

試験管中で自律的に進化する *in vitro* DNA ウイルスの開発

(課題番号：14580666)

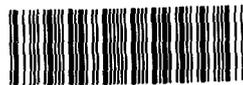
平成14年度～平成15年度科学研究費補助金(基盤研究C(2))

研究成果報告書

平成16年5月

研究代表者： 伏見 譲
(埼玉大学工学部教授)

埼玉大学図書館



204800459

埼大コーナー

はしがき

In vitro ウイルスとは、mRNA（ないし、cDNA）とそれがコードしている蛋白質分子とが結合した核酸・蛋白質複合体を“ウイルス粒子”とみなし、その“ライフサイクル”（複製、転写、翻訳）を全て *in vitro* で行い、蛋白質を高速に増幅・評価・進化させようとするものである。 mRNA-protein fusion とか mRNA ディスプレーと呼ぶ人もいる（経緯は後述）。

当研究室で、「進化しつつある核酸分子に手を加えないで済む *in vitro* DNA ウイルス」が開発された。リンカー・プライマーと称する DNA オリゴマー誘導體（両末端とも 3' という特殊なもの）の片方の末端にあらかじめピューロマイシンを化学的に結合させておいたものを用意しておく。これを「エサ」として、人工ウイルス突然変異体集団を「培養」というイメージに近づいたシステムができた。従って、これを 3SR などの等温核酸増幅法と組み合わせれば、このウイルスの比増殖速度を適応度（生存競争における評価関数）とするような進化過程が観測できるはずである。比増殖速度を適応度とすれば、自然淘汰型進化リアクターが構築できる。これは、セルスタット（大腸菌の流れの中でフェージを連続培養し、フェージの進化過程を観測する装置；1982年われわれが開発）の *in vitro* 版である。そしてまた、3SR 核酸進化リアクターの蛋白質版である。

一方、当研究室の 3SR 核酸進化リアクターの研究から、自然淘汰型進化リアクター中では、自律的な進化過程が観察されることがわかっている。本研究では、蛋白質が関与する進化分子系で、自律進化過程が観察されることを期待している。この単純化され理想化された分子自律進化系の構築を基礎に、生体高分子系の進化能(Evolvability)という物性の本質を解明する。データの創出のみならず、アルゴリズムの創出が起こる機構の解明である。それは生命の起源、すなわち生命情報の物理的起源に関して、生物物理からの寄与となるであろう。と同時に、試験管内進化による機能性蛋白質の創出を通して、福祉・産業に寄与することができよう。

研究組織

研究代表者： 伏見 譲 （埼玉大学工学部機能材料工学科教授）

研究協力者： 鈴木美穂 （埼玉大学工学部機能材料工学科助手）

研究協力者： 田淵一郎 （埼玉県中小企業振興公社博士研究員）

研究協力者： 空本清香、上野 真吾、小島進也

（埼玉大学大学院理工学部機能材料工学専攻院生）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成14年度	2,000	0	2,000
平成15年度	1,600	0	1,600
総計	3,600	0	3,600

研究発表

（1）学会誌等

Aita T., Hamamatsu N., Nomiya Y, Uchiyama H., Shibana Y. and Husimi Y., Surveying a Local Fitness Landscape of a Protein with Epistatic Sites for the study of Directed Evolution, *Biopolymers*, **64**, 95-105 (2002).

Husimi Y, Aita T. and Tabuchi I., Correlated Flexible Molecular Coding and Molecular Evolvability, *J.Biol.Phys.*, **28**, 499-507 (2002).

Kitamura K., Kinoshita Y., Narazaki S., Nemoto N., Husimi Y., Nishigaki K., Construction of block shuffled libraries of DNA for evolutionary protein engineering: Y-ligation based block shuffling, *Protein Engineering* **15**, 843-853 (2002)

Tabuchi I., Soramoto S., Suzuki M., Nemoto N. and Husimi Y., An efficient ligation in the making of in vitro virus for in vitro protein evolution, *Biological Proced. Online*, **4**, 49-54 (2002).

Aita T. and Husimi Y., Statistical Formulae for Energy Distribution among a Globular Protein Structure Ensemble, *J.Theor.Biol.*, **220**, 107-121 (2003).

Aita T., Ota M., Husimi Y., An *in silico* exploration of Neutral network in protein sequence space, *J.Theor.Biol.*, **221**, 599-613 (2003)

Aita T., Husimi Y., Thermodynamical Interpretation of Adaptive Walk on a Mt. Fuji-type Fitness Landscape: Einstein's Relation-like Formula holds in a Stochastic Evolution, *J. Theor. Biol.*, **225**, 215-228 (2003)

Suzuki,M., et al., Intramolecular Fluorescent Resonance Energy Transfer (FRET) by BODIPY Chemical Modification of Cysteine-engineered Mutants of Green Fluorescent

Protein, *Chem.Lett.* **32**, 306-307 (2003)

Aita,T, Husimi,Y, Thermodynamic Interpretation of evolutionary dynamics on a fitness landscape in an evolution reactor I. *Bulletin Math. Biology*, in press (2004)

Aita,T, Husimi,Y, Thermodynamic Interpretation of evolutionary dynamics on a fitness landscape in an evolution reactor II. *Bulletin Math. Biology*, submitted.

Tabuchi I., Soramoto S., Ueno S., Husimi Y., Multi-Line Split DNA Synthesis: a combinatorial method to make a high quality peptide library, *BMC Biotech.* submitted.

伏見 譲, 田淵 一郎, *In vitro* virus と進化分子工学, 蛋白質・核酸・酵素(特集: 化学と生物学の接点がつくる NEW バイオテクノロジー), 48, 1481-1487 (2003)

相田 拓洋, 伏見 譲, 進化実験系の解析・評価技術・適応歩行技術の研究: 中立ネットワーク, 埼玉大学地域共同研究センター紀要, **2**, 37- 39(2002.).

相田 拓洋, 伏見 譲, 進化実験系における配列空間適応歩行の理論的解析, 埼玉大学地域共同研究センター紀要, **2**, 121-127(2002.).

伏見 譲、生命の起源と進化への生物物理学的アプローチ、学術の動向, 9:6, 60-63 (2004)

(2) 口頭発表

相田 拓洋, 伏見 譲, タンパク質配列空間中の中立ネットワークに沿った進化可能性, 日本進化学会第4回学術講演会(東京), Vol.4, (2002.8).

岡 裕之, 遠田 健一, 伏見 譲, 大腸菌プロモータの適応度地形の探査, 生物物理 2002 日本生物物理学会第40回年会講演予稿集, Vol.42, p. S67 (2002.11).

空本 清香, 田淵 一郎, 上野 真吾, 伏見 譲, コドン出現頻度が制御可能なランダム DNA ライブラリーの設計と構築, 生物物理 2002 日本生物物理学会第40回年会講演予稿集, Vol.42, p. S79 (2002.11).

相田 拓洋, 太田 元規, 伏見 譲, タンパク質主鎖構造の中立ネットワーク探査, 生物物理 2002 日本生物物理学会第40回年会講演予稿集, Vol.42, p. S139 (2002.11).

松岡 真人, 伏見 譲, セルスタットのための相関ネフェロメーターの開発, 生物物理 2002 日本生物物理学会第 40 回年会講演予稿集, Vol.42, p. S173 (2002.11).

Husimi Y., Evolutionary molecular engineering and the evolvability of biopolymers, 7th International Symposium on Bio-Nanoelectronics: Creation of Nano-Micro Structures in Bioscience & Technology, Proc., Vol.7, p.3, pp. 14-28 (2002.11).

伊藤 洋一郎, 根本 直人, 鈴木 美穂, 四方 哲也, 伏見 譲, GFP をインジケータとした新規クローニングシステムとそのハイスループット化への応用, 第 25 回日本分子生物学会, Vol.25, p.1515 (2002.12).

Aita T., Husimi Y., Formulation of the energy distribution among a globular protein structure ensemble for the high-throughput screening of sequences, 13th International Conference on Genome Informatics (GIW2002), Vol.13, pp. - (2002.12).

Soramoto S., Ueno S., Tabuchi I., Husimi Y., Design of Various High Quality Random Libraries for in vitro Protein Evolution, 13th International Conference on Genome Informatics (GIW2002), Vol.13, pp. - (2002.12).

Suzuki M., Ito Y., Husimi Y., Multipurpose indicator in cells using intramolecular FRET between GFP and chemical compounds, SPIE BiOS 2003, Genetically Engineered Probes Conference (San Jose), 2003.1

伏見 譲, 進化分子工学の将来—Directed Evolution から Autonomous Evolution へ—, 産業科学技術研究開発制度「加速型生物機能構築技術」最終報告会 (東京), 2003.2

伏見 譲, 進化分子工学の発展, 埼玉大学群馬大学工学部懇談会 (桐生), 2003.3

伏見 譲, ポストゲノム時代の先端研究とバイオベンチャー発展の方向性, 首都圏バイオ・ベンチャーネットワーク第 1 回研修会基調講演 (東京), 2003.5

相田拓洋, 伏見 譲, 実験室内進化ダイナミクスの熱力学的概念に基づく解釈, 日本進化学会第 5 回大会 (福岡), 2003.8

上野真吾, 田淵一郎, 空本清香, 深石 圭, 新井秀直, 伏見 譲, 進化蛋白質工学のための高品質ランダム DNA ライブラリーの作製, 日本生物物理学会第 41 回年会 (新潟), 生

物物理, 43, 79-79, 2003.9

相田拓洋, 伏見 譲, 配列空間に於ける実験室内分子進化ダイナミクスの熱力学的概念による解釈, 日本生物物理学会第42回年会(新潟) 生物物理, 43, 207-207, 2003.9

小島進也, 小池充烈, 永安弘樹, 伏見 譲, 高温等温核酸増幅を用いた自然淘汰型進化リアクターの構築, 日本生物物理学会第43回年会(新潟) 生物物理, 43, 208-208, 2003.9

富田允, 熊谷英郷, 飯塚 毅, 伏見 譲, 固定化DNA-ISFETを用いたDNA複製反応の実時間モニター, 日本生物物理学会第44回年会(新潟) 生物物理, 43, 221-221, 2003.9

伏見 譲, 分子進化における遊びと無駄の効用, 日本生物物理学会第45回年会(新潟), 生物物理, 43, 23-23, 2003.9

伏見 譲, 分子認識と分子情報, 第3回バイオナノ技術研究会(仙台), 2003.10

伏見 譲, 生体高分子を進化させる, 法政大学マイクロ・ナノテクノロジー研究センター第1回定例セミナー, 2003.10

Husimi Y., Aita T., Free fitness as a measure of biological information, the determinant of molecular evolution, EABS2003 Fourth East Asian Biophysics Symposium Taipei, Taiwan, Abstract p.11, 2003.11

伏見 譲, 生命分子系は細胞を必要とするか? — 進化分子工学からの考察、日本生命の起源及び進化学会(奈良) 2004.3

伏見 譲, *in vitro* 自然淘汰型進化リアクター、科研費特定研究(B) 分子プログラミング公開シンポジウム(横浜)、2004.3

(3) 出版物

伏見 譲(編集および分担), シリーズ・ニューバイオフィジックスII第8巻「生命の起源と進化の物理学」, 共立出版, (2003.1).

伏見 譲(編集および分担), 「生命の起源——「物質の進化」から「生命の進化」へ」、丸善パリティブックス, (2004.2)

(8) 研究成果

1. 研究背景

1. 1 遺伝子型表現型対応付けにおけるウイルス型戦略

進化分子工学（分子進化学、directed evolution, in vitro selection などの別名で呼ばれることもある）は、RNA、一本鎖DNA、蛋白質を進化リアクター中で、超高速進化させたり新規機能を創出する工学で、われわれが、セルスタットの開発以来取り組んできた分野である。特に米国において1990年以来、RNAや一本鎖DNAの進化分子工学が先行し、核酸の潜在的機能を開花させることに次々に成功していることは、周知の通りである。核酸は、遺伝子型と表現型とが同一分子であるために、両者の対応付けに特別の工夫がいらぬ。一方、蛋白質進化では、それが自己増殖能を持たぬことから、両者の対応付け戦略が進化能を決定する。そのもっとも単純なものが、単純なウイルスが採用している、遺伝子型分子と表現型分子を結合して対応づける戦略である。

最初の蛋白質進化のための進化リアクター・セルスタットは、大腸菌を宿主とする繊維状ファージfdを作業用分子（遺伝子型・表現型結合体）とするウイルス型対応付け戦略を採用したものであったが、fdファージ粒子は10個の遺伝子からなるゲノム一本鎖DNAの周りに5種2700個強のコート蛋白が結合したもので、非常に複雑な分子構成をしている。これを極限まで単純化すれば、1個の遺伝子DNAに、それがコードしている蛋白質1個が結合している「最小のウイルス粒子」が想定できる。このようなものが構築できれば、蛋白質の分子進化の過程が実験的に明確に観測できると考えた。現実の実験系では、無細胞翻訳系でmRNAと新生蛋白を何らかの方法で結合すればよい。この方法として、3種類の方法を考案したが、結局、最後に試した、ピューロマイシンをリンカーとする方法が、三菱化成生命研柳川弘志氏の協力を得て成功した(Nemoto et al., FEBS Lett., (1997))。この方法は、それまでのファージ提示法よりも遙かに分子多様性を取り扱え、また淘汰圧の多様性に耐える系となった。少し遅れて開発した米国 Szostak らは mRNA-protein fusion と呼んでいる。この in vitro RNA ウイルスを利用すると、 10^{12} の分子多様性をもつ集団の進化を扱え、そのおかげで、Szostak らは、ランダム配列から出発して、機能性の蛋白を進化させることに成功し、進化RNA工学と同じような成果を蛋白質でも再現しつつある。米国ファイロス社は cDNA-protein fusion を開発し、RNA よりも安定なウイルスを作った。しかし、これら従来のもものは全て、進化しつつある mRNA 分子等の 3' 末端を化学的酵素的に修飾し、ピューロマイシンを結合させなければならない。これでは、自律進化系を構築することはできなかった。

1. 2 自律進化しうる in vitro DNA ウイルスの開発

2001年に、1997年の in vitro RNA ウイルスの弱点を克服する、図1. に示すような in vitro DNA ウイルスの開発に成功した。2種のペプチドタグを持つ2種ウイル

スの「混合培養」を行い、それらタグを特異的に結合する環境下での、淘汰実験でその有効性を示した (Tabuchi et al., FEBS Lett, 2001)。 図2. に示すような両端が3'末端であるようなDNAオリゴマー誘導体である「リンカー・プライマー」を新たに有機合成した。これはピューロマイシン結合のためのリンカーであると同時に、cDNA合成のための逆転写プライマーでもある2重機能を持つ。これがハイブリダイゼーションしたmRNAでは、その部位でリボソームによる翻訳は停止し、その間にピューロマイシンがAサイトに取り込まれ、その結果、新生蛋白質C末端にリンカー・プライマーが結合する。ついで逆転写すれば、cDNAに共有結合で蛋白質が結合したもの (in vitro virus 粒子) が得られる。ハイブリダイゼーション配列中に停止コドンを隠せば従来のものでは不可能であった停止コドン付きmRNAも扱える。

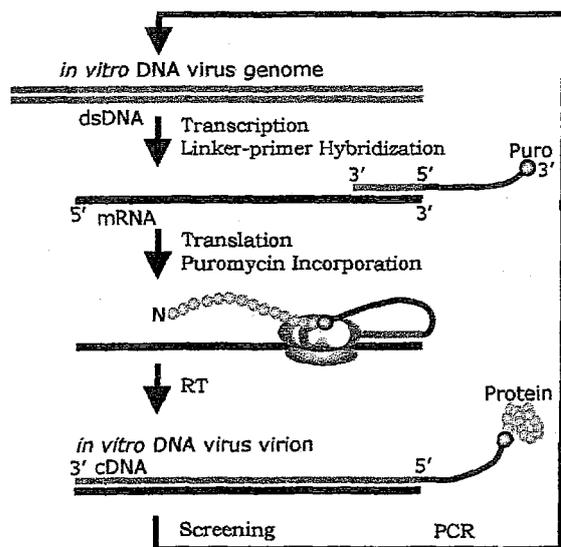
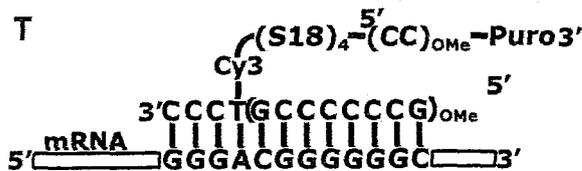


図1. *in vitro* DNA virus の分子構成と「ライフサイクル」 (Tabuchi et al., FEBS Lett, 2001)

進化しつつあるmRNA に手を加えないで済むことに注意。新規合成したLinker-primer (図2) と2種のPCRプライマー、及びdNTPを「エサ」として、この「ウイルス」を「培養」し、制御された環境下で、その進化過程を観測することができる。

図2. T-Linker-primer。 mRNAにハイブリダイゼーションした新規合成Linker-primer。

Puro はピューロマイシン。リボソームはこのハイブリによる障害で翻訳を停止し、その間にピューロマイシンのAサイトへの取り込みと、蛋白質C末端への結合が実現する。Linker-primer はcDNA合成のためのプライマーでもある。



1.3 等温核酸増幅を用いた DNA 進化リアクター中での増幅機構の自律的進化の観測と、その制御法の開発

3SR (Self-Sustained Sequence Replication) などの等温ワンポットDNA増幅法を用いると、DNAの比増殖速度を適応度とする自然淘汰型進化リアクターを構築できる。われわれはHIV-1RT と SP6-RNAポリメラーゼの2酵素系3SRの継代植え継ぎ法でこれを模擬した。ランダム配列領域を含むテンプレート集団から出発すると、驚いたことに、3SRでは増幅できないDNAが進化してきた。分子系が、より効率のよい増幅法を自動的に編み出したのである。それは、別の研究者が理論的に考えて提案していたCATCH法であった。進化する分子系によるアルゴリズムの自動獲得と言ってよい。このような自律進化現象は、自然淘汰型の特長であると考えられる。

次に、RNA-Z型増幅のみを阻害するアンチセンスDNAオリゴマーを考案し、RNA-Z増幅機構への進化を抑制する方法を考案し、進化的にかなり安定な3SR進化リアクターの運転に成功した。(Yamamoto et al., Chem.Lett, (2001))

1.4 蛋白質適応度地形の解析法の開発

蛋白質の点突然変異の効果には統計的相加性があるということを示唆するデータを根拠に、われわれは、アミノ酸部位の機能への相加性に基づく適応度地形の理論(富士山型地形の理論)を確立した。この理論は非相加性の寄与を評価できる枠組みを持っている。富士山の斜面の勾配とその上の凸凹の比を、 θ 値と定義し、これをダーウィン進化のしやすさのパラメータとする。多くの実験データを解析した結果、進化した実績を持つ蛋白質の局所的適応度地形は、多くの場合、この意味で多少の凸凹のある富士山型地形として捉えることができることがわかった。例外的に強い相互作用(エピスタシス)を持つアミノ酸部位対がある場合があることがわかり、これを取り扱えるように理論は拡張されている(Aita et al, Biopolymers **64**, 95-105 (2002))。同じ理論で、標準遺伝コード表が進化能へ非常に寄与していることが評価できた。一方、配列空間の大域的には、中立ネットワークが張り巡らされているという知見がRNAで理論的に得られ、実験的にも支持されているので、蛋白質でも同様の中立ネットによる配列空間のパークレーションの有無を検討した(Aita et al., J.Theor.Biol.**221**, 599-613 (2003))。

このように、蛋白質は進化しやすいという物性(進化能)を持っているように見える。この蛋白質分子の進化能の内容を実験的に掘り下げるために、in vitro DNA ウイルスは、強力な実験系を提供すると思われる。

2. 研究成果概要

2.1 50℃の3SRとRNA-Z

耐熱性 T7RNAポリメラーゼを用いて1.4Mトレハロース存在下で50℃の等温過程でDNA/RNAを増幅する系を構築した。この系で、A,T,Gの3塩基からなるランダム領域を含

み 3SR 増幅機構をコードしたライブラリーを初期プールとして、適応度を比増殖速度とする自然淘汰型進化リアクターを運転した。勝ち残る配列はランダム領域が AT-rich となる傾向を示す。また、以前からしばしば観測された、より速い増幅機構である RNA-Z 増幅機構をコードした突然変異体が進化してくることはなかった。また、T7 プロモータの 50℃ の最適配列を RNA-Z 法進化リアクターを用いた *in vitro selection* で求めた。37℃ の野生型プロモータとハミング距離 2 だけ離れた配列であった。

2. 2 アミノ酸組成が自由に設計でき終止コドンを含まないランダム DNA ライブラリー
in vitro virus のゲノムに載せるべき初期ランダムライブラリーは、終止コドンを含んでいてはならず、また、対象に応じてアミノ酸組成が自由に設計できることが望ましい。DNA 合成機を 3 台並列に運転してスプリット合成する MLSDS 法は配列多様性が 10^{16} に達する。このライブラリーの実際の合成物を複数種いろいろな評価関数で評価しその高品質なことを確認した。また、長鎖化法を検討した。

2. 3 進化リアクター過程の熱力学的解釈と生命情報の内訳

人為淘汰型や自然淘汰型の進化リアクター中で、富士山型や NK モデル型などの適応度地形を山登りするダイナミクスを理論的に研究した。突然変異率と集団サイズで決まるゆらぎの効果を「進化温度 (T)」というパラメーターで表す。いずれの地形でも、T が高いときは、歩行者は適応度 (W) 最大を目指すのではなく、「自由適応度 (G)」の最大をめざすというリャプノフ関数 G を定義できる。この自由適応度最大点の近傍では、進化アドミタンスと適応度の分散の間に、アインシュタインの関係式に似た関係式が成り立つ。さらに、進化の過程で獲得したシャノンの意味の情報量 (情報の extent) 以外に、 $\Delta W/T$ は獲得した適応度情報量 (情報の content)、 $\Delta G/T$ は進化の過程で獲得した生命情報の量、という解釈ができることがわかった。生命情報はシャノン情報量と適応度情報量の和で表されるという発見である。

3. 研究成果詳論

巻末に添付した 5 編の論文別刷りをもって報告に替える。上記論文リスト中、太字で記した論文がそれに当たる。

4. 今後の展望

この 2 年間の研究では、以上を統合して、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までには至らなかった。

今後の展望としては、図 3 に示すような転写酵素をコードしている *in vitro DNA* ウイルスを構築したい。このウイルスのゲノムは、この転写酵素のためのプロモータとこの転写酵素自体の構造遺伝子からなる。転写酵素 *in vitro DNA* ウイルスのコート蛋白の機能は、

自分をコードしている mRNA をスタンピング増幅することであり、自分の遺伝子型の増幅である。従って最も速く増幅してくる *in vitro* ウイルスは、最も酵素活性の高い転写酵素を担っていることになる。これは自律的に進化する蛋白質進化系である。これをフローリアクター中に置けば、*in vitro virus* の“連続培養”ができる、すなわち、セルスタットの *in vitro* 版が構築できる。これは試験管中で増幅し、突然変異を起こし、淘汰を受け、進化するから、ウエットウェアの人工生命と言ってよいだろう。

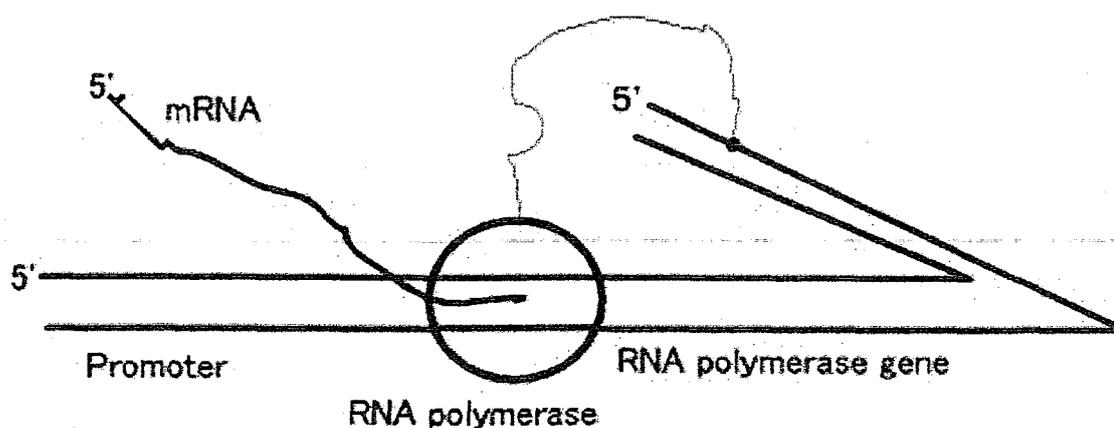


図 3. 転写酵素 *in vitro* DNA ウイルス。これは自律的に進化する蛋白質進化系であり、ウエットウェア人工生命であると言いうる。