

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26891009

研究課題名(和文)液滴マイクロ流体システムを用いた膜内進化実験によるRNAの酵素能力の追求

研究課題名(英文)Experimental evolution of an RNA enzyme using droplet-based microfluidics

研究代表者

松村 茂祥 (MATSUMURA, Shigeyoshi)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・助教

研究者番号：40619855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マイクロ流路による液滴操作技術を用いて、リボザイムの「膜内進化システム」を構築し、RNAの触媒機能の限界を追求することを目的とした。本システムは、「RNAの膜内発現系」と、液滴を解析・分取する「マイクロ流体デバイス」から成る。前者については、これまでに開発されたRNAの発現系を基に、反応系成分の濃度等の最適化を行い、確立した。後者については、研究協力者の協力の下、液滴の多色蛍光検出、分取が可能な、独自の装置の構築を行った。現在、上記システムを用いて、リボザイムの膜内進化実験を行っている。本研究で開発したマイクロ流体デバイスは、汎用性の高いRNA実験進化システムの基盤となる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on developing a compartmentalized ribozyme evolution system using microfluidic technology to pursue potential of catalytic RNAs. It is composed of two parts; "compartmentalized ribozyme expression system" and "droplet-based microfluidics". First, we established the former by optimizing components of an RNA expression system we have previously developed. Second, the latter, an original system which is capable of multi-color fluorescence-based analysis and sorting of droplets, was constructed. Currently, InDrop evolution experiment of ribozymes is undergoing by using the system described above. The drop microfluidic system and devices developed in this study will contribute the basic technology for further artificial RNA evolution experiments.

研究分野：進化分子工学

キーワード：人工進化 RNA酵素 マイクロ流体システム エマルジョン

1. 研究開始当初の背景

RNA は、遺伝情報の保持と高次機能の発現の両者が可能な生体高分子であり、またその特徴から生命の起源・初期進化において重要な役割を果たしたと考えられている。そこで、機能性 RNA を新規に創製する強力な手法である「試験管内進化法 (*in vitro* selection)」が開発された。これは、多様な配列をもつ RNA の分子集団を作製し、望みの分子機能を指標とした選択(淘汰)をかけ、残った分子を増幅して再度選択をかける、といった生物のダーウィン進化を模したサイクルを繰り返すことで、無作為な配列から機能情報を抽出する、という方法である。

これまでにこの方法を用いて多数の触媒 RNA (リボザイム) が創出され、RNA が多様な代謝活性を持ちうることは証明されている。しかし、得られたリボザイムの活性、特に分子間反応を触媒する酵素回転能力は総じて低かった。生命進化初期においてリボザイムが触媒すべき「代謝」は通常は分子間反応であるため、リボザイムが酵素としてどこまで働かせるのかを知ることは、RNA ワールドの成立条件を考える上で極めて重要である。

試験管内進化法には「自己を修飾する分子・反応しか選択できない」という原理的な制約が存在するため、分子間で働く「酵素」としての機能全体に対して淘汰圧はかかっていない。すなわち、これまでの実験ではリボザイムの酵素機能を極大まで進化させていたとは言えない。この欠点を克服するため、*in vitro* compartmentalization (IVC) 法が開発された。これは、水溶液をオイルに分散させ、極めて微小かつ多数の細胞様液滴(エマルジョン)を作り出し、各液滴で独立に反応を進行させ、かつ選択を行う方法である。この方法には、自己修飾分子に限るといった機能選択の制限がなく、酵素機能全般に対して直接淘汰圧をかけることができるため、リボザイム進化の有力な方法であると期待された。しかし、液滴の大きさが不揃いであること等により実験条件の厳密な制御が難しいため、現状ではリボザイムの活性の劇的な向上に成功しているとは言い難い。

2. 研究の目的

本研究では、上記 IVC 法の欠点を克服した「膜内進化システム」を構築し、リボザイムの酵素機能の限界を追求することを目的とした。近年著しく発展しているマイクロ流体技術を用いることで、均一径の液滴の作製、液滴の分裂や融合、蛍光を指標とした選別など、液滴を高度に制御することができ、より正確かつ定量的な進化実験が可能となる。

本研究の課題は、上記マイクロ流体技術を用いて液滴を高度に操作し、リボザイムを膜内で進化させ、かつ強い淘汰圧を加えることで、リボザイムの酵素としての機能を追求することである。具体的な到達目標(課題)は、

以下の3つである。

(課題1) 液滴マイクロ流体システムの確立
(課題2) リボザイムのオンチップ膜内進化システムの構築

(課題3) 進化実験によるリボザイムの触媒能の追求

3. 研究の方法

(課題1) 液滴マイクロ流体システムの確立
本研究ではまず、液滴の作製、解析、選別を行うマイクロ流体システムを構築する。システム開発は、研究協力者である Andrew D. Griffiths 教授(フランス、ESPCI ParisTech)との共同研究を継続し、遂行する。これまでに開発したシステムをさらに改良し、励起レーザーの波長の一つを 532 nm (緑) から 561 nm (黄) へ変更する。この変更により、光学系の変更および最適化が必要になるが、バックグラウンドノイズの低減と、特にリボザイム活性に由来する蛍光の検出感度の向上が期待できるため、より精度の高い進化実験が可能になる。

(課題2) リボザイムのオンチップ膜内進化システムの構築

本研究の中心課題の1つである「リボザイムの酵素能の追求」のためには、進化実験において極めて強い淘汰圧をかける必要がある。淘汰圧調整の最も典型的なパラメータは反応時間であるが、短い反応時間を厳密に、かつ再現性よく制御するのは難しい。そのため、本研究では、液滴生成・インキュベーション・液滴選択の3つのモジュールから構成される、「統合」デバイスを用いる。このデバイスでは、上記の一連の反応・操作を1つのチップ上で連続して行うことができるので、極めて正確かつ再現性の高い実験の遂行が可能となる。

(課題3) 進化実験によるリボザイムの触媒能の追求

上記統合デバイスを用いて、リボザイムの進化実験を行う。リボザイム1分子を直径約 30 μm (15 pL) の液滴に封入し、遅延流路上にて 37°C でインキュベーションして複製・活性発現させ、それぞれの液滴の蛍光強度に従って選別する。選別後に液滴を破壊して内部の RNA を取り出し、精製後に希釈して濃度調整した後、再度液滴に封入し、以降同様の操作を繰り返すことで、高活性なリボザイムを進化させる。

4. 研究成果

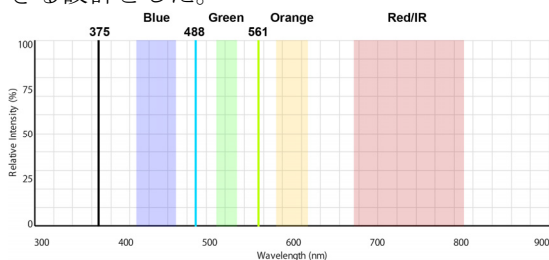
(課題1) 液滴マイクロ流体システムの確立
本研究の中心課題である「液滴内でのリボザイム人工進化」には、液滴を蛍光により解析するマイクロ流体システムが必要であるため、まずその開発に取り組んだ。市販の装置を用いてこのような実験を行うのは現状不可能であるため、フランス・ESPCI

ParisTech の Andrew D. Griffiths 教授との共同研究のもと、専用のシステムを自前で構築した。

蛍光解析のための光学系の概要を以下に記す。まず、チップ上の流路にレーザーを照射し、流路内の液滴を励起する。液滴から生じた蛍光を光路に取り込み、ミラーで分波、蛍光を3本の光電子増倍管(PMT)で検出する。PMTには特定波長を透過するフィルターが装着しており、それぞれ、青・緑・オレンジ領域の蛍光に対応する。PMTにより検出された蛍光シグナルは、接続されたコンピューターに送られ、解析される。また、コンピューターからのPMTの感度制御も可能となっている。

当初の研究計画では、使用する励起レーザーは2色(青・黄)の予定であったが、将来的な実験の拡張を見越して、紫外域の375 nmレーザーを追加し、全3色とした。これにより、紫外励起・青色蛍光の蛍光分子が使用可能になる。

構築したシステムの励起レーザー、および蛍光検出波長域を示す。青・緑・オレンジの蛍光色素をそれぞれ375 nm・488 nm・561 nmのレーザーで励起し、検出するシステムとなっている。レーザー光が検出部に入り込み、ノイズを上昇させるのを防ぐため、レーザーの波長と検出波長域が重ならないようにバンドパスフィルターを選定した。また、青とオレンジの検出波長域については、使用する蛍光色素を変えても対応できるように、代表的な複数の色素の蛍光波長に合わせて、広めに設計した。検出に使用しない赤～赤外光を、カメラによる液滴観察に用い、蛍光解析中でもデバイスと液滴をカメラでモニターできる設計とした。



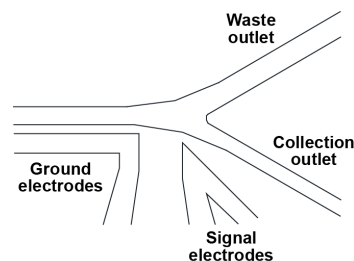
上記設計に基づいてシステムを構築し、最適化の後、性能評価を行った。蛍光色素を異なる濃度(濃度比10:1)で封入した2種類の液滴を作製、それらを混合し、蛍光解析を行った。システム上で2種類の液滴を識別することに成功し、その蛍光強度比も10:1と濃度比とほぼ同じであった。すなわち、高い定量性をもつ蛍光解析システムを開発できたと言える。

(課題2) リボザイムのオンチップ膜内進化システムの構築

リボザイム人工進化実験を行うための「統合」デバイスを新規に開発した。開発にあたり、液滴の分取を行うソーティングデバイスの改良を行った。これまで使用していたデバ

イスでも通常のソーティングを行う際に問題はないが、液滴の流速を上げた際、少量の液滴がソーティング信号とは無関係に collection outlet に流入してしまう問題があった。これは、waste outlet と collection outlet の流路抵抗の差が十分に大きくないことに起因すると考えられた。

そこで、上記2つの流路抵抗の差を大きくした新たなデバイスを開発した。このデバイスをテストした結果、流速の高い条件下でも、液滴の collection outlet への流入(擬陽性)をほぼ抑制することに成功した。



さらに、この新ソーティングデバイスと、液滴生成・遅延流路を組み合わせ、統合デバイスを構築し、テストした結果、良好な動作を確認した。

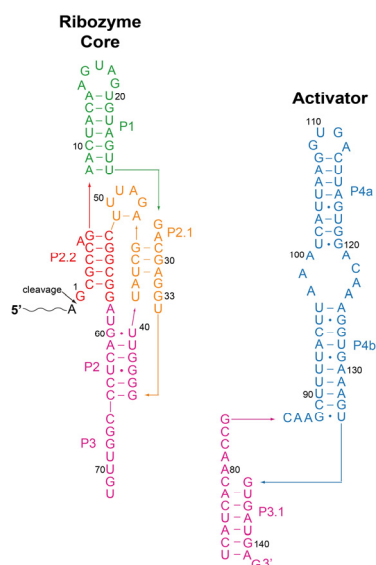
(課題3) 進化実験によるリボザイムの触媒能の追求

上記課題1と2で開発したマイクロ流体システムおよびデバイスを用いて、リボザイムの膜内進化実験を現在遂行中である。当初計画していたVSリボザイムに加えて、スプライシング活性をもつグループIリボザイムと、RNA切断活性をもつ *glmS* リボザイムを現在使用している。特に、後者の *glmS* リボザイムについて、その解析および工学的改変を行った。

glmS リボザイムは、炭疽菌のある mRNA 上に存在し、低分子代謝物であるグルコサミン6リン酸に応答して活性を発現する、自己切断型リボザイムである。このリボザイムは補因子(グルコサミン6リン酸)依存的リボザイムであるので、低分子応答性分子スイッチと見なせる。これを、膜内RNA進化系の制御に用いることを考え、その解析を行った。

このリボザイムは活性に必須のコア領域と、それを補助する周辺領域の2つの部分からなることが分かっている。もし、このコア領域と周辺領域を分割して別々の分子として構築し、混合することで再構成できれば、それは周辺領域をアクチベーターとするRNA応答型リボザイムとなる。すなわち、リボザイムの制御因子を増やし、核酸(RNA)にも応答するリボザイムを開発できることになる。

実際に図のようなリボザイムのコア分子とアクチベーターRNAを構築し、再構成実験を行った結果、アクチベーターの濃度に依存してリボザイムの活性が上昇することが確認できた。このことは、リボザイムのコア分子を「ANDゲート」、すなわちグルコサミン6リン酸だけでなく、アクチベーターRNA



をも入力とし、2つの因子が揃ったときのみ活性を発現するRNAスイッチとして用いることができることを意味している。ANDゲートは論理演算回路を構築するための最も重要な要素の一つであるため、このリボザイムを分子パーツとして用いて、さらに複雑なRNA回路を構築できる可能性がある。またそれ以外にも、低分子とRNAの2つの入力を平行して同時に扱えることで、リボザイムの活性を正確に微調整することができるため、分子スイッチを極めて精密に制御することが可能になる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

1) Tecto-GIRz: engineered group I ribozymes the catalytic ability of which can be controlled by self-dimerization., Tanaka, T., Matsumura, S., Furuta, H., Ikawa, Y., *ChemBioChem*, in press (2016), DOI: 10.1002/cbic.201600190, 査読あり

2) Mutational analysis of structural elements in a class-I cyclic di-GMP riboswitch to elucidate its regulatory mechanism., Inuzuka, S., Nishimura, K., Kakizawa, H., Fujita, Y., Furuta, H., Matsumura, S., Ikawa, Y., *The Journal of Biochemistry*, in press (2016), DOI: 10.1093/jb/mvw026, 査読あり

3) Optimization of RNA-based c-di-GMP fluorescent sensors through tuning their structural modules., Inuzuka, S., Matsumura, S., Ikawa, Y., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press (2016), DOI: 10.1016/j.jbiosc.2016.01.011, 査読あり

4) Characterization of an RNA receptor motif that recognizes a GCGA tetraloop., Furukawa, A., Maejima, T., Matsumura, S., Ikawa, Y., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80, 1386-1389 (2016), DOI: 10.1080/09168451.2016.1156483, 査読あり

5) Artificial ligase ribozymes isolated by a “design and selection” strategy., Matsumura, S., Ikawa, Y., *Methods in Molecular Biology (RNA Scaffolds)*, 1316, 113-125 (2015), DOI: 10.1007/978-1-4939-2730-2_10, 査読あり

6) Modulation of group I ribozyme activity by cationic porphyrins., Matsumura, S., Ito, T., Tanaka, T., Furuta, H., Ikawa, Y., *Biology*, 4(2), 251-263 (2015), DOI: 10.3390/biology4020251, 査読あり

[学会発表] (計8件)

1) 代謝物・核酸デュアル応答型自己切断RNAスイッチの開発, 内藤 卓人, 井川 善也, 松村 茂祥, 平成28年度日本生化学会北陸支部第34回大会, 金沢大学宝町キャンパス (石川県金沢市), 2016年5月28日

2) Addressing origins and evolution of life by microfluidics, Matsumura, S., *International Symposium on Frontier Biology and Chemistry 2016*, 富山大学五福キャンパス (富山県富山市), 2016年3月7日

3) Experimental RNA evolution in droplets: How cellularity contributes the early RNA world evolution, Matsumura, S., Coldren, F., Kun, A., Nghe, P., Jossinet, F., Szathmary, E., Griffiths, A., Ryckelynck, M., *Pacificchem 2015, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015*, Sheraton Waikiki (Honolulu, Hawaii, USA), 2015年12月16日

4) 細胞がもたらす生命の創発: 遺伝情報の維持と多様化, 松村 茂祥, *BMB2015, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 ワークショップ「生命への道程: 自己集合・自己組織化による秩序形成と創発」*, 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市), 2015年12月1日

5) 代謝物応答型・自己切断リボザイムのモジュール工学的解析, 内藤 卓人, 井川 善也, 松村 茂祥, 平成27年度日本化学会近畿支部北陸地区講演会と研究発表会, 金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市), 2015年11月27日

6) 細胞構造と群淘汰がもたらす遺伝情報の進化的安定性と多様性, 松村 茂祥, Coldren, F. M., Kun, A., Nghe, P., Jossinet, F., Szathmary, E., Griffiths, A. D., Ryckelynck, M., *第37回日本分子生物学会年会, パシフィック横浜 (神奈川県横浜市)*, 2014年11月25日

7) Evolutionary stability and diversity of genetic information established by cellularity and cell-based selection, Matsumura, S., Coldren, F.,

Kun, A., Nghe, P., Jossinet, F., Szathmary, E., Griffiths, A., Ryckelynck, M., *ISNAC 2014, The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*、北九州国際会議場（福岡県北九州市）、2014年11月6日

8) Empirical investigation of importance of cellularity in the RNA world evolution using droplet-based microfluidics, **Matsumura, S.**, Coldren, F., Kun, A., Nghe, P., Jossinet, F., Szathmary, E., Griffiths, A., Ryckelynck, M., *DNA20, The 20th International Conference on DNA Computing and Molecular Programming*、京都大学医学部芝蘭会館（京都府京都市）、2014年9月25日

〔図書〕（計0件）

なし

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

富山大学 大学院理工学研究部 テニユアト
ラック若手育成部門

<http://www3.u-toyama.ac.jp/ritenure/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 茂祥 (MATSUMURA, Shigeyoshi)

富山大学・大学院理工学研究部（理学）・

助教

研究者番号：40619855

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

Andrew D. Griffiths

教授, ESPCI ParisTech, フランス