



Title	連續攪拌槽型反応器を用いた区画内RNAの長期進化に関する研究
Author(s)	吉山, 友明
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72601
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名（吉山友明）	
論文題名	連続攪拌槽型反応器を用いた区画内RNAの長期進化に関する研究
論文内容の要旨	

連続攪拌槽型反応器は反応液を攪拌しつつ反応基質を連続的に流入させ、同量の反応液を取り出すことで自動的かつ安定的に化学反応を持続させる。細菌の実験室内進化においては連続培養器として用いられてきた。最近では生物由来の材料で再構成された、細菌よりもはるかに単純な遺伝子複製系を持つ人工細胞の実験室内進化も可能となつた。人工細胞の進化は、同じく単純な遺伝子複製系と考えられている原始生命の進化モデルとなり、複雑性や多様性の獲得機構を明らかにすることが期待されている。しかし、人工細胞の継代には細菌の培養のような操作に加えて、区画構造の作成も必要となるため、連続培養器をそのまま流用することはできない。

区画構造として、油中水エマルションがよく用いられる。エマルションを用いれば、反応を区画化することができ、さらに攪拌することで液滴間の融合・分裂を促し、区画内に新しい基質を供給して内部反応を継続させることができる。本研究では、まず小型のマグネットスターーラーを用いた連続攪拌槽型反応器を開発し、我々の研究室で構築した人工細胞に適用することを試みた。この人工細胞は、エマルションの液滴を反応区画として用い、生命システムの中で重要な反応であるRNAの翻訳・複製反応を内封しており、本反応器で継代することができれば様々な人工細胞実験の効率化にも貢献することが期待される。反応基質の供給とエマルションの攪拌をおこなうことで、通常は4時間ほどで反応が停止するのに対して、10時間反応を持続させることができた。

人工細胞の進化には数百時間ほどの継代が必要と予測されたため、より長時間反応を持続させるための条件を検討した。先行研究より、継代時の希釈率を下げることで、複製酵素をコードしているRNA（ホストRNA）と、人工細胞に自然発生してウイルスのようにふるまうRNA（パラサイトRNA）の濃度が振動現象を起こしながら複製を持続することが報告されている。本研究の反応器も希釈率を下げ、攪拌を間欠的にすることで液滴内の物質の希釈率を低下させたところ、同様の振動現象が観察され、400時間を超える反応の持続に成功した。また、進化後のホストRNAは数点の変異を有し、複製率が向上したことから、自然淘汰による進化が起ったと考えられた。

本研究の反応器では実験操作のほとんどが自動でおこなわれるため、手作業で継代していた先行研究と比較して、1日当たりに経る世代数は3倍、実験操作は3日に1度で実験室内進化をおこなうことが可能となった。そこで、さらなる長期間の継代を実施し、人工細胞系における前人未到の長期間におよぶ実験室内進化の観察を試みた。現在、継代は4800時間（約1400世代）を超えて、今なお進化は持続している。

これらの結果から、本研究で開発した連続攪拌槽型反応器は、エマルションが反応区画として用いられている様々な人工細胞研究の実験効率向上に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (吉山友明)		
論文審査担当者	(職)	氏名
	主査 教授	松田 史生
	副査 教授	前田 太郎
	副査 教授	清水 浩
	副査 教授	若宮 直紀
	副査 教授	松田 秀雄
	副査 招へい教授	市橋 伯一 (東京大学)

論文審査の結果の要旨

本論文は単純な遺伝子複製系と考えられている原始生命の進化モデルである、人工細胞の進化系の構築を目指したものである。その実現のために、反応液を攪拌しつつ反応基質を連続的に加え、同量の反応液を取り出すことで自動的かつ安定的に化学反応を持続させる連続攪拌槽型反応器の構築を志向している。これまでに、人工細胞の区画構造によく用いられるエマルションの液滴は、攪拌することで融合・分裂し、内封液が液滴間で拡散することが知られている。本論文では、小型のマグネットスターを用いた連続攪拌槽型反応器を開発し、人工細胞の長期進化系の構築を目的としている。

第1章は序論である。本研究の背景と目的について述べている。

第2章ではまず、エマルションの液滴を反応区画として用い、生命システムの中で重要な反応であるRNAの翻訳・複製反応を内封した人工細胞を継代する、連続攪拌槽型反応器の運転条件の最適化をおこなっている。これにより、反応基質の供給とエマルションの攪拌をおこなうことで、通常は4時間ほどで反応が停止するのに対して、10時間反応を持続させることができたこと示している。

第3章では、人工細胞の進化には数百時間ほどの継代が必要と予測されたため、より長時間反応を持続させるための条件を検討している。継代時の希釈率を下げることで、複製酵素をコードしているRNA(ホストRNA)と、人工細胞に自然発生してウイルスのようにふるまうRNA(パラサイトRNA)の濃度が振動現象を起こしながら複製を持続することを確認し、さらに400時間を超える反応の持続に成功している。また、進化後のホストRNAは数点の変異を有し、複製率が向上したことから、自然淘汰による進化が起こった可能性があることを示している。

第4章では、長期進化実験に取り組み、4800時間を超える反応の持続に成功している。本研究の反応器では実験操作のほとんどが自動でおこなわれるため、手作業で継代していた先行研究と比較して、1日当たりに経る世代数は3倍、実験操作は3日に1度で実験室内進化をおこなうことが可能となったことを示している。

第5章では、本研究で得られた知見をまとめ、展望について述べている。

このように、本論文では人工細胞の進化系の構築にむけ、連続攪拌槽型反応器の作成(第2章)、最適化(第3章)に基づく、長期実験室進化に初めて成功した(第4章)。本研究をもとに、人工細胞の実験室内進化が可能になれば、原始生命の進化モデルとして、複雑性や多様性の獲得機構を明らかにすることが期待されるところから、情報科学の発展に寄与することが期待される。したがって、本論文は博士(情報科学)の学位論文として価値のあるものと認める。