



はしがき

進化分子工学とは、実験室内に単純化された「進化する分子系」を構築し、分子レベルの生体機能の創出機構を明らかにすることを通して、生体高分子の機能の改良・新規開発のための「適応的分子設計法」を提供しようとする学問領域である。生物進化の過程で獲得された分子系の歴史的実像も「進化する分子系」であるが、これにヒントを得て構築された単純化人工進化系は、繰り返し実験が可能な超高速分子進化によって、分子が進化する物理化学的機構を解明するための道具立てとなる。

PCR法をバネとして1990年に立ち上がって以来、技術の集中的集積が行われた結果、人工進化実験系による適応的分子設計(進化分子工学)は、機能性高分子の有効な分子設計法としての地位を確保しつつある。進化分子工学は一方では、生命の起源の実験科学的研究に突破口を与えた。RNAの潜在能力を開示した様々なリボザイムの創出は、RNAワールドに現実味を与えた。本研究班でも進化分子工学における遺伝子型・表現型対応付けのウイルス的戦略の考察から得られた翻訳系の創出機構のモデルが提案された。

このように、広範な応用が期待される分野であるが、アカデミックには、核酸や蛋白質の配列空間中を高分子集団が「適応歩行」する機構の研究としてこの分野を特徴づけることができる。しかし、長さ134bpのDNAの配列の総数が、宇宙の全原子数に匹敵することからもわかるように、高分子の配列空間は巨大であるため、この適応歩行の基礎研究を進めておくことが、その巨大さに翻弄されないために重要となる。この研究班ではこの基礎研究として、配列空間上の適応度の地形の問題と、階層構造的適応歩行の問題を中心に研究した。前者では例えば、セクシュアルPCRがなぜ故に効率が良いかの説明が得られる。後者では例えば、モジュールシャプリングの有効性が示された。

一方、天然の進化では、環境は生物と共進化しているし、構成要素間には網目のような相互作用がある。これは極めて複雑な系であり、それをモデル化し解析しうる進化実験系ができれば、進化システム工学と呼ぶにふさわしい。単純な進化分子工学では、実験者が外部環境を与えるので、Directed Evolution が起こるのだが、この種の系では、Undirected auto

nomous evolution が起こりうる。これは実験進化学における、進化分子工学の次の発展段階であるが、本研究班では、このような研究も行った。

この報告書で、本研究班の平成6～8年度の3年間の研究成果を報告する。欧米に比し遅れているといわれているこの分野の活性化に貢献できれば幸いである。

なお、ファージ提示法の試薬キットが遺伝子工学用として市販されているからといって、この分野を「遺伝子工学上の実験技術に係わる分野」と誤解されないようお願いしたい。遺伝子工学は、分子生物学のセントラルドグマという機械論的デコーディング過程に基礎を置いて成功した技術だが、進化分子工学はダーウィン進化機構という散逸構造論的エンコーディング過程に基礎を置いている。遺伝子工学は操作中に余計な情報を生み出さないという信頼の元に成り立つ技術であり、進化分子工学は操作中に自動的に情報を生み出すことを期待する。一言でいえば、進化学は遺伝学を基礎とするが、遺伝学とは異質な学問だということである。

本研究班は、研究会活動として次のようなものを行った：

- 平成7年3月3日 「第2回進化分子工学シンポジウム」を主催
於：日本化学会化学会館ホール(参加者約100名)
- 平成7年9月2-3日 合宿研究会開催(班員と研究協力者)
於：KKR稲取
- 平成8年11月7日 第32回日本生物物理学会年会シンポジウム
「人工進化—進化分子工学の発展と抗体工学の新展開」
を共催
於：工業技術院生命工学工業技術研究所(参加者約60名)
- 平成9年1月8日 「第3回進化分子工学シンポジウム」を主催
於：日本化学会化学会館ホール(参加者約100名)

研究組織

研究代表者:	伏見 譲	(埼玉大学・工学部・教授)
研究分担者:	卜部 格	(大阪大学大学院・工学研究科・教授)
研究分担者:	大島泰郎	(東京薬科大学・生命科学部・教授)
研究分担者:	大西耕二	(新潟大学・理学部・助教授)
研究分担者:	金子邦彦	(東京大学大学院・総合文化研究科・教授)
研究分担者:	郷 通子	(名古屋大学大学院・理学研究科・教授)
研究分担者:	森島 績	(京都大学大学院・工学研究科・教授)
研究分担者:	柳川弘志	(三菱化学・生命科学研究所・室長)

研究経費

平成6年度	6,000千円
平成7年度	5,100千円
平成8年度	2,800千円
計	13,900千円

目 次

はじめに	1
研究組織	3
研究経費	3
目次	4
研究発表	5
研究成果	18
序論	伏見 譲 18
配列空間上の適応度地形と適応歩行:理想から実在へ	伏見 譲 22
ウイルス型対応付けの有効性	伏見 譲 26
進化分子工学を利用したタンパク質の安定化	大島 泰郎 28
モジュールの組み合わせによる蛋白質設計	郷 通子 32
モジュール置換グロビン蛋白質の分子設計	森島 績 36
単位領域の組み合わせによる新規タンパク質の創製	柳川弘志 41
ポリtRNA構造から見た蛋白質構造の構築原理	大西耕二 45
適者生存 vs 競争的共存:大腸菌をもちいた実験進化学	四方哲也、卜部 格 53
細胞分化と社会形成:多様化から再帰的ルール形成へ	金子邦彦 58

研究発表

(1) 学会誌等

Aita, T., Husimi, Y., Period Dependent Selection in Continuous Culture of Viruses in a Periodic Environment, *J. Theor. Biol.*, 168, 281-289, (1994).

Nemoto, N., Husimi, Y., A Model of the Virus-type Strategy in the Early Stage of Encoded Molecular Evolution, *J. Theor. Biol.*, 176, 67-77 (1995).

Aita, T., Husimi, Y., Fitness Spectrum among Random Mutants on Mt. Fuji-type Fitness Landscape, *J. Theor. Biol.* 182, 469-485, (1996).

Kinoshita, Y., Nishigaki, K., Husimi, Y., Strand Ligation in a Double-stranded DNA by T4 RNA Ligase, *Chemistry Letters*, 1996, 797-798, (1996).

Aita, T., Husimi, Y., Fitness Landscape for a Multi-step reaction system, *J. Theor. Biol.*, (1997) (in press)

Aita, T., Husimi, Y., Adaptive Walk on the Mt. Fuji-type Fitness Landscape, *J. Theor. Biol.*, (submitted).

Sakurai, T., Yamamoto, Y., Husimi, Y., Kinetic properties of enzymatic reaction of inorganic pyrophosphatase as revealed by micro ISFET pH sensor, to be submitted.

Yamamoto, Y., Suzuki, M., Husimi, Y., Long-lived Self-Sustained Sequence Replication (3SR) using SP6 RNA Polymerase, to be submitted.

Miho AOSHIMA and Tairo OSHIMA: Stabilization of *Escherichia coli* isopropylmalate dehydrogenase by single amino acid substitution. *Protein Eng.*, 10(2), in press (1997)

Toshiro IWASAKI, Takeo IMAI, Akio URUSHIYAMA, and Tairo OSHIMA : Redox-linked Ionization of Sulredoxin, an Archaeal Riske-type [2Fe-2S] Protein from *Sulfolobus* sp. Strain 7. *J. Biol. Chem.*, 271, 27659-27663 (1996)

Toshiharu SUZUKI, Yutaka INOKI, Akihiko YAMAGISHI, Toshio IWASAKI, Takayoshi WAKAGI, and Tairo OSHIMA : Molecular and Phylogenetic Characterization of Isopropylmalate Dehydrogenase of a Thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7. *J. Bacteriol.*, in press (1997)

Takuro YAOI, Yoko HAYASHI-IWASAKI, and Tairo OSHIMA : Electrostatic interaction between two domains of isocitrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* is important for the catalytic function and protein stability. *FEBS Letters*, in press

Miho AOSHIMA, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : Cloning and sequencing of a gene encoding 16S ribosomal RNA from a novel hyperthermophilic archaeobacterium NC12. *Gene*, in press (1997)

Toshiro IWASAKI and Tairo OSHIMA : Role of cytochrome b562 in the archaeal aerobic respiratory chain of *Sulfolobus* sp. strain 7. *FEMS Microbiol. Letters*, 144, 259-266 (1996)

Chikahiro NAGATA, Hideaki MORIYAMA, Nobuo TANAKA, Masayoshi NAKASAKO, Masaki YAMAMOTO, Tatsuo UEKI, and Tairo OSHIMA : Cryocrystallography of 3-Isopropylmalate Dehydrogenase from *Thermus thermophilus* and its Chimeric enzyme. *Acta Cryst.*, D52, 623-630 (1996)

Tomomi FUJII, Yasuo HATA, Takayoshi WAKAGI, Nobuo TANAKA, and Tairo OSHIMA : Novel zinc-binding centre in thermoacidophilic archaeal ferredoxins. *Nature Str. Biol.*, 3[10], 834-837 (1996)

Miho AOSHIMA, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : Eubacteria-type isocitrate dehydrogenase from an archaeon: Cloning, sequencing, and expression of a gene encoding isocitrate dehydrogenase from a hyperthermophile archaeobacterium, *Caldococcus noboribetus*. *Biochem. J.*, 119[5], 1014-1018 (1996)

Qian ZHANG, Toshio IWASAKI, Takayoshi WAKAGI, and Tairo OSHIMA : 2-Oxoacid:ferredoxin oxidoreductase from the thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. *J. Biochem.*, 120[3], 587-599 (1996)

Takayoshi WAKAGI, Tomomi FUJII, and Tairo OSHIMA : Molecular cloning, sequencing, and heterologous expression of a novel zinc-containing ferredoxin gene from a thermoacidophilic archaeon, *Sulfolobus* sp. strain 7. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 225[2], 489-493 (1996)

Akihiko YAMAGISHI, Tomoaki TANIMOTO, Toshiharu SUZUKI, and Tairo OSHIMA : Primidine biosynthesis genes (*pyrE* and *pyrF*) of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62[6], 2191-2194 (1996)

Takuro YAOI, Kentaro MIYAZAKI, Tairo OSHIMA, Yutaka KOMUKAI, and Michiko GO : Conversion of the coenzyme specificity of isocitrate dehydrogenase by module replacement. *J. Biochem.*, 119[5], 1014-1018 (1996)

Akihiro Okamoto, Ryuichi Kato, Ryoji Masui, Akihiko Yamagishi, Tairo Oshima, and Seiki Kuramitsu : An Aspartate Aminotransferase from an Extremely Thermophilic Bacterium, *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.*, 119[1], 135-144 (1996)

Yoko HAYASHI-IWASAKI, Koishi NUMATA, Akihiko YAMAGISHI, Katsuhide YUTANI, Masahiro SAKURAI, Nobuo TANAKA, and Tairo OSHIMA : A Stable Intermediate in the Thermal Unfolding Process of a Chimeric 3-Isopropylmalate Dehydrogenase Between a Thermophilic and a Mesophilic Enzymes. *Protein Sci.*, 5, 511-516 (1996)

Takashi KOTSUKA, Satoshi AKANUMA, Masaaki TOMURO, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : Further Stabilization of 3-Isopropylmalate Dehydrogenase of an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*, by a Suppressor Mutation Method. *J. Bacteriol.*, 178[3], 723-727 (1996)

Masami ISHIDA and Tairo OSHIMA : A leader open reading frame is essential for the expression of GC rich *leuB* gene of an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*, in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Letter*, 135(1), 137-142 (1996)

Shojiro KADONO, Masahiro SAKURAI, Hideaki MORIYAMA, Mamoru SATO, Yoko HAYASHI, Tairo OSHIMA, and Nobuo TANAKA : Ligand-Induced Changes in the Conformation of 3-Isopropylmalate Dehydrogenase from *Thermus thermophilus*. *J. Biochem.*, 118[4], 745-752 (1996)

Masato OHZEKI, Takuro YAOI, Hideaki MORIYAMA, Tairo OSHIMA, and Nobuo TANAKA : Crystallization and Preliminary X-Ray Studies of Isocitrate Dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biochem.*, 118[4], 679-680 (1996)

Masatada TAMAKOSHI, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : Screening of Stable Proteins in an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*. *Mol. Microbiol.*, 16(5), 1031-1036 (1996)

Toshio IWASAKI, Katsumi MATSUURA, and Tairo OSHIMA : Resolution of the Aerobic Respiratory System of the Thermoacidophilic Archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7: I The Archaeal Terminal Oxidase Supercomplex is a

Functional Fusion of Respiratory Complexes III and IV with No c-Type Cytochromes. *J. Biol. Chem.*, 270(52), 30881-30892 (1995)

Toshio IWASAKI, Takayoshi WAKAGI, Yasuhiro ISOGAI, Tetsutaro IIZUKA, and Tairo OSHIMA : Resolution of the Aerobic Respiratory System of the Thermoacidophilic Archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7: II Characterization of the Archaeal Terminal Oxidase Subcomplexes and Implication for the Intramolecular Electron Transfer. *J. Biol. Chem.*, 270(52), 30893-30901 (1995)

Toshio IWASAKI, Takayoshi WAKAGI, Yasuhiro ISOGAI, Tetsutaro IIZUKA, and Tairo OSHIMA : Resolution of the Aerobic Respiratory System of the Thermoacidophilic Archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7: III The Archaeal Novel Respiratory Complex II (Succinate-Caldariellaquinone Oxidoreductase Complex) Inherently Lacks Heme Group. *J. Biol. Chem.*, 270(52), 30902-30908 (1996)

Toshio IWASAKI, Takayoshi WAKAGI, and Tairo OSHIMA : Ferredoxin-dependent Redox System of a Thermoacidophilic Archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7: Purification and Characterization of a Novel Reduced Ferredoxin-Reoxidizing Iron-Sulfur Flavoprotein. *J. Biol. Chem.*, 270(30), 17878-17883 (1995)

Toshio IWASAKI, Yasuhiro ISOGAI, Tetsutaro IIZUKA, and Tairo OSHIMA : Sulredoxin: a Novel Iron-Sulfur Protein of the Thermophilic Archaeon, *Sulfolobus* sp. Strain 7 with a Rieske-Type [2Fe-2S] Center. *J. Bacteriol.*, 177(9), 2576-2582 (1995)

Moriyoshi YASUDA, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : The plasmid found in isolates of the acidothermophilic archaeobacterium, *Thermoplasma acidophilum*. *FEMS Microbiol. Letters*, 128, 157-162 (1995)

Moriyoshi YASUDA, Hiroshi OYAIZU, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : Morphological Variation of New *Thermoplasma acidophilum* Isolates from Japanese Hot Springs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(9), 3482-3485 (1995)

Jintana BUNNAK, Hiroshi HAMANA, Yukio OGINO, Toshihiko SAHEKI, Akihiko YAMAGISHI, Tairo OSHIMA, Takayasu DATE, and Takao SHINOZAWA : Orotate Phosphoribosyltransferase from *Thermus thermophilus*: Overexpression in *Escherichia coli*, Purification and Characterization. *J. Biochem.*, 118[6], 1261-1267 (1995)

Hideaki MORIYAMA, Ko ONODERA, Masahiro SAKURAI, Nobuo TANAKA, Hiromi KIRINO-KAGAWA, Tairo OSHIMA, and Yukiteru KATSUBE : The Crystal Structures of Mutated 3-Isopropylmalate Dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8 and Their Relationship to the Thermostability of the Enzyme. *J. Biochem.*, 117[2], 408-413 (1995)

Masahiro SAKURAI, Hideaki MORIYAMA, Ko ONODERA, Shojiro KADONO, Koichi NUMATA, Yoko HAYASHI, Jitsutaro KAWAGUCHI, Akihiko YAMAGISHI, Tairo OSHIMA, and Nobuo TANAKA : The crystal structure of thermostable mutants of chimeric 3-isopropylmalate dehydrogenase, 2T2M6T. *Protein Engng.*, 8[8], 763-767 (1995)

Emiri YODA, Yoriko ANRAKU, Hiromi KIRINO, Takayoshi WAKAGI, and Tairo OSHIMA : Purification and Characterization of 3-Isopropylmalate dehydrogenase from a Thermoacidophilic Archaeobacterium, *Sulfolobus* sp. Strain 7. *FEMS Microbiol. Letters*, 131, 243-247 (1995)

Tetsuya AOYAMA, Tasashi EGUCHI, Tairo OSHIMA, and Katsumi KAKINUMA : Synthesis of DL-threo-3-(1-fluoro-1-methylethyl)- and DL-threo-3-(1,1-difluoroethyl)-malic acids. Mechanistic studies of 3-isopropylmalate dehydrogenase. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1995, 1905-1912 (1995)

Takuro YAOI, Kentaro MIYAZAKI, and Tairo OSHIMA : His273 of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8 is involved in the coenzyme binding. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210, 733- 737 (1995)

Koichi NUMATA, Masashi MURO, Nobuko AKUTSU, Yoshiaki NOSOH, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : Thermal Stability of Chimeric Isopropylmalate Dehydrogenases Constructed from a Thermophile and a Mesophile Genes: *Protein Eng.*, 8[1], 39-44 (1995)

Hiroaki TERASAWA, Kentaro MIYAZAKI, Tairo OSHIMA, Tadashi EGUCHI, and Kastumi KAKINUMA : Synthesis of 2-O-Methyl Ether and 1-Carboxamide Derivatives of (2R,3S)-3-Isopropylmalic Acid and Their Interaction with Thermophilic 3-Isopropylmalate Dehydrogenase; *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58[5], 870-873 (1994)

Takuro YAOI, Kentaro MIYAZAKI, and Tairo OSHIMA: Roles of Arg231 and Tyr284 of *Thermus thermophilus* Isocitrate Dehydrogenase in the Coenzyme Specificity; *FEBS Letters*, 355, 171-172 (1994)

Ko ONODERA, Masahiro SAKURAI, Hideaki MORIYAMA, Nobuo TANAKA, Koichi NUMATA, Tairo OSHIMA, Mamoru SATO, and Yukiteru KATSUBE : Three-dimensional structures of chimeric enzymes between *Bacillus subtilis* and *Thermus thermophilus* 3-isopropylmalate dehydrogenases; *Protein Eng.*, 7[4], 453-459 (1994)

Masami ISHIDA and Tairo OSHIMA : Overexpression of Genes of an Extreme Thermophile, *Thermus thermophilus*, in *Escherichia coli* Cells; *J. Bacteriol.*, 176[9], 2767-2770 (1994)

Kentaro MIYAZAKI, Shojiro KADONO, Masahiro SAKURAI, Hideaki MORIYAMA, Nobuo TANAKA, and Tairo OSHIMA : Chemical modification and site-directed mutagenesis of Tyr36 of 3-isopropylmalate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8; *Protein Eng.*, 7[1], 99-102 (1994)

Kentaro MIYAZAKI, Takuro YAOI, and Tairo OSHIMA : Expression, purification, and substrate specificity of isocitrate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *Eur. J. Biochem.*, 221, 899-903 (1994)

Hiromi KIRINO, Makoto AOKI, Miho AOSHIMA, Yuko HAYASHI, Masayuki OHBA, Akihiko YAMAGISHI, Takayoshi WAKAGI, and Tairo OSHIMA : Hydrophobic interaction at the subunit interface contributes to the unusual thermostability of 3-isopropylmalate dehydrogenase from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Eur. J. Biochem.*, 220, 275-281 (1994)

Nakashima, T., Sekiguchi, T., Sunamoto, H., Yura, K., Tomoda, S., Go, M., JKere, J., Schlessinger, D. and Nishimoto, T., Structure of the human CCG1 gene: relationship between the exons/ introns and the functional domain/modules of the protein., *Gene*, 141(75), 193-200, 1994(4).

Hojo, H., Yoshimura, S., Go, M. and Aimoto, S., Preparation of S-Protected Cysteine-Containing Peptide Thioester and Its Use for the Synthesis of the Barnase-Like Domain in DNA-Directed RNA Polymerase II of *Saccharomyces cerevisiae*., *Bull. Chem. Soc. Japan*, 68(1), 330-336, 1995(1).

Tateno, M., Nureki, O., Yura, K., Morikawa, K., Noguti, T., Yokoyama, S. and Go, M., Molecular recognition mechanism of tRNA^{Glu} by glutamyl-tRNA Synthetase: a study using molecular dynamics simulation and computer modeling., *Protein Engng.*, 8(9), 967, 1995(9).

Tateno, M., Mizutani, M., Yura, K., Nureki, O., Yokoyama, S. and Go, M. Module Structure and Function of Glutamyl-tRNA Synthetase., in *Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures*. eds. M.Go & P.Schimmel, Elsevier, 53-63, 1995(12).

Noguti, T. and Go, M., Modules of Barnase: The Physicochemical Basis for Their Structures., in *Tracing*

Biological Evolution in Protein and Gene Structures. eds. M.Go & P. Schimmel, Elsevier, 161-174, 1995(12).

Takahashi, K., Go, M. and Noguti, T., Mechanical Stability of Protein Modules Determined by Molecular Dynamics Simulations., in Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures. eds. M.Go & P.Schimmel, Elsevier, 175-185, 1995(12).

Yura, K. and Go, M., Helix-Turn-Helix Module Distribution and Module Shuffling., in Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures. eds. M.Go & P. Schimmel, Elsevier, 187-195, 1995(12).

Oshima, T., Yaoi, T. and Go, M., Module Replacement Converted Coenzyme Specificity of Isocitrate Dehydrogenase., in Tracing Biological Evolution, in Protein and Gene Structures. eds. M.Go & P. Schimmel, Elsevier, 197-203, 1995(12).

Go, M. and Noguti, T., Putative Origin of Introns Deduced from Protein Anatomy., in Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures. eds. M.Go & P. Schimmel, Elsevier, 229-235, 1995(12).

Fukami-Kobayashi, K., Mizutani, M. and Go, M., Correlation between Module Boundaries and Intron Positions in Hemoglobins from Various Taxa., in Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures. eds. M.Go & P. Schimmel, Elsevier, 271-282, 1995(12).

Noguti, T., Adachi-Yamada, T., Katagiri, T., Kawakami, A., Iwami, M., Ishibashi, J., Kataoka, H., Suzuki, A., Go, M. and Ishizaki, H., Insect prothoracicotropic hormone: A new member of the vertebrate growth factor superfamily., FEBS Lett., 376(3), 251-256, 1995(12).

Tateno, M., Nureki, O., Sekine, S., Kaneda, K., Go, M., and Yokoyama, S., A three-dimensional structure model of the complex of glutamyl-tRNA synthetase and its cognate tRNA., FEBS Lett., 377(1), 77-81, 1995(12).

Sekine, S., Nureki, O., Sakamoto, K., Niimi, T., Tateno, M., Go, M., Kohno, T., Brisson, A., Lapointe, J. and Yokoyama, S., Major Identity Determinants in the "Augmented D Helix" of tRNA^{Glu} by glutamyl-tRNA from *Escherichia coli*., J. Mol. Biol., 256(4), 685-700, 1996(3).

Fukami-Kobayashi, K. Nosaka, M., Nakazawa, A. and Go, M., Ancient divergence of long and short type isoforms of adenylate kinase: molecular evolution of the nucleoside monophosphate kinase family., FEBS Lett, 386(3), 214-220, 1996(5).

Yaoi, T., Miyazaki, K., Komukai, Y., Oshima, T. and Go, M., Conversion of the coenzyme specificity of isocitrate dehydrogenase by module replacement., J. Biochem., 119(5), 1014-1018, 1996(5).

Song, S., Inouye, S., Kawai, M., Fukami-Kobayashi, K., Go, M. and Nakazawa, A., Cloning and characterization of the gene encoding *Halobacterium halobium* adenylate kinase., Gene, 175(1/2), 65-70, 1996(10).

Saeki, K., Tokura, K., Fukuyama, K., Matsubara, H., Nadanami, K., Go, M. and Itoh, S., Site-specific Mutagenesis of *Rhodobacter capsulatus* Ferredoxin I, FdxN, That Functions in Nitrogen Fixation: Role of Extra Residues., J. Biol. Chem. 271(49), 31399-31406, 1996(12).

Shirai, T. and Go, M., Adaptive amino acid replacements accompanied by domain fusion in reverse transcriptase., J. Mol. Evol., 1997 in press.

Takahashi, K., Oohashi, M., Noguti, T., and Go, M., Mechanical stability of compact modules of barnase., FEBS Lett., 1997 in press.

Yura, K. and Go, M., The homeodomain-like putative product of plastid genome: A possible role in plastid differentiation, *Res. Commu. Biochem. Cell & Mol. Biol.* 1997 in press.

Noguti, T., Takahashi, K., Tanaka, K., Ohashi, M., Hojo, H., Yamauchi, K., Kinoshita, M., Aimoto, S., Ohkubo, T., and Go, M., Design of Mini-Protein by Removing a Module from Barnase : Molecular Modeling and NMR Measurement of the Conformation., to be submitted.

Takahashi, K., Ishima, R., Nagayama, K., Hojo, H., Aimoto, S., Kawabata, M., Kawabata, S., Iwanaga, S., Noguti, T. and Go, M., Secondary Structure of Barnase Module M1 Studied by NMR in Solution., to be submitted.

Yura, K., Kawatani, K. and Go, M., A common module for phosphate binding in three DNA-binding proteins., to be submitted.

Wakasugi, K., Ishimori, K., Imai, K., Wada, Y. and Morishima, I., "Module" Substitution in Hemoglobin Subunits: PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF A CHIMERA α -SUBUNIT, (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 18750-18756

Wakasugi, K., Ishimori, K. and Morishima, I., "Module" Substitution in Hemoglobin Subunits: preparation and characterization of a chimera α -subunit, (1993) *Protein Engineering* **6**, 1006-1007

Inaba, K., Wakasugi, K., Ishimori, K. and Morishima, I., "Preparation and characterization of novel hemoproteins by module substitution in hemoglobin subunits" (1995) *Protein Engineering* **8**, 968

Wakasugi, K., Inaba, K., Ishimori, K. and Morishima, I., "Structure and Function of Module-Substituted Hemoproteins", (1995) *Journal of Inorganic Biochemistry* **59**, 435

T. Shibata-Seki, J. Masai, K. Yoshida, K. Sato, and H. Yanagawa, Supramolecular structure of peptide aggregates revealed by atomic force microscopy, *Reports on Progress in Polymer Physics in Japan*, **37**, 743-746 (1994)

K. Kobayashi, M. Kohara, T. Gamo, and H. Yanagawa, Formation and alteration of organic compounds under submarine hydrothermal vent environments, *Origins of Life Evol. Biosphere*, **24**, 324-325 (1994)

K. Kobayashi, T. Kasamatsu, T. Kaneko, J. Koike, T. Oshima, T. Saito, T. Yamamoto, and H. Yanagawa, Formation of amino acid precursors in planetary and cometary environments, *Proc. 19th Int. Symp. on Space Technology and Science*, 867-872 (1994)

K. Kobayashi, T. Kasamatsu, T. Kaneko, J. Koike, T. Oshima, T. Saito, T. Yamamoto, and H. Yanagawa, Formation of amino acid precursors in cometary ice environments by cosmic radiation, *Adv. Space Res.*, **16**, 21-26 (1995)

J. Masai, T. Shibata-Seki, K. Sato, Y. Ogawa, and H. Yanagawa, Supramolecular structure of synthetic polypeptide filament studied by atomic force and frictional force microscopy, *Rept. Prog. Polym. Phys. Jpn.*, **38**, 477-478 (1995)

J. Masai, T. Shibata-Seki, Y. Ogawa, K. Sato, and H. Yanagawa, Friction-force microscopy of peptide filament: an application to estimate the size of a supramolecular unit, *Thin Solid Films*, **281**, 624-629 (1996)

R.A. Shiurba, K. Ishiguro, M. Takahashi, K. Sato, E.T. Spooner, M. Mercken, R. Yoshida, T.R. Wheelock, H. Yanagawa, K. Imahori, and R.A. Nixon, Immunocytochemistry of tau phosphoserine 413 and tau protein kinase I in Alzheimer pathology, *Brain Res.*, **737**, 119-132 (1996)

N. Doi, M. Itaya, T. Yomo, S. Tokura, and H. Yanagawa, Insertion of foreign random sequences of 120 amino acid

residues into an active enzyme, FEBS Letts., in press

S.-H.Chung, Y.Ogawa, K.Sato, T.Shibata-Seki, J.Masai, K. Ishiguro, and H.Yanagawa, The C-tail region of human tau protein is a crucial structural element for the formation of paired helical filaments, submitted to J. Biol. Chem.

Nobuhide Doi, Mitsuhiro Itaya, Tetsuya Yomo, Seiichi Tokura, and Hiroshi Yanagawa, Insertion of foreign random sequences of 120 amino acid residues into an active enzyme, FEBS Letters 402 (1997) 177-180.

Ohnishi,K., Poly-tRNA structures as early protein-synthesizing RNA apparatus: Evolution from proto-tRNA to most primitive mRNA's. *Viva Origino* 23(3), 237-254, 1995.

Ohnishi, K. and Yanagawa, H.: Poly-tRNA structure in the *Bacillus subtilis* *rrnB* operon is a relic of an early peptide-synthesizing ribozyme co-ancestral to the *E. coli* *trpE* gene and the exon 2 of the chicken triose-phosphate isomerase gene. In: "Genome Informatics 1996", ed. by T. Atitsu et al., pp. 238-239, University Academy Press, Tokyo, 1996.

Ohnishi,K. and Yanagawa,H. : Poly-tRNA-mediated early semeiogenesis of the genetic codes. In:"Intertaxonomic Combination and Symbiotic Adaptation (Endocytobiology VI)", ed. by H.E.A.Schenk, R.G. Herrmann, K.W. Mueller and W. Schwemmler, Springer Verlag, Berlin/New York,(in press).

Ohnishi, K. and Suwa, K. :Origin of ribonuclease P RNA (M1 RNA) as a homologue to the tRNA gene cluster in the *Bacillus subtilis* *rrnB* operon. *Viva Origino*,(発表予定)

Prijambada I. D., Yomo T., Tanaka F., Kawama T., Yamamoto K., Hasegawa A., Shima Y., Negoro S., and Urabe I. , Solubility of artificial proteins with random sequences, FEBS-Lett. 382(1-2): 21-5 1996 Mar 11

Wei-zhong Xu, Akiko Kashiwagi, Tetsuya Yomo, and Itaru Urabe, Fate of a mutant emerging at the initial stage of Evolution, *Res. Popul. Ecol.* 38(2) 231-237 1996

Tetsuya Yomo, Wei-zhong Xu, and Itaru Urabe, Mathematical model allowing the coexistence of closely related competitors at the initial stage of evolution, *Res. Popul. Ecol.* 38(2) 239-247 1996

K. Kaneko and T. Yomo,, Isologous Diversification: A Theory of Cell Differentiation, *Bull.Math.Biol.* 59, 139-196 (1997)

K.Kaneko, Coupled Maps with Growth and Death: An Approach to Cell Differentiation, *Physica D* (1997), in press

K. Kaneko and T. Yomo, A Theory of Differentiation with Dynamic Clustering, in eds. E. Moran et al. *Advances in Artificial Life*, (Springer,1995) pp.329-340.

T. Yamamoto and K. Kaneko, Igniting the cycle of creation -- an approach to create metabolism with Tile Automaton, *Proceedings of Artificial Life V* (1996)

大西耕二、遺伝暗号の起源にパラドックスはなかった ---ポリ tRNA 学説とその記号進化学的意義 I. *生物科学* 47(1), 10-23, 1995.

大西耕二、遺伝暗号の起源にパラドックスはなかった ---ポリ tRNA 学説とその記号進化学的意義 II. *生物科学* 47(3), 155-166, 1995.

(2) 口頭発表

Husimi, Y., Evolution Reactors and the Fitness Landscape in Sequence Space, International Symposium on Time-Machine Biotechnology, (1994).

Husimi, Y., Kikuchi, T., Tadori, Y., Murata, G., Aita, T., Fitness Landscape in Sequence Space and the Adaptive Design of Biopolymers, 1st East Asian Symposium on Biophysics, (1994).

Nemoto, N., Husimi, Y., Role of the Virus-type Strategy in the Encoded Molecular Evolution, The 4th JRDC Internat. Sympo. Exptl. Approaches to Evolutionary Biology, (Tokyo) (1996)

Nemoto, N., Yanagawa, H., Husimi, Y., Virus-like Molecule at the Origin of Translation System, 11-th International Conference on the Origin of Life (Orleans), (1996)

Husimi, Y., Nemoto, N., Yanagawa, H., ROLE OF THE VIRUS-TYPE STRATEGY IN ENCODED MOLECULAR EVOLUTION, Prog. Biophys. & Mol. Biol., 12-th International Biophysics Congress (Amsterdam), 65, 64-64, (1996)

Aita, T., Husimi, Y., Theory of Ideal Fitness Landscapes of a Biopolymer, Prog. Biophys. & Mol. Biol., 13-th International Biophysics Congress (Amsterdam), 65, 65-65, (1996)

Jitsutaro KAWAGUCHI, Yoko HAYASHI-IWASAKI, Akihiko YAMAGISHI, and Tairo OSHIMA : Molecular bases of unusual stability of enzymes from an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. in "Thermophiles '96" September, 1996, Athens, Georgia, USA

Tairo OSHIMA : How to create a robust enzyme: Model studies using a chimera between a thermophile and a mesophile 3-isopropylmalate dehydrogenases. in "Enzyme Engineering X III" October 1995, San Diego, California, USA

Go, M., Origin of introns: were the original blocks of proteins encoded by exons? The First Workshop of the International Society of Molecular Evolution: Open Questions in Molecular Evolution, April 1994.

Takahashi, K., Noguti, T. and Go, M., Mechanical stability of protein modules. First East Asian Symposium on Biophysics, May 1994.

Go, M., Architecture of heme proteins viewed on their building blocks. Nagoya International Symposium: Structures and Functions of Metal Complexes in Biological Processes, July 1994.

Go, M., Module-exon correspondence in the evolution of the globin family. Gordon Research Conference on Oxygen Binding Proteins, July 1994.

Tateno, M., Mizutani, M., Nureki, O., Morikawa, K., Yokoyama, S. and Go, M., Module Structure and Function of Class I Aminoacyl-tRNA Synthetase.

The 20th Taniguchi Symposium, Biophysics Division, Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures, October, 1994.

Noguti, T. and Go, M., Modules of barnase: physicochemical basis of their structures. The 20th Taniguchi Symposium, Biophysics Division, Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures, October, 1994.

Takahashi, K., Noguti, T. and Go, M., Mechanical stability of protein modules studied by molecular dynamics simulations. The 20th Taniguchi Symposium, Biophysics Division, Tracing Biological Evolution in Protein and

Gene Structures, October, 1994.

Yura, K. and Go, M., Module Taxonomy and Module Shuffling. The 20th Taniguchi Symposium, Biophysics Division, Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures, October, 1994.

Go, M., Origin of introns implicated by protein anatomy. The 20th Taniguchi Symposium, Biophysics Division, Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures, October, 1994.

Fukami-Kobayashi, K., Mizutani, M. and Go, M., Correlation between module boundaries and intron positions in hemoglobins from various taxa. The 20th Taniguchi Symposium, Biophysics Division, Tracing Biological Evolution in Protein and Gene Structures, October, 1994.

Go, M., Yura, K., Fukami-Kobayashi, K., Takahashi, K., Komukai, Y., Honda, M., Hashimoto, H., guchi, Y., Nadanami, K., Tanaka, K., Tsukahara, Y. and Noguti, T., Ancient origin of introns: statistical evidence on intron-module correlation in glycolytic enzymes. The Third International Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE3), August, 1995.

Fukami-Kobayashi, K., Mizutani, M., Go, M., Ancient origin of introns in hemoglobin genes, The Third International Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution (SMBE3), August, 1995.

Go, M., Mizutani, M. and Fukami-Kobayashi, K., Origin of introns in globin family implicated by correspondence of modules to exons. International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Invertebrate Hemoglobin, December, 1995.

Fukami-Kobayashi, K. and Go, M., Intron loss in hemoglobin genes along their evolutionary pathway: 1995 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, December, 1995.

Go, M., Co-evolution of protein architecture and gene structure., International Symposium on Network and Evolution of Molecular Information, April, 1996.

Yura, K., Kawatani, K. and Go, M., A newly identified phosphate-binding module in DNA-binding proteins. XIIth International biophysics congress, August, 1996.

Go, M., Noguti, T. and Yura, K., Statistical evidence of intron-module correlation in glycolytic enzymes and origin of introns. XIIth International biophysics congress, August, 1996.

Takahashi, K., Noguti, T. and Go, M., Mechanical stability of modules of barnase. XIIth International Biophysics Congress, August, 1996.

Go, M. and Yura, K., Module and architecture of DNA-binding proteins. 15th International CODATA Conference, September 1996.

Yura, K. and Go, M., A common module in DNA-binding proteins observed through protein three-dimensional structure database. Institute for Protein Research Seminar. Databases for Structural Biology and Related Areas, October, 1996.

Yura, K., Kawatani, K. and Go, M., Newly identified similar modules for phosphate binding in DNA-binding proteins. The 11th Rinshoken International Conference "Frontiers of Structural Biology", November, 1996.

Go, M., The Origin and Role of Present and Lost Introns., Junk DNA: The Role and the Evolution of Non-Coding Sequences, A Symposium in Honor of Emile Zuckerkandl (1997 International Society of Molecular Evolution), 1997.

Morishima, I., Wakasugi, K., Inaba, K. and Ishimori, K., "Design and Engineering of Module-Substituted Hemoproteins based on the Exon-Shuffling Hypothesis", XIIth International Biophysics Congress (in Amsterdam, the Netherlands) 11-16 August 1996

K.Kobayashi, T.Kasamatsu, T.Kanako, J.Koike, T.Oshima, T.Saito, T.Yamamoto, and H.Yanagawa, Formation of amino acid precursors in planetary and cometary environments. ,The 19th International Symposium on Space Technology and Science, Yokohama, May, 1994

K.Kobayashi, T.Kasamatsu, T.Kaneko, J.Koike, T.Oshima, T.Saito, T.Yamamoto, and H.Yanagawa, Formation of amino acid precursors in cometary ice environments by cosmic radiation, The 30th COSPAR Scientific Assembly, Hamburg, July, 1994.

H.Yanagawa, An experimental approach to exon shuffling: From protein anatomy to protein engineering International Symposium on "Time-Machine Biotechnology", Molecular Evolution Engineering, Tsukuba, Nov., 1994

S.Y.Aksyonov, D.Chernavskii, A.Glinenko, Y.Ishikawa, T.Kaneko, Y.Kawasaki, K.Kobayashi, J.Koike, K.A.Kotelnikov, Y.Kotov, E.Kuzipcheva, A.Martynov, T.Oshima,N.G.Polikhina, A.B. Rubin, T.Saito, V.Tsarev, T.Yamamoto, and H.Yanagawa, Return to Mars together mission- Search for biogenic compounds and organisms on Mars, Mars Together Conference, Stanford, June, 1995

T.Shibata-Seki, J.Masai, K.Yoshida, K.Sato, Y.Ogawa, and H.Yanagawa, Comparative study of synthetic peptide aggregates by atomic force microscopy and transmission electron microscopy., The 13th International Vacuum Congress/ 9th International Conference on Solid Surface, Yokohama, Sept., 1995

H.Yanagawa, M.Ishizaka, K.Yoshida, A.Sato, and T.Shimamiya, An experimental approach to exon shuffling: Modular mutagenesis of barnase, The 8th ISSOL Meeting, Orleans, July, 1996

H.Yanagawa, Y.Ogawa, J.Hori, J.Masai, K.Yoshida, and K.Sato, Conformational transition of secondary structures of peptide fragments and their nongenetical self-propagation, The 8th ISSOL Meeting, Orleans, July, 1996

K.Ohnishi, H.Tanaka, and H.Yanagawa, Comparative anatomy of group I introns and related RNA's The 8th ISSOL Meeting, Orleans, July, 1996

K.Ohnishi and H.Yanagawa, Origin and evolution of protein-module-encoding exons, The 8th ISSOL Meeting, Orleans, July, 1996

N.Nemoto, H.Yanagawa, and Y.Husimi, A virus-like molecule in the early stage of encoded molecular evolution The 8th ISSOL Meeting, Orleans, July, 1996

Ohnishi,K. : Poly-tRNA-mediated peptide-synthesis in early terrestrial organisms before genetic codes: A perspective on early life. In : The First International Conference on Circumstellar Habitable Zone (organized by L.Doyle, J. Billingham and D. DeVincenzi, held at NASA Ames Research Center, Mountain View, Calif.) Jan. 19-21, 1994.

Ohnishi,K. : Poly-tRNA theory on the origin of mRNA and genetic codes. ISSOL-94 Conference . 1994年7月 [Origins of Life and Evolution of Biosphere (Abstract), 24(3-4), 191-192, 1994.

Ohnishi,K. : Further evidences for the poly-tRNA theory on the origin of mRNA and genetic codes: Poly-tRNA structure in the Bacillus subtilis rrmB operon is also a relic of an early peptide-synthesizing RNA molecule.

ISSOL-96 Conference . 1996年7月 [Origins of Life and Evolution of Biosphere (Abstract), 26(3-4), 405-406, 1996]

Ohnishi,K., Tanaka,H. and Yanagawa,H. : Comparative anatomy of group I introns and related RNA's. ISSOL-96 Conference . 1996年7月 [Origins of Life and Evolution of Biosphere (Abstract), 26(3-4), 407-408, 1996]

Ohnishi,K. and Yanagawa,H. : Origin and evolution of protein-module-encoding exons. ISSOL-96 Conference . 1996年7月 [Origins of Life and Evolution of Biosphere (Abstract), 26(3-4), 409-410, 1996]

Kaneko,K. , Isologous Diversification for Cell Differentiation, (European conference on Artificial Life, Granada, June,1995)

Kaneko,K. , Extensions of Coupled Map Approaches to Biological Systems, (International Workshop on Lattice Dynamics, Paris, June, 1995)

Kaneko,K. , Isologous Diversification for Biological Systems, (International Workshop on Logic and Dynamics of Higher-Level Formation in Biological Systems, Hayama, March, 1996)

Kaneko,K. , Isologous Diversification and Emergence of Recursivity, (Workshop on the Evolution of Organization, Altenberg, Sept. 1996)

Kaneko,K. , Isologous Diversification for Cell Society, (European Conference on Mathematics Applied to Biology and Medicine, Heidelberg, Oct. 1996)

Kaneko,K. , From Isologous Diversification to Emergence of Recursivity, (Toshiba-Keio Workshop on Complex Systems, Oct. 1996)

第2回進化分子工学シンポジウム (1995年3月3日、東京)での発表

1. モジュールの組合わせから進化工学へ (名大) 郷通子
2. モジュールの組合わせによる新規グロビン蛋白の創製 (京大) 森島績
3. エクソンシャフリングへの実験的アプローチ (三菱化学) 柳川弘志
4. ミニ遺伝子集合化による機能発現 (癌研) 芝清隆(ゲスト)
5. 好熱菌酵素を用いた基質変換の試み (東工大) 大島泰郎
6. 酵素の好熱菌内での進化的耐熱化 (東工大) 山岸明彦
7. *B.stearothermophilus* カタラーゼからみた蛋白質配列空間の地形 (阪大) 四方哲也
8. ポリ tRNA 構造に基づくRNAと蛋白質の構築原理 (新潟大) 大西耕二
9. 遺伝情報翻訳系の起源と進化 (東大) 渡辺公綱(ゲスト)
10. カオスによる自発的分化と多様性の進化 (東大) 金子邦彦
11. 適応度の地形の概観 (埼玉大) 伏見譲

第32回日本生物物理学会年会シンポジウム「人工進化—進化分子工学工学の発展と抗体工学の新展開」(1996年11月7日、つくば)での発表

1. はじめに：人工分子進化の物理的側面 伏見 譲 (埼玉大・工)
2. 抗原認識機構の構造生物学的解明 島田一夫 (東大・薬) (共催)

3. 大腸菌・ファージによる抗体工学 熊谷 泉 (東北大・工) (共催)
4. DHFR 遺伝子を利用した活性型リボザイムのスクリーニング
多比良和誠 (筑波大応用生物化学) (ゲスト)
5. 分子進化の階層性：ヌクレオチドからマイクロ遺伝子へ 芝 清隆 (癌研究会癌研究所) (ゲスト)
6. ランダムポリペプチドから蛋白質への進化の展望 四方哲也 (阪大・工)
7. 終わりに 熊谷 泉 (東北大・工) (共催)

第3回進化分子工学シンポジウム(1997年1月8日)での発表

1. 配列空間の適応度地形と適応歩行 (埼玉大工) 相田 拓洋、伏見 譲
2. RNAの試験管内進化 (東大理) 横山茂之(ゲスト)
3. ポリ tRNA 構造から見た蛋白質の核酸結合性ドメインの起源と構築原理 (新潟大理)大西 耕二
4. DNA 結合タンパク質に見られるモジュール・シャフリングの痕跡 (名大理)由良 敬、郷 通子
5. モジュール置換によるグロビン蛋白質の構築 (京大工) 森島 績
6. 単位領域の組み合わせとランダム配列からの新しいタンパク質の創出 (三菱化学・生命研)柳川弘志
7. トポロジカル変異によるタンパク質配列空間の縮約 (工業技術院・生命研) 巖倉 正寛(ゲスト)
8. 酵素の温度適応 (東薬大・生命科学) 大島 泰郎
9. 植物ウィルスの進化実験 (京大農) 古沢 巖(ゲスト)
10. 大腸菌の長期培養による実験進化 (阪大工) 四方 哲也
11. 自発的多様化から分化のルール形成へ：細胞集団のダイナミクスへの視点 (東大・総文) 金子 邦彦

(3) 出版物

Tairo Oshima, Takuro YAOI, and Michiko Go : Module Replacement Converted Coenzyme Specificity of Isocitrate Dehydrogenase.

In "Tracing Biological Evolution in protein and Gene Structures" (Michiko Go and Paul Schimmel, eds.) pp.197-203, Proceedings of the 20th Taniguchi Symposium, Elsevier, Amsterdam (1995)

Akihiko YAMAGISHI and Tairo OSHIMA : Return to Dichotomy: Bacteria and Archaea:

in "Chemical Evolution: Self-Organization of the Macromolecules of Life" (J. Chela-Flores, M.S. Chada, A. Negron-Mendoza, and T. Oshima, eds.), pp.155-158, A. Deepak Publishing, Hampton, Virginia (1995)

Tairo OSHIMA : Stabilization of proteins by evolutionary molecular engineering techniques; Current Opinion Structural Biol., 4[4], 623-628 (1994)

Wakasugi, K., Ishimori, K. and Morishima, I., Module Substitution in Globins: Preparation and Association Characteristics Chimeric Hemoglobin Subunits and Myoglobin

In "Tracing Biological Evolution in protein and Gene Structures" (Michiko Go and Paul Schimmel, eds.) pp. 283-295, Proceedings of the 20th Taniguchi Symposium, Elsevier, Amsterdam (1995)

K.Kobayashi, M.Kohara, T.Gamo, and H.Yanagawa, Formation and alteration of organic compounds in simulated submarine hydrothermal vent environments,

In "Biogeochemical Processes and Ocean Flux in the Western Pacific" (eds., H.Sakai & Y.Nozaki), 523-535, Terra Scientific Publishing company, Tokyo, 1995

- 伏見 謙, 中村春木, ここまで来た蛋白質の人工設計,
in 赤坂一之編, 「蛋白質—この絶妙な設計物—」, (吉岡書店, 1994).
- 伏見謙, 進化分子工学, 電子情報通信学会誌, 77, 115-121, (1994).
- 伏見 謙, 人工進化, 現代思想, 174-181, (1995).
- 伏見 謙, 鈴木美穂, DNA の寿命, Materials Life, 8, 196-201 (1996).
- 伏見 謙, RNA 上の情報をコピーする RNA の創出—生命の起源の実験的研究の進展, パリティ, 12, 49-52, (1997).
- 伏見 謙, 相田拓洋, 進化のダイナミクス,
in 金久 実編, シリーズ・ニューバイオフィジックス第11巻「ヒューマンゲノム計画」, (共立出版, 1997)
- 野口俊之、郷 通子、タンパク質のモジュール構造:生物進化の物理、日本物理学会誌、9 (5), 344-350, 1994(5).
- 野口俊之、郷 通子、立体構造から見た分類学、蛋白質核酸酵素、39(7), 1028-1035, 1994(5).
- 深海-小林 薫、郷 通子、RNA結合ドメインを持つ蛋白質の分子進化、蛋白質核酸酵素、39(13), 2177-2188, 1994(10).
- 郷 通子、立体構造から見た蛋白質の進化—長くて短い40億年:くり返しと組み合わせの歴史—、蛋白質核酸酵素、39(15), 2448-2456, 1994(11).
- 柳川弘志、進化分子工学による高次分子システムと機能の創出、まてりあ(Materia Japan), 34, 1261-1268 (1995)
- 柳川弘志、熱水環境と生命の起源、温泉科学, 45, 168-172 (1995)
- 柳川弘志、生命の起源における熱水噴出孔の役割、化学と工業, 47, 1161-1162 (1994)
- 柳川弘志、生命の起源とRNAワールド、蛋白質核酸酵素, 39, 2465-2479 (1994)
- 柳川弘志、脂質核酸複合体からの超ラセン構造の形成、蛋白質核酸酵素, 40, 75 (1974)
- 柳川弘志、自己複製するペプチドフラグメント、蛋白質核酸酵素, 40, 184(1974)
- 柳川弘志、「生命はRNAから始まった」、岩波科学ライブラリー、岩波書店(1994)
- 柳川弘志、「生命の起源と進化」、岩波講座・地球惑星科学入門、岩波書店(1996)
- 金子邦彦、「複雑系—カオスのシナリオから生命的シナリオへ」、現代思想 1996年 11月号 pp.79-86
- 金子邦彦、多様性の起源、維持、進化、計測と制御 35, 496-501 (1996)
- 金子邦彦、「相互内部ダイナミクス系としての生命観」、現代思想 1995年12月号 pp.86-97
- 金子邦彦、津田一郎「複雑系へのカオスのシナリオ」(朝倉書店、1996年)

序 論

伏見 譲 (埼玉大学工学部)

1. 進化分子工学の位置づけ

DNA上の情報をアクセスする in vivo のマシンとバイオテクノロジーのマシンを表にすると進化分子工学の位置づけの一つがわかる(表1. 1)。COPY 命令を実行する in vivo マシンは DNA ポリメラーゼとして見つかったが、WRITE 命令を直接的に実行するマシンは、in vivo には見つかっていない。WRITE 命令とは、白紙の DNA に意味のある情報を文字列として書き込むことである。白紙とは、全ての可能な文字列を等確率で担いうる状態を表す。バイオテクノロジーでは、DNA 合成機がこれに当たる。

表1. 1

直接的な情報アクセスマシン

命 令	In vivo	Biotechnology
READ	RNA Polymerase, Ribosome	DNA Sequencer
WRITE	な し ! (未発見)	DNA Synthesizer
COPY	DNA Polymerase	PCR, 3SR
MERGE	Transposase etc	Recombinant DNA tech.
EDIT	Repair enzymes	Site-directed mutagenesis

間接的な Write プロセス

WRITE	Molecular evolution	Evolution reactor
-------	---------------------	-------------------

DNA 合成機では、実験者の知性が特定の文字列を決定すれば、それを、DNA 分子上に WRITE することができる。しかし、実験者の知性は、非天然の新情報を決定できるほどには高くないようだ。蛋白質工学における新規蛋白質設計の構造論的なアプローチが苦勞している点である。一方、生細胞も、たとえ WRITE マシンを持ったとしても、何を書いてよいかわからない筈である。すなわち、生物は賢明にも、使いこなせない WRITE マシンは所有しない。

現在の天然 DNA 上の意味のある情報は、マシンを使って直接書かれたのではなく、分子進化というプロセスによって間接的に結果として書き込まれた。これに対応するバイオテクノロジーのプロセスを進化リアクタープロセスと呼び、その設計方針と運転法を確立することが、進化分子工学の中心課題である。機能分子を創出するのに、蛋白工学では分子構造を設計するが、ここでは淘汰環境を設計する。

このように、進化分子工学は、遺伝子工学の存立基盤であった機械論的デコーディング過程とは異質の、散逸構造論的エンコーディング過程に係わっている。進化は情報獲得や情報獲得法の獲得という、免疫や脳の学習過程と共通した現象であり、原理も共通のものを持っていると思われる。この観点から、工学全体を見直そうとするのが

進化学である。

2. 進化学の分類とそれによる概念整理

進化分子工学はいわゆる進化学の一つであるが、進化学と進化分子工学の分類を多方面の切り口から行い、筆者なりに概念を整理してみよう。

本研究班は下記5)と6)の分類に基づいて、図1・1に示す4テーマを設定し、研究を進めた。

1). 淘汰工学と進化学

淘汰工学： 初期に存在する突然変異体集団の中から、評価と増幅のサイクルを繰り返して、適応度の高いものを選択する。ダーウィン淘汰は単なる選択ではない。増幅プロセスを使ってSN比を改善した選択過程を指す。1分子操作が進歩すれば、増幅プロセスを必要としない、評価プロセスのみの選択工学が登場しうる。

進化学： 初期に存在しない突然変異体をも探索するため、淘汰プロセスとランダム突然変異プロセスのサイクルを繰り返して、適応度の山を登る。適応度の地形の適切さがダーウィンの漸進的高速進化にとって重要な問題となる。

2). 作業物質とターゲットによる進化学の分類

Stemmer は、作業物質をDNAとシリコンにわけ、進化のターゲットを機能と数値にわけて、進化学を分類した。

	機 能	数 値
DNA	進化分子工学	分子コンピュータ
シリコン	人工生命	遺伝的アルゴリズム

3). 自然淘汰型と人為淘汰型

人為淘汰型： 進化学における淘汰プロセスで、評価と増幅が分離したプロセスであるもの。通常の in vitro selection はこれ。突然変異プロセスは増幅プロセスと同時進行の場合が多い。

自然淘汰型： 淘汰プロセスで評価と増幅が同時に進行するもの。セルスタットはこれ。3SR法は、自然淘汰型 in vitro selection となりうる。突然変異プロセスも同時進行させうる場合が多い。

4). 進化する分子の相互作用の有無による分類

進化分子工学： 進化する高分子間の相互作用を積極的に取り除き、高分子1分子の進化を適応度の地形上の独立粒子の適応歩行に単純化して成功を収めた。実験者が外部環境を与えるので、Directed evolution となる。

進化システム工学： 相互作用を積極的に行わせる。分子系と環境との共進化も起こる複雑系となる。このため、Undirected autonomous evolution となる。天然の進化

により近い。ニーズの解決よりもシーズを拾うことをねらう。

5). 表現型遺伝子型対応付けによる分類

RNA型: 表現型と遺伝子型とを同一分子に担わせる戦略。リボザイム、ウイロイド。RNAやssDNAのアプタマー技術。SELEX。

ウイルス型: 両者は別の分子に担われているが、その両者を結合することにより対応付ける戦略。繊維状ファージなどの単純なウイルス粒子のコート蛋白。セルスタット。ファージ提示法。In vitro ウイルス プロセス。コード化組み合わせライブラリー。

細胞型: 両者を一つの袋に入れて対応付ける戦略。単細胞生物。細胞提示法。プラスミド・ケモスタット。クローニング・スクリーニング法。マイクロカプセル法。

外部知性型: 遺伝子型分子を用いず、表現型分子を評価同定し、同定した分子を大量合成する。Combinatorial Chemistry。番地付け固相重合ライブラリー法。

6). ランダム置換の階層による分類

ヌクレオチド・アミノ酸レベル: 点突然変異による改変と全く新しい新規機能の創出。

エクソン・モジュールレベル: モジュール、2次構造、フォールドンなどのシャプリングによる新規3次構造の創出。全く新しい機能の創出は期待しにくい。

シストロン・サブユニットレベル: 3次構造のシャプリングによる新規4次構造の創出。

オペロンレベル:

ゲノムレベル: 共生説。

7). 集団サイズによる分類

決定論的淘汰工学: 長さが短い時、配列空間の全数調査が可能。

決定論的進化工学: 集団サイズが配列空間の点の数よりはるかに少ないときでも、適応度地形が理想地形の場合は、最適値に迅速に到達する歩行法がある。

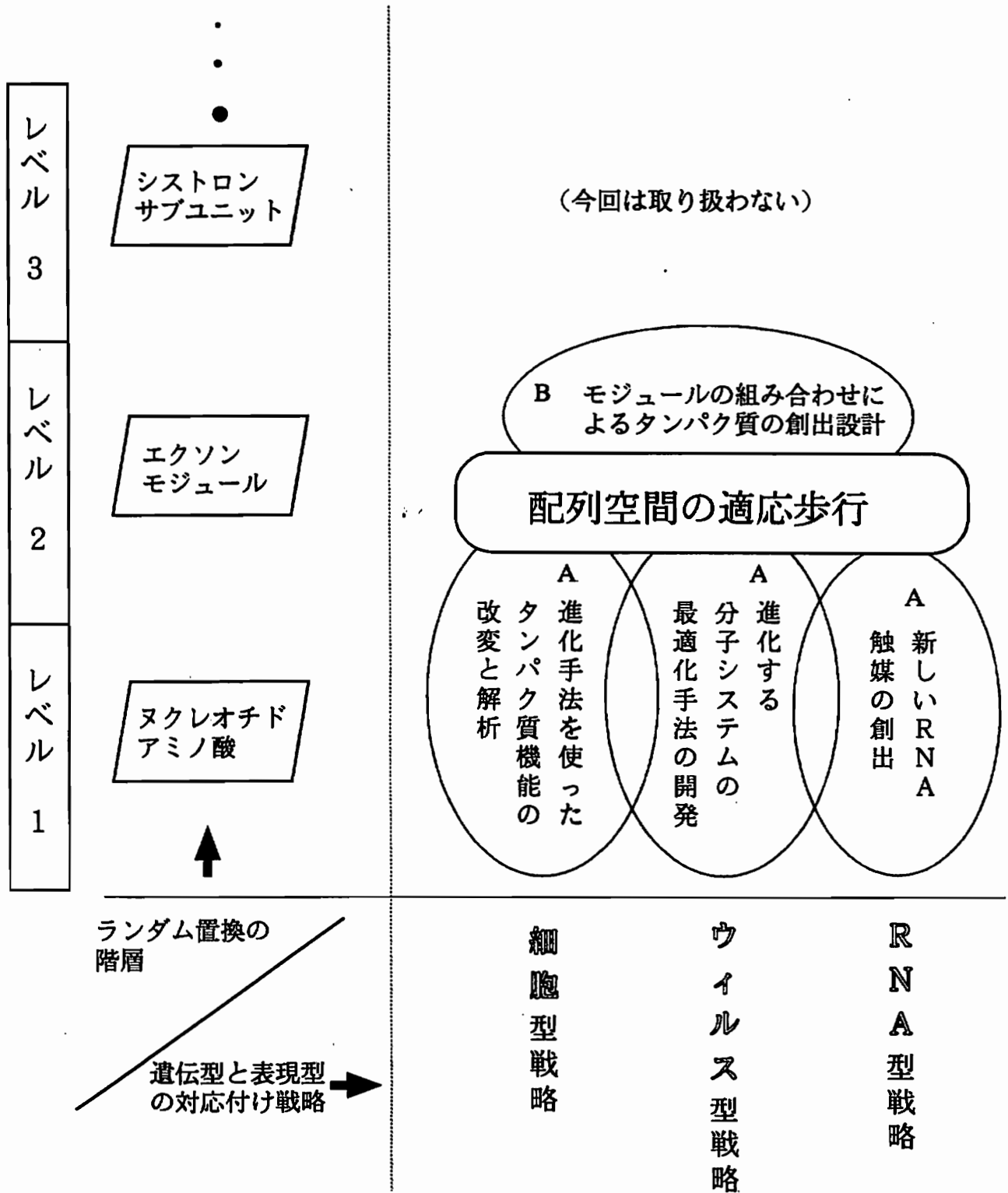
確率論的: それ以外の、集団サイズが配列空間の点の数よりはるかに少ないとき。

8) 進化分子工学、分子進化工学

進化分子工学: 進化論的な分子工学である。進化する分子は核酸と蛋白質などの天然の生体高分子だけとは限らず、「生体高分子」概念の一般化をねらう。

9) 分子進化工学: 分子進化という用語は、通常、生物進化に付随して進化してきた生体分子の進化史と進化機構を指す。分子進化・工学は、当初、系統樹作成技術を応用して、来年のインフルエンザのワクチンをあらかじめ用意するというような工学として提起された。分子・進化工学なら、進化分子工学工学と同じ。

図1.1 本研究班の研究テーマの分類



配列空間上の適応度地形と適応歩行:理想から実在へ

伏見 譲、相田拓洋 (埼玉大・工)

1. 第一の単純化・第一のコーディング:「適応度の地形」概念の成立

進化分子工学では、実験者が進化分子系の環境を設定し、かつ、構成要素間の相互作用を可能な限りはぎ取るという理想化単純化を行う。例えば、我々の開発した自然淘汰型進化リアクター・セルスタットは、初めて成功したウイルスの安定連続培養槽であるが、それは次のような単純化理想化によって成功した。⁽¹⁾

宿主・寄生間の生態学的相互作用を最低限度に押さえるために、宿主培養槽(タービドスタット)とウイルス培養槽(セルスタット)を分離し、宿主菌の高速流の中でウイルスを培養する。この場合、セルスタットの希釈率は、上流のタービドスタットの希釈率より遙かに大きく、セルスタット中の宿主菌は細胞分裂を起こすより速く流出するように設定するので、ウイルスゲノムの淘汰と進化を、宿主ゲノムのそれと独立に観測することができる。また、タービドスタット培養は対数期という代謝系が安定した生理状態の宿主菌を供給し、ケモスタット培養のような生理的不安定性を与えない。さらに、合成培地で大腸菌雄株を培養すると、Ffファージに対する不可逆的受容体であるF線毛は細胞当たり1本しか生えず、また、Ffファージ感染大腸菌は速やかに、第2の感染を許さない膜状態を作り上げるため、ファージの多重感染が起こり得ないように出来る。従って、個々の感染大腸菌は、ファージゲノムのクローニング用試験管と見なすことが出来る。ファージ突然変異体間の相互作用は、上流から流入する未感染大腸菌への感染競争のみとなる。

また、*In vitro* selection におけるPCRやアフィニティクロマトグラフィー等による評価プロセスも、個々の突然変異体高分子間の相互作用がないような条件で行われる。

この結果、生体高分子1分子の進化を、他の高分子との相互依存関係を無視して取り扱うことができる。この独立粒子モデルが有効な場合は、生体高分子の進化を、配列空間における適応度の地形(Fitness Landscape)と、その上の突然変異体集団の適応歩行の問題に落とし込むことができる。

環境と生体高分子の種類が決まれば、その物性として、一次構造と機能の関係、すなわち、適応度の地形が決まる。別の観点から見ると、この単純化は、機能(その評価関数が適応度)を文字列(生体高分子の一次構造)にコーディングしていることになる。

一方、天然の進化では、環境は生物と共進化しているし、構成要素間には網目のような相互作用がある。これは極めて複雑な系であり、その複雑さが進化の重要な点だとする立場からすれば、進化分子工学の立場は単純化しすぎて複雑系の示す興味ある現象を捨象しているのかも知れない。しかしながら、重要な点は、複雑な進化過程をエッセンスを保持したまま単純化する切り口を実験科学的に示したと言うことである。エッセンスとは、高分子が自動的に高速進化するという点である。このおかげで、「適応度の地形」概念が有効性をもつようになったのである。

ところで、単純化したと言っても未だ十分複雑である。すなわち、タンパク質1分子構造のフォールディングの問題が既に、正面突破しようとする、Levinthal パラドックスに象徴されるように十分

複雑であるのと同じように、タンパク質1分子機能の適応度の地形の問題も、正面突破しようとする、KauffmanのNKモデルのような複雑性を生むことになる。

2. 第二の単純化:理想的適応度地形のモデル

本研究においては、この後者の複雑性を回避するために第二の単純化理想化を行った。適応度の地形の理想化である。理想地形とは、配列空間の任意の点から、点突然変異のみを重ねて登るのみで適応度最大点に至る経路が存在するような地形である。この場合は、配列空間の点の数に相当する、長さの指数関数に比例するランダム試行回数ではなく、長さのそのものに比例するランダム試行回数で最適点に達することができる。4³⁰⁰と4x300とを比較すればわかるように、これこそダーウィン進化の漸進的高速進化を理想的に体现する場合である。配列空間を1次元軸で模式的に表すと、理想地形は富士山の絵のようになろう。そこで、この理想地形を富士山型地形とも呼ぶ。これは既定の物性量に対する大胆な近似なので、実験系の設定に係わる第1の単純化理想化の場合よりも危険を伴うが、第1の単純化が行われている場合は実験的検証が可能であるので作業仮説として導入してよい。この作業仮説は、後述するような、ある範囲の進化分子工学実験によって、支持されている。この作業仮説を後押しするのは、生命が出現しそれが進化したという事実そのものである。

生体高分子の残基の置換に関し、その様々な物性量に対応するギブズ自由エネルギー変化 ΔG に相加性が成立すると仮定してみよう。すると、そのギブズ自由エネルギー ΔG を適応度とする地形は富士山型となる。蛋白質のような多値配列空間ではこの地形は必ずしも単純ではない。富士山型地形といえども、尾根筋以外の方向には凸凹しているのである。我々は、アミノ酸配列の任意の部位上に関して、残基置換に対する寛容性を表現する「寛容度関数」を導入し、ある野生型配列を中心とした、ハミング距離 d の突然変異体集団の適応度分布を定式化した。⁽²⁾ 分布の平均値と分散が d にどう依存するかを示した。また、尾根筋を山登りしている野生型が何合目にいるかによって、分布の d 依存性がどのように変化するかを示した。実験で得られたランダム突然変異体スペクトルをこの理論分布に当てはめることにより、富士山型地形のスロープに関する情報が得られると同時に、野生型配列の最適配列からの距離が推定できる。

組合せ論的ペプチド合成を用いた機能性ペプチドの対レセプター・アフィニティの進化実験、酵素プロリルエンドペプチダーゼの耐熱性の進化実験(図1)、並びに、大腸菌 lac プロモータの突然変異体集団スペクトルの解析にこの理論を適用したところ、それぞれの地形が富士山型に近いとする仮説と矛盾しなかった。特に、短いペプチドの場合は、配列空間全体が富士山型地形に近い可能性が大きい。また、進化したという実績を持つ現在の生体高分子に対して、その周囲の地形が富士山型に近いことは当然だという見方もある。

理想地形は、理想気体と同じように、理論を展開しやすい。しかも、上述のような進化分子工学実験の解析結果、並びに、突然変異効果の統計的相加性を期待することにより成り立つ Sexual PCR の数多くの成功、⁽⁴⁾ また、蛋白質工学において点突然変異の効果の統計的相加性を示すデータが数多く報告されていること、⁽³⁾ から、実在地形の第一近似モデルにできると思われる。

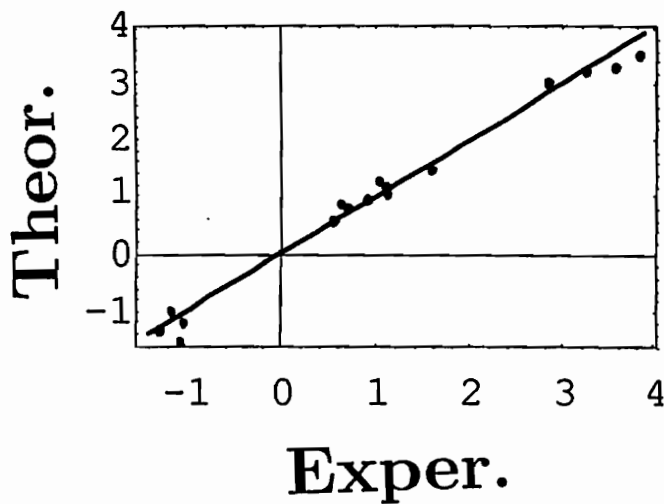


図1 プロリルエンドペプチダーゼの突然変異体スペクトルの実験と理論の比較。熱安定性を増加させる進化分子工学実験で得られたアミノ酸残基4置換体に対して、出発配列とのハミング距離の中間に位置する $2 \times 2 \times 2 \times 2 = 16$ 種の置換体全てを合成し、その熱安定性を測定した(小久保ら、1996)。熱変性反応速度の活性化自由エネルギーを適応度として、寛容度関数を用いる富士山型地形の理論のよる値(横軸)と実験値とを比較した。結果は相加性に基づく富士山型地形に極めて近いことを示す。

3. 理想地形上の適応歩行

富士山型地形の目隠しをした山登り(適応歩行)は、部位特異的な突然変異導入ができる場合は、親配列に対して特定の部位に対してプールサイズ $N = \lambda$ の1点突然変異集団を作り、その部位をスキャンしていけば、歩数 $T = \nu$ で確実に頂上に達することができる。ここで、 λ はアルファベットの文字数であり、 ν は文字列の長さである。 $N=1$ で、 $T = \lambda \nu$ としても同じである。コストが $N T$ に比例するとき、両歩行法のコストは同じだが、後者の歩行法は時間がかかる。最も速い歩行法は、プールサイズが配列空間の点の総数 $\lambda^\nu = N_0 = N^\nu$ の突然変異集団を作り、たった $T=1$ 回の淘汰で、頂上に達する歩行法である。しかしこの歩行法はコストが最も大きい。 ν が少し大きくなると N_0 が巨大となり実際上不可能となる。

部位特異的な突然変異導入が困難なときは、尾根筋を通る歩幅1ハミング距離の着実な歩行(ハミング距離1の突然変異体プールサイズ $N = \nu(\lambda - 1)$)を行えば、配列の長さ ν に相当する歩数 T で、確実に頂上に到達する。 $N (\ll N_0)$ が与えられたとき、最小の歩数で到達する歩幅(突然変異率)のスケジュールは何か? コストは歩数(試行回数) T と N の関数であろうが、コストパフォーマンスを最適化する歩行法は何か? クローニング・スクリーニング型進化リアクターに対するこの問題を、前節の理論を発展させ、Rechenberg の $(1+N)$ -ES(進化戦略)モデルで研究した。

富士山の麓にいるときは、周囲の景観は等方的であり、突然変異体は確率 $1/2$ で有利突然変異体である。従って、 N が小さくても、歩幅の大きな歩行をした方が、一気に高所に登れる。頂上に近づくとつれ、 N が小さいとき、大きな歩幅の歩行はむしろ山を下る確率が高くなるので避けるべきである。クローニング・スクリーニングではコストがスクリーニングされる総突然変異体数に比例すると考えられるので、コストパフォーマンスは、 N が小さく、従って歩幅の小さい歩行法の方ほど改善される。

理想地形に対してこの結論は、半ばトリビアルであるが、その素地として構築した理論は、地形が理想から少しずれた実在地形の歩行法の理論的枠組みを提供するので有用と思われる。

4. 理想地形から実在地形へ: 多段反応における部分適応度間のフラストレーションの程度

我々は理想地形からの近似を進めることによって実在地形へ接近しようとしている。まず研究したことは、多段反応における部分適応度間のフラストレーションの問題である。

例えば酵素の触媒能は、遷移状態結合・生産物解離という少なくとも2段階の結合特性に依存する。それぞれの結合特性(部分適応度)が富士山型地形であっても、それぞれのピーク(最適配列)の位置が異なれば、触媒能全体(全適応度)としての地形は、フラストレーションを起こし凸凹になるかも知れない。我々は、次のようなモデルでこの地形間のフラストレーションの問題を調べた。⁽⁵⁾ 20値20次元配列空間上の、L段カスケード反応の全反応速度の地形が、部分適応度の地形間の相関を表す量の相関係数 r 、各段の寛容度関数の形状を表すパラメータ n (大なるほどアミノ酸置換に対する寛容度なし)、に依存して、富士山型からどの程度ずれるかを調べた。Lが大きいほど、 r が-1に近づくほど、 n が大きいほど、局所最適点が多量出現し、凸凹さを増す。しかし、 r が-1に極めて近い限り、局所最適点はハミング距離Lの領域ではもはや最適点ではないことがわかった。すなわち、ハミング距離Lの歩幅で歩行すれば、富士山型の場合と同じ適応歩行ができる。Lが小さい場合は確実な適応歩行をするための突然変異体プールサイズは実験可能量にとどまる。

文献

- (1) Y.Husimi, K.Nishigaki, Y.Kinoshita & T.Tanaka, *Cellstat. Rev.Sci.Instrum.* **53**, 517-522 (1982).
- (2) T.Aita and Y.Husimi, *Fitness Spectrum among Random Mutants on Mt.Fuji-type Fitness Landscape, J.Theor.Biol.*, **182**, 469-485 (1996)
- (3) J.A.Wells, *Additivity of Mutational Effects in Protein. Biochemistry*, **29**, 8509-8517 (1990)
- (4) W.P.C.Stemmer, *Rapid Evolution of a Protein in vitro by DNA shuffling. Nature*, **340**, 389-391 (1994)
- (5) T.Aita and Y.Husimi, *Fitness Landscape of a Biopolymer Participating in a Multi-Step Reaction, J.Theor.Biol.*, (submitted)
- (6) T.Aita, Y.Husimi, *Adaptive Walk on the Mt.Fuji-type Fitness Landscape, J.Theor.Biol.*, (submitted).

ウイルス型対応付けの有効性

伏見 譲、鈴木美穂、根本直人* (埼玉大・工、*現在・三菱化学生命研)

実験室の中でダーウイン進化する高分子系を作るにはどのような物理化学的条件を満たせばよいかを考察した結果、5つの条件がまとめられた。

①非平衡開放系、②自己増殖系、③突然変異系、④遺伝子型と表現型の対応付け戦略をもつ系、⑤配列空間上の適応度の地形が適切な系

④は、淘汰における遺伝的フィードバックにとって必須である。本研究では、④の進化分子工学における有効な戦略と、その生命の起源における役割について論ずる。

1. 第二のコーディング機構: 遺伝子型と表現型の対応付け

進化分子工学は、進化の表現として、適応度地形を導入したが、この他にも、進化分子系の枠組み自体の進化にも示唆を与えた。特に、遺伝子型・表現型対応付け戦略の進化、あるいは、広く考えれば、コーディング機構の進化に示唆を与えた。

前節で述べた第一のコーディング機構は、遺伝子型を担う分子と表現型を担う分子が同一のRNAであるような、進化RNA工学や、RNAワールドのモデルに対しては完全なものである。しかし、現在の生命世界では、少なくとももう一つ、塩基配列とアミノ酸配列間の第二のコーディング機構を持つ。進化分子工学でも、タンパク質を進化させるとき、この第二の機構のどれかを使うわけである。その機構として、ウイルス型、細胞型、外部知性型と呼びうる3種の戦略が使われてきた(序論参照)。フェージ提示法の成功からわかるように、核酸と蛋白を結合させて対応づけるというウイルス型戦略が最も効率がよい。

2. ウイルス型対応付けのモデルと最初の翻訳産物蛋白

我々はこの戦略が、生命の起源の翻訳系の起源でも働いたとするモデルを、次のような仮定のもとに作った。

(仮定1)RNAワールドの末期、RNA自己複製リボザイムがハイパーサイクルを形成していた。

(仮定2)最初の翻訳蛋白はそのRNAレプリカーゼ・リボザイムの補因子として出現した。ごくわずかの翻訳能は、RNAワールドのRNA取り扱い技術の進化に付随して生じた。

(仮定3)翻訳蛋白と遺伝子RNAは結合体を形成していた(ウイルス型対応付け)。

(仮定4)淘汰環境はRNA数一定のフローリアクターとする(タービドスタットモデル)。

この結合体は最初のウイルス粒子であり、RNAワールドの海に寄生して増殖する。このような生命体(ウイルス様メンバーを持つハイパーサイクル)の突然変異体間の個体群動態学をコンピュータシミュレーションで調べると、次のようなことがわかった。

(1)ウイルス様メンバーは、たとえ翻訳能の未熟さゆえにRNAメンバーよりはるかに適応度が低くても、RNAワールドへの寄生として、安定に存在できる。

(2)ウイルス型対応付けのおかげで、淘汰における遺伝的フィードバックがかかり、このウイルスの

進化を要として、複製能と翻訳能が共進化しうる。RNPワールド初期はRNAワールドへの寄生としての、このウイルスの世界と考えてよい。

(3)ある程度合理的な条件設定のもとでは、一般に、細胞型対応付けより、ウイルス型対応付けの方が淘汰速度がはるかに速い。ウイルスや細胞の定義を、このように遺伝子型表現型対応付けの面から進化機構論的に行うと、素朴な通説とは逆に、細胞よりウイルスの方が先に出現したとする説が合理的となる。

3. in vitro ウイルスの開発

前節のモデルは、翻訳蛋白と遺伝子RNAの結合様式の具体的分子機構を問わない理論である。しかし、進化分子工学では、無細胞翻訳系におけるmRNAと新生蛋白を結合する具体的分子機構を開発する必要がある。このプロセスの開発に成功すれば、in vitro ウイルスと呼ぶにふさわしいウイルス様生命体がすぐ構築できる。これは宿主が試験管であるウイルスであり、実験者の望む方向に高速進化する。mRNAと新生蛋白の結合体はそのVirionであり、新生蛋白は、in vitro ウイルスのコート蛋白といえる。そのライフサイクルは、Virion 作成プロセス⇒アフィニティクロマトなどによるVirionの蛋白部分による評価⇒優良評価VirionのRNA部分のRT-PCR⇒T7RNAポリメラーゼによる転写⇒Virion 作成プロセスというサイクルである。このRT-PCRと転写の段階を、3SR(Self-Sustained Sequence Replication)法で置き換える方が自然淘汰法や自動化への発展が望めるので、我々はSP6RNAポリメラーゼを用いた長期間安定な3SRの開発も進めている。

多くの研究者がこのVirion 作成プロセスの開発に取り組んでいるが、我々は、大きく分けて2種の方法を検討した：

(1)分子Aと分子Bが強固な特異的結合をすとしたとき、mRNAの3'末端近傍にB模倣ペプチドをコードしておき、mRNA3'末端に共有結合したAにより、新生蛋白C末端近傍でmRNAと結合させる技術の開発に取り組んできた。A=アビジン、B=ビオチンの場合は、模倣物との結合を強くすることが困難であることがわかってきた。

(2)mRNAの3'側にサプレッサーtRNAを結合しておく系である。このtRNAとしては微量塩基を含まぬ転写産物自体がアダプター機能を持ちうるものを用いる。柳川弘志班員との共同研究の結果、このtRNAの3'末端の構造をdC-Pur(ピューロマイシン)に転換したものを用いると、収率はかなり少ないものの、mRNAと新生蛋白の結合物が得られた。さらに、サプレッサーtRNA部分を省略したほうが、収率が上がるのがわかった。

文献

Nemoto, N., Husimi, Y., A Model of the Virus-type Strategy in the Early Stage of Encoded Molecular Evolution, *J. Theor. Biol.*, **176**, 67-77 (1995).

進化分子工学を利用したタンパク質の安定化

大島 泰郎 (東京薬科大学生命科学部)

1 研究の目的と背景

好熱菌の生産する酵素やtRNAなど生体高分子は、例外なく熱安定である。しかし、その機能は常温菌の相当する分子と変わらない。すなわち、機能は保ったまま、耐熱性を獲得している。この機構が明らかになれば、進化の過程について分子レベルでどのような変化を伴っているかを語る事が出来る様になるだろう。さらに、この過程の分子レベルの解明は自然の設計原理を学ぶことであり、タンパク質の立体構造維持の原理の解明に繋がる。タンパク質の耐熱化の研究は、これら二つの純理学的な重要課題に直結しているだけでなく、応用生化学の上からも重要である。好熱菌酵素などの耐熱化の機構が分かれば、これを利用して触媒機能を損なわずに酵素を耐熱化するための人為設計の技術を向上させることができる。

好熱菌の熱安定な酵素の耐熱化機構は完全には分かっていない。分子機構に関して多くの提案がされているが、それに基づいて分子設計を行っても、必ずしも酵素タンパク質の安定化に成功するとは限らない。このような耐熱タンパク質に関する研究の壁を破る一つの道は、無作為な変異体プールを作成しその中から目的の物性や機能を獲得した変異タンパク質を選択すること、すなわち「進化分子工学」の手法を用いて、人工的な強い選択圧のもとの実験室内進化を行わせることである。この考えのもとに、本研究においては高度好熱菌内で酵素の進化的な耐熱化を行った。モデル酵素として好熱菌と常温菌の合いの子、すなわちキメラの3-イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼを選び、実験室内進化により耐熱化を試みた。

2 イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ

イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼはロイシン生合成系の酵素である。この酵素の活性を欠くと、ロイシンの存在しない培地の中では生育できない。すなわち、この酵素の活性を指標にすると、強い選択圧をかける事が出来る。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の生産するイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼは90℃まで安定である。本研究において用いたキメラ酵素は、N末側から約20-40%の領域のみが常温菌である枯草菌のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子によりコードされ、残りの部分は好熱菌の遺伝子にコードされている。このキメラ酵素は、好熱菌の酵素に比べ約20℃ほど変性温度が低下している。

野生型の好熱菌酵素もキメラの酵素も結晶化され、立体構造がX線解析により決定されている。本酵素タンパク質は、同一のサブユニット2ヶからなるダイマー酵素であり、各サブユニットは二つのドメインに分けられることが明らかになっている。各サブユニットは、345アミノ酸残基からなり、活性中心はドメイン間の深い割れ目に存在する。

キメラの酵素の骨格は、高度好熱菌の酵素とほとんど同じであるが、2カ所のみ異なっている。すなわち、座位 80 付近のループと座位 110 から 114 に至るループ部分の骨格が異なり、また、この部分が最も揺らぎが大きい。

3 進化的分子工学実験

高度好熱菌 *Thermus thermophilus* は 85°C まで生育可能な細菌であり、グラム陰性の桿菌である。この好熱菌は研究に広く用いられているが、の生産する酵素、タンパク質、tRNA など生体高分子はすべて耐熱性である。特に、外来の DNA を染色体に簡単に取り込む性質がある。すなわち、外来の DNA と染色体 DNA に塩基配列上共通な配列があると、その部分で DNA を取り込み形質転換がおこる。この性質を利用すると、染色体 DNA への組み換え系が簡単に作れる。進化分子工学手法により酵素タンパク質を安定化しようとするときは、安定化により細胞内に保持された酵素タンパク質の活性がないと、菌が死滅するような培養条件を選び強い選択圧をかけるが、その際、プラスミドなどコピー数に変異すると、見かけ上生産量の上昇した酵素は安定化された酵素と活性の上で区別がつかない。このため、染色体内への組み込み系が必要である。

われわれは高度好熱菌 *Thermus thermophilus* を宿主として用い、その染色体への組み換え系を開発した。ジーンターゲティング法と呼ばれる方法で、高度好熱菌の染色体 DNA からイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼをコードしている遺伝子 (leuB 遺伝子) の全体を取り除き、これを宿主とした。その遺伝子の上流と下流の配列の間に、取り上げたい遺伝子を挟めるようなベクターを用意した。この系を用いると、任意の遺伝子を高度好熱菌の染色体内のロイシン・オペロン内に組み込み、オペロンの上流にあるプロモータの働きのもとで発現させることが出来る。

キメラ酵素は 70°C まで安定である。開発された系を用いて、キメラ酵素遺伝子を高度好熱菌の染色体に組み込むと、得られた転換株はロイシンのない合成培地では 70°C までしか生育できない。しかし、転換株を 75°C とか 80°C といった高温下に保っていると、やがて耐熱化した変異株が出現し活発に生育してくる。すなわち、強い選択圧のもとで「進化」が起こる。

この様にして選択されてきた変異株を分離し、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼを抽出し、安定性を測定すると、いずれももとのキメラ酵素より熱安定性が改善されていることを確認できた。

選択されてきた変異体のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼ遺伝子を単離して解析したところ、そのひとつはアミノ酸配列上 93 位のイソロイシンをロイシンに置換していた (I93L)。高度好熱菌の酵素では 93 位はロイシンだから、実験室内進化は天然と同じ配列を導いたといえる。

別の耐熱化変異体は 172 位のアラニンをバリンに置換していた (A172V)。予想外にも、この座位は好熱菌遺伝子によりコードされている部分に存在していた。この変異体は、高度好熱菌の野生型のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼもさらに安定化できる可能性を示唆している。野生型イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼに変異 A172V を導入したところ、予想通り高度好熱菌の酵素を人工的に安定にすることに成功した。

なお、自発的な変異においては特定の座位の置換が繰り返し得られるので、PCR を利用したランダムな変異を用意するなど、工夫した実験も行われた。

4 耐熱化の機構

I93L はなぜ耐熱化されているのだろうか？この座位は酵素タンパク質分子の内部の疎水性領域にあり、イソロイシンはいくらかロイシンより疎水性が高いから、変異により疎水コアの疎水性は幾分か低下したと予想できる。したがって、熱安定性はむしろ低下すると考えて当然である。

この説明を求めて、I93L が結晶化され、立体構造をX線回折により調べた。その結果、もとのキメラ酵素では93位のイソロイシンは53位のフェニルアラニンと立体障害を起こし、このため側鎖の立体配座は異常に歪んでいたが、この障害はロイシンに置換することにより解消されることが分かった。このような僅かな変化が分子全体の安定性に影響するので、安定化の分子設計は容易でなく進化分子工学手法の有効性が証明された。

なお、I93Lを走査示差熱量計(DSC)を用いて解析することにより、第1ドメイン(93位は第1ドメインに属する)がより安定化されていること、言い換えると置換の効果は第1義的には局所的であることが示唆された。

A172Vでは、172位のアラニンの側鎖周辺に僅かな間隙が存在し、これがバリンに置換することにより埋められると解釈された。この解釈が正しいならば、バリンより側鎖の嵩高いロイシンやイソロイシンでは逆に不安定かを招くと予想された。この仮説を証明するために、A172L や A172Iが作られたが、予期に反してこれらはA172Vよりさらに安定であった。この説明を求めて、これらの変異酵素タンパク質の結晶構造解析が進められた。その結果、172位に大きな側鎖のアミノ酸残基(たとえばロイシンやイソロイシン)を導入すると、二つのドメイン間がせばまり、閉じた形のタンパク質に変化し、ドメイン間の相互作用が増して分子全体はより安定になると解釈された。このような変化も分子設計からは予測されにくく、進化分子工学のみが導く変異体である。

5 将来の展望

進化実験のすばらしい点は、理論からは予言しにくいイソロイシンからロイシンへの置換を見つけだすことである。この置換はいくぶんか疎水性を減少させるから、今までの理論設計では思いつかないタイプの変異である。イソロイシンでは近くのフェニルアラニンとぶつかっていたのが、ロイシンでは衝突が回避される。疎水性の僅かな増加より、立体障害を回避することが安定化により大きく貢献しているのである。こんな僅かな変化がタンパク質の安定化に重要であるから、安定化の分子設計は容易ではない。

もう一つの172位のアラニンからバリンへの置換体は、当初、X線による構造解析と熱測定から、疎水コア中のわずかな空隙を埋めることが、耐熱化の機構と推定された。この推論を証明するために172位のアラニンをさらにロイシンやイソロイシンに置換した。空隙はバリンにより埋められるが、それより大きな側鎖を持つイソロイシンやロイシンでは逆に立体障害を起こして安定性は低下すると予測された。しかし、実験結果は予測を裏切り、更に安定化していた。この理由を探るために、172位のロイシン置換体についてX線結晶構造解析が行われ、その詳細な立体構造から、二つのドメイン間を閉じることで予想された立体障害を回避していることが分かつ

た。これも、あらかじめ予測しがたい結果であり、進化分子工学手法がタンパク質の物性や機能改変に有効であることを示唆している。

その後、キメラのイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼだけでなく、大腸菌や枯草菌のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼの耐熱化にも成功した。これも、分子設計では難しく、進化分子工学手法を用いることにより容易に成功することが出来た。

キメライソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼを耐熱化するのとは逆の実験が企てられた。すなわち、大腸菌の染色体を加工し、好熱菌の酵素遺伝子を組み込めるようにした。こうして、好熱菌の遺伝子を大腸菌内で常温適応させる実験系を開発し、これを利用して、高度好熱菌のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼを常温適応させることにも成功している。驚いたことに、35-40℃における触媒活性を向上させた「常温適応」した好熱菌由来のイソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼの耐熱性はもとの野生型酵素と同じであった。このことは、低温における触媒活性の向上と耐熱性の間には「取り引き」がないことを意味している。

さらに、進化的分子工学の方法が特定の遺伝子や遺伝子座位に限らないことを証明するため、ピリミジン生合成系の遺伝子座位を利用する系も作成した。また、酵素として、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼに限らないことを示すために、カナマイシンヌクレオチジルトランスフェラーゼも用いられた。原理的には実験室内進化実験はどの座位も、どの酵素にも適応可能な系である。

進化分子工学実験にも欠点がある。これまで多くの変異体が分離されてきたが、必ず一塩基置換による変異体に限られている。二塩基置換体は得られていない。もちろん、理論的には変異体のプールを大きくすればよいことには違いないが、膨大な実験が必要となり実際的でない。これを解決する工夫が必要である。

モジュールの組み合わせによる蛋白質設計

郷 通子 (名古屋大学大学院 理学研究科 生命理学専攻)

蛋白質はコンパクトな構造部品「モジュール」に分解できる。一方、遺伝子のイントロンはモジュールの境界によく対応していることが数個の蛋白質でわかっている。すなわちエキソンが単一または連続したモジュールをコードしている。

イントロンは蛋白質をコードするエキソンを、さまざまな形につなぎ換えるためのデバイスとして位置づけられ、「エキソンのかき混ぜ」の概念が提唱されている。生物はエキソンのかき混ぜにより、新しい蛋白質を獲得してきたとする考え方である。モジュール境界とイントロン位置の対応は、「エキソンのかき混ぜはモジュールのかき混ぜ」であることを示している。エキソンの混成が新規蛋白質を生み出すためには、エキソンがコードする蛋白質セグメントが、機能や構造の単位に対応していることが必要である。モジュールは蛋白質の構造部品として立体構造情報から定義される。

生物が行った新しい蛋白質獲得の手段すなわち、進化の道筋に従って、あるいは進化とは全く異なった道筋で、蛋白質を設計できるかどうかを知ることを目的として、本研究を行った。この目的に対応して以下の成果が得られた。

研究成果は、(1)モジュール同定法の完全な自動化、(2)モジュール境界とイントロンの相関を統計的に検定する方法の開発、(3)単独モジュールの力学的安定性、(4)モジュールの分類と共有、(5)機能未知の蛋白質の機能推定、(6)挿入モジュールと蛋白質設計、(7)モジュール置換による蛋白質デザイン、(8)モジュールを欠失させたミニ・蛋白質：デザイン、安定性の評価、化学合成、構造決定、機能測定である。各項の内容は以下の通りである。

(1) モジュール同定法の完全な自動化

これまでの方法では困難であった、蛋白質の両末端モジュール同定法を開発した。この自動化された方法により、立体構造が既知の蛋白質をモジュールに分解した。

(2) モジュール境界とイントロンの相関を統計的に検定する方法の開発

2項分布により、イントロンとモジュールとの相関を検定できることが分かった。さらに解糖系酵素において、モジュール境界と遺伝子上のイントロンの位置と

の対応を調べた結果、統計的に有意な相関が得られた。この結果は、イントロンがランダムに遺伝子に挿入されたとする「イントロン後生説」では説明が難しく、イントロンが遺伝子の創成時にすでに存在したとする「イントロン早生説」を支持する。原核生物では遺伝子のイントロンが失われたこと、「エキソンのかき混ぜ」は「モジュールのかき混ぜ」であり、モジュールが蛋白質の、古くからの構築部品であることを強く支持している。

(3) 単独モジュールの力学的安定性

モジュールを部品として蛋白質をデザインするためには、モジュールが組み込まれる場所や他のモジュールとの相互作用によって部品としての形が大きく変わるようなことがあってはならない。モジュールがこの性質を満たしていること、すなわちモジュールの立体構造は主にモジュール内部の相互作用によって決まることを明らかにした。すなわち、RNase の一種であるバルナーゼにおいて、切り離した単独モジュールのほとんどが力学的に安定であることを、真空中と水中での分子動力学計算を行って示すことができた。

また、バルナーゼの単独モジュールM1を化学合成し、その溶液構造を2次元NMR測定により決定したところ、天然のバルナーゼと同じ位置に2次構造を形成していることがわかった。これらの結果から、モジュールを単位とする蛋白質デザインのために必要な構造基盤が得られた。

(4) モジュールの分類と共有

イントロンは蛋白質の部品「モジュール」の境界によく対応していることから、分子進化において、モジュールが「かき混ぜられた」基本構造部品であることが明らかになってきた。本研究の目的の一つはモジュールを分類し、機能の異なる蛋白質間に共有されるモジュールを明らかにすることであった。成果はモジュールを分類できる見通しが得られ、すでにモジュールの一部がカタログ化できたことである。得られた具体的な成果を以下に述べる。

(4. 1) モジュールの分類法の確立：(3)によって、他のモジュールから切り離した単独モジュールが力学的に安定であることを、分子動力学計算の結果から示せた。すなわち、部品として機能するため必要な性質として、モジュールの立体構造は内部の相互作用によって決まることが明らかになった。従って、モジュールの分類は立体構造に基づいて行うのが合理的であると結論できた。

(4. 2) モジュールの分類：アミノ酸配列の一致度が40%以下である蛋白質7

7個についてモジュールを同定し、得られた950個のモジュールを分類した。モジュールが3個以上含まれるグループが66種類特定された。しかし、どのグループにも属さないモジュールが存在している。

(4. 3) 蛋白質間でのモジュール共有：同じグループに属するモジュールが複数の蛋白質に共通に使われていることが明らかになった。これらのモジュールの中には、機能が明確に規定されるものが多くあり、モジュールのかき混ぜが起きたものと解釈できる。ヘリックス・ターン・ヘリックス・モジュールには、異なる機能を持つモジュールへの分化が見られた。転写因子は塩基認識モジュールとリン酸基結合モジュールとの組み合わせであること、原核生物由来の2種類の転写因子と真核生物由来のDNAポリメラーゼ β との間に、共通のリン酸基結合モジュールが見つかった。これはモジュールのかき混ぜの痕跡であることが示唆された。DNAポリメラーゼ β 遺伝子のイントロンはモジュール境界とよく対応していた。

(5) 機能未知の蛋白質の推定機能

プラスチドの転写産物IRF170がコードする蛋白質がホメオドメインとの類似性をもつことを明らかにした。IRF170がプラスチドの分化を制御していることが示唆され、IRF170の一個のイントロンは、アミノ酸配列の挿入の位置とよく対応していた。

(6) 挿入モジュールと蛋白質設計

生物進化の過程で生み出された、モジュールを単位とした蛋白質デザインの例を、シスチンノットファミリーとアデニル酸キナーゼに見出した。カイコ変態ホルモンPTTHの1次構造とジスルフィド結合の架橋パターンに基づいて、PTTHがヒトの神経成長因子 β -NGFや、脊椎動物の発生・分化を決定するTGF- β 、血小板由来成長因子PDGF-BBと同じくシスチンノットファミリーのメンバーであると予測した。これらのホルモンと成長因子の祖先型遺伝子は脊椎動物の出現以前に存在し、それぞれの蛋白質へと発散分岐したことが示唆された。この過程で、シスチンノットファミリーのモジュール構成を比較したところ、 β -NGFは他のメンバーが持たないモジュールを余分に持っていることがわかった。一方、アデニル酸キナーゼは原核生物から、植物、動物まで広く分布する酵素であり、短いタイプと長いタイプのアイソザイムが存在する。これらのアイソザイムの分子進化系統樹を描き、真核生物と原核生物の分岐以前の早い時期に遺伝子重複が起きたとの結論を得た。アイソザイムの違いはモジュールの欠失・挿入が中央付近に存在

することである。挿入モジュールは特異的機能または機能調節に働いていると示唆される。蛋白質のデザインに際して、機能の付加はモジュールを付加することで達成できることを示している。

(7) モジュール置換による蛋白質デザイン

モジュールを移し変えて蛋白質の機能を変えることができるか？この設問に答えることは、モジュールを軸とした蛋白質デザイン法を発展させるために、またモジュールが機能の単位であることを示すために大切である。イソクエン酸デヒドロゲナーゼはNADPを補酵素とし、これと相同な酵素イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼはNADを補酵素とする。大島泰郎教授（東工大、現東薬大）グループと共同研究により、モジュールの置換を行って、イソクエン酸デヒドロゲナーゼの補酵素特異性を、イソプロピルリンゴ酸デヒドロゲナーゼのそれへと変換することができた。アミノ酸の置換では、変換を達成できなかった。これは「モジュール1個丸ごとの置換」が、機能変換に有効であることを示している。

(8) モジュールを欠失させたミニ・蛋白質：デザイン、安定性の評価、化学合成、構造決定、機能測定

モジュールを単位とした新しい蛋白質の設計法を実用化するための技術を確立するために、目標としたことは（i）天然の蛋白質からモジュール単位の削除を行い、最小のモジュール構成で安定な立体構造をもつミニ蛋白質を設計、それを作成して構造解析を行うこと、（ii）親蛋白質の機能を保持したミニ蛋白質の設計、作成、構造と機能の測定である。これに関して得られた主な成果は、（i）ミニバルナーゼの基本構造の設計と安定性の評価を行い、（ii）北條裕信博士（大阪市立大）らとの共同研究により、化学合成を行ってミニバルナーゼを調整し、（iii）ミニバルナーゼの構造と活性を測定した結果、M2欠失バルナーゼが安定な3次構造を形成している事が判明した。部位特異的に¹⁵Nラベルして化学合成されたミニバルナーゼの構造を、大久保忠恭博士（北陸先端科学技術大学院大）との共同研究によって、2次元NMRの測定を行った結果、モジュールを1個欠いたにもかかわらず、バルナーゼの3次構造と類似の立体構造を保存していることが明らかになった。また、M1欠失バルナーゼはM1と複合体を形成し、RNA分解活性をもつことが分かった。以上、モジュールを単位とする蛋白質デザインのための構造安定化技術と合成法を確立することができた。

モジュール置換グロビン蛋白質の分子設計

森島 績 (京都大学工学研究科)

1. モジュール置換によるグロビン蛋白質の機能変換

蛋白質の多くは、その詳細な立体構造解析により、連続した10~40のアミノ酸から成る構造単位「モジュール」に分割できることが郷らにより明らかにされた。特に、遺伝子上でのエクソンと蛋白質におけるモジュールとが対応していることは、エクソン混成による蛋白質の分子進化と関連して、蛋白質が新たな機能を獲得する際のモジュール置換の重要性を示唆している。しかしこれまで、実験的にモジュール置換により新規機能を有する蛋白質を設計した例は非常に少ない。そこで本研究室では、モジュール構造が最初に解明され、遺伝子工学的手法による変異体合成が容易であるグロビン蛋白質に着目し、モジュール置換による機能変化を詳細に検討してきた。具体的には、ヘモグロビン α 鎖、 β 鎖及びミオグロビン(Mb)がいずれもM1, M2+M3, M4の四つのモジュールで構成されていることをふまえ、表1に示した5種類のモジュール置換グロビン鎖を作

製し、それらの会合特性つまりサブユニット間認識機能を主に調べた。会合特性の結果を表2にまとめて示す。ここで注目すべきは $\beta\beta\alpha$ 鎖が α 鎖と会合せず、 β 鎖と会合して四量体を形成したことであり、このことは β 鎖のモジュールM4を α 鎖のものに置換することにより会合特性が β 鎖型から α 鎖型へ置換できたことを意味している。同様に会合機能を全く持たないミオグロビンのモジュールM4を α 鎖のものに置換したMbMb α 鎖は β 鎖と会合する機能を獲得しており、モジュール置換により会合特性がミオグロビン型から α 鎖型へ変換されていることが分かる。これらの会合特性変換の結果はモジュールM4がサブユニット間認識機能を主に司っていることを強く指示するものである。しかしながらモジュール置換

により、すべてのグロビン鎖の会合特性が意図したように変換されたわけではなく、 $\beta\beta\alpha$ 鎖の逆パターンである $\alpha\alpha\beta$ キメラ鎖はモジュールM4が β 鎖由来であるにも

表1 作製したモジュール置換グロビン鎖

	M1	M2+M3	M4
$\beta\beta\alpha$	β	β	α
$\alpha\alpha\beta$	α	α	β
$\alpha\alpha\text{Mb}$	α	α	Mb
MbMb α	Mb	Mb	α
MbMb β	Mb	Mb	β

表2 モジュール置換グロビン鎖の会合特性

	+ α	+ β	単独
$\beta\beta\alpha$	-	+(4)	(4)
$\alpha\alpha\beta$	-	+(4)	(4)
$\alpha\alpha\text{Mb}$	-	-	(2)
MbMb α	-	+(2)	(4)
MbMb β	-	+(2)	(2)

+: 会合する
(2): 二量体
-: 会合せず
(4): 四量体

関わらず、会合特性は β 鎖型に変換されなかった。そこで $\alpha\alpha\beta$ 鎖の構造を分光学的手法により調べたところ、 $\alpha\alpha\beta$ 鎖はヘムを1:1に取り込んでいるものの、会合特性変換がうまくいった $\beta\beta\alpha$ 鎖・ $\alpha\alpha$ Mb鎖と比べ二次構造が大きく崩れ、天然型から構造が大きく変化していることが明らかとなった。つまり $\alpha\alpha\beta$ 鎖においては、大きな構造変化のためにサブユニット間認識の機能が十分に発揮されず、会合特性変換が意図したようには変換できなかつたのではないかと考えられる。以上の結果から、モジュール置換がグロビン蛋白質に置いて、会合特性などの機能の変換に有用であるという知見が得られたが、モジュール置換の構造に与える影響を無視することは出来ず、大きな構造変化により機能低下の可能性もあることも示された。

2. モジュールM1・M4同時置換によるモジュール置換グロビン鎖の構造機能改変

Gilbert らによって提唱された、エキソンの組換え、すなわちモジュールの組換えによる蛋白質の分子進化仮説に基づき、ヘモグロビン α 鎖・ β 鎖及びミオグロビンの間で人為的にモジュール置換を行い、その構造と機能が天然鎖に比べてどのように変化するのかを研究してきた。その結果、いくつかのモジュール置換グロビン鎖は天然鎖のような安定な構造を保持することができず、なかでも α 鎖のM4を β 鎖のM4と置換した $\alpha\alpha\beta$ 鎖の構造の崩れは大きかった。そこで本研究では、Hbの立体構造が形成される際に重要であると考えられているペプチド鎖両末端間のヘリックスのパッキングに着目し、構造を保持した状態でモジュール置換を行うことを目的とした。すなわち β 鎖の両末端を形成するM1とM4を保存したまま、ヘム近傍構造を形成するM2～M3に α 鎖由来のモジュールを組み込んだ $\beta\alpha\beta$ キメラ鎖を遺伝子工学的に設計し、その構造の安定性と会合特性がM4のみを置換した $\alpha\alpha\beta$ キメラ鎖に比べてどのように変化するかを検討した。まず遠紫外部のCDスペクトルを測定し、222nmのモル楕円率から α -ヘリックス含量を見積もると約50%となった。この結果は天然鎖が持つ68～70%には及ばないものの、M4のみを置換した $\alpha\alpha\beta$ キメラ鎖の21%に比べると、大きな二次構造の回復が見られた。また尿素変性実験により、各グロビン鎖の変性の自由エネルギーを見積もったところ、表3に見られるように明らかに $\alpha\alpha\beta$ 鎖に比べ大きくなっており、意図したように天然構造に近づいていることが分かる。そこでこの構造回復が見られた $\beta\alpha\beta$ 鎖の会合特性をゲルクロマトグラフィーを用いて調べたところ、 α 鎖と会合し二量体を

表3 モジュール置換グロビン鎖の安定性 形成したことから、モジュールM1・M4同時置換により会合特性が α 鎖型から β 鎖型への変換がみられた。つまり構造が大きく変化した $\alpha\alpha\beta$ 鎖はモジュールM4を置換したことによる顕著な会合特性変換は起こらなかったのに対し、モジュールM1とM4の同時置換により構造変化を小さ

	ΔG_{H_2O} [kJ/mol]
α	20.9
$\alpha\alpha\beta$	4.8
$\beta\alpha\beta$	10.3

くすることで、モジュールの機能をより発揮させ、会合特性変換が可能となった。以上の結果から、機能変換を目指したモジュール置換において、蛋白質分子内の二次構造間（モジュール間）の相互作用を考慮し、構造変化が最小となるように設計することが重要であることが明らかとなった。

3. $\alpha\alpha$ Mb鎖のカルボキシル末端部の切断による構造・機能改変

本研究では蛋白質上でエキソンに対応すると考えられているモジュールに着目し、機能及び構造解析データが豊富なヘモグロビン(Hb)、ミオグロビン(Mb)間でモジュール置換を行い、新規機能性蛋白質の設計が可能かを検討した。すなわち、Hbの機能や構造に深く関わる会合特性に着目し、Hb α 鎖においてHb β 鎖との四量体形成に重要な水素結合の集中する四番目のモジュールを、構造が酷似しているが会合特性をもたない単量体のMbの四番目のモジュールと置換したChimera α Mb(α Mb, 図1)を作製し、会合特性と構造の変化を検討した。その結果、 α Mbは単独で二量体であり、 α -ヘリックス含量が13%と著しい構造の変化がみられ(図2)、会合特性は失われた。しかし、この会合特性の変化は、モジュール置換に起因するものか、あるいはモジュール置換により蛋白質構造が大きく変化したためなのかは判断できない。そこで α Mbにおいて天然のHb α との大きな違いであり、安定な構造形成を阻害していると思われる、Hb α よりも6個多いカルボキシル末端部のアミノ酸を欠失させたChimera α Mb 141 Lys->term.(α MbT, 図1)を作成したところ、会合特性は消失したままで α Mbより α -ヘリックス含量が39%と増加した(図2)。以上のことからモジュール置換は蛋白質の機能発現に関与し、さらに部位特異的アミノ酸置換を加えることが安定な構造形成に有効であることが示唆され、これらの組み合わせが新規機能性蛋白質の設計手段となりうるということが考えられる。また α Mb鎖から構造が回復した α MbT鎖についても β 鎖との会合特性は失われていたことから、 α Mb鎖の会合特性が α 鎖型からミオグロビン型に変化したのはモジュール置換によるものと考察できる。

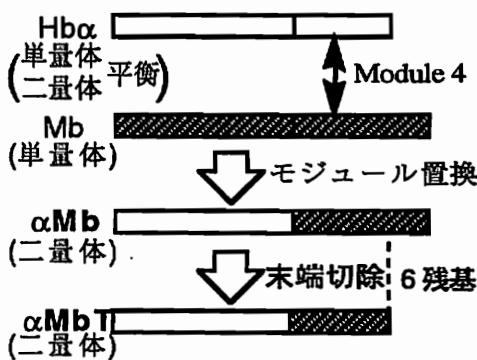


図1 Chimera 蛋白質の作製

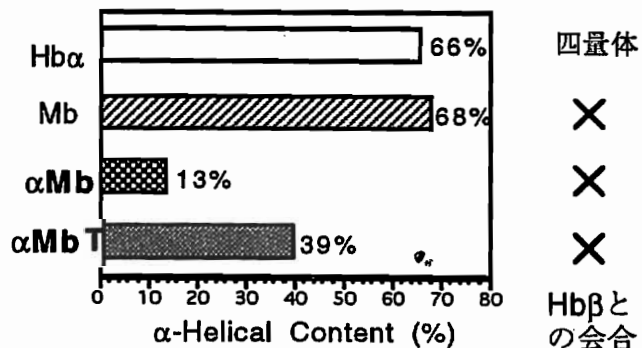


図2 各蛋白質の α -ヘリックス含量

4. モジュール置換及び偽モジュール置換グロビン鎖の構造・機能比較

これまで本研究室では、モジュール構造が最初に発見されたグロビン族 (M1, M2, M3, M4 の四つのモジュールからなる) をとりあげ、グロビン鎖間でモジュール置換することにより、各モジュールがヘムと結合する機能や会合特性を制御する機能を分担していることを示唆してきた。そこで今回は、モジュールの蛋白質の構築原理・機能発現における意義を更に明らかにする目的で、構造的には隣り合った二つのモジュールの真中から真中に対応し、進化的な意味をもたないとされる偽モジュールと呼ばれる構造単位 (今回はM3からM4にまたがる偽モジュール) をヘモグロビン α 鎖・ β 鎖間及びミオグロビンと α 鎖間で置換したグロビン鎖を作製し (図3)、その構造及び機能をモジュールM4を置換した場合と比較検討した。

α 鎖・ β 鎖間で偽モジュール置換したグロビン鎖は天然型・モジュール置換グロビン鎖と同様ヘムを1:1に取り込み、Deoxy, O₂, CO, CN各体において同一の吸収スペクトルを示した。またヘム近傍残基に帰属されるNMRシグナルのケミカルシフトも天然型グロビン鎖と変わらず、ヘム近傍構造が保持されていることが明らかとなった。全体構造に関しても、遠紫外領域のCDス

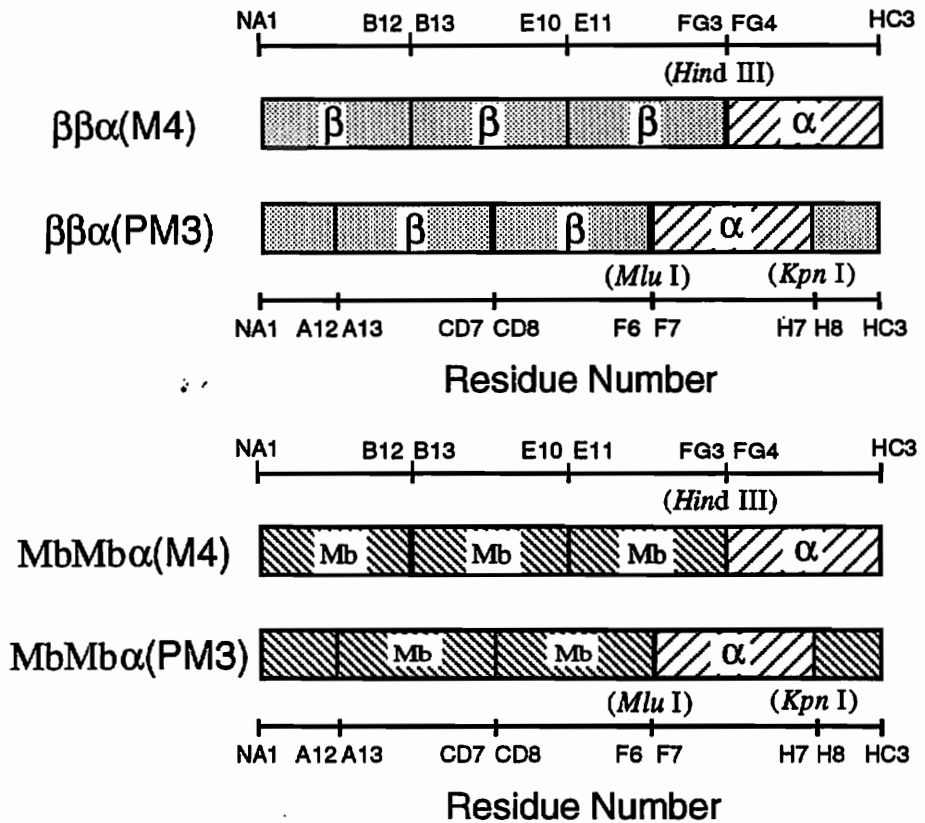


図3 作製した偽モジュール置換グロビン鎖

ペクトルの結果からヘリックス含量が約70%と全く変化しておらず、安定なグロビン構造を形成していることが判明した。一方、会合特性についてはゲルクロマトグラフィーにより検討をおこない、 α 鎖の偽モジュールを導入した β 鎖は α 鎖型の会合特性を示し、偽モジュール置換によっても、モジュール置換同様、機能変換が可能であることが示された。このように進化的意味をもたない偽モジュールを α 鎖・ β 鎖間で置換したグロビン鎖は、予想に反して安定なグロビン構造を保持し、意図した会合特性に変換されていることがわかった。一方ミオグロビンと α 鎖間でモジュールM4を置換したグロビン鎖はCDスペクトルの結果からヘリックス含量が天然型

グロビン鎖に比べ半分以下に減少していたのに対し、偽モジュール置換したグロビン鎖は天然型グロビン鎖と同量のヘリックスを保持しているというモジュール仮説に反する結果が得られた。これらの実験結果はグロビン鎖においてモジュールが必ずしも安定な構造単位さらには機能単位とは断言できないことを示唆していると考えられるが、昨年Trotmanらのグループが今回偽モジュールの境界と設定したF6-F7の境界近傍にもイントロンをもつ生物が存在することを示したことから、本研究の実験結果を改めて考え直す必要性がでてきたと考えられる。つまり郷らの求心性プロファイルでも示唆されているようにモジュールM3はさらに二つのモジュールに分断され、今回偽モジュールと考えたものがモジュールに相当することが事実であるなら、本研究における実験結果はまさに新たなモジュールの存在を支持するものであると解釈できる。

1. 緒言

本研究の目的は、従来は想像もできなかったほどの多くのタンパク質の変異体をつくり、その中から望む機能をもった新規タンパク質を、実験室内で効率的に選び出す進化実験系を構築すること、およびそれを通してタンパク質の構造と機能の創出原理を明らかにし、機能性タンパク質の改良、開発のための方法論を確立することにある。

モジュールは球状タンパク質中の立体的にコンパクトな単位である。モジュールはしばしば真核生物のエクソンに対応する。エクソン・シャッフリング仮説によれば、タンパク質はエクソンのランダムな組み合わせにより進化してきたと考えられている。エクソンやモジュールを軸とする進化分子工学の戦略は、この組み合わせを自然淘汰という長い時間スケールでのスクリーニングに任せるのではなく、積極的に人の手で行うことである。

また、本研究の目的は、アミノ酸レベルの改変でタンパク質を設計する従来のタンパク質工学とは異なり、モジュール、エクソン、二次構造、超二次構造、原始配列ユニットなどの領域を単位とし、その組み合わせで新しい機能をもつタンパク質を設計するための原理を解明することである。それは分子進化の単なる模倣ではなく、進化の過程で実現されることがなかった機能性タンパク質の設計をも可能とする。上記を踏まえ、本研究では、タンパク質の分子構造に基づいて、機能性タンパク質の設計原理の解明に向けて、単位領域の組み合わせによるタンパク質の進化実験系のモデルシステムを開発することを重点的に進める。

これまで我々は、モジュール構成と機能の相関解析に基づくタンパク質設計に関する研究を遂行してきた。これはエクソン=モジュールを単位とするタンパク質の設計原理を解明し、進化分子工学の確立を目指すものである。その第一歩として、リボヌクレアーゼの一種のパルナーゼ (6個のモジュール、M1-M6に分割できる) を取り上げ、そのモジュールの構造と機能について研究してきた。その結果、構造形成に重要な役割をしているモジュール (M1とM5) は水溶液中で自己集合し、ヘリックスやシート構造を形成することがわかった¹⁻⁴⁾。一方、活性部位を構成するモジュール (M2、M3、M6) はリボヌクレアーゼ活性をもっていた⁵⁾。パルナーゼは、進化の過程で単独でリボヌクレアーゼ活性をもつ「機能モジュール」と、それらを寄せ集めるための糊の役目をする「構造モジュール」の組み合わせによりつくられた、と推測できる。

2. マルチリコンビナントPCR法

まず、タンパク質の立体構造的にコンパクトな単位であるモジュールに対応する遺伝子の順序を任意に入れ換えるのに適した方法の検討を行った。すでにクローニングされているパルナーゼの遺伝子から6個のモジュール (M1-M6) に対応する遺伝子をPCRで単独に増幅した。パルナーゼの遺伝子は全長330bpで、各モジュールに対応するDNA断片の長さは、それぞれ72bp(M1)、84bp(M2)、63bp(M3)、45bp(M4)、30bp(M5)、36bp(M6)である。二つのモジュールに対応するDNA断片を互いに連結させ、21種のサブジーン (M1-M2, M1-M3, M1-M4, M1-M5, M2-M3, M2-M4, M2-M5, M2-M6, M3-M2, M3-M4, M3-M5, M3-M6, M4-M2, M4-M3, M4-M5, M4-M6, M5-M2, M5-M3, M5-M4, M5-M6, M6-ter) を作成した。DNA断片が重複するように選んだ6個のサブジーンと両末端のプライマーを用いて、マルチリコンビナントPCRを行った。たとえば、図1に示すように、M1-M4-M2-M5-M3-M6のような順にモジュールを連結させたい場合は、1-4, 4-2, 2-5, 5-3, 3-6, 6-terの6個のサブジーンを鋳型に用いてマルチリコンビナントPCRを行う。重複させるサブジーンの長さは、30~84残基であ

る。マルチリコンビナントPCRの条件は次の通りである。反応液 (50 μ l) は、10 mM KCl、20 mM Tris-HCl(pH 8.8)、10 mM (NH₄)₂SO₄、2 mM MgSO₄、0.1 % トリトン X-100、2% ホルムアミド、50 ng サブジーン、400 μ M dNTP、1 μ M 各プライマー、1 ユニット ベントDNAポリメラーゼを含む。増幅条件は、第1段階 (5 サイクル) 94°C 1分; 53°C 1分; 73°C 0.5分、続く第2段階 (20 サイクル) 94°C 1分、60°C 1分、73°C 0.5分、である。このようなマルチリコンビナントPCRを用い、20種のサブジーンを組み合わせにより計23種のバルナーゼのモジュール入れ換え変異体の遺伝子を構築した (図2)。

3. バルナーゼのモジュール入れ換え変異体の発現と特徴

次に、バルナーゼのモジュール入れ換え変異体の遺伝子を、T7RNAポリメラーゼによる転写調節を受けるように、T7プロモーターの下流に挿入した。入れ換え変異体のタンパク質の発現ブロックをのせたプラスミドを用いて、大腸菌BL21(DE3)を形質転換した。IPTGで誘導すると、23種のバルナーゼのモジュール入れ換え変異体タンパク質は発現し、細胞内に不溶性画分として蓄積した。

モジュールはタンパク質の構造形成単位であるのか、モジュールはタンパク質の構造を考える際の鍵となり得るかについての知見を得るために、モジュール入れ換え変異体タンパク質を精製し、二次構造、三次構造形成などの物理化学的特徴づけについて検討した。その結果、大部分の変異体タンパク質はヘリックスやシートのような二次構造をもっていた。中には三次構造をもっているものもあった。

M1とM2を入れ換えたナバルーセ(nabarse)、M2とM3を入れ換えたバルセーナ(barsena)の詳細な物理化学的性質を調べた。ナバルーセとバルセーナは単量体で、コンパクトな構造をもっていた。ナバルーセとバルセーナは二次構造をもち、さらにバルセーナは三次構造をもっていた。バルセーナの尿素による変性は協同的で、ナバルーセのそれは非協同的であった。バルセーナの変性の自由エネルギーは1.6 kcal mol⁻¹で、野生型バルナーゼのそれは10.3 kcal mol⁻¹であった。ナバルーセとバルセーナの遠紫外CDスペクトルは、野生型バルナーゼのモルテングロビュール状態のそれによく似ていた。しかし、ANSに対する結合性を調べた結果、nabarse、barsena共に溶媒に露出している疎水的クラスターをもっており、ネイティブのパッキングの様式とは異なっていた。barsenaのN末端にリジンを3個つけたもののNMRを測定したが、野生型のようにシグナルがよく分散したスペクトルは得られなかった。

これらの結果は、形成可能な部分的な二次構造が高次構造の形成によらず、部分配列にコードされるかたちで存在することを示している。したがって、高次構造を通じた特異的な相互作用の形成は、局所的構造形成のための必要条件ではないと言える。モジュールシャッフリングにより、局所的な適応度の最適値が数多く存在し、部分変異の導入によりさらに適応度を上げることができる可能性が示唆された。今後、モジュール入れ換え変異体にランダム変異をかけ、触媒機能と安定な構造をもつ変異体のスクリーニングを行う予定である。

4. 結論

動植物などの真核生物では、タンパク質をコードするヌクレオチド配列 (エクソン) は、タンパク質をコードしないヌクレオチド配列 (イントロン) によって分断されている。イントロンの部分は、DNAからRNAポリメラーゼの作用によってmRNAに転写された後、スプライシング過程で切り落とされ、エクソン部分同士がつなぎ合わさり、連続したmRNAになり、タンパク質へと翻訳される。真核生物のイントロンの役割は何であろうか。イントロンの間で不等交差 (互いに等しくない遺伝子の部分間の交換) が起きると、エクソンのまったく新しい組み合わせが

生まれる。一つのエクソンが一つの機能に対応しているならば、イントロンを介したエクソンの「かきまぜ」(シャッフリング)によって、まったく新しい機能をもったタンパク質をつくるのが可能である。イントロンはエクソンの「のりしろ」として真核生物の遺伝子の創成に役立ってきた、と考えられる。つまり、真核生物は、進化の過程でイントロンを介してのエクソンのシャッフリングによって、新しい機能をもつ複雑なタンパク質をつくり上げてきたのかもしれない。真核生物の遺伝子を分断しているイントロンはモジュールの連結点によく対応している。このことは、エクソンの断片がモジュールの断片によく対応していることを示している。したがって、生物進化の過程ではエクソン・シャッフリングによってモジュールの組換えが行われ、タンパク質の高度な機能が誕生した、という仮説が考えられる。モジュールを軸とする進化分子工学は、試験管の中でのエクソン・シャッフリングを実現する。

本研究ではタンパク質の構造単位のモジュールを遺伝子レベルで任意に入れ換える方法論「マルチリコンビナントPCR」の開発に成功した。本手法は、エクソン、モジュール、二次構造、超二次構造のような単位領域の組み合わせで新しい機能をもつタンパク質の創製に役立つ。

今後、種々のモジュール入れ換え変異体タンパク質の物理化学的性質を詳細に調べ、その特徴付けを行い、野生型タンパク質のコンパクトな構造単位「モジュール」に相当するアミノ酸一次配列が、入れ換え変異体タンパク質中でもコンパクトな構造をとり得るかどうかが調べたい。このような証明により、エクソンがコードしているアミノ酸配列が物理化学的な意味をもつようになると思われる。すなわち、遺伝子型のエクソンとその表現型のタンパク質の対応関係の解明である。

引用文献

1. K. Yoshida, T. Shibata, J. Masai, K. Sato, T. Noguti, M. Go, and H. Yanagawa, *Biochemistry*, 32, 2162-2166 (1993)
2. T. Ikura, N. Go, N. Khoda, F. Inagaki, H. Yanagawa, M. Kawabata, S. Kawabata, S. Iwanaga, T. Noguti, and M. Go, *Proteins*, 16, 341-356 (1993)
3. T. Shibata-Seki, J. Masai, K. Yoshida, K. Sato, and H. Yanagawa, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 32, 2965-2968 (1993)
4. J. Masai, T. Shibata-Seki, K. Yoshida, K. Sato, and H. Yanagawa, *Reports Prog. Polymer Phys. Japan*, 36, 657-660 (1993)
5. H. Yanagawa, K. Yoshida, C. Torigoe, J. -S. Park, K. Sato, T. Shirai, and M. Go, *J. Biol. Chem.*, 268, 5861-5865 (1993).

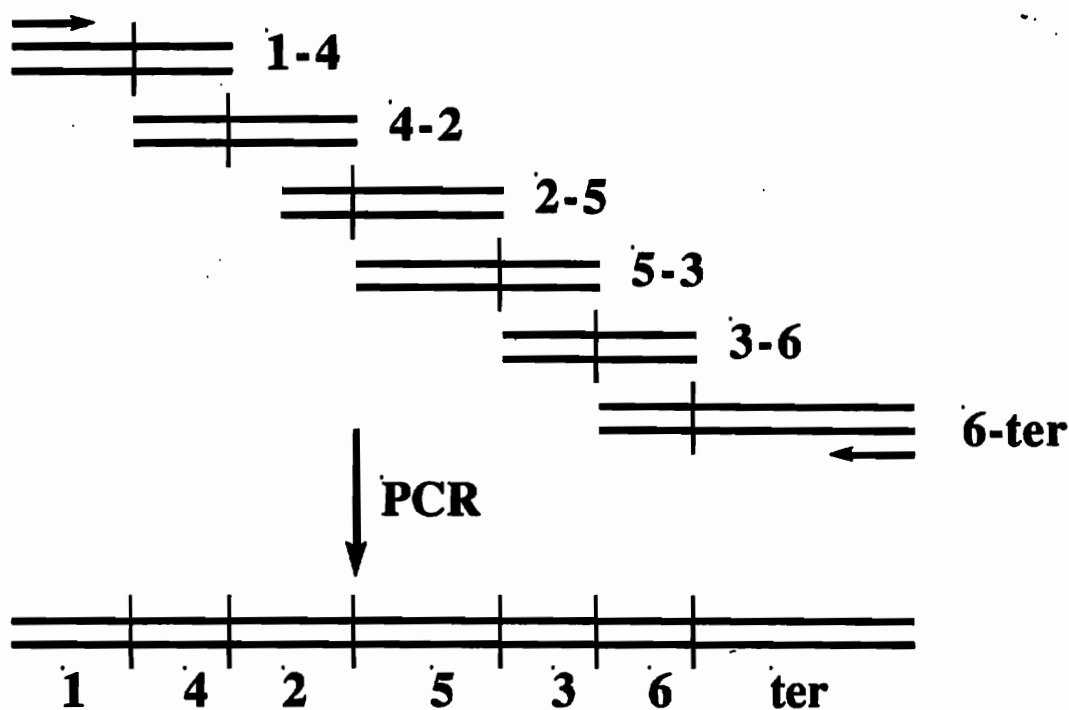


図1. マルチリコンビナントPCRによるバルナーゼのモジュール入れ換え変異体の遺伝子の作製法

Plasmid	Alignment	Plasmid	Alignment
1. pMX A	123456	13. pMX M	142356
2. pMX B	123546	14. pMX N	142536
3. pMX C	124356	15. pMX O	143256
4. pMX D	124536	16. pMX P	143526
5. pMX E	125346	17. pMX Q	145236
6. pMX F	125436	18. pMX R	145326
7. pMX G	132456	19. pMX S	152346
8. pMX H	132546	20. pMX T	152436
9. pMX I	134256	21. pMX U	153246
10. pMX J	134526	22. pMX V	153426
11. pMX K	135246	23. pMX W	154236
12. pMX L	135426	24. pMX X	154326

図2. バルナーゼのモジュール入れ換え変異体

ポリtRNA構造から見た蛋白質構造の構築原理

大西耕二（新潟大学理学部生物学教室）

蛋白質がモジュールやドメインを単位として構築されていることは、Go (1981) のモジュール学説に代表されるように、周知のことから、遺伝子重複やエキソン構造とも深く関わりながら進化してきたものと考えられる。一方、これらの現存蛋白質は、DNAにコードされながら進化してきたのみならず、RNAワールド時代において、すでに原初的蛋白質が合成されていた可能性がある。リボザイムの起源に関する正確な知見はまだ大変少ないが、遺伝装置やさまざまな遺伝子にtRNA様の構造が存在することや、tRNAが遺伝暗号系の中核部において、基本的な役割を担っていることから、tRNAが進化的に最初の遺伝子であったのではないかとの考えが、Eigen & Schuster (1979) をはじめとする何人かの研究者によって提唱されてきた。

リボソームRNA (16S rRNA, 23S rRNA) の中にtRNAと塩基配列類似性の高いセグメントがしばしば見られることは、Blochら(1983,1986)によって早くから指摘されてきた。筆者は、tRNA様の配列が、rRNAのみならず、アデニル酸キナーゼ等の基本酵素の遺伝子配列中に存在する可能性に関心を持ち(Ohnishi 1990; 1992a,b)、原初的なtRNAの祖先型RNA(単に原初tRNAと呼ぶことにする)が、アミノ酸配列をコードする原初mRNAへと進化した可能性の存否について、理論的に可能なモデルを組むことができるか否かを検討してポリtRNA学説を提唱し(Ohnishi, 1993a,b)、検証を進めてきた(Ohnishi, 1992c, 1993c; 大西, 1995a,b)。

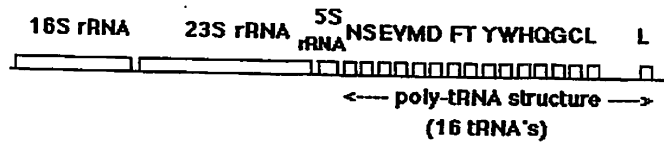
1. ポリtRNAモデル

その結果、ポリtRNAモデル(図1B)を組むことによって、原初tRNAからmRNAへの進化が、矛盾なく進行することが、理論的には十分起こり得たものと想定され、実際にそのようなモデルに基づく進化が起こったか否かを、塩基配列一致の度合いに基づいて、統計的に評価することも可能であることが分かってきた。

このモデルの基本は、図1に示すものである。すなわち、原初tRNAが、mRNAへと進化したとするならば、原初tRNAの塩基配列の3つづつの塩基の並びが、トリプレット遺伝暗号コドンへと進化したことを意味する。すなわち、これらの個々のトリプレットが、それぞれ異なる原初tRNA分子の祖先型アンチコドン域と相互接触した歴史のなかで、原初トリプレットコドン域と祖先型アンチコドン域との間のワトソン-クリック型の水素結合による相互作用の安定化を齎す塩基置換が自然選択されて、コドンとアンチコドンの相補配列が進化し、tRNAのアミノ酸特異性の順序に対応するアミノ酸配列を持つペプチド(図1)では、"NSEVMDFTYWHQ GCLL"の16個のアミノ酸の並びを持つもので、以後、trnD-ペプチドと呼ぶ)の合成が効率的に進化したと考えられる。そこで、図1[A]に示す枯草菌のtrnDオペロン全体の長いRNA転写物を原初ペプチド合成装置の痕跡(レリック)と考え、[B]に見られる様に(後にmRNAへと進化すべき)原初tRNA(図中のtrnD-mRNA)が、ポリtRNA中の2つづつのtRNAの原初リボソーム上の原始Pサイトと原始Aサイトで相互作用して、ペプチド結合を触媒したと考える。このとき、初期においては、tRNAのCCA末端域が、アンチコドン域に近く位置していれば、立体化学的に特異

[A]

trnD operon (Bacillus subtilis)



[B]

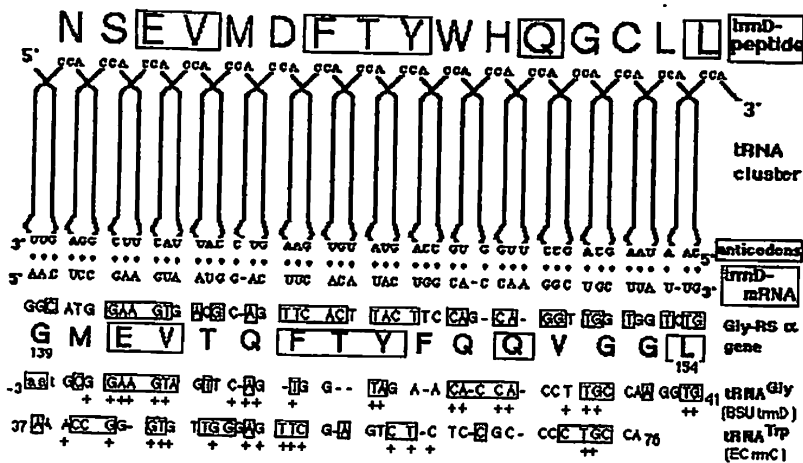


図 1. 枯草菌の trnD オペロン [A] と ポリ tRNA モデル [B].

```

<==== 5'-end of M1 RNA
[rnpB] 1 gaagctgacc apacagtcgc cgcttcgctg tcgtcctctt cggggg-a|gac gg|gcgga-ggg
      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
[rnB] 5872 /gtgtctttac apac-gtggg -ggttcaa-g tcc-cttcat ccgaccca|ttt ct|gcggaagta
      tRNA-Leu ==>| |<====tRNAGly
  
```

```

61 gaggaagtc cgggctccat- agggcagggg gccaggtaac gccgggggg gaaaccc-acg
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  gttcagtggt agaacaccacc ttgccaaggt g-ggggtc gcg-ggttcg -aatcccgtct
  
```

```

121 accagtcca|a cagagagcaa acc|gccgatg gcccg-cgaa gcgggacag gtaagggt-ga
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  tccgtcca|a ctataccatc cac|gccgggg tggggaattg gca-ga-cac acaggacttaa
  tRNA-Gly ==>| |<==== tRNA-Leu
  
```

```

181 aagpgtcgg tagagcgca ccgccc-ggct -ggtacagtc cgtggca|cgg taaact|ccac
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
5846 aatcctcgg taggtgacta ccgtccggtt caagtcggcc ctcggca|tta agtttt|cgcc
  tRNA-Leu ==>| |<====
  
```

```

241 ccggagcaag gccaatagg g-gttcataag gtaccggccc tactgaacc gggtaggctg
  *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  ccgtagctca attggataga ggtt-tgac -tacggtca aaaggttag- gggttcga-
  == tRNA-Arg
  
```

```

301 cttgagccag tgagcgatt|g ctggcctaga tgaatgactg t|ccagcagc aaccggctt
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
  ctctctcgg -gcgcgcca| -tgatctata tgaaa----- t|cgg-gaagt agctcagctt
  tRNA-Arg ==>| |<==== tRNA-Pro
  
```

```

3'-end of M1 RNA ==>
351 a-tcggtcagt ttcacct ( 367) gat ttacgtaa aaccggcttc g/
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
6015 ggtagagcaca tggtttg (6032) gga ccatggggg cgcagg-ttc g/
  
```

Base matches in M1-RNA : 176/341 = 51.6 %

Pnuc (176, 341) = 0.63 X 10⁻²⁵

図 3. M1 RNA をコードする大腸菌遺伝子(rnpB)とtrnB-ポリtRNA 領域(B. subtilis trnB)との相同性(Ohnishi & Suwa, 1997, 発表予定) .

的アミノ酸を受け入れ易いコドン-アンチコドンが選択された可能性も有り得る。しかし、アミノ酸特異性は、それ以前にある程度確立していた可能性も十分あり得る。後者の場合は、塩基置換の選択は、主として、(原初tRNAに由来する)原初mRNA側で進行し、アンチコドン側では保存的に進化したと考えなければ論理矛盾を生ずる。

2. ポリtRNAモデルの検証

さて、trmD オペロンのポリtRNA構造を、そのように捕えると、

(予想 1) 16個のtRNAのアンチコドンの並びと相補的配列を、図1のように作って、trrnD-mRNAと呼ぶことにすると、trmD-mRNAは本来原始的tRNAに由来するものであるから、tRNAとの配列相同性が見られるであろう。

(予想 2) また、trmD-ペプチド由来の現存蛋白を発見できれば、trmD-ペプチド対応域をコードするDNA域には、tRNAとの配列相同性が見られるであろう。

この二つの予想が実際に観察されることは、Ohnishi (1993), Ohnishi & Yanagawa (1997)において、かなり申し分のない程度にまで実証された(大西, 1995)。図1Bでは、trmD-mRNAは、tRNA^{Gly} と最も高い配列相同性が見られる。trmD-ペプチドに酷似するアミノ酸として、グリシルtRNA合成酵素(Gly-RS) alpha-サブユニットの139-154番アミノ酸残基域(7残基一致)がデータベース検索によって得られ、対応遺伝子領域は、trmD-mRNAと(47塩基中)64%の塩基一致を示し、偶然によって同等以上の一致が生ずる確率は、 0.2×10^{-7} である。この他にも、ATP合成酵素aサブユニット遺伝子や免疫グロブリンJエキソンなどにも、trmD-mRNAとの顕著な配列相同性が見られる。

さらに驚くべきことは、これらの遺伝子が、単にtrmD-mRNAや、それと相同性の高いtRNA^{Gly} と配列一致が見られるのみならず、trmD-ポリtRNA構造中の、tRNA^{Gly}を含む、His-Gln-Gly-Cys-Leu-Leu の6つのtRNAとそのスペーサー域を含む長い領域が、そのままグリシルtRNA合成酵素やATP合成酵素の長いアミノ酸域をコードする遺伝子領域となっていることである。この興味深い発見は、初めのモデル構築時点では、全く予想だにできなかったことであり、trmD型のtRNA遺伝子クラスターが、さまざまな基本的遺伝子の基になっている可能性が高い。

実際、trmD型のtRNA遺伝子クラスターは、グラム-ポジティブ菌に広く存在し、グラム-ネガティブ菌でも、一部類似構造が見られる。このことは、tRNA遺伝子クラスターが、蛋白合成装置や翻訳系が完成するよりも前の原型的生命体に既に存在していたことを示唆しているように思われる。

3. エキソン・イントロン構造の下部構造としてのポリtRNA構造

レグヘモグロビン等のいくつかの蛋白質では、モジュールとエキソンが1対1に美しく対応していて(Go, 1981)、モジュール構造はエキソン-イントロン構造を基盤として構築されているかのように見える。何がエキソン-イントロン構造を支配しているのだろうか？

大豆のレグヘモグロビンでは、第3エキソンと第4エキソンの間には弱い相同性が見られ(Ohnishi, 1992a)、いずれかが古い配列をよく保持している可能性に関心が持たれた。そこで、先のグリシルtRNA合成酵素(Gly-RS) alpha-サブユニットのポリtRNA対応域と比較すると、第4エキソンの全体が、Gly-RS alpha の第101-135番アミノ酸域と著しい配列相同性を示した(Ohnishi & Yanagawa, 1997a)。この配列の対


```

              N V R L H    G Q V F L T S W F V I A A L V V L S L L    A    65
F0 a, Syn.  -----CAATATCGG-CTTCA-----GGCCAGTC-TTTTTGACTTCTGCTGCTGAATCCGGCTTGGT-GGTCGTTCTTCT-----GCCGA
vs GlyRS (+)  ++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++
green-sens. opsin - C G P D V F S G S S V P G V Q S Y M I V L M V T C C I T P L / 232 |vs Gly-tRNA synthetase a, (aa) 17/80= 21.3%
                  P C D P C T - E I F Y D / 187
AlaRS, EC    -TCCTCCGACCCGGTAC-----GAAA-TTTCTA-CGAT/
              E C K P V T G E I T Y G L E R L A M Y I Q G V D S V Y D L V W S D G P L G K T T Y G D 197
GlyRS, EC    -ATGTA AACCCGTTADGGAGAGA-TACCTA-CGG-TGTGGACGTGGCCATGTAATTGAGAGCGTA-BAGCCGTTTACGAG-TGGTTGGAGGACCGGTCCTGGGTA AAAACCTACCGCA
vs U1 (soy)    0000 00 0 0 00 0 0 0 0 0 0 0000 000 00 0 000 00 00 0 000 00 00 0 (GlyRS/U1, 78/159 = 47.8%)
U1 snRNA (soy) ---GAAATAA-CCCT-DAGGCAUGA-GGAGCG-GCCUUCUUGAGUUGUCCAAGUG-G-CAGAGCCUA-CGUCUAAAUUGGUUAUGGGGCCUGAUUDCCGCGCCCTCUC 162(3') 55/156 = 34.6%

lectin BRA3-1 - E N Q D C - G V V N Y D / 131 (amino acid match to GlyRS = 13/34 = 38.2 %)
lg V-HI Sie    V S S G S 124
lg V-HI Sie    V S S G S 124
              V T A G K N
J-H (shark)    CTGATTCAGGTGGAAATatgcaatgattcaatgag- [ vs trrnD : 31/75 = 41.3 %, Pnc(31,75) = 0.14 X 10-2 ]
              V T V
J-H 7 (Xenopus) ATAAATCAggtg-ctctc/ [ vs trrnD : 43/79 = 54.4 %, Pnc(43,79) = 0.22 X 10-7 ]

trrnD, BSU    GTCCGGGTTTCCGAATCCGCTCTCCGCT-CCAatta-cGG-G-GCA-TAGCCAAGT-CGTA-AGGCAGAGTCT-CAAAAACCTTTATCCCGG-GTTTCCAATCCGGTGTCCGCTTcttattgCCGGGTTGGTGA 1555
              tRNA-Gly ==> <=== tRNA-Cys tri tRNA-Cys ==> <=== tRNA-Leu

tRNA-Asn,BSU  GTCGTAGGTTCCAAATCAGTCTGAG-CGA-cttttGGA-A-AGC-TGTGAGT-GTCCCAAGGACCAATGCAATGCTTAGC-CG-T/ +51 (tRNA-Ser in trrnD)
tRNA-Ile,BSU  AT-CTTCGATCTATTCAGGTTCA-CATgacttcattCCCGCATGCTCAGT-GG/ +19 (tRNA-Asn in trrnD)
tRNA-Trp,BSU  GT-CTGTTCCGATCTACTGCTCCGTC-CAaaat/

F0 a, Syn.    N R N L Q R I P S G L O N F M E Y V L D F I R N L A R T O I G E K E Y 100
vs GlyRS (+)  -TCGAT-TTCAGCGATCC-CCCGCT-CCAG-ATTTATGAGAT-AG-TTC-GGACTT-DATCCATCCCTGCC(-----158 gaps-----)GCCACTAGTCCGAAAAGGAATATC
              ++ + +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++
              V F H Q N E V E Q S T Y N F E Y A D V D F L F T C F E Q Y E K E A 130
GlyRS, EC    -CTTTCCTCAGAGGAGTGGGAGAGTCCACTTAC-AGCTTC-CAAT-AGC-CGGGTTGGACTT-CTG-TTCCAGTCT(-----158 gaps-----)CG-AG-DATTA-BAGAAAGAAGCCG

trrnD, BSU    ATTGCGACAGACA-CAGGACTTAAA-ATCCTCCG-GTAGGTGACTAC---CGTGCCGGTTCAAGTCC-GCC-CCTC-GGCACCAattt(....158 bases....)ctt-GCCGGTGTGGCC-GAATTG--- 1913
              tri tRNA-Leu ==> <=== tRNA-Leu

F0 a, Syn.    R P W V P F I G T L F L F I F L S N W S G A L I P W K L I K L P S G E L A A P T S D I N T 145
vs GlyRS (+)  GTCTTCGTTCTGTTTATGGTACCCGTT-CTGTTTATTTCCGTTCCAAATGCTGTCGGCTC-TTATCCCTTGGAAAGCGAGTACGCTCCCTCAG-CCGATTCGCTCCCGGACCGTGAATGAATGA
              + + +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++
              Q Q L L A L E N P L P L P A Y E R I L K A A H S F N L L D A R K A I S V T E R Q R 271
GlyRS, EC    AECAGCTGTGGCTGGAATAATCCGCTCCG-CTGCCAGCTAGACTGATTTGAAGCCCGCC-AGAC-----TTCCACTGCTGATGCGCGTAAGCCATCTCCCTCCAGCCCTAGCG

trrnD, BSU    -GCAGACCGCCAGACTCAAATCCTGTTCTTCTGG-AGTGTCGGTTCGACCCG-GACCACCGGTAactggaaaaaccgtttcttaacagaaaccggtttttttttttattaaga-aaggagcctcggtc 2045
              tri tRNA-Leu ==>

F0 a, Syn.    T V A L A L L I S L A Y F Y A G E S R K G L G Y F / 170
vs GlyRS (+)  TACCGTA-CGCG-TC-CCATATGACTCF-----CTGGC-DACTTTCAGS-----CGTTCAGC-CG-AGAGGCTGCAATTT/ 217/479 = 45.3%
              ++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++ +++++
              Y I L R I R T L T K A V A E A Y Y A S R E A L G F P M C N K D K trm 303
GlyRS, EC    TACAATTCGCGTTT-GA-CCCTGACAGACAGTGGCAGAGGCA-TAG-TACCTTCCCTGTC-----BAGGCTT-CGGTTCGCCATGTGC-ACCAAAGATAACGAAG/ 239/472 = 50.6%
              TACAATTCGCGTTT-GA-CCCTGACAGACAGTGGCAGAGGCA-TAG-TACCTTCCCTGTC-----BAGGCTT-CGGTTCGCCATGTGC-ACCAAAGATAACGAAG/ 283/631 = 44.8%

trrnD, BSU    ctttttatacttactcagcg-tattggtctaggatctc-ttctagcactcttcta-gctctctgtatcttcaagctctgattggctgaacggagcgtacaagctgttctcgtc/ 2160

```

図2. 枯れ草菌 (*B. subtilis*) *trrnD* オペロン中の ポリtRNA領域 (tRNA^{His-Gln-Gly-Cys-Leu-Leu}) とさまざまな遺伝子との相同性 (前ページからの続き)

応を、DNAレベルで対応させて見ると、レグヘモグロビン遺伝子の第4エクソンの5'末端は、His-Gln-Gly-Cys-Leu-Leu のポリtRNA構造の中の tRNA^{Gln} の5'末端と1塩基のずれもなく正確に一致しており、tRNA^{Gln} とそれに続く spacer 域と、さらに続く tRNA^{Gly} の5'末端18塩基領域に対応している。第3エクソンでは、エクソンの3'末端は、tRNA^{Gly} の5'末端域を含んでいない。このことは、レグヘモグロビン遺伝子の第3、第4エクソンが、基本的には tRNA 一個分に対応していることを如実に物語っているのみならず、少なくとも第4エクソンは、trnDオペロンの tRNA^{Gln}の相同物であることが確実である。第3エクソンはその重複エクソンであるか、または別のtRNAに由来するものであるかの、いずれかであろう。

アフリカツメガエル免疫グロブリン J-H エクソンでも、エクソンの5'末端は、trnDオペロンの tRNA^{Gly}と、1塩基のずれもなく正確に一致しており、エクソン全体は、tRNA^{Gly} よりも14塩基程度短いのが、J-H エクソンの本来の姿であることが、ヒトJ-H エクソンとの比較から推測される(Ohnishi & Yanagawa, 1997a)。

ここに示した二つの例は、1つのtRNAが、1つのエクソンに進化して、しかもレグヘモグロビンでは、典型的な1つの蛋白質モジュールをコードしているという、構造を支配する階層関係が見られて、複雑系の進化の在り方としても、極めて美しい論理構造に依存している。

このような関係はまた、エクソン-イントロン構造の起源が、ポリtRNA構造の中の(tRNAの5'末端域と3'末端域のつくる)ステム構造における配列相補性が利用されながら、ある領域がイントロンとして除かれる過程を経るなどして、エクソン-イントロン化が進行した可能性が高い。エクソンとtRNAとの相同並列において、その末端が正確に一致する例が見られることは、スプライシング機構が、ポリtRNA構造の持つ、本来の構造に依存しながら進化してきた可能性を示唆している。

4. rrnB 型 poly-tRNA 構造の進化

B. subtilis は、もう1つの異なるタイプの tRNA 遺伝子クラスターをもつ。すなわち、rrnB オペロンは、(5') 16S rRNA-23S rRNA-5S rRNA-(tRNA)₂₁ (3') の構造をもつが、このRNA転写物中のポリtRNA構造 (rrnB-ポリtRNA) におけるtRNAのアミノ酸特異性の並びは、"VTKLGLRPAMISMDFHGINSE" で、trnD-ポリtRNA構造とは異なるものであり、rrnB-ペプチドと呼ぼう。また、これらの21個のtRNA のアンチコドンの並びと相補性をもつ63塩基長のポリヌクレオチドを rrnB-mRNA と呼ぶ。rrnB-ペプチドに一致の高いアミノ酸配列域をもつもののなかで、そのコード域が rrnB-mRNA と相同可能性の高いものをデータベースから検索した結果、グリセロアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)や、トリプトファンオペロン中の trpE 遺伝子産物(アントラニル合成酵素)が見つかった(Ohnishi & Yanagawa, 1996; 1997 in press)。また、ラムダファージのラムダレプレッサーのDNA結合領域がrrnB-ペプチドの相同物であり、rrnB-ポリtRNA構造中のtRNA^{His} と相同であり、ラムダレプレッサーのN末端側172アミノ酸残基分が、Phe-His-Gly-Ile-Asn-Ser の6つのtRNAを含む領域と相同であることが、ドットマトリックス法等でほぼ確かめられた。この全領域での塩基の一致は48%、偶然による一致確率(危険率)は 10^{-20} であるが、部分的には、さらに相同性の確実な領域がある (Ohnishi, 準備中)。

5. リボヌクレアーゼP RNA (M1 RNA) の起源

リボヌクレアーゼP RNA (M1 RNA) は、C5 蛋白質との複合体としてのリボヌクレアーゼP の形で存在し、プレtRNAにおけるtRNAの5'末端を切断する。この

酵素の活性はM1 RNAに主として担われており、M1 RNA単独でも活性があり、典型的なリボザイムの一つとして多くの解析がなされてきた(Ohnishi, 1992a,b)。

大腸菌のM1 RNAを、trmD-ポリtRNA, rmB-ポリtRNA, 16S/23S-rRNA などと、ドットマトリックス法等で、相同可能性のある領域を検索解析したところ、rmB-ポリtRNA の tRNA^{Leu}-tRNA^{Arg}-tRNA^{Pro} の3つのtRNAとスペーサーを含む領域と明白な相同性があることが判明した(図3; Ohnishi & Suwa, 1997)。ここでは、52%の塩基一致(危険率 10^{-25})を得た。この結果は、ポリtRNA構造が本来さまざまなリボザイムとして機能していたことを強く示唆している。

ここまでに述べた結果から、枯草菌に残るtrmD型-ポリtRNA構造と rmB型-ポリtRNA構造は、基本蛋白質(house-keeping enzymes等)のmRNAの起源となっているのみならず、M1 RNAを含む少なくとも一部のリボザイムの起源となっている。

16S rRNA や23S rRNA が短いtRNA相同セグメントを持つことはよく知られているが(Bloch et al., 1983), Ohnishi (1992c)は、これらのrRNA 域の中に、trmD型ポリtRNA構造が存在する可能性を示しており、さらなる検討に値する。

6. RNA 工学、蛋白質工学における応用

これまでに得られた結論は、蛋白質やリボザイムが、ポリtRNA構造を基本下部構造として進化してきたことを明白に示しており、自然選択は、この下部構造の支配法則の下で進行してきたといえる。このことが、そのような下部構造を持たない場合の進化とどのように異なるかを知ることは、進化過程そのものとしても興味深い。下部構造が、上部構造の効率的構造化(以上の例では、エキソン-イントロン構造やモジュール構造)を促進してきた可能性が高いのではなからうか? そのようなことが実験的に検証できれば、

応用蛋白質工学としても、tRNAやポリtRNA構造類似の配列を利用することによって、目的にかなった遺伝子や蛋白質を創製する道が展望できるのではなからうか。そのためには、現存遺伝子の中のポリtRNA構造の在り方を、さらに多く確認していく記載科学研究もまた重要である。

7. 一般システム進化学と一般システム文法、および、記号起源論

また、ここで述べたような、下部構造と上部構造の進化過程における相互依存関係と、その進化様式の一般法則は、一般システムや、いわゆる複雑系の進化の研究と深く関係しているものと思われる。

このような一般システムの進化の在り方については、いくつかの論考(Ohnishi, 1988, 1990)を試みてきたが、『思考の階層的進化に関する覚書き(II)』(大西, 1993a)の中では、言語進化と分子進化に見られる共通の進化法則や、チョムスキー的木構造の起源についても考察してきた。Ohnishi (1996)は、人類言語単一系統論の立場から、アフリカのニジェール-コンゴ系言語の単語の構造が、アフリカ外のおそらくすべての言語の起源となっていることを示したもので、その単語構築の在り方が、まさにチョムスキー木構造の最も基本的な構造を持っていることを示している。言語の多様な分化過程で進行したチョムスキー木構造の多様化は、RNAや蛋白質の基本構築システム文法が、単純なtRNA構造やポリtRNA構造の相互作用文法としての在り方から、階層化された、より複雑なシステム文法構造への進化に対応している点で、言語文法の階層的進化と並行する論理を含んでいるものと思われる。

モンゴロイド諸語の言語文法の多様化が、ニジェール-コンゴ語族的文法から、原始オーストロネシア語文法を経て、どのように多様化して、モンゴロイド諸語の文法になったかを知ることは(Ohnishi, 1994)、一般システム文法の基本的進化法則

を知るうえでも興味深く、蛋白質や遺伝子のシステム進化論理とも共通する、汎現象的重要法則が何であるかを見きわめるための近道を提供するものかも知れない。

多細胞生物の進化に先立つ、倍数性単細胞生物の起源については、Ohnishi (1990)において、単数性の近縁2個体の協力行動の進化とそのシステム文法的考察の立場から論じてきたが、実際に、そのような進化過程における血縁淘汰によって、近縁2個体の協力生活相としての倍数世代が形成され、単相に戻るときの、チェック機構として、相同染色体接合による近縁性認識機構が進化したとの新学説を提唱した(Ohnishi, 1996b)。この学説は、現生の原生生物の減数分裂のありかたや、Mayerの定義する2倍体種の存在様式を、血縁淘汰の必然的進化結果として矛盾なく説明できる。すなわち、協力生活相としての協力行動が進化し始めたときに、すでに、その必然的結果として、相互協力可能な個体群、すなわち、相互に相同染色体が正常に接合-分離(すなわち減数分裂)可能な個体群としての種の存在様式が決定されていたことが示された。ここに、種が、実在するものでないという主張は誤りであることが、強く示唆された。

ポリrRNA学説は遺伝暗号起源論と深く関係しており、記号起源論や記号進化学や、ソシユール言語学 (における「意味するもの(シニフィアン)」と「意味されるもの(シニフィエ)」の論議) の立場から、遺伝暗号の起源を考察した(大西, 1995a; Ohnishi, 1995b; Ohnishi & Yanagawa, 1997)。

8. 文献

- Bloch, D., Kuechler, E. and Steiner, G. : 1983, *J. molec. Evol.* **19**: 420-428.
Eigen, M and Schuster, P. : 1979, *The Hypercycle*, Springer, Berlin.
Go, M. : 1981, *Nature* **291**: 90-91.
Ohnishi, K.: 1990, In: *Symmetries in Science IV*, ed. by Gruber and J.H.Yopp, Plenum, New York.
Ohnishi, K. : 1988, *Viva Origino* **16**: 232-233
Ohnishi, K. : 1992a, *Viva Origino* **20**: 225-256.
Ohnishi, K. 1992b, *Endocytobiosis and Cell Research* **8**: 109-120.
Ohnishi, K. :1992c, *Nucleic Acids Res. Symp. (Oxford)* **27**: 145-146.
Ohnishi, K. : 1993a, In: *Endocytobiology V*, ed. by S. Sato, M. Ishida and H. Ishikawa, Tubingen University Press, Tubingen.
Ohnishi, K. :1993b, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **707**: 524-528.
Ohnishi, K. : 1993c, In: *Genom Informatics Workshop IV*, ed. by T. Takagi, H. Imai, S. Miyano, S. Mitaku, and M. Kanehisa, pp.325-331, University Academy Press,
大西耕二, 1993a: *生物科学* **45**: 201-212.
Ohnishi, K., 1994: *Viva Origino*, **22**, 283-326, 1994.
大西耕二, 1995a: *生物科学* **47**, 10-23; 155-166.
Ohnishi, K. 1995b: *Viva Origino* **23**(3), 237-254.
Ohnishi, K. 1996a: African origin of classifier-prefixed words in extra-African languages: New evidence for Ruhlen's monogenesis theory of human languages. Presented at: "Evolution of Human Language Conference (Edinburgh, 1996年4月)" (Anthropological Science に投稿準備中).
Ohnishi, K. 1996b: *Origins Life Evol. Biosph. (Abstract)* **26**: 409-410, 1996]
Ohnishi, K. and Yanagawa, H., 1997 : In: *Endocytobiology VI*, ed. by H.E.A. Schenk, R.G. Herrmann, K.W. Mueller and W. Schwemmler, Springer Verlag, Berlin, (in press).
Ohnishi, K. and Suwa, K. , 1997: *Viva Origino* (5 pages, 発表予定)

適者生存 vs 競争的共存：大腸菌をもちいた実験進化学 四方哲也（大阪大学工学部応用生物工学科）

要旨

進化は複雑で長い時間がかかる。そのため、進化学の理論も無批判に存在しやすい。実験進化学はそれを打破し、進化を検証可能な科学の土俵にのせる。ここでは「適者生存は進化のプロセスでどれくらい現れるのか」に答える。大腸菌を用いた競争実験で調べてみた。グルタミン合成酵素遺伝子の変異体をいくつか混ぜ、連続培養した。すると、多くの場合、より適応した株が生き残るのではなく、競争しながらも共存した。相互作用による競争的共存である。

<はじめに>

生物を見ていると本当に良くできたシステムだなあと感心する。目はものを見るためにあり、手はものをつかむ目的のために存在していると考えられる。もちろん、ものの存在に目的があるわけではない。生物学で合目的な理解がなされるのは、進化の自然選択過程を目的に言い換えたほうが頭に入りやすいからだろう。たとえば、物をよりうまくつかむ手を持った個体が選択され手ができたと仮定する。これを、手は物をつかむためにあると言い換えるとわかりやすい。

ある不思議な機能や構造を見つけて、その合目的な意味を見つける我々の理解のパターンは、その機能や構造が適者生存によって作られてきたという前提に寄っている。適者生存によって作られていない顔の上のほくろなどに、合目的な説明をしたらおかしい。では、前提となっている適者生存は進化の過程でどの程度現れるのだろうか。これがこの小論の中で答える質問である。そして、答えは「多くの場合、適者生存にならず、競争者が相互作用によって共存する」となっていく。合目的な説明のための前提、つまり適者生存はそれほど広い範囲に当てはまらない。

進化の研究というと普通は化石を調べたり、分子系統樹を書いたりする。しかしここで紹介する我々のアプローチは、進化のプロセスを研究室に切り出して調べようとする実験進化学である。すでに起こった進化の歴史を紐解こうとしないで、進化のどの場面でも働く力学を知ろうとしている。

<大腸菌による競争実験系>

進化実験は世代時間の短い生物を使い、より簡単に再現可能な環境で行うほうが望ましい。最もよく使われている生物は大腸菌で、1万世代飼育して進化（変化）を観察した例がある「1」。我々の実験では進化の最初のステップ、すなわち突然変異が起こった後に新しい表現型を持った大腸菌が集団の中にどのように広まるかを調べる「2」。変異型大腸菌は淘汰されるのか。それとも、元々集団の中にいた野生株を追い出すのか。共存の道はないのか。

競争に使う大腸菌はグルタミン合成酵素の遺伝子だけが異なる変異体を使う（図1）。ランダム変異によって触媒活性の異なるグルタミン合成酵素の遺伝子を用意し、染色体上のこの遺伝子の欠失株に導入する。こうして作られた大腸菌を2種類選んで混合培養する。栄養は一定速度で培養槽に流入し、増殖した大腸菌を含めて培養液を一定速度で流出する。培養槽は常によく攪拌し均一系に保つ。グルタミン合成酵素に淘汰圧がかかるように、グルタミン合成反応の基質であるグルタミン酸を単一窒素源として用いる。

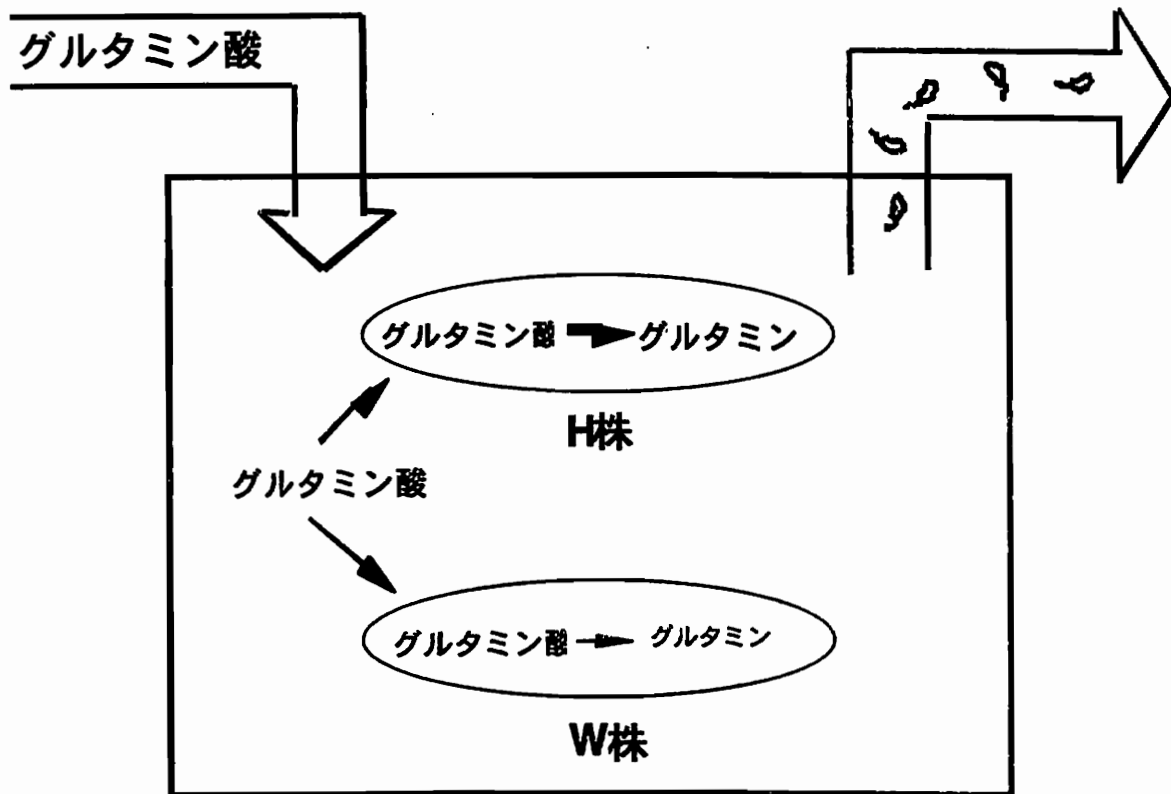


図1 大腸菌の連続培養による競争実験

H株のグルタミン合成酵素の触媒活性は $28 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。W株は $9.9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 。一定速度で流入しているグルタミン酸の濃度が菌体の増殖を制限している。増殖した菌は培養液とともに一定速度で流出する。

競争実験をする前にそれぞれの株の増殖速度を測ってみた。すると予想通り、グルタミン合成酵素の活性の差によって、増殖速度に差が現れた。ただ、活性の高い酵素を持つ株（H）が高い増殖速度を持つとは限らず、むしろ、野生型の遺伝子を持つ株（W）が高い増殖速度を示した。これらを混ぜて競争させれば、増殖速度（適応度）の高いW株が低いH株を淘汰しそうである。

ここで紹介する競争実験は小さな湖での単純な種内生存競争を模倣している。たとえば、ある湖に水棲生物が1種類だけ棲んでいるとしよう。餌は上流の川から一定速度で流れ込み、増えた生物ごと下流に流れ出る。湖は対流によってよくかき混ぜられている。そこに変異体が現れて種内競争が始まるのである。

実験条件は適者生存がもっとも起こりやすくなっている。もし、競争する大腸菌の間に二つ以上の性質の差があれば、お互いに弱い部分を補いあって適者生存にならず共存するかもしれない。いわゆる分業による共存である。しかしながら、競争に使う2つの株にはグルタミン合成酵素の活性以外は差がないので、分業による共存は考えられない。また、培養槽の中で空間的な棲み分けが起り、見かけ上の共存が起こるかもしれない。しかしながら、競争実験中は培養槽をつねに攪拌しているので棲み分けもありえない。よって、高い機能を持つ大腸菌が生き残るとは限らないが、どちらか一方だけが生き残る適者生存が現れる。

<競争的共存>

結果は適者生存、不適者不生存にはならず、二株の共存であった（図2）。培養を始めて10日目までは酵素活性の高いH株の集団中の割合が変化している。このH株の割合の変化はW株にたいするH株の相対増殖速度の変化を示している。しかしながら、10日目をすぎるとHとWの存在比は4対1に収束して定常状態になった。ここで注意したいのは、H株が集団の80%を占めているからと言って、H株の適応度が高いわけではない。むしろ、二つの株の増殖速度が全く同じになり、安定な共存状態になっている。また、培養開始時の二つ株の混合比を変えて競争させると、同じ存在比に収束している。この共存はなんらかのメカニズムがあって、なるべくしてなっているのであろう。

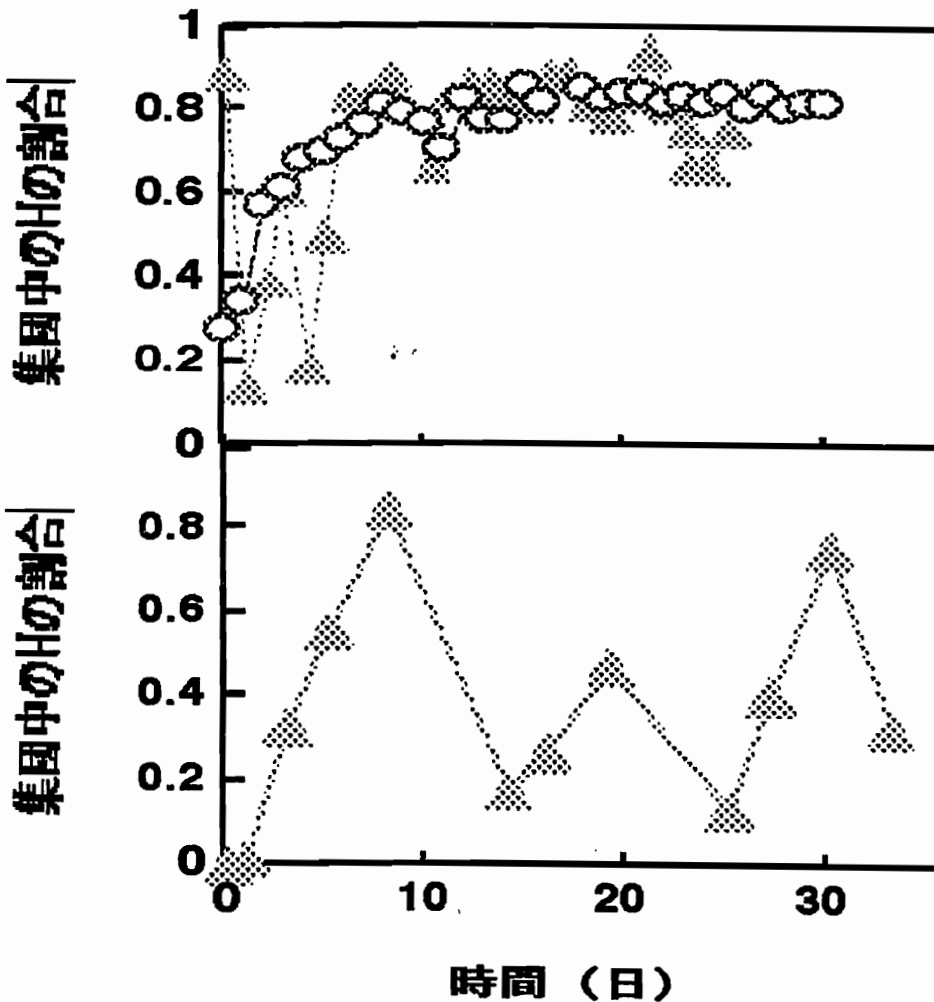


図2 競争実験でみられた大腸菌の共存

100 mM グルタミン酸を流入したH株とW株の競争実験（上）。H株の初期混合濃度を25%から始めても90%から始めても、80%の定常状態に収束している。1 mM グルタミン酸を流入したH株とW株の競争実験（下）。H株の割合が不規則に振動する。

比較のためにそれぞれの株を単独で培養してみた。すると、培養槽中の総個体数は単独培養でも混合培養の定常状態でもほぼ同じであった。別の言い方をすると、共存状態ではそれぞれの株は相手がいるせいで、単独でいるときより個体数を減らしている。よって、二つの株は餌を取り合って競争しながら、共存していると云えよう。競争的共存である。

流入するグルタミン酸の濃度を薄くして混合培養してみた。すると、H株とW株の割合が不思議な振動を始めた。7日目ではH株の方が増殖速度が大きいのでその割合が増えている。しかし、12日目ではW株の方が増殖速度でH株を上回り、H株の割合は減っている。この様な振動が見られる例として兎と狐のダイナミクスが知られている。兎が増えると次のそれを食べる狐が増える。しかし、狐が増えすぎて兎が減りだして、その後、狐が減りだす。そして、天敵が減ったので兎が増えだし元に戻る。この様に性質が大きく違う生物では食う食われるなどの関係が成立して振動が現れることがある。しかし、ここで使った大腸菌はグルタミン合成酵素の活性以外は差がない。よって、振動が現れるような特殊な関係を簡単に想像しにくい。

ここまでH株とW株の競争実験を簡単に紹介した。このほかにもグルタミン合成酵素の活性の小さい株など使って色々な組み合わせ競争実験を行った。色々な環境条件でも行ってみた。その中には、淘汰が起こり1種類だけが生き残った場合もあった。しかしながら、約80%の異なった競争実験で共存が現れた。ここでみられた競争的共存は希なことではないようだ。

<相互作用による共存>

どうしてここで示した大腸菌の競争実験では適者生存にならないのだろうか。現在、完全にメカニズムが分かったわけではないが、二つの株の間で相互作用が働いて共存が起こったことは確かだ。具体的には何らかの菌体内物質が培養液中に漏れて、それが相手の菌の増殖に影響を与えたと考えている。実際、物質の漏れを仮定した計算モデルを作ると実験の結果をよく説明できた「3」。たとえば、グルタミン合成酵素活性の強い株からグルタミンがもれて、もう一方の株がそれを利用して共存したとするとわかりやすい。しかし、両方の株からグルタミンが漏れた場合でも共存は起こりえた。つまり、どちらの株にもメリットがなくても、相手のいることによる影響さえあれば共存は起こりうるのである。

モデル計算ではグルタミンが漏れることを仮定したが、実際には培養中に大腸菌が死んで細胞内の物質が漏れ、競争相手の株に影響を与え、共存が起こったのかもしれない。このように2種類の生物がいれば互いに影響を与えてしまう。つまり、競争者間の相互作用は避けがたく、共存はごく自然におこる。

ここで見られる相互作用による競争的共存は適者生存や分子進化の中立説とどのような関係にあるのだろうか。適者生存の概念では競争者の適応度が定義される。そして、適応度は相手の存在量によらないとしている。つまり、相互作用を無視する。こうすることによって、適応度は適応度の高い個体は増え続けるという予測力を持つのである。しかしながら、相互作用のある系では適応度は競争中に変化するのである。この適応度の変化は大腸菌の競争実験で増加していた株がしばらくすると減少して振動することより明らかだろう。よって、ある時点での適応度は予測力を持たず、簡単に適者生存にならない。

無理に予測力ある適応度を定義しようとすると、競争中の各遺伝子型の割合をすべて知らなくてはいけない。ほとんどのことが分からないと予測できないのでは意味がない。こうした状況は物理の分野で複雑系として知られている「4」。多くの要素が相互作用しあう系では、ポテンシャルが予測力をもたず、複雑な振る舞いが現れる。生物進化も複雑系なので、適応度の予測どうりにならず、共存を含めた

多様なダイナミクスが現れる。

故木村博士の提唱した中立説は分子レベルの進化理論として大変有名である「5」。「遺伝子上に起こる変異の多くは生物の適応度に大きな差を作らず中立である。よって、多くの場合はどの変異体が集団の中に広まるかは遺伝的浮動によって偶然に決まる。」これが中立説の主張であろう。しかし、大腸菌の競争実験では遺伝的浮動による偶然性が支配しているようには見えない。むしろ、培養開始時の二つの混合比を変えて競争させても同じ存在比に収束する事実は、は遺伝的浮動による偶然性が集団中の遺伝子頻度の変化を支配していないことを示している。この様に競争的共存は中立説の範囲では説明されない。なぜならば、適者生存と同様に、中立説でも生物間相互作用を無視しているからである。

<複雑系として進化へのアプローチ>

相互作用が生物学の中で重要なのは言うまでもない。個体発生、体全体が関わる疾病、脳神経系、生物進化などはそれぞれの要素が複雑に相互作用して全体が発達する。そして、全体が要素を規定する。この様な系では部分の足し算だけでは全体が分からないので、要素を調べあげるだけでは十分でない。かといって全体を見ろと言われても、複雑なので書き下すことが難しい。これに対して我々は再構成系を作って研究を進めている。自然界では色々なことが起こり、進化は再現不可能になっている。それをモデル実験の中で何度も繰り返し、そこで現れる普遍的現象だけを取り出している。この実験で分かったことは「最も競争の激しそうな環境に置いても生物は相互作用してしまい、必ずしも適者生存にならず、競争的共存になる」ということである。

大腸菌の競争実験で見られた競争的共存が、他の複雑な生物の進化にどの程度当てはまるかは定かでない。しかし、より複雑な環境になると適者生存になりやすい理由はない。きっと、色々な条件によって多少修飾されても、競争的共存が現れる傾向は広い範囲で見られるだろう。種内で多様性を保つ競争的共存が多様性を減らす力である適者生存とバランスして生物多様性を作っているのだろう。

「1」 Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations, Lenski R. E. and Travisano M., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., (1994) 91(15) p6808-14

「2」 Fate of a mutant emerging at the initial stage of evolution, Xu w. z., et. al., Researches on Population Ecology (1996) 38 in press

「3」 Mathematical model allowing the coexistence of closely related competitors at the initial stage of evolution, Yomo T. et. al., Researches on Population Ecology 38 (1996) in press

「4」 複雑系のカオス的シナリオ、金子邦彦、津田一郎、朝倉書店、1996

「5」 生物進化を考える、木村資生、岩波新書 1988

細胞分化と社会形成：多様化から再帰的ルール形成へ

東京大学 総合文化研究科広域科学専攻 金子邦彦

1 はじめに

この3-4年をかけて、細胞分化、細胞社会の形成への新しい理論を四方哲也と共同で提出した。この理論は今のところ大域的に結合した細胞集団系の分化とメモリー生成、集団の安定性などに重点をおいて研究を行って来た [1-6]。

まず基本として、生命系を内部ダイナミクスを持つ増殖ユニットが相互作用しているものとしてとらえることから始める。ここで内部ダイナミクスはユニット間の相互作用によって変化を受け、その一方で相互作用は内部状態によって変動を与えられていく。このように内部ダイナミクスと相互作用の間の相互フィードバック系を出発点としている。

ここ数年の研究によって、内部ダイナミクスを持つ要素が相互作用によって自発的に分化を示すという内在的な機構の存在が明らかにされてきた。全く同一の要素の相互作用系を考えると、そのカオスと結合の度合によって、同期して振動する集団に分化し、それぞれの集団ごとで動的な振舞が異なってくるのである。これが結合系カオスでのクラスター化である [7]。このことは結合した非線形ダイナミクス系のクラスター化が自発的多様化の基盤を与えることを示唆している。

このように本質的な多様化を基本に考えると、以下の問題点が浮かびあがってくる。まずそのようなヘテロな系がばらばらなもの単なる集合体にならないのは何故だろうか。このことは個々のレベルでは多様化する機構があるのに対し、集団のレベルでは、より安定な、また決定論的な性格が強くなる機構が存在することを意味している。つまり個体の集団からひとつのユニットと見なせられる新しいレベルが生成され、そこでは安定性の高い振舞が現われると考えられるのである。こういった例は、多細胞生物の起源、社会の生成などとしても見られ、一般に生命系を考える上で、ロバストな集団レベルの生成機構は本質的な問題である。

次の問題点は再帰性とでもいうべきもの。ここで述べたように多様化を基本にすると、逆に、では自己複製がいかにか生じてくるかが問題となってくる。つまり、増殖はしてもそのままでは同じものがなかなかできないからである。では、そのようないい加減な増殖からいかにして同じものをつくるようになれるのであろうか。これが再帰性の問題である。生命系を考える上でDNAのような、ほぼデジタルな情報がいかに生まれ、機能しているかは本質的な問題であるが、上の再帰性とデジタル情報の起源は密接に関連している。というのはアナログ的に変動している量については再帰性を保つことが困難だからである。例えば位相のようなアナログ量は少しずつずれていって再帰性をくずしてしまうであろう。われわれはこのようなデジタル化を与える基本には状態をクラスター分けすることがあると考えている。それによってマクロレベルでの安定性が有効になってくるのである。

われわれがここで提出する理論は、「内在的多様化」「集団レベルの安定性」「再帰性」の3つ組が、内部ダイナミクス-相互作用 (intra-inter dynamics) により自然に

現れてくる性質であるというものである。後に見るように、この3つ組は力学系の表現としては、クラスター化、ホメオカオス [8] で見られるような結合系の集団運動の安定性 [7]、初期値の選択に対応している。ここでは細胞分化—形態形成の問題を考える。

2 モデル

ここでは、生命系を内部ダイナミクスを持つ増殖ユニットが相互作用しているものとしてとらえることから始める。

これは、内部ダイナミクス—相互作用系 (intra-inter dynamics) のよい例となっている。つまり、各細胞の内部の代謝反応ダイナミクスと細胞間の相互作用が互いに関係しあっている系だからである。ここでは以下の要素を取り入れたモデルを考える。(1) 単純化した代謝反応系 (細胞内の k 変数微分方程式系) (2) 外の培地から細胞内への化学物質 (栄養) のアクティブなとりこみと拡散 (3) 代謝反応の進行によって増殖のための積分的な条件がみたされるための細胞分裂 (4) 細胞内部の化学成分の状態と与えられる条件で決まる細胞死からなるモデルを考える。つまりモデルは各細胞 i の化学物質 m の濃度 $x_i^m(t)$ 、それぞれの培地での量 $X^m(t)$ の発展方程式であらわされる。そして自由度、つまり細胞の数は細胞の増殖/死亡とともに変化する。

この種のモデルをいくつか調べている [1-6]。その基本構造は以下の通りである。

(i) 細胞内の代謝反応:

ここでは S 、 $x^m (m = 1, \dots, k)$ の化学物質があり、 S は他を作る源 (栄養) となっていると考えてみよう。さらに、 x^m の間では反応が起こっているとしよう。一般にこの生化学反応は多くの酵素によって制御されており、またその酵素の生成には、化学物質自体によって作られている。ここでは、各 x^m によって反応 $x^l \rightarrow x^j$ を司る酵素が作られるとしよう。すると、各細胞 i での x_i^m の変化の方程式を他の化学物質の濃度の式として表現できる。(具体的にはこの酵素のダイナミクスが速いとして、それがミカエルメンテン型の反応に従うとした)。同様に S から各化学成分 x^m への反応がおこるとする。また各成分から増殖のための物質が生成されるとする。

(ii) 化学物質のとりこみと拡散:

各細胞は培地におかれており、その培地から化学物質をとりこんでいるとしよう。(培地には外から栄養物質 S が与えられているとする。) このとりこみはその細胞の活性で与えられているとし、活性は一般には内部の化学成分に依存しているとする。一方培地の成分は各細胞にとりこまれただけ減少し、また外から栄養 S の供給があるとする。各成分 x^m も培地と各細胞の間で拡散的な相互作用があるが、これは外からは供給されないとする。

(iii) 分裂と細胞死

各細胞ではその化学成分から生成された増殖因子が蓄積されていく。その量があるしきい値を越えると (ほぼ等分に) 2分割され、細胞分裂が起こるとしよう。(これは、DNA の合成としてもよいし、細胞膜の成分と思ってもよい)。これにより、細胞数は1個増加し、われわれの系の自由度は増加する。例えば $\int_{t_0}^T dt \sum_j x_j^i(t) > T_R$ のような条件であ

る。

一方、細胞死の条件をいれておくことも場合によっては有用である。特に細胞の無限定な増殖を防ぐのには必要である。この条件として、例えば上の活性が、あるしきい値より小さければ細胞が死亡するというのを採用してみる。つまり、 $\sum_m x_i^m(t) < T_s$ である。

3 Isologous Diversification

前節のようなクラスのモデルのシミュレーションをいくつか行なった結果、次のようなシナリオが得られた。我々はこのような分化、多様化のシナリオは細胞分化にかかわらず生物系に一般的であると考えており、それを isologous diversification theory と名付けている。isologous というのは、全く同じものが内在的に多様化を起こすことを強調するために用いている。

段階1：化学成分は代謝反応により振動しているがその振動は同期している。そこで、細胞は一斉に分裂する。

段階2：振動位相のクラスター化：細胞は同期を失い、異なる位相で振動する集団に分かれる。

段階3：分化：化学組成自体が細胞によって異なりはじめる。力学系の言葉では細胞ごとに相空間の異なる領域を用いるようになる。これによって細胞は異なった役割をにない、分業を達成する。

段階4：再帰性：分化したグループはその性質を子孫の細胞に伝える。つまり、ある型の細胞から分裂した細胞は同じ型になる。

段階5：階層性：さらに細かい種類への分化が進行し、細胞種は階層的に分化していく。

段階2では各細胞の化学成分の相空間での軌道は同じ軌跡を辿っている。例えば $(x_i^m(t), x_i^l(t))$ の軌道を重ね描きして比較してみれば、同じ軌跡を細胞ごとにちがった位相で振動しているのが見てとられる。このことの今のシステムの中での意味付けを考えると、全細胞の振動が引き込んでしまうと一斉に栄養源をとりあうことになり増殖が困難なのに対し、クラスター化により時間的な棲みわけ (time sharing system) を実現していると考えることができる。こういったクラスター化の由来は代謝反応と取り込みのダイナミクスにある不安定性にある。これによって2つの細胞の状態の微小な差がマクロな差にまで増幅されるのである。

段階3では $(x_i^m(t), x_i^l(t))$ の軌道を描いてみると、相空間の中の異なった軌跡を描いていることがわかる。つまり、位相の違いだけでなく振幅、さらに成分の比率が異なっているのである。この違いに応じて活発に代謝反応を行ない速く分裂する集団とあまり反応を起こさずに休眠している集団に分化することも起こる。この場合、前者の細胞数は少数で、後者の細胞は多数存在する。これは有限な資源 (栄養) の取り合いに応じて貧富の差が生成されたことを意味する。

この第3段階では位相と振幅といった2重のコードが生じたわけである。この時に位相の違いはアナログ的であり、連続的に変化させられるのに対して、振幅の違いの方はしば

しば離散的になっている。これは、ひとつには個々の代謝反応がオンオフ型の振動をしているためと考えられる。このようなデジタル的な分離は情報の生成という点からも興味深い。

段階4の実現は再帰性が生まれたことを意味する。つまり、子孫が同じ形質になるように分裂後の(化学成分の)初期条件が伝えられたのである。実際、親の細胞の化学成分の濃度の平均を横軸に娘の細胞での平均を縦軸ににとってリターンマップを描いてみると、初期の分裂では、親娘に大きな差があったのに対して、分裂を繰り返す内に、そのプロットは対角線上の近くにばらまかれてくる。

このような固定化が生じると、細胞系譜を描くことが可能である。未分化の細胞からいかに各タイプの細胞が固定化されていくかを順次追うことができるのである。ここで注目すべきは、実際の分化過程と同様に、異なるラインから同じ型の細胞が固定化されることが見られることである。これは細胞分化が遺伝子が順次発現することで、階層的に決ってくるとすると説明しにくいものであるが、ここで考えるように動的な相互作用に依存すると考えれば、自然に生じるのである。

以上で注意すべきは、この分化過程はそのなるべく遺伝情報にプログラムされているというよりも、相互作用を通して生成されたとみるべきであるということである。その意味で固定化は、細胞の型という情報が生成されたことを意味する。それでは分化形質の伝播は細胞間相互作用を通して記憶されているのであろうか、それとも細胞内の化学成分の値によって記憶が生まれたとみなせるのであろうか。このためにはある細胞をとりだして別な状況においた時にやはりその子孫が同じ形質を保っているのかを見ればよい。こういった移植シミュレーションを行なってみた。具体的には、細胞の分化が固定化したあとで、例えばそのA型の細胞とB型のをとりだし、それを他の細胞集団の中においてみるのである。その結果、AとBの細胞数がひどくアンバランスでない限り、AからはA、BからはBが生まれることが見出された。つまり、細胞集団がある範囲の限りでは細胞内に記憶ができていたのであるが、極端な分布を持った集団の中ではその記憶がこわされると考えられる。

我々のモデルでは遺伝子を明示的に扱ってはいない。我々は遺伝子がすべてを決定するとは考えていないが、といて分化に遺伝子が重要でないということを主張するのではない。当然、このモデルで扱った化学反応のネットワークの中には遺伝子も関係していると考えてよい。むしろ遺伝子のような、ほぼデジタルな情報がいかに生まれ、機能しているかをここで述べた再帰性とデジタル情報の起源をもとにして考えていきたいと思っている。

なお、不安定性を用いたシナリオというとなら発生のような安定性を要求される場合には無意味と思われるかも知れない。しかし、実際、予測不能な初期段階のある細胞の子孫がどんな種類の細胞になるかだけであって、細胞の系譜、できる細胞の種類やその割合は初期の乱れや外からの乱れに対して安定である。例えば、外から活発な細胞をとりのぞいてしまうと、休眠中の細胞の一つがそれにとってかわって活性化して全体としてもとと同じ状態に戻ってくる。B型の細胞を取り除くとA型の一部が分化することは先に述べた通りである。つまり最初に触れた、集団レベルでの安定性が実現したのである。ここでの安定性は固定した状態によって維持されているのではなくダイナミックに保たれていること

に注意しよう。この点では生態系モデルで提唱されたホメオカオスと同様な安定性が成り立っている。

4 ガン化の機構

パラメータを変えて行なった結果では、化学的多様性を喪失した細胞が生じて、これがきわめて速く増殖するということが起る。この種の細胞はある化学成分の濃度が圧倒的に高く、他のほとんどの化学成分の濃度は非常に低く抑えられている。そこで、代謝は実質上、栄養 → ある化学成分 → 増殖因子 という簡単な過程となっている。この細胞は速く増殖し、細胞集団の化学的秩序を壊しているので、がん細胞と対応していると考えてもよいであろう。なお、興味深いことにこういったがん細胞では、再帰性が部分的に破れているのである。つまり、ある化学成分が多いという性質は子孫に伝搬されるけれども、その濃度自体は変化していつているのである。

我々の数値シミュレーションではこの種の細胞の形成は細胞間の相互作用に強く依存している。実際、細胞の密度が高い場合、細胞間の拡散が大きい場合に生じる。なお、この結果はルビンらによる実験結果と符合している。彼らの実験 [9] では、がん細胞の生じる率は密度とともに増加していく。その生成率は細胞数でなく密度によっているのである。このことはガン化が細胞間で独立に生じる突然変異によるものでなく相互作用が本質的であることを示唆している。

また、我々の結果は逆に、がん細胞を正常に分化させる方法を示唆する。つまり化学的な多様性を回復させればよいのである。例えば実験では初期の未分化の細胞の成分を注入するなどをすればよいわけである。数値シミュレーションではがん化した細胞数個と初期の未分化細胞数個をとってそこから時間発展をさせていくと、がん細胞は正常な分化を回復するのである。

5 階層的分化

この考えを進めて (A) 階層的分化と幹細胞の起源 (B) 集団レベルでの調整機構の生成 (C) 組織レベルの分化と多様化を扱った。具体的には (1) 単純化した代謝反応系 (細胞内の k 変数微分方程式系、ただしカオスを示すことがある) (2) 外の培地から細胞内への化学物質 (栄養) の拡散 (3) 外からのとりこみによって体積が2倍になったときの細胞分裂 からなるモデルを調べた。細胞の種類などは反応系に依存するが、具体的な例をとって説明しよう [6]。

まず、化学成分がカオス的に振動するタイプの細胞 (“0” と呼ぶ) が生じる。これらが増殖するにつれて異なる組成をもち異なったダイナミクスを持つ細胞タイプ 1、2 が生じて来る。更に 1 からは 3 種類のタイプ 3、4、5 が生じることが見出された。つまり、0 は以下の細胞種の幹細胞になっており、1 は 3、4、5 の幹細胞となっている。(A の実現)。

ここで $0 \rightarrow 0$ 、 $0 \rightarrow 1$ 、 $0 \rightarrow 2$ の選択は確率的のように見える。ここで注意すべき

はこの選択の割合が周囲の細胞タイプによっていることである。これによって、例えば0が少ない時は最初の矢印のパスが増加し、もとの分布を安定化することが起こる。ではこのような「調節機構」を可能にしている(Bの実現)ものは何であろうか。この場合、同じタイプ0の細胞でも、周囲の細胞の分布により少しだけダイナミクスが異なっている。その差異を利用して、上のパスの選択の調整が生まれているのである。これは、内部のダイナミクスに集団の情報が埋め込まれるという、相互-内部ダイナミクス系特有の現象である。

では安定な細胞集団分布は一意に決まるのであろうか。上記のモデルでは1つの細胞から生まれて来る集団が4種類の安定分布を持つことが見出された。これは、(B)で述べたような、集団を安定化する、個々の細胞タイプの数の変動のダイナミクスが4つの安定状態を持っていることを意味する。今のモデルでは、細胞数が変動するのでこの細胞タイプレベルのダイナミクスを調べるのは困難なので、このことを細胞数を一定にしたシミュレーションで調べた。その結果、細胞集団でのレベルでの個体数ダイナミクスは確かに上記のような多安定性を持つことが確認されたが、さらにそれ以上(5個)の安定状態が見出された。つまり、発達を通して実現できているのはその一部であり、細胞集団は発生過程の束縛を受けていることが見出された。いずれにせよ、ここで化学反応ネットワークから細胞分化のレベル、さらにその上の細胞集団の分化という2段階層の結果が得られたことになる(Cの実現)。

6 空間的に局在した相互作用を含めることによる増殖ユニットの生成

多細胞生物の起源を考えると、細胞集団がその集団を一つのユニットとして子孫を残し得る高次の再帰的構造の形成が必要である。この問題ではコンパートメント化が必要であるので、空間構造を考慮した議論が必要になってくる。そこで、各要素自体がさらに空間を運動する能力を持ち、またある条件で死ぬことをとり入れたモデルを考え、空間と内部ダイナミクスの干渉による構造化の発見とその解明を行なった。このためにまず分化を起こしうような、最小モデルの構成を試みた。これは自由度の変わる coupled map であり、具体的には以下のような位相モデルを考えてみる [10]。まず細胞は培地の栄養 s をとりあい、各細胞 i の状態は変数 $x(i)$ で規定されているとしよう。この栄養は培地の外から一定の割合 c で供給され、各細胞が培地からとる割合はある関数 $f(x)$ で与えられるとしてみよう。すると、各細胞の状態の変化は

$$x_{n+1}(i) = x_n(i) + f(x_n(i)) + S_n; S_n = \frac{1}{N_r} [c - \sum_j f(x_n(j))]$$
 と書ける。ここで $x_{n+1}(i) - x_n(i) = f(x_n(i)) + S_n$ は細胞 i が時刻 n に外からとってくる栄養の量であり、2番目の条件はある決められた領域(半径 r_c) の範囲内で栄養の競合が起こるとしたためであり、半径 r_c あたり s の栄養が流入するとしたためである。(N_r はその中にある細胞の数)。

ここで分裂と死に対して、以下の条件を課してみる。

(A) 細胞 i は $x_n(i) > T_g$ を満たしたときに分裂して細胞 i と $N+1$ 番目の細胞となる。

そのときそれぞれの x の値は $(x_n(i) - T_g)/2 + \delta$ と $(x_n(i) - T_g)/2 - \delta$ とする。 (δ は小さい乱数とする。)

(B) もし $x_n(i) < T_d$ であればその細胞は取り除く。

運動を考えるために、上には明記されていないが、各要素 i は空間の位置座標をもってゐる。(2次元であれば $(R_x(i), R_y(i))$)。そしてこの位置は他の細胞から受ける力で移動できるとし、さらにその力が要素間の位相関係で決まるとしよう (例えば $K \cos(2\pi(x(i) - x(j)))$)。この場合、力はある範囲 r_f で作用するとした。

この結果、 r_c と r_f がほぼ等しく、内部ダイナミクスのパラメータ K が要素間の同期と非同期の両方を可能にするパラメータの場合に限ってこの要素が数を増やして空間に広がっていくことが見出された。この場合、領域 r_c 内に適度な数が集まった細胞集団が形成されることで成長が可能になる。つまり、細胞集団としての成長ユニットが形成されたことを意味する。

参考文献

- [1] K. Kaneko and T. Yomo, "Cell Division, Differentiation, and Dynamic Clustering", *Physica* 75 D (1994), 89-102
- [2] K. Kaneko and T. Yomo, "A Theory of Differentiation with Dynamic Clustering", in *Advances in Artificial Life*, F. Moran et al. eds., Springer, 1995, pp. 329-340
- [3] K. Kaneko and T. Yomo, "Isologous Diversification: A Theory of Cell Differentiation", *Bull. Math. Biol.* 59 (1997) 139-196
- [4] 金子邦彦、現代思想、1995年12月号、1996年11月号
- [5] K. Kaneko and T. Yomo, "Isologous Diversification for Cell Differentiation" submitted to *Proc. National Acad. Sci.*
- [6] C. Furusawa and K. Kaneko "Emergence of Rules in Cell Society: Differentiation, Hierarchy, and Stability", submitted to *J. Theor. Biol.*
- [7] 複雑系のカオスのシナリオ (朝倉書店)、1996 金子邦彦、津田一郎
- [8] K. Kaneko and T. Ikegami, *Physica* 56 D (1992), 406-429
- [9] Yao A. and Rubin H. (1994), *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91 (1994) 7712; Rubin H. (1994), *ibid*, 91, 1039; 91, 6619
- [10] K. Kaneko, "Towards Coupled Map Approach to Cell Biology", *Physica D*, in press (1997)