Mutが現れる前、分裂直前における細胞内のRepの分子数N_RはN_{max}である。これが分裂直後は約N_{max}/2 になる。ここから再びN_{max}になるまでの間にMutが出現する確率は、μN_{max}/2 である。これが 1/2 以下であれば、Mutが出現するよりも前に分裂する確率が、分裂するよりも前に出現する確率よりも高く、生細胞が増幅することが可能と考えられる。したがって、原始細胞繁殖の条件は

$$N_{max} < \frac{1}{\mu} \qquad \text{式 5.1}$$

である。実際に、各μにおいてP_{prop}が 1/2 になるようなN_{max}を 1/μに対して図 5.2Bにプロットした（○）。結果、N_{max}と 1/μは傾き 1 で正比例し（図 5.2Bの実線）た。以上のように、RNAの複製とリポソームの分裂の速度に依存せず（静的）、細胞内でのRNA複製反応に量的制限がある場合、原始細胞繁殖の条件における細胞内RNA分子数と変異率の関係は、式 5.1 で示されることがわかった。

5.4.2. 動的な原始細胞繁殖条件―RNA の分子間親和性が高い場合

私達は次に、RNA の複製と細胞膜の分裂速度がつりあうことにより原始細胞が繁殖しえる場合を調べた（動的）。まず、RNA 分子の反応における 2 分子間の衝突は無視することとした。これは、溶液反応速度論的には、2 分子間の親和性が十分に高く、反応が濃度に依存しない場合と言えるため、以降は“RNA 分子間の親和性が高いとき”と記述する。つまり、反応 5.1-3 を以下のように単純化した。

図5.2

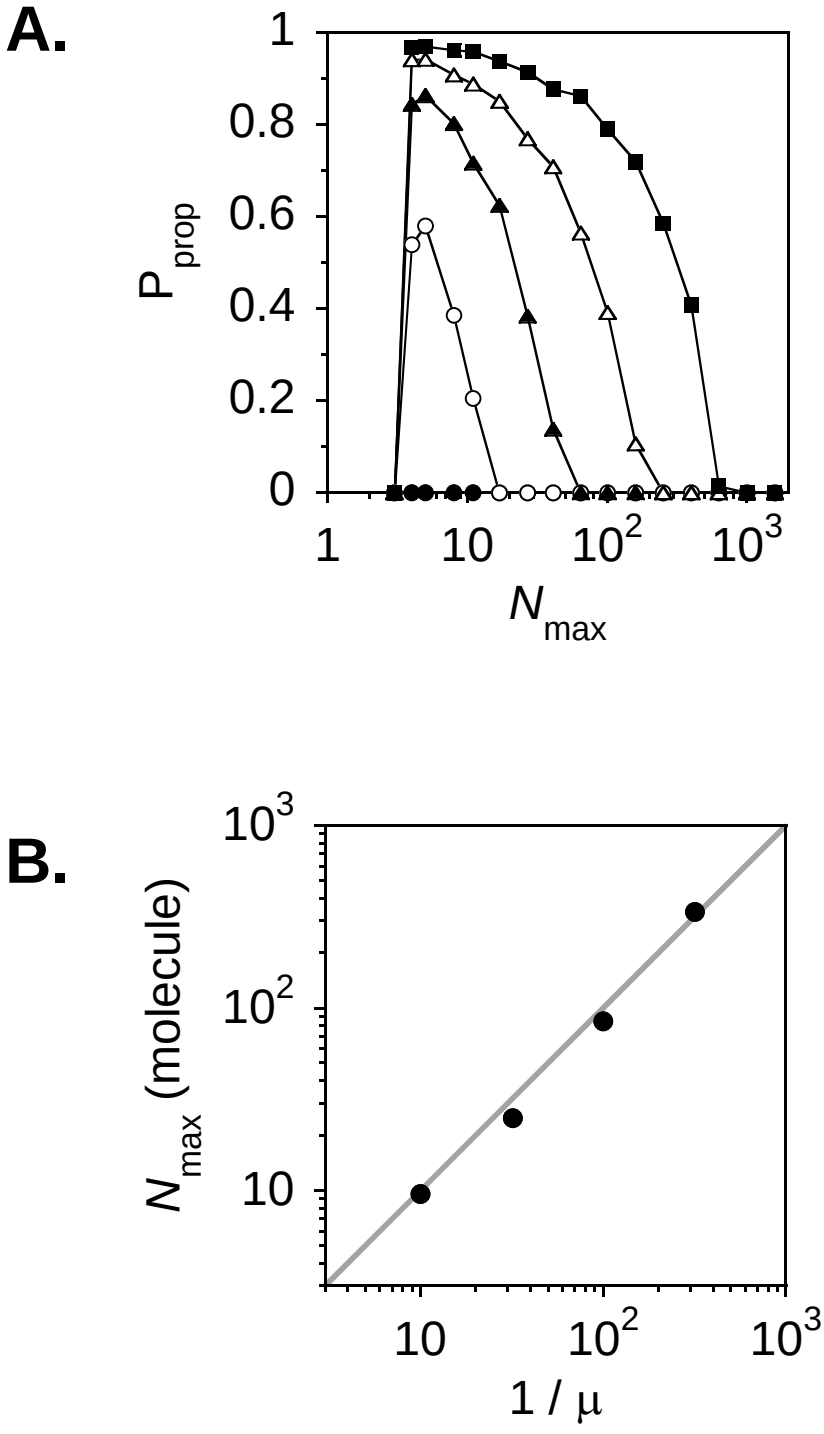


図5.2 細胞内に存在できるRNA分子数に上限N_{max}があるときの結果。A. 異なるμにおけるN_{max}とP_{prop}の関係。μは0.25（●）、0.1（○)、0.031（▲）、0.01（△）、0.0032（■）。B. AにおいてP_{prop} =0.5になるN_{max}（●）と、1/μの関係。実線はN_{max} = 1/μ。

$$\mathrm{Rep} \rightarrow \begin{cases} 2\mathrm{Rep} \\ \mathrm{Rep}+\mathrm{Mut} \end{cases} \quad (N_R \geq 2\text{のとき、１細胞あたり}N_R\text{回試行し確率}p_{cat}\text{で起こる})$$

$$\mathrm{Mut} \rightarrow 2\mathrm{Mut} \quad (N_R \geq 1\text{のとき、１細胞あたり}N_M\text{回試行し確率}p_{cat}\text{で起こる})$$

$$\mathrm{Rep} \rightarrow \mathit{None} \quad (\text{1 細胞あたり}N_M\text{回試行し、確率}p_{cat}\text{で起こる})$$

ただし、N_RおよびN_Mは細胞内のRepおよびMutそれぞれの分子数であり、*None*は分子がないことを表す。この条件は、Repがいくら少なくても、Mutは単位時間当たりに一定の確率で増幅できるという少し考えにくい状況ではあるが、理解を単純化するためであり、現実的にRepの取り合いによる競争阻害などを考慮しても、以下に示す結論は変わらない。このとき、反応速度式は以下のように表すことができる。

$$\begin{cases} \dfrac{dN_R}{dt} = (1-\mu)\,p_{\mathrm{cat}}\,N_R - p_{\mathrm{div}}\,N_R - p_{\mathrm{cat}}\,N_M \\ \dfrac{dN_M}{dt} = p_{\mathrm{cat}}\,N_M - p_{\mathrm{div}}\,N_M + \mu\,p_{\mathrm{cat}}N_R \end{cases} \qquad \text{式 5.2}$$

ただし、このときのp_{cat}やp_{div}は確率ではなく、その確率に比例した速度定数として考えることができる。この平衡状態での解はRepおよびMutの分子数（それぞれN_RおよびN_M）が共に 0 のときである。つまり、平均的には細胞内にRNA分子を保持できない系である。

上記のような条件下において、速度定数（確率）を無次元化すると、可変定数は$p_{\mathrm{cat}}/p_{\mathrm{div}}$および$\mu$だけである。これらを変化させて、数値シミュレーションを行い、前述に定義した原始細胞繁殖確率（P_{prop}）を求めた。ただし、試行を 1000 回行った場合の確率であり、その結果を図 5.3 に示す。結果から、式 5.2 が示す平均的な結果とは異なり、あまりに変異率が高い場合（μ = 0.25、●）を除き、繁殖する確率が十分ある（>0.001）ことがわかる。これは、式 5.2 とは異なり、数値シミュレーションでは分子が離散的であることを考慮しているため、Mutが 0 である生細胞が存在するからである。全ての生細胞において常にMutが存在するような場合には、式 5.2 と同じ結果になる。また、繁殖する可能性がある条件は、$p_{\mathrm{cat}}/p_{\mathrm{div}}$がつりあっている（1 付近）ことであることがわかる。この条件を以下に説明する。生細胞が生存を続けるには、先述のように、Repが分裂による希釈により減っていき 2 分子より少なくならないこと、またRepが細胞内にたまることによって、Mutが発生し式 5.2 が示すようにMutによって分解されないことが必要である。つまり、細胞内にMutが存在しない状態で、Repを少ない状態に保つ必要がある。これはMutが存在しない条件下でRepが定常であると考えることができる。式 5.2 では、平均的なRepの自己触媒の速度係数は$(1-\mu)\,p_{\mathrm{cat}}$となっているが、$p_{\mathrm{cat}}$が速度定数（単位時間当たりの確率）であるのに対し$\mu$はあくまでも反応あたりの確率である。よって、Mutが出現しないという仮定の下、式 5.2 において$N_M = 0$および$\mu = 0$を仮定すると、定常状態をとるのは、$p_{\mathrm{cat}}/p_{\mathrm{div}} = 1$のときであることがわかる。

$p_{\mathrm{cat}}/p_{\mathrm{div}} = 1$であれば確実に原始細胞繁殖が達成されるというわけではない。確率的ゆらぎにより、Repが完全に定常ではなく、Repが分裂により 2 分子より少なくなること

図5.3

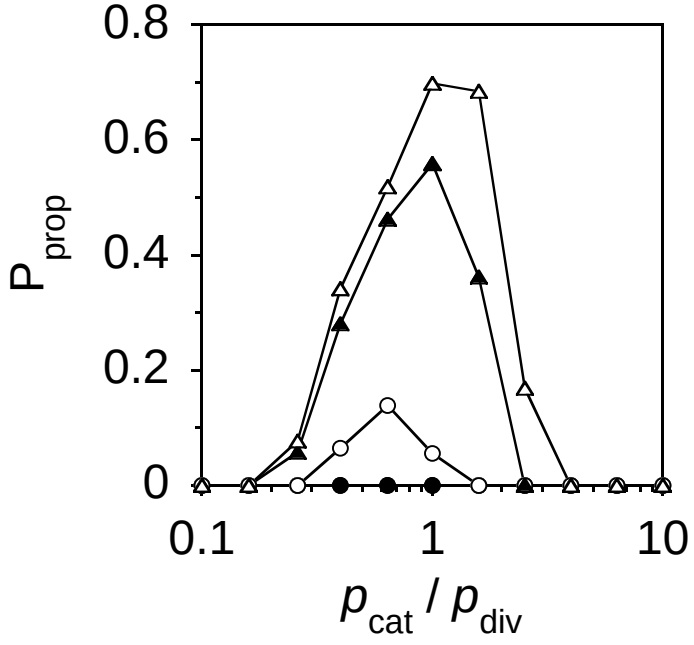


図5.3　RNA分子間親和性が強いときにおける、原始細胞の繁殖率に対する複製反応と細胞分裂の比の関係。μは0.25（●）、0.1 （○)、 0.031（▲）、0.01 （△）。

も、Repが大きくなって細胞内にMutが出現する確率が高くなることもあるからである。つまり、安定に生細胞が生存し、増幅できるRepの範囲が存在するということであり、これを以下に説明する。前述同様Mutが出現する前の細胞内を考える。この細胞において、次の時間にMutが出現する確率よりも分裂が起こる確率のほうが小さくなるような場合、常にMutが存在するようになり、式 5.2 同様絶滅の結果を招く。逆の場合には、Mutが出現する生細胞が繁殖するよりも、Mutが存在しない生細胞が増殖するほうが速い。具体的に、単位時間当たりに出現するMutの平均分子数は$\mu\, p_{\mathrm{cat}}\, N_{\mathrm{R}}$である。ここで、十分小さい単位時間を考え、$p_{\mathrm{cat}}$が十分小さいとき、$\mu\, p_{\mathrm{cat}}\, N_{\mathrm{R}}$は単位時間当たりにMutが1分子出現する確率であると考えることができる。これが分裂確率p_{div}よりも小さければ、Mutの存在しない生細胞が減っていくよりも増えていくほうが多い。よって条件は、$p_{\mathrm{div}} > \mu\, p_{\mathrm{cat}}\, N_{\mathrm{R}}$であり、いま$p_{\mathrm{cat}}/p_{\mathrm{div}} = 1$ であるので、許容されるN_{R}は式 5.1 同様

$$N_R < \frac{1}{\mu} \qquad \text{式 5.3}$$

になることがわかる。これは変異率μが小さいほうが、許容されるN_{R}の範囲が広く、原始細胞繁殖確率が高くなることを示しており、図 5.3 ではそのようになっている。

5.4.3. 動的な原始細胞繁殖条件―RNA の分子間親和性が低い場合

私達は次に、RNA分子の反応における 2 分子間の衝突確率が、細胞内のRNA分子濃度に比例するような条件下での原始細胞繁殖確率について調べた。これは、溶液反応速度論的には、2 分子間の親和性が低く、反応が濃度に比例する場合と言えるため、以降は“RNA分子間の親和性が低いとき”と記述する。細胞の体積をv_{cell}とすると、細胞内のN_{R}およびN_{M}の反応速度式は以下のように表すことができる。

$$\begin{cases} \dfrac{dN_R}{dt} = \dfrac{(1-\mu)\, p_{\mathrm{cat}}\, N_R{}^2}{v_{\mathrm{cell}}} - p_{\mathrm{div}}\, N_R - \dfrac{p_{\mathrm{cat}}\, N_M N_R}{v_{\mathrm{cell}}} \\ \dfrac{dN_M}{dt} = \dfrac{p_{\mathrm{cat}}\, N_M N_R}{v_{\mathrm{cell}}} - p_{\mathrm{div}}\, N_M + \dfrac{\mu\, p_{\mathrm{cat}}\, N_R{}^2}{v_{\mathrm{cell}}} \end{cases} \qquad \text{式 5.4}$$

ここで、$N_{\mathrm{R}}{}^2$はRep同士の 2 分子が衝突して反応することを表しているため、分子の離散性を考えると、$(N_{\mathrm{R}} -1)\ N_{\mathrm{R}}$が正しいが、単純のためにこのように記述している。ただし数値シミュレーションでは$(N_{\mathrm{R}} -1)\ N_{\mathrm{R}}$となるように行っている。全て正の数かつ$\mu$が 1 より小さいとき、分子間親和性の高いとき同様、平衡状態での解はN_{R}およびN_{M}が共に 0 のときである。

分子間親和性の高いとき同様、速度定数（確率）を無次元化すると、モデル定数は$p_{\mathrm{cat}}\, p_{\mathrm{div}}{}^{-1}\, v_{\mathrm{cell}}{}^{-1}$および$\mu$だけである。これらを変化させて、数値シミュレーションを 10000 回行ったが、$\mu = 0.01$ においても一度も繁殖は成功しなかった。この理由について以下に説明する。前節同様、Repの分子数は多すぎても少なすぎても細胞死を招くため、原始

細胞繁殖のためには、Mutが存在しない状態（Mut = 0 かつ μ = 0）においてRepは定常状態でなくてはならない。式 5.4 から、$N_R \neq 0$ でない定常状態は、

$$N_R{}^* = \frac{v_{\mathrm{cell}}\ p_{\mathrm{div}}}{p_{\mathrm{cat}}} \qquad \text{式 5.5}$$

のときである。ただし定常状態でのN_RをN_R*としている。しかしながら、式 5.5 のとき、式 5.4 から

$$\frac{d}{dN_R}\frac{dN_R}{dt}\bigg|_{N_R = N_R{}^*} = p_{\mathrm{div}} > 0$$

である。これは、Repの分子数N_RがN_R*よりも大きいときにN_Rが増え、N_R*よりも小さいときにN_Rが減る、つまりN_R*は鞍点であることを意味している。連続関数でN_R*が初期値である場合とは異なり、離散的な数値シミュレーションでは鞍点を持続することができない。しかしながら、細胞はその数を指数的に増幅するため、1 細胞に関して持続することはできなくても、非常にまれではあるが集団として以下に示すように繁殖することができる。

鞍点ではあるが、N_RがN_R*付近で繁殖しえるとして、N_R*の許容範囲を考える。まず、生細胞の条件からN_R*>2 である。さらに、前節同様に考えて、ある細胞においてMutが出現する確率よりも分裂が起こる確率のほうが高い条件は、

$$p_{\mathrm{div}} > \frac{\mu\, p_{\mathrm{cat}} N_R{}^2}{v_{cell}}$$

であり、$N_R = N_R$*のとき、式 5.3 同様になることがわかる。よって、

$$2 < N_R{}^* < \frac{1}{\mu} \qquad \text{式 5.6}$$

である。ここで、例えば μ = 0.01 のときについて考える。N_R*が 2 などの小さい条件では、常にN_R* < N_RとなりMutの出現が高いため死亡する確率が高く、N_R*が 100 ではN_R < N_R*となり逆に分裂によるRepの希釈で死亡する確率が高いため、N_R*はその中間程度（数十程度）の条件であることが最適であると考えられる。このとき、初期のRepが 2 分子（つまりN_R < N_R*）であることから、最初に誕生した原始細胞のRNA増幅速度が最も遅く、細胞分裂による希釈に負けやすいと言える。また、最初の原始細胞が死亡すると、絶滅を意味するため、原始細胞繁殖のために、最初の細胞内でRNAが増加することが非常に重要である。ここで、細胞サイズに分布が存在し、最初の細胞だけ小さかったとする。このとき、v_{cell}が小さいことから、最初の細胞についてのみN_R*は小さい、つまりRepが増幅できる。よって、最初の細胞のみ細胞サイズを変えて数値計算を行い、図 5.4Aに示した（μ = 0.01）。RNAの分子間親和性が高い場合に比べると著しくP_{prop}が小さいものの、初期細胞サイズが小さいときには大きいときに比べP_{prop}が高いことがわかる。

図5.4

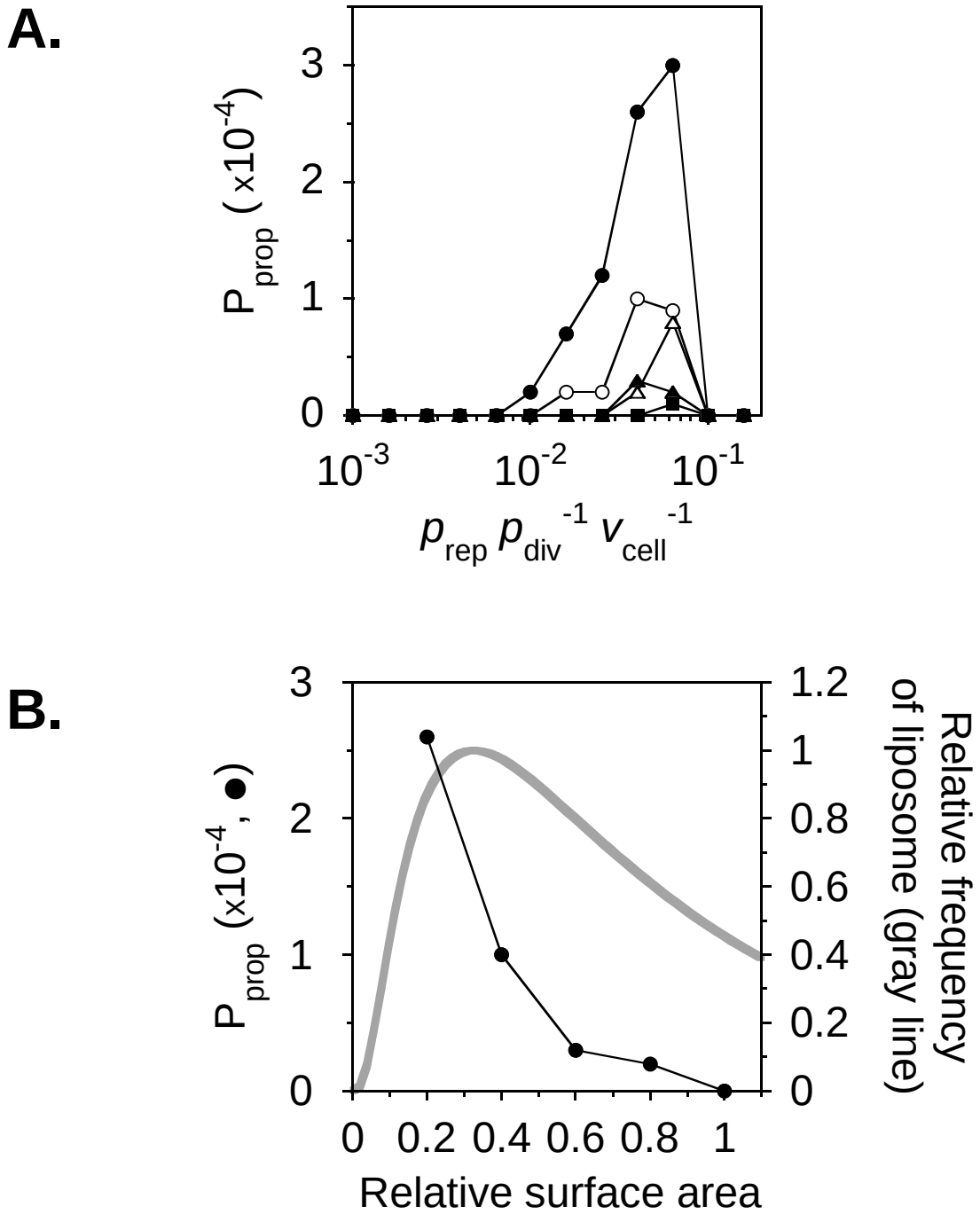


図5.4. RNA分子間親和性が弱いときにおける原始細胞の繁殖率。A. 異なる初期サイズにおける、原始細胞繁殖に対する速度定数の依存性。初期面積は20（●）、40（○)、60（▲）、80（△）、100（■）。ただし平均面積は100。B. 原始細胞繁殖率にたいする初期サイズの効果と、細胞分布の比較。●は本章でのシミュレーション結果のP_{prop}（左軸）、灰色実線は第2章により求められたリポソームのサイズ分布。サイズは平均面積に対する面積で示してある。

また、P_{prop}が高い$p_{cat}\ p_{div}^{-1}\ v_{cell}^{-1}$は 0.05 程度であり、やはり$N_R$*は数十程度が最適であることがわかる（式 5.5）。図 5.4Bは$p_{cat}\ p_{div}^{-1}\ v_{cell}^{-1} = 0.04$ のときの、細胞サイズに対するP_{prop}依存性を示している（●）。また、灰色は過去の研究[23]（第 2 章）から得られているリポソームのサイズ分布である。ただし、リポソームのサイズ分布はその脂質量、つまり面積を基準として分布する（第 2 章参照）ため、サイズは平均面積に対する面積比で示してある。結果から、P_{prop}は初期細胞サイズに大きく依存し、小さいほどP_{prop}が大きくなっていることがわかる。また第 2 章からリポソームのサイズ分布は大きい方に尾を引くことがわかっているため、初期細胞のサイズは平均サイズに比べて小さいサイズであることのほうが確率が高いことが示唆される。以上のように、分子間親和性が低い場合において、細胞サイズが完全に一定ではなく、初期サイズが平均サイズと異なることで原始細胞繁殖の確率が著しく高くなることが示された。

5.5. 考察

5.5.1. 第5 章の結論

本研究では、RNA ゲノムをリポソーム内に有し、細胞分裂がゲノム複製に依存しない原始細胞を想定し、計算期シミュレーションを用いてこれの繁殖に対する理論的考察を行った。原始細胞のモデルとしては、第 2-4 章の再構成実験の結果を踏まえ単純なものを作成した。それは、RNA が時間に対して一定の確率で倍化し、細胞膜も時間に対して一定の確率で分裂するというものである。結果、主に以下の 5 つのことが示された。1 : 細胞内の RNA 分子数に、物質制限による上限が存在する場合にはダイナミクスに関係なく安定に繁殖できる。2 : 細胞内の許容 RNA 分子数は変異率に反比例する。3 : RNA 分子間の親和性が高い場合には RNA 複製と細胞膜分裂がつりあったときに比較的高い確率で繁殖が可能である。4 : RNA 分子間の親和性が低い場合にはダイナミクスのつりあいによる原始細胞の繁殖は難しいが、細胞サイズのばらつきがこれに寄与する可能性がある。の 4 つである。

5.5.2. 物質制限による原始細胞繁殖

物質制限による生存は、安定かつ現実的であり、最初はこの理由により繁殖したと考えられる。原始環境下において、RNA（もしくはそれに似た物質）の材料が豊富に存在したとは考えられず、これによる細胞内反応の制限は十分に考えられる。またその材料の少なさとはことなり、微小空間である細胞内では濃度が比較的濃く、生化学反応は十分に起こりえたと考えられる。一方で、通常細胞膜モデルであるリポソームの分裂は攪拌などの人為的操作により頻繁に起こるものであり、リポソームが自発的におこすダイナミクスは非常に遅い。よって、この条件で細胞内RNA分子数が十分に抑えられ、原始細胞が繁殖したと考えることは難しくないと考えられる。なお、この物質制限はリポソ

ームのサイズに比例したと考えられ、この際にはサイズ分布[20]が影響した可能性がある。

5.5.3.　RNA 分子数と変異率の関係の一般性

本研究では、Mut が著しく原始細胞繁殖にとって悪影響を及ぼすため、はっきりと変異率と細胞内分子数の関係が結果として表れた（式 5.1）。これは、Mut の悪影響が小さくても、基本的には同じであると考えられる。先述のように変異によって悪影響をもたらす分子が生まれる可能性は、良いものが生まれる可能性よりも高いと考えられる。よって、このような悪影響の変異体 Mut が常に全ての細胞に出現するようでは、その悪影響が小さくても、先述のように Mut のほうが Rep よりも増幅率が大きいため、やはり絶滅に陥る。進化能における遺伝子選択は、原始細胞の繁殖に関しては、より良いものを選択するよりはむしろ悪いものを排除するということの貢献のほうが大きいと考えられる。

5.5.4.　動的な原始細胞繁殖

複製と細胞分裂の速度がつりあうことによる繁殖は現存する生物に近いと考えられる。これを安定的に行うためには強い分子間親和性が必要であるが、細菌サイズの小胞であれば、RNAの親和性は十分にこの条件を満たしうる。なぜなら、RNAやタンパク質などの親和性は、天然ではnM（pM-μM）のオーダーである。これは細菌サイズ（1fLオーダー）において 1 分子存在すれば満たす濃度（1 nM）である。つまり、十分に進化したRNAやタンパク質などであれば、私達が仮定した“分子間親和性が高い場合”という状況を満たしている。実際に、単体でRNA複製を触媒することができるQβレプリカーゼとRNAとの親和性（ミカエリス定数）は 1 nMオーダーであった[21]。

5.5.5.　初期条件の違いによる原始細胞繁殖への貢献

初期サイズ依存性は現在の細胞に進化する際に重要な戦略となったと考えられる。原始細胞が誕生したとき、その RNA 分子間の親和性はまだ十分に高くなかった可能性がある。また、その誕生時における細胞は貴重な 1 つの細胞である。この 1 個から指数的に増幅するときに確率的ゆらぎを最も大きく受けるのは、最初の 1 個のときである。一度ある程度の数に増幅できるようであれば、絶滅する確率は小さくなるが、最初の 1 個が死んでしまえば、それだけで絶滅である。実際に、第 4 章の数値シミュレーションにおいても、指数増幅する際にもっとも大きなばらつきを生むのはその初期である。よって、原始細胞誕生時には、この初期サイズ依存性が貢献した可能性がある。

5.5.6.　全ての生細胞を観察する系

一般的に、原始細胞に対するシミュレーションを用いた研究では、観察する小胞の数を一定にするため、分裂によって小胞が増殖するたびに、その分どれか 1 つの細胞を観

察から外す[13]。これは、既に生存できる原始細胞が、限られた観察集団サイズの占領競争を行う結果、どのような種の細胞が最も繁殖するかなどを研究するためである。これに対し、私達の研究対象となる原始細胞は、小胞の分裂が細胞内反応とは全く独立におこり、生存することが確実ではないような、さらに原始的なものであり、これがどのような条件下で生存できるかを調べるのが研究目的である。よって、本研究では、細胞が分裂して増殖してもなお、生きている細胞は観察から外さない。つまり、どれだけ効率が悪く、増殖が遅くても、絶滅しなければ生存できるという系である。原始細胞が出現したときは、資源を取り合う相手もいないことを考えると、この系は妥当であると考えられる。

5.5.7. 細胞サイズのゆらぎについて

私達は過去の研究において、リポソームのサイズ分布を明らかにした[23](第 2 章参照)。融合過程が定かでないこと、及び複雑化を避けるために本研究でのモデルには加味しなかったが、分裂過程が分子間親和性の低い場合の原始細胞繁殖率に影響しうることを議論する。過去の研究[23]で得られた分裂過程は、単位時間当たりサイズに比例した確率で起こるというものである（第 2 章参照）。つまり、式 5.4 のp_{div}がv_{cell}に比例する。結果、式 5.5 のN_{R}*はv_{cell}の 2 乗に比例するので、v_{cell}がゆらいでいると、N_{R}*がその 2 乗に比例してゆらぐ。つまり、鞍点が大きく揺らぐということである。これは鞍点を不安定化させるように思われるが、安定化に貢献したかもしれない。それはN_{R}*のとれる領域が広がったとも取れるからである。

5.5.8. まとめと展望

本研究では、細胞分裂が内部反応と完全に独立に行われる原始細胞について、単純なモデルを作り数値シミュレーションを用いて考察した。このモデルは非常に単純ではあるが再構成実験の結果に基づいており、原始細胞の繁殖について重要な知見を与えたと考えられる。さらに再構成実験が行われることで、今後このような理論モデルに詳細な項を足し、その影響を考察することができる。

5.6. 第 5 章の参考文献

1. Ruiz-Mirazo, K., Pereto, J. & Moreno, A. A universal definition of life: autonomy and open-ended evolution. *Orig Life Evol Biosph* **34**, 323-346 (2004).
2. Luisi, P.L., Ferri, F. & Stano, P. Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften* **93**, 1-13 (2006).
3. Alberts, B. Molecular biology of the cell, Edn. 4th. (Garland Science, New York; 2002).

4. Szostak, J.W., Bartel, D.P. & Luisi, P.L. Synthesizing life. *Nature* **409**, 387-390 (2001).
5. Gilbert, W. Origin of life: The RNA world. *Nature* **319**, 618 (1986).
6. Joyce, G.F. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* **418**, 214-221 (2002).
7. Calendar, R. The bacteriophages, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2006).
8. Kruger, K. et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157 (1982).
9. Johnston, W.K., Unrau, P.J., Lawrence, M.S., Glasner, M.E. & Bartel, D.P. RNA-catalyzed RNA polymerization: accurate and general RNA-templated primer extension. *Science* **292**, 1319-1325 (2001).
10. Takakura, K., Toyota, T. & Sugawara, T. A novel system of self-reproducing giant vesicles. *J Am Chem Soc* **125**, 8134-8140 (2003).
11. Matsuura, T. et al. Importance of compartment formation for a self-encoding system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7514-7517 (2002).
12. Koch, A.L. Evolution vs the number of gene copies per primitive cell. *J Mol Evol* **20**, 71-76 (1984).
13. Kaneko, K. & Yomo, T. On a kinetic origin of heredity: minority control in a replicating system with mutually catalytic molecules. *J Theor Biol* **214**, 563-576 (2002).
14. Fedoroff, N. & Fontana, W. Genetic networks. Small numbers of big molecules. *Science* **297**, 1129-1131 (2002).
15. Prozorov, A.A. The Bacterial Cell Cycle: DNA Replication, Nucleoid Segregation, and Cell Division. *Microbiology* **74**, 375-387 (2005).
16. Yamaichi, Y. & Niki, H. migS, a cis-acting site that affects bipolar positioning of oriC on the Escherichia coli chromosome. *Embo J* **23**, 221-233 (2004).
17. Oro, J. & Lazcano, A. A minimal living system and the origin of a protocell. *Adv Space Res* **4**, 167-176 (1984).
18. Ayala, F.J. Darwin's greatest discovery: design without designer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104 Suppl 1**, 8567-8573 (2007).
19. Ball, P. Synthetic biology: designs for life. *Nature* **448**, 32-33 (2007).
20. Hosoda, K., Sunami, T., Suzuki, H., Matsuura, T. & Yomo, T. Geometrical similarity in multi-vesicular giant liposomes measured by flow cytometry. *In preparation*.
21. Hosoda, K. et al. Kinetic analysis of the entire RNA amplification process by qbeta replicase. *J Biol Chem* **282**, 15516-15527 (2007).
22. Hosoda, K. et al. Kinetic analysis of the RNA replication by qbeta replicase in liposome. *In preparation*.
23. Hosoda, K. et al. A division-induced lognormal-like size distribution for Escherichia

coli and liposome. *In preparation*.

24. Axelrod, V.D., Brown, E., Priano, C. & Mills, D.R. Coliphage Q beta RNA replication: RNA catalytic for single-strand release. *Virology* **184**, 595-608 (1991).

第 6 章：総括

6.1. 本論文のまとめ

原始細胞がどのように誕生し、繁殖したか？この問いに対して必要な知見が原始細胞のダイナミクスであり（緒論参照）、本論文はこのダイナミクスに関して再構成実験及び理論的考察の両面アプローチにより知見を得ることを目的とした。本論文では RNA ワールド仮説に従い、RNA 分子を細胞内に有し、細胞分裂が RNA 複製に依存しない原始細胞を想定した。その原始細胞膜モデルとしてリポソームを、原始細胞ゲノム複製モデルとして Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応をそれぞれ選び、そのダイナミクスについての研究を行った。結果、各章において以下のように原始細胞についての知見を得た。

第 2 章では、人為的制御の少ない方法で作成したリポソームのサイズおよび内部区画構造の分布を計測し、これを解析することによりリポソームのダイナミクスの理解を試みた。結果、リポソームのサイズ分布をよく説明できる形成過程の条件が明らかになった。それは、大きいほど早く分裂し、その分裂は比較的 2 等分であるというものである。また、この条件を満たすだけで大腸菌の細胞サイズ分布を良好に説明できることが発見され、大腸菌には細胞サイズを積極的に制御する機構がないことを示唆することに繋がった。また、リポソームの内部区画構造の相似性を発見し、リポソームのダイナミクスを考える際に、その内部区画構造は無視できることが示された。以上のように、原始細胞は細胞サイズの制御機構がなくても、大腸菌と同様のサイズ分布を持つことができ得たということを示した。

第 3 章では、Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応を試験管内で行い、この速度論的解析を行った。結果、新規に提唱した、反応非依存的結合を考慮している簡単な反応動力学モデルが、未解決であった点を含め実験結果を全て説明できることを示し、その速度定数や平衡定数を解析的手法により求めた。これにより、RNA 複製反応の簡単な理解に貢献した。また、RNA と酵素の親和性は、Qβファージの宿主大腸菌内でそれぞれ 1 分子のみ存在したときにでも結合を維持できるために最低限必要な強さであることがわかった。さらに、短い RNA を複製する反応において、Qβレプリカーゼが高濃度であるとき（>100 nM）、単位時間当たりに RNA が 2 倍になるというだけの最も簡単なモデルで説明できることがわかった。以上のように、単純な反応モデルを用い、近似を用いて解析解を得ることで、原始細胞におけるゲノム複製の実験モデルである RNA 複製反応を、明快かつ定量的に理解することができた。

第 4 章では、Qβレプリカーゼによる RNA 複製反応のばらつきを試験管内で測定して解析した。結果、RNA の倍加がポアソン過程であると仮定することにより、その反

応のばらつき（ゆらぎ）まで定量的に説明できることがわかった。試験管内反応において反応のばらつきを計測することができたのは指数増幅反応であるからであり、この手法は指数増幅する大腸菌の増幅のばらつきを測定することなどにも適応できうる。さらに、原始細胞を模倣して、実際にリポソーム内でこの反応を行い、試験管内での反応と比較することで、RNA 複製反応がリポソーム内で起こる場合のリポソームによる影響を調べた。結果、RNA 複製反応の効率は、微小空間であるリポソーム内でも試験管内とほとんど変わらないことを示した。以上のように、生物に特徴的である指数増幅に対して確率論的な理解と計測方法を提唱し、また RNA ワールド説において原始環境下で行われたとされる、脂質細胞膜内での RNA 複製反応を後押しすることができた。

第 5 章では、計算機シミュレーションのみを用いた理論研究を行い、2-4 章で示された結果をもとに、原始細胞繁殖に重要であろう条件を調べた。結果、原始細胞繁殖に関して、以下のようなことが示唆された。細胞あたりの RNA 分子量制限は、RNA 複製反応と細胞分裂のダイナミクスに依存せず、安定に原始細胞繁殖を導くことができる。細胞内で許容される RNA 分子数は、変異率の逆数に比例する。原始細胞内において 2 分子の RNA 分子が衝突してその複製反応を行う際、この 2 分子間の親和性が高い場合は、複製速度と細胞分裂速度がつりあうときに安定に原始細胞繁殖を導くことができる。一方で 2 分子間の親和性が低い場合は、原始細胞が繁殖する確率が極端に下がるが、そのときに細胞サイズのゆらぎが重要な役割を持ちうる。これらは、原始細胞とはどのような条件を満たしたものであるかを考察する際に重要な知見と考えられる。

6.2. 最後に

本論文では、原始細胞のダイナミクスに関する知見を得ることを目的とし、上記のような結果を得た。さらに、原始細胞についてだけでなく、以下のような知見及び手法も得られた。リポソームのサイズ分布を説明するためのモデルは、大腸菌のサイズ分布も説明することができ、現在の生物の理解にも貢献した。また、リポソームの内部区画構造を測定する実験系およびその解析方法を提唱し、これに対する知見を得ることができた。Qβ レプリカーゼによる RNA 複製反応を研究することにより、生物に特徴的な指数増幅に対する実験及び解析の手法を提唱することができた。さらに、微小空間内反応の研究に対して有用である、リポソーム内反応の解析手法（体積補正など）を提唱することができた。以上のように、本論文は原始細胞についての知見を得ただけでなく、現存する生物である大腸菌のサイズ分布に対する知見や、リポソーム内反応や指数増幅反応の実験および解析手法などを提唱することができたので、これらの結果も含めて、後続の研究に役に立てたら幸いである。

業績

印刷済み主論文

Hosoda K, Matsuura T, Kita H, Ichihashi N, Tsukada K, Yomo T.
Kinetic analysis of the entire RNA amplification process by qbeta replicase.
J Biol Chem **282**: 15516-27 2007.

印刷中主論文

Hosoda K, Matsuura T, Kita H, Ichihashi N, Tsukada K, Urabe I, Yomo T.
A novel sequence-specific RNA quantification method using nicking endonuclease, dual-labeled fluorescent DNA probe, and conformation-interchangeable oligo-DNA.
RNA (scheduled for publishing in Mar 1, 2008; 14 (3)), Published online: January 29, 2008, 10.1261/rna.761708, http://www.rnajournal.org/cgi/content/abstract/rna.761708v1

投稿中副論文

Kita H, Sunami T, Matsuura T, Hosoda K, Ichihashi N, Tsukada K, Urabe I, Yomo T:
Construction of in liposome RNA-protein self-replication system: a step toward artificial cell assembly.
J Am Chem Soc

投稿準備中主論文

Hosoda K, Sunami T, Suzuki H, Matsuura T, Kita H, Ichihashi N, Yomo T.
Geometrical similarity in multivesicular giant liposomes measured by flow cytometry. （第 2 章の実験結果）

Hosoda K, Matsuura T, Suzuki H, Kita H, Ichihashi N, Sunami T, Tsukada K, Yomo T.
Kinetic analysis of the RNA replication by qbeta replicase in liposome. （第 4 章）

Hosoda K, Matsuura T, Suzuki H, Yomo T.
Origin of narrow lognormal distributions across the sciences.（第 2 章の理論モデル部分とその延長）

申請中特許

四方哲也、細田一史、松浦友亮、中島敏博、樋口浩文

発明の名称：仲介ポリヌクレオチド、特許出願 2006-282975

国際学会ポスター発表

Hosoda K, Kita H, Matsuura T, Tsukada K, Urabe I, Yomo T.
A new mechanism of the RNA synthesis reaction by Qbeta replicase.
RNA 2006, Eleventh annual meeting of the RNA society #525,
University of Washington (Seattle, Washington), June 20-25 (2006)

国際シンポジウム口頭発表

Hosoda K.
In vitro evolution of the self-replication system by Q beta replicase
2004 Osaka University-KAIST Graduate Students Symposium #S22,
Korea Advanced Institute of Sciences and Technology (Deajeon, Korea), July 19-22 (2004)

国内学会ポスター発表

Hosoda K, Kita H, Matsuura T, Tsukada K, Urabe I, Yomo T.
Enzymology of Q beta replicase : Template RNA catches “Q beta replicase” in a trap
日本生物物理学会第４３回年会、1P126
札幌コンベンションセンター、2005 年 11 月 23-25 日

Hosoda K, Sunami T, Suzuki H, Matsuura T, Kita H, Ichihashi N, Yomo T.
Inner aqueous volume distributions of cell-size liposomes in consideration of the inner-compartmentalization
日本生物物理学会第４５回年会、2P270
パシフィコ横浜、2007 年 12 月 21-23 日

謝辞

本研究を遂行するにあたり、長年にわたってご指導及びご助言を頂き、その抜群の科学的センスで本当に色々に色々と影響を与えていただいた四方哲也教授に心より感謝申し上げます。本論文の予備審査の主査、本審査の副査、さらには一時期指導教授としてご指導いただいた柳田敏雄教授（大阪大学大学院生命機能研究科、ナノ生体科学講座）、副査として貴重なお時間を割いていただき、適切なご助言をいただけた貴重な時間を賜りました野地博行教授（大阪大学産業科学研究所高次細胞機能講座）、菊池誠教授（大阪大学サイバーメディアセンター大規模計算科学研究部門）に深く感謝いたします。学部生のころから、長期にわたり暖かく大きな視野で見守っていただき、様々に大事なことを教えていただいた卜部格教授（大阪大学大学院工学研究科、進化生命システム学領域）に厚く感謝の意を表します。

長年にわたり、研究に関する様々なことを直接、基礎からたくさん教えていただき、かつともに研究することでセンス溢れるご意見、および研究の熱さ・楽しさを盛りだくさんに教えていただいた松浦友亮特任准教授；四方研究室に着任後まだ半年と短い期間にもかかわらず、本論文を作成するにあたり全面にお世話していただき、数々の助言と大きな人格・笑いを賜りました鈴木宏明准教授；長い間研究だけでなく、気兼ねなく何の話でも聞き入れて楽しく相談に乗っていただいた塚田幸治助教；学部生時から研究以外にも、ためになり心落ち着く人生相談を色々としていただいた島康文氏；学部生のころから、常に同じチームで色々と世話していただき、共にがんばり、毎日楽しい雰囲気を作っていただいた上に、初志貫徹・研究根性を背中で教えていただいた北寛士氏；博士課程中、常に身近で共に研究し、鋭く的確な意見・知恵と、類稀な雰囲気作りによる癒しを与えていただいた市橋伯一氏；学部生時、初めての実験において基礎の基礎、および実験の楽しさをまるで小学校教師のように教えていただいた沖真弥氏；学部生時に同級生として意見を交わしあい一緒に楽しくがんばった永田一彦君；その他同じグループで共に切磋琢磨した先輩・同輩・後輩の方々；ためになる研究ご指導と人生相談・人脈紹介・楽しい日々を与えていただいた“おやじ及びその予備軍”の皆様方；そして共に研究し、一緒にがんばってきた同輩の角南武志君、石川慶太郎君、柳田勇人君、木原久美子君；その他、卜部・四方研究室にてともに過ごした先生・研究員・学生・秘書・技官などの皆様方、心より感謝感謝を申し上げます。ありがとうございました。

長年にわたりご援助いただいた日本育英会、日本学生支援機構の皆様、アシスタントとして雇うことで、経済的救済を与えていただいた皆様、色々とお世話いただいた専攻事務の皆様に心より感謝いたします。

最後に、常に私を理解し、心の底からいつも私を信頼して全ての面で支えていただいた家族に最大の感謝を表します。ありがとうございました。