

進化分子工学の始まり

埼玉大学工学部 伏見 譲

An emerging biotechnology, the evolutionary molecular engineering, provides a new design principle of functional RNAs or proteins based on the Darwinian mechanism of molecular evolution. There are three types of the evolution reactor corresponding to three types of assignment strategy between the genotype and the phenotype, namely, RNA-type, virus-type and cell-type.

evolution experiment / evolutionary molecular engineering / biopolymer / fitness landscape / sequence space

1. 進化分子工学とは

現在の地球上の生物は45億年の進化の産物であり、DNA分子上の遺伝情報がその進化の結果を記録にとどめている。生物という分子システムは、環境から情報を受けとり、変換し、DNA分子上に蓄積することによって、自らを最適化させる機構を持っている。対象を分子レベルの進化に限定すれば、この現象を実験室で研究できるようになる。そのような実験室内分子進化の機構が解かってきたので、その分子工学的応用も可能となった。すなわち、この機構を用いて、新しい機能性生体高分子（触媒、ワクチン、抗ウイルス剤、選択的凝集剤、バイオ素子、…）の自動設計を行うのである。機能に応じて環境を設定すれば、設計書はDNA/RNAの塩基配列として得られることになる。これが進化分子工学である^{1),2)}。逆にこの工学を推進する中から、分子進化の機構や生体高分子の特異な物性を明確にする理学の進歩も期待できる。これはまた、タンパク質工学における、構造論的アプローチに相補的な工学と言える。

工学的応用の観点から、進化機構を分類してみよう。まず、情報の獲得過程がどこにあるかに関しては、2つのものが考えられた。まず、ラマルクによる、環境に適応するように各個体が遺伝情報を変化させるというもの。すなわち、情報の獲得過程は突然変異の過程にあるというもの。次に、ダーウィンによる、ランダムな遺伝情報変化*¹⁾があった後で、その中から環境が選ぶというもの。突然変異過程は情報の散逸過程で

ある。ところでラマルク進化は熱力学的にはもとより、分子生物学的には極めて考えにくいものである。まず、生細胞中には新しい情報をDNA分子に書き込む分子機械（WRITEマシンと呼ぼう）が見つからない。仮にWRITEマシンがあるとしても、環境に適応するのに必要な機能の仕様情報を、いかにして塩基配列情報に情報変換するのか不明である。一方、ダーウィン進化は生物のもつ合目的性質を、目的論を用いずに説明できる。それは工学的応用がすぐにでもできる事を意味する。

進化機構の分類の次のレベルは、環境がいかにして、ランダム突然変異体集団の中から勝者を選ぶのかに関係する。これには、中立説という、中立突然変異体の有限集団内の浮動・機会的固定による機構（Survival of the Luckiest）、カオスによる機構、及び、淘汰による次のような諸機構が考えられた。即ち、ネオダーウィニズムという、有利突然変異体の成長に基づく自然淘汰による機構（Survival of the Fittest）、また、環境ゆらぎ説という、変動環境中の自然淘汰による機構、さらには、擬種説という、突然変異体分布の局在性相転移に基づく自然淘汰による機構など。

この淘汰の原理を用いた進化分子工学が、1980年代半ばからドイツ、日本、米国で研究されていたが、1990年に、米国の数カ所の研究機関から相次いでその成功の報告が出た^{3)~11)}。1990年は「進化」の思想に染まった新しいバイオの時代の元年と言える。

2. 遺伝子型と表現型を対応づける方法

淘汰による進化が起こるためには、遺伝子型と表現

*) 突然変異過程には、物質的エネルギー的制約があるから、情報変化は数理的な意味ではランダムではない。

Evolutionary Molecular Engineering

Yuzuru HUSIMI
Saitama University

表1 遺伝子型と表現型を対応づける方法と生命の形態

戦術	生命体の例	進化分子工学の例 (実施例)
同一分子上に乗せる	RNA ワールドの機能性 RNA	進化 RNA 工学 3),4),5),6),12),25)
一つの結合体とする	ウイルス粒子	セルスタット, 融合ファージ 7),8),9),10),14),22),23),27)
一つの袋に入れる	細胞	クローニング型進化リアクター 26),28) ケモスタット (プラスミド)

型を対応づける必要がある。なぜなら、この最適化過程の評価関数は、表現型の環境への適応度（淘汰値）であるにもかかわらず、選び出したい実体は遺伝子型を担う分子（DNA, RNA）の方だからである。対応づけの方法は、地球上の生物進化でも、進化分子工学でも、表1にのせた3つが考えられてきた。従って、進化機構学的観点に立てば、RNA ワールドの RNA 分子も、ウイルスも、細胞生物も、それぞれ異なる戦術を用いているが、それぞれの環境に適応する戦術を身につけているという点で、基本的には同等な生命体である。細胞はクローニング実験の試験管と同じ役割を果たしているのである。細胞膜の機能は、外界との境界としての機能もさる事ながら、他の個体との境界としての機能も強調されるべきであろう。

進化分子工学を遂行するマシンを進化リアクターというが、表1は、進化リアクターにはクローニング型と非クローニング型の2種類がある事を示している。配列空間の探索の効率はいかに大量の突然変異体を調べるかに依存するので、試験管やマイクロプレートの数の制限を受けるクローニング型に比し、分子の数でしか制限を受けない非クローニング型の方が効率がよい。また、自然淘汰型と人為淘汰型の2種類にも分類できる。前者は作業レプリコンにとっての価値と、実験者の価値が一致する場合、後者は一致しない場合に相当する。筆者は最近まで、前者は非クローニング型でよいが、後者はクローニング型でなければならないと思っていたが、分子機能が他分子との結合力によって評価できる場合は、後述のように RNA 型適応戦術とウイルス型適応戦術に対しては、その必要はない。

3. 生体高分子の基本的性質としての分子進化

高機能の生体高分子は、分子進化の結果生じた物で

あるから、この表題が出てくる。ダーウィンのな分子進化をし得る性質とは何か、分子の構造と物性に即した表現が必要である。一方、生体高分子の基本的機能としてその特異的立体構造に基づく相互作用特異性がある。分子生物学の最大の成果は、生命現象の基本過程がこの特異的相互作用にある事を、高分子構造から明らかにした点にあるとされている。たとえば、酵素は、基質の遷移状態の構造とのみ準安定な複合体を作るような物質である。この特異的相互作用の進化こそ分子進化の主要な内容であろう。原始にランダム現象の中からこのような相補的な分子の表面形状がある確率で生じ得る事、その表面形状がより小さな解離定数を持つように、モノマー単位の置換により、漸進的に変化し得ること、その表明形状が他の分子と結合するように、モノマー単位の置換により、漸進的に変化し得る事、などが生体高分子のもつ分子進化可能性という性質の分子構造論的表現である。しかし構造論だけでは現象は起こらない。

ここで重要な事は、相互作用特異性が正のフィードバックループを持つことである。すなわち、相互作用特異性があることが、相互作用特異性の進化を促す。これは次のような考察からわかる。

生命体であるための必要条件を並べることにより、進化する分子系の十分条件が得られる筈である。まず、次の2つは生命の必要条件だろう：

①開放系、 ②自己増殖系

②の性質は生体高分子の特異的相互作用の結果出てくるものである。この2つの性質があると、ある程度一般的な物理化学的モデル系で、自然淘汰が起こる事が数学的に証明できる¹³⁾。また、有限小集団なら、遺伝的浮動による突然変異体の集団内固定も起こりうる。特に、初期条件として、配列空間のスープと称する、可能な全ての塩基配列をもつ核酸分子集団を系に投入

したとき、そのうちのただ一つの塩基配列だけが生き残ることがわかる(淘汰値が縮退していればその範囲で)。その塩基配列こそ、環境情報を配列情報に変換したものである。これが自然淘汰が自動的情報獲得機構である事の証明である。環境から DNA 分子への直接的 WRITE マシンは存在しないが、条件①かつ②は間接的 WRITE の機構を与えてくれている。

初期に配列空間のスープを取り揃えることは、配列長 ν がすこしでも長くなると指数関数的に困難となり、すぐに事実上不可能となる。($\nu=135$ で配列空間の点の数 N は全宇宙の原子の数を越える。) ところが、生命を構成する分子系は次のような性質を持っている:

③突然変異, ④配列空間上の特殊な淘汰値の地形条件③があると、初期条件で取り揃えることのできなかった配列空間の未知の領域を探索できるようになる。条件④は、その探索が漸進的に高速に起こるようにするものであるが、現実の生体高分子がどのような地形を持っているかの研究が進んでいる^{13),14)}。ダーウィンの淘汰の原理によって漸進的に高速最適化されるために理想的な地形は、富士山型の地形である。この場合は最適配列を得るのに、 4^ν のランダム突然変異の試行ではなく、 $4 \times \nu$ の試行で済む。生体高分子が配列空間で大域的に富士山型の地形を取っているかどうかは誰も知らないが、局所的には、多少の凹凸はあるものの、基本は富士山型であるらしい。タンパク質工学で作られた種々の点突然変異タンパクと多重点突然変異タンパクの物性データを比較してみると、点突然変異の効果は、大部分が相加的であった。触媒能、タンパク・タンパク相互作用、タンパク・DNA 相互作用、立体構造安定性など重要な物性の全てについてこのことがいえる¹⁵⁾。少数の例外はあるものの、地形は富士山型に近いものとなる。われわれのファージの連続培養のデータもこのことに矛盾しない¹⁴⁾。

一方、点突然変異の効果が大規模に相互依存すると、地形は極めて凹凸したものとなるという、スピングラス模型や NK 模型¹⁶⁾ などの数理モデルも研究されている。ここで K は、一つの点突然変異の効果に影響を及ぼす他の点突然変異の数である。しかし、 K の値は生体高分子の物性によって決定され、上述の結果からすると、例外はあるものの、統計的には K は十分小さいであろう。なお、立体構造形成に協同性があるからと言って、 K が大きいとは限らないことを注意しておく。 K が小さければ、 $(K+1)$ 重点突然変異体の総スペクトルを得る事は可能であり、淘汰の原理による最適化が途中がトラップされる事はない。

4. 分子進化の超高速化

進化分子工学を実行するには、対象遺伝子に自己増殖性を持たせる必要がある。それを担うものを作業レプリコンと呼ぼう。これは複製速度が速く、個体数(分子数)を大きくできるものほどよい。実際に使用されているものは、ファージ、プラスミド、 $Q\beta$ 様 RNA, RNA の PCR プロセスである。

対象遺伝子は短いほど、進化は高速である¹⁴⁾。これにランダム突然変異をかけて遺伝子突然変異体プールを作り、それらを作業レプリコンに組み込み、自己増殖し得る突然変異体プールを得る。次いで、ある環境条件に設定された開放系中で「培養」すれば、淘汰が起こり、最適化が実行される。この部分的に最適化された遺伝子を単離し、上記プロセスを繰り返すことにより配列空間中の adaptive walk による生体高分子機能の最適化、即ち分子進化が起こる。

突然変異プロセスを分離せず、開放系中で淘汰プロセスと一体化した実験も行われた。最初の試験管内分子進化実験は、 $Q\beta$ レプリカーゼによって複製される $Q\beta$ 様 RNA 分子が環境条件に適応するようにその塩基配列を変化させる実験であった¹⁷⁾⁻²⁰⁾。開放系の条件は素朴に次々と試験管に「植え継ぐ」事によって行われた。最近開放系の条件を、化学反応進行波法で実現した巧妙な実験が行われた²¹⁾。われわれのバクテリオファージ連続培養法セルスタットによる、組換え DNA の遺伝的安定性実験も同種の実験である^{14),22),23)}。

新規機能性高分子を進化論的に設計したという結果を明瞭に出したのは、Szostak ら³⁾ が最初である。彼らは、ある色素分子に特異的に結合する RNA 分子 ($\nu=100$) の塩基配列をこの方法で決定した。突然変異プロセスは DNA 合成機によるランダム合成、自己増殖は逆翻訳 / RCR / 翻訳法、開放系の条件は、その色素が固定化されたアフィニティクロマトグラフィーである。突然変異体プールの 10^{13} 種の RNA がスクリーニングされた。しかし、未だこのプロセスを繰り返してはいないので、進化分子工学の心髄には達していない。

Smith ら⁹⁾ は Ff ファージのパイロットタンパクの N 末端近傍に外来ペプチドを挿入しても、ファージとして増殖することを利用して、ウイルス型適応戦略を用いた。各ファージ粒子は、その表面に 10^7 種の内の一つの 6 mer アミノ酸配列を持っており、その DNA 上にはこれに対応する遺伝情報を持っている。遺伝情報のこの部分は DNA 合成機でランダム合成された。この融合ファージ集団を、あるモノクローナル抗体に対

する結合力でアフィニティー精製 / 増幅し、最適のエピトープを決定した。

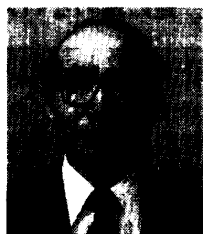
われわれは同じ F1 ファージを用いて、主コート蛋白の最適化をセルスタット法で²⁷⁾, *lac* プロモータの最強化をクローニング法で行い²⁸⁾, 配列空間の adaptive walk をさせている。

最後に、進化分子工学の次の段階を示唆する仕事を紹介しておく。Fodor ら²⁴⁾ は、「光制御で番地付けられた並列化学合成法」という、 n 段合成で 2^n 種類の配列を持つ高分子を同時にガラス板 (1.6cm^2) 上に番地づけて合成する方法を開発した。超 LSI 作成技術を援用すれば将来 10^{10} 番地 / cm^2 は可能である。このクローニング済みの莫大な突然変異体プールを、たとえば蛍光抗体法でスクリーニングすれば、ある分子と特異的に相互作用する高分子の単量体配列を決定することができる。この技術はダーウィン進化の条件を満たしており、核酸やタンパク以外に「生体高分子」概念を拡張する可能性を秘めている。

文 献

- 1) Eigen M, and Gardiner WC (1984) *Pure & Appl. Chem.* **56**, 967-978.
- 2) 伏見 譲 (1988) 現代化学, **204**, 38-44.
- 3) Ellington AD, and Szostak JW (1990) *Nature*, **346**, 818-822.
- 4) Green R, Ellington AD, and Szostak JW (1990) *Nature*, **347**, 406-408.
- 5) Tuerk C, and Gold L (1990) *Science* **249**, 505-510.
- 6) Robertson DL, and Joyce GF (1990) *Nature*, **344**, 467-468.
- 7) Cwirla SE, Peters EA, Barrett RW, and Dower WJ (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6378-6382.
- 8) Devlin JJ, Panganiban LC, and Devlin PE (1990) *Science*, **249**, 404-406.
- 9) Scott JK, and Smith GT (1990) *Science*, **249**, 386-249
- 10) McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, and Chiswell DJ (1990) *Nature*, **348**, 552-554.
- 11) Lewin R (1991) 科学, **61**, 79-82.
- 12) Joyce GF (1989) *Gene*, **82**, 83-87.
- 13) 伏見 譲 (1991) 科学, **61**, 333-340.
- 14) Husimi Y (1989) *Adv. Biophys.* **25**, 1-43.
- 15) Wells JA (1990) *Biochem.*, **29**, 8509-8517.
- 16) Kauffman SA, and Weinberger ED (1989) **141**, 211-245.
- 17) Mills DR, Peterson RL, and Spiegelman S (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **58**, 217-224.
- 18) Spiegelman S (1971) *Q. Rev. Biophys.*, **4**, 213-253.
- 19) Kramer FR, Mills DR, Cole PE, Nishihara T, and Spiegelman S (1974) *J. Mol. Biol.*, **89**, 719-736.
- 20) Biebricher CK (1983) in Hecht MK, Wallace B, and Prance GT eds. "Evolutionary Biology, Vol. 16", (Plenum Pub. Co.) pp. 1-52.
- 21) Bauer GL, McCaskill JS, Otten H, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7937-7941.
- 22) Husimi Y, Nishigaki K, Kinoshita Y, and Tanaka T (1982) *Rev. Sci. Instrum.* **53**, 517-522.
- 23) Husimi Y, and Keweloh H-C (1987) *Rev. Sci. Instrum.* **58**, 1109-1111.
- 24) Fodor SPA, Read JL, Pirrung MC, Stryer L, Lu AT, and Solas D (1991) *Science*, **251**, 767-773.
- 25) 井上 丹 (1991) 生物物理, **31**, 115-121.
- 26) Eigen M (1987) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **52**, 307-320.
- 27) 木原 拓, 西垣功一, 伏見 譲 (1989) 生物物理, **29**, S226.
- 28) 村田 学, 吉野賢二, 伏見 譲 (1991) 生物物理, **31**, S129.

ふしみ ゆずる



1943年兵庫県出身。東京大学理学部物理学科卒業 (1965)。同大学院理学研究科物理学専門課程博士課程中退, 同助手, 埼玉大学理工学部講師, 工学部助教授を経て, 埼玉大学工学部環境化学工学科教授 (1986)。この間, 1985-87年, 断続的に西独マックスプランク生物物理化学研究所客員研究員。進化現象を物理化学や分子生物物理学の立場から見つめてみたい。

趣味: 科学史 連絡先: 〒338浦和市下大久保255埼玉大学工学部
TEL 048-852-2111 ex. 2294
Fax 048-855-2889
E-Mail a32723@sinet.ad.jp