

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：38005

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02855

研究課題名(和文) 実験と計算を融合した核酸酵素の進化学

研究課題名(英文) Directed Evolution of Nucleic Acid Enzymes Combining Experiment and Computation

研究代表者

横林 洋平 (Yokobayashi, Yohei)

沖縄科学技術大学院大学・核酸化学・工学ユニット・教授

研究者番号：70769752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：触媒機能をもつ核酸、特にRNA(リボザイム)は、生命の起源や遺伝子治療など、基礎的にも応用的にも興味深い分子である。リボザイムの塩基配列とその機能とどのような関係を持っているかを、測定し、予測することが本研究の主な目的である。本研究では、リガーゼというRNAを結合するリボザイムについて、大量の配列とその活性を測定し、そのデータを機械学習などによって解析した。その結果、リボザイム配列とその触媒活性について、多くの興味深い知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

触媒機能をもつRNA、リボザイムは、生命の起源に深く関わると考えられている。また、遺伝子治療などへの応用も有望な機能性核酸である。本研究は大量のリボザイム塩基配列とその機能を実験的に測定し、得られた大量のデータを機械学習などで解析することにより、これまでになかった基礎的な知見が得られた。本研究により開発されたリボザイム測定技術やデータ解析法は、他の核酸酵素にも応用可能であり、様々な発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Catalytic nucleic acids, especially those based on RNAs (ribozymes), are intriguing molecules for their implications in the origin of life and applications in gene therapy. The main objective of this project is to measure and predict the sequence-function relationships of these ribozymes. In this project, we measured activities of a large set of ribozyme sequences that have RNA ligase activity. The data were then analyzed by various methods including machine learning. As a result, we obtained various insights into the relationships between ribozyme sequence and its function.

研究分野：核酸化学

キーワード：進化学 核酸化学 RNA リボザイム

1. 研究開始当初の背景

タンパク質や核酸の機能向上や機能創生において、進化学は強力な手法である。進化学の手順は、まず多くの変異体を作成し、その中から望みの機能を有する少数の変異体を分離（選択）し、それらの遺伝子配列を増幅する、というサイクルを繰り返し、最後に生き残った配列を解析する、というものである。進化学により、様々な機能を持ったタンパク質や核酸が作成されてきたが、いくつかの限界も存在する。まず、進化学実験においては、膨大な数の変異体が生成されるものの、実際に解読される配列は、最終的に生き残ったごく少数の変異体に限られる。また、その中でも個別に機能（結合能や触媒活性）測定が行われるのはごく一部である。つまり、実際に機能が定量的に測定されるのは 100 配列にも満たない。

申請者は、触媒活性を持つリボザイム（RNA 酵素）について、次世代シーケンシング（NGS）多数の変異体の活性を一度に定量的に測定する手法を開発した[1,2]。本研究ではこの手法と、遺伝的アルゴリズム（GA）や機械学習といった計算機による手法を組み合わせ、リボザイムの配列と機能の相関、つまり適応度地形を解析することを試みた。

2. 研究の目的

申請者は NGS を活用して、従来手法では得られなかった、核酸酵素の大規模配列-機能相関データを取得することに成功した。本研究ではこの独自手法によって初めて得られるデータを活用し、さらに計算機による（in silico）デザインを取り入れることにより、実験と計算を高いレベルで融合した、新しい核酸酵素の進化学の確立を目指す。

3. 研究の方法

遺伝的アルゴリズム（GA）によるリボザイム配列設計と、大規模活性測定

- 10^3 から 10^4 種類の変異体配列を計算機上で設計し、それらをマイクロチップ多配列DNA合成で混合物（oligo mix）として化学合成する。
- それを利用して作成したリボザイムライブラリをNGSにより活性測定し、そのデータをもとにGAにより次世代の配列集団（ 10^3 から 10^4 種類）を計算機内で設計する。このサイクルを繰り返す（Figure 1）。

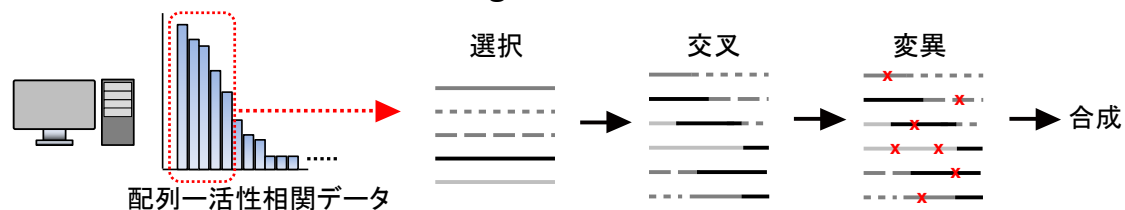


Figure 1. 遺伝的アルゴリズム（GA）による計算機上での配列設計の概念図。

機械学習（深層学習）によるリボザイムの適応度地形の予測

- NGSにより得られた配列-活性相関データを学習用データと検証用データに分け、深層学習により適応度地形モデルを作成する。
- 未検証の配列を任意に選び、多配列DNA合成により核酸酵素を作成し、NGS法により活性測定を行う。この新しいデータにより適応度地形モデルの精度を評価する（Figure 2）。

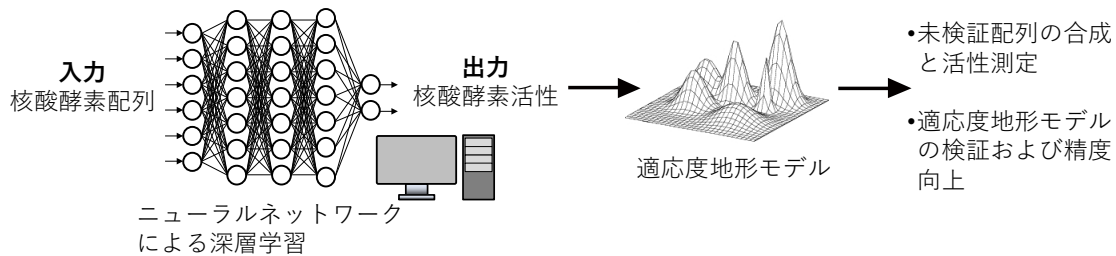


Figure 2. 深層学習（deep learning）による計算機上での適応度地形予測の概念図。

4. 研究成果

我々は、RNA リガーゼ活性をもつリボザイム F1*U を対象とした。まず、すべての 1 塩基変異体 (105 種類)、2 塩基変異体 (5355 種類)、ランダムに選んだ 3 塩基変異体 (4540 種類) を合成し、NGS により相対活性 (Relative Activity: RA) を測定した (**Figure 3**)。その配列活性相関データを用い、GA により新たな 2000 種類の配列を計算機で設計し、実際に合成・測定した。このような操作を 7 世代繰り返し、多くのリガーゼ活性を保持するリボザイム変異体データが得られた。

さらに、このデータを用いて深層学習モデルを構築し、計算機上で 100 世代に渡って GA を実行し、12000 種類の第 8 世代配列を設計したところ、約 50% の配列が活性を保持していることが確認された。これらの配列は F1*U と比較して、平均 13 塩基もの変異を含んでおり、スタート配列から遠い配列領域において活性を維持したリボザイム集団を予測できることが示された。

また、F1*U と比較して 16 塩基の変異を有する変異体 (Mut) に着目し、F1*U から Mut に変異する過程において、65536 種類すべての中間変異体の活性を測定した。その結果、この 2 つの配列の間に位置する変異体は、非常に高い活性を有することが確認された。これらはいわゆる neutral network を形成する配列集団と考えられ、今回実験的に解析されたことには大きな意義がある。また、本研究で得られた大規模なリボザイム配列-機能相関データは、実験的な生体高分子の適応度地形データとして、今後のさらなる解析によって新しい知見が得られることが期待できる。

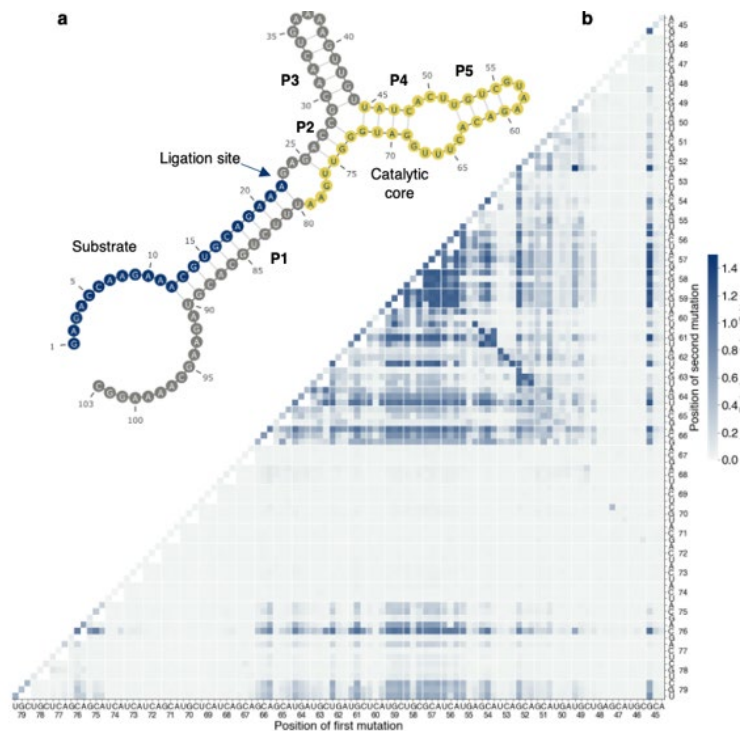


Figure 3. F1*U リガーゼと 1, 2 塩基変異体活性マトリックス。

文献リスト

- 1) Kobori S, Nomura Y, Miu A, Yokobayashi Y. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: e85.
- 2) Kobori S, Yokobayashi Y. *Angew Chem Int Ed* 2016; 55: 10354-10357.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yokobayashi Yohei	4. 巻 53
2. 論文標題 High-Throughput Analysis and Engineering of Ribozymes and Deoxyribozymes by Sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Accounts of Chemical Research	6. 最初と最後の頁 2903 ~ 2912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.accounts.0c00546	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 -
1. 著者名 Kobori Shungo, Nomura Yoko, Yokobayashi Yohei	4. 巻 47
2. 論文標題 Self-powered RNA nanomachine driven by metastable structure	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 6007 ~ 6014
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz364	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 -
1. 著者名 Mustafina Kamila, Fukunaga Keisuke, Yokobayashi Yohei	4. 巻 9
2. 論文標題 Design of Mammalian ON-Riboswitches Based on Tandemly Fused Aptamer and Ribozyme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Synthetic Biology	6. 最初と最後の頁 19 ~ 25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acssynbio.9b00371	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 -
1. 著者名 Nomura Yoko, Yokobayashi Yohei	4. 巻 47
2. 論文標題 Systematic minimization of RNA ligase ribozyme through large-scale design-synthesis-sequence cycles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 8950 ~ 8960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz729	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 -

1. 著者名 Tabuchi Takeshi、Yokobayashi Yohei	4. 巻 50
2. 論文標題 High-throughput screening of cell-free riboswitches by fluorescence-activated droplet sorting	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 3535 ~ 3550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkac152	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 -

1. 著者名 Fukunaga Keisuke、Yokobayashi Yohei	4. 巻 50
2. 論文標題 Directed evolution of orthogonal RNA-RBP pairs through library-vs-library in vitro selection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 601 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab527	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8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 横林 洋平
2. 発表標題 セルフリーシステムにおける人工リボスイッチの構築
3. 学会等名 生物工学Webシンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yokobayashi Y.
2. 発表標題 Designing RNA Devices in Test Tubes and Cells
3. 学会等名 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横林 洋平
2. 発表標題 人工細胞でも使える(?) RNAデバイスの作成
3. 学会等名 「細胞を創る」研究会12.0 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nomura Y, Yokobayashi Y.
2. 発表標題 Systematic Minimization of RNA Ligase Ribozyme Through Large-Scale Design-Synthesis-Sequence Cycles
3. 学会等名 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mustafina k, Fukunaga K, Yokobayashi Y.
2. 発表標題 Design of Mammalian ON-riboswitches Based on Tandemly Fused Aptamer and Ribozyme
3. 学会等名 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yokobayashi Y.
2. 発表標題 High-throughput analysis of ribozyme sequence-function relationship
3. 学会等名 RIKEN BDR Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横林 洋平
2. 発表標題 RNA遺伝子スイッチを創る
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yokobayashi Y.
2. 発表標題 Synthetic Riboswitches in Mammalian Cells
3. 学会等名 Cold Spring Harbor Asia, Synthetic Biology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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
---------	---------