

自律進化分子系の構築と情報創出過程の解析

Construction of autonomously evolving molecular system and an analysis of the generation process of information

プロジェクト代表者：伏見 譲（理工学研究科・教授）

Yuzuru Husimi (Graduate School of Science and Engineering, Prof.)

1. はじめに

ヒトゲノム計画が学問全体に衝撃を与えた結果、学問を理科と文科とに2分するのは間違いで、法則定立科学（物理学や化学）とプログラム科学（生命科学と人文・社会科学）とに分類するのが本質的とする新たな学問2分法が登場した。これは物質と情報の相互独立性を根拠としている。この根拠は実は疑わしい。実際、我々は進化分子工学を建設し、法則定立科学の枠内でゲノム情報の成立を理解しようと努力してきた。

生物進化はゲノム DNA 上に符号化情報として記録されつつ進行する。このゲノム情報には物理化学的に決定された側面と、約束事として決定された側面とがある。プロモータ配列は、もしも RNA ポリメラーゼが**所与のもの**であれば、それと DNA との物理化学的相互作用が評価されて、最強プロモータの塩基配列情報が決定されてゆく。実際、進化分子工学によってこの過程が実証できた。しかしながら、天然の RNA ポリメラーゼは**所与のものでなく**、それ自体も進化してきたものである。プロモータ配列は RNA ポリメラーゼとの共進化の産物であり、物理化学的必然だけではなく約束事として決定された側面も持つだろう。

この後者の部分のみを強調して、情報は物質から独立していると主張する人は多いが、生命情報に関してはシステムの部分でさえ、ソフトウェアがハードウェアに依存する部分が多い。ゲノム情報の場合、約束事として決定された情報でさえ、サイコロを振って決めたという状況よりも、必然的な物理化学的側面によって援助されて情報が獲得されという状況が多いのではないだろうか。情報獲得過程への物理化学的側面の多様な関わり方を実験的に示す研究を行うことにする。

実験室内で核酸や蛋白質を高速進化させる進化分子工学は我々が世界的に見ても先駆的に開発してきたもので、それは新奇な実験手法と言うよりむしろ、**生体高分子はいかにして生命情報を獲得しうるか**、という基本問題のための実験系に関する工学である。進化分子工学は、分子進化の機構、地球生物進化の歴史を通じてではなく、構成的実験により研究するものである。これにより、地球生物に普遍的に見られる性質が、物理化学的に決定された性質か、一つの進化系統に属するが故なのか、の判定ができるようになった。例えば、DNA 製の酵素デオキシリボザイムは進化分子工学によって多種のものが創出され、地球生物において DNA が酵素機能を持たないのはその物理化学的性質によるものではないことが判明した。進化分子工学によれば、地球進化史上の生命に限定した研究では到達し得ないような一般的な生命システムの理解が可能となる。なかんずく遺伝情報の物理化学的起源と、遺伝情報の効率的獲得の物理化学的過程に対する知見が挙げられる。

なお、進化分子工学はこのようなアカデミックな側面と同時に、新規機能性核酸や蛋白質を創出するバイオテクノロジーとしても発展している。実際、2004 年末にはアプタマー医薬の第 1 号が米国 FDA に認可され、進化バイオ医薬の時代が始まった。埼玉大学も応用研究として、JST 埼玉県地域結集型共同研究事業「高速分子進化による高機能バイオ分子の創出」（H15-H19、事業総括：大関正弘、研究統括：伏見譲）、並びに、その成果を受けて、文科省都市エリア産学官連携促進事業（一般型）埼玉・圏央エリア「タンパク質の高速分子育種を基盤技術とする先端バイオ産業の創出」（H19-H21、事業総括：神保秀久、研究統括：伏見譲）の 2 本の産学官共同研究を「埼玉バイオ」の名の下に行い、地域 COE を構築している。ちなみに、埼玉バイオは埼玉大学第 1 期中期計画に

その推進が明記されている。この応用研究の成果については、別の機会に報告したい。

2. 自律分子進化を実現する自然淘汰型進化リアクター

2.1. 核酸の等温増幅法の利用したプロモーターの最適化と中立進化を経る進化過程 (担当: 上野泰生)

進化する分子系の実験システムを進化リアクターという。進化分子工学は進化リアクターの設計原理と運転原理に関する学問である。進化リアクターの設計原理の基本は5つの条件にまとめることができた。その内の3つはダーウィン淘汰を実現するための条件であるが、核酸のダーウィン淘汰を実現するには次の2つの条件で十分である。すなわち、(1) 非平衡開放系、(2) 自己触媒反応系、である。

一方、進化リアクターは人為淘汰型と自然淘汰型に分類できる。適応度 (fitness、生存競争における強さの指標) を実験者の目的に合わせて人為的に設定するのが前者であり、directed evolution と呼ばれるプロセスとなる。アプタマー技術などのバイオテクノロジー応用がこれである。一方、適応度を比増殖速度に設定するのが自然淘汰型である。後で述べるように自然淘汰型は自律進化 (autonomous evolution) が起こるプロセスとなる。

PCR増幅系は(2)の条件を満たすが、比増殖速度が温度サイクルで決まるため自然淘汰型には使いにくい。3SR法やRNA-Z法などの、転写過程と逆転写・RNaseH 処理過程を介して ssDNA テンプレートを再生産して増幅するワンポット等温核酸増幅法は、塩基配列の違いによる比増殖速度の違いが生存競争結果に反映するため、自然淘汰型進化リアクターに適している。ここで、条件(1)としてはフローリアクターを導入するのが理想的だが、技術的困難さから継代植え継ぎ実験でエミュレートする。

RNA-Z 法進化リアクターを、HIV-1RT と耐熱性 TT7 RNA ポリメラーゼの2酵素系を用いて 1.4M トレハロース存在下で 50℃の等温過程で DNA/RNA を増幅する系として構築した。これにより G-start の mRNA を作る TT7 プロモータの 50℃の最適配列を網羅的 *in vitro* selection (20 ラウンド継代植え継ぎ) で決定した。それは 37℃の野生型プロモータとハミング距離 2 だけ離れた配列 (Nagayasu 配列と呼ぶ) であった。この進化実験では、上流のタグ配列コンテキスト変化に依存して適応度の2段階淘汰過程が観察された。適応度変化のプラトー領域 (7-15 ラウンド) では、中立進化による塩基配列の放散が観察された。

以上の成果を踏まえ、H18年度は、テンプレートの初期配列として、上流のタグを除去したもの (テンプレート G 改) と、想定転写開始部位が A のもの (テンプレート A 改) を用いて、継代植え継ぎを行い、最強プロモータを求めると共に、進化過程を解析した。予想通り、テンプレート G 改に対しては、集団の配列は一気に収束し、5, 7, 10 ラウンドのコンセンサス配列は、既に Nagayasu 配列であった。すなわち、Nagayasu 配列が、TT7RNA ポリメラーゼの 50℃における (転写が G で始まる) プロモータの最強配列であることを確認した。一方、テンプレート A 改に対しては、20 ラウンドでも未だ収束しなかった。しかも、想定転写開始部位が A から G に変異しており、コンテキスト依存の淘汰による進化の途上であることがわかった。想定転写開始部位が変異を起こさないように配列を設計し直し実験する必要がある。また、プロモータ配列以外の箇所に欠失が起こっており、塩基配列決定において、この欠失の影響を調査する必要がある。

高温における最強プロモータ配列は、自然淘汰型進化リアクターを安定に運転するのに使用できる。また、遺伝子工学における蛋白質収量の向上に貢献する。また、初期テンプレート配列を、より原始的なものに設定すれば、自己複製する配列情報の起源に関する知見が得られよう。

2.2. 分子系によるアルゴリズムの自動獲得

われわれは既に、HIV-1RT と S P 6-RNAポリメラーゼの2酵素系を用いた3SR増幅機構での継代植え継ぎ実験の興味ある結果を報告した。ランダム配列を有するテンプレートを初期ライブラリーとして進化リアクターを運転すると、**進化する分子系によるアルゴリズムの自動獲得**と呼ぶべき現象が起こった。すなわち、植え継ぎ最終段試験管中のDNAの塩基配列を決定したところ、CATCH法と呼ばれるものに類似の増幅機構をもつ分子の存在が明らかにされた。CATCH法をドイツの科学者が考案する以前に、我々の試験管の中のDNA分子自体が同様の増幅機構を発明したのである。増幅機構（「増幅」コマンドを実現するためのアルゴリズム）を規定するものは、実験操作の系列以外に、増幅するDNAの塩基配列の一部を占める特異的配列がある。この特異的配列の配置とその塩基配列が自律進化し、新しいアルゴリズムを自ら獲得したのである。このような自律進化現象は、**自然淘汰型進化リアクターの特長**であると考えられる。

このように、進化する分子が核酸のみである系では、情報の起源は物理化学的なものが支配的である。実際、以上の実験で用いた蛋白質酵素は所与の不変的存在であった。そこで、本プロジェクトでは、酵素蛋白質を所与とせず、それ自体も進化するような自然淘汰型進化リアクターの構築を検討した。

3. 蛋白質の進化における遺伝子型・表現型対応付け

3.1. N末端-3'末端結合による*in vitro*ウイルスの開発(担当:上野 真吾)

蛋白質のダーウィン淘汰を実現する条件としては、上述の2つの条件(1)、(2)に、条件(3)遺伝子型・表現型対応付け戦略を持つ系、が付け加わる。この対応付け戦略として単純で効率的なものは、我々がウイルス型戦略と呼ぶもので、遺伝子型分子(mRNA又はcDNA)と表現型分子(タンパク質)を何らかのリンカーを介して結合するという戦略である。1997年に我々が三菱化学生命研と共同開発した*in vitro*ウイルスは、無細胞翻訳系のリボソーム上でmRNAの3'末端と新生蛋白のC末端とをピューロマイシンをリンカーとして結合するものである。これはファージディスプレイ法の*in vitro*版と見なすこともでき、mRNAディスプレイ法とも呼ばれる。しかし、これらは応用指向の即物的命名法であり、試験管を宿主とし増殖し進化する人工ウイルスを含意する*in vitro*ウイルスという命名法の方が、真の研究の方向を指し示している。この*in vitro*ウイルスは、蛋白質のC末端、mRNAの3'末端が塞がれているので、これらの末端が機能部位であるような場合には使用できないことになる。実際、提示RNAレプリカーゼは、3'末端が塞がれている自分のRNAを複製することはできない。

そこで、sup tRNAを利用した蛋白質への非天然アミノ酸導入法にヒントを得て、N末端とmRNAの5'末端付近で両者を共有結合で結合する新しいタイプの*in vitro*ウイルスを開発してきた(図1)。mRNAの開始コドンから数コドン下流に終止コドンを配置し、アミノアシル化したsup tRNAのアミノ酸側鎖をリンカー鎖を介してmRNAの5'末端に結合させる。このコンストラクトを無細胞翻訳系に投入することにより、mRNAと連結したアミノアシルsup tRNAが5'側の終止コドンで取り込まれ、蛋白質のN末端側とmRNAの5'末端が連結される。

6xHis-Tag配列を含む上記mRNAコンストラクトを*E.coli* S30 extractに投入し、その翻訳産物をNi-NTAでスクリーニングし、RT-PCRを行った結果、ネガティブコントロールに比較して有意に増幅率が高い結果が得られ、スクリーニングサイクルを回すことに成功した。また、6xHis-tag配列を含む“ウイルス”と、FLAG-tag配列を含む“ウイルス”の混合物から、Ni-NTAを用いて、6xHis-tag配列をもつ“ウイルス”の濃縮に成功した。同様に、anti FLAG M2抗体を用いて、FLAG-tag配列を含む“ウイルス”の濃縮にも成功した(図2)。また、FLAG-tag配列を含むmRNAコンストラクトをPURESYSTEM無細胞翻訳系に投入し、その翻訳産物をSDS-PAGEで解析したところ、mRNA-peptide複合体の形成を確認できた。

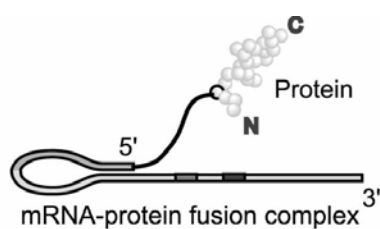


図1. Schema of new *in vitro* virus
(See text.)

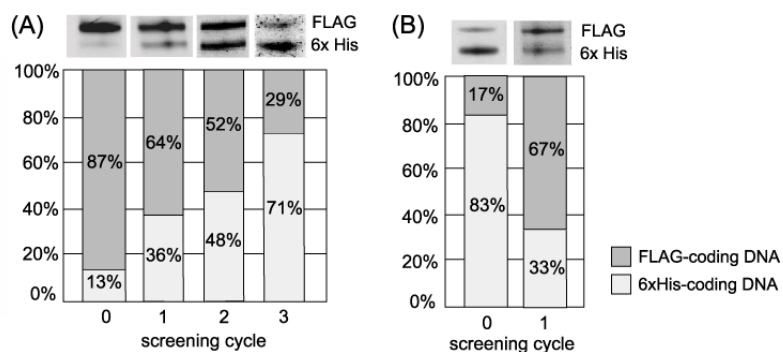


図2. Selective enrichment experiments (See text.)

3.2. RNAポリメラーゼやRNAレプリカーゼを提示した*in vitro*ウイルス (担当: 新井秀直)

RNA ポリメラーゼ (転写酵素) を提示している *in vitro* DNA ウイルスは、転写によって自己の遺伝子型を増幅する。この増幅の過程で突然変異が起これば、自己の転写能が変化するという意味で自己言及系になっている。またコーディング領域の突然変異によって最適プロモーターも変化しうるし、プロモーター領域も多様化しうるから、転写酵素とプロモーターの共進化が起こる系となる。この共進化系での情報獲得過程は、物理化学的必然と偶然の絡み合う過程となるので生命情報獲得機構を考える構成的生物学として興味深い。しかしながら、T7 RNA ポリメラーゼは巨大であり、*in vitro* virus 形成効率が悪いと判断された。よって、分子量がその約 1/2 の RNA レプリカーゼを提示する *in vitro* RNA virus の検討を開始したところである。これも自己言及系で、自然淘汰型進化リアクターによる進化に適している。上述したように RNA レプリカーゼは 3' 末端を認識・機能部位とするので、5' 結合型 *in vitro* virus を用いる必要がある。これにより、生存アルゴリズムを自動的に創出する人工生命というべき自律的に進化する *in vitro* virus を実体として構築することが期待される。

5. 成果の公表

H18年度に公表された本研究に係わる成果：

S. Ueno, H. Arai, M. Suzuki, Y. Husimi, An *in vitro* display method for evolution of the protein having free C-terminus, *Meeting Program of EABS & BSJ 2006 (Okinawa)*, **46:2**, S329, (2006).

Y. Ageno, H. Nagayasu, N. Yamada, Y. Husimi, Evolution of Promoter in Natural Selection-type Evolution Reactor, *Meeting Program of EABS & BSJ 2006 (Okinawa)*, **46:2**, S329, (2006).

密接に関係する研究が、次の論文と著書で発表された：

相田 拓洋, 伏見 譲, 実験室内分子進化過程の熱力学および情報論的解釈, *生物物理*, **46**, 137-143 (2006)

Biyani M, Husimi Y, Nemoto N, Solid-phase translation and RNA-protein fusion: a novel approach for folding quality control and direct immobilization of protein using anchored mRNA, *Nucleic Acids Res*, **34**, e140 (2006)

伏見譲, 西垣功一編著, 「進化・情報・かたち：生命知のパースペクティブ」, 培風館, 2006

生井沢寛, 堂前知也, 伏見譲, 早川尚男, 今田正俊, 「複雑システム科学」, 放送大学教育振興会, 2007