

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14794

研究課題名(和文) DNA自己増幅ループを用いたスクリーニング不要のin vitro分子進化法の開発

研究課題名(英文) Screening-free in vitro evolution of biomolecules with programmed DNA amplification and natural selection

研究代表者

古林 太郎 (Furubayashi, Taro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特別研究員

研究者番号：20902620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：スクリーニング不要のin vitro超高速酵素進化系の実現を目指して研究を行った。ここで構築する進化系は、人工細胞の中で「進化ターゲット酵素の活性」を「酵素をコードした遺伝子(DNA)の自己増幅」へと変換するようなDNA自己増幅プログラムを備え、10億個ほどの微小な人工細胞(w/oエマルション)が超並列にDNA自己増幅競争を行うことで進化を実現する。

本研究では、RNAポリメラーゼ活性をDNA複製量に変換する分子プログラム、超並列フェムトリットルリアクター内でのDNA増幅プログラムの実現に成功した。これら基盤技術をもとにRNAポリメラーゼの進化実験を引き続き行っていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

指向性進化は自然の進化プロセスを実験室内で模倣し、有用な機能分子をエンジニアリングする強力な手法である。次世代の進化テクノロジーであるin vitro分子進化法において、酵素など複雑な分子を改変する手法は高度な専門性・高額な機器を必要とする。また、進化サイクルを回すには人手と時間を要し、省力化・効率化が求められていた。

本研究では、DNA自己増幅プログラムによる半自動進化というアイデアをin vitro分子進化に持ち込み、困難なスクリーニング無しに高速進化を達成する新しい道筋を提示した。簡単かつ超高効率な分子進化法の実現は、非専門家も巻き込みバイオテクノロジーに大きなインパクトをもたらす。

研究成果の概要(英文)：We aimed to construct a screening-free and ultra-efficient in vitro enzyme evolution system. The evolution system developed here is equipped with a DNA self-amplification program that converts the "activity of target enzymes" into "self-amplification of enzyme-coding genes (DNA)" in artificial cells. Evolutionary optimization of the target enzyme occurs through massively parallel DNA self-amplification race among tiny artificial cells (w/o emulsion).

In this study, we achieved (1) Molecular program to convert RNA polymerase activity into DNA replication (2) DNA amplification in a massively parallel femtoliter reactors. Based on the basic technologies established here, we are going on to evolution experiments of an RNA polymerase.

研究分野：進化学

キーワード：進化学 タンパク質工学 分子進化 指向性進化 無細胞翻訳 人工細胞 ダーウィン進化 DNA複製

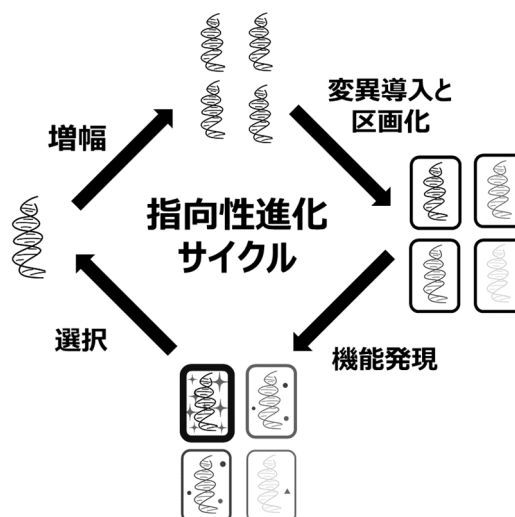
1. 研究開始当初の背景

酵素は高い反応触媒能と基質特異性をもつ生体分子であり、科学研究の基本ツールとして、また工業・農業・医薬など生活一般を支える役者として広く活用されている。したがって、より高活性あるいは新機能をもつ酵素をデザインする技術開発は科学や社会の発展に大きなインパクトをもたらす重要課題である。しかし、タンパク質の立体構造と分子機能のマッピングや、分子解像度で正確にタンパク構造体を予測・設計することは近年の技術発展にもかかわらず、未だ困難な課題である。

このような状況で台頭したのが指向性進化法であり、この手法は進化ターゲット(RNAやタンパク質)の配列さえわかれば、その立体構造や構造・機能対応についての知識なしに分子を改良・デザインできる方法論である。指向性進化は、機能分子をコードした遺伝子ライブラリ(通常はDNA)に対して変異導入・機能発現・選択・増幅からなる進化ループを繰り返し行うことによって実現される(図1)。この際に最も重要となるのは、機能向上した変異体を選択するプロセスをいかにうまくデザインするかであり、一般に指向性進化法のボトルネックとなっている。指向性進化法は進化サイクルの途中で生物を利用するか否かで、*in vivo*アプローチと*in vitro*アプローチに分類できる。*In vivo*アプローチには強力な転写・翻訳活性や、細胞増殖を通じた進化ターゲットの自律選択など、宿主細胞の高度な機能を活用したメリットがいくつも存在する。しかし *in vivo*アプローチでは宿主細胞を生かしたまま扱う必要があるため、細胞毒性のある分子は発現させられない、反応系の成分や変異率などを容易に変更できない、そもそも遺伝子が発現しない(しばしば原因不明)など、生物由来で根本的な解決が難しい問題が数多く存在している。

このような生物由来の問題を解決できるポテンシャルを持つのが *in vitro*アプローチであり、近年発展してきた酵素進化の代表的な手法として *in vitro* 区画法¹が挙げられる。このアプローチでは人工の微小区画(エマルジョンなど)にターゲット遺伝子を1分子封入して遺伝型-表現型カップリングを行い、細胞抽出液や再構成無細胞タンパク合成系²などの無細胞翻訳系で遺伝子発現を行う。この無生物プラットフォームでは細胞毒性のある分子が発現可能、反応系の成分および物理化学パラメータ(温度やpHなど)の変更が容易、内容物が既知でトラブルシューティングが格段にしやすい、など数多くのメリットが生まれる。しかし、分子機能の評価・選択するプロセスの実現にはアイデアと試行錯誤が要求され、いまだ簡便・高効率な *in vitro* での選択手法は存在しない。

図1：指向性進化サイクルの概念図



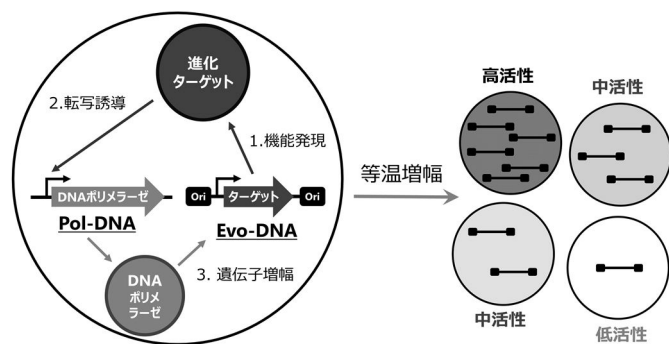
1. O. J. Miller et al., Nat. Methods. 3 (2006), doi:10.1038/nmeth897.
2. Y. Shimizu et al., Nat. Biotechnol. 19, 751-755 (2001), doi:10.1038/90802.

2. 研究の目的

進化ターゲットの酵素活性を、酵素をコードした遺伝子の自己増幅率へと変換する分子プログラム(DNA 自己増幅ループ)を再構成型無細胞翻訳系の中に構築する(図2)。より具体的には、本システムは無細胞翻訳系を分散した water-in-oil エマルジョンに変異体 DNA ライブラリを区画あたり1分子封入した in vitro 区画化系として実現され、およそ 10^8 個の微小区画内で超並列に自己増幅プログラムが走る。酵素活性を自己複製にカップリングさせることにより、機能の高い変異体をスクリーニングなしに自律進化させることが可能である。また従来は各ステップごとに人為的な介入が必要であった変異導入・機能発現・選択・増幅の過程をワンポットの等温反応に統合することにより、スクリーニング過程の排除のみならず進化サイクル全体を劇的に効率化できる。

図2: DNA 自己増幅ループ

無細胞翻訳系の中で Evo-DNA から進化ターゲット分子が発現され、その分子機能が Pol-DNA の転写を誘導するよう分子デザインを組む。続いて翻訳される DNA ポリメラーゼが Evo-DNA を複製することにより、進化ターゲット活性の強さをその遺伝子増幅率へと変換する。



3. 研究の方法

DNA 自己増幅ループの構成要素は無細胞翻訳系と、二種類の直鎖状二本鎖 DNA である(前々頁・図2)。一方の DNA は進化ターゲット分子をコードし両端に複製起点配列 Ori をもつ Evo-DNA であり、もう一方は phi29DNA ポリメラーゼ(DNAP)をコードし、Ori 配列をもたない Pol-DNA である。Evo-DNA のみが複製・進化することにご注意頂きたい。また Evo-DNA は T7 プロモーターの、Pol-DNA は T3 プロモーターの制御下にあり、これらプロモーターはお互いに直交し T7 もしくは T3RNA ポリメラーゼ(RNAP)により独立に転写を制御できる。

さて、進化ターゲットが T3RNAP である場合を考える。Evo-DNA が区画あたり1分子に、Pol-DNA が区画あたり数十~数百分子(図2では単純化のため1つしか描いていない)になる濃度に調整し、無細胞翻訳系の water-in-oil エマルジョンとして界面活性剤を加えたオイル中にホモジナイザーを用いて分散・区画化する(図3)。このエマルジョンを等温で保温すると、まず区画内に最初から含まれている T7RNAP によって T3RNAP が転写され、発現する。続いて T3RNAP が Pol-DNA の転写を誘導し、これにより DNAP が発現して Evo-DNA が複製される。すなわち、進化ターゲット(この場合は T3RNAP)の活性が遺伝子の自己増幅に変換されるわけである。この際ポリメラーゼの自発的なエラーによって一定確率で Evo-DNA に変異が導入されること、および1分子封入された T3RNAP 遺伝子変異体の活性に応じて増幅率が決まることから、図3の等温増幅過程(ステップ1)だけで増幅・変異・選択が一気に行われる。あとはエマルジョンの一部をランダムに除去して DNA 濃度が十分に下がるように希釈し(ステップ2-3)、一定量の Pol-DNA を含む新しい無細胞翻訳系(Evo-DNA は含まない!)とオイルを供給し再びホモジナイザー混合して栄養の供給と Evo-DNA 変異体ライブラリの区画あたり1分子再封入(ステップ4)を行う。

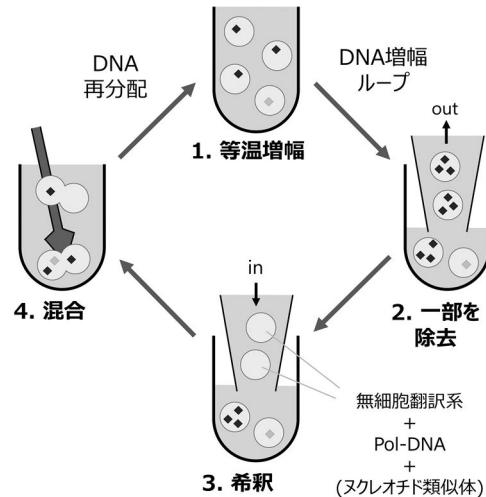
研究項目 では、上記のように T3RNAP をコードした Evo-DNA を用いて上記の進化サイクルを 10~20 サイクル程度回して DNA 配列集団の NGS 解析を行い、進化の程度を確かめる。phi29 ポリメラーゼの変異率は 10^{-5} 程度と低いいため、ヌクレオチド類似体を無細胞翻訳系に含ませてエラー率を上昇させた条件検討も行う。変異の蓄積が十分でない場合は、解析結果から追加

の進化サイクル数を決定して追加実験し、再び NGS 解析を行う。NGS 解析から濃縮された変異を同定した後、当該の変異セットをもつ T3RNAP を作成して生化学アッセイを行い、プロモーターへの結合能や反応レートを解析し、T3RNAP の活性が進化により向上したかどうかを検証する。

研究項目 では、サイクルごとに供給する Pol-DNA のプロモーター配列を徐々に変更することにより、T3RNAP が認識するプロモーター配列を、最終的に T3 フェージ近縁種である SP6 フェージのプロモーターに変更することを試みる。与える Pol-DNA 配列を変更する以外は基本的に研究項目 と同様の進化実験と解析を行い、T3RNAP の配列認識能が変更できたかを検証する。

図 3 : 連続継代による実験進化サイクル

Water-in-oil エマルジョンに封入した DNA を菱形で示す。色の濃い方が高活性変異体を示す。



4 . 研究成果

- T3RNAP を用いた DNA 増幅ループを無細胞翻訳系の中に構築し、DNA 低濃度から高効率で DNA 増幅反応を起こすことに成功した
- 上記 DNA 増幅ループ反応が w/o エマルジョン内で連続的に継代できる条件を確立した
- 先行研究では直交するとされていた T3RNAP と T7RNAP の直交性が実際には十分でない(相互リーク発現する)ことを発見し、より適切な候補として SP6RNAP による増幅ループと進化系を再構築した
- エマルジョン連続継代による進化のパイロット実験として、RNAP の前に phi29 DNAP の高温適応進化実験を行い、これに成功した

現在はこれらの基盤的な知見と技術に立脚し、SP6RNAP の進化実験に乗り出している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizuuchi Ryo, Furubayashi Taro, Ichihashi Norikazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Evolutionary transition from a single RNA replicator to a multiple replicator network	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29113-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古林太郎
2. 発表標題 phi29 ファージ DNA 複製を用いた人工 DNA ゲノム進化系の構築
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古林 太郎、Thibault Di Meo、皆川 慶嘉、野地 博行、Yannick Rondelez
2. 発表標題 人工ダーウィン進化で実現するスクリーニング不要の in vitro 指向性進化系
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古林 太郎、Thibault Di Meo、皆川慶嘉、野地博行 & Yannick Rondelez
2. 発表標題 ダーウィン進化の導入によるin vitro酵素進化系の革新
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会16.0
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taro Furubayashi, Thibault Di Meo, Yoshihiro Minagawa, Yannick Rondelez & Hiroyuki Noji
2. 発表標題 Toward Screening-free in vitro directed evolution with natural selection
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関