

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06579

研究課題名(和文) 区画化による分子共生はRNAワールドを飛躍させるか？

研究課題名(英文) Could molecular symbiosis by compartmentalization drive evolution of the RNA world?

研究代表者

松村 茂祥 (Matsumura, Shigeyoshi)

富山大学・学術研究部理学系・講師

研究者番号：40619855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：リボザイムに人為的に変異を導入し、液滴を用いた実験進化を行ったところ、野生型のリボザイムを超える活性を示すクローンを見出した。次に、より高い選択圧をかけることのできる統合型マイクロ流体デバイスを用いて追加の進化実験を行った。得られたライブラリを解析したところ、もとのリボザイムの活性を大幅に上回る分子種を発見した。また、上記の実験進化の過程で、リボザイムではない、基質RNAに結合してその蛍光を増強する能力をもつ新規なRNAが出現した。さらに、この分子種は情報と機能を分離させている非常に興味深い特徴をもつことも判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞サイズの微小液滴操作技術を用いてリボザイムの人為進化を行う実験系を構築・運用し、実際にリボザイムの活性を大きく向上させることに成功した。特に、統合型マイクロ流体デバイスの実験進化における有用性を示すことができたことは、液滴を用いた新たな進化学の応用範囲・可能性を大きく広げる意義を含んでいる。また、実験進化の過程で、リボザイムではない、基質RNAに結合してその蛍光を増強する能力をもつ新規なRNAを発見した。この分子種は、情報と機能を分離させている非常に興味深い特徴をもつことも判明した。このようなRNAはこれまでに発見されておらず、RNAワールドの進化に対して極めて重要な知見を与えうる。

研究成果の概要(英文)：Experimental evolution of the ribozyme using droplet microfluidics has successfully produced the mutant ribozyme with higher activity beyond the wild type. Then subsequent evolution experiment has been carried out by using the integrated device newly developed, so the highly active mutant was newly obtained. We additionally obtained the novel functional RNA, that is not a ribozyme, which binds the substrate RNA and enhances its fluorescence intensity. This RNA has a very interesting feature, in which the information and function has been separated. The discovery of this RNA will give us hints regarding the RNA world evolution.

研究分野：進化分子工学

キーワード：RNAワールド 実験進化 リボザイム 区画化 マイクロ流体システム 生命の起源 情報と機能の分離

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

生命の起源は、科学におけるもっとも根源的かつ難解な問題の一つである。「RNA ワールド」仮説はそれを説明する有力な仮説であり、生命は機能をもつ RNA から始まり、現在の生命まで進化したとする。これまでに、ランダムな配列をもつ RNA 集団から、天然にない機能や構造をもつ分子がさまざまに単離されており、RNA が生命の創発に十分な機能を持ちうるとする RNA ワールド仮説を実験的に支持する根拠となっている。

しかし、これらの実験は、RNA が機能を「持ちうる」可能性は示唆するものの、実際にそのような進化が起こり得たのかどうか、という疑問には答えてくれない。進化の実際の状況においては、ランダム配列のような均一かつ大きな多様性が突然生じることが考えにくく、すでに存在する分子に少しずつ変異が入り多様性が生じ、進化が起こる。その際に、致命的な有害変異は自然選択により排除されるため、世代を越えて蓄積する変異は、その分子の機能を大きく毀損しない程度に限定されると考えられる。このような、多様性がかなり制約された状況からは、大きな進化は起こりにくいと予想される。これは、分子の機能(表現型)を毀損せずにどこまで変異を入れられるか? という「エラーの限界(error threshold)」として、しばしば議論されてきた。

だが、選択が個々の分子ではなく、分子の集団に対して働くと考えると、状況は変わってくる。仮に集団内に機能を失った分子があっても、全体としての活性が一定程度保たれば、その集団は生存できる。つまり、分子の機能を失わせるほどの有害な変異が許容されうる。これは、「遺伝子重複」と類似した状況であり、機能を喪失した分子に変異が蓄積し、大きな進化が起こりうると考えられる。

近年の研究で、RNA のような高分子が進化するためには原始細胞のような区画構造が必要で、そこでは区画を単位とした集団レベルの選択をうけたであろうことが示唆されている。申請者らは最近、区画化と選択により RNA 分子の多様性が大きく増大することを実験的に示した(Matsumura ら, Science, 2016)。RNA の進化実験を行うと活性をもたない寄生体 RNA が出現してくるが、活性をもつ RNA との共存を考えたとき、複製が遅い寄生体 RNA のほうが有利となり、寄生体 RNA 同士での競争が起こりにくくなり、結果として多様性が生まれやすくなるためである。

しかし、その多様性がどこまで大きくなりうるのか(エラーの真の限界はどこか)、そこから新たな分子機能が出現するなどの大きな進化が起こり得るのかどうかは、実験的には全く検証されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、RNA の実験進化を通して、「RNA に自発的に蓄積する多様性から、新たな分子機能の創発は起き得たのか?」という問いに答えることである。生命の起源における生体高分子の進化可能性(いかに進化し得たのか?)は、非常に重要な問題である。進化の原動力は多様性であるが、高分子が多岐にわたる進化をみせるほどの多様性が自発的に出現・蓄積していくのかどうかは、未解決の問題である。申請者は最近の研究で、RNA の区画化によりもたらされる集団レベルの選択が RNA 分子の多様化をもたらすことを、実験的に明らかにした。しかし、その多様性はどの程度まで蓄積しうるのか、そこから新たな機能の創発が起こるのかは、全く未開拓の課題であった。

本研究により得られる実験結果により、集団レベルでの選択圧と多様性の許容度との関係、真のエラー限界が理解されると考えられる。また、それが進化可能性を実質的に解き放つものであるかも解明されることが期待される。すなわち本研究は、「進化可能性」の議論をこれまでの「分子レベル」から「集団レベル」へと飛躍させることを目的とする。また、進化を応用して機能性分子を創る進化分子工学に対しても、高機能な分子を高速で創出する方法論を提供できると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) リボザイムに人為的に変異を導入し、液滴を用いた実験進化を行うことで、リボザイムの高性能化を目指した。変異誘発 PCR を用いて、RNA 切断リボザイムの遺伝子に変異を導入し、ランダムライブラリーを作製した。次いで、マイクロ流体システムによりそれら遺伝子の一つずつ微小液滴に封入し、液滴内でのリボザイム活性の評価・選別を行った。この過程を 5 ラウンド行った結果、活性の濃縮が確認されたため、プールから 40 種のクローンを単離し、配列を解析した。その中にはもとの野生型の配列は見られず、実験進化の成功が示唆されたため、数種類を選び、リボザイムの活性測定を行った。

(2) 得られた変異型リボザイムの実験進化をさらに進めるため、より高い選択圧をかけることのできるマイクロ流体デバイスの開発を行った。これまでの実験では、液滴の生成・保温・選別を別々のデバイスを用いて行っていたのに対し、新たに開発した統合デバイスでは、上記の全ての過程を1つのチップ上で行うことができるため、液滴の保温時間を極めて均一に、かつ短くすることができ、実験の再現性も大幅に高めることができると考えられる。

(3) 液滴の生成・保温・選別を1つのチップ上で行うことができる統合デバイスを用いて、ほぼ限界に近い選択圧をかけた追加の進化実験を行った。具体的には、反応時間をまず40分として2~3ラウンドの選別を行ったのち、反応時間をさらに20分に短縮して、最終選別を行った。得られたプールを次世代シーケンサーで解析し、最終ラウンドで優勢なクローンの活性を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) プールから単離されたクローンのうち1種は、野生型のリボザイムを超える活性を示した。このことは、液滴を用いた本手法が想定通りに機能し、リボザイム活性の実験的進化に有効であることを示している。得られたプールを次世代シーケンサーで解析し、活性種の配列を網羅的に解析した。また、リボザイムのさらなる機能向上を目指して、より厳しい条件で追加の進化実験を行った。

(2) 液滴の生成・保温・選別を連続して行える統合デバイスの構築に成功した。液滴の生成と選別の速度を合わせるため、特殊なデザインの液滴生成モジュールを用い、保温・選別モジュールと接続した。構築したデバイスは、液滴をチップ上で約40分保温した後、約1000 Hzの高速で分取することができた。次いで、この統合デバイスを用いて、リボザイムの追加の進化実験を行った。

(3) 得られたプールを次世代シーケンサーで解析し、最終ラウンドで優勢なクローンの活性を測定した結果、もとのリボザイムの活性を大幅に上回る分子種の同定に成功した。

また、上記の実験進化の過程で、想定外の機能をもつ機能性RNAも出現してきた。解析の結果、これはリボザイムではなく、基質RNAに結合することでその蛍光を増強する能力をもつ新規なRNAであることが明らかとなった。さらに、この分子種は情報と機能を分離させている非常に興味深い特徴をもつことも判明した。これらの分子種とその特性について、現在更なる詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今井 巴絵、荏原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 Functional analysis of a novel VS ribozyme variant obtained by experimental evolution
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田 海舟、荏原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 Analysis of unknown functional RNAs emerging during in droplet ribozyme evolution
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野口 唱、寺田 海舟、荏原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 VSリボザイムの進化実験により得られたリボザイム配列類似型・非切断RNAの機能解析
3. 学会等名 令和3年度 日本化学会近畿支部 北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田 海舟、荏原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 リボザイムの進化実験中に出現した未知の機能性RNAの解析
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺田 海舟、荻原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 リボザイムの擬細胞内実験進化で出現した未知の機能性RNAの解析
3. 学会等名 第46回 生命の起源および進化学会 学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中根 龍、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 ポリアミンを用いた核酸増幅反応とリボザイム反応の両立
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部 第38回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井 巴絵、荻原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 実験進化により得られた活性部位改変型VSリボザイムの評価
3. 学会等名 令和2年度 日本化学会近畿支部 北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺田 海舟、荻原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 リボザイムの進化実験中に出現した非切断型機能性RNAの解析
3. 学会等名 令和2年度 日本化学会近畿支部 北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西山 祐夏、荻原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 統合型デバイスを用いた微小液滴スクリーニングによるリボザイムの実験進化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荻原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 微小液滴スクリーニングによる機能性RNAの実験進化
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荻原 基力、井川 善也、松村 茂祥
2. 発表標題 微小液滴ハイスループットスクリーニングによるターンオーバー型リボザイムの実験進化
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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			
フランス	ESPCI Paris			
フランス	ESPCI Paris			
フランス	ESPCI Paris			
フランス	ESPCI Paris			