

“ゲノム” – 生体分子システムの^{かなめ}要 – をめぐって

理工学研究科物質科学部門 西垣 功一

Graduate School of Science and Engineering

1. はじめに

大学での研究活動のレビューを書くということは、とりまなおさず教育活動を振り返るということにつながっている。若干の感慨を込めながら、あえて資料をひもとかず、頭に去来する事項をひたすら書き留めていくことにする。そのために、大切なことを書き漏らす可能性が最初からあり、予めご容赦のほどをお願いする次第です。研究活動の大半を記述できるように努めて書き始めていく。

2. 「生命とは何か」を探求する研究

高校生の頃から、そんな研究をやりたいとぼんやりと考えていた。しかし、1968年大学に進んでみても明瞭で適切な研究テーマは思いつくはずがなかった。時折しも、“学園紛争”となり、「政治・社会問題との関わり」をも絡めたテーマ探索の日々が続くことになった。今とは違い、便利なインターネットなどは当然なくて、情報の元は図書館や書店に求めるしかない時代で、本郷や駒場の総合図書館に通うしかなかった。そこでは様々な学問分野の取組の違いがわかったぐらいで自分のテーマとしていけそうなものは結局見つからなかった。大きな方向性は決まっていた、そこで具体的に何をすべきかがわからない。何をやっていいかわからない中で、とりあえず直感的に「生物物理学」が気に入った。当時、京都大学には「生物物理学科」ができていたが、東大にはそれがなく、学科としては、生物化学科がそれに近かった（事実、後に知ったことだが、学科の英語名は Dept. of Biochemistry and Biophysics であり、Biophysics を志向した名称となっていた）。当時は人気の学科であったが幸運にも進学振り分けで進むことができた。最終学年の卒業研究は学園紛争の影響もあって、実質4か月の短期コース（正常な場合でも6か月）となったが、日本の生物物理化学のパイオニア的教授の野田春彦先生の研究室でお世話になった。カラーゲン研究を始め繊維状高分子研究に実績のある研究室で、大真面目に“納豆の糸”のレオロジーという物理化学系のテーマに取り組んだ。試料調製、粘度測定、ペプチドフラクタン¹の結合様式解析、ゲル電気泳動測定、超遠心機分析、納豆菌培養など短い時間ながら、研究室の多くの先生方や先輩のお蔭で、同期の原田勇君（卒業後、山陽国策パルプへ）と楽しく有意義な経験ができた。しかし、「生命とは何か？」からやや遠い気がした。

2-1 リボゾーム研究

1972年に大学院生として、理学系研究科生物化学専攻に進み、駒場の磯研究室に所属した。指導教授の磯晃二郎先生が「分子生物学の基礎を鍛える」と標榜されていたのに惹かれてご指導いただくことにした。これには経緯があり、卒業研究の指導教授野田先生に無理を言って「脳研究をやりたい」と研究室を飛び出すような希望を表明した所、「それでは、脳研（東大医学部付属）の黒田教授を紹介しよう」と取り継いでくださった。黒田（正則）先生をお伺いしたところ、「あなたの先輩にあたる当研究室助手の芳賀君を紹介しますので、詳しい話を聞いてください。」とおっしゃった。そうして、懇意にお話いただいた芳賀達也先生の言葉に「今、学部卒の段階で脳科学に飛び込むのは、時期尚早であり、専門的基礎を

身につけてからにした方がいい。」とあり、これが磯研究室を考えるきっかけとなった。その段階で一旦、脳科学を断念した(まだテーマを探し求めて彷徨中の出来事であり、比較的素直であった。約 40 年後に再び脳科学と出会うことになる)。

さて、磯研究室でのリボソーム研究 4 年間では、基本的に独立・自主・放任の研究室の雰囲気から、研究の世界の厳しさ、難しさをマジマジと実感するとともに、面白さをジワジワと体感することになった。当時の世界の最先端リボソーム研究のレベルと比べる時、伝統の浅い日本の大学の一研究室が取り組むことの成算のなさは、大学院に進んだばかりの一学生の私にもひしひしと感じられていた。ドイツ MPI (Max・Planck 研究所) の Wittmann チームが毎月のように *J. Mol. Biol.* 誌に掲載してくるリボソーム研究は質・量共に溜息のでものものであり、自分の研究のひ弱さを嫌という程、味合わされた。当時のリボソーム研究の中心は原核細胞生物大腸菌の 70S リボソーム研究であり、Wisconsin 大学の日本人研究者野村真康のリボソーム再構成実験が精彩を放っており、上述の Wittmann らの研究はそれを個々のタンパク質レベルで肉付けしていく研究であった。また、当時は、リボソーム全体を結晶化するなどという大胆な考えは、誰も本気にしない時代であり(その 25 年後に実現してしまった!!!)、構成タンパク質の幾つかを重金属置換して中性子散乱法で構成タンパク質の相対位置を調べるという操作を繰り返していくとかジメチルスベリミドなどの二価架橋剤で隣接タンパク質を一つ一つ推定して行くというような実験を駆使して、巨大分子会合体の三次元構造を解明して行くしか術がない時代であった。無論、当時、電子顕微鏡によるアプローチもあったが、酸化モリブデンを蒸着させるシャドウイング法で像をえるという素朴で低解像度のものがやっとならぬであった。それにしてもこのリボソーム研究を追いかけるということは、先に行くポルシェを自転車で追いかけるよりももっと勝目がなかった。さすがに指導教授の磯先生は、同じ原核生物では相手にならないと悟っておられて、真核生物「酵母」を用いたリボソーム研究を開始されていた。1970 年当時の分子生物学の世界はまだ原核生物「大腸菌」の研究が完成のはるか手前であり、その段階でより複雑性の高い真核細胞生物の酵母を手がけた研究は、比較生物学的研究を除いては、ほとんど無かった。「ニッチを開拓する」という意味では良い戦略だが、リボソーム自体が 70S から 80S へと大きくなり複雑化する点と、世界に共通する研究者が殆どいないためにすべての基礎データを自力で開墾する必要が発生するという不利な点があった。実際、私の修士研究テーマは「酵母のリボソームサブユニット 60S の構成タンパク質分析」という地道なものであり、博士に進んだ後の研究前半においても残るサブユニット 40S のタンパク質分析が中心であった。グラウンド整備から始めて一つ一つ足場を固めていくしかない状態であった。「JMB に掲載されるような最先端の研究はいつになったらやれるかな〜。」と焦りとも諦めともつかない複雑な気持ちで取り組んでいた青春の日々を昨日のように想い出す。私のいた頃の、駒場の磯研究室は、磯教授と 2 人の助手(船越浩海先生、古賀洋介先生)と 1 人の事務スタッフと 3 人の先輩大学院生と数人(平均 2~3 人)の後輩大学院生・卒研(東京大学教養学部基礎科の 4 年生)から構成された総勢 10 人程度の比較的小さな研究室であった。同じ生化学系ということで、酵素学がご専門の山崎誠先生(当時助教授)やそのグループの藤岡輝子先生や赤沼宏先生(当時助手)が所属しておられ、隔週、合同でセミナーを運営していて、全体では 20 人ぐらいになり、多くの若いエネルギーにあふれ賑やかで楽しく過ごすと同時に、生物化学や生物物理学の専門修行になった。しかし自分自身の特定のテーマ「リボソームの構造と機能」については、具体的に攻める道具も不足していれば、ノウハウも少ない状況であり、同時期、学問のフェアウエイをひたすら猛進する同じ世代の学友(その中には東大医科学研究所で研鑽し後に海外に出て大活躍した長田重一君や斉藤春男君がいた)に会っても、うまく話が噛み合わず、学問的田舎に住んでいる思いがした。しかし、今思えば、“田舎住まい”が許されていたということは大変有難い状況であったといえる。

2-2 分子システム論研究

工学や実業の世界では、大きな「目的(ゴール)」があって、それに到達するまでの一里塚のような「目標(マイルストーン)」を幾つか設定して、1つ、1つ、それらのマイルストーンへの到達を積み重ねて、最終的に確実にゴールすることを目指す。プロジェクト研究を行うと最初にそのようなデザインをすることになる。一方、そのような研究の進め方と180度異なっているのが、ぼんやりとした目的に向かって、「なにを、どのように、研究すればいいのか？」と尋ねながらゆっくりと進む学問的彷徨である。殆ど20歳台を通じて、学問的目的探索を続けていたが、ようやく鮮明に見えてきた目的が標記の「分子システム論」であった。生命現象について、「分子生物学」が個々の分子の働きを明らかにし、「生物物理学」が物理法則に基づきそれらの現象を説明するというような図式の中で、何か説明しきれないものがある。それらだけでは生命現象の全体が説明できない。それはなにか？それは、「個別の分子の振る舞いやその主要なる現象だけを相手にしたこれまでの学問」ではなく「分子全体をシステムとしてとらえる学問(分子システム論)」だと考えて、当時手に入った関連の書籍を読み漁った。中でも、Von Bertalanffy の「一般システム論」は試作段階の感はあるが刺激的であった。また、目指すものからしてやや専門に過ぎる感じではあったが、地に着いた学問の「熱力学」を学んだ。1970年代の計算科学勃興期のことであったが、システムの記述に究極的に計算機は欠かせないことは認識していた。目的とおよその攻め方がはっきりしてきたものの、具体的にどう進めていくかは依然、暗中模索であった。

この頃(1976年初)、卒業研究の指導教授を務めてくださった本郷の野田春彦先生から、ある日突然、「物理学科の伏見君が、埼玉大学に勤めることになって、手伝ってくれる助手を探している。1人、2人、私の辺の人に聞いたのだが、気が進まないようです。君はどうですか？」と駒場の私にお電話があった。結局、ご縁があって、私は発足直後の埼玉大学理工学部環境化学工学科(私が着任した1976年7月には、理工学部ではなく工学部が変わっていた)に助手として着任することになった。当時、東大物理の生物物理学教室で和田昭允教授の下で助手をされていた新進気鋭の伏見譲先生はまだ学位取得前で、講師として着任された。無論、私もまだ博士課程の2年の段階で、件の「リボゾーム研究」に悪戦苦闘中で、博士号取得を目前にしていたころのことであった(このこともあって、野田先生からの話には、当初やや躊躇したが、「伏見君に会ってみてはどうかね？」との薦めに、「お願いします」と即答したのは今考えれば運が良かった(若い伏見先生は人間的魅力にも溢れておられた)。

3. 埼玉大学での研究の立ち上げ

1976年、埼玉大学工学部の新しい学科(環境化学工学科)で、新しい研究室(環境化学基礎講座)が発足し、新しいスタッフ4人(応用化学科から移られた田中豊助(とよすけ)教授およびその年の9月から着任の木下保則技官とで構成)で、新しいテーマに向かって出発することになった。すべてゼロから始めるという大きなエネルギーが必要ではあったが、かけがえのない貴重な体験をすることになった(実はこの16年後、再度、新学科(機能材料工学科)を立ち上げることになったが、その時は既に16年間に蓄えた装置・器具・ノウハウなどの資産があった)。研究については、もともと有機金属化学がご専門で当時まだ55歳の田中教授は「伏見先生を中心に若い人たちで生物物理学研究を進めてください」とはっきりとおっしゃり(ご自身の専門に関しては一切学生をとらず、専らご自身だけで化学史研究に専念され、後にラポアジェの「化学のはじめ」をかわきりに偉大な化学者の原著を扱った「古典化学シリーズ」を営々と翻訳・上梓された)、まだ当時33歳で講師の身分であられた伏見先生に、講座の運営を全面的に任せられ、田中教授は完全に裏方に回られた。研究室内の放談で、伏見先生が「進化実験」をやるつもりですと言われ、一方、27歳の私は「システム論」に関心を持っていると表明しながら、研究室一丸となって、「実験室内進化実験」のテーマに取り組むことになった。研究室の整備の一方、学生実験をゼロから準備していくことができたのは、公務員試験を合格して研究室に配属された当時まだ24歳で科学技術のセンスの

よい木下技官がフルに仕えてくれていたからと思ひ起こす。田中教授も加わられ、それぞれ専門分野の異なる講座の全メンバー4人で、Kornbergの“DNA Replication”を完読することから研究室は動き出した。

3-1 ウイルス連続培養装置「セルスタット」

1982年、研究室発足以来5年余りを経過して初めて本格的英語論文が出版された。世界で初めて、ウイルスの連続培養に成功したこととそのために創製した装置を報じるものであった(Husimi Y., Nishigaki K., Kinoshita Y., and Tanaka T. **Cellstat-A continuous culture system of a bacteriophage for the study of the mutation rate and the selection process at the DNA level**, *Rev. Sci. Instrum.* 1982)¹⁾ 共著者に学生の名前がないことから推察されるように、研究室立ち上げ直後の仕事で、研究を担えるまでに育った学生がまだいなかった。140時間連続培養実験の夜間運転のすべてをボンボンベッドの上のシュラフで仮眠し、数時間ごとに眼をこすりながらサンプリングしていた日のことは懐かしい。セルスタットという名前は、長期にわたり均一条件下でウイルス(ここで用いたのは、大腸菌には寄生するが人畜無害なバクテリオファージfd)を培養し続けるために、ウイルスのエサとなる大腸菌を均一生理状態・均一濃度で長時間供給し続けるシステム(“細胞(cell)が定常状態(stat)”にある)からつけられた名前である(図-1参照)。この実験室内進化実験の遂行に当たって、私は連続培養実験の遂行と、もう一つ大きな課題として、進化実験過程で発生する膨大な数に上る変異型ウイルスのDNA解析をミッションとしていた。

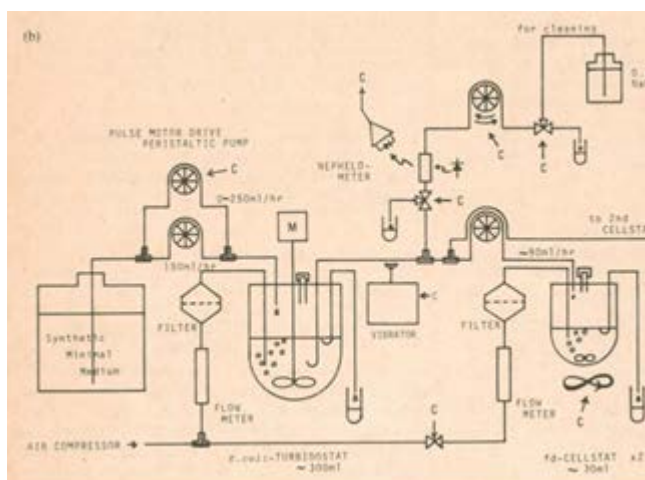


図1. セルスタットの構成図 右下の小さな丸底フラスコがセルスタット本体(ウイルスを連続培養する槽)。図は原論文¹⁾から引用。

3-2 DNA解析技術の開発

1976年にイギリスのSangerらが「酵素法」で、一方、アメリカのGilbertらが「化学法」でDNAの塩基配列を解析する技術を開発し、あっという間に世界中の分子生物学者らがこの技術を競って使い、重要な発見(利根川博士の抗体分子の多様性機構解明もこの技術なしでは成し得なかった)をしていった。しかし当時は、化学法または酵素法でシーケン斯拉ダーDNAを作成しておいた後、手造りした5~70cmのガラス板ゲルを用いて電気泳動して、その後、オートラジオグラフィ法でフィルムに感光させて像をえる。その泳動パターンからDNAの塩基配列情報を取得するというもので、1度に300~500塩基長を読み取るのがやっとであった。私は、1981年手初めに京都大学化学研究所(宇治市)の高浪満教授らが今のTaKaRaと共同で主催された「Sanger法講習会」に参加することができた。全国から10人近い参加者を(抽選で)募って行われた。このことから明らかなように、まだ日本では、この段階はシーケンシング技術普及段階であった。このころに、まさに世界に先駆けて伏見先生は、恩師の東大和田教授の要望で、独自に「4色蛍光自動シーケンシング法」の開発を行っていた。結局、当時の産学官連携体制の不備から、国内特許を取り下げざるをえないことになったばかりか、1985年には基本的に同じ原理でアメリカのABI社からDNAシーケンサーが販売されることになった。DNAシーケンサーはその後、その後継機を含めて、20年近くにわたり、とりわけ、1990年代に入って本格化した“ヒトゲノム計画”の実験を支える中心的装置として活躍してきた(この間のことは、岸宣仁氏の「ゲノム敗北」(ダイヤモンド社)が詳しい)。最近になっ

て、次世代シーケンサー (NGS) が現れ、多量シーケンシングの重要性が一層増している。

この間、同じ研究室で伏見先生らが DNA シーケンサーを開発しているのを横目に、私は Harvard 大学の Fisher らが開発した DNA 断片の 2 次元ゲル電気泳動法を参考にし、DNA の変異体解析に取り組んでいた。私は当初から、その変性剤濃度勾配法に着目して、彼らが採用した 2 次元展開 (1 次元目と 2 次元目で異なる原理 (分子サイズや等電点や融解点など) で 2 度泳動する方法) ではなく、変性剤の濃度勾配上で 1 次元平面展開する方式 (DGGE) に拘った研究をしていた。卒業研究の阿部徹君が担当してくれていた。1981 年の春には、Fisher らの行った 2 次元方式を採用することを強く迫る伏見先生と 1 次元平面展開を追求する私とで一時険悪な関係になった (伏見先生のような強い要請は珍しかった)。手作りのゲル作製器具や恒温型泳動装置を作製し (ここでは伏見先生の有益なアドバイスもあった)、データが出だしたのが 1981 年の卒業研究生金子清光君や翌年の増田政昭君らの実験であった。この方式の実験 (DGGE) に拘ったのは実はリボソームの構造研究をしていた頃に、カラムクロマトグラフィーや電気泳動法などで変性剤の濃度を徐々にあげていくことによるリボソームの漸進的構造崩壊と剥離溶出タンパク質の関係を調べるという実験のアイデアを抱いていたからで、実際にはそれを実践する前に就職してしまっていたことなどがあった。対象はリボソームという RNA・タンパク質複合体と片や 2 本鎖 DNA と全く異なるが、私の頭の中では同じように漸進的崩壊過程が見られると確信していた。頑なになった (私企業なら解雇もの?) わけだが、これは実った。この研究は、今日停年退職を迎える今に至るまでその延長の仕事が続いているという意味で、感慨深い。とりわけ、変性剤濃度勾配 (DGGE) のついたゲル平面上で、DNA が特徴的な移動度変異現象を示すこと (図-2) は、当初「謎」であった。増田君が根気よく実践した丁寧な実験から、特徴点の位置と変性剤濃度との関係は明らかになり、特徴点が構造安定性に関わっていることは間違いのないこととなったが、より本質的な説明に窮していた。丁度その当時、場所も場所、東大の和田研究室は DNA 二重らせんの融解挙動に関する研究で世界をリードしていた (Wada, A. Tachibana, H., Ueno, S. Husimi, Y., Machida, Y. Melting fine structure of DNA fragments of known base sequence from phi X174, *Nature*, 1977)。また丁度そのころ DNA 塩基配列と DNA の融解挙動を結びつける Poland らの理論が完成したのを応用して、和田研究室の秋山氏らは塩基配列情報から DNA 融解過程を予測するプログラムを開発していた。そのことを聞き及んでいた私はそのプログラムを使って、今回のゲル電気泳動における特徴的なパターンとなんらかの関係が明らかになるかどうかを知りたくて、そのソフトを拝借できませんかと伏見先生にお願いした。それから数か月経って、その年度の卒業生・修了生 (研究室最初の修士学生) たちを送り出して研究室が静かになり、教員の我々も自由な時間が増えた 3 月のある夕方のこと、環境化学工学科棟 1 階にある事務室の隣の部屋においてあったターミナルコンピュータを操作して、本郷の大型計算機と通信して例のソフトを運転された伏見先生がその結果を得て、直ちに自らデータ整理をして、明快な形にされた後で、3 階の研究室にいた私に、その結果を示された。明らかに興奮で弾む話され方であった。それを聞いた私は、あまりにも見事な「理論と実験の対応関係」が、あまりにもあっさり目の前に出現したことに対して、喜びを通り過ぎて拍子抜けした感情が起こったことを記憶している。「私のやろうとしていたことを瞬時に完璧に先にやっってしまった！！」しかしその後、自らの幸運に感謝した。この研究

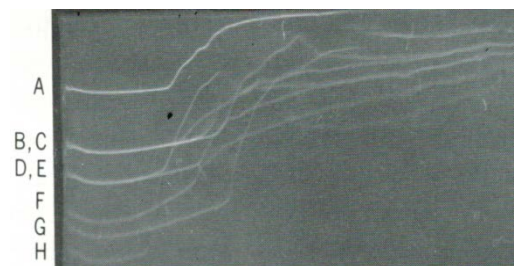


図2. DGGE パターン fd ファージの RF (複製型) を fd 感染培養大腸菌より精製し、制限酵素 HpaII で処理し、得られた DNA 断片を変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) で解析したもの。当時は、二本鎖 DNA も制限酵素も共に貴重な試料であった。この一連の実験で初めて DGGE により、二本鎖 DNA の融解過程が観察されることがわかった (図は増田君のデータに基づく原論文2) から引用)。

成果は世界広しと言えどもその時点では、和田研究室で開発したそのソフトを用いて調べる以外に得ることのできないものであり、それを真っ先に得ることができた(少し遅れて、Harvard 大学で類似のソフトを開発し、我々の発見に追い付き追い越す仕事をした)。さらに、伏見先生一流の潔癖感でこの研究に関しての関わりはそれきりで、それ以上踏み込み主張されることは、今日まで1度もなかった。この仕事は迷わず *J.Biochem.*²⁾ に投稿し(当時 JB は“良識”の学術誌の評判が高かった)採択され(1984 年)、私の学位論文の一部となった。

この成果は、偶然にも、当初のミッションであった多種のウイルスゲノム DNA の迅速解析法ではなく、「二本鎖 DNA の構造解析」というまさに和田研究室が世界をリードして行っていた構造研究に繋がるものとなっていた(分光学的方法の 100 分の 1 の試料で、しかも未精製のままで実験ができるという意味で画期的であった)。このように DGGE 法を DNA の構造情報を与える技術として新発見したが、後に、この研究は当初のミッション「多種の変異体を迅速解析する」を実現する技術に発展していった。すなわち、GP (ゲノムプロファイリング)法というゲノム DNA の迅速解析技術の開発である。

ところで、この少し前(1979 年ごろ)まで、私は世田谷(下北沢)の独身アパート住まいで週末は人気のない駒場の磯研究室でリボソーム研究を続けていた。確か、1979 年の新年は帰省もせず、大晦日から人気のない駒場の研究室にこもり元旦を迎えていたが、不思議なもので、“ヒマラヤの頂上で新年を迎える気分”のような昂揚感があった。この年に、書き上げてはいたが研究室でくすぶっていた一報目の論文「酵母 60S リボソームタンパク分析」と全く同一内容の論文がともあろうに同じ日本の研究室(広島大学)から先んじて国際誌(Ito, T., Higo, K., and Otaka, E.. *Biochemistry*, 1979)に投稿されることになり、この研究の延長で学位論文をまとめることは断念せざるをえなくなってしまった。「よもやこんな地味な仕事をしている人は世界に他にはいるまい」と高を括っていた(そのために、教授の机の上に論文が眠っていてもあまり焦りを感じなかった)のが油断であった。今、年齢を重ねてみると、その種の地味な仕事の重要性が認識され、油断の素になった当時の愚明さを恥じている。

もうこの頃には、“学問的彷徨(ランダムウォーク)”をする余裕もなければ、その気持ちも消え失せてしまっていて、ひたすら目前の研究テーマに精を注ぐだけであった。

3-3 一本鎖核酸の溶液中構造ダイナミクス

1985 年に *Nucl. Acids Res.*³⁾ に投稿した「II 型制限酵素は一般的に一本鎖 DNA を切断する」と題した論文(Nishigaki, K., Kaneko, Y., Wakuda, H., Husimi, Y., Tanaka, T. 共著)は、投稿即受理となった。これは依頼原稿でもない限り、普通はないことであった。それだけ気合が入っていたともいえ、自ら言うのも憚れるが会心の作であった。*Science* や *PNAS* 誌上での“制限酵素論争”にピリオドを打つ意味があった。とりわけ、1 本鎖核酸の溶液中構造ダイナミクスを考える上で、準安定、不安定構造の寄与を実験的に示したことにあり、とりわけ、準安定構造を積極的に考えることで、II 型制限酵素の作用機序を初めて説明できた。その当時、助手の私と一緒に柴崎昌彦君や松田広君が、目が飛び出るほど高価であった制限酵素を自家調製した。東大医科研や和光の理研から株を分取していただいた *H.influenzae* 菌や *B. subtilis* 菌の培養から始めて制限酵素の大量取得に奮闘してくれた(大学院時代にリボソームやそのタンパク精製の経験を嫌というほど積んだお蔭で、fd の RFII DNA 調製や制限酵素精製は抵抗なく進めることができた)。また制限酵素を使った実験では、修士の金子佳男君や卒業研究の和久田英彦君らの器用で丁寧な仕事の実を結んだ。

溶液中核酸構造ダイナミクスについては、別の発見があった。それは今日、SSCP(Single Stranded DNA Conformation Polymorphism)と呼ばれ PubMed の引用数で、2013 年現在、13,223 回という高頻度引用技術(あの iPS が 5745 であるのに対して)となっているものである。これは、卒業研究の長南安浩君や坪田美佐(現在加藤姓)さんが、手間のかかる変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE)を毎回、丹精込め

で行っていた実験の中で発見した。1994 年同じ長さで、塩基配列的にもほぼ同じ(2,3 の点置換のみ) DNA を同時に DGGE 解析したところ、高変性剤側ではぴったりと一致して泳動している 2 本の DNA バンドが低変性剤濃度側で離れて泳動した。この実験を最初に私に報告した卒業研究生の坪田さんは私が驚いていることに、ややきよんとしていたのを思い出す。これが世界で初めて観察された紛れもない SSCP であった。翌々年の 1986 年に *J. Biochem.*⁴⁾ に掲載された。その中で「一本鎖で点置換変異を解析できる(即ち SSCP)」と記述したのが下記の部分であった。

(一本鎖 DNA の高次構造ダイナミクスが SSCP 現象の原因であると分析し、変性剤濃度勾配ゲルのメットを記述した後で)；

“One promising application is to **directly detect point mutations** of such DNAs as mutation carrying genes in humans“ (*J. Biochem.* 99(3), p671 (1986) より)

とはっきり述べていた。このことの持つ重要性は認識していたから、点置換体が手元があれば当然、それを使って実践していたであろうが、問題は、それを持っている研究者(世界にはいた)と共同研究するだけの才覚がなかったことである。今の時代の教員ならば殆どの方が迷わず、その行動に出るのではないかと推測され、当時ののんびりとした時代状況を改めて思い起こしている。

丁度そのころ(1985)、アメリカで PCR が発明され、日本の我々がそれを使うことになるのは数年遅れの 1988 年頃であった。このことは、SSCP の原理を発見した我々が PCR という便利な技術で、随意に点置換体 DNA を手にして、デモンストレーション実験をやることのできるまでには 2~3 年待たなければならなかったことを意味していた。まさにその数年経過した 1989 年に築地の国立がんセンターの研究者らががんとの関係で手持ち豊富なガン関係の点置換体試料を用いて SSCP 解析し、*PNAS* に掲載された。このときに彼らによって、馴染みやすい“SSCP”という名称があたえられ、技術(単に低温でゲル電気泳動するだけ)の簡明さにもかかわらず、点置換体を確実に検出するパフォーマンスの高さで、先ほどの数値(関連論文数 13,223)にみられる高い普及に至ることになった。SSCP 現象をわかりやすく広めたということ自体はがんセンターグループの功績である。しかし、その現象の発見を最初に報じた論文が既に存在した(仮に、それを知らずに独立に自分らが後に発見したとしても)ときに、その事実を頭にするのが、科学者のとるべき道ではなかろうか。

さてそのような“煩わしいトラブルの素”をさておき、我々の研究室では「一本鎖核酸の溶液中高次構造ダイナミクス」に関して、その後、研究を深めていった。

1992 年に修士を修了した佐久間良人君は「一般化した PCR 産物予測プログラム(PCR-Ana)」を開発した(*J. Biochem.* 1994)⁵⁾。これは 1989 年の卒業研究の天野紀彦君と 1990 年修士修了の高沢努君が開発した「ランダム PCR 技術」⁶⁾を理論的に支えるものであり、背景には「溶液中核酸高次構造のダイナミクス」という考えが貫かれている。卒研から修士、博士と進学した齋藤あゆむ君が佐久間君のアルゴリズムの一部を改良・高速化して、当時ようやく入手可能になった大腸菌ゲノム塩基配列(460 万ベース、1996 年解読完了)を対象にして、「オリゴスティッキネス解析」を行った。この時、佐久間君が作成したプログラムで検証材料に用いたラムダファージ DNA(5 万塩基長)のオリゴスティッキネス解析との同一性を齋藤君のプログラム(PCRAna—A1)⁷⁾を用いて調べ、「完全一致」がえられたことは、科学的には当たり前とはいえ感慨深いものがあった(基本的に独立に作成した異なるアルゴリズムの試行産物が一致したこと)。

4. 基礎研究から工学へ

4-1 進化分子工学

在職中、目の当たりにすることのできた科学技術史的出来事の1つは、先述の岸氏のドキュメンタリー「ゲノム敗北」にまとめ上げられている顛末であった。件のシーケンサー原型機(4色蛍光ゲル電気泳動方式)の作製に研究室最初の修士学生であった土屋政幸君やその後の湯浅太郎君、坂部宗親君と技官の木下さんらが淡々と取り組んでいた。1985年、伏見先生がドイツ・ゲッチンゲンに1年間在外研究中の初夏の頃、東大でAlexander Richの講演会があった。4-50人の聴講者の中に、和田先生も居られた。その数ヶ月前に私の学位論文審査委員を務められたばかりで、私のところにわざわざやってこられて、「シーケンシングするのに、1ベース当たり、経費はいくらかかりますか？」と質問された。あまりにも実践的な質問に怪訝な気がするのを抑えながら「現状では、数100円というところでしょうか。」と適当にお応えしたのに対して、「もっと安くなりませんかね」と言い残してご自分の席に戻られた。当時、伏見先生が関係されていた科技庁系のプロジェクト「DNAシーケンサー開発」の指揮をとっておられたのでその関係でそのような質問がでてきたのかとは感じたものの、よもや世界に先駆けて「ヒトゲノム計画」を着想されていたためとは夢にも思わなかった。それが判明したのは翌年(1986年)3月に伏見先生がドイツより戻られ、和田研に顔を出されたときに『殿ご乱心』という噂(和田先生は幕末の偉人木戸孝允の血縁者)が立っているとお聞きした時のことであった。この当時、SangerらのDNAシーケンシング技術がようやく、世界の研究室に普及し、ABI(アプライドバイオシステム)が世界初のDNA自動シーケンサーを世に出そうかという時であったが、その段階でヒトゲノム30億塩基長の全解読を考えるのは、「ライト兄弟が『今から月に飛ぶ』』と言い出した」ように、皆には感じられた。私はといえば、「気概は超一流だが数10年早いのでは？それにしても面白いことを言われるな。」とその時は思った。

1986年3月末、ドイツMPI生物物理化学研究所のEigen研究室から戻ったばかりの伏見先生が帰朝報告(当時、在外研究から戻るとその成果を発表する場が設定された。1992年の私の在外研究帰国頃までは続いていた)され、Evolutionary Molecular Engineering(進化分子工学)の真髓を分かりやすく説明され、「進化分子工学」の理論的整備と普及活動を始められた。ほぼ同時に、世界でこの分野の研究が立ち上がり、1990年にはRNAアプタマーに関する最初の成果がアメリカでSzostak研究室など複数の研究室から一斉に報告され、事実上の進化分子工学元年を迎えた⁸⁾。

4-2 GP法

1980年代、ゲノム研究のもう一つの飛躍は、DNA合成技術が確立したことであった。上述の講演で取り上げたRich博士のX線結晶構造解析による左巻きZ型DNAの発見は、結晶化可能な純度と量のオリゴヌクレオチドの合成が可能となったことによっている。1985年ごろ(PCR法発明の年)にはプライマーサイズのDNAが高価ではあるが入手可能となり(このことがPCR法を実現したともいえる)、1990年代に入ると核酸を研究対象とする研究室ではDNA合成機を所有するトレンドが生まれた。この少し前、我々はプライマーの迅速合成法としてテトラヌクレオチド(即ち4mer)を単位とする液相合成法を提唱し、その一段合成産物がDNAポリメラーゼの鎖伸長反応プライマーとして働くという実証実験を卒研生(1986年度)の山本(現、大橋)由紀子さんがやり遂げた(日本化学会誌1988)⁹⁾。ここでの経験がランダムPCR法(生物物理1990)⁶⁾を生み出すことになった。

この間、我々の考案した特異的DNA増幅技術「プライマー・ストッパー法」(1986年のアイデア:2つのプライマーを用いてゲノム上の任意のDNAを増幅する技術というコンセプトはPCR法と全く同じだが、2つ目のプライマーの貼りつく方向が我々のものは1つ目と同じ方向をむいていて、それが逆を向くPCRとは結果が大きく異なった)は、修士にまで進んだ渋谷剛君が従容として挑戦した。独自技術とはいえ、論文をまとめてJBに投稿した時(1991年)には類似の世界的技術としてPCR法の存在が明らかであり、レ

フェリーの評価は惨憺たるもので、“コンピュータの発明の後に計算尺の発明を申請した”ようなものとなり、至極当然と言えるものだった。我々の主張は、複製物が常に同一のテンプレート由来であり、エラー蓄積率が PCR より低いとか、そもそもこの方法はポリメラーゼ自身の複製精度や速度、プロセシビティ(2次構造にどの程度抵抗的かということ)を調べる実験系として意義があるということであったが、レフェリーの無慈悲な評価には取りつくしまがなく、あっさりと兜を脱いだ。しかし計算尺としての価値はあると埼玉大学紀要(1992)¹¹⁾に努力の跡をとどめることにした。しかし、これらの研究がランダム PCR(一般化 PCR)の素地となった。ランダム PCR はいわば、逆転の発想であった(生物物理 1990)¹⁰⁾。通常の PCR が純度の高い特定の DNA 断片を得るために、特異的結合プライマーを設計して、非特異的結合を避けるために高温(50 度以上)でアニール(プライマーを DNA に結合)させる。一方、ランダム PCR では、逆にアニーリング温度を下げて、様々なゲノム DNA 部位にミスマッチを含む形で結合させる戦略を取る。その結果、ランダム PCR では、ゲノム DNA から色々な DNA 断片を“ランダムサンプリング”(統計学用語)することになる。その際に、ランダムサンプリングではあるが、下記の式で定義される予測可能な DNA 断片になっている。

$$P = f(\text{Template, primer, conditions}) \quad (1)$$

ここで、P は産物 DNA であり、それが Template DNA, primer の配列とモル濃度、温度等の実験条件の関数になっていることを示している。このことを理論的に考察して、佐久間君がコンピュータプログラムを作成し、ランダム PCR 産物の計算科学的予測と実際の実験結果とが一致することを確認した(*J. Biochem.* 1994)⁵⁾。また、先述のように、齋藤あゆむ君がさらに高速化したプログラム(PCRAna-A1)を作成し、当時(1998 年ごろ)、ゲノム塩基配列が分かってまだ日の浅かった大腸菌ゲノム DNA に対して、この予測プログラムを動かして、さらにドイツの Steger が作成した DNA の熱変性過程を予測するプログラム“Poland”¹²⁾に関して、大学院の長谷川孝君が Fortran を使って加工して実験的に得られる 2 本鎖 DNA の融解過程をシミュレーションできるようにした。これらの情報を統合・解釈することで大腸菌ゲノム DNA に対して得られたランダム PCR 産物の塩基配列がシーケンシングせずに予測できるというデモンストレーション実験を行った(*Nucl. Acids Res.* 2000)¹³⁾。チームで主に実験を担当した Mohammed Naimuddin 君は 1997 年に私の研究室にやってきた最初の国費留学生であった。この論文ではかなり大仕掛けな実証法が採用されているが、要はランダム PCR 法が我々の考えた理論通りに作用していることを立証するものであった。実施した 4 例すべてが予測通りであったということでもまとめた。NAR のレフェリーは「もう少し実施例を増やせませんか?」とやってきたが、「4 例で既に十分立証できています。それに、さらに増やそうとすると、1 年以上先になるので、これで認めてください。」と言って納得してもらった。話の分かるレフェリーであった。

このころのゲノムプロファイリング(GP)法研究で、重要な進展があった。それは、ゲノムプロフィールと呼んでいる 2 次元平面に展開される DNA の融解パターンについて、その複雑な曲線の持つ情報全体を利用するのではなく、“特徴点”と呼ぶ曲線固有の特異点を抽出し定量化して取り扱うことにし

内部参照試料特徴点2つを使って規格化に用いる
(蛍光検出法)

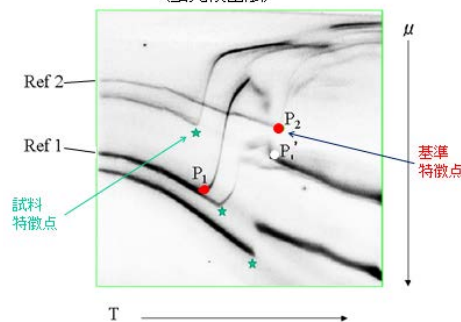


図3. TGGE(温度勾配ゲル電気泳動法)で現れる DNA バンドパターン。上部に横一線に DNA 試料を入れ、上から下に泳動させている。このときに左から右に順次温度が高まるような温度勾配がついているために特定の温度で変性が起こり、移動度(μ)が大きく変化する。ここでは、変性温度とサイズが既知の内部参照試料(Ref1, Ref2)を投入し、規格化に用いている。

た。この際に、内部参照試料を用いて実験的ゆらぎを消去する。その結果得られる特徴点の情報を”種同定点 spiddos (species identification dots)” と称する。Naimuddin 君や渡辺雄大君らとでこれを論文 (*Gene* 2000)¹⁴⁾にまとめあげた。その際、約 20 年前の仕事(1984 年の JB 論文)²⁾で注目した DNA バンドごとに存在する融解開始点の情報を採用したことになった(図-3)。結果的には、この点の情報が極めて再現性の高い情報(Manish Biyani 君の 2.5cm サイズのゲルを使った電気泳動実験(μ TG:2001 年)¹⁵⁾から確認された)であり、再現実験で \sim 0.8%程度の誤差に収まる(2006 年卒業研究の田村志穂子さんの実験など)ことがわかってきた。この特徴点の「指定」を人間が行うために“癖”や“ムラ”が幾分入り込むことを考慮して、それらを排除してさらに高い再現性にすると同時に、データ処理の簡略化を実現する「バンドパターン自動読み取り方式」を検討した。しかしこの画像処理問題は結構手強くて、最初は、1990 年に高沢努君が、次に 2000 年頃に渡辺雄大君達が余技的に挑戦し一定の成果を挙げた(アルゴリズム「連形成参照点シフト方式」など)ものの完成には程遠く、その後 2007 年修士修了の鶴岡誉之君が本格的に取り組んで 60%の正解率(但し、最初から“困難バンド”を忌避すれば、90%以上)のソフトにまで仕上げ、この段階で初めてマンーマシン方式で人の負担を軽減してゲノムプロフィール情報をとりだすことができるようになった。ただ、実用化の前に修士の年限が来てしまった。現在、インド・ラジャスタン大学付属の Biyani's Girls College の情報学部の Madhu 先生と仕上げの作業に取りかかっている。

結局、この技術の特徴として、種同定点 spiddos が中心的役割を果たしており、この点を意識するために、2000 年以降の GP 法の技術を「スピード法」と呼ぶようにしている。

4-3 GP 法(スピード法)

前述のスピード法の確立とほぼ同時に、当時採用していた温度勾配ゲル電気泳動装置(TGGE)を小型化した。この検討をインドからの 2 人目の国費留学生 Manish Biyani 君が担当し、期待通りに分解能を落とさずに小型化するのに成功した(*Electrophoresis* 2001)¹⁵⁾。世の中になかった μ TGGE の出現であった。これにより、わずか 10 分程度で TGGE の泳動が完了するようになり、試料・試薬の量が減り、ゲルの作り置きも容易になった。幸いにして、 μ TGGE システムは当時付き合いのあった企業(タイテック社)の開発部の方々(佐藤清一氏、金海榮一氏、宮谷宣秀氏ら)のご理解で 2001 年に製品化した。

アカデミズムとは離れるが、今日の大学のミッションの一つとなりつつある産学連携との関係で、この装置の趨勢に触れよう。 μ TG は後述の種同定・分類や変異原解析など広い用途の装置である割に今までそれほど普及していない理由の一つに、DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)法の普及があることがわかっている。

もともと、タンパク質のフォールディング研究に Creighton が開発した DGGE(変性剤濃度勾配ゲル電気泳動)技術¹⁶⁾を Fisher らが DNA の 2 次元展開に導入した¹⁷⁾。それを参考にしながら、我々は DGGE を DNA の構造解析技術として発展させた。坪田(現、加藤)美佐さんが SSCP 現象を発見したのも DGGE 法であった。前述のようにゲル中に変性剤(尿素やホルムアミド)の濃度勾配を作成するには細やかさと粘りが必要で、増田君や坪田さんは毎回、実験直前に時間をかけて作成していた。1984 年の我々の JB 論文に明記したように、DGGE と TGGE は相互変換可能であることがわかっていた(DNA を変性するという現象では共通であるが原理的には異なる)ので、TGGE 法では温度勾配発生装置は必要なもの、それさえあれば、その後はデリケートで日持ちせず面倒な変性剤濃度勾配ゲル作製作業から解放されるといったメリットを有しているもので、当然のように乗り換えることにした。そもそも、温度を変数として DNA の変性過程を予測する Poland らの理論はあっても、変性剤の方は難しかった(1985 年当時、東大の橋秀樹氏が挑戦し一定の成果を得ているが、温度ほど明快とはいえなかった)。定量的 TGGE 法は 1986 年の卒業研究生で修士まで進んだ三浦季久君が確立した。自作の TGGE 装置の開発を始めた直後に大塚宏明君(伏見研所属)が親戚の金属加工技術専門家に依頼し作製してくれた。銅製の矩形平板両脇下部

に高温と低温の温度媒体を循環させるユニットを配して2台の高・低温の恒温槽につなぐ方式で、シンプルにして高性能なもの2機であった。残念ながら世界初ではない(既に1981年に英国の Thatcher らがアルミブロックを用いて実作していた)が、日本では間違いなく初めてのものであり、1990年になってタイテック社と共同で普及版の TGGE 装置1号機が開発された(ゲルサイズが18 cm 角で、泳動には1時間余り要した)。初めての産学連携体験であった。その少し前に、ドイツの Riesner らが地元企業と共同開発して TGGE 装置が製品化していたが、普及せず撤退していた。その大きな理由の一つが、BioRad 社がハーバード大学の Fisher らの支援で80年代後半に製造した DGGE 装置の存在とそれを利用した技術(もっぱら微生物生態学領域での応用; RAPD-DGGE など)の普及があった。DGGE と TGGE の両方に関わった我々としては、同じ効果を得るのに TGGE の方が便利であると確信しているが、どこの世界でも“最初に普及したものが勝ち”の道理があることがよくわかった。因みに、PubMed で両者の論文出現回数を調べると2013年10月現在で、DGGE は6397で TGGE は285であった。もろもろの事情から、2020年にはこれらの相対比は縮まっていると確信しているが、研究のダイナミクスは一筋縄ではいかず予測しがたい。

さて、そのような訳で小型化した第2種 TGGE 装置 (μ TG と名称)が世に出ると、少なくとも研究室での GP 実験の能率は飛躍的に向上した(スピード法がスピードを持って実験できるようになった)。因みに、2011年には基本性能を落とさずに価格を2分の1以下に抑えた普及型 μ TG(第3種 TGGE)が埼玉県入間のライフテック社によって開発された。

2000年以降の GP 法はスピード(sppidos)という再現性の高い客観的パラメータを用いることになり、定量性と処理能力を格段に向上し、その後の技術開発を可能とした。

4-3-1 普遍的種同定法

GP 法を種同定に用いる試みは、GP 法の基本論文 (Chem. Lett. 1991)¹⁸⁾ の時からあった。1996年の日化誌では濱野圭一君が行った「様々な生物に関する GP 解析」を発表したが、そこには同一のプロンプ(ランダム PCR に用いるプライマー)で植物や動物のすべてについて種固有のパターンが示されていた。その後、Naimuddin 君が大学の近くにある埼玉県衛生研究所の研究者(倉園貴至氏ら)との共同研究で腸内細菌や枯草菌等の細菌を調べ、やはり種固有のパターンが得られることを示した (Gene, 2000)¹⁴⁾。その後、スピード法が樹立されてから、卒業研究から博士課程まで進んだ幸塚さんが、形の科学会メンバー(新潟大学の松岡篤教授や北海道工業大学の小川直久教授ら)のご協力を得ながら、放散虫を用いて1細胞での GP 解析可

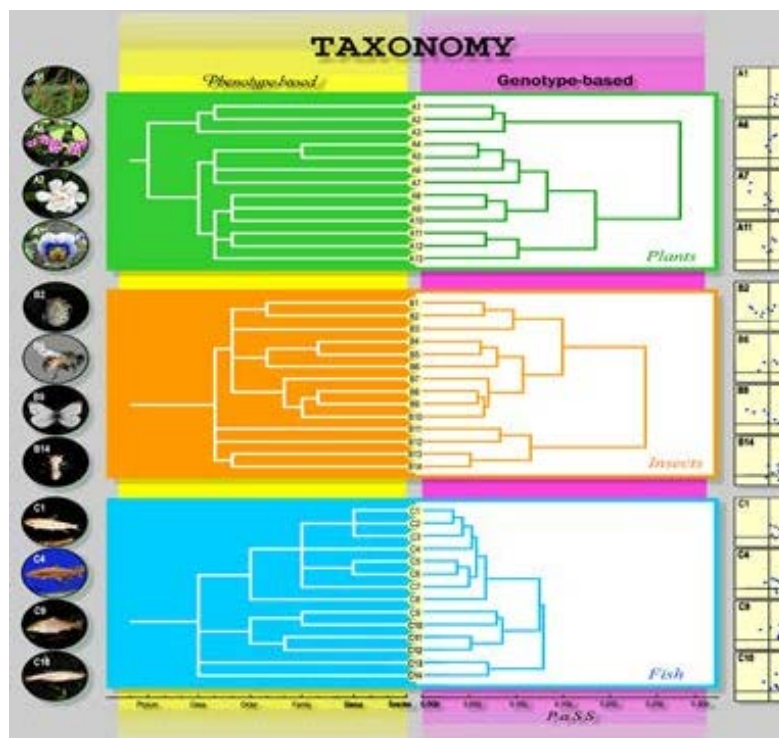


図4. GP 法により行った生物系統分類の例。

植物、昆虫、魚類に関して、古典的表現型分類(左)と GP 法による分類(右)とが、(位相的に)完全に一致していることがわかる。

能性の確立 (*BMC Genomics*, 2006)¹⁹⁾を行うとともに、昆虫、植物、魚類などの広範な生物に関して GP 法で種を同定・分類できることを示した (図-4)。一方、2003 年当時、埼玉県久喜工業高校の教員で国内研修として在籍した田村直治氏 (1986 年度の西垣研卒研究生) が精力的にキノコ類を収集しその分類可能性を示した (*埼玉大紀要*, 2004)²⁰⁾ また、さらに詳細な分類同定として、同一種内の品種の違いに関してイネを用いて 2003 年卒業研究の塩田千絵さんが当時まだ残っていた近隣の耕作農家や全国各地の農業試験所に稲穂を提供して頂いてサンプルを集め、初めて植物の同一種 (*O. sativa*) 内での品種間差異をゲノムレベルで実証した。後には埼玉バイオプロジェクトの中で、濱野圭一氏 (タイテック社社員) と辻幸香 (現, 上野姓) さんが菌類のトリコスポロンやカンジダさらには細菌の乳酸菌を用いて、それらの株の違いを正しく分類できることを示すと同時に、菌株データベースの日常的検定に有効であることを示した (*J. Microb. Methods*, 2012)²¹⁾ (辻さんは埼玉バイオプロジェクトの中で GP 法に携わり、1 日で技術を完璧にマスターしたとの逸話を残した。) 分類同定の極みは、2011 年に *PLoS ONE* に掲載された昆虫の分類同定である (図-5)²²⁾。これはバングラディッシュからの国費留学生 Shamim Ahmed 君や修士まで進んだ小森学君、博士課程で在籍していた辻 (上野) 幸香さん (学位は後述の進化工学関連) らの共同実験の成果である。共同研究者 (獨協医大の宮本潔先生や小作明則先生) から送られてくる多数のホルマリン漬け昆虫試料から DNA を一つ一つ抽出する作業に、ややうんざりしながら人懐っこい笑顔で頑張っていた小森君のことや *PLoS ONE* のレフェリーから執拗な補足データ (そのためにわざわざ“Congruence value (合同値)”という理論的補足を行った) を要求されて頭から湯気を出しながら格闘していた Shamim 君の姿が思い浮かぶ。この論文では古典的形態分類とゲノムに依存したスピード法 (GP 法) による分類が一致することを示し、生物分類学へ一石を投じた。同時に、ゲノム依存法の 18SrDNA 法で同じことを行うことが容易ではないことも実証した。これら様々な生物種に関する多くの関係者の活動で、2002 年に提唱した“On-web GP” (Watanabe T., Saito A., Takeuchi Y., Naimuddin M. and Nishigaki K., *Genome Biology*, 2002)²³⁾ (すなわち、生物の分類同定の基礎データとしてウェブデータベースにスピードを登録し活用する方式) が現実的になってきた。この間に 10 年の歳月が経過しているが、まさにそれは埼玉バイオの 10 年に呼応している (進化工学の方に大きくエネルギーを注ぐことになった)。

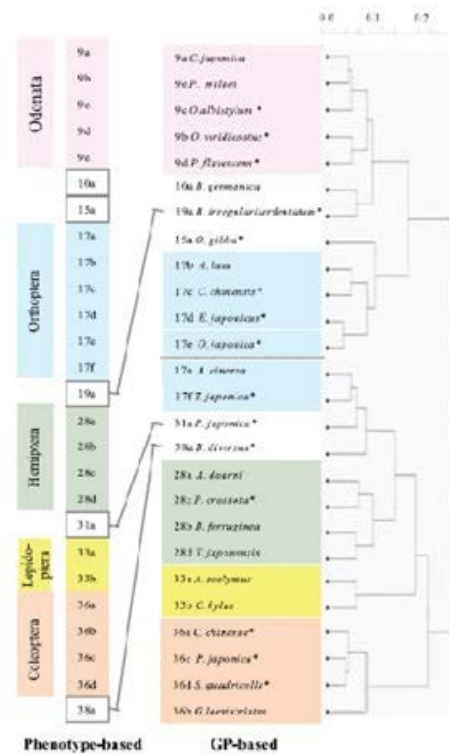


図5. 古典科学と最新科学との一致。

昆虫の表現型分類 (左) とゲノム型分類 (右) は基本的に一致することが初めて示された (文献 23)。18SrDNA 配列解析法も行ったが、単純な結果とはならなかった。古典 (表現型) と最新 (遺伝子型) で分類が一致している理由は、まだ完全にはわかっていない。カラーボックスは上から順に (紫) トンボ目、(水色) バッタ目、(灰色) カメムシ目、(黄色) チョウ目、(橙) コウチュウ目をさす。白は、1 目 1 種のもの。

4-3-2 変異原解析とゲノム距離

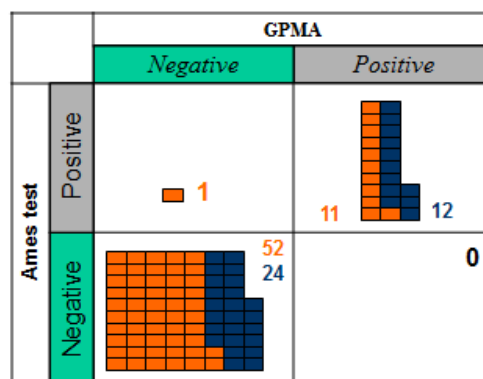
GP 法 (スピード法) は、ゲノムの距離を測定する技術である。そのことを応用すると、変異原物質 (ゲノムの距離を変える) を同定したり、その強度を測定したりできる。2001 年に工学院大学を卒業して修士から研究室に入ってきた二上雅恵さんは、このテーマに取り組み、やがて要領をえて極めて正確なデータを

取得するようになった。大腸菌を指標生物にして、変異原物質が存在する場合としない場合とで一定の世代培養した後にゲノム DNA を比べたら、変異原性の強度に相関して DNA の変異が観察されることを示した。まず、紫外線照射量を変える実験から、その照射量に比例してゲノム DNA に変異が蓄積することを示した (*Chem. Lett.*, 2007)²⁴⁾。ついで、60 数種の化学物質に関して変異原性の有無を調べたところ、基本的に Ames テスト (変異原測定 of 標準技術) と同じ結果を与えることが示された (*J. Biochem.*, 2007)²⁵⁾。Ames テストが特定遺伝子 (アミノ酸ヒスチジンの代謝酵素) の復帰突然変異という現象 (表現型) を元に変異原性を推定するのに対して、我々の技術 (GP-based Mutation Assay (GPMA) と名称) は DNA の突然変異を直接測定する技術になっており、感度としても 10 ppb の試料 (Ames テストは 1ppm であるから GPMA は 100 倍の高感度) を測定できるという特徴を持っている。1960 年代から研究されてきた Ames テストは種々な改良が施され、突然変異にしても、点置換なのかフレームシフトなのか、それとも組換え変異なのかという変異の種類を特定したり、摂取物質の肝臓における代謝変化を考慮するマイクロソーム処理法などの付加価値が付いた技術となっているが、本質の部分は変わっておらず、サルモネラ菌の *his* 遺伝子の復帰突然変異を調べるものである。一方、我々が開発した GPMA 法は培養の前後の変化だけを調べる「差分検出法」であり、用いる指標細胞は原理的に何であっても構わない。大腸菌でも枯草菌でも、はたまた動物細胞であっても構わない。このことを、国費留学のご主人と一緒にネパールから留学され、2006 年に修士に入学した Sunita Ghimire Gautam さんは動物細胞 (NIH3T3 など) を用いて実証し、しかもわずか 3 世代の培養で差分検出可能であることを示した (特許申請中)。同時に、二上さんの実験の続きとして検査対象分子を全体で 100 分子にまで拡大し、すべて (100%) に対して GPMA 法と Ames テスト法とは同一の変異原性判定を下すことを示した (投稿準備中)。表現型でのテスト (Ames テスト) と遺伝子型でのテスト (GPMA) という性質の異なるものが完全に一致したという意味で、驚くべき結果といえる (図 6)。この二人の女性は、コツコツと緻密な実験を行う素質に恵まれていた。

この時に、この研究に関する当初からの我々自身の疑問は、GPMA 法は微生物 (細胞) 集団に蓄積する変異を調べているのであって、確率的であり同時に統計的であるが、なぜ再現的であるのかや、DNA 上の様々な部位に生起するはずの変異がなぜ 1 本のバンドパターンとして spiddos シフトを与えるのか? (理論的には異なる部分に起きた突然変異は DNA の融解曲線における転移温度が異なるはずで、その結果様々な温度での転移に由来するカスケード的現象が見られてよい) という問題であった。2003 年に修士まで進んだ三浦崇君が GPMA 実験の傍ら、計算科学的にこの問題に挑戦し、合理的範囲内にある (そのような現象が一定の仮定の下に説明可能) という実践解を与えてくれた。GPMA は実験的には明快であるが、その数理は中々厄介な部分を有するために、実証的に積み上げる証明が近道であり説得的である研究領域と考えている。

ともあれ、このように GPMA 法は高い感度 (10 ppb = 10^{-8} 部分) を有することが示されたので、次に「飲用水における変異原性テスト」に取り組むことにした。2010 年に修士に上がった上関明子さんが最初に担

Comparison of GPMA (GP-based mutation assay) and Ames test examined about 100 chemicals



Futakami M, Salimullah M, Miura M, Tokita S, and Nishigaki K. *J. Biochem.* 141, 675-686 (2007)

図6. 2つの変異原テストの (Ames テストと GPMA 法) の結果は完全に一致した。100 種の化学物質について、最初から 99 種が一致していた。残る不一致の 1 種 (左上の区画) も回数を重ねた実験から、一致することが示されている。表現型による方法 (Ames テスト) と遺伝子型 (GPMA) とが全く同じ結果を与えたことになる。

当したテーマで、当初、「水道水の変異原性はあるとしても低いに違いないから濃縮して調べる必要がある」と考えて、濃縮実験から取り組んだ。実験の性格上、加熱は適切でなくて、強力な凍結乾燥装置でもあれば話は別であるが研究室に存在する装置では 10 倍濃縮でさえ相当に手間がかかるという事実直面した。そこで上関さんは賢明にも、「ダメ元」で、濃縮せずに直接水道水の変異原性テストを行なう選択をした。その結果が図 7 に示すような、あっと驚く結果であり、我々の飲んでいる水には変異原性があることが濃縮せずに分かった。それが塩素消毒のためであると推定されるまでには時間がかからなかった。科学分析支援センターの三田和義技師が

GC-MS で高感度な結果を導出し、数 ppb レベルのトリハロメタン類が存在することがわかった。トリハロメタンの混在事実自体はその道の専門家(水道関係)にはよく知られた事実であったが、それがその低濃度で作用して有意に細胞に突然変異を引き起こすということは、間違いなく初めての観察であった。それというのも、そのような低レベル(数 ppb)の変異原の変異作用を調べる方法がこれまでなかったからである(原理的に可能な技術としては Comet assay (DNA の変異に伴う鎖切断をゲル電気泳動で検出する方法)が知られているがこの種の報告は見られない。一般に、低濃度被曝の効果を検出可能にするには長期間の被曝が必要で、研究しづらい性質があった)。

上関さんが 2011 年春に修士を修了した後、その秋にはインドの Biyani's Girls College から 3 人の博士留学生が研究室に入ってきた。その中の 1 人、Parmila Kumari さんは上関さんの実験を引き継いだ。承知の通り、2011 年春(3 月 11 日)には東日本大震災・福島原発事故があった。偶々、震災後の水道水を扱うことになった Parmila さんの実験は、震災前の上関さんの実験を基本的に再現した。概して、震災の前後で水道水に関しては、変異原性は殆ど変らなかつたということである(但し、詳細な解析の余地は残されていて、GPMA 法がそのような微妙な変化を議論できるものかどうかは現在、検討中である)。これらの実験で都市河川水が変異原性を有し、一方、ミネラルウォーター一般には変異原性がないという興味深い結果が得られた。

ここに述べた人たちの努力で、比較的コストや手間のかからない日本生まれの変異原解析技術 GPMA 法が誕生した。アメリカ生まれの Ames テスト法とは相補的に独自の展開が期待される。

GPMA 法において発揮された、スピード法(GP 法)の本質「ゲノム距離測定」の原理は、他の用途にも応用可能であった。それらは学内外の研究者によって既にいくつか実現し論文になっている(法医学応用、生態学応用、微生物昆虫学応用など)。研究室でも、個体内の細胞間のゲノム距離を測定するというこれまでになかった試みに挑戦し、興味深い結論を得た。それは、2012 年に修士を修了した駒崎峻君と彼の実験を引き継ぎ発展させた Deepti Diwan さん達の実験であった。この研究の結論も極めて意外性の高いものであった。20 世紀末から今世紀にかけてゲノム研究が進み、ヒトとチンパンジーではゲノムに 4%

水に含まれる極低濃度変異原

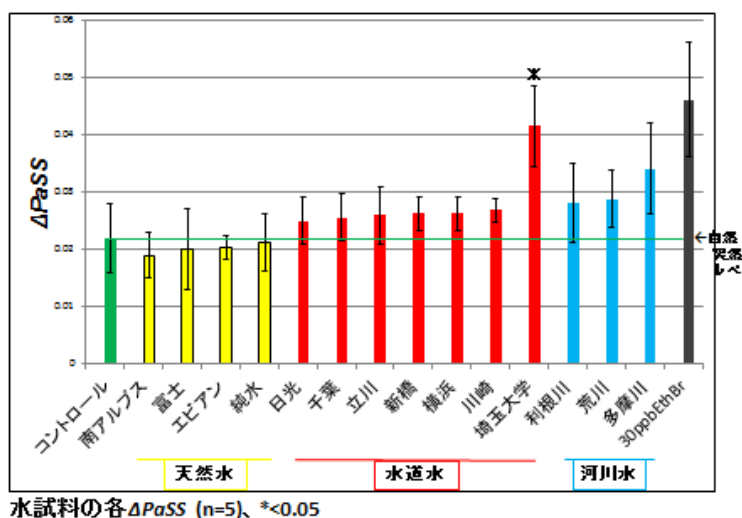
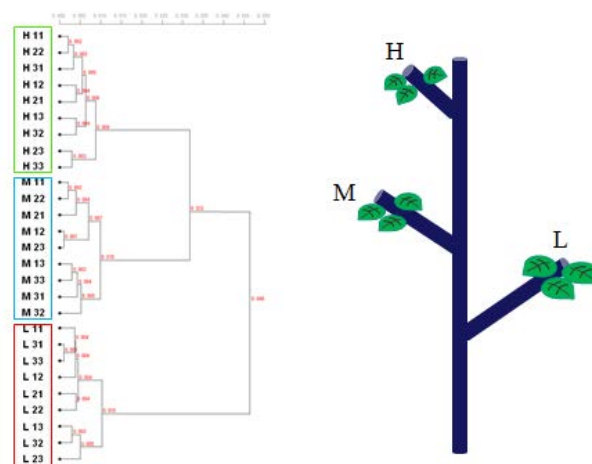


図7. 飲料水や河川水の変異原性テスト(GPMA 法).

自然突然変異レベル(ΔPaSS が約 0.022)を超えているものが変異原性がある。エラーバーが高い初期のデータを示しているが、精度を上げたのちの実験から、基本的にこのデータが正しいことが確かめられている。

の違いがあることや、同じヒトであっても個人差があるようにゲノムに差があることが実証されてきた。しかし、同一個体内(つまり自分自身の体の細胞間)では、がん細胞を除けば、すべての細胞は同じゲノムを持つというのが、通念であった。しかし、これが、同じ個体内であっても系統的にゲノムは異なっているということを示すような駒崎君の実験結果となり、目から鱗が外れる思いがした。



(Height) – (Leaf No.) –

図8. 同一個体(桜の木)の枝違いで葉のゲノムが違うことが初めて示された。ここでもゲノム距離測定法(GP法)が使われている。

Deeptiさんはこの結果に対して、驚くべき馬力でさらに数倍の実験を重ねて再現性を確認し不動のものにして、学術論文とした(現在投稿中)²⁶⁾。この間、研究経過を二人とも「形の科学会」で発表し、生物・数理・物理系の研究者に高い関心と評価をいただいた。考えてみれば、形の科学会の諸氏には、幸塚さんを始め何人もの学生がお世話になってきた(衷心より感謝申し上げる)。Deeptiさんは、現在の日本人に見つけることが難しくなった“24時間闘えるハードワーカー”である(2度にわたり来日されたお父上にお聞きしたところ「生まれつき」とのことであった)。私は研究室の学生の生活態度は基本的に本人の自由にまかせ、「自己管理」の方針を貫いてきたつもりである(よほどのことがない限り、子供扱いはせず“一人前の大人扱い”を前提とし接してきた。しかし、Deeptiさんに対しては、逆に「少し休みを取った方がいいよ」とつい言うってしまうほどのハードワークぶりである。今、Deeptiさんは、「GP法に残された最後の課題」すなわち、GP法で測定されるゲノム距離の“意味”を明らかにする実験に取り組んでいる。

GP法のゲノム距離測定能を生かした別の応用では、近縁なマウスの家系解析研究がある。現在修士2年生の大谷文人君がテーマとしていて、埼玉がん研究センターの松島芳文先生との共同研究で、既に3系統16個体のマウスがGP法で系統ごとに分けられている。哺乳動物についてのGP法でのこの種の研究(種内個体間距離測定)は初めてであるが、種内個体間距離のレベルでは、濱野君らの菌類トリコスポロンや塩田千絵さんのイネでの実験と共通している。しかし違っているのは、マウスには(イネにも)家系があり親子関係が明確にわかっていることで、現在、大谷君は親子なのか兄弟なのかの判別ができるかどうか挑戦している。これは法医学の世界では重要な知見となるためである(GP法は既に京都府立医大法医学教室と科学警察研究所の共同研究でも使われ、論文(*Leg. Med.* 2012)²⁷⁾にもなっている)。

このようにGP法(スピード法)はまだ発展中である。その中で次世代にバトンを渡すことができるのは幸である。

4-3-3 ゲノム計算科学

既に述べたように1990年代に入って、ランダムPCRを予測するプログラムを開発した。実はそれ以前のII型制限酵素の切断様式を解明する研究(*NAR*, 1985)³⁾のときから、完全相補ではないミスマッチを含むリラックスしたハイブリッド構造に、大袈裟に言えば「生命現象の本質の一端」を見ていた。その*NAR*論文をまとめる際には、パソコンPC98(学位取得の祝いに義父母にプレゼントしていただいた思い出の機

器)を用い、BASIC でプログラムを組上げて核酸 2 次構造準安定構造の寄与を発見した。

スティッキネス(粘着性)解析 そのために、1994 年スティッキネス解析(Nishigaki & Sakuma, *J. Chem. Software*)²⁸⁾を始めたのはいわば必然のことであった。それは、溶液中で 1 本鎖核酸が動的にどのような構造を形成しているかを予測することであり、そこには安定構造だけではなく、準安定、不安定構造が混じっている。上述の制限酵素の研究は、まさにその準安定構造の安定度合に比例して一時的に形成される制限酵素認識正準構造(*HaeIII* ならば、GGCC 部分が正しく完全相補になっている構造でその前後で形成される塩基対合の安定性はその構造を支える役割を果たす)が制限酵素のターゲットになっていると解釈するものであり、2 型制限酵素が 2 本鎖以外に 1 本鎖 DNA を切断するという謎に解を与えたことになった(最初この問題を提示したロックフェラー大学の Kensuke Horiuchi 氏から「あなたの説で納得しました」の便りをいただいた)。

さて、オリゴヌクレオチドがゲノム DNA のどこにどの程度安定に結合するかという“オリゴスティッキネス解析”は、現在の生物のゲノムが進化の段階で高頻度に組換えをしてきたという痕跡をあぶりだすことに成功し、同じ細胞の中のすべての染色体がオリゴスティッキネス解析で同一のパターンになるという意外な発見をした(Nishigaki & Saito *Bioinformatics* 2002)⁷⁾。このことをさらに発展させて、2009 年には Shamim Ahmed 君はウイルスとその宿主とは、緊密であればあるほど(AIDS ウイルスのように溶原化する(ホストのゲノムの一部となる)ものが最も緊密で、逆にホストの細胞を壊して飛び出す大腸菌の T 系ウイルスのようなものは緊密性が低い)、Soss と名称したオリゴスティッキネス由来のパラメータが大きくなる(すなわちオリゴスティッキネス的に類似する)という発見をした(*Bioinformatics*, 2009)²⁹⁾。これは、ゲノム塩基配列に対して、このオリゴスティッキネス・セット(Soss)解析をすることによって、あるウイルスがどの宿主に寄生するかを予測可能にしたことになり、これまで“現場主義”(即ち、ウイルスの宿主は、ウイルスが宿主の細胞と一体化している“現場”を電子顕微鏡等で抑えること)で宿主-ウイルス関係が発見されてきた(モンタニエによる AIDS ウイルスの発見も電子顕微鏡像が決め手)が、Soss 解析はひょっとしたら、大量ゲノム塩基配列時代に新しいアプローチを与えることになるかもしれない。ゲノム配列さえわかれば、宿主を推定することができる今、バンガラディッシュの Sharjalal 科学技術大学の教員となった Shamim 君のこれからの挑戦である。

苦い思い出 ゲノムを単位とした戦略論文で忘れられない苦い思い出がある。それは、最終的には *DNA Research* 誌(2000 年)³⁰⁾に採択されたものであるが、当初、投稿後、2 年近く、*Genome Research* 誌の編集者の手中に止めおかれた論文であった。いまだに真相は不明であるが、事実としては、投稿後、最初の査読回答までに半年かかった上で(遅いとはいえそれはありえないことではなかった)、エディターから“大幅に修正するなら採択可能”であるとの連絡(このこと自体は投稿者の我々には不満が多いものの、ありうること)があったという事実、そして首を傾げる出来事がこの後にあった。大幅修正を真剣に受け止めた我々は、そのために、別途新たなサポート論文を作成することで真摯に対応した。元の論文の内容は、要するに「現在(1997 年)、ヒトゲノムプロジェクトが進行中であるが、戦略として現在取られている“Divide-and-Conquer(分割統治)方式”よりも、いわゆる“ショットガン方式”(予め、全体を細かく分けて整理した上で、小さくなったそれぞれをさらに細かく解析する方式ではなく、全体を一気に丸ごと解析する方式)が有効であり、事実、そのための方式が存在する。その具体例として、“ランダム PCR とプライマーレー法に依る戦略”を提唱し、実験的にその有効性を示した」という至極通常の科学論文であった。1996 年に修士になった赤坂浩一郎君が着々と実験を進めてできあがったものであった。レフェリーのコメントの中に、「ランダム過程では、どれだけさいころを振ったら全体がカバーできるかわからない。これに対する実証が必要だ」というかなり重いクレーム(つまり、実験を追加せよ)ということがあった。通常ならば、それを拒否して、そのまま別の雑誌に変更して投稿し直すところであったが、当時採択されていた科研費の報告書の中心に据える論文であり、*Genome Research* 受理という重みは捨てがたかったことや計算

科学に堪能な学生(齋藤あゆむ君)が偶々そばにいてくれたのでここは腹を決めて、レフェリーの要望に沿った改良をすることにした。“Yuki-comcom”というシミュレーションプログラム(*J. Chem. Software*, 1999)³¹⁾は数か月で出来上がり、ゲノム解読戦略に要するコスト計算もつけて半年後には修正版を再投稿することができた。しかし、査読回答がまたしても半年近く引き伸ばされた。しびれを切らして督促したらやっと戻ってきた結果にはビックリ仰天した。「前より悪くなっている。」、「これは **Betrayal**(裏切り)論文だ」。

その異常さに、それ以上関わることは避けて、日本の *DNA Research* 誌に事情を述べながら投稿したら、編集委員の榊佳之氏(現、豊橋技術科学大学学長)から即座に審査に付し「採択」との報告を受けた。嵐の中から平穏な世界に戻ってきた気がした。

後日知るところとなったのは、我々の論文が *Genome Research* の編集者の手に留め置かれていた時(1998年)は、丁度、アメリカの国会(科学諮問会議)で、ヒトゲノムプロジェクトの国際共同チームが、その大型予算に基づく研究の進め方に無駄などの問題はなかったかと、問われていた最中であり、それはゲノム研究の風雲児 Craig Ventor が TIGR(ヒトゲノム配列解析機関)を立ち上げてショットガン方式を採用して恐ろしい勢いでヒトゲノム配列を決定していた時期であった。事実上、*Genome Research* 誌は Ventor と真正面から敵対する国際共同プロジェクト推進者らの機関誌であった。この一件で、「アメリカの科学」の一面を見た気がした。それは私の周りのおっとりとした(それまでの)日本の科学とはおよそ異なるものであった。

研究テーマ誕生の契機 これまでに我々の取り組んだ研究テーマがどのようにして生まれてきたのかは、それに関わった人たちにとっても振り返ってみる価値がありそうだ。1985年頃に、溶液中一本鎖核酸高次構造問題に取り組み始めて、改めてゲル電気泳動法が有力な構造解析技術であると認識した。この頃、制限酵素(バイオプローブ)が構造解析の重要なツールであると *NAR* 論文³⁾を書きながら実感していた。溶液中の不安定構造を制限酵素 *HaeIII* は検出しており、それは *NMR* をはじめ、他のどのような高度な物理的装置をもってしても検出できない微弱な構造シグナルであった。それを検出しているバイオプローブ(この頃から、「分子機械」という言葉が使われ始めていた)は素直に「凄い！」と感嘆した。他方、ゲル電気泳動はそれとは別の魅力があった。ゲル自身の物性の面白さもあるが、それを泳動媒体に使用した時に分離分析技術としての、いわゆる「理論段数の高さ」が魅力であった。この本質は直ぐに明らかになった。超遠心機分析、カラムクロマトグラフィ、フリーフロー電気泳動(ゲルのような媒体を使わないもの)などと異なり、ゲル電気泳動では高分子の拡散が実質ゼロに近く、このために結果的に極めて高い理論段数を与えている。理由は簡単で、ゲルの窮屈な網目にはいりこむ時は強い電場に引っ張られるが、一方で高分子拡散の方は網目に取り囲まれて身動きできないために極めて微小である。1978年、埼玉大学理学部物理学科の学生であった田幸玲子さんは卒業研究を環境化学工学科で伏見先生の指導の下に履修し「アガロース中での繊維状ファージ fd の拡散実験」を行っていた。もの見事にファージの拡散は微小であり、ごく僅かに広がるのみであった。その現象の最も感度の高い測定法が PFU 測定という泥臭い一種のバイオアッセイ法で、これを用いて田幸さんはファージの拡散係数を測定していた。材料・方法は生物であるが、研究は、まさに物理そのものであった。当時、助手の私は、ファージのゲル電気泳動を行い、ゲル中における牽引力(クーロン力)の強さと試料がぼやけるもとなる拡散力の事実上の喪失という著しい落差に目を見張った。高分解能の理由はここにあった。ゲル電気泳動法に対する学生時代からのやや軽侮の気持(なにしろ、自分の卒業研究で扱えたぐらい)から、「これは探求するに価する極めて優れた特性だ」という確信に変わった。以来、今日までの付き合いになり、GP法(スピード法)はその中で生まれた。もう一つ、たった1個体でも簡便に検出可能であるという PFU などのバイオアッセイには、強い関心をもっていった。1978年の卒業研究生(記念すべき環境化学工学科1期生)10人の内、助手の私が直接指導した2人(山田倫史君と本保健男君)のうち、山田君には、バイオアッセイ法によるグルコース濃度の測定に挑戦してもらった。陽気で血気盛んな山田君が、内径 2 mm ほどのキャピラリー中に希釈大腸

菌をアガロースごと吸い込み、そこで嫌氣的に増殖した菌数を数えているときには真摯な修行僧の形相があった(もう一人の本保君は生活力に長けており、与えられた卒研がミスマッチなテーマと感じながらも、研究室のゲル電気泳動法の礎石を築いた。正確に言えば、その前の年に原崎朗君(応用化学科卒研生)が私と共に始めていたが)。2年後に渡邊達郎君が引き継いで論文をまとめる段階までに高めた。この方式で、特異的にサブ ppb 濃度のグルコースまで測定可能であり、MS の感度に比肩することを示す (*Biotech. Applied Biochem.*, 1988)³²⁾と同時に、バイオアッセイ法の威力を実感した。この後、今日まで、いくつかのバイオアッセイ法(「溶液中核酸構造解析法」,「GPMA 法」,「pepELISA」³³⁾など)を開発してきた。バイオアッセイ法は“分子レベル”, “特異性”, “増幅性”等の特性を有し、一般に低コストであり、通常の電子機器装置では実現しない領域を補完している。低コストなのは生物進化のレガシー(遺産)のお蔭であると認識される(パソコンでも、カメラでも、進化するほど高機能で低価格になるのと同じ理由である)。今日、*Synthetic Biology*(合成生物学)が興隆しつつあるが、生物の高度さに迫り、さらに超えようとする試みである。ここでも生物が教材といえる。

分子動力学 計算科学に、元々、興味はあった。研究資金に乏しい中で、「バイオアッセイ法」,「(温度勾配)ゲル電気泳動法」などと自前の技術を開拓して行く中で、もう一つ、これらを相補する構造解析技術が必要だと思っていた。それは当時、技術的高度化が進み、既に遠く先を行っていた NMR や X 線結晶解析技術ではありえなかった。我々の研究室単位では、装置を手に入れるのも、技術的キャッチアップをするのも、技術を継続維持するのも、何れも容易ではない。その中で、偶々、大学院(機能材料工学専攻)の特別講義を引き受けてくださっていた東大の横山茂之先生(NMR の専門家で、当時、「タンパク 3000 プロジェクト」の下準備中:私の卒業学科の優秀な後輩でもある)が「最近 MD を使い始めたら、とても面白いことがわかった。」と話され、それもあって、MD に取り組む決心をした。MD の基本的な勉強から始め、実際に AMBER を手に入れて、パソコンで動かし始めた。最初にそれを担当してくれた修士の浦田賢君は、苦労が多かったはずである。教える側の私も同じように分かっていないから、手探りで進めるしかない。しかし、浦田君はゼロから始めて、なんとか MD の目を出した。自律精神のある秀才であった。それを引き継いだ青山崇君も根性があった。ペプチドオリゴマーの順逆配列のコンフォメーション計算をして、同じアミノ酸からできていても配列が異なれば形状が異なるという極めて自然な結果を導いた。さらに、根性といえば、雪国生まれの村山真一君は先輩たちに負けず劣らず粘りがあった。2 人の先輩が草掻き分けて拓いた小径をひたすらコツコツと歩み続け、計算を重ね、「ナノ秒(10 億分の 1 秒)の計算で、タンパク質断片が最終的にどのような構造(α ヘルックスか β シートかそれ以外か)になるかを高い確率で予測できる」ことを示した。いわゆる「梅檀(せんだん)は双葉より芳しい」の発見である。地道な成果だがそれを国際会議(韓国)で村山君が発表し、後に論文(村山 真一, 吉田 昼也, 青山 崇, 浦田 賢, 西垣 功一 *J. Comput. Chem. Jpn.*, 2006)³⁴⁾にした。この少し前には、インドからの国費留学生の Manish Biyani 君が溶液中核酸構造のシミュレーションに MD を使いこなすようになっていた(*J. Biochem.*, 2005)³⁵⁾。一方で、2000 年頃の大学院生、齋藤あゆむ君、長谷川孝君、渡邊雄大君らは、GP 法の計算科学関係で web データベース環境を構築していった(いわゆる“On web-GP”; *Genome Biology* 2002)²³⁾。独創を目指した小さな研究室での「ニーズからの挑戦」が研究室の大学院生を中心に着実に実を結んで行った。計算科学の流れはこの後も卒研生の佐藤大輔君や修士まで進んだ鶴岡誉之君や国費留学生 Shamim Ahmed 君らが受け継ぐ傍ら、彼らの多くが研究室のサーバー管理を担ってくれた。多くの組織がコンピュータ時代を迎えて“ヒトなし、カネなし、課題あり”で苦戦していた時代である。なんとなっていたのはさすが大学の工学部であり、紛れもなく、彼ら研究室学生の貢献のおかげである。中でもコンピュータオタクの齋藤あゆむ君の寄与は突出していた。これに加えてこの時に、技術室でサポートしてくれていた齋藤由明技術員や小山哲夫技術員らの日常的貢献には頭が下がる。特に齋藤さんには前身の環境化学工学科田中研究室の時代から今日まで、学務・学科運営関係の多くのプログラムの作成を手伝っていただ

いた(例えば、現在の機能材料工学科の会計プログラムの原型を作る時にも寄与された)。情報科学が専門ではなかったが持前の勘の良さで見事にこなしてくれていた。

この関連で長年の主張であるが、「計算科学とりわけバイオインフォマティクスに人材を」という考えは、激動の情報化社会の中でなかなか叶わないが、日本の将来を見据えた国策として1つの重要なオプションになると考えている。

5. 基礎から応用へ

1990 年ごろまで、研究室では、ウイルス連続培養装置「セルスタット」を運転して、大腸菌ファージ (f1,fd, M13, δ A など)の競合実験などを行っていた。一方では、それに伴う変異体解析技術の高度化を進めていた。丁度このころ、PCR 装置が世に出てきた。研究室の若い有能な助手であった木原拓博士の不幸な出来事(1989 年、病気による早世)があった。その後、それまでの研究室内の研究だけでなく、産学官が連携した研究(応用研究)に移っていった。私自身、この頃、初めて企業や特許と出会った。理学部で育ち、工学部に就職後も「(環境化学)基礎講座」という理学部的な雰囲気(世の中の役に立つかどうかわからないファージの突然変異や核酸の溶液中構造を解析して憚らない)で暮らしていた。しかし結局は、開発した技術の成熟(セルスタット, GP 法など)が社会還元へと自然につながっていった。やはり基礎は重要である。

5-1 進化工学技術開発の夜明け

1990 年に *in vitro* evolution (試験管内進化)や directed evolution (定向進化)と標榜した進化分子工学が世界で一斉に開花した。同じころ、ファージディスプレイ法が実用化してきた。私自身、1991 年春から 1 年間イギリスのケンブリッジにある医学研究協議会(MRC)・分子生物学研究所(LMB)・分子遺伝学部門(MGU)の Sydney Brenner 博士の研究室に在外研究の機会を得た。それは、様々な出会いと諸々の思索の時間をもつことのできた私にとって珠玉の 1 年間であった。その頃、ケンブリッジでは、Greg Winter 博士が誕生したてのファージディスプレイ法で Man-made Antibody (人工抗体)を開発し話題になっていた。いわゆる scFv (一本鎖ファージ抗体)で、進化工学の走りである。LMB 研究所はあの Watson と Crick が二重らせんを発見した場所として世界的に有名な分子生物学のメッカであり、1991 年当時の所長は、タバコモザイクウイルスの構造解明でノーベル賞をとった Aaron Krug 博士であった。ケンブリッジに到着した間もなく、LMB 本館の上層階にある食堂で Ichiro Maruyama 博士の紹介で Krug 博士と握手をして簡単な挨拶をしたときは、「この人があの Krug か」と別の世界に入り込んだように感じた(20 年近く前、磯研究室の大学院生であった時に隣の席の高松久雄先輩が、電顕を使った Q β ウイルスの高次構造研究で *Nature* 論文を仕留めたが、その時のエディターが Krug 博士自身だった)。しかし数週間もしないうちに慣れて、一人ナップザックを背負って、目の前をスタスタと歩いてくる人物が Cesar Milstein (モノクローナル抗体の発見でノーベル賞受賞)だったり、人のよさそうな小柄な老人が廊下を歩いているのに気付くとその人物が、なんとあの Max Perutz (“タンパク質構造化学の父”)だったりした。さすがに LMB だ、と感心したのは、2~3 週間に 1 度ぐらいの頻度で、世界中から分子生物学の分野で最も話題の研究(分子生物学のトップジャーナル *J.Mol.Biol.* を出版しているのが LMB から数 km 離れたシティにある事務所であるから、トレンドに明るい訳である)をしている研究者を招聘して、LMB のホールでそのホットな研究を発表してもらっていた。その場に無名の若手やビッグネームが集い質疑応答をしていた。COE (Center of Excellence)とは、まさにこのことで、その中で世界と競争する研究が生まれてくるのがよくわかった。1 年間、私もその贅沢を味わうことができたが、老齡の Perutz 博士がほぼ毎回顔を出されていたのが印象的であった。その中で仕入れた進化工学関連の重要ニュースが Follicle dendritic cell (濾胞性樹状細胞)の体細胞超変異の話であった。これは免疫系がまさに“進化工学”の原則(変異型分子ライブラ

リーの作製と淘汰の繰り返し)を実践していることであり、丁度、日本で進化工学の実践に取り組み始めたばかりのときであり、一入(ひとしお)感慨深かった。やむを得ないこととはいえ、日本にいて、(この分野の専門家は別として)私のような一般の研究者がこのことに気付くには何年の遅れが生じるのか興味深い(とりわけ、今日、インターネットが普及して、全てがワンタッチで学問の玄関に容易に入ることができる時代では、どうであろうか? 1985年にアメリカで開発されたPCR法を英国ケンブリッジではいつ知ったのか(前述のように我々は1988年)、何かの機会に聞いてみたい(当然答は「遅れなし」と思われるが))。

5-2 ディスプレイ技術と組み換え技術

1992年春、帰国が迫った2月ごろに、Brenner博士が「もう少し滞在して研究の続きをやりませんか?」といってくれた(Brenner博士が提案したp53のメチル化の有無を調べる実験系を確立し、実際に自分の血液や提供者の血液からp53をとりだし調べることに成功したと彼に報告した直後であった)。大変甘美な誘いではあったが、日本では新学科(機能材料工学科)を創ることになって伏見先生や飯田先生が奮戦されておられるという便りが届く(当時はまだemailはなくて、程よく隔離されていてよかった)中で、“Yes, I will”とはいえなかった。後になって、大学の面々に非難されてもその時に、“I will”と言っていたら、別の(少なくともその直後の苦難は回避した)人生を歩んでいたかと、思うことがあった。しかし、イギリスでの天国の1年と帰国後の不運の1年を経験した後は、少し頭が冴えたかもしれない。ファージディスプレイに対して、伏見先生が提唱されだした「情報(DNA)と機能(タンパク質)」の対応付け戦略に関係して1つのアイデアを研究室定例の昼食会で提案していたが、再び、頭が冴えてきた時には、それはどうでもよくなっていた。進化工学には、「一般的組み換え技術」が重要であるという強い認識から、まず、RRR法(制限酵素によらないでDNAの特異的切断と組換えを実現する技術)を考案した。科研費一般(B)を頂いて、卒業研究の興野大君が実験を頑張った。そのあとにも田口勝也君が組換え技術を広げる実験に精魂傾けた。

ちなみに、この時同時に、進化工学を進める上で「研究試料の微量・並列化」が必須であると確信していたが、小深田光君は卒業研究テーマとしてゲルを用いた実現可能な微量・並列実験系の検討を開始した。通常、TEMEDと過硫酸アンモニウムで重合開始するところを、リボフラビンを用いて光重合開始系にしてマスキング法でパターン形成を行った。後に言う新型マイクロアレイMMV(Microarray with manageable volumes)の初期基礎部分を築いてくれた。幸運にも、埼玉大学独自に立てたこの研究テーマMMVは、私の定年間際に完成(2013年)に漕ぎつけることができ、今、MMVに関心を持つ複数の企業によって製品化が検討されている。この10数年間、国が一貫して国立大学に求め続けてきた産学連携のささやかな進展である。もともと理学志向の研究者(私)を時代が変えてきたとも言える。一方で、理学的観点(curiosity-driven:“役に立つからではなく面白いからやる”)の重要性を再認識してもいる。たとえば、溶液中核酸高次構造の研究は興味本位で始めたものだが、その知見が変異原を検出する「GPMA法」でキーコンセプトであるspiddos(種同定点)の開拓に繋がっているのだから、興味本位もまんざらではない。大学の本質は「精神の自由」にあることを認識するならば、これまで同様、興味本位の活動を許すことこそ、最も重要なポリシーであろう。

さて、組み換え技術RRR³⁶⁾(Restriction enzyme-non-dependent Restriction and Recombination of DNA)を引き継いだ木村哲二君は「バクテリオファージfdのゲノムを組み換える」という挑戦的なテーマとして取組んだ。「fdの10個の遺伝子について、それぞれ任意に順番を替えて環状につなぎ合わせて、再び活性をもつファージを得ることができるか?」という興味深いもので、木村君はステップ数の多い実験を卒研の最後の最後まで鉢巻きを締めながら、嬉々として取組んでいた。そしてついに、最終段階で活性のあるファージを見つけた時の興奮と、それが混入した野生型であったことを知った時の落胆は、今でも彼のみならず、私にも甘酸っぱい思い出である。

1995年、この技術を国際誌 *NAR* に論文投稿したとき、フランス人レフェリーから“*Ingenious but for what?*” (巧妙だが一体何の役に立つのかね?) という‘忘れることのできない拒絶理由’を頂戴した。幸、翌年、日本化学会の *Chem. Lett.* に救われ掲載されたが、時代がまだ熟していなかった。

その中で、環境化学工学科時代から教育研究の良き協力者であった木下技官 (独法化後の呼称は技術員) が 1992 年の工学部改組で新設した機能材料工学科に共に移り、制度変更 (小講座制から大講座制へ) に伴って、学科ルールとして技官の自主研鑽が認められるようになり、それまでの関係もあって私の研究室 (講座制から教授・助教授がそれぞれ独立した研究室制に変更) を選び、技官の本務の傍ら、私の研究を手伝ってくれるようになった。部分的ではあるが、“楽天に田中将大投手が入ってきた”ようなものであった。じわじわとその効果が出てきた。DNA に関係する酵素として、制限酵素 (特に *Hae III*) や DNA ポリメラーゼを用いた論文を書いていたが、この段階で T4RNA リガーゼ (T4RL) と付き合い始めた。T4RL は名前の通り、本来、一本鎖 RNA どうしを連結することで見つかった酵素であるが、少し活性は下がるが DNA も連結する。我々はこの性質を何とか実用化するために、分子間反応を分子内反応に変換することで活性を高めることにして、それを Y 連結法 (連結させたい 2 本の DNA に対して、相補的に結合する領域を設けて結合させ、残りの自由な 2 本の枝の部分同士を T4RL で連結するというもので、枝同士が隣接するために濃度効果で反応速度が高まるというもの) と称して論文にまとめた (*Mol. Diversity* 1999)³⁷⁾。木下氏はこの後にも、T4RL に見られたような酵素の持つ異常活性 (通常謳われている正準な基質や反応機構に外れるもの) に着眼して、色々な酵素 (ルシフェラーゼを始めとする ATP 要求性酵素など) について、非正準な活性が存在すること、およびそれらが工学的に利用可能であることなどを実証して学位論文をまとめた (1998 年)。ところで、この Y 連結法の技術は有用で、少なくとも研究室内で色々と役立っている。タンパク質進化工学において、1 分子淘汰を実現する有力な方式に「ウイルス型」と呼称される“情報 (mRNA) と機能 (翻訳されたタンパク質・ペプチド) を一体化する方式 (伏見先生提唱)”の開発がある。1997 年に、新生中のタンパク質の C 末端に結合して、タンパク質合成を未熟に終了させ、タンパク質合成を阻害する抗生物質ピュロマイシンをうまく応用して mRNA と新生タンパク質を結合する、いわゆる“mRNA ディスプレイ法” (mRNA と新生中のタンパク質をピュロマイシンのついたリンカーが介在し連結する方式) が日本とアメリカの 2 つのグループではほぼ同時に発表された。原理は全く同じで、ともにピュロマイシンを利用しているが、日本のグループの *FEBS Lett.* 論文 (根本直人博士、伏見譲教授、宮本悦子博士 (三菱生命科学研究所) および柳川弘志博士 (三菱生命科学研究所) らの共著³⁸⁾: *in vitro virus* 法と名称) が若干早かった。しかし、*PNAS* に投稿したアメリカのグループ (Roberts & Szostak) の名称した“mRNA ディスプレイ”³⁹⁾ が優勢に使われるようになっていく。語呂の良さ (それまでにファージ・ディスプレイ’の用語が浸透していた) と著名科学誌 *PNAS* の権威に圧された形である。誠に残念である。その後、伏見研究室の博士課程の学生であった田淵一郎君のアイデアで mRNA を逆転写して mRNA/cDNA ハイブリッドを形成して対ヌクレアーゼ耐性を高めた、いわゆる“cDNA ディスプレイ法”が開発され (*Biol. Proced. Online*, 2002)⁴⁰⁾、現在、さらに根本研究室大学院生の望月佑樹君らがリンカー部分に改良を重ねて効率の向上や用途の拡大を通じながらこの名称で論文を書き、巻き返しを図っている。

ところで、この 3 者 (mRNA とリンカーとタンパク質) 連結技術の中で後者の「タンパク質とリンカーの結合」はピュロマイシンによっているが、前者の「mRNA とリンカーの結合」に T4RL による Y 連結法が使われている。アメリカのグループはそれを別の酵素 T4DNA リガーゼ (名前は似ているが作用が異なり、この酵素は連結のためには厳密に 2 本鎖 DNA ニック構造を要請する) に頼っている分だけ、収率も低く、窮屈な方式になっている。この Y 連結法を最大に生かした技術が次に述べる YLBS 法であった。

5-3 組換え技術 YLBS 法

進化分子工学は well-defined な工学であり、その目標は明確である。とりわけ、淘汰と進化の違いについては明確に理解される。淘汰は「母集団」からある選別条件(選択圧)の下で、その条件に最も適したもの(機能を持つもの)を選抜する過程である。従って、元の母集団に存在しない要素を選びあげることはない。これに対して進化は、淘汰によって選びあげられた要素の属性を改変(突然変異)して、新たな機能を持つ可能性を有する新母集団を形成し、その中から再度、淘汰することでより優れた(進化した)分子を選びあげることである。従って、進化するためには、新母集団の中に元の母集団に含まれていた要素を超える新しい要素が突然変異によって発生する必要がある。この事実は重要であり、進化分子工学における「突然変異とは何か？」の問題に立ち入らざるを得ない。既に 20 世紀後半の DNA 研究から、突然変異のモードには大別して「点置換」と「組換え」があるということ(後者は広義であり、いわゆる逆位や欠失も含む)がわかっていた。今もこの現象に関係する生体中の修復遺伝子の研究は続いている。

さて、この 2 つのモードの内、遺伝子工学の世界では、まず点置換法の開発が進行した。それは、古典的微生物遺伝学の分野で、UV や亜硝酸やニトロソグアニジンなどを用いて、点突然変異をランダムに誘発してきた歴史から自明である。さらに、Michael Smith の部位特異的 point mutation 技術の開発は PCR 法と組み合わせて DNA 中の様々な部位に容易に点置換を導入可能にした。一方、合成 DNA については、配列の特定の部分で塩基を変える指令をすることでどのようにでも点置換体(変異の頻度は自由)を発生することができる。しかし、分子ライブラリーとしての組換え体を制御的に得る技術は、我々が RRR 法や YLBS 法に挑戦したこの段階では存在せず、連結されるブロックの長さも頻度もランダムなものか、あるいは 1 つ 1 つ手間のかかる方式で連結体を作製するしかなく、淘汰ライブラリーの要素数 (10^{12}) だけクオリティの高い組換え体分子を揃えることはできなかった(組換え体作製という意味では、1 つ 1 つ手作りする Cre-LoxP 系は重要な技術である)。要するに、組換え変異体集団作製という進化分子工学にとっての基本技術もその理論も未整備であった。

YLBS ライブラリーの作製 図-9 に示すようなスキームを考えて、その検討を 1999 年卒業研究の北村幸一郎君や 2001 年の 檜崎真介君のテーマとした。技術が整った(Prot.Eng., 2002)⁴¹⁾ところで、YLBS 法を用いて、蛍光性を保持した GFP タンパク質の部分欠損体の作製を目指したが、全く見つからず、逆に部分挿入体は比較的容易に形成することがわかった(FEBS Lett., 2004)⁴²⁾。続けて、吉田昼也君が YLBS 技術を用いてトリプレットコドン単位で 8 アミノ酸長のランダムライブラリーの作製に成功した。このライブラリーは後述の埼玉バイオプロジェクト開始直後から役にたち、まず、学位取得後、JSPS(日本学術振興会)の外国人特別研究員を私のところで送っていた Mohammed Naimuddin 君が雇用研究員として、カテプシン E(CE)を阻害する DNA アプタマーの探索研究を行なうことになり、そのためにこのライブラリーを使用した。都合により 1 年間の研究であったが、nM の Ki(50%阻害濃度)を有する CE 阻害 DNA アプタマーがとれ、それが G-クオアルテット(グアニンが 4 角形を形成して安定する DNA4 本鎖構造)や i-モチーフ構造を形成することがわかり、我々にとって、最初の淘汰・進化工学実践であったが一定の手ごたえがあった(J.Mol. Recognit., 2006)⁴³⁾。そこでは Naimuddin 博士のパイオニア的研究者としてのセンスの良さが発揮された。この後、このライブラリーを使って(なにしろ PCR でいくらでも増える)、本格的にペプチドアプタマー開発に入っていた。

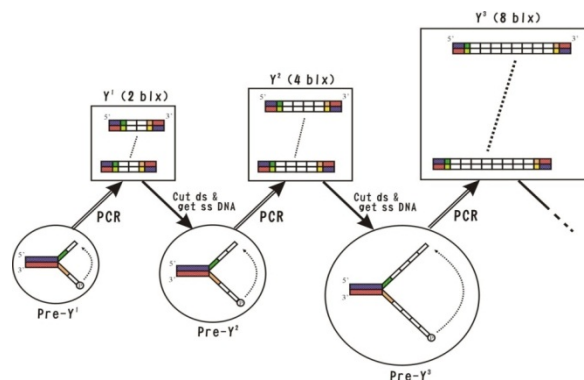


図9. 分子多様性を組換えにより指数関数的に増やす技術 YLBS 法

5-4 埼玉バイオプロジェクト

この頃(2003年)、「高速分子進化技術による有用分子の創製」を目指した埼玉バイオプロジェクトが立ち上がった。それはJSTの地域結集型プロジェクト(5年継続, 30億円(当初予定))という大型事業であり、埼玉県が実施機関となり、県内外の大学・研究機関・企業が連携して進めるものであり、その中心テーマが“進化分子工学”で、その提唱者・伏見譲教授が研究統括の軸(事業総括は元大正製薬研究所長の大関正弘氏)となり開始した。その数年前から学内バイオ系の教員、特に理学部の井上金治教授と一緒にやって行った下準備が結実した。この中で、私は高速分子進化の技術開発を進めるテーマのリーダーとして、そして最終的にはペプチドアプタマー開発を行なった。3期(埼玉バイオ I, II, III)10年の研究の継続の結果、多くの方々のご協力で、埼玉バイオ版「ペプチド高速分子進化技術」といえる技術群が整い、とりわけ、「cDNA ディスプレイ法の有効性実証(10 ターゲット対象)」、「発達ライブラリー法」、「迅速機能淘汰 MMV 法」などの主要技術成果とともに、周辺技術(pepELISA 法など)や装置の開発、さらには有用シーズペプチド(CE 阻害/活性化ペプチド、グレリンアンタゴニストペプチド、SOD1 結合ペプチド、NM23 結合ペプチド、A β 42 重合阻害ペプチドなど)の開発で幕を引くことになった。ここで開発した技術群を駆使して本格的に社会貢献する「ペプチドアプタマー」を創りだしていく第 2 幕の主人公は、その時活躍した若き研究者たちと埼玉バイオで産声を上げて独り立ちするところまで育ててきているベンチャー企業 Janusys であろうと考えている。

5-5 確実な進化戦略「発達ライブラリー(PLM)法」

21 世紀が始まったという昂揚感がまだ残っていた 2001 年秋に埼玉大学のキャンパスで形の科学会シンポジウムが開催された。「進化・情報・形」のテーマであった。この時、研究室のメンバー総出で運営に当たってくれた。この時の講演者のお一人に、当時、日本生物物理学会の会長が決まっていた郷通子先生がおられた。郷先生は、1980 年に分断遺伝子「イントロン・エクソン構造」に関して、生物物理学的解釈として「モジュール仮説」(*Nature*, 1981)⁴⁴⁾を提唱されていた。生物進化に関して、intron-early か intron-late かでいまだに議論が燻っている。しかし、それとは別に、タンパク質がモジュール(15~30 アミノ酸の構造単位)と名称されたペプチド断片の組み合わせとして形成してきたということはその後のゲノム研究からほぼ間違いのないものとなってきた。我々はモジュールをさらに小さくした、その半分の大きさ(オクタマー程度)の機能性ペプチドを工学的に見つける研究をしているが、それを“モジュレット”と呼ぶとしたら?とお聞きしたら「それは構いません」とおっしゃった。進化的にそのような小さな単位のペプチドが存在した時代があったかどうか(仮にあったとしても、現在のゲノムから、その痕跡を見つけることは至難の業かもしれないが)は不明であるが、オクタマー(8mer)は十分機能を持ちうることで実験的に分かってきた。

無から有を生じる ランダムペプチドライブラリー(オクタマー)を吉田昼也君が YLBS 法で終止コドンが出現しないようにして合成した。これを用いて、埼玉バイオの2年目(2004年)からポスドクとして勤め始めた北村幸一郎君がカテプシンE阻害ペプチドのスクリーニングを行った。このとき、我々のグループとして初めてペプチドアプタマーを淘汰するためにcDNA ディスプレイ法を実用することになった。それまで、まだ実績のない技術であった。北村博士はまず 3 ウエイのリンカー構造を検討してみたが、少し試みて不調であったので深入りせず、根本博士(当時ジェンコム of 研究者で後に埼玉大学准教授)らが作製したリンカーをそのまま用いた。種々な検討を重ねた末に、CE 阻害ペプチドアプタマーを得て、その後、活性化型を得ることに成功した。ランダム状態(情報的には“無”)から意味のある配列(“有”)を選び上げることができたことを意味した。その後、10年間の埼玉バイオプロジェクトの中で、私が関係した10近いペプチドアプタマー淘汰の中で、唯一うまくいかなかったのが、表—1にある CD16a である。これは糖鎖に覆われた膜たんぱく質で、どうやらその糖鎖が淘汰を難しくしていたと後で考えられた。糖鎖を分解酵素

埼玉バイオターゲットペプチドリスト

ターゲットペプチド	特性	達成度	
カテプシンE	酸性阻害	酸性条件下で働くアスパラギン酸プロテアーゼ	1次・2次・3次スクリーニング成功
	酸性活性化		1次・2次・3次スクリーニング成功
	中性活性化	中性下で酸性とは異なる活性を発揮しがんをアポトーシスさせる	1次・2次・3次スクリーニング成功
NM23結合	白血病・リンパ腫に関連して発現するタンパク。分化促進・転移抑制	1次・2次スクリーニング成功	
MGMT阻害	O6-メチルグアニンメチル転移酵素。阻害によりグリオーマ治療に	1次スクリーニング成功	
サイキニン阻害	広くがん細胞に発現し、がんの増殖・維持に寄与している。	1次スクリーニング成功	
CD16a結合	免疫応答のADCC においてFc受容体として働く細胞表面糖タンパク	[未達成]	
グレリン受容体阻害	グレリンの受容体でGPCRの一種。	1次スクリーニング+点置換成功	
Aβ42阻害阻害	凝集しアルツハイマー病を引起すと考えられるタンパク質	1次・2次・3次スクリーニング成功	
SOD1阻害	変異体がALS(筋萎縮性側索硬化症)の原因と考えられている	1次・2次スクリーニング成功	
ジンジバイン阻害	口内に棲息するジンジバリス菌の産生するプロテアーゼ	1次スクリーニング+点置換成功	

で外すと今度はタンパク質同士が凝集し始めて始末に負えず、研究を撤回した。東大の太田(邦彦)研究室との共同研究のために退きづらかったが、泥沼にはまり込まずにすんだのは、研究を主体的・合理的に進めてきた小松将之君(博士後期課程)のデータが有無を言わさぬ明快さを持っていたからである。この後、小松君は興味深い新戦術を提起し、共同研究者の強い関心をつなぎとめている。

この件はあったものの、基本的にcDNA ディスプレイと総称する一連の淘汰方式は有用であるということが示せて(そのころ、Naimuddin 博士が産総研の久保(泰)研究室でcDNA ディスプレイ法を用いてIL6受容体のアゴニスト・アンタゴニストを取るのに成功した(*Mol. Brain* 2011)⁴⁵⁾), 少なくとも埼玉バイオの間には、もはやその有効性を疑う人はいなくなった。この間、国内外では、Szostak のグループや慶応大学の柳川弘志教授らのグループが mRNA ディスプレイの名称で成果を挙げてきていた。

1から10(低から高)へ 進化工学で、当初から大きな課題であったのは、“機能向上”の問題であった。「淘汰」は選抜対象となる集団の中から、最も優れたものを選びあげるプロセスである。逆に言えば、最初の集団に含まれる要素を超えたような優れたものは選びようがない。従って、満足いく“玉”がなかったときは、全く別の山を掘りなおすというのが、通常のやりかたであった(もともと、そこで淘汰されたものについて、点置換体や末端からかじり取った欠失体を探索するというは遺伝子工学の初期 1970 年代から実践されてきた)。結局、これは膨大な配列空間において、探索対象の分子集団の要素数をランダムに増やすという方式に他ならない。その意味では、扱うことのできる分子集団数を最初から 10 倍にできれば、探索を 10 回行ったことに相当し、ライブラリーサイズを大きくすることはその意味で有効である。しかし、そこには“学習”がない。探索によって得られた成果(一般には少数の分子集団(=エリートライブラリー))をどこにも利用していない。35 億年の生物進化は、どうやらそのような方式ではなく、“学習のある方式”を取ったがゆえに、ここまで高度化したと考えられた。これが後述の「発達ライブラリー法(淘汰の成果を利用しながらさらに進化した分子を探索する方式)」の原点である。

さて、CE 阻害ペプチド(pH4.5 条件下)の淘汰に成功した北村博士は次にこの発達ライブラリー法の第二ステップ(ASAC 法と名称)に取り組んだ。初期ライブラリーの淘汰で得られたペプチド分子集団から配列のクラスタリング解析を通じて共通するペプチド断片配列(ブロック)を複数見出して、それらおよび

ープ配列(先験的に添加する配列)のランダムな組み合わせ配列を発生して2次ライブラリーを形成した。これには、背景があった。1980年代にセルスタットの実験を行っていたが、その頃から適応度地形や配列空間の概念が研究室で盛んに議論されてきて、1990年代には当時の卒研生で計算・理論に強い相田拓洋君が研究室に残り、伏見先生の下で博士号取得後も、その関係の理論を発展させていた。そのような環境の中で2000年代の埼玉バイオ実践時代を迎えていた。我々が行ったペプチドアダプターの淘汰実験は、まさにそのような理論の検証の場でもあった。淘汰実験で得られる様々な配列のペプチドを“一次ライブラリー淘汰産物”としてデータベース化することは、自然な流れであった。それらの配列のクラスタ解析からコンセンサスな複数の機能断片を見つけることになり、それをブロック(通常、テトラマー)としてランダムに連結し、しかもオクタマーだけでなく、12mer, 16mer, 20mer, 24mer, 28mer, 32mer等の長さのブロックランダムペプチドを発生させた(研究室の討論で、「どうしてテトラマーか?」と伏見先生や相田博士が鋭く問われたのは「さすが」と思った。「直感」という答え以外にまだ明解な根拠はないが、興味深い問題である)。ここでブロックシャフリング技術YLBS法が威力を発揮した。様々な長さで様々な順番に連結した分子集団、即ちASAC(All steps and All combinations)ライブラリーを容易に創ることができた(もともと、時として現場の苦心は相当なものであったが)。20種のブロックを使って8つ連結すると 2.56×10^{10} 種のペプチドを発生することができる(わずか3回の連結反応で(図-9参照))。このライブラリーから淘汰した2次ライブラリー産物は、すべて活性を向上させることが示された。生物進化においてゲノムレベルでランダムな組換えが頻発しそれが新しい分子ライブラリーを提供してきたことはほぼ確実になっている。我々自身、上述のようにこのことをオリゴスティッキネス解析で明らかにしている。⁴⁶⁾問題はそうにして発生したランダム組換えライブラリーが、なぜ“**超えた分子**”を提供するのか?ということである。理論的証明はなかなか困難でも、実験的実証は図-10示されるように好調である。科学の発展が論理の緻密な理詰めだけでなされるのではなく、直感による飛躍が介在し、後付け的にそのギャップを埋める理論が展開するというケースは、例外というよりむしろ、科学発展の本質かもしれない。

10 から 100, さらに・・・:「発達ライブラリー

(PLM)法」 2次ライブラリー淘汰で高機能なペプチドを得たが、それに満足することなく、一層の高度化を目指した。3次ライブラリーの作製と淘汰である。このときにもタンパク質科学の教えるところに従えば、必然的に淘汰選別ペプチド(2次エリートペプチド)の組み合わせライブラリー(組換え体)の作製が考えられる(これをP&P(ペアペプチドライブラリー)と呼称)。あくまでも生体高分子タンパク質の“**進化してきたプロセス**”がお手本である。既に述べたように、進化のための「分子多様性」を発生するには、天然でも人工でも、本質的に「**組換え**」と「**点置換**」しかない。その組換えをもう一度活用するということがある。再びブロックシャフリング技術YLBS法での3次ライブラリー作製である。ここまで到達したペプチドアダプターはこれまでに4種(北村博士が酸性条件下でCE阻害ペプチドと活性化ペプチドをそれぞれ進化させたのと、Madhu Biyaniさんや小松将之君が中性条件下でCEを活性化

対象	発達段階	成果	備考
1. CE酸性阻害ペプチド			J.Mol.Biol.2009. 62 nM.
2. CE酸性活性化ペプチド			J.Mol.Biol.2009. Kd: Not tested.
3. CE中性活性化ペプチド			Int. J. Pep. 2011. 334 nM.
4. CE酸性阻害ペプチド			J.Pep.Sci 2012. 110 nM, 570 nM.
5. CE酸性活性化ペプチド			J.Pep.Sci 2012. Kd: Not tested.
6. CE中性活性化ペプチド			Int. J. Pep. 2012. 2 nM.
7. AS42結合ペプチド			Pro. Pep. L. 2011. 536 nM.
8. AS42結合ペプチド			(REDSIID). 23 nM.
9. NM23結合ペプチド			(REDSIID). 83 nM, 153 nM.
10. SOD1変異型結合ペプチド			(REDSIID). 85 nM.
合計	10	10	試行すべて成功

図10. 発達ライブラリーの試行と結果。

ライブラリーの発達には1次から2次、2次から3次と異なっているが、いずれの場合でもこれまですべて成功している。2次、3次ライブラリーは基本的に組み替え体ライブラリーである。

するペプチドを高機能化した。さらには Sunita Ghimire Gautam さんが Aβ42 結合ペプチドをより強力なものにした)であった。

さらに、Sunita さんは修士の黒田大斗君と協力して、発達ライブラリー法の最終的仕上げとなる 4 次ライブラリーの作製と淘汰を行っている。この 4 次ライブラリーは 3 次ライブラリー淘汰で得られた産物の点置換変異体集団である。サイズの小さなタンパク質(100 アミノ酸以下)ならば、最初からハミング距離 5 (変異させる前の配列と変異した後の配列でアミノ酸が 5 か所異なっているもの)以内のものを 10^{12} 種の操作分子で網羅することが可能である(その種のハミングライブラリー作製を 2013 年秋、早期卒業で修士に上がってきた本江彩さんが挑戦している)。この場合は、米国 Stemmer 博士が開発した「DNA シャプリング」でさらに機能向上する過程が省略できる。一方、アミノ酸数 100 を超えるタンパク質の場合は、DNA シャプリングを実践すればよい。いずれにしろ、この段階で発達ライブラリー法の“発達”は完成する。これは現存のタンパク質の進化の歩みとほぼ完全に重なっている。無論、現実の進化は遥かに錯綜していて、4 次ライブラリー淘汰産物の後にも組換えがあろうし、4 次ライブラリー以前にも点置換がある。順調な段階的発展は、個別分子に関するというより、“進化の大局的歩み”と考えるべきものであろう。発達ライブラリー法は、生物進化のサイエンスを元にして、素直に工学的戦略に移し替えたものであり、そこで頻用している組換え技術(YLBS)は別として、結局、全体は Biomimetics(いわゆる“Bio-inspired technology”)である。進化工学全体がそうであるように。そのことは、“模擬”に伴うネガティブな意味ではなく、生物進化の実績に“保証された”技術として輝かしくとらえることができるものである。このように科学技術にも“信仰”の要素が隠れ潜んでいる。

6. マイクロ・ナノテク「MMV」

2-2で述べたように私の関心は分子システムにある。そこで分子システムを捉えようとする要素全体を把握する必要がある。結局、オーミックス解析が重要となる。この観点から、網羅的解析手段の開発に突き進むことになる。それは、マイクロ・ナノテクの研究に踏み込むことに他ならなかった。この場合同時に、高感度な検出系が必要となる。1990 年に助手として務め始められた鈴木美穂先生はやがて高感度蛍光検出系として、伏見研究室の博士課程院生の伊藤洋一郎君らが開発した GFP(緑色蛍光タンパク質)の高輝度変異体を FRET(蛍光共鳴エネルギー移動法)応用するなどして独自に生体分子の高感度検出系の開拓をしてきている。部分的にはそのような対応ができて、限られた規模の研究室で残りのすべての技術要素を揃えることは、最初からできない話であり、共同研究の必要性がここからも発生した。「埼玉バイオ」やその関連のプロジェクトはいわば必然の趨勢であった。

ところで、2009 年、埼玉大学に脳科学融合研究センターが発足することになり、偶然のことからその立ち上げに参画することになり、20 代前半にぼんやり考えていた「脳科学」研究に 60 歳を過ぎて老いの道楽的に再びチャレンジする機会を得た。40 年という歳月の経過によって、脳科学はオーミックス研究のターゲットとしてピッタリな対象になっていた。

1990 年代、進化工学が本格化したのとはほぼ同時に、世界で「ナノテク」が勃興した。フラーレンやカーボンナノチューブとともに当初から、DNA やタンパク質などの生体高分子がこの領域のメインプレーヤーとして注目されていた。一分子観察・操作技術も現れる一方、当然のことながら 1960 年代から半導体産業が培ってきた技術の応用が始まった。すぐに分かってきたのは、未開領域は「ナノ」だけでなく、「マイクロ」においてもスカスカの状態であり、その一体的発展が必要であるということであった。

進化工学は「数の工学」とも言われるように、夥しい数(例えば、 10^{12})の分子を相手とする。そのとき、“まとめて(集団で)相手にする”か、“個別に相手にする”かの選択になり、当然前者が能率のいい方式であり、いわゆる“SELEX”や“ディスプレイ技術”はこれを可能にする進化工学の重要技術である。中でも、根本先生らが開発、発展に情熱を注いできた cDNA ディスプレイ法はタンパク・ペプチドに関しては最も大

きなライブラリー数を与える優れた技術である。数だけでいえば、DNA アプタマーは“対応付け戦略”が不要な分だけ有利(ディスプレイ法での制約因子となる“細胞数”や“リボソーム数”から自由)であり、 10^{15} も実際的に可能である。しかし、核酸は分子サイズが大きすぎる弱点があり、この点、ペプチドは有利である。

従来の多数分子の統計的計測に飽き足らずに、「一分子観察技術」が出現したのと同じ理由で、“まとめて相手にする”時に取れる情報量には限界がある。「運動量と位置の情報の両方を精度高く求めることができない」という量子力学での不確定性原理と似た話である。進化工学では、一方で、一つ一つ調べる技術が重要である。その時に膨大な数を捌くには、1 つ当りの処理速度を速め、同時に処理する数(並列性)を増やすしかない。究極技術は、「超並列化」×「超高速単位操作」×「一分子観察」に至りつく(最後の一分子観察はここでは微量化であり「経済性」から来る)。しかし、現実には、これらのどれかを深く追求しながら、他の要因については妥協的に折り合うというのが現実のマイクロ・ナノテク技術開発になる。進化工学においては、さらにもう一つの重要な要因、すなわち「多段階反応性」を取り込むことができなければ、全体としての高速化が実現しない。「多重並列化したマイクロフルーイデクス系で高感度検出を実現」すれば、“究極技術”が達成するように考えられる。将来的にはこのような系が実現するかもしれない。しかし、そこまでには困難な試練(吸着, 蒸発, 安定な加圧・移送, 等分割, 高感度化の限界, …)がいくつも存在するということをこれまでの μ TAS (micro total analysis system) 研究が明らかにしている。本質的により困難な面は技術ではなく、経済かも知れない。あまりにも特殊に創りこんだ結果、汎用性のないものとなり、小口化し過ぎて産業として成り立たないというジレンマを有する。

1994年からこれまで20年の歳月が経過する中で開発してきた新型マイクロアレイMMVは「スモール」&「シンプル」を基本に据えて、「汎用性」・「融通性」・「閉鎖系/開放系両用性」・「多段階反応性」を担保した技術となっている。すなわち、サブ μ L の微量で1024 並列であり、原理的には何段階でも反応可能である。実用開発にはまだこれからの部分が多く残されているが、これまでの開発で、「2N法により1024条件の一斉作成(リゾチーム結晶条件探索)」、「無尽レプリカ法」、「D2P(最初DNAであったものから最終的にペプチドやタンパク質に変換すること)」、「超高速次世代DNAシーケンサー(NGS)に依存しない微生物集団解析(NNMA)」、「機能淘汰マイクロアレイ(R123)」などがある。苦労しながらも、それぞれの技術が一定の成果に到達してきている。

6-1 新型マイクロアレイ MMV 開発プロジェクト

1994年の卒業研究から始まった新型マイクロアレイ研究は、2002年に修士に進学した森正輝君の研究とそれを引き継いだバングラディッシュからの留学生 Md. Salimullah 君によって、斬新な立体ゲル電気泳動4SRに発展した。これは「分離や反応のための積層ゲルシステム」(Stacked slice gel system for separation and reaction)のことで Salimullah 君が論文 *Genom. Proteom. and Bioinform.*, 2006)⁴⁷⁾にまとめた

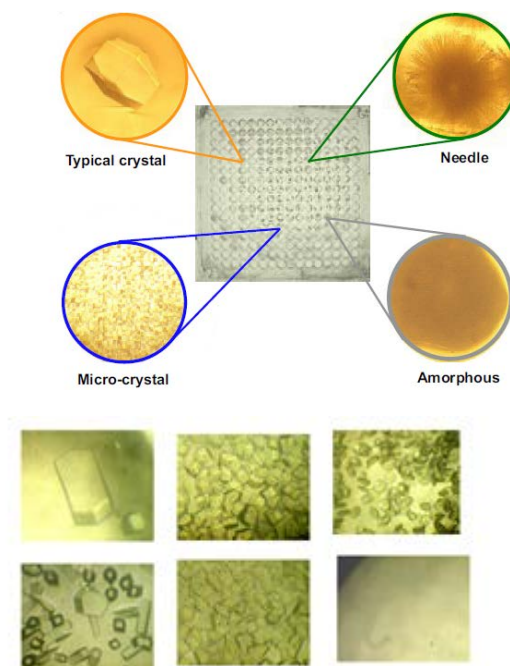


図11. 井戸型マイクロアレイ MMV を使って結晶化条件を調べる。図は 256 ウエル(アクリルアミドゲル製)の MMV を用いて行ったリゾチームの結晶化条件探索。微量・迅速に異なる結晶化条件を MMV1 枚の上に出現している(この後に 1024 ウエル(PC 製)も行い成功している)。下は見つかったそれぞれの条件で結晶化したもの。

時は、ポテンシャルはあっても、まだ時期尚早な技術という感じであった。一方では、卒業研究の三木英司君と森君で DMD (Digital Micromirror Device) を用いてゲルに細密なパターンを描くことに成功した。いわゆる湿式 MMV の作製である。装置は電気・電子システム工学科の内田秀和先生から提供されたものであった。この時、三木君は 1 インチ角に 10000 のウエルを作製することに成功した。アクリルアミドゲルを 2 層に重ねて(ウエル貫通層と底板層)成形する技術で、重合開始に用いるリボフラビン重合後ゲルから洗い出す操作が必要となり、このときにゲルが膨潤したり、2 層が剥離したりするために、安定な定型をえるためには洗い操作を含めた全操作を注意深く処理する必要がある。いわゆる“職人技”の必要な領域の仕事であった(先述の増田君、坪田さんらの変性剤濃度勾配ゲル作成もそれに近かった)。スイッチを押せば、確実に定型品を吐き出してくれる完成された装置に到達する前には、常にこの種の泥臭く、汗臭い開発段階の作業が伴う。創造的工学の醍醐味と言える。さすが工学部に来る学生だけあって、中には、この種の“光る技”を有している学生が少なくない。森君らが立ち上げた DMD 運転の後を引き継いだ田山貴紘君は特に器用に、MMV ゲルを量産し、研究のペースを高めていた。MMV を用いた PCR 反応や細胞培養を実現し、その後、木下技術員も加わってさらに巧妙に「2N 法による 256 (及び 1024) 条件の一斉作成(リゾチーム結晶条件探索)」(図-11)を実現した。

この湿式ゲル MMV 開発は、後の乾式 MMV を検討するためのパイロット実験としての役割を果たした。国際特許の申請や論文発表 (*BMC Biotech.*, 2010)⁴⁸⁾ に繋がった。これらの成果を下に、乾式の MMV とその支援装置開発を目指し「超高速スクリーニングのための新型マイクロレイシステム開発」というテーマで、数社と連携して科学技術振興機構 (JST) の「先端計測分析機器開発事業」(平成 21 年度) に応募して採択された。平成 25 年 3 月までの 3 年半の期間、継続する中で、有難いことには、産学連携がガッチリと生まれ (MMV チップ開発のエンプラス社、装置開発のライフテック社、フィルター開発のファインテック社、アプリケーション開発のジェナシス社、そして測定装置とシステム開発の埼玉大学の 5 機関)、目的通りの器具・機器開発に到達した。乾式 MMV は実用化し、予想以上のアプリケーションの数々が開発されてきた。これらの成果は開発に直接・間接に携わった多くの方々のご努力と国民の貴重な税金に支えられており、その活かし方が目下の課題となっている。

6-2 無尽レプリカ法と D2P (DNA からタンパク質へ)

新型マイクロレイ MMV は別名「井戸型マイクロレイ」であるが、図-12 に示すように複製可能な因子 (DNA や細胞) については、井戸から井戸へ移送する過程で残留する微小液滴を種として増幅することで、半永久的に同じものを再生することができる (無尽レプリカ法)。シンプル系ゆえの強味である。ジェナシスの雇用研究員である藤生誠一氏が試行錯誤の中で開発した。その前には、やはりジェナシスの雇用研究員であった澤田瑞穂さんが MMV 中で動物細胞 CHO などの培養とアッセイを成功させていて、卒業研究で塩田侑子さんが着火した「MMV を用いた動物細胞培養系」を確実に燃え続ける炎にした。既に学位を修め、ポスドクとして雇用されていた Shamim Ahmed 博士は、MMV 中での多段階反応に挑戦した。すなわち、MMV に DNA を入れ、その場で mRNA に転写し、さらにタンパク質に翻訳するという一連の反応をピペットを使わずに MMV の“Well-to-well”移送操作だけで実行し、最終産物として蛍光性の GFP を得た。いわゆる D2P (DNA から Protein へ) である。2012 年に修士に進学した神山諒平君は MMV 中でのセルベースアッセイ開発をする傍ら、この多段階

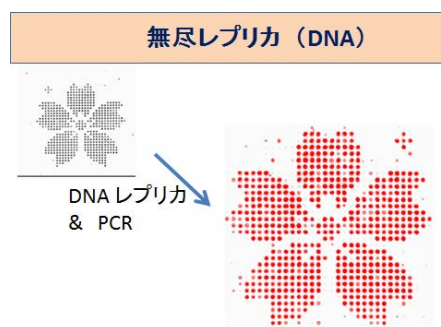


図12. 無尽レプリカ法

井戸型マイクロレイ MMV を使えば、D2D (DNA から DNA へ) C2C (細胞から細胞へ) と半永久的にレプリカが形成できる。

反応に挑戦し、Aβ42 結合ペプチドの MMV 中でのスクリーニング実験を基本的に成功させている(確認実験中)。念願の「創薬のための超高速スクリーニング系」の完成が近づいたと期待したい。

6.3 シングルセル方式微生物群集解析(NNMA)

「実に単純なことであっても、実現が難しいこと」がこの世にはある。その一例が「微生物集団を 1 個体ずつに分けて多段階の処理をする」ということである。仮に 1000 細胞からなる細胞群があったとして、それを希釈して、1 細胞/数 μL の濃度にし、マイクロプレートの 1536 穴に、数 μL ずつ注いでいけば一応実現する。しかしこの後、細胞を溶解し、DNA を精製し、PCR して DNA を増やし、その DNA の配列解析を行うということになると、1536 並列処理であることを考えれば、ピペット操作だけでもうんざりする。そもそも、1 細胞由来の DNA をこのような容器で直接扱おうと、吸着ロスなどでどこかに行ってしまう...といった問題があり、実は大変難しい。この一連の実験を新型マイクロアレイ MMV で実現するというのが、タイトルの NNMA である。応用研究もここまでくると、工学部の研究かどうかがわからなくなるが、紛れもなく工学部の我々の研究室の研究テーマである。これが成功すれば、これまで不可能に近かった微生物群集解析が現実のものになり、例えば腸内細菌の全体像が明らかになる。その知見が健康との関係で重要になってきている。これまでのところ、その情報を得るためには、次世代シーケンサー(NGS)というハイパフォーマンスな塩基配列決定装置を動かすしかなくて、極めて高コストであった(1回 50 万円ほど)。我々が開発した MMV を使うと、その 10 分の 1 以下のコストで実現できるはずである。この研究に、2011 年に大学院に進んだ野村翔太君と博士後期課程のインドからの私費留学生 Harshita Sharma さんが協力しあって挑戦し、全行程を通じて実現可能であることを示した。最初は、すぐに DNA がどこかに行ってしまうという吸着ロスの問題であったり、そもそも微生物細胞から DNA がまともに抽出されないという問題や、前段での反応試薬が残留することにより PCR が阻害されるという問題など、元々微量で扱いにくいということ以外に様々な課題が存在していたが、それらを丁寧に 1 つ 1 つ解決して、成功に導いた。二人は分担して個別の課題を解決した上で、それぞれ、独立にプロセス全体を実施し、共に、用いた試料(口内細菌)特有の正しい結論を得ている。野村君に至っては、修士の 2 年全体をこの研究に費やし、悶々としながら最後の数カ月を迎えたが、そこで鬼神が乗り移り快刀乱麻の冴えを見せた。Harshita さんの方は、文献調査に漏れがなく、次々と手がかりを得ては前に進んでいく典型的な才女ぶりであった。二人がヒマラヤの南壁と北壁を独立に登りきったような気がした。その後ろから、修士 1 年に上がったばかりの小林哲也君が、コツコツと登っている。2013 年の研究室の感動的シーンであった。

研究は元々“山登り”と同様だと思っている。大学教育・研究生生活の最後の段階まで多くの優れた学生や研究仲間とともに“山登り”できていることは、これまでに遭遇した人々、研究室を巣立った、あるいは巣立ちつつある学生諸君、応化・環境化学工学科や機能材料工学科の先生方や職員及び技術員の方々、理工学研究科の教員・職員の方々、産学連携でご協力頂いた企業・県・国の職員の方々、そして伏見先生を始めとする生体高分子工学グループの教員・スタッフの皆様のお蔭であり、一人ひとりに心からお礼を申し述べたい(誠にありがとうございました)。

さいごに

センター長の小林先生に、原稿依頼を受けた段階では十分すぎるほどの時間があると思っていたが、不覚にも右手首を骨折するトラブルなどの思いがけないできごともあり、結局は、物理的最終段階まで待っていただくことになった。それでも結局書き足りない思いの中で筆をおくことになった。研究センターに記述したために、どうしても論文等にまとめたものやその関係者の方々の話が中心になっている。科学分析支援センターのマイ・レビューとしての格調から、勢い、学問的にかかわりのある内容に留める努力を払ったせいもある。あれやこれやで、本来このような場でご披露するのがふさわしい話も漏れっぱなしで、内容

に足らざる部分が多々生じている。このことに対しては深くお詫び申し上げると共に、またのチャンスに委ねたいと考えている(深謝)。

文献:

1. Cellstat-A continuous culture system of a bacteriophage for the study of the mutation rate and the selection process at the DNA level, Husimi Y., Nishigaki K. Kinoshita Y. and Tanaka T., *Rev. Sci. Instrum.*, **53**(4), 517-522, (1982)
2. Strand Dissociation and Cooperative Melting of Double-Stranded DNAs Detected by Denaturant Gradient Gel Electrophoresis, Nishigaki K., Husimi Y., Masuda M., Kaneko K. and Tanaka T., *J. Biochem.*, **95**(3), 627-635, (1984)
3. Type II restriction endonucleases cleave single-stranded DNAs in general, Nishigaki K., Wakuda H. Husimi Y. and Tanaka T., *Nucl. Acids Res.*, **13**(16), 5747-5760, (1985)
4. Detection of differences in higher order structure between highly homologous single-stranded DNAs by low-temperature denaturant gradient gel electrophoresis, Nishigaki K., Husimi Y. and Tsubota M., *J. Biochem.*, **99**(3), 663-671, (1986)
5. Computer Prediction of General PCR Products Based on Dynamical Solution Structures of DNA, Sakuma Y. and Nishigaki K., *J. Biochem.*, **116**(4), 736-741, (1994)
6. DNA プロファイリング方法と原理, 西垣功一, 天野紀彦, 高沢努, 木下保則, 伏見謙, *生物物理*, **30**, S230, (1990)
7. Genome structures embossed by oligo-nucleotide-stickiness, Nishigaki K. and Saito A., *Bioinformatics*, **18**(9), 1153-1161, (2002)
8. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Ellington AD, Szostak JW. *Nature*. 1346(6287) 818-22 (1990)
9. テトラマーブロック法による DNA オクタマーの効率的合成, 山本 由紀子, 西垣 功一, 森田 数博, 杉本 宣敬, *日本化学会誌*, **1988**(2), 189-193,(1988)
10. (欠番)
11. Primer-and stopper Method: transcription-like Copying and Amplification of DNA, Nishigaki K., Takasawa T., Kinoshita Y., Shibuya T. and Husimi Y., *埼玉大学紀要*, **26**, 1-9, (1992)
12. Thermal denaturation of double-stranded nucleic acids: prediction of temperatures critical for gradient gel electrophoresis and polymerase chain reaction. Steger G. *Nucleic Acids Res.*, **22**(14), 2760-2768, (1994)
13. Whole genome sequence-enabled prediction of sequences performed for random PCR products of Escherichia coli, Nishigaki K., Saito A., Hasegawa, T., Naimuddin M., *Nucl. Acids Res.*, **28**(9), 1879-1884, (2000)
14. Species-identification dots: A potent tool for developing genome microbiology, Naimuddin M., Kurazono T. Zhang Y., Watanabe T., Yamaguchi M. and Nishigaki K., *Gene*, **261**(2), 243-250, (2000)
15. Hundred-fold Productivity of Genome Analysis by Introduction of Micro-Temperature Gradient Gel Electrophoresis, Biyani M. and Nishigaki K., *Electrophoresis*, **22**(1), 23-28, (2001)
16. Electrophoretic analysis of the unfolding of proteins by urea. Creighton TE. *J Mol Biol.*, **129**(2), 235-264, (1979)
17. Two-dimensional electrophoretic separation of restriction enzyme fragments of DNA. Fischer SG,

- Lerman LS. *Methods Enzymol.* **68**, 183-191, (1979)
18. DNA Profiling. An Approach of Systemic Characterization, Classification, and Comparison of Genomic DNAs, Nishigaki K., Amano N. and Takasawa T., *Chem. Lett.*, 1097-1100, (1991)
 19. Acquisition of genome information from single-celled unculturable organisms (Radiolaria) by exploiting genome profiling(GP), Kouduka M., Matuoka A. and Nishigaki K., *BMC Genomics*, **7**(135)(Web J.) (2006)
 20. Quantitative comparison of fungi genomes performed by μ TGGE genome profiling, Tamura, N., Fujino, H., Kouduka, M., Nishigaki, K., *埼玉大学紀要*, **37**, 21–28, (2004)
 21. Genome profiling (GP) as an effective tool for monitoring culture collections: A case study with *Trichosporon*, Keiichi Hamano, Sachika Ueno-Tsuji, Reiko Tanaka, Motofumi Suzuki, Kazuko Nishimura, Koichi Nishigaki, *Journal of Microbiological Methods*, **89**, 119–128, (2012)
 22. Genome Profiling (GP) Method Based Classification of Insects: Congruence with That of Classical Phenotype-Based One, Shamim Ahmed, Manabu Komori, Sachika Tsuji-Ueno, Miho Suzuki, Akinori Kosaku, Kiyoshi Miyamoto, Koichi Nishigaki, *PLOS ONE*, **6**(8), 23963, (2011)
 23. A database for the provisional identification of species using only genotypes: web-based genome profiling, Watanabe T., Saito A., Takeuchi Y., Naimuddin M. and Nishigaki K., *Genome Biology*, **3**(2), 0010.1-0010.8, (2002)
 24. Measurement of DNA mutations caused by seconds-period UV-irradiation, Futakami M. and Nishigaki K., *Chem. Lett.*, **36**(3), 358-359, (2007)
 25. Novel mutation assay with high sensitivity based on direct measurement of genomic DNA alterations: Comparable results to the Ames test, Futakami M., Salimullah Md., Miura T., Tokita S. and Nishigaki K., *J. Biochem.*, **141**, 675-686, (2007)
 26. Systematic genome sequence differences among leaf cells within individual trees, Deepti Diwan, Shun Komazaki, Miho Suzuki, Naoto Nemoto, Takuyo Aita, Akiko Satake, Koichi Nishigaki (投稿中)
 27. Human blood identification using the genome profiling method, Nagisa Suwa, Hiroshi Ikegaya, Tomokazu Takasaka, Koichi Nishigaki, Koichi Sakurada, *Legal Medicine*, **14**(3), 121-125, (2012)
 28. Introduction of Physicochemical Properties Termed Stickiness and Pseudostickiness to Quantification of Macromolecule-interaction and Its Application to the Analysis of Lambda Genome DNA, Nishigaki K. and Sakuma Y., *J. Chem. Software*, **2**(2), 96-107, (1994)
 29. Host-parasite Relations of Bacteria and Phages can be unveiled by Oligostickiness, a Measure of Relaxed Sequence Similarity, Shamim Ahmed, Ayumu Saito, Miho Suzuki, Naoto Nemoto and Koichi Nishigaki, *Bioinformatics*, **25**(5), 563-570, (2009)
 30. Random PCR-Based Genome Sequencing: A Non-Divide-and-Conquer Strategy, Nishigaki K., Akasaka K., Hasegawa T., *DNA Research*, **7**(1), 19-26, (2000)
 31. Estimation of the Redundancy in Human Genome Shotgun Sequencing by a Monte-Carlo Simulation, Saito A. and Nishigaki K., *The Journal of Chemical Software*, **5**(1), 29-38, (1999)
 32. Bacterial Bioassay of Microgram to Subnanogram Quantities of Glucose, Nishigaki K., Yamada T., Watanabe T., Husimi Y. and Tanaka T., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **10**(5), 428-434, (1988)
 33. Peptide aptamer-based ELISA-like system for detection of cathepsin E in tissues and plasma, Koichiro Kitamura, Madhu Biyani, Masae Futakami, Sachika Ueno-Tsuji, Miho Suzuki, Tomoyo Kawakubo, Kenji Yamamoto and Koichi Nishigaki, *Journal of Molecular Biomarkers and Diagnosis*, **2**(1), dx.doi.org/10.4172/2155-9929.1000104, (2011)

34. ナノ秒の MD シミュレーションから求めたペプチド二次構造の確率予測—三角マップ表示した%ステイキネス法の有用性, 村山 真一, 吉田 昼也, 青山 崇, 浦田 賢, 西垣功一, *J. Comput. Chem. Jpn.*, **5**(4), 213-218,(2006)
35. Single-Stranded Conformation Polymorphism (SSCP) of Oligodeoxyribonucleotides: An Insight into Solution Structural Dynamics of DNAs Provided by Gel Electrophoresis and Molecular Dynamics Simulations, Biyani M.and Nishigaki K., *J. Biochem.*, **138**(4), 363-373, (2005)
36. Restriction-Enzyme-Nondependent Recombination and Rearrangement of DNA (RRR), Nishigaki K., Kinoshita Y, and Kyono H., *Chem. Lett.*, 131-132, (1995)
37. Y-ligation: an efficient method for ligating single-stranded DNAs and RNAs with T4 RNA ligase., Nishigaki K., Taguchi K., Kinoshita, Y., Aita T., Husimi Y., *Molecular Diversity*, **4**(3), 187-190, (1999)
38. In vitro virus: bonding of mRNA bearing puromycin at the 3'-terminal end to the C-terminal end of its encoded protein on the ribosome in vitro. Nemoto N, Miyamoto-Sato E, Husimi Y, Yanagawa H. *FEBS Lett.*, **414**(2):405-408, (1997)
39. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins, Roberts RW, Szostak JW. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; **94**(23), 12297-12302, (1997)
40. An Efficient Ligation Method in the Making of an in vitro Virus for in vitro Protein Evolution, Tabuchi I, Soramoto S., Suzuki M., Nishigaki K., Nemoto N. and Husimi Y., *Biol. Proced. Online*, **4**(1), 49-54, (2002)
41. Construction of block-shuffled libraries of DNA for evolutionary protein engineering:Y-ligation-based block shuffling, Kitamura K., Kinoshita Y., Narasaki S., Nemoto N., Husimi Y. and Nishigaki K., *Protein Engineering*, **15**(10), 843-853, (2002)
42. GFPs of insertion mutation generated by molecular size-altering block shuffling, Kitamura K., Yoshida C. and Nishigaki K., *FEBS Lett.*, **555**(3), 483-488, (2002)
43. Selection-by-function: efficient enrichment of cathepsin E inhibitors from a DNA library, Naimuddin M., Kitamura K., Kinoshita Y., Honda-Takahashi Y., Murakami M., Ito M., Yamamoto K., Hanada K., Husimi Y. and Nishigaki K., *J. Mol. Recognit.*, **20**(1), 58-68 (2007)
44. Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. Go M. *Nature*. **291**(5810), 90-92, (1981)
45. Directed evolution of a three-finger neurotoxin by using cDNA display yields antagonists as well as agonists of interleukin-6 receptor signaling. Naimuddin M, Kobayashi S, Tsutsui C, Machida M, Nemoto N, Sakai T, Kubo T. *Mol Brain.*, **4**:2. doi: 10.1186/1756-6606-4-2. (2011)
46. Homogenization of chromosomes revealed by oligonucleotidestickiness, Saito, A. and Nishigaki, K., *Journal of Computer Chemistry, Japan*, **3**(4), 145-152, (2004)
47. High-throughput 3-dimensional gel electrophoresis for versatile utilities: stacked slice-gel system for separation and reactions (4SR), Salimullah M., Mori M. and Nishigaki K., *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, **4**(1), 26-33, (2006)
48. Novel concept microarray enabling PCR and multistep reactions through pipette-free aperture-to-aperture parallel transfer, Yasunori Kinoshita, Takahiro Tayama, Koichiro Kitamura, Md. Salimullah, Hidekazu Uchida, Miho Suzuki, Yuzuru Husimi, and Koichi Nishigaki, *BMC Biotechnology*, **10**(71), (2010)