

# 進化分子工学のロボット化とマイクロリアクターへの展開

徳島大学・工学部・生物工学科  
伊藤嘉浩

## はじめに

コンビナトリアル化学は、網羅的にランダムに合成した分子ライブラリーから標的分子を認識する分子を探し出すという方法である。欧米では 80 年代後半から研究例が報告されはじめ、90 年以降特に活況を呈するようになった。<sup>1-6)</sup> Merrifield の固相合成法から発展し、ランダムに作製する分子ライブラリーの対象はペプチド、核酸、そして有機分子へ拡張されてきた。基本的には「いかに網羅的に様々な分子ライブラリーを構築するか」と「膨大なライブラリーの中からごくわずかの目的とする分子をいかに探し出すか」が、課題となる。

## 進化分子工学とは

コンビナトリアル化学の中で、進化分子工学は、「試験管内進化法」、英語では *in vitro* selection, *in vitro* evolution, あるいは Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment の下線部をとって SELEX と呼ばれる。その特徴はダーウィン進化論と類似した手法で分子進化をさせるという点で、主に分子生物学者を中心に研究が進められてきた。ダーウィン進化論は、生物の進化は「突然変異」、「自然淘汰」、「増殖」の 3 つの過程を繰り返して行われてきたとしている。そこで、この 3 つの過程をランダム配列の核酸分子ライブラリーの合成、アフィニティ選別、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法による増幅で置き換えたのが進化分子工学である (図 1)。他のコンビナトリアル化学と異

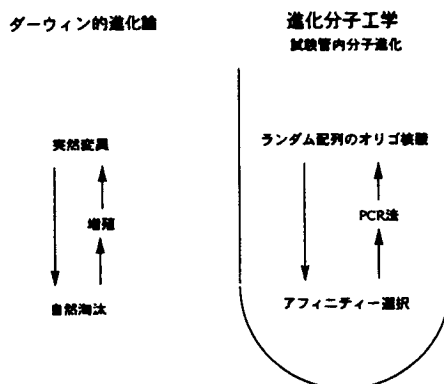


図 1 進化分子工学の原理

なる点は、核酸分子を用いるので PCR 法での増幅が可能であることである。また、ファージ・ディスプレイのような生物そのものを用いるわけではないので、後述するように非天然成分を構成単位として用いることができる特徴がある。PCR 法は 80 年代後半に Mullis 博士が考案したもので、核酸分子を無生物的に酵素だけで無限に増幅させることで、DNA 鑑定などにも威力を発揮しており、発明から数年後にノーベル化学賞が授与されている方法である。進化分子工学では、コンビナトリアル化学の課題の一つ「膨大な分子群の中から、いかにごくわずかの目的の分子を探すか」を、増殖という方法で容易にクリアできる利点がある。また、この過程をサイクルし、繰り返すことにより、より目的に合った分子を S/N 比を高めるように選び出すことが可能となる。この方法で選び出された核酸分子は「適合」を意味するギリシア語、apt から aptamer (アプタマー) と呼ばれる。

### アプタマー探し

1990 年に Nature と Science に 2 つのグループから、進化分子工学が報告された。<sup>7,8)</sup> そして 1992 年になるといくつかの有機染料を特異的に認識できる核酸分子がアプタマーとして選別された。以後、数多くのアプタマーが見出されるようになった。<sup>9)</sup>

ここでは臨床分析化学の上で非常に重要な甲状腺ホルモンのひとつチロキシン (T<sub>4</sub>) 1 を標的として認識するアプタマーを探した我々の研究例を紹介する。<sup>10)</sup> 上述の 3 過程を繰り返し、標的分子に結合する核酸分子の割合を図 2 に示す。繰り返し回数の増加に伴い、チロキシンに結合する核酸分子が増加した。ランダム配列で合成した核酸分子のライブラリーの中には、殆どチロキシン分子と結合するものはないが、選択過程の繰り返しによって、チロキシンに適合するアプタマーだけが選別されてくることになった。しかし、この段階では、まだ、核酸分子は様々な配列をもったものの集まりである。そこで、クローニングという操作後、

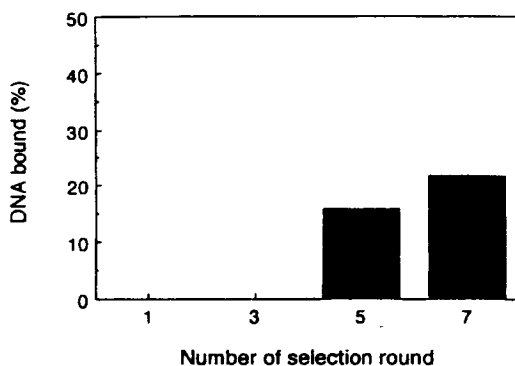
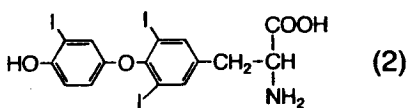
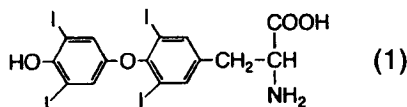


図 2 選別サイクルと結合率の関係



なるだけのリオチロニン (T<sub>3</sub>) 2 のような化合物を厳密に識別して結合しなかった。同様な方法で、葉酸や抗ガン剤メトトレキセートを標的分子としたアプタマーも見出されている。<sup>11,12)</sup>

## 進化分子工学の展開

このようなアプタマーの探索から始まった進化分子工学では以下のような進展が見られる。

1994 年頃から、単なるホスト・ゲスト化学でなく、触媒作用をもつオリゴ核酸を発見、開発する方法として用いられるようになってきた。進化分子工学の研究は、生体分子は遺伝機能と触媒機能を併せ持つ RNA から始まったという RNA ワールドの検証という意味で始められた経緯がある。最近では、新型の Ribozyme (リボザイム) や、DNAzyme も発見され、天然ではまだ発見されていない核酸分子の触媒作用も見つかってきている。<sup>13,14)</sup> また、抗体触媒から容易に連想できるように、遷移状態アナログを標的分子にして触媒活性のオリゴ核酸を用いようとする研究も報告されている。<sup>15)</sup>

また前述のように、進化分子工学では酵素反応を利用しているため、これまで天然核酸を用いて行われてきた研究を有機化学で合成した非天然核酸へ拡張することができる。<sup>16,17)</sup> 天然の核酸は 4 種類と限られ、官能基の種類もタンパク質に比べると少ない。アミノ酸のような官能基を導入した核酸を用いたり、超酸や超アルカリ性の官能基を入れたり、刺激に応答するような官能基を入れたりすることにより、様々な機能をアプタマーに導入でき、これまでとは全く異なるホスト分子や触媒分子が得られてくると予想される。非天然核酸を用いた進化分子工学で新しい触媒作用を有する核酸誘導体分子を見出した報告は既に現れ<sup>18)</sup>、現在、我々も、アミノ基やビオチニル基を側鎖に有するオリゴ核酸から高分子触媒や高分子センサーの選択に成功している。

最後に、ロボット合成により、各種分析用の抗体の代替物としてルーチンで用いられるようになる試みが行われつつある。<sup>19,20)</sup> このロボット化が進めば、抗体を得るために動物を用いる必要はなくなり、固相法で大量のアプタマーが合成でき、安定性も高い等の特徴がある。また、PCR 法のマイクロ化や、DNA チップのようなマイクロデバイスが可能になってきたので、マイクロリアクターやマイクロ・トータル・アナリシス・システム ( $\mu$ TAS) への展開も期待される。

## 最後に

バイオテクノロジーや固相法の進歩は、我々に生体由来の高分子化合物を精密に合成できる実際的手段をもたらすとともに、これまでラマルク的進化論の方法論で研究をすすめてきた化学の研究に、コンビナトリアル化学のようなダーウィ

ンの進化論に基づく研究法をももたらし始めている。ロボット合成は、この研究法に大きな役割を果たすことが期待される。既存の生体分子を模倣し、それをシステム化することを一つの課題としてきた化学から、生物の「進化」というストラテジーをも模倣し、今度は生物進化とは別の化合物を人工的に作り、生物を超えて新しい化合物を合成する化学がいよいよ始まった。

#### 引用文献

- 1) 伊藤嘉浩、海外高分子研究、40, 189 (1994)
- 2) 伊藤嘉浩、高分子、44, 28 (1995)
- 3) 伊藤嘉浩、インテリジェント材料、5, 6 (1995)
- 4) Y. Ito, "Polymeric Materials Encyclopedia," ed. by C. J. Salamone, CRC Press, Boca Raton, pp. 4473-4481 (1996)
- 5) 伊藤嘉浩、高分子、47, 407 (1998)
- 6) Y. Ito, et al., Methods Enzymol., in press (1999)
- 7) A. D. Ellington and J. W. Szostak, Nature, 346, 81 (1990)
- 8) C. Tuerk and L. Gold, Science, 249, 505 (1990)
- 9) A. D. Ellington and J. W. Szostak, Nature, 355, 850 (1992)
- 10) N. Kawazoe, et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 71, 1699 (1998)
- 11) N. Kawazoe, et al., Anal. Chem., 68, 4309 (1996)
- 12) Y. Ito, et al., Bull. Chem. Soc. Jpn., 70, 695 (1997)
- 13) R. R. Breaker and G. F. Joyce, Chem. Biol., 2, 655 (1995)
- 14) B. Cuenoud and J. W. Szostak, Nature, 375, 611 (1995)
- 15) J. R. Prudent, et al., Science, 264, 1924 (1994)
- 16) 伊藤嘉浩、化学、53, 66 (1998)
- 17) Y. Ito, et al., J. Bioact. Comp. Polym., 13, 114 (1998)
- 18) T. M. Tarasaw, et al., Nature, 389, 54 (1997)
- 19) N. Kawazoe, et al., Biotechnol. Prog., 13, 873 (1997)
- 20) Y. Ito, et al., Anal. Chem., 70, 3510 (1998)