

埼玉大学における進化分子工学の誕生と発展

The emergence of evolutionary molecular engineering and its growth in Saitama University

理工学研究科工学部応用化学科 根本 直人

Graduate school of Science and Technology, Department of applied chemistry

Naoto Nemoto

Abstract

In modern times, evolutionary molecular engineering is indispensable for bioindustry, especially antibody engineering and enzyme design. The initial study of evolutionary molecular engineering was started and emerged by professor Yuzuru Husimi at Saitama University in the 1980s. I joined Husimi lab for study of origin of life as a graduate student at Saitama University in 1992.

Ever since, I have studied evolutionary molecular engineering and the origin of life and developed an artificial virus-type molecule named as “in vitro virus”. In vitro virus is the world's first virus type molecule with genotype-phenotype assignment strategy, that is synthesized with a cell-free translation system. The idea was proposed at Saitama university and accomplished at Mitsubishi Chemical Institute of Lifesciences in 1996. The diversity size of in vitro virus is 10^5 times larger than that of phage display.

Now in vitro virus has been known as mRNA display, and its improved version has been named as cDNA display. In this paper, I review how cDNA display has been developed and how it has been applied.

1. はじめに

私は埼玉大学で研究の手ほどきを受け、埼玉大学で研究を始めたことが研究者として自立する大きな契機となったと考えている。当時、工学部環境化学工学科の教授であった伏見譲教授の下で、生命の起源という何とも漠然としたテーマを研究したくて伏見先生の研究室を訪ねたのが、1990年頃であったと思う。当時、千葉県の高教員で学部卒業であったため、修士課程に入学するつもりで訪問したのだが、その場で先生から「あなたは修士課程には受からないと思います」と言われ、困惑していると「今度、埼玉大学に理研と連携大学院の博士課程ができます。そこなら受かるかもしれません」と言われた。確かに、私は物理学科出身で化学系はまったく勉強してこなかった。また、当時、修士課程の定員数も少なく、内部進学だけで埋まってしまい、外部からの入学は狭き門であったと思う。いずれにしても修士は難しいが博士なら可能かもしれないと伺い、当初、修士で2年間ぐらい勉強したらまた教員に戻ろうと思っていたが、博士課程を修了して教員に戻るべきか大いに悩んだ。しかし、当時、伏見先生は世界で最初のウイルス進化リアクター(図1)を完成させ、試験管の中でウイルスを進化させる実験を通して、進化の原理を物理化学的に究明しようとしていた。しかもその先には、物理科学と生命科学を統一するという壮大な夢が

あると伺い、元来、哲学少年だった私は、その接点にやりたかった「生命の起源」もあるということで、この理念に共鳴し、やらないわけにはいかないと気持ちが強くなった(図2)。さて、気持ちは気持ちで良いのだが、実際問題として30歳を過ぎて生物を全く勉強していない者が博士課程に入ってやっつけられるのか。その心配を伏見先生に尋ねると「20代で博士課程に入る場合は、どんな人間でも何とかできるが、30代で博士課程に入る場合、ピンかキリかどっちかだ」という返事が返ってきた。この段階で私はキリになるものと確信し、思う存分研究した後は、ラーメン屋にでもなろうと覚悟した。ラーメン屋になることを覚悟して研究を始めたので、ある意味、怖いもの知らずで、何でも挑戦できる。

今になって思うと、当時、できるかどうかわからない(というか実現できるとは思えない)“試験管ウイルス(in vitro virus)”の創製に挑戦できたのは、生物のことが何もわかっていない無知とこの将来を捨てた覚悟があったからではないかと思う。かの西郷隆盛は世の中で一番怖い男とは訊かれ「名誉も金も地位もいらぬ男だ」と答えているが、要はバカほど怖いものはないということである。

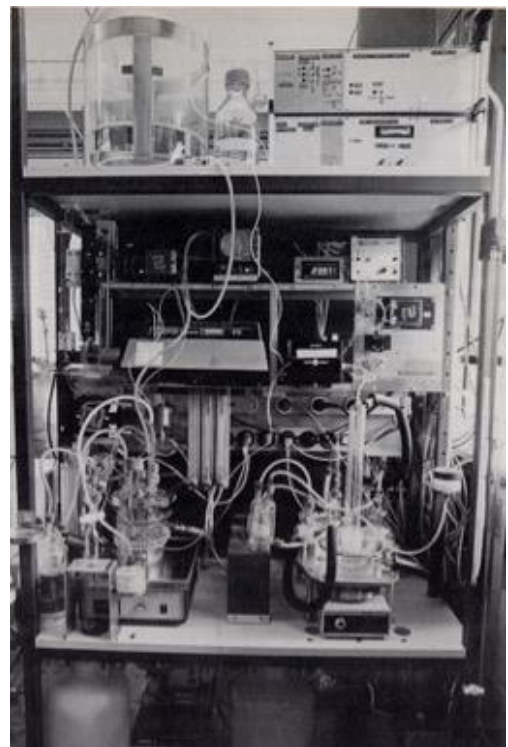


図1 世界で最初のウイルス自然淘汰型進化リアクター 1982年に完成

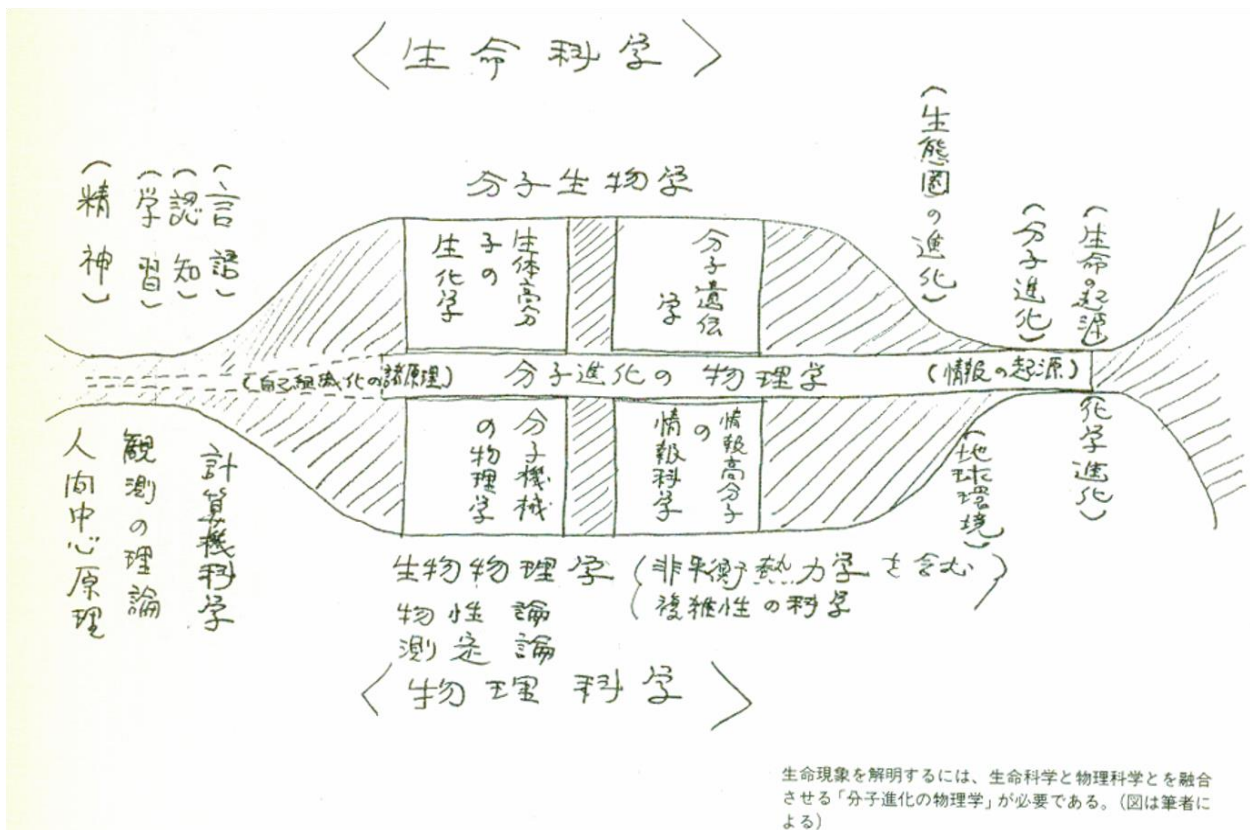


図2 「物理学と生命科学を地続きにする」 その境界に情報科学とも接点を持ちながら分子進化の物理学という領域が広がっている。

(学研 『最新生命論』(1990)より引用)

2. In vitro virus (mRNA display)開発事始め

私が伏見研究室を訪問した1990年頃は、進化分子工学の有効性が実証された年で、ハーバード大の Szostak 博士が RNA の試験管内進化 (in vitro selection) で Nature に、G.P. Smith 博士のファージディスプレイによるペプチドの in vitro selection が Science に発表された年である。実は、Smith 博士がファージディスプレイに用いた fd ファージは伏見先生がインスピレーションを与えている。1982年に米国アспенで開催された国際学会で図1の進化リアクター⁽¹⁾の発表をしたのだが、この進化リアク

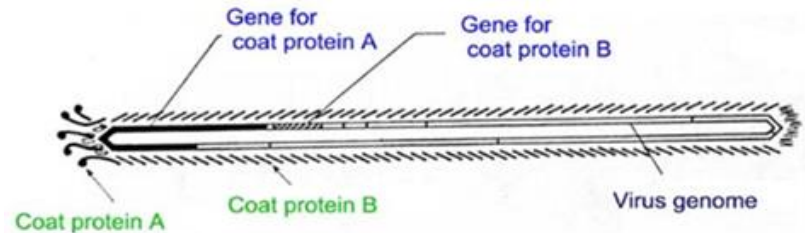
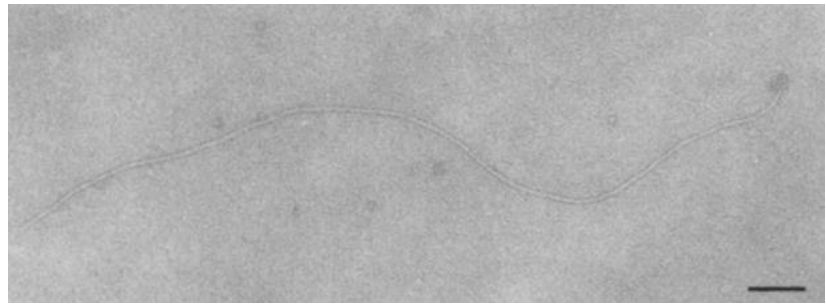


図3 fd 大腸菌バクテリアファージ 電子顕微鏡写真(上), 模式図(下) ゲノム DNA を表皮タンパク質 (coat protein) が包んでいる

ターで進化させていたウイルスが後にノーベル賞の対象となった fd ファージであった。fd ファージは繊維状ファージといって糸のように長い形をしている(図3)。fd ファージはウイルスのゲノムをそのゲノムに記録されている表皮タンパク質(コートタンパク質; coat protein)が取り囲んでいる。ちなみに伏見先生は coat protein B に変異を入れて進化実験をしていたのだが、Smith 博士は coat protein A に人為的にペプチドやタンパク質を導入することができることを発見し、これがノーベル賞の対象となった。現代の抗体医薬はこの部分に抗体の一部を導入し、試験管の中で進化工学的に最適な抗体のデザインを利用されている。

このような経緯もあり、当時の伏見研究室ではファージディスプレイを超える「遺伝子型—表現型対応付け分子」の開発が研究テーマに挙がっていた。博士課程のテーマとしてファージディスプレイを超える技術を考えるために伏見先生に紹介頂いた論文が1988年に Science に発表されたロシアの Spirin 博士の連続無細胞翻訳系に関するものであった。当時、無細胞翻訳系は合成量が少なくこれを用いたバイオツールは実用性に乏しいと考えられた。しかしこのような中で、Spirin 博士の研究は従来の見方を覆す画期的な成果である。今になって思えば、リボソームを含む翻訳系が生物学的な「翻訳反応」から合成生物学的な「翻訳分子システム」として捉えられる契機だったのかもしれない。いずれにしてもこの頃から無細胞翻訳系は私の主要な研究ツールであり、研究テーマとなったのである。

3. 生命の起源とハイパーサイクル

しかしながら、教員を辞めて大学院に入学したそもそもの目的はいわゆる「生命の起源」を研究したためであった。今でこそ生命の起源は宇宙生物学や合成生物学の興隆もあり、最先端の学際分野として受け入れられつつあるが、1990年当時それはそれを真顔で言うとは物好きか変人扱いされる雰囲気であったと思う。そんなことは一向に気にならなかったのは、当時の私は「世の中で一番役に立たないことをしよう」と覚悟を決めて大学院に入ったからに他ならない。さて、生命の起源研究はどれも難問といえば難問だが、とりわけコード化された RNA から鋳型依存的にタンパク

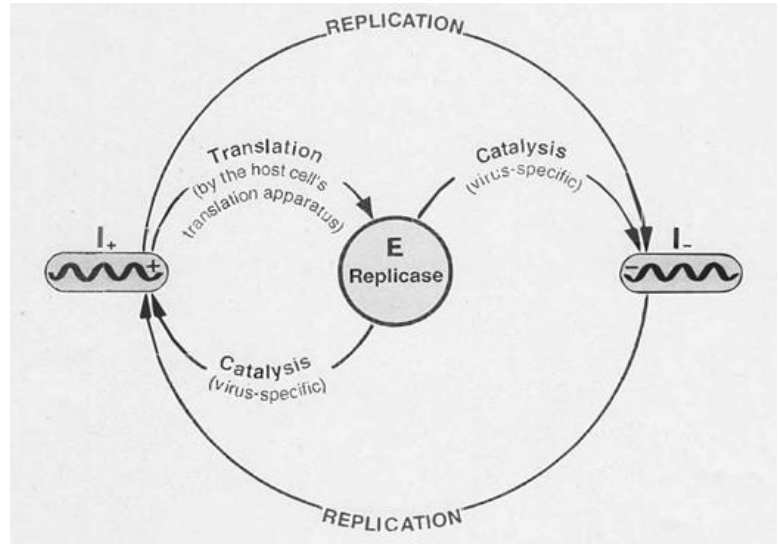


図4 Eigenのハイパーサイクル

「STEPS TOWARDS LIFE, Oxford University Press, 1992」より

質が合成されるメカニズム、つまり翻訳系の起源がもっとも大きな謎であると思えた。M. Eigen 博士の Hypercycle 理論はまさにこの翻訳系の起源に対する理論的なアプローチであった(図4)。一見、もっともらしい完璧な理論なのだが、1点問題があるとすれば、この系はダーウィン進化のような漸進的進化と相いれない理論であるという点であった。というのは、ハイパーサイクル理論は「なぜ全ての生物は 20 種類のアミノ酸に対するコドンが同じか」という問いに答えるための理論であるとも言えるからだ。たった一つの原始細胞からすべての生命は始まったという理由にすべての生物のコドンが同じであることが根拠として挙げられている。しかし、なぜ 20 種類なのか、なぜ各アミノ酸にそれぞれのコドンが対応したのか、に関しては説明できない。Hypercycle 理論の式を解くと、最終的に双曲線関数になる。これはある時間を漸近線として特定の自己複製する RNA 分子メンバーだけが無限大に増殖することを意味する。つまり、ある RNA 分子メンバーだけが生き残る。これがいわゆる「コドンの凍結」であると Eigen は考えた。しかし、私はコドンが形成される初期に 20 種類のアミノ酸に対するすべてのコドンが形成されたと考えるのは無理があると思えた。そのためには今あるようなリボソームがなくてはならないと思う。しかし、細胞も満足にできていない時期に立派なリボソームがあったとは考えにくい。つまり、最初から Eigen の言うような「コドンの凍結」があったのではなく、漸進的に使われるアミノ酸の数が増えるのに応じてコドンが形成されたと考えたほうが良いのではないかと思った。それはつまり one or nothing 的な Hypercycle にダーウィン進化を導入することに他ならない。それでは、

Hypercycle にダーウィン進化を導入するためにはどうすればよいだろうか？ 実は、RNA メンバーとそれにコードされたアミノ酸配列(小さなペプチド)が前述の fd フェージのように単純に結合したものを「ウイルス」と定義すると、このような RNA とペプチド(翻訳産物)が結合した形体が RNA メンバー単独よりも「複製」に寄与すると、ハイパーサイクル内に安定して存在することが数理モデルを解析することによってわかった。いわば、ハイパーサイクルに寄生するウイルスということになるが、「なぜ RNA ワールドからタンパク質

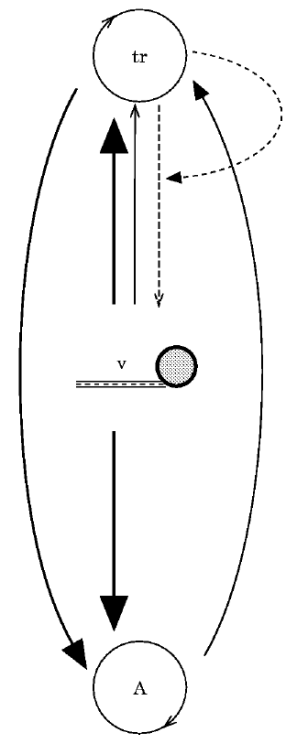


図5 根本・伏見のウイルス型分子を伴ったハイパーサイクル

も存在する RNP ワールドに遷移したのか」という問いに対する答えとしては、このモデルを使うと「ウイルスができたほうがハイパーサイクルの複製効率が向上するから」ということになる。生命の起源研究では、最近、リボソームが RNA 酵素であることが判明し、RNA ワールドから RNP ワールドに遷移したということが自然に受け入れられてきている。しかし、「なぜ RNA ワールドから RNP ワールドに遷移したのか」という問いには明確に答えることができない。これは言い換えると「なぜリボソームができたのか」という問いである。我々のモデルでは、RNA ワールドにおける RNA 酵素(リボザイム)からなるハイパーサイクルにウイルス的な RNA とアミノ酸が連結してものが発生すると考える。この RNA とタンパク質の複合体は、当初、タンパク質部分は RNA 複製酵素(RNA レプリカーゼ)として進化し、RNA 部分はタンパク質を合成するために有利なリボザイム(これはリボソームの原型)に進化するとハイパーサイクル内で RNA とタンパク質が相互依存して共生的に進化する。これを図式にすると図 5 のようになる。

$$dx_1/dt = \sum_{i=1,v} \sum_{j=1,2,v} k_{ij}x_i x_j + k_v x_v - k_t x_1 x_2 - x_1 D, \quad (1)$$

$$dx_2/dt = \sum_{i=1,2,v} k_{2i} x_2 x_i - x_2 D, \quad (2)$$

$$dx_v/dt = k_t x_1 x_2 - x_v D, \quad (3)$$

$$D = \sum_{i,j=1,2,v} k_{ij} x_i x_j + k_v x_v, \quad (4)$$

Eigen はハイパーサイクルが細胞のような袋に入ってハイパーサイクル自体が進化すると考えたが、この場合、細胞分裂のような機構が必要になる。遺伝子型-表現型対応付けの観点からは、細胞型はウイルス型に比べて細胞分裂が複雑なため増殖が難しい。そのため、伏見先生と私はウイルス型の分子がまず発生してある程度優秀なレプリカーゼができて長い RNA の複製ができるようになってから細胞型になって、翻訳系もより精緻なものができるようになったのではないかと考えた。ハイパーサイクルにウイルスが発生(寄生)することを数式化したものが上記の(1)~(4)の式で表せる⁽²⁾。

4. ウイルス型分子を試験管中で作る・・・In vitro virus

さて、実際にこの mRNA とそれにコードされたポリペプチドを連結した分子を試験管中で作るにはどうしたらよいであろうか？理論的には RNA とペプチドがしっかりと共有結合的に連結する必要はない。しかし、これを実験的工具として利用するのであれば、淘汰プロセスで RNA とペプチドが離れてしまっただけでは役に立たない。私はその頃(1992 年)、まだ有名なワトソンの教科書「遺伝子の分子生物学」で分子生物学を自習していた。そんなある日、あるページで目が釘付けになった。そこにはピューロマイシンという抗生物質が伸長中のポリペプチドの C 末端にリボソーム上で連結する模式図があった。「mRNA の 3' 末端をピューロマイシンで修飾すれば、伸長中のポリペプチドにリボソーム上で mRNA は連結するのではないか」とい

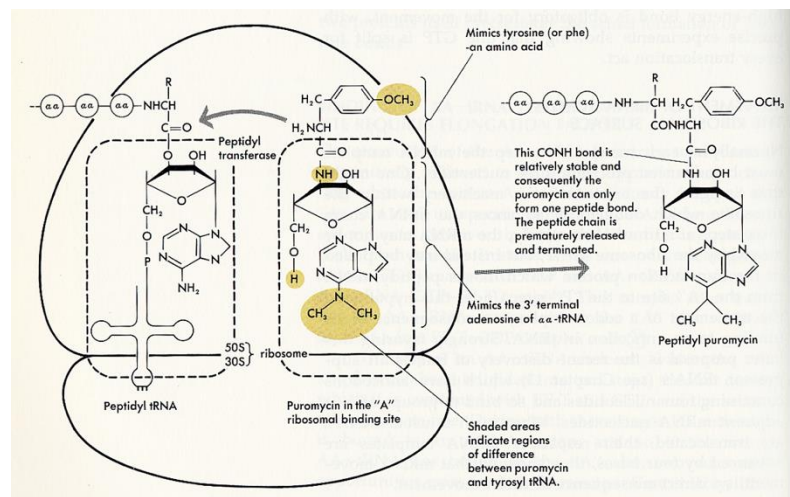


図 6 リボソームの A サイトにピューロマイシンが入る仕組み (ワトソン, 他著, 遺伝子の分子生物学より)

うのがその時閃いたアイデアであった。私はすぐさま指導教官であった伏見先生の教官室に行った。3時間程度白板を前に立ったままその可能性を議論した。伏見研究室は応用化学科の研究室であったが、その内容は生物物理で生化学的な実験手法しかなかった。そのため、ピューロマイシンを有機合成的に mRNA の 3'末端に連結することはきわめて難しい状況だった。紆余曲折の後、私はそのアイデアを実験的に証明するために三菱化学生命化学研究所の柳川弘志博士のもとで幸いにも特別研究員として研究を始めることができ、ピューロマイシンを介してリボソーム上で mRNA とタンパク質が共有結合することを証明したのは 1997 年であった⁽³⁾。しかし、この時の連結効率は 0.01%程度であって、実用化にはほど遠いものだった。

5. mRNA display (in vitro virus)から cDNA display へ

In vitro virus(mRNA display)は何とかできたもののその合成効率は実用化には程遠いものであった。課題には次のようなものがある。1) mRNA とピューロマイシン・リンカーの連結効率 2) mRNA の不安定性による selection の制限 3) 伸長中のポリペプチドとピューロマイシンの連結効率, 等々であった。

まず、1)の課題であるが、通常、mRNA と一本鎖 DNA であるピューロマイシン・リンカーの連結は T4 RNA リガーゼで行っているが、これは極めて効率が悪い反応である。この効率を上げるヒントになったのが当時准教授の西垣功一先生が行っていた T4 RNA ligase を用いた "Y-ligation" という方法であった。一本鎖の連結反応は効率が悪いのだが、連結させたい 2つのフラグメントにハイブリダイゼーションする領域を作っておき、Y 字型になるような形状を作る。連結をさせたい一本鎖同士が近傍に来るようにすることで、通常 16 時間かけても 50%程度の連結効率が、10 分程度で 80%程度連結する。飛躍的に効率を上げることができた(図7上)。そもそも1997年にはほぼ同時に埼玉大/三菱化学生命研とハーバード

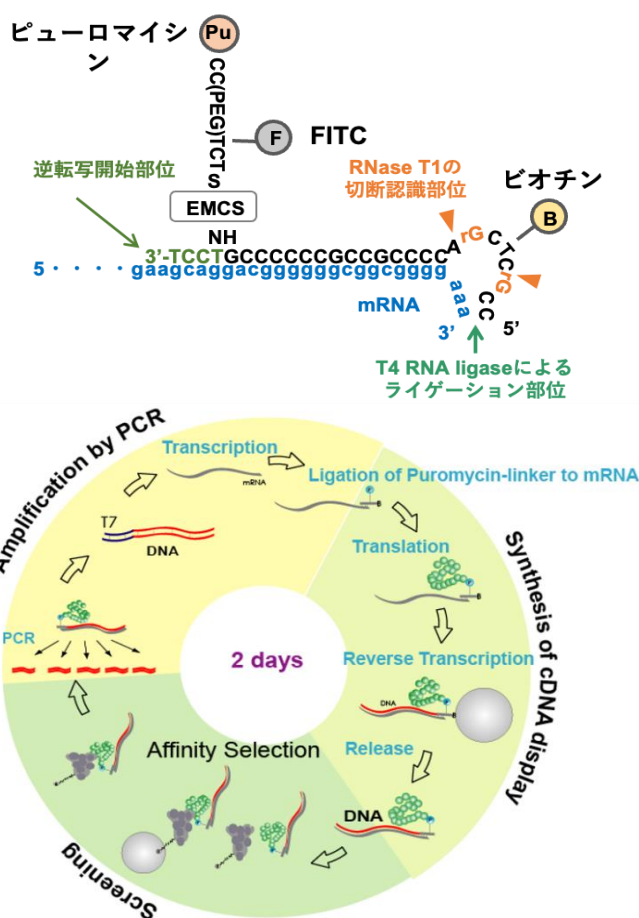


図7 cDNA display 用ピューロマイシン・リンカー(上), これを用いた cDNA display のスクリーニングサイクル(下)

大が論文発表した際に、一番大きく異なった点は mRNA にピューロマイシンの付いた DNA (リンカー) を連結する酵素が、埼玉大では「T4 RNA ligase」でハーバード大は「DNA ligase」であった。これは西垣先生が行っていた T4 RNA ligase を用いた実験を側で拝見し、この酵素の性質を詳しく知る機会があったからであった。さて、1)の課題は何とか解決の見通しが付いたものの、次の課題は2)の逆転写であった。mRNA は無細胞翻訳系に投入するとリボソームが結合して翻訳するが、通常、1 個だけでなく複数のリボソームが結合して連続的に合成される。そのため、無細胞翻訳系の中に逆転写酵素を入れてもリボソームが邪魔をして、cDNA を合成することは難しい。そこで、逆転写のためには無細胞翻訳系から mRNA display を取り出した後、リボソームを mRNA から取り除かなくてはならない。そのためにリンカーにはビオチンを付加して、アビジン磁性体ビーズで簡単に無細胞翻訳系から回収できるようにした(図7下)。この

ように磁性体ビーズに固定化することの利点はバッファー交換が簡単になることである。試験管内に磁性体ビーズを分散させた後、バッファー溶液を交換する際には、磁石で磁性体ビーズを数分で回収できる。この方法で、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid; 金属キレート剤) バッファーに無細胞翻訳系から取り出した mRNA display が固定化された磁性体ビーズを投入すると、EDTA によってマグネシウムイオンが取り除かれるので、マグネシウムを失ったリボソームは容易に mRNA から離脱する。後は図7下にあるようにリンカーの一部は逆転写用プライマーになっているため、逆転写酵素用バッファーと逆転写酵素を加えることで、磁性体ビーズ上で cDNA が 10 分程度で合成できる。安定化した cDNA display の形で磁性体ビーズ上に固定化されているため、例えば、修飾酵素でペプチドに糖鎖や様々な修飾を加えることができる。このように合成した cDNA display 分子は RNase T1 を加えることで、磁性体ビーズから切り離し図7のような選択プロセス (Affinity Selection) に利用できる。これでようやく安定に厳しい環境下でもスクリーニングできる形になった。具体的には生細胞 (通常、RNA 分解酵素等を放出している) の表面にある膜タンパク質 (創薬標的である GPCR 等) に対してスクリーニングが可能になった。mRNA display では通常、4°C でスクリーニングを行うことと、mRNA のため分解されそもそもスクリーニングが難しい。ここまでの研究は当時早稲田大学の船津高志先生の下で大学院生であった山口淳一君、埼玉大学の西垣先生のインド留学生 Biyani さん、Naimudin さん、伏見研の上野真吾さん、根本研の望月祐樹君、熊地重文君らのご協力の成果である⁽⁴⁾。

6. 分子間相互作用解析の課題

Affinity Selection でとれてきたペプチドやタンパク質の機能 (一般的には親和性) を解析することは実は思いの外大変である。ペプチドの場合は化学合成にはそれなりのコストがかかる。また、タンパク質の場合は、大腸菌等で発現・精製する必要があるが必ずしも発現がうまくいくとも限らない。特に無細胞翻訳系で合成されたものが大腸菌で合成できない場合も多い。そのため、cDNA display の selection でせっかく取得したペプチドやタンパク質の親和性を簡単に測定することができないという課題があった。微量なサンプルで測定できる機器はどれも高価で、立ち上げたばかりの研究室では購入は難しい。そこで、無細胞翻訳系で合成したペプチドやタンパク質で簡易に定性的にでも親和性を測定できる系が必要であった。生化学では昔から免疫沈降やプルダウン法といったものがあり、この無細胞翻訳系版を作りことを当時博士課程学生であった望月君が挑戦してくれ、図8のような系を作ってくれた⁽⁵⁾。また、修士課程の種村裕太郎君も貢献してくれてジスルフィド架橋ペプチドの相互作用の簡易測定を実現してくれている⁽⁶⁾。

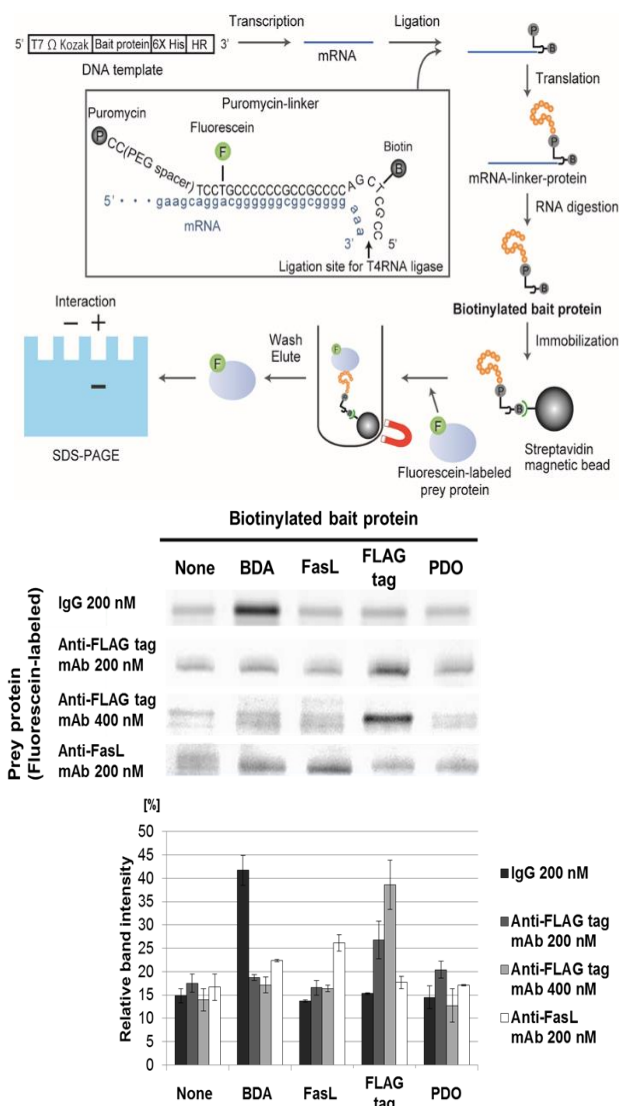


図8 プルダウン用ピュロマイシン・リンカー (上), これを用いた分子間相互作用の結果 (下)

(Y. Mochizuki, et al., *Anal. Biochem.*, 434, 93-95, 2013)

当時の貧乏研究室ではせいぜいこのようにして候補分子を絞り込むしかできなかった。一方、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置 (いわゆるバイオコア) を用いた正確な K_d 測定も必要であることには変わらない。

当時、埼玉大学ではバイオコアの普及版であった Biacore-J を環境共生学科の王先生が使われていたため、これをお借りして無細胞翻訳系で合成したタンパク質の親和性を正確に SPR 装置で図れることを証明し、これを *Analytical Chemistry* に発表することができた⁽⁷⁾。この研究でわかったことは、mRNA display のように合成したタンパク質の近傍に mRNA が存在すると本来の K_d 値より一桁程度高めにでるということであった。これは mRNA が立体障害的に分子間相互作用を阻害していると考えられる。これは当時修士課程の福島貴之君が主に行ってくれた仕事である。

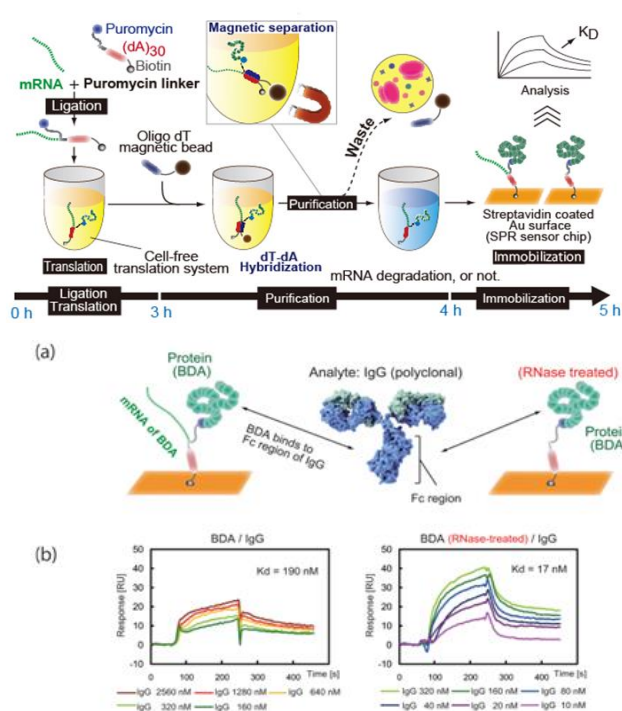


図 9 表面プラズモン共鳴装置用ピューロマイシン・リンカー (上), これを用いた分子間相互作用の結果 (下) (N. Nemoto, et al., *Anal.Chem.*, 86 (17) 8535-8540, 2014)より

7. cDNA display と生命の起源

冒頭でも述べた通り、そもそも研究の世界に足を踏み入れたのは生命の起源を研究したかったからである。しかし、大学では実際に学生が実験を担っていることが多い。工学部の学生が生命の起源に興味をもってもらうことは極めて難しいと思ったが、幸いにも後に博士課程に進む熊地重文君が興味を持ってくれたことは有難かった。熊地君は cDNA display 法を自家菜籠中に扱うことができたため、生命の起源で有名なミラーの実験で最初に地球上に誕生したであろう 4 種類のアミノ酸 (グリシン, アラニン, アスパラギン酸, バリン) でできた (ランダム) ペプチドライブラリで RNA (tRNA) に結合するものがあるか、つまり、RNA とは中性で静電相互作用しない 4 種類のアミノ酸から成るペプチドで RNA を認識できるのかという実験をしてくれた。この結果は驚くべきものであった。この単純なアミノ酸からなるペプチドでも一本鎖 RNA の 3 塩基部分の塩基の違い (プリンかピリミジンかの違い) を見分けることができるということであった⁽⁸⁾。これはいきなり 20 種類のアミノ酸からなるペプチドがなくとも、少数のアミノ酸の種類から機能あるペプチドが RNA の相互作用の中から生じる可能性を示唆している。ハイパーサイクルでアミノ酸を最初から 20 種類揃える必要はなく、漸進的にアミノ酸の種類を増やしていけることが

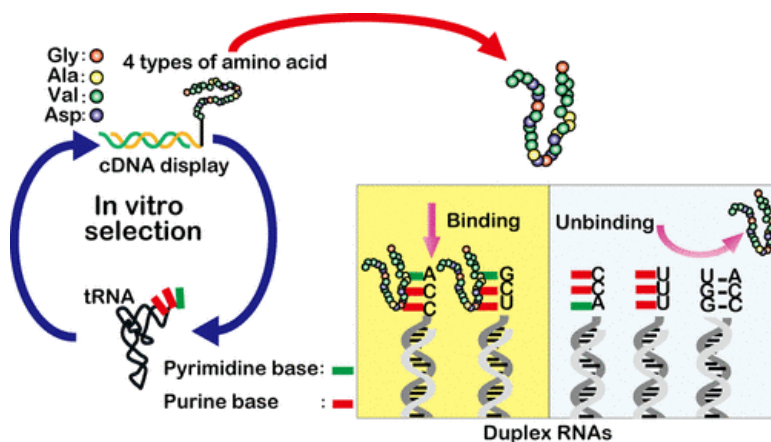


図 10 tRNA に対する cDNA display による in vitro selection. 最も化学進化の初期に出現したと思われる 4 種類のアミノ酸からなるペプチドライブラリから tRNA の 3' 側の 1 本差部分に相互作用するペプチドが取得された。

(S. Komachi, et al., *ACS Omega*, 1(1), 52-57, 2016)より

わかる。

この他にも、細胞に必要な脂質膜とペプチドの相互作用についても cDNA display を用いてリポソームに対して in vitro selection を行い、20 残基程度のランダムなペプチドライブラリの中からリポソームに結合するものがあるかどうかを調べた。この実験は当時修士課程の小林省太君が行ってくれた。リポソームは DOPC (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) である。選択されたペプチドはリポソームに静電相互作用する塩基性アミノ酸からなる C 末端側と疎水性アミノ酸からなる N 末端側をもつもので LB-1 と名付けた。LB-1 はまず中性では負電荷をもつリポソーム表面に C 末端側の部分が塩基性のため静電相互作用するものと思われる。リポソーム上で分子運動している間に N 末端側の疎水性部分が一旦膜の中にもぐりこむと簡単には疎水性部分は表面部分に戻ってくることは熱力学的に難しいと思える⁽⁹⁾。

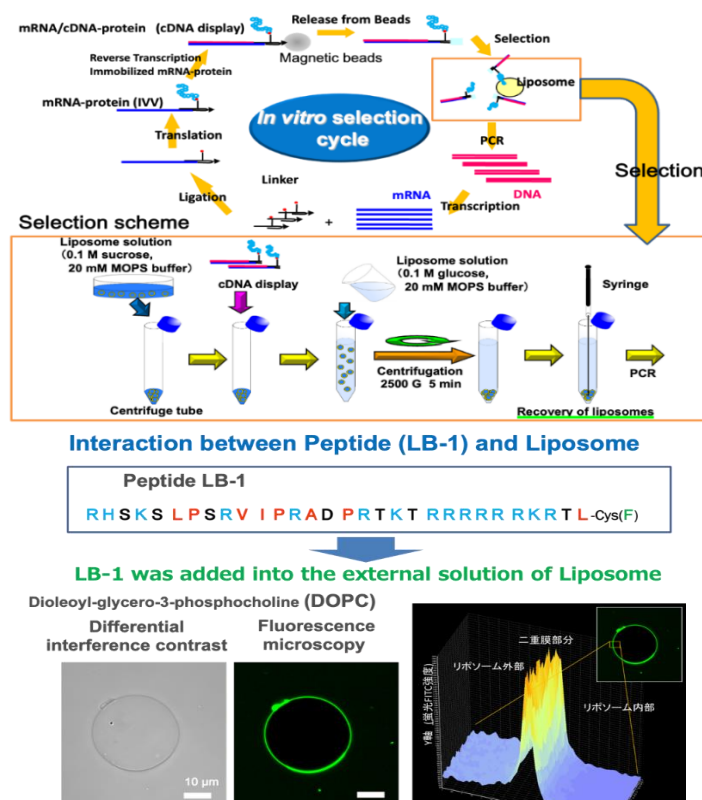


図 11 リポソーム (DOPC) に対して cDNA display による in vitro selection を上図のように行い、その結果、下図のようなリポソーム結合ペプチドが得られた。

8. 超高感度検出— cDNA display-mediated immuno-PCR (cD-iPCR)

1992 年名著“Biophysical Chemistry”の著者 Cantor CR 博士が Science に Immuno-PCR という画期的な検出法を発表した。当時ようやく実用化されてきた PCR と抗体を結びつけ、高感度検出を可能にする方法であった。原理は単純で抗体に DNA を化学架橋させることで、抗原と反応させた後に洗浄して非特異的結合を除き、この DNA を PCR すれば、例え抗原が 1 分子しかなくても原理的には検出が可能である。

ただ、この方法には 1 点課題がある。DNA は抗体のリジンのアミノ基に共有結合させるが、抗体にはリジンが複数存在するため抗体に DNA を 1 本だけ固定化することが難しい。固定化する DNA にバラツキが生じるため定量的でなくなる。この課題を解決するのに元々 DNA とタンパク質が 1 対 1 対応している cDNA display は最適な形体をしていると考えた。ただし、cDNA display には通常の抗体を提示することはできない。そこで、後に述べるラクダ科由来の VHH 抗体であれば無細胞翻訳系でも十分に合成可能なため、実用化できるのではないかと考えた。この研究には寺井先生、安西君、これを小麦アレルゲンであるグリアジンに応用した Chathuni さんたちが協力いただいた⁽¹⁰⁾。原理は簡単であるが、実際にやってみると非特異的吸着があるため、これをどのように押さえるかが課題となる。また、PCR 装置を使うとなるとどこでも実施可能というわけにはいかない。そこで、特に高価な PCR 装置を必要としない等温 PCR 法と結びつけて 60℃で数十分温めれば検出ができるようにしたいと考えた。これは現在、山下純平君が取り組んでいる。これができればこの技術がより簡易に様々な検査・検出に使えるのではないかと考えている。

9. VHH 抗体の cDNA display スクリーニング

2014 年当時使っていた無細胞翻訳系はウサギ網状赤血球由来のもので cDNA display ではそれほど

大きなタンパク質を翻訳することはできなかった。そのため、主に機能ペプチドの取得を目指して研究を行っていた。しかしある企業との共同研究で抗体の一部分である scFv (single-chain variable fragment) でスクリーニングができないかという話があった。そこで、実際に実験したもののやはり合成量が少なく効率に課題があった。一方、進化分子工学では抗体に代わる新しい抗体様認識タンパク質(一般にスキヤフォールドという)の研究が盛んであった。医薬品として考えた場合、単に結合力だけでなく免疫原性や生産性も問題になる。そのような条件を満たすものとして最近注目されてきたのがラクダ科由来の VHH 抗体であった。VHH 抗体はシングルドメイン抗体と呼ばれることもある。つまり大きさがドメイン程度でアミノ酸 110 残基程度である。そのため、リフォールディング能が高く、熱安定性も高く、発現も微生物で可能である点など利点が多い。そこで VHH 抗体のライブラリを作る必要があるが、ラクダの血液から mRNA を取り出して VHH ライブラリを作製するには時間もコストもかかるため、論文を参考に人工合成で VHH ライブラリを考えた。これを使った VHH 抗体のスクリーニングを担当してくれたのは、現在リコーで活躍している鈴木武尊君である。この研究でわかったことは VHH 抗体が天然のラクダ科動物から直接採取した VHH 抗体でなくともしっかり抗原に結合するものが作れるということであった⁽¹¹⁾。VHH 抗体は人工的な改変が可能な自由度の大きいモデルタンパク質ではないかということである。後に埼玉大学発ベンチャーの Epsilon Molecular Engineering (EME) 社を立ち上げた際に、この VHH 抗体を次世代抗体として最も有望な分子として考えた所以である。

10. 新学術領域「分子ロボティクス」

2012 年に「感覚と知能を備えた分子ロボットの創成」を旗頭に多士済々の研究者が集まった。今にして思うとよくあれだけの多様性のある研究者を一つにまとめ上げたものと総括班の先生方に改めて敬意を表したい。私が大学教員になって良かったと思ったことの一つは普段であれば決してお会いできない先生方とお会いして自由にディスカッションする機会をいただいたことだった。二ヶ月に 1 度ある研究会と年に 1 回の合宿は企画が大変だったと思うが、良い思い出になった。また、思いもかけず素晴らしい先生方との共同研究に結実し、有意義な研究をさせていただいた。

その最初の例は北陸先端技術大学院大学 (JAIST) の藤本健造先生との出会いだった。藤本先生は核酸を世界一長波長の光で光架橋する優れた特殊塩基 (cnvK) の開発をされていた。核酸アプタマーは進化分子工学のテーマでもあるため、進化工学に使える可能性を打ち合わせに浦和まで訪ねてきてくれたのが最初であった。これが後に私自身の人生にも大きな影響を与える EME の起業にもつながることになるとは当時は予想もしなかった。In vitro virus (mRNA display) のときから cDNA display になっても、依然として mRNA とピューロマイシン・リンカーとの連結 (ライゲーション) は T4 RNA ligase を用いたものであった。T4 RNA ligase でも短時間 (10 分程度) で連結できるようになったが、酵素反応のひとつの欠点は精製または使用後の除去などが必要なことである。cDNA display の産業化には自動合成装置等が必要になるが、酵素を使うとなると精製・除去のほかに酵素を保存する冷蔵装置も必要になるため、装置が複雑で高価になる。藤本先生の開発した cnvK は 380 nm の近紫外線を数秒当てるだけで二重鎖核酸の塩基同士を共有結合させることができる。これによって cDNA display が酵素を使わずに 1 分で連結できることがわかった⁽¹²⁾。これを使って産業化 (実用化) できるという確信を持つことができた。EME 設立への大きな一歩であった。

また、当時、東京大学薬学部の助教だった寺井琢也先生 (現在、東大理学部化学科准教授) が日本学術振興会のグラントを取得して、東大を辞めて研究員として埼玉大で研究することになったのも、この新学術領域での出会いが切っ掛けであった。寺井先生は短期間に cDNA display 法を自家薬籠中にして、新規のペプチド関係の研究を中心に、私がなかなか忙しくてまとめ切れていない研究を論文化していただいた⁽¹³⁾。ケミカルバイオロジーの観点から独自の cDNA display 法の利用を考えていただけるのでは

ないかと期待しているところである。

東京農工大学工学研究院教授の川野竜司先生とも楽しく共同研究させていただいた。交互に研究室を行き来し、学生も参加しながらリポソームに人工チャネルをペプチドで作る研究をしていた。面白い結果がでてきたにも関わらず、私の方が忙しさにかまけて論文化を怠っていていまだに論文にまとめないで来ている。何とかまとめなくてはと思っている次第である。

他にも名古屋大学の瀧口金吾先生とはやはりリポソーム結合ペプチドの研究でご協力をいただきました。いつも鋭い本質を突く質問をされていて、研究者としていつも感心しております。

東工大の小長谷明彦先生、瀧ノ上正浩先生、北大の角五彰先生、JAISTの平塚祐一先生、東北大の村田智先生、野村慎一郎先生、関西大の葛谷明紀先生、鳥取大の松浦和則先生そして、東京大の萩谷昌己先生、豊田太郎先生といった錚々たる先生方といろいろ議論できたことは私の研究生活の中でも本当に楽しい思い出となっております。

最後に名古屋大学の浅沼浩之先生とは現在も基盤 S「非環状型人工核酸による人工遺伝システムの創成とその進化分子工学への応用」というテーマで共同研究をさせていただいている。この研究にはすでに卒業した瀧澤佐恵さん、博士課程の井上遥晶君、修士の数野智成君、卒研究生芝美彩子さんが参加してくれている。お会いした当初、浅沼先生はバリバリの特殊核酸が専門の化学者という認識だった。しかし、いろいろお話しているうちに生命の起源にも興味をお持ちということで、RNA ワールドの前にプレ RNA ワールドがあったのではないかという仮説を共同研究によって実証することになった。思いがけず、生命の起源研究にも結び付く研究ができることになった。

11. Epsilon Molecular Engineering (EME) 社の起業

藤本先生の *cnvK* を用いたピューロマイシン・リンカーは効率良くスクリーニングが可能になっただけでなく、化学プロセスとして酵素のような生化学反応をプロセスから減らすことができた。そのため自動合成によって大量に短時間で合成できる可能性が広がった。伏見先生は「進化分子工学は数が勝負」と言われているが、いかに大きな配列空間の探査ができるかがカギとなる。そのような意味では一度に自動的に合成して大量の *cDNA display* を合成できるようになることは産業化には重要である。

しかし、このような原理的に確立した技術で大量合成する装置を研究したい場合、基礎科学的な観点をもつ文科省の科学研究助成金に申請しても採択される確率は低い(少なくとも自分の文章力では書けそうもない)。また、企業との共同研究は複数いただいたが、共同研究だけではチャレンジングな大学本来の研究ができなくなる。学生にとっては試行錯誤の練習ができないことが問題だと感じていた。さかのぼると伏見先生が研究統括としてスタートした埼玉バイオプロジェクトは埼玉県、JST など国や県の税金を使って 10 年以上に渡って実用化を進め、完成したのが *cDNA display* である。しかし、2015 年に埼玉大学で私が教授になった際に助教を採用できないことがわかった。大学の運営費削減等の問題もあろうかと思うが、実際このままでは埼玉大学ではかなりの資金を投入して完成した *cDNA display* 技術が継承できないことが明らかになった。

いろいろ考えた結果、このタイミングでベンチャーを起業し、そこで更なる技術の磨き上げと応用研究をすべきと決断した。これが EME 創業当時の状況であった。

さて、そう決めたのは良いが具体的にどのように進めたら良いか。埼玉県・さいたま市の創業セミナーに参加したり、オープンイノベーションセンターの小林裕一先生に相談したり、いろいろ手探りでスタートであった。そもそも埼玉大学ではベンチャー支援といったしくみもないため、大学スタートアップが叫ばれる昨今であるが、資金調達の方法も含めガイダンスできる体制が望まれる。

EME について語り始めるとかなりの長さになるため、ここでは関わっていただいた主な方々を中心に要点だけでとどめたい。

伏見研究室 OB で弁理士の柴田富士子先生には士業(弁護士, 弁理士等)の方々を紹介いただき、会社立ち上げに必要な作業をサポートいただいた。また、鍵山直人氏には EME の名目上の社長として立ち上げに協力いただいた。伏見研究室 OB の新井秀直博士が社員第 1 号として参加してくれ、研究員としては根本研のドクターであった熊地重文君が参加してくれることになった。このように大学の伝統ある研究室というのは人脈という見えない強みがある。また、西山哲史氏、篠澤裕介氏など、リバネスの皆さんには大学にはない「会社の作り方、事業の起こし方」のノウハウをたくさん教えていただいた。おそらく、リバネスの援助がなかったらスタートアップとしての船出は難しかったのではないかと思う。リバネスが立ち上げたリアルテックファンドで、更に丸幸弘氏、ユーグレナの永田暁彦氏とも出会い、大学の世界だけでは知りえない、新しいスタートアップの世界に足を踏み入れることになった。

スタートアップは技術によって社会を、ひいては世界を変えることが使命だ。当初は中小企業のオヤジをイメージしていたが、いつのまにか cDNA display を創薬も含む様々な産業に役立てたいという大志を持ち始めた。

さて、cDNA display は分子スクリーニング技術である。ここでいう分子はペプチドやタンパク質になるが、どのような分子のライブラリを作製しスクリーニングするかが問題となる。設立当時、進化分子工学をテーマに新学術領域を立ち上げるための勉強会(ネオバイオ分子研究会)でラクダ科動物由来の VHH 抗体ライブラリを作製してファージディスプレイでスクリーニングしている村上明一先生(当時琉球大学)とお会いした。村上先生は所有する VHH 抗体のライブラリ多様性が 10^{14} 程度まであるライブラリを、天然のアルパカ由来のライブラリを改変して作られていた。しかし、この多様性をファージディスプレイでカバーするのは難しいため、cDNA display でスクリーニングした後、ファージディスプレイでスクリーニングしてはどうかと考えるべきだった。そこから、VHH 抗体のライブラリを EME に提供していただくことになり、本格的な cDNA display による VHH 抗体のスクリーニング体制が作られた。また、スクリーニングの際はもう一つ重要な問題がある。それは何を標的とするかである。創薬ターゲット分子はいろいろあるが、抗体医薬におけるペイン(痛み;課題のこと)は何かと考えたとき、膜タンパク質、特に GPCR(G protein-coupled receptor)という 7 回膜貫通タンパク質の抗体が作れないことだとわかった。EME にとって幸いだったのは、埼玉大学にこの GPCR をナノディスクという小さなディスク状の脂質膜に無細胞翻訳系を用いて埋めることができる技術を理学部の戸澤譲先生がお持ちであったことである。お二人の先生のご協力の下で EME はいわゆる創薬プラットフォームを作る準備ができたのである。EME には他にも当時埼玉大学におられた中井淳一東北大学教授や最初の GPCR をクローニングした久保泰先生などが科学顧問として参画していただいた。

それでは、この創薬プラットフォームで具体的にどのような創薬をしていくか。

次に創薬のためには専門家が必要ということで、中外製薬で日本初の抗体医薬アクテムラを開発した土屋政幸博士に EME に参加していただくことが必須と考えた。土屋博士は伏見研究室 OB でもあり、埼玉大学出身者でもある。そのため、埼玉大学、EME のため cDNA display と VHH 抗体を使って新しい創薬に挑戦いただいた⁽¹⁴⁾。

現在、EME は埼玉大学発認定ベンチャーとしてオープンイノベーションセンター内で事業活動中である。

12. 日本抗体学会の設立

2014 年頃から進化分子工学の新学術領域研究の立ち上げを目的にネオバイオ研究会を立ち上げた。発起人の主なメンバーには、大阪府大の藤井郁雄先生、鹿児島大の伊東祐二先生、東北大の梅津光央先生、東工大の上田宏先生、当時大阪大(現、東工大)の松浦友亮先生、産総研の萩原義久先生などであった。いずれも進化分子工学を実際に行っている先生方で、後に VHH 抗体でお世話になる当時

琉球大の村上先生ともこの研究会が縁となった。2 回ほど「ネオバイオ分子」ということで新学術領域のグラントに提案したものの残念ながら採択には至らず、この研究会は終わったかに思えた。

2019 年 12 月、アメリカのサンディエゴで行われる The Antibody Society に参加した際にたまたま鹿児島大の伊東先生も参加されていた。日本からも中外製薬をはじめとする主な製薬企業が参加していた。私は初めて世界レベルの抗体医薬研究に触れて、日本の遅れに危機感を感じた。帰りの飛行機で伊東先生と一緒にいた際に、このような学会が日本にないためにサンディエゴまで来なくては行けない現状を嘆いた。

その後、世界は 2020 年に入り、コロナウイルス感染の危機に怯える時代に突入した。その結果、もはやサンディエゴさえも簡単に行けない状況が出現した。日本の抗体医薬研究はますます世界から孤立するように思えた。そこで、ネオバイオ研究会での流れで伊東先生や村上先生、梅津先生に日本抗体学会の必要性についてお話したところ、賛同をいただき、上田先生や萩原先生にも加わっていただき、準備委員会を立ち上げて、2022 年 4 月に正式に日本抗体学会が設立され、12 月には伊東先生が大会委員長を務められ第 1 回記念学術大会が鹿児島大で開催された。研究発表はいずれもレベルが高く、世界的にも決して引けを足らない水準であった。互いに研究を共有し刺激をしよう場がなかったことが日本のバイオ医薬の遅れの理由の一つではなかったかと改めて思われた。

現在、日本抗体学会の会員数は 1000 名を数え、学会として十分に存在感がある形になったと思っている。

13. 生命の起源学会

私がそもそも 30 歳を過ぎてから研究の世界に足を踏み入れたのは生命の起源を研究したかったからであった。そのため、最初に参加した学会も 1993 年に信州大学で開催された生命の起源及び進化学会に参加人数も 50 人程度の小さな学会であったが、私は大満足であった。伏見先生もわざわざ私を連れてくるために 1 日目だけ参加して日帰り出張していただいた記憶がある。当時は博士課程の学生が少なかったが生命の起源を研究して博士号をとるといったことは、将来のことを考えるとさらに少なかった。しかし、日本の生命の起源を研究する著名な先生方が集まっていたため、とてもアカデミックな雰囲気に浸ることができた。一方、若い人たちがいないことには少々寂しい感じがしたものである。

当時、この学会で知り合った若手の朝原治一氏(当時、宇宙研、現在 NEB)とは *in vitro virus* の可能性を実験的に調べるために、mRNA の 3' 末端側に sup tRNA をつけて、これにアラニン tRNA 合成酵素により RI ラベルしたアラニンを付加させ、無細胞翻訳系の中で合成させた際にラベルされたペプチドが合成されるかどうかを実験するアイデアが、この学会中、朝原さんとのランチを食べながらの議論でできた。そして、実際に宇宙研から酵素をいただき、三菱生命研の RI 室で実験したのが懐かしい。同じ清水幹夫研究室の田村浩二先生とはこの後 10 年以上経て、いろいろお話しする機会を得た。

そして、当時大阪府大の川村邦男先生や帝京大の平林淳先生と知り合うことができ、また横国大の小林憲正先生、奈良女子大の池原健二先生、東京薬科大の山岸明彦先生ともお会いできていろいろと議論できたのは本当にありがたく、特に 2018 年の「生命の起源および進化学会第 43 回学術講演会」を埼玉大学で開催できたのは、小林先生、山岸先生にいろいろお知恵を拝借させていただいたお蔭である。生命の起源研究に憧れて研究の世界に足を踏み入れ、この学会を自分で開催できたのは自分にとっては感慨深いものがあった。

14. 終わりに

ここまで書いて、最初は研究について書き始めたものの、途中からベンチャー起業のことや学会設立のことになり、研究とは密接に関わるものの研究そのものではない話になってしまった。しかしながら、これ

も元をたどれば研究を発展させたいという気持ちから始まったことであった。大学研究の社会実装というスローガンが叫ばれて久しいが、それを実際に実現することの難しさも痛感している。

さて、ここで最近の cDNA display の研究の話題に戻ってみたい。

mRNA display を安定化した cDNA display まで各プロセスの効率化を一つ一つ解決し、開発したものの最終収率は 10%程度で、何とか使いこなすことができる段階であった。これ以上の収率は難しいと諦めかけた頃、埼玉大理学部の戸澤譲先生が再構成型無細胞翻訳系 (PURE system) で組成を検討し、この効率を上げることを提案いただいた。最終的に、現在は 60%まで収率が向上し、今までライブラリの大部分を無駄にしていた状況を克服できるようになった。更に無細胞翻訳系そのものの合成効率の向上によって、ペプチドやドメインレベルのタンパク質だけでなく酵素等の標準的なタンパク質の進化工学にも貢献するものと期待している。また、戸澤研出身の鈴木翔君には EME に入社後、cDNA display 法のプロセス改良に地道に取り組んでいただいた御蔭で、トータルに極めて再現性の良い効率的な cDNA display 合成プロセスが完成できた。cDNA display 法の社会実装の準備ができたといってよい。また、EME 社から提供したピューロマイシン・リンカーを用いて当時ノースウェスタン大学でポスドクをしていた坪山さん (現在、東大先端研) のグループがランダムなポリペプチドのフォールディングについて研究した成果を Nature 誌の article に発表してくれた⁽¹⁵⁾。今後も埼玉大学発の cDNA display 技術が世界的に利用され、科学、産業の発展に役立つことを心から祈念している。

謝辞

まず、このような執筆の機会をいただいた、また、日頃から研究の必要な機器の管理をいただいている科学分析支援センターの皆様に感謝申し上げます。

そして、大学院時代から薫陶を受けた伏見譲先生、また西垣功一先生にはいつも科学的議論で啓発を受けました。鈴木美穂先生には研究室運営でお世話になり、何とか埼玉大学での教育・研究を続けることができました。他にも松岡浩司先生を始めとして多くの先生方にお世話になっておりますが、ここでは割愛させていただきます。

最後に、根本研究室で卒研・修士・博士課程を共に過ごした学生諸君。本当に有難うございました。各人の氏名をここに載せられませんが、皆さんの協力の下で研究が少しずつ形になり、世の中に役立てることができるまで来ました。皆さんが、社会に出てそれぞれに活躍されることを心より祈っております。

参考文献

- (1) Y Husimi, K Nishigaki, Y Kinoshita, T Tanaka, *Rev Sci Instrum*, 53, 517-522 (1982)
- (2) N. Nemoto, Y. Husimi, *J. theor. Biol.* 176, 67-77 (1995)
- (3) N. Nemoto, E Miyamoto-Sato, Y Husimi, H Yanagawa, *FEBS Lett.*, 414, 405-408 (1997)
- (4) J. Yamaguchi, M. Naimuddin, M. Biyani, T. Sasaki, M. Machida, T. Kubo, T. Funatsu, Y. Husimi, N. Nemoto, *Nucleic Acids Res*, 37, e108 (2009)
- (5) Y. Mochizuki, F. Kohno, K. Nishigaki, N. Nemoto, *Anal. Biochem.*, 434, 93-95 (2013)
- (6) Y. Tanemura, Y. Mochizuki, S. Kumachi, N. Nemoto, *Biology (Basel)*, 4, 161-172 (2015)
- (7) N. Nemoto, T. Fukushima, S. Kumachi, M. Suzuki, K. Nishigaki, T. Kubo, *Anal Chem.*, 86, 8535-8540 (2014)
- (8) S. Kumachi, Y. Husimi, N. Nemoto, *ACS Omega*, 1, 52-57 (2016)
- (9) S. Kobayashi, T. Terai, Y. Yoshikawa, R. Ohkawa, M. Ebihara, M. Hayashi, K. Takiguchi, N. Nemoto, *Chem Commun*, 5, 3458-3461 (2017)
- (10) H. Anzai, T. Terai, C. Jayathilake, T. Suzuki, N. Nemoto, *Anal Biochem*, 578, 1-6 (2019)

- (11) T. Suzuki, Y. Mochizuki, S. Kimura, Y. Akazawa-Ogawa, Y. Hagihara, Nemoto N, *Biochem Biophys Res Commun*, 503, 2054-2060 (2018)
- (12) Y. Mochizuki, T. Suzuki, K. Fujimoto, N. Nemoto, *Journal of Biotechnology*, 212, 174-180 (2015)
- (13) H. Anzai, T. Terai, K. Wakabayashi-Nakao, T. Noguchi, S. Kumachi, M. Tsuchiya, N. Nemoto, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 12, 1427-1434 (2021)
- (14) R. Yonehara, S. Kumachi, K. Kashiwagi, K. Wakabayashi-Nakao, M. Motohashi, T. Murakami, T. Yanagisawa, H. Arai, A. Murakami, Y. Ueno, N. Nemoto, M. Tsuchiya, *J Bio Chem*, 299, 102804 (2023)
- (15) K. Tsuboyama, J. Dauparas, J. Chen, E. Laine, Y. Mohseni Behbahani, J. J. Weinstein, N. M. Mangan, S. Ovchinnikov, G. J. Rocklin, *Nature*, 620, 434-444 (2023)