

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

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

<u>細田 一史</u>

<u>平成 20年 3月 25日 修了</u>

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 Q 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。

<u>目次</u>

<u>第1章:緒論</u>	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Q 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
<u> </u>	10

やと早、TAODを用いた細胞シースクホノームが成過性の肝肌	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
<u> 第 3 章 : Q レプリカーゼによる RNA 複製反応の速度論的解析</u>	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 Q 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 Q 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 Q 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

<u>第4章:Q 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</u>

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 Q 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 Q 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

<u>第5章</u>	:原如	<u> 台細胞繁殖に対する理論的</u>	考察	105
5.1	■概要	長および本論文での位置づけ		105
5.2	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算	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	3 原如	台環境下における自己複製モデ	・ ジレ	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	1 計算	算結果		110
	5.4.1	静的な原始細胞繁殖条件 I	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 I	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 I	RNA の分子間親和性が低い場合	116
5.5	5 考察	र्		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弱	 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
<u>第6章</u>	: 総括	124
<u>第6章</u> 6.1	<u>:総括</u> 本論文のまとめ	<u>124</u> 124
<u>第6章</u> 6.1 6.2	<u>: 総括</u> 本論文のまとめ 最後に	<u> </u>
<u>第6章</u> 6.1 6.2	<u>: 総括</u> 本論文のまとめ 最後に	<u>124</u> 124 125
<u>第6章</u> 6.1 6.2 業績	<u>: 総括</u> 本論文のまとめ 最後に	<u>124</u> 124 125 126
<u>第6章</u> 6.1 6.2 業績	<u>: 総括</u> 本論文のまとめ 最後に	<u>124</u> 124 125 126

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[]	: 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
$C_{\rm DNA}$: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
Е	: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
$f_{\rm w}(v_{\rm w})$:全てのリポソームにおける全体積 レ娠のリポソームの確率密度関数
$f_{\rm p}(v_{\rm p},v_{\rm w})$:全体積 $v_{ m w}$ のリポソーム中での $v_{ m p}$ の確率密度関数
$f_{\rm p}(v_{\rm p}/v_{\rm w})$:全体積 $v_{ m w}$ のリポソーム中での $v_{ m p}$ の確率密度関数
$f_{\rm wp}(v_{\rm w},v_{\rm p})$: 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 $v_{ m w}$ の確率密度関数
F(X,t)	: 時間
$F_{\rm w}(v_{\rm w})$:全体積 _{٧w} をもつ全リポソームの頻度
$F_{\text{wreac}}(v_{\text{w}})$:反応したリポソームの頻度(_{٧w} に対する関数)
$F_{\text{preac}}(v_{\text{p}})$: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 $v_{ m w}$ をもち区画体積 $v_{ m p}$ で反応がおこるリポソームの頻度
$F_{\rm xw}(v_{\rm w})$:任意のリポソーム集団の全体積 $ u_{ m w}$ をもつ頻度
$F_{\rm xp}(v_{\rm p})$:任意のリポソーム集団の内部区画体積(反応体積) $ u_{ m 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 $ u_{ m p}$ のリポソームにおける緑色蛍光の平均的代表値
$J_{ m A}$:反応体積 v _p の階級にあるリポソームの <n<sub>RNA60(v_p)>との偏差平方和の、全</n<sub>
	v _p についての総和
$J_{ m B}$: <n<sub>RNA60(v_p)>と<<n<sub>RNA60>>との、全 v_pについての偏差平方和</n<sub></n<sub>
$J_{ m AV}$: J_{A} のうち v_{p} の階級の幅に依存するもの
$J_{ m total}$:反応したリポソーム全てについての RNA 分子数の<< <n<sub>RNA60>>との偏差</n<sub>

	平方和
$J_{ m reac}$:反応のばらつきに依存するもの
$J_{ m vol}$: 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
<i>k</i> ₋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
<i>k</i> -2	: 非生産的結合の解離速度定数
$k_{\rm cat}$:触媒速度定数
$k_{ m div}$:分裂の確率(速度)係数
$k_{ m fus}$: 融合の確率(速度)係数
k _{inact}	: 失活速度定数
kinactmax	:最大失活速度定数
$k_{\rm obs}$:観測指数増幅率
$k_{ m pol}$:1塩基の平均伸長速度定数
kothers	: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
<i>K</i> 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($k_{-2}+2k_{ ext{cat}}$)/ k_2
$K_{\rm MGDP}$: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
$n_{ m div}$: 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
Ν	: 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
$N_{\rm M}$: 細胞内の Mut の分子数
$N_{\rm R}^*$: 定常状態の条件を満たす細胞内の Rep の分子数
$N_{\rm max}$: 細胞内の複製増幅可能な最大分子数
$N_{\rm RNA}(t)$: 時間 <i>t</i> での RNA の分子数
$< N_{\rm RNA}(v_{\rm p}) >$: 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
	表值
$<\!\!N_{\rm RNA60}(v_{\rm p})\!\!>$: 反応体積 _{vp} 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
	的代表值

<< <i>N</i> _{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
$p_{\rm div}$: 原始細胞が単位時間当たりに分裂する確率
$p_{\rm div}(x)$: 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
$p_{\rm fus}(x,\xi)$: 2 つのサイズ <i>x</i> と <i>ξ</i> 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
$P_{\rm size}(x,t)$: 時間
$P_{\rm reac}(v_{\rm w})$:ある体積 レ┉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 $ u_{ m 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 レゥ 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∩B)	:全リポソームのうち、全体積 $v_{ m w}$ および区画体積 $v_{ m p}$ をもち、かつその区
	画 vp 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
$\mathbf{R}_{\mathrm{free}}$: 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
$\mathrm{SD}_{\mathrm{lnRNA}}$:指数期における対数スケールでの RNA 分子数の標準偏差
$\mathrm{SD}_{\mathrm{RNA}}$: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	:ある RNA 分子数に達する時間 の標準偏差
[Substance]	: Substanceの濃度
t	:時間
t _{sat}	: 飽和点に達する時間
${\cal V}_{ m w}$: 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
$V_{\rm cor}(t)$: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	: <i>X</i> がとりうる最小値
α	: [E ₂₈₀]に対する[Et]の比(= [Et]/[E ₂₈₀])
	:指数関数の平均値の逆数
μ	:変異率
	:ある RNA 分子数に達する時間
ξ	: 任意のサイズ
Ξ	: <i>ξ</i> の対数表記(底 <i>b</i>)

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RNA¹⁴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O β のゲノムRNAを複製する酵素である¹²。 $Q\beta$ 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、**Ο**β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).
- Luisi, P.L., Ferri, F. & Stano, P. Approaches to semi-synthetic minimal cells: a review. *Naturwissenschaften* 93, 1-13 (2006).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Kruger, K. et al. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* **31**, 147-157 (1982).
- 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).
- Torchilin, V.P. & Weissig, V. Liposomes : a practical approach, Edn. 2nd. (Oxford University Press, Oxford ; New York; 2003).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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**.
- 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).
- 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).
- 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).
- 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>100µm)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 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。

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

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*_{div}(*x*)とした。また*X*及び*E*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。

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

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

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。

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

ただし、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、

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

$$= 8k_{div}xp(2x,t) - k_{div}xp(x,t) - k_{div}\bar{x}p(x,t)$$
式 2.M1
となる。よって、平均値の時間変化は、

$$\frac{d\overline{x}}{dt} = \frac{d}{dt} \int_0^\infty x p(x,t) dx \frac{d\overline{x}}{dt} = -k_{div} \overline{x}^2$$
$$\therefore \overline{x} = \frac{\overline{x}_0}{1 + k_{div} \overline{x}_0 t} \xrightarrow{t \to \infty} \frac{1}{k_{div} t}$$

と書き下せる。ただし、 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。 dp(x,t)

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

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)。

$$p(x,t) = \frac{k_{div} t K_2(2)}{2 K_1(2)^2} \exp\left[-\frac{k_{div} t K_2(2)}{K_1(2)} x - \frac{K_1(2)}{k_{div} t K_2(2) x}\right]$$
 $\exists z . M2$

ただし、K_n()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、

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

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

とかける。ただし、 $\mu = k_{growth} \Delta x$ であり、また $x >> \Delta x$ より $x - \Delta x \Rightarrow x$ 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。

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

定常状態における平均値は、

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

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、

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

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。

$$p(x) = \frac{K_2(2)}{2\,\overline{x}\,K_1(2)^2} \exp\left[-\frac{K_2(2)}{\overline{x}\,K_1(2)}x - \frac{\overline{x}\,K_1(2)}{K_2(2)\,x}\right]$$

$$\vec{x} \ 2.M4$$

ただし、平衡状態においては、平均値 $x = \mu / k_{div}$ 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xの1つの

みであることがあげられる。その逆数 1/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'-TTGGATCCAT GCCTTCTGAACAATGGAA) と Antisense primer (5'-TAAATTAAG CTTTTATTATTATTTTTGACACC)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 DH5 α 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'-AATTCGAGGCCC TGAGGGCCAGGAGGCCTCCTGGCCTATGCGGCCGCA)とオ リゴ DNA2 (5'-AGCTTGCGGCCGCATAGGCCAGGAGGCCTCC TGGCCCTCAGGGGCCTCG)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 DH5 α 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 40 μ L 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. 試驗管內転写翻訳反応

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)、50 μ M 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 20 μ L氷上で 作製した。これをMx3005PTM 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 20 μ L氷上で作製した。この反応液 10 μ L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 1.5 μ L移し、28.5 μ L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、vw(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vpに対するヒストグラムのvp > 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,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。

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*_{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*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kdiv、ndivおよびSのみである。このうち、kdiv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、ndivおよびSはサイズ分布の形に影響す る。図 2.2Aはndiv = 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 = ∞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. 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。

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

ただし、K_n(*ø*)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 vw (whole volume)、またある1つのリポソーム内部区画の体積をvp (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vwとvp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 SYSTEM¹⁸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

Α.





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vwおよびそのうちの一つの内部区画体積vp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、50 μ M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い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vw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vw及びvp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●、〇)。 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(●および〇)も 3 時間以降は蛍 光産物 PFB フルオロセイン 50 μ M(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(50 μ M)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。 ー方で、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 び〇)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 50 μ M 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。 \bigoplus 、〇はそれぞれ、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50 μ M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、 \bigoplus 、〇からプラスミ 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vw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、vn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_bが測定できていると思われるのはv_bが1fL程 度以上の集団である。この集団を見ると、vwおよびvp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vwを持つリポソームでも、そのvo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_b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 つの内部区画体積い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vw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vw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} vw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vw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} vw)と表すことができる。これより、ある体積vw</sub>をもつリポソーム内で図 2.3Aの反 図2.5



10 µm

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vw依存性。〇は、体積vwにおけるリポソームのうち、反応したリポソームの確率Preac(vw)。灰色太実線は、〇を式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P1。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Preac(vw)は、

 $P_{\text{reac}}(v_{\text{w}}) = 1 - \exp(-a_{\text{capsul}} C_{\text{DNA}} v_{\text{w}})$

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(〇)。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 $v_w = v_p c$ 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 μ m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 μ m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 \cap 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。cれらAとBは、 $v_w \ge v_p$ 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 \cap B)は以下のように記述できる。

 $P(A \cap B) = P(A) P(B|A)$

式 2.4

ここで、P(A)は全リポソームのうち、全体積vw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vw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vp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vwをもつリポソームに封入されるとき、それが体積vpをもつ、あ る特定の内部区画に封入される確率はvp/vwである。また、そのリポソーム中にvpの内部 区画が多く存在すれば、その頻度に比例して体積vp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vwのリポソーム中でのvpの確率密度関数をfp(vp,vw) とすると規格化定数CBAを用いて

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 (\propto 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vwにおけるvp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vwにおけるvpに対するヒストグラムの分布の最頻値(MODE(vp)、 を軸)および半値全幅(FWHM、〇、右軸)のvw依存性。灰色破線は直線回帰MODE(vp)= 0.31 vw)。黒色実線は〇の平均値(=4.5)。B.一定のvpにおけるvw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vpにおけるvwに対するヒストグラムの分布の最頻値 (MODE(vw)、●、左軸)および半値全幅(FWHM、〇、右軸)のvw依存性。灰色破線は比 例曲線、MODE(vw)=2.6 vp+5.6)。黒色実線は対数スケールでの比例直線、FWHM=3.6 vp^{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vw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、

 $P(A \cap B) = P(B) P(A|B)$

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、 $v_p \ge v_w$ 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、

 $P(A) = C_A P_{reac}(v_w) f_w(v_w)$ = $C_A \{ 1 - \exp(-a_{capsul} C_{DNA} v_w) \} f_w(v_w)$ $= C_A \{ 1 - \exp(-a_{capsul} C_{DNA} v_w) \} f_w(v_w)$

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、 $v_p \ge v_w$ 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、

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

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

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。 \bigoplus 、〇、△、×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に〇をフィットした結果。

灰色実線、フィットの結果は $\bar{x} = vw^{2/3} = 2.8 \text{ (fL}^{2/3})$ 。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、 $f_{0}(v_{p}/v_{w})$ が指数関数である⁸とすると、以下のように記述できる。

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

ただし、λは指数分布fp(vp/vw)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(〇のvp/vw=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、vp/vw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vw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vp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vw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んを、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、んを求めるために、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

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

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

- 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).
- 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).
- Betageri, G.V., Jenkins, S.A. & Parsons, D.L. Liposome drug delivery systems. (Technomic Pub., Lancaster; 1993).
- 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).
- Epstein, B. Logarithmico-Normal Distribution in Breakage of Solids. *Ind. Eng. Chem.* 40, 2289-2291 (1948).
- 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).
- 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

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

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).
- 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).
- Sunami, T. et al. Femtoliter compartment in liposomes for in vitro selection of proteins. *Anal Biochem* 357, 128-136 (2006).
- 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 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、Oβ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、Oβ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. 0 βレプリカーゼとは

 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}。Q β 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 10¹²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

OB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Oβ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. Q β 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Smal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BgIII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'-GATCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTA)、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BgIII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RNA³²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AlwI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

第3章:QBレプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

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 (20 μ L) 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 (Mx3005PTM 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 1 μ L の Q β 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kobs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、

第3章:Q β レプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

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。

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

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。

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

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

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。

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

ここで、フィッティングパラメタを減らすために、 $k_1 >> k_{cat}$ もしくは $k_1 << k_{cat}$ のどちらかを仮定することにした。2つの場合、 $k_1 >> k_{cat}$ および $k_1 << k_{cat}$ のときにはそれぞれ、 k_{obs} は以下のように解ける。

$$k_{\rm obs} = \frac{k_{\rm cat}[E_{280}]}{[E_{280}] + K_{\rm M}/\alpha}$$

および

$$k_{\rm obs} = \frac{2 k_{\rm cat} [\rm E_{280}]}{K_{\rm M} / \alpha + [\rm E_{280}] + \sqrt{4 [\rm E_{280}] K_{\rm M} / \alpha + ([\rm E_{280}] + K_{\rm M} / \alpha)^2}}$$

式 3.4'

ただし、 K_{M} は $(k_{.1} + k_{cat})/k_{1}$ であり、 $[E_{280}]$ は 280 nmの吸光度から求めた酵素濃度である。 α は $[E_{280}]$ に対する[Et]の比 ($\alpha = [Et]/[E_{280}]$) 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。

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

ただし、Rnは空の非生産的結合部位([Rn] = n·[Rt] – [E-Rn]、nは1分子のRNAあたりの

非生産的結合部位数)、k₂およびk₂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。

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

ここで、 K_{M2} は($k_{.2}$ +2 k_{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、

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

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。 ln[Rt]=Boole[$t < t_{sat}$]·($k(t-t_{sat})$ +ln(at_{sat} +b))

+ Boole[$t_{sat} \le t$] · ln(at + b)

3.3.7. 線形期の解析

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、 $t < t_{sat}$ のときは時間に対して指数的に増加し、 $t > t_{sat}$ 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、 $[R_{sat}]/[E_{280}]$ と $[E_{280}]$ 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。

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

式 3.6

式 3.7

式 3.8

第3章:QBレプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

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 $E \rightleftharpoons E-Rp \rightarrow E+2R_{free}$)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。

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

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。

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

式 3.9 および式 3.10、さらに[Rt] >> $K_{\rm M}$ 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($V_{\rm cor}(t)$)を以下のように得た。

$$V_{\rm cor}(t) = \frac{k_{\rm cat} \, [{\rm Et}] ({\rm e}^{-(K_{-2} + nk_2 K_{\rm M})t} + \frac{K_{\rm i}}{n K_{\rm M}})}{1 + \frac{K_{\rm i}}{n K_{\rm M}}}$$
 $\ensuremath{\vec{\matheb{R}}}$ $\ensuremath{\vec{\mathbb{R}}}$ $\ensuremath{\vec{\mathbb{R}}}$

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。

$$V(t) = \frac{k_{\text{cat}} \alpha[E_{280}](e^{-(k_{-2}+nk_{2}K_{M})\cdot t} + \frac{K_{i}}{nK_{M}})}{1 + \frac{K_{i}}{nK_{M}}} \cdot e^{-k_{\text{inact}}\cdot t}$$
 $\overrightarrow{\texttt{T} 3.12}$

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_{cor}(0)およびV_{cor}(∞)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。 K_{iNTP} の値は、 $K_{iNTP} = [It] k_{inact_inh}/(k_{inact_MAX} - k_{inact_inh})$ 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。

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] = [Rt₀]・exp(k_{obs} ・t)と表すことができる。ここで、[Rt₀]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[E₂₈₀]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 [E₂₈₀]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α[E₂₈₀]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	いこ求ま)た7種の鋳型	RNALZOLIT	ての速度論定	_数			
Template	Ν	$k_{ m cat}$ $^{(1)}$	$K_{ m M}{}^{(1)(4)}$	n (2)	$K_{ m M2}{}^{(2)(4)}$	$V_{ m cor}(0)^{(3)}$	$V_{ m cor}(\infty)^{(3)}$	$K_{ m i}$ $^{(3)}$
RNA	(nt)	(/min)	(nM)		(nM)	(nM/min)	(nM/min)	(nM)
S130	130	3.6 ± 0.1	1.7 ± 0.3	ND	ND	6.2 ± 0.2	$5.8~\pm~0.03$	$19.3 ~\pm~ 13.8$
S222	222	$2.6~\pm~0.08$	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	$4.2~\pm~0.6$	0.4 ± 0.2	5.3 ± 10.0	$2.9~\pm~0.5$	1.9 ± 0.2	7.7 ± 2.3
MDV-T12	271	$2.0~\pm~0.03$	2.6 ± 0.2	$1.6~\pm~0.8$	$59.2~\pm~45.2$	3.2 ± 0.4	1.8 ± 0.1	3.8 ± 1.6
MDV-CAT	936	$1.2~\pm~0.04$	$4.9~\pm~0.7$	3.0 ± 0.4	8.3 ± 2.2	1.4 ± 0.2	$0.33~\pm~0.07$	$6.0~\pm~2.4$
MDV-dBETA	1028	$1.2~\pm~0.05$	$4.1~\pm~0.7$	3.2 ± 1.1	$29.6~\pm~15.7$	$1.2~\pm~0.1$	$0.38~\pm~0.06$	7.8 ± 2.0
MDV-BETA	2085	0.67 ± 0.02	$1.2~\pm~0.3$	8.5 ± 5.0	$49.6~\pm~36.5$	$1.8~\pm~0.2$	$0.55~\pm~0.04$	$4.4~\pm~0.1$
(1) 指数期の角	解析 か	ら求めた。	(2)	飽和点の解れ	斤から求めた。			
(3) 線形期の角	解析 か	ら求めた。	(4)	飽和点の解れ	斤から求めたα	= 0.2 の値を)	雨いて求めた。	
表 3.2. 図 3.54	A で 末 る	りた異なるヌク	レオチド存ィ	生下での失活	行定数			
Additives	Inact	ivation rate						
	(1	0 ⁻² /min)						
None	0.26	5 ± 0.09						
U, C, and GTP	0.96	5 ± 0.04						
C, G, and ATP	0.91	1 ± 0.02						
G, A, and UTP	1.00	$) \pm 0.08$						

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

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

Α.







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kobs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/kcatとNの関係。実線は直線回 帰であり、この結果得られたkpolおよびkothersの値は本文に記載。

第3章:QBレプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

polymerase⁴¹、3D polymerase⁴²、HIV reverse transcriptase⁴³、RNA polymerase II⁴⁴、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}]/[E₂₈₀]は、式 3.7 で表すことができる。 K_{M2} は $(k_2 + 2 \cdot k_{cat})/k_2$ 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}]/[E₂₈₀]と[E₂₈₀]との関係を図 3.3Aに示した。 結果から、[E280]が十分に大きいとき、RNAが長いほど[Rsat]/[E280]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}]/[E₂₈₀]の値は[E₂₈₀]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、 $K_M 2/\alpha >> (1+n) [E_{280}]$ 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、 $[R_{sat}]/[E_{280}] = \alpha$ 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}]/[E₂₈₀]の値の平均値から、α=0.20を得 た。なお、[R_{sat}]/[E₂₈₀]の[E₂₈₀]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、[E₂₈₀]を大きくしたときに、[R_{sat}]/[E₂₈₀]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]/[E280] 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(\bigcirc)、S222(\bigcirc)、MDV-poly(\blacksquare)、MDV-T12(\Box)、MDV-CAT(\blacktriangle)、MDV-dBETA(\triangle)、MDV-BETA(\times)。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 $n \ge K_{M2}/a$ の値は表3.1に示してある。B. $n \ge N$ 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/k2)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[E280]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} 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、 $k_{cat}:\alpha$ 、 $n\cdot k_2:K_M$ 、 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 $n \ge K_M$ 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 $Vcor(0) = k_{cat} \cdot \alpha \cdot [E_{280}], V_{cor}(\infty)$ = $k_{cat} \cdot \alpha \cdot [E_{280}]/(n \cdot K_M/Ki + 1)$ と記述できる(式 3.11 参照)。これらから、 $Ki = n \cdot K_M/(V_{cor}(0)/V_{cor}(\infty) - 1)$ である。よって、妥当な精度で求めることができる $V_{cor}(0) \ge V_{cor}(\infty)$ 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Kiを求めることができた(表 3.1)。 K_M や K_{M2} 同様、Ki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 ≥ 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、 \bigcirc 、×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 \bigcirc を式3.12にフィットした 結果。これにより、kcat α , n·k2·KM、k-2、kinact 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、Vcor(0)/[E280] と kcatの関係。Vcor(0)/[E280] とkcat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 $\alpha = 0.16$ が求まった。これは飽和点で求めた $\alpha = 0.20$ 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、 $k_2 \ge k_2$ の値はそれぞれ、 $k_2 = 2 k_{cat} / (K_{M2} - Ki)$ および $k_2 = k_2 \cdot Ki \ge U$ 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、k₂/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、k₁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Vcor(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Vcor(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= Ki/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Ki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 $V_{cor}(0)/[E_{280}] \geq k_{cat}$ 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. Q β 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。●、〇はそれぞれ、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*kinactmax、KMGDP、KiNTP*が求まった(結果は本文に記載)。

第3章:QBレプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

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 arrest⁴⁷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Oβ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Ki_{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Kintp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、Q β 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Q β 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、α = 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kcatの過小評価につながる。一方で、指数期ではkcat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、α ≠1 であり、keat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1nM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1fL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 1nM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1nM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 一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

第3章:QBレプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

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、Q β ファージ増幅の理解や、Q β 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、Q β ファージゲノム ok_{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Q β 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Q β 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、Q β 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Q β 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RNA³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. Q β レプリカーゼの3 量体について

 $Q\beta$ 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

OB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。O β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、Oβ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RNA⁵⁵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/(1-2*d*)およびα·(1-2*d*)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)/[E₂₈₀]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Q β 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、Q β 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、Q β レプリカーゼの応用の際に役立つ情報を提供した。Q β 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).
- Haruna, I. & Spiegelman, S. Specific template requirments of RNA replicases. *Proc* Natl Acad Sci U S A 54, 579-587 (1965).
- 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*

第3章:QBレプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

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).
- 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).
- 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).
- Biebricher, C.K., Eigen, M. & Gardiner, W.C., Jr. Kinetics of RNA replication. Biochemistry 22, 2544-2559 (1983).
- 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).
- 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).
- 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).
- Abramson, R.D. & Myers, T.W. Nucleic acid amplification technologies. *Curr Opin Biotechnol* 4, 41-47 (1993).
- 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).
- 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

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

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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).

第3章:QBレプリカーゼによるRNA複製反応の速度論的解析

- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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.

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

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).
- 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).
- 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。 20μ 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 O β 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RNA⁴、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。Q βレプリカーゼは大腸菌ファージOβ⁸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、Oβ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 μ L)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、Oβ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、Oβ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、Οβ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、Q β 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(1-10 µ m)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、リポソーム内の反応体積ととした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

Q β 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 μ L氷上で作製 した。この反応液 25 μ L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 μ L移し、95 μ Lの希釈液(反応溶液のうち、RNA、酵 素、APCを除き、終濃度 10 μ g/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 μ L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 μ L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vwに対するヒストグラムを反応体積vpに対するヒストグラムに変換した方法を記す。実際にはvw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vp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。

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

ただし、W(i)はvw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。

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

$$\frac{\partial J}{\partial R(j)} = 2\sum_{i=1}^{n} \{W(i) - (R(1)P_{i1} + R(2)P_{i2} + \dots + R(m)P_{im})\}(-P_{ij})$$

$$= 2\left[-\sum_{i=1}^{n} W(i)P_{ij} + \sum_{i=1}^{n} (R(1)P_{i1} + R(2)P_{i2} + \dots + R(m)P_{im})P_{ij}\right]$$

$$= 2\left[-\sum_{i=1}^{n} W(i)P_{ij} + R(1)\sum_{i=1}^{n} P_{i1}P_{ij} + R(2)\sum_{i=1}^{n} P_{i2}P_{ij} + \dots + R(m)\sum_{i=1}^{n} P_{im}P_{ij}\right]$$

$$= 0$$

したがって、以下の式が成り立つ。

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vi-からvi+までを一つの階級jとし、そのなかにvi- $< v_{pik} < v_{i+}$ なる体積 v_{pik} 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_{i-}からv_{i+}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<vpi>をvpi-とvpi+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 ($N_{RNA}(t) = k_{cat}$ Nenz 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vp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vokと その体積での平均RNA分子数< N_{RNA60}(v_{pik})>は比例定数a_{ave}(j)で比例すると仮定する(< $N_{\text{RNA60}}(j) > = a_{\text{ave}}(j) v_{\text{pik}}$ 。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<< $N_{RNA60}(<v_{pi}>)>>(= a_{ave}(j)<v_{pi}>)とすると、反応体積の階級に幅があることに$ よるその階級でのRNA分子数の偏差平方和Jav(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、

$$J_{AV}(i) = \frac{a_{ave}(j)^{2} F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpi-}^{vpi+} (v_{pjk} - \langle v_{pj} \rangle)^{2} dv_{pjk}$$

$$= \left(\frac{\left\langle \left\langle N_{RNA60}(\langle v_{pj} \rangle) \right\rangle \right\rangle}{\left\langle v_{pj} \right\rangle} \right)^{2} \frac{F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpi-}^{vpi+} (v_{pjk} - \frac{v_{pj+} + v_{pj-}}{2})^{2} dv_{pjk}$$

$$= \left(\frac{\left\langle \left\langle N_{RNA60}(\langle v_{pj} \rangle) \right\rangle \right\rangle}{\left\langle v_{pj} \right\rangle} \right)^{2} \frac{F_{preac}(v_{pj})(v_{pj+} - v_{pj-})^{2}}{12}$$

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

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

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

次に、これらの値からをSD_{InRNA}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

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

と定義される。ただし $N_{\text{RNA60}}(v_{\text{pjk}},\mathbf{l})$ は、 $F_{\text{preac}}(v_{\text{pjk}})$ 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、

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

$$= \frac{F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpj-}^{vpj+} SD_{RNA}(v_{pjk})^{2} dv_{pjk}$$

$$= \frac{a_{AVE}(j)^{2} a_{SD}^{2} F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} \int_{vpj-}^{vpj+} v_{pjk}^{2} dv_{pjk}$$

$$= \frac{1}{3} \left(\frac{N_{RNA60}(\langle v_{pj} \rangle)}{\langle v_{pj} \rangle} \right)^{2} \frac{a_{SD}^{2} F_{preac}(v_{pj})}{v_{pj+} - v_{pj-}} (v_{pj+}^{3} - v_{pj-}^{3})$$

である。また、

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

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

である。 $N_{\text{RNA60}}(\langle v_{\text{pj}} \rangle)$ は図 4.4Dの黒色実線の関係から求まり、 $F_{\text{preac}}(v_{\text{pj}})$ 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) = $a_{SD} < N_{RNA60}(v_p) > = 60 a_{SD} k_{cat} N_{enz}$ であり、式 4.2 からSD_{InRNA} = 60 $k_{cat} a_{SD}$ であるので、 a_{SD} からSD_{InRNA}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 $Q\beta \nu$ 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。

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 ($k_2 \Rightarrow 0$) 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、

$$k_{cat}$$

Rt + E \rightarrow 2 Rt + E

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。

 $\ln(N_{\text{RNA}}(t)) = k_{\text{cat}} t + \ln(N_{\text{RNA}}(0))) \quad (t \leq t_{\text{sat}} \mathcal{O} \notin \mathfrak{E})$

 $N_{\text{RNA}}(t) = k_{\text{cat}} N_{\text{enz}} t + N_{\text{enz}} (1 - k_{\text{cat}} t_{\text{sat}})$ (t > t_{sat}のとき) 式 4.1 ただし、 $N_{\text{RNA}}(0)$ 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、 $t_{\text{sat}} = \ln(N_{\text{enz}}/N_{\text{RNA}}(0))/k_{\text{cat}}$ 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pcat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_{InRNA}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_{$\tau}とすると、RNA分子数が十分に大きいとき、$ 以下のような関係がある。</sub>

$$SD_{\tau} = \frac{SD_{RNA}}{k_{cat} N_{enz}} = \frac{SD_{\ln RNA}}{k_{cat}}$$

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



C.

D.



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 τ とSDInRNA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 τ とSDRNA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. SDInRNA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_{InRNA}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_{InRNA}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_{InRNA}が大きくなることがわかる。また、 SD_{InRNA} = $1.28\sqrt{1-p_{cat}}$ という式でよくフィットできた(実線)。このように、SD_{InRNA}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_{InRNA}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_{taRNA}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

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

$$\overrightarrow{x} 4.3$$

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。 \bigcirc 、 \triangle 、 \blacksquare 、+、 \bigcirc 、▲、 \Box はそれぞれ、初期RNAを10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、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(NRNA(0))とτの関係。実線は、直線回帰であり、ここから求まるkcatの値は本文に示した。C. NRNA(0)とSDlnRNAの関係。 \bigcirc と \bigcirc 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(pcat = 0.1)。

 $N_{RNA}(0)$ (molecule)

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_xを求め、これと求めた k_{cat} から、式 4.2 に したがいSD_{InRNA}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_{InRNA}をプロットしたものである。実験結果(●と〇)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、Q β 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2.15µM、初期RNA濃度1nM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vw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[R₀]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} [R₀] 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vwについての二次元ヒストグラム。有効酵素濃度2.15 μ M、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vw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、〇を式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vwとvp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. vw をvp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

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

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} [R₀] = 0.054 nMを得た(黒色実線)。[R₀] = 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} [R₀] = 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の全体積が 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)。

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。

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。

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、vwおよびvn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、ある反応体積い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vw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< $Gr(v_p)$ >から換算されるRNA分子数の平均的代 表値< $N_{RNA}(v_p)$ >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< $N_{RNA}(v_p)$ >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vpの階級における反応リポソームの<Gr(vp)>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_n)>をもつリポソームの順位)を求 めた。その後各v_n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_n)>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_n = 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、 $\ln(\langle Gr(v_n) \rangle) = 0.76 \ln(v_n) + 5.1 (R^2 = 0.98)$ 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_n)>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vp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_n)>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、kcatおよびNenz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Neaz(●、 右軸)を示した。得られたkcatは、vo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。Nenzは、封入した濃度([E] = 2.15 μ M = 3600 molecule/fL) から想定される分子数(Nenz = [E] vp =3600 vp、灰色破線)に対して 49%程度([E] = 1.1 μ M = 1800 molecule/fL) であった(灰色実線は線形回帰直線 N_{enz} = 1800 v_{px} 、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< $Gr(v_p)$ >が示してある。B. < $Gr(v_p)$ >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. <NRNA(v_p)>の経時変化。 \oplus 、 \bigcirc 、▲、×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. <NRNA(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。 \bigcirc 、 \oplus 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}) = 0.67ln(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(\bullet)。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(\bullet)。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。

 $J_{\text{total}} = J_{\text{A}} + J_{\text{B}}$

 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、

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

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_{InRNA}を求めることができる(詳細は試料と方法)。結果、SD_{InRNA} = 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vw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。

 $J_{\rm vol}$

 $J_{\rm reac}$

 $J_{_{
m total}}$

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 Q β 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、1fL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Οβ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vw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、kcatはあまり変わらないが、Nenz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、vpの平均体積とvw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kcat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、kcat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).
- 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).
- 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).
- Chetverina, H.V. & Chetverin, A.B. Cloning of RNA molecules in vitro. *Nucleic Acids Res* 21, 2349-2353 (1993).
- 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).
- Spiegelman, S. et al. The mechanism of RNA replication. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 33, 101-124 (1968).
- 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).
- 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).
- Biebricher, C.K., Eigen, M. & Luce, R. Template-free RNA synthesis by Q beta replicase. *Nature* 321, 89-91 (1986).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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RNA⁹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Oβ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pdiv(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、Q β 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(\leq 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

 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、

$Mut + Rep \rightarrow 2Mut + Rep$

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、

$\operatorname{Rep} + \operatorname{Mut} \rightarrow \operatorname{Mut}$

反応 5.3

である。単純化のためにこの触媒確率もpcat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、 $O\beta$ 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(Pprop)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





Β.

1. Replicator replication



2. Mutant replication



3. Mutant activity



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 $Q\beta \nu \tau$ 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 ($p_{cat} \gg p_{div}$) 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 $\mu \geq N_{max}$ 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 $P_{prop} = 0 \geq x$ 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、 $p_{cat} \gg p_{div}$ を仮定しているため、例えば $N_{max} = 3$ であっても、 $p_{cat} \gg p_{div}$ 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、 $\mu N_{max}/2$ 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

 $N_{\max} < \frac{1}{\mu}$ 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(〇)。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、 $1/\mu$ の関係。実線は $N_{max} = 1/\mu$ 。

$$\begin{split} & \operatorname{Rep} \to \begin{cases} 2\operatorname{Rep} \\ \operatorname{Rep} + \operatorname{Mut} \end{cases} & (N_R \geq 2 \mathcal{O} \diamond \flat \& 1 \ \text{細胞あた} 9 N_R & \text{回試行し確率} p_{cat} & \text{で起こ3}) \\ & \operatorname{Mut} \to 2\operatorname{Mut} & (N_R \geq 1 \mathcal{O} \diamond \flat \& 1 \ \text{細胞あた} 9 N_M & \text{回試行し確率} p_{cat} & \text{で起こ3}) \end{cases} \end{split}$$

Rep→*None* (1 細胞あたり N_M 回試行し、確率 p_{cat} 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。

$$\begin{cases} \frac{dN_R}{dt} = (1 - \mu) p_{\text{cat}} N_R - p_{\text{div}} N_R - p_{\text{cat}} N_M \\ \frac{dN_M}{dt} = p_{\text{cat}} N_M - p_{\text{div}} N_M + \mu p_{\text{cat}} N_R \end{cases}$$
 $\overrightarrow{\text{x}} 5.2$

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pcat/pdiv および μ 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(Pprop)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、pcal/pdiv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_{cat} となっているが、 p_{cat} が速度定数(単 位時間当たりの確率)であるのに対しμ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 $N_{\rm M}=0$ および $\mu=0$ を仮定すると、定 常状態をとるのは、 $p_{cat}/p_{div} = 1$ のときであることがわかる。

 $p_{cat}/p_{div} = 1$ 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 (〇)、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 $\mu p_{cat} N_R$ である。ここで、 十分小さい単位時間を考え、 p_{cat} が十分小さいとき、 $\mu p_{cat} N_R$ である。ここで、 十分小さい単位時間を考え、 p_{cat} が十分小さいとき、 $\mu p_{cat} N_R$ である。ここで、 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_{div} > $\mu p_{cat} N_R$ であり、いま $p_{cat}/p_{div} = 1$ であるので、許容される N_R は式 5.1 同様

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。

$$\begin{cases} \frac{dN_R}{dt} = \frac{(1-\mu)p_{\text{cat}}N_R^2}{v_{\text{cell}}} - p_{\text{div}}N_R - \frac{p_{\text{cat}}N_MN_R}{v_{\text{cell}}} \\ \frac{dN_M}{dt} = \frac{p_{\text{cat}}N_MN_R}{v_{\text{cell}}} - p_{\text{div}}N_M + \frac{\mu p_{\text{cat}}N_R^2}{v_{\text{cell}}} \end{cases}$$

ここで、 N_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_R -1) N_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_R -1) N_R となるように行っている。全て正の数かつ μ 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_{cat} $p_{div}^{-1}v_{cell}^{-1}$ および μ 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、

$$N_R^* = \frac{v_{\text{cell}} p_{\text{div}}}{p_{\text{cat}}}$$

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

$$\left. \frac{d}{dN_{R}} \frac{dN_{R}}{dt} \right|_{N_{R}=N_{R}^{*}} = p_{\text{div}} > 0$$

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、

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

であり、 $N_{\rm R} = N_{\rm R}$ *のとき、式 5.3 同様になることがわかる。よって、

$$2 < N_R^* < \frac{1}{\mu}$$

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

式 5.6

(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 $N_{\rm R} < N_{\rm R}$ *)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、 $v_{\rm cell}$ が小さいことから、最初の細胞についてのみ $N_{\rm R}$ *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 $P_{\rm prop}$ 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 $P_{\rm prop}$ 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Pprop(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- μ M)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).
- 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).
- 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).
- 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).
- Oro, J. & Lazcano, A. A minimal living system and the origin of a protocell. *Adv Space Res* 4, 167-176 (1984).
- 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

第5章:原始細胞繁殖に対する理論的考察

coli and liposome. In preparation.

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、Q β 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、Q β 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、Q β 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。

<u>業績</u>

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)

国際シンポジウムロ頭発表

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ト部格教授(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。