

《総説マイレビュー》

進化リアクターと塩基配列空間上の淘汰値曲面

Evolution reactors and a selective value landscape on the base sequence space

工学部環境化学工学科 伏見 譲 西垣 功一
Department of Environmental Chemistry Yuzuru HUSIMI Koichi NISHIGAKI
木下 保則
Yasunori KINOSHITA

1. はじめに： ダーウィン進化と生体高分子機能の最適化

1859年、ダーウィンは生物「種の起源」が、自然淘汰の原理による漸進的進化によって説明できることを示した。⁽¹⁾現代の生物物理学的観点からは、ダーウィン進化は物質系の自己組織化の機構の一つとみなすことができ、⁽²⁾その意義は次の2点にまとめられる：

(1)生物のもつ合目的的性質を因果論で説明した。

(2)配列空間の高速自動探索法を概念的に示した。ここでは(2)を説明する。生命現象の基本過程は生体高分子の特異的相互作用である。生体高分子は、特にタンパク質やRNAの一部は、それぞれ特異的な立体構造をもち、それに基づく特定の機能を果たしている。また、生体高分子は、特にDNAやRNAの一部は、分子機械の設計書と、分子機械の時間空間的組織化に関する指令とが書きこまれており、情報高分子と呼ばれる。この情報は4種の文字（化学物質としては4種の塩基）を用いて書かれており、この文字列を塩基配列と呼ぶ。一つの分子機械の設計書は、小さなものでは、長さ300程度の塩基配列からなる。長さ ν の塩基配列の種類は 4^ν である。このことを、 ν 次元塩基配列空間には、 4^ν 個の点があるという。分子機械側から言えば、この中に、ある環境条件の下で最適化された分子機械の設計書を表す点が存在する。これを探索するのに全くのランダム探索では 4^ν 回の試行を要するが、自然淘汰の原理が理想的に働いたときは、文字列中の一文字一文字を順次決定していく漸進的最適化ができるので、 $4 \times \nu$ 回の試行で済む。 $4^{300} \approx 10^{180}$ で、宇宙の全原子数 10^{80} と比較すれば、ダーウィンの原理の偉大なことがわかる。

このことは、 ν 次元塩基配列空間の2点間最長距離が ν にすぎないことの反映である。

そこで、実験室内で自然淘汰の原理を有効に働かせることによる生体高分子機能の最適化、すなわち、超高速分子進化はいかにして可能か、という研究課題が生ずる。この機能性高分子「種の起源」を実現する進化分子工学のための、あるいはその可能性を検討するための実験装置を進化リアクターと呼ぶ。^(3,4)我々が開発したバクテリオファージの連続培養法セルスタット^(5,6,9)は進化リアクターの一種であり、それによる塩基配列空間上の淘汰値曲面の研究が重要な役割を果たすことを以下に示す。本誌の性格上、測定論的側面を主に述べる。

2. 進化リアクターの原理

できるだけ単純で制御可能な高速進化する系を作るために、まず、自然淘汰が起こる条件を求めよう。⁽⁷⁾答は、通常考えられている生命の条件と同じで、a.開放系であること、b.自己増殖系であること、である。制御可能な開放系を作る簡単な方法は、フローリアクター、すなわち、連続培養法を採用することである。この他にも、化学反応進行波管を使う方法もある。⁽⁸⁾自己増殖系で簡単なものは、例えば、 $Q\beta$ レプリカーゼを用いるRNA分子増殖系や、PCR法から派生した種々の核酸分子増殖系^(16,17)があるが、われわれは大腸菌のウィルスであるバクテリオファージFf族 (fd, M13, f1, δ A etc) および $Q\beta$ を採用した。

この系がさらに、c.突然変異性をもてば、系はダーウィン進化を始める。⁽⁷⁾淘汰に先立って無方向な突然変異体スペクトルが存在することがダーウィニズムの基本である。そこでは淘汰が情報獲

得過程である。(突然変異過程にDNAの情報獲得があるとする説にラマルキズムがある。タンパク質工学で部位指定突然変異誘発を行うのは、いわば、人工的なラマルク進化といえる。) ここでいう突然変異とは本来、組換えも含む核酸情報の変化一般をさすが、まずは点突然変異に限定する。突然変異は連続培養中に生じさせてもよいが、in vitroで核酸分子にランダム突然変異を誘発したほうがよい。

分子進化の速度を決めるパラメータを列挙し、高速化のための戦略を考えよう。

- (1) サイズパラメータ (①核酸分子の長さ ν 、②集団の大きさ N)
- (2) 速度パラメータ (③突然変異率 μ 、④フローリアクター希釈率 D 、⑤配列空間上の淘汰値曲面の地形 σ 、⑥ μ 、 σ の揺らぎの緩和時間)
- (3) 初期条件

Eigenの分子進化の擬種理論によると、生物種が安定に存在するための条件として⁽⁷⁾

$$\nu \cdot \mu \leq \log \sigma$$

という関係がえられる。左辺は1世代毎に散逸する情報量、右辺は1世代毎に獲得される情報量にほぼ等しいので、この関係は理解し易い。 $\log \sigma$ は ν にはあまり依存しないから、 ν が小であるほど、 μ は大きくできる。例えば、大腸菌のゲノム全体を進化の対象とする場合と、 $\nu = 300$ の分子機械の設計書のみをバクテリオファージDNAに挿入したものを進化の対象とする場合とを比較する。①から④までのパラメータの値を評価すると、後者は前者に比し、突然変異体の収集効率が 10^7 倍以上であることがわかる。よって、⑥を無視すると、超高速分子進化を実現するために残る問題は、⑤の地形の問題である。

3. 塩基配列空間上の淘汰値曲面の地形

配列空間の i 番目の点(その配列をもつ突然変異体)の淘汰値 W_i とは、生存競争における強さを表すパラメータである。通常の細菌の連続培養の場合は、これは比増殖速度に等しい、すなわち、希釈率に等しい。 $Q\beta$ のような毒性ファージの場

合は $\log \beta_i / \tau_i$ に等しい。ここで、 τ_i は潜伏期、 β_i はバーストサイズである。ファージのライフサイクルを、化学反応モデルで表すと、 W はその反応速度定数の関数として表される。⁽⁹⁻¹⁴⁾分泌型Ffファージの場合も少し複雑だが、同様である。突然変異体と野生株との淘汰値の相対差を淘汰係数 s_i という。

W ないし s の地形が δ 関数のようだと、最適化は全くの偶然に頼るしかなく、進化分子工学は成り立たない。あるいは、スピニングラスで出てくるような凸凹した地形だと、局所的極値で立ち往生してしまうかも知れない(理論的には空間の次元数が増せば抜け出すことができる)。最適値の周りに富士山状に広がった地形であれば、漸進的高速進化が可能となる。また、突然変異率が大きな場合、地形の様子によっては、淘汰値自体ではなく、「自由淘汰値」を評価関数にする必要があることがわかっている。⁽¹⁵⁾

ダーウィン進化論が概念的に示した配列空間の高速自動探索法が具体化可能かどうかは、現実の生体高分子の物性に基づく現実の地形がどうなっているかに依存するわけである。これは実際に測定してみなければわからない。 W, s をはじめ、一般に、反応速度定数を測定するときは、環境条件がよく制御できる実験系を作る必要がある。

4. セルスタット⁽⁹⁾

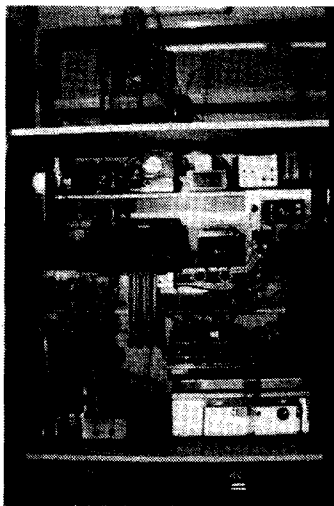
そこで、われわれはバクテリオファージの連続培養法セルスタットを開発し、 s の測定を行ってきた。当時、ウィルスの連続培養に成功した人は誰もいなかった。それは、宿主細胞との生態学的相互作用による不安定性のためであった。たとえば、ウィルス耐性細胞が出現してくるのである。セルスタットでは、上流で指数増殖期の宿主菌をタービドスタット培養し、この生理状態一定の宿主菌の流れの中でウィルスを培養する。このとき、セルスタットの希釈率をタービドスタットの希釈率により十分大きくしておく。すると、セルスタットに流入した宿主菌は細胞分裂する前に流出してしまう。セルスタットでは宿主菌は自己増殖

系の条件を欠くから、自然淘汰は起こらず、ウィルスの自然淘汰のみが観察される。プラスミドを用いたときはこのようなトリックは使えない。また、プラスミドを担う細菌の連続培養によく使われるケモスタットは、細菌の生理状態が不安定であり、初めて s の測定をやる系としては不向きである。

ケモスタットが安定に運転できる理由が、栄養制限化学物質濃度と細菌個体群密度との間の、負のフィードバック機構に基づくように、セルスタットが安定に運転できる理由は、未感染細胞個体群密度とウィルス個体群密度との間の、負のフィードバック機構による。そのため、ケモスタットでは栄養制限化学物質濃度が一定が保たれるように、セルスタットでは未感染細胞個体群密度が一定に保たれる。これが両者の語源である。厳密には次のようになる。ウィルス・宿主相互作用が次の条件を満たすとする：

- (1) 遊離ウィルスは未感染細胞とのみ反応する。
- (2) その後の娘ウィルス生産反応は感染細胞の一体反応である。

すると、連続培養定常状態における未感染細胞の個体群密度は、流入流中の宿主の個体群密度 h_0 とその比増殖速度には依存せず、希釈率と反応速度

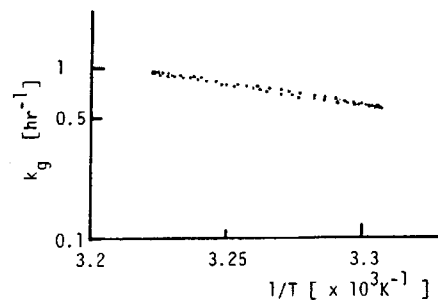


(図1)

A cellstat. The control-computer block is not shown.

定数だけに依存することが証明できる。⁽⁹⁾(1)の条件が満たされないケースでも、セルスタット性が広い h_0 の範囲でほぼ成立することがわかっている。

図1はドイツのマックスプランク生物物理化学研究所で作ったセルスタット2号機である。パソコン(IBM PC/XT)に汎用データ入出力ボード(Burr-Brown PCI-2000)を搭載し、データ集録と制御を行っている。⁽¹⁰⁾ 埼大の1号機はミニコン(YHP 2108A)に自家製のインターフェースボードを多数搭載したラボ・オートメーションの草分け的存在であった。セルスタットの技術的問題は、安定したタービドスタットの運転と、細菌の壁成長やフロック形成の防止にある。前者は濁度計セル表面の壁成長防止が重要で、タイムシェアリング法⁽⁵⁾と気泡通過法⁽¹⁰⁾が開発されている。また、タービドスタット培養槽をロータリー・フェルメンターとすることはフロック形成/壁成長低減に有効であった。壁成長防止のため機械的、化学的、生物的方法を検討したが、表面処理のような化学的方法は成功せず、気液界面通過のような機械的方法はある程度有効であり、生物的方法が最も有効であった。大腸菌の細胞吸着の原因となる細胞表面小器官は1線毛であるが、その遺伝子の発現をフェーズロックして止めた突然変異体X4-4株



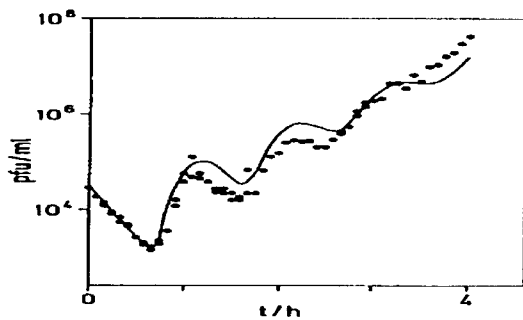
(図2)

Temperature dependence of the specific growth rate (in the exponential growth phase) of *E. coli* S26 in Davis minimal medium with aeration.

Abscissa: Inverse of absolute temperature. Ordinate: Specific growth rate or Dilution rate of the turbidostat (in logarithmic scale)

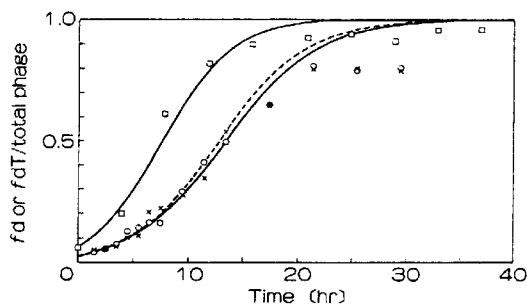
がドイツで作られ、セルスタットの壁成長が抑えられることが示された。⁽¹¹⁾

タービドスタットは零位法であり、フィードバック量が系の観測量となる。すなわち、コンピュータが指令を与えた希釈率データが、即、大腸菌の比増殖速度を与える。タービドスタットの温度を掃引しつつ、希釈率を記録すれば、大腸菌増殖の温度特性が測定できる(図2)。⁽¹²⁾ 23°C - 39°Cでは増殖速度変化が温度変化に時間遅れ無



(図3)

Infection profile in cellstat. *E. coli* concentration was maintained at 4.2×10^8 per ml during the run; the flow rate was such that the dilution rate for the reactor was $1.6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$; the initial concentration of Q β phage was 3×10^4 per ml.



(図4)

Competition between fd and fl in a cellstat. Ordinate: fraction of fd phage population in total population. Abscissa: time after infection. At time 0, a fd:fl = 1:19 mixed phage population was put into cellstat vessel. \square fl vs. fd wild type, $h_0 = 2.4 \times 10^8$ CFU/ml, $D_c = 2.3 \text{ h}^{-1}$; \circ fl vs. fd mutant (fd T), $h_0 = 2.1 \times 10^8$ CFU/ml, $D_c = 3.0 \text{ h}^{-1}$; \times , same as \circ except $D_c = 3.2 \text{ h}^{-1}$.

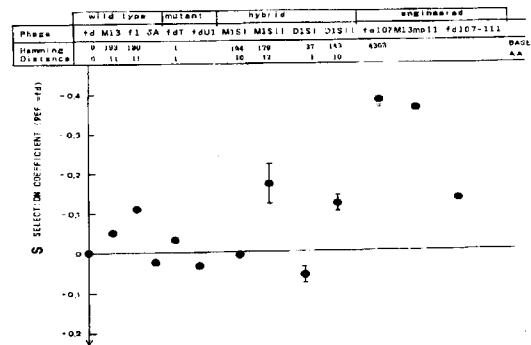
し(分解能3分)に追従することもわかった。

セルスタットでファージを純粋連続培養すると、ファージ増殖は自己触媒反応であるから、非線形非平衡化学反応の特徴(振動反応)が見られる場合がある(図3)。⁽¹³⁾

5. ファージfdの周りの淘汰係数曲面

Wを絶対測定して、その差からsを求めるのは精度が悪い。差動測定することによって直接sを求める方法は現在2つ成功している:⁽⁹⁾ a. 2種競争法、b. 生物学的緩和法。a. は初期に19:1のモル比で2種のファージを投入したとき、少数派が大きな淘汰値を持っていれば、 τ 時間後に個体群置換を起こす(図4)。 τ はsDに逆比例する。ここに連続培養プラス差動法の測定論上の長所が表現されている。つまり、長時間測定すれば、それだけ微小なsが測定できる。

b. は、人工的に平衡からずらすと、系が平衡状態に緩和して行く過程が観察されるが、この緩和曲線の解析からその緩和過程を支配している速度定数がえられるという一般原理に基づく。われわれの場合は、組換えDNA技術によって作られたキメラファージの塩基配列が、平衡からずらされた状態であり、突然変異率と淘汰値が速度定数



(図5)

Selection coefficient of various closely related phages to fd phage.

Hamming distance is the number of point mutations from the fd sequence.

M13* and DIS* are hybrid phages between M13 and fl and between fd and fl, respectively.

である。⁽⁵⁾

一方、現在開発中のc.ランダム突然変異体集団淘汰法は、連続培養初期の突然変異体のs分布の関数形が、淘汰のモード、すなわち、2状態置換か、逐次置換か、に明かな影響を与えるという理論に立脚している。

現在までのデータを図5にまとめた。⁽⁹⁾詳細は割愛するが、漸進的進化の可能性を示唆するデータになっている。

6. おわりに： 進化分子工学の展望

これまでの研究で進化分子工学の科学的可能性は示されたといえる。さらに、RNA分子が遺伝子であると同時に触媒(リボザイム)にもなりうることに着目し、それ故、簡単な進化分子工学的手法で、その分子機能の潜在能力を開発した結果が最近出始めた。^(16, 17)この結果が出るということは、生体高分子の物性が、淘汰値曲面の地形として、ダーウィン進化に都合のよいものを与えているのだろうと推測させる。われわれが次にやるべきことは、フェージを用いた進化リアクタープロセス全体を完成させて、DNA/蛋白系の進化分子工学の技術的可能性を実証することである。⁽¹⁸⁾

特定遺伝子をフェージDNAからカセットとして切り出すためには、PCR法が有効である。培養液(中のキャリアーセル)から直接カセットが出来ることがわかった。カセット化と同時にランダム突然変異をかける方法を検討している。一方、野生Ff-ssDNAをカセットに対するドライブとする方法として、ユニバーサル制限酵素/固定化DNAビーズ法を開発した。組換えDNAをフェージ粒子にするためには、常法である大腸菌へのエレクトロポレーションを用いる。突然変異体集団の分析には変性ゲル電気泳動法を用いる。

上述のセルスタットは自然淘汰型進化リアクターといえるが、淘汰の環境条件を多様にするための改造を行っている。また、人為淘汰型進化リアクター、すなわち、ウィルスのもつ評価関数ではなく、実験者のもつ評価関数で、微量多種クローンを並列スクリーニングするシステムも開発

中である。

本研究は埼玉大における故木原拓助手、斉藤由明技官を始め、多くの大学院生、卒業研究生の協力と、マックスプランク生物物理化学研究所における博士研究員、大学院生の協力の下に行われた。

文 献

- 1) C. Darwin, "The origin of species"(John Murray, London, 1859) 邦訳、岩波文庫
- 2) 伏見讓、固体物理, 22, 62-69 (1987)
- 3) M. Eigen and W. Gardiner, Pure & Appl. Chem., 56, 967-978 (1984)
- 4) 伏見讓、現代化学, 204, 38-44 (1988)
- 5) Y. Husimi, K. Nishigaki, Y. Kinoshita and T. Tanaka, Rev. Sci. Instrum., 53, 517-522 (1982)
- 6) 伏見讓、西垣功一、木下保則、田中豊助、遺伝, 35, 41-48 (1981)
- 7) M. Eigen, Naturwiss., 58, 465-523(1971)
- 8) G. Bauer, J. McCaskill and H. Otten, Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 7937-7941 (1989)
- 9) Y. Husimi, Adv. Biophys., 25, 1-43(1989)
- 10) Y. Husimi and H. Keweloh, Rev. Sci. Instrum., 58, 1109-1111 (1987)
- 11) A. Schwienhorst, Personal communication.
- 12) 伏見讓、西垣功一、木下保則、田中豊助、生物物理, 20, 379-382 (1980)
- 13) C. Biebricher, M. Eigen, W. Gardiner, Y. Husimi, H. Keweloh, and A. Obst, "Complex Chemical Reaction Systems"(Springer Verlag, 1987) pp.17-38
- 14) 伏見讓、木原拓、R&Dコンピューティング要覧、(サイエンスフォーラム, 1988) pp.259-261
- 15) 伏見讓、Viva Origino, 16, 135-141 (1988)
- 16) G. F. Joyce, Nature 344, 467-468 (1990)
- 17) A. D. Ellington and J. W. Szostak, Nature 346, 818-822 (1990)
- 18) 伏見讓、平成元年度文部省科学研究費補助金(一般研究A)成果報告書 # 62420055(1990)