

氏名	新井 秀直		
博士の専攻分野の名称	博士 (学術)		
学位記号番号	博理工乙第 213 号		
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当		
学位論文題目	ノロウイルス RNA 複製酵素の特性評価と自然淘汰型 <i>in vitro</i> 進化実験への応用に関する研究		
論文審査委員	委員長	教授	西垣 功一
	委員	名誉教授	伏見 譲
	委員	教授	小林 哲也
	委員	教授	坂井 貴文
	委員	准教授	根本 直人

論文の内容の要旨

進化分子工学ではダーウィン進化を模倣することにより、共重合高分子を自動的に高速進化させ、高機能性分子を得ることが可能である。このような *in vitro* 進化実験は、人為淘汰型と自然淘汰型の二つに分けることができる。自然淘汰型とは比増殖速度を適応度とする進化実験である。RNA の自然淘汰型 *in vitro* 自律進化実験はこれまでは、所与の複製酵素や RNA ポリメラーゼや逆転写酵素を用いて行われてきた。生命の起源関連の合成生物学の次段階では、複製酵素をコードしている遺伝子領域を含んだ RNA の翻訳系を搭載した *in vitro* 進化実験、すなわち複製酵素蛋白質と RNA の *in vitro* 共進化実験が期待され、試みが始まっている。

四方らの試みは、これまでの伝統に従い、Q β ファージの RNA レプリカーゼと細胞型対応付けを用いている。我々は、RNA 等温増幅法と *in vitro* virus 法を用いた、RNA—複製酵素共進化実験の実現を目指している。しかしこの場合、Q β RNA レプリカーゼは不向きであると考えられたので、調査研究の結果、ノロウイルス RNA レプリカーゼ (NV3D^{pol}) を対象酵素の候補に挙げた。NV3D^{pol} は分子量 56kDa の単一ポリペプチド鎖で、単量体にて RNA 複製活性を持つことが報告されているからである。本研究第一部では酵素 NV3D^{pol} の *in vitro* 特性評価を行った。酵素試料は、*in vitro* virus への応用を考え、無細胞蛋白質合成系を用いて合成した。調製した NV3D^{pol} と 50 塩基程度の一本鎖 RNA を等モル量混合し、3mM Mn²⁺ 存在下で 30°C での等温増幅反応を行った。本酵素の *in vitro* 特性評価に関する複数の先行研究では、その RNA 複製の様式にはプライマー依存型、プライマー非依存型、バックプライミング型等があり、RNA 複製の特性評価の結果は互いに一致していなかった。本研究ではそれらの矛盾点を説明し、NV3D^{pol} による RNA 複製は鋳型となる RNA 鎖の 3' 末端配列に依存して異なることを示した。NV3D^{pol} は一本鎖 RNA を鋳型にして、プライマー非依存的に二本鎖 RNA を等温増幅し、特に、鋳型一本鎖 RNA の 3' 末端が C ストレッチであるとき、60 分で 54 倍の増幅を示すほど複製効率が高くなった。また、3' 末端の数塩基で小さなステムループ構造を形成する時、NV3D^{pol} はこれより始まる複製活性を示し、複製産物はヘアピン RNA となった。しかし、プライマー依存的な RNA 複製活性はこれらに比べ低かった。NV3D^{pol} による RNA 複製の伸長段に

において、NV3D^{pol}は高い複製忠実度（20000分の1以下のミスコピー率）を示し、また、プロセッシビティが高く数百塩基長のRNA複製もRNAより脱落することなく行うことができることを確認した。複製終結段においては、NV3D^{pol}がターミナルヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性を示し、複製鎖の3'末端に主にシチジンを数塩基付加することを確認した。

本研究第2部では、このNV3D^{pol}の自然淘汰型 *in vitro* 進化実験への応用可能性を検証するとともに、本酵素の特性の新たな側面を明らかにした。3'末端の4塩基をランダム配列にした50塩基長のRNAライブラリーを、NV3D^{pol}を用いて試験管内等温増幅反応させた。これを継代植え継ぎすることにより、二本鎖RNAの比増殖速度を適応度としたNV3D^{pol}のRNA複製における鋳型RNAの最適3'末端配列の *in vitro* 進化実験を行った。1.4倍希釈120分、17ラウンドの植え継ぎ操作の結果、4次元RNA配列空間上にて主峰と副峰からなるPopulation Landscapeをなす最適3'末端配列を得た。主峰は5'CAAC3'を中心とする。これが最適配列であると、第一部のCストレッチの複製速度より遅く一見矛盾する。第一部の増幅実験は一本鎖鋳型から出発する回分反応であり、酵素が鋳型重合終結段でプラス鎖とマイナス鎖を飛び移るシャトル型複製を行っているのに対し、第2部の植え継ぎ実験は、2本鎖末端と遊離酵素の2体反応による複製と考えれば矛盾が解決する。酵素が2本鎖末端の鋳型鎖に初めて取りつくには塩基対合のブリージングが必要であり、CAACに比べCストレッチは不利である。

以上の結果から、NV3D^{pol}を自然淘汰型 *in vitro* 進化実験へ応用するときの鋳型RNAの両末端配列を提案できた。*in vitro* virus法を応用した自律進化実験系は、NV3D^{pol}を提示した *in vitro* virusコンストラクトを工夫することで、実現可能であると考えられる。

論文の審査結果の要旨

学位論文審査委員会は、平成 26 年 1 月 31 日（金）に工学部機能材料工学科会議室において開催された。学位論文の審査結果の概要は以下のとおりである。

まず、「ノロウイルス RNA 複製酵素の特性評価と自然淘汰型 *in vitro* 進化実験への応用に関する研究」と題した研究に取り組む背景として以下の事が記述されていた。すなわち、

進化分子工学ではダーウィン進化を模倣することにより、共重合高分子を自動的に高速進化させ、高機能性分子を得ることが可能である。このような *in vitro* 進化実験は、人為淘汰型と自然淘汰型の二つに分けることができる。自然淘汰型とは比増殖速度を適応度とする進化実験である。RNA の自然淘汰型 *in vitro* 自律進化実験はこれまでは、所与の複製酵素や RNA ポリメラーゼや逆転写酵素を用いて行われてきた。生命の起源関連の合成生物学の次段階では、複製酵素をコードしている遺伝子領域を含んだ RNA の翻訳系を搭載した *in vitro* 進化実験、すなわち複製酵素蛋白質と RNA の *in vitro* 共進化実験が期待され、試みが始まっている。申請者は、RNA 等温増幅法と *in vitro* virus (IVV) 法を用いた、RNA—複製酵素共進化実験の実現を目指しているが、これまでの伝統に従った Q β RNA レプリカーゼは IVV 法への応用は不向きであると考えた。調査研究の結果、ノロウイルス RNA レプリカーゼ (NV3D^{pol}) を対象酵素の候補に挙げており、以下に示される 2 つのサブテーマ、すなわち、本酵素の *in vitro* 特性評価と *in vitro* 自然淘汰型進化実験への応用可能性を検証している。

[1] NV3D^{pol} の *in vitro* 特性評価

NV3D^{pol} は分子量 56kDa の単一ポリペプチド鎖で、単量体にて RNA 複製活性を持つことが複数報告されているが、それら報告の結果は一致してはいないものであった。酵素試料は、IVV への応用を考え、無細胞蛋白質合成系を用いて合成した。調製した NV3D^{pol} と鋳型一本鎖 RNA の等温増幅反応を行った。本酵素の *in vitro* 特性評価に関しての複数の先行研究において、その RNA 複製の様式は様々なものが示唆されており、プライマー依存型、プライマー非依存型、バックプライミング型等が挙げられていたが、申請者はそれらの矛盾点を説明し、NV3D^{pol} による RNA 複製は鋳型となる RNA 鎖の 3' 末端配列に依存して異なることを示した。NV3D^{pol} は一本鎖 RNA を鋳型にして、プライマー非依存的に二本鎖 RNA を等温増幅した。特に鋳型一本鎖 RNA の 3' 末端が C ストレッチの時、60 分で 54 倍の増幅を示すほどの高い複製効率であった。また、3' 末端の数塩基で小さなステムループ構造を形成する時、NV3D^{pol} はこれより始まる複製活性を示し、複製産物はヘアピン RNA となった。これは先行研究のひとつにて指摘されるバックプライミング型に一致する。しかし、プライマー依存的な RNA 複製活性はこれらに比べ低かった。NV3D^{pol} による RNA 複製の伸長段において、NV3D^{pol} は高い複製忠実度を示し、また、プロセスシビティが高く数百塩基長の RNA 複製も RNA より脱落することなく行うことができることを確認した。複製終結段においては、NV3D^{pol} がターミナルヌクレオチジルトランスフェラーゼ活性を示し、複製鎖の 3' 末端に主にシチジンを数塩基付加することを確認した。

[2] NV3D^{pol} の自然淘汰型 *in vitro* 進化実験への応用可能性検証

3' 末端の 4 塩基をランダム配列にした RNA ライブラリーを、NV3D^{pol} を用いて試験管内等温増幅反応させた。これを継代植え継ぎすることにより、二本鎖 RNA の比増殖速度を適応度とした NV3D^{pol} の RNA 複製における鋳型 RNA の最適 3' 末端配列の *in vitro* 進化実験を行った。1.4 倍希釈 120 分、17 ラウンドの植え継ぎ操作の結果、四次元 RNA 配列空間上にて主峰と副峰からなる Population Landscape をなす最適 3'

末端配列を得、主峰は 5' CAAC3' を中心とするものであった。この *in vitro* 進化実験は適切に行うことができたと考えられる。申請者は、C ストレッチを持つ配列が最適であると予測していた。しかし淘汰された 5' CAAC3' が最適配列であると、C ストレッチ配列の複製速度より遅く一見矛盾する。第一部の増幅実験は一本鎖鋳型から出発する回分反応であり、酵素が鋳型重合終結段でプラス鎖とマイナス鎖を飛び移るシャトル型複製を行っているのに対し、第二部の植え継ぎ実験は二本鎖末端と遊離酵素の二体反応による複製と考えることで説明ができ、ここで申請者はシャトル型という RNA 複製様式における新たな知見を提示している。

以上の結果から、NV3D^{pol} を自然淘汰型 *in vitro* 進化実験へ応用するときの鋳型 RNA の両末端配列を提案した。IVV 法を応用した自律進化実験系は、NV3D^{pol} を提示した IVV コンストラクトを工夫することで、実現可能であると考えられ、また本酵素は、Q β RNA レプリカーゼを用いた場合に採用されていた細胞型対応付け戦略の *in vitro* 進化実験にも用いることが可能と考えられることなどを議論した。

以上のことから、本学位論文はノロウイルス RNA ポリメラーゼを用いて、ゲノム自律進化系を構築するのに基礎となる研究と実践に際する洞察を与えたことにより、新学問分野を切り開いたと判定された。