

加速型生物機能構築技術（タイムマシンバイオ）プロジェクトの誕生

旧生命工学工業技術研究所

中村 吉宏

要約

経済産業省工業技術院産業科学技術研究開発制度の平成 7 年度新規事業「加速型生物機能構築技術（タイムマシンバイオ）プロジェクト（以下「本 PJ」）」の誕生経緯と成果について、30 年前の資料と記憶に基づいて記述した。本 PJ の技術的背景は、進化分子工学である。地球上に生命が誕生して 40 億年経過する過程で、生物は、突然変異と淘汰（選択）を繰り返してきた。この進化のプロセスを実験室内で人工的に加速し、優れた機能をもつ新規な高分子を創出する技術体系である。別の言い方をすれば進化実験系の構築と言える。平成 4 年度（筆者：微生物工業技術研究所の研究企画官時代）に勉強会がスタートし、平成 5 年度（筆者：同所生物反応工学部長）は、平成 6 年度先導研究の要求作業及び進化分子工学分野の先進的研究を展開している米国の大学・ベンチャー企業の研究状況調査のため JETRO 海外調査事業を遂行した。平成 6 年度は、先導研究の実施と併せて、本 PJ を平成 7 年度新規事業に押し上げるべく概算要求作業に注力した。平成 7 年度から本 PJ がスタートし、平成 13 年度に終了した。

はじめに

本稿では、平成 5 年 1 月、筆者が工業技術院生命工学工業技術研究所生物反応工学部長に就任して以降、コーディネータ役として「加速型生物機能構築技術（タイムマシンバイオ）」プロジェクトの誕生に関与した経緯及びプロジェクトの実施・成果について記述する。一部は、研究企画官時代に、本 PJ の準備段階に関与した内容も含む。本 PJ の期間は平成 7～13 年度（1995～2001 年度）の 7 年間で、筆者は当初の 2 年間関与したが、その後岡山県に出向したため、本 PJ の 3 年目以降の経緯（成果を含む）には関与していない。したがって、本 PJ の平成 9 年度（1997 年度）以降の経緯及び成果に関しては、関係資料に基づいて記述した。何せ 30 年も前の事柄であり、資料が散逸し記憶が定かでない部分もあるが、当時のナショプロ成立過程の一典型例として記録に残しておく意義はあるのではないかと、という一念で執筆に取り掛かることにした。

第 1 章ではプロジェクトの概要を説明し、第 2 章では本 PJ 開始の前々年度に実施した米国調査の調査団結成から報告書作成までを記述し、第 3 章では本

PJ 開始の前年度に実施した平成 6 年度先導研究事業について述べ、第 4 章では本 PJ の要求作業の経緯及び第 1 期の成果について記述し、第 5 章では本 PJ の第 2 期の成果について述べる。

なお、本文の途中に“トピックス”欄を設け、裏話的な話題を提供した。

第1章 本プロジェクトの概要

1. 加速型生物機能構築技術の概念

本プロジェクトの概念図を図 1 に示す。

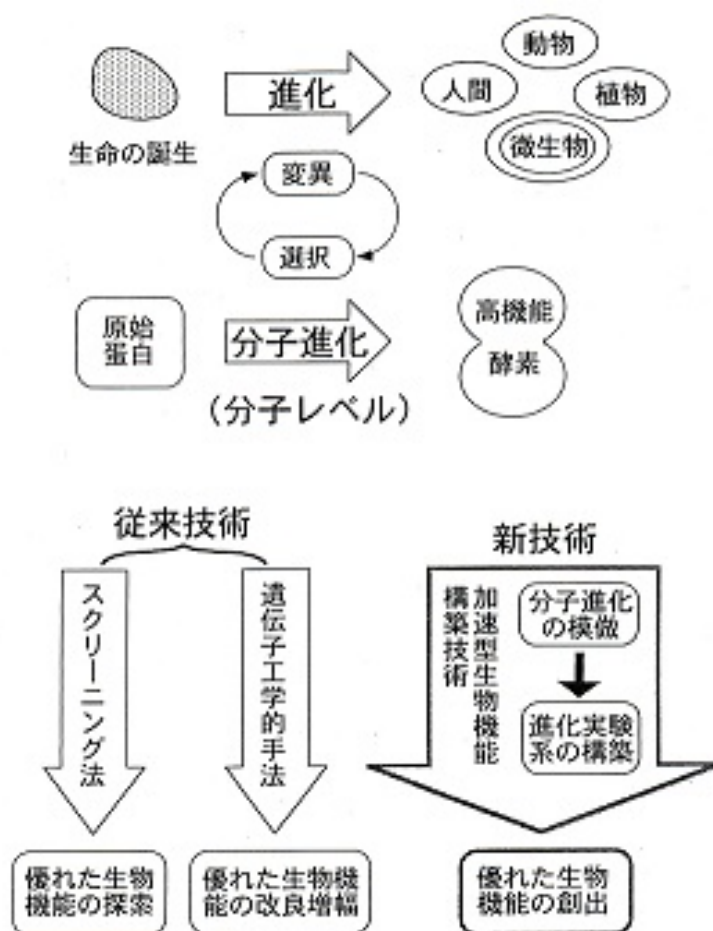


図 1. 加速型生物機能構築技術の概念図

従来のバイオテクノロジーは、優れた生物機能を自然界から探索するスクリーニング法、及びこれを遺伝子工学的手法を用いて改良増幅する技術体系

を活用してきた。これに対し、本 PJ は、優れた生物機能を創出する点で、従来とは一線を画する技術体系の確立を目指している。

2. 本プロジェクトの背景と目的

本 PJ の背景となる技術体系は、進化分子工学である¹⁻⁵⁾。地球上に生命が誕生して 40 億年経過する過程で、生物は、突然変異と淘汰（選択）を繰り返してきた。この進化のプロセスを実験室内で人工的に加速し、優れた機能をもつ新規な高分子を創出する技術体系である。別の言い方をすれば進化実験系の構築と言える。本 PJ は、それまでの進化分子工学の国内外の成果に立脚し、汎用的な技術体系を確立することを目的とした。

3. 進化分子工学の先駆的実験システム

初めての試験管内進化実験は、1967 年 Spiegelman らが RNA 分子を対象に、複製、選択を 74 回繰り返すことにより、増殖速度を 15 倍向上させた実験である⁶⁾。その後 Eigen らは、RNA フェージの実験室内変異を解析することにより、初めて進化分子工学の概念を提唱した⁷⁾。我が国においては、伏見らによるフェージの連続培養系の確立が、進化分子工学の最初の報告である⁸⁾。

図 2 に進化分子工学の実験システム概念を示す¹⁾。突然変異プロセスにより発生させた変異分子集団の中から、目的分子を評価（選択）し増殖させ、部分的に進化した分子集団を生成する。この集団をさらに突然変異プロセスに送る。このプロセスを繰り返すことにより、目的分子の集団が獲得できる。

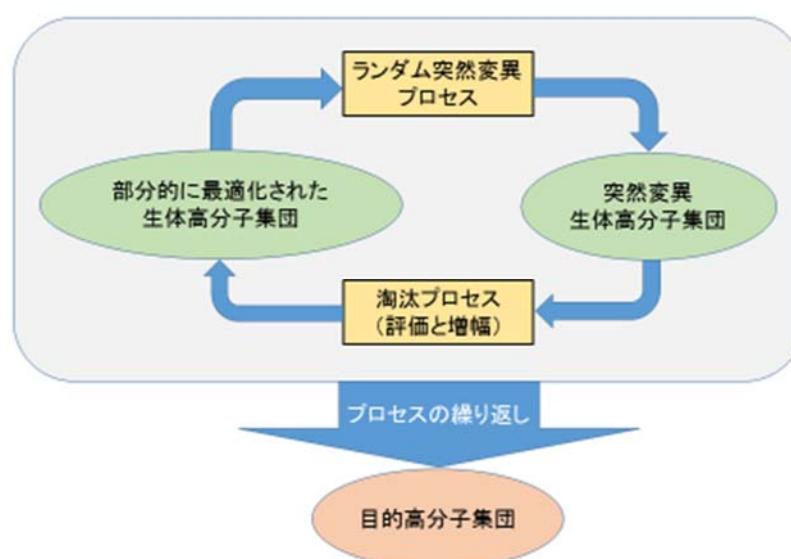


図 2. 進化分子工学の実験システム
(文献 1) の図を改変)

4. 進化実験系の概念

本PJでは、進化分子工学に立脚し、進化実験系の構築を目指す。具体的には、自然界の生物進化機構の分子レベルにおける知見に基づいて、実験室内に人工的な変異・選択の繰り返しシステム（進化実験系）を構築することにより、タンパク質等を対象に、目的とする優れた生物機能の創出を可能とする、バイオテクノロジーの新しい基幹技術の確立を目指す。本PJ開始後にも、本PJに関する総説が発表されている^{9,10)}。図3に進化実験系の概念図を示す¹⁰⁾。

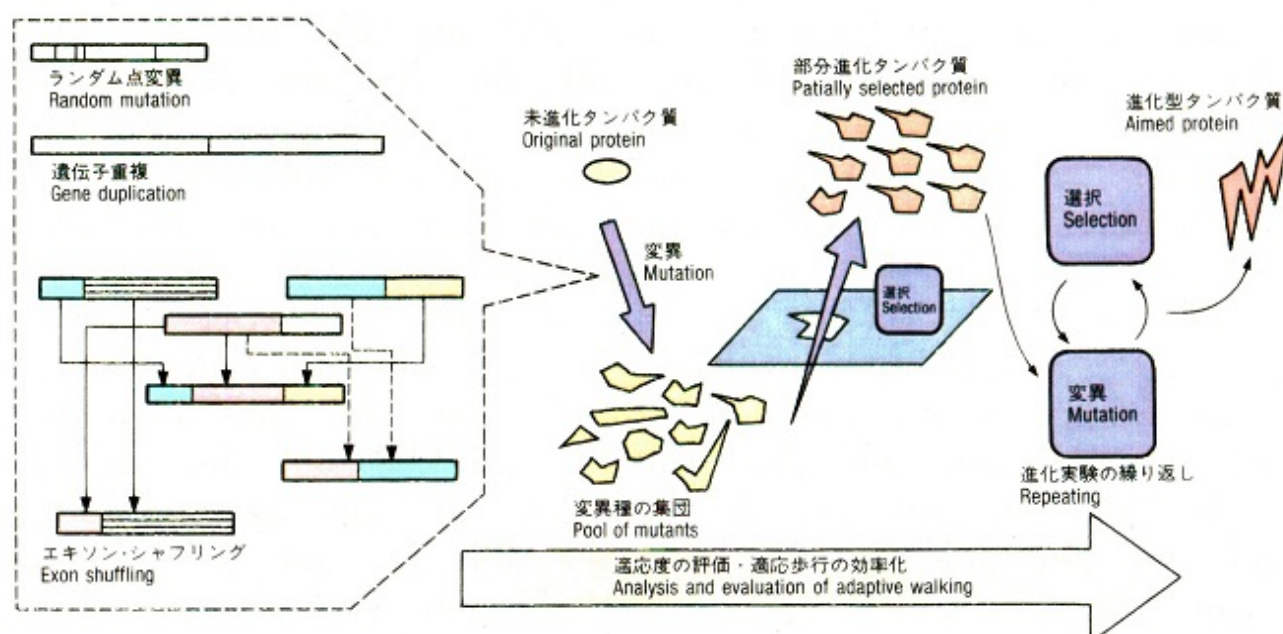


図3. 進化実験系の概念図
(文献10)の図を改変)

5. 研究計画の概要

第1期（平成7年度～10年度）研究計画の概要

1) 進化実験系を構築するための要素技術の開発

- ① タンパク質の構造単位で効率よく再構成を行わせるための新規な変異発生技術の開発
- ② 変異遺伝子情報とタンパク質等の表現型分子を対応させるための生体内・外における対応付け技術の開発
- ③ 多様な変異表現形質の中から生体内・外において効率的に目的表現形質を選択する技術の研究開発

2) 進化実験系の解析評価技術の開発

- ① 進化実験系における適応歩行を一般化するための理論的解析手法の開発
- ② 進化実験系における効率的な適応歩行システムの開発

第2期（平成11年度～13年度）研究計画の概要

第1期の成果に基づき、これらの要素技術、解析・評価技術を確立するとともに、進化実験系のモデルシステムを開発する。

6. 研究開発課題の体系図

前項の研究開発課題を体系化して図4に示す。

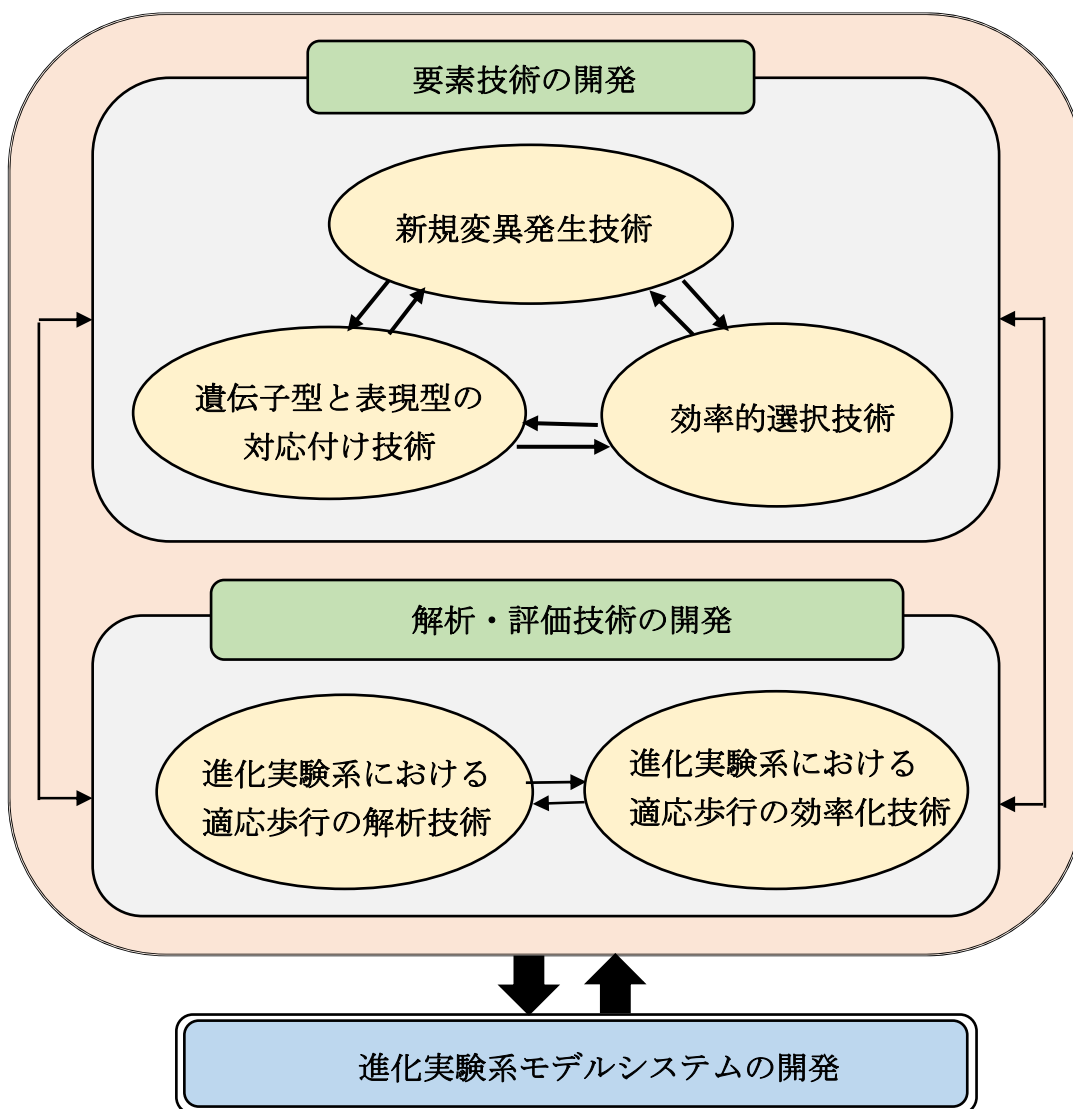


図4. 研究開発課題体系図

研究課題の「進化実験系の適応歩行」とは、進化実験を山登りに例え、山の頂上、即ち目的分子（機能）を徒歩で探索する方法のことである⁸⁾。

7. プロジェクトの研究項目と分担

プロジェクトの研究項目と分担は表 1 の通りである。

表 1 研究項目と分担¹⁰⁾

研究項目	分担
1. 進化実験系構築技術 1) 新規変異発生技術 2) 遺伝子型と表現型の対応付技術 3) 効率的選択技術	(株)海洋バイオテクノロジー研究所 工業技術院生命工学工業技術研究所 (株)三菱化学生命科学研究所)* 住友電気工業(株) (愛媛大学) (英国 NER ウイルス研究所) 日本たばこ産業(株) 工業技術院生命工学工業技術研究所 (東京薬科大学) (英国シェフィールド大学) (スイス国チューリッヒ大学)
2. 進化実験系解析・評価技術 1) 進化実験系における適応歩行の解析技術 2) 進化実験系における適応歩行の効率化技術	(埼玉大学) 日本チバガイギー(株) (大阪大学)

* 調査研究

8. 本プロジェクトの波及効果

本 PJ の技術的波及効果は、「進化実験系」という、従来のバイオテクノロジーでは見られなかった画期的なバイオテクノロジー手法を確立し、基礎、応用を問わず世界中のバイオ研究者にその手法を提供することにある。具体的には、例えば有用酵素を基に、その立体構造情報がなくても、耐熱性や有機溶媒耐性を飛躍的に向上させ、また酵素の基質特異性を大幅に改変することができる汎用的な実験システムの普及が期待される。

9. PJ 予算

本 PJ の 7 年間の総予算は、NEDO が 2589 百万円、生命研が 265 百万円となっている。

第2章 米国調査

1. 企業への参加呼びかけ

通常、PJの実施前には、予備的調査研究を目的として「先導研究」を実施する。本PJにおいても、後述のように平成6年度に先導研究を実施したが、その予算要求作業は、前年度、即ち平成5年春頃から本格的にスタートした。筆者が生命研の担当部長に就任して間もなく、先導研究の要求作業準備に入ったが、期を一にして、進化分子工学分野で先進的研究を進めている米国に調査団を派遣する方針が、工業技術院産業科学技術研究開発室（以下「産技室」）から提示された。産技室と協同で米国調査の骨格を作成し、企業に対し次のような参加呼びかけ資料を作成した。

【呼びかけ文】

平成5年7月15日
工業技術院産技室

加速型生物機能構築技術に関する欧米調査計画について

加速型生物機能構築技術（タイムマシンバイオ）については、平成6年度より先導研究を行うべく所用の予算を要求しているところであり、また、これらの先導研究を効果的に進めるため、今般新エネルギー・産業技術研究開発機構から旭リサーチセンターの委託調査研究において調査研究を開始したところです。

本調査は、前記の先導研究立ち上げのための委託調査研究と関連を保ちつつ、事前に先進国とりわけ進化に研究が盛んな米国の大学、研究機関、企業等における研究状況を広く調査し、もって先導研究に資することを目的とした調査です。

本調査の時期等については現在のところ以下の予定で実施することとしておりますが実際の調査団の派遣に際しては、より具体的で実効可能な計画を明確にしなければなりません。そこで、本調査を滞りなく遂行するための専門の委員会「タイムマシンバイオ欧米調査委員会」を発足させ、①目的、②調査項目、③訪問先、④ミッション規模、⑤役割分担、⑥日程等につき検討いただき、早急に計画を煮つめる必要が生じています。

つきましては、本調査の実施にご協力頂ける企業等がありましたら7月30日までに連絡を頂きたくご案内いたします。

（以下略）

【呼びかけ企業】

呼びかけ企業は次の 7 社である。

旭化成工業(株)、味の素(株)、サントリー(株)、日本たばこ産業(株)、

住友化学工業(株)、電気化学工業(株)、藤沢薬品工業(株)

なお、呼びかけ文に記載されている、新エネルギー・産業技術研究開発機構
(以下「NEDO」と略記) からの委託調査研究の参加企業は次の 6 社である。

協和発酵工業(株)、武田薬品工業(株)、東レ(株)、三井東圧化学(株)、三菱化成(株)、
日本チバガイギー(株)

【米国調査委員会参加企業】

結果的に、タイムマシンバイオ米国調査委員会参加は次の 7 社となった。

旭化成工業(株)、サントリー(株)、中外製薬(株)、(株)日鉱共石、

日本たばこ産業(株)、日本チバガイギー(株)、三菱油化(株)

トピックス: JETRO 事業採択に向けて

本海外調査事業は、当初は産技室の事業として進めたが、その後日本貿易振興会（以下「JETRO」）の平成 5 年度国際産業技術開発推進事業に採択され、「加速型生物機能構築技術に関する調査」（事務局：(株)旭リサーチセンター）として実施されることとなる。委員長には、本分野の先進的研究者、学習院大学生命分子科学研究所所長、三浦謹一郎教授にお願いすることとした。

2. 調査委員会開催

2-1. 委員会開催準備

トピックス: 委員会準備

準備は、産技室の三好企画官、傘木技官、小山技官（生命研から出向）、筆者及び筆者の研究部酵素開発研究室の三石 安主研で進めた。まず生命研側から、米国調査の目的、調査項目、訪問先候補、ミッション規模、役割分担、日程の各項目につき、概要を素案として提示した。産技室から、JETRO 内承認のための資料を大至急作成するよう依頼があり、対応した。

2-2. 第 1 回委員会

開催日：1993 年（平成 5 年）8 月 5 日

場所：工業技術院内会議室

討議事項

- 1) ミッション派遣先
- 2) ミッション派遣時期：11 月 27 日（土）～12 月 5 日（日）
- 3) ミッション参加者
- 4) 事前アポの分担

- 5) 英文プレゼンテーション資料作成のための構成、日本文原稿執筆の分担
- 6) 訪問目的文の作成
- 7) 第2回委員会の日時：9月20日（月）13:30～

トピックス：JETRO 事業スタート

その後、第2回調査委員会から、JETRO 事業の委員会に移行した。生命研は、JETRO 機械技術部と協同で、多くの委員会資料を準備した。また、訪問先アポ用手紙文案を産技室と協同で作成した。

2-3. 第1回加速型生物機能構築技術に関する調査 国際協力推進委員会

日時：平成5年9月20日（月）13:30～15:30

場所：旭リサーチセンター

委員会名簿：

委員長	三浦謹一郎	学習院大学 生命分子科学研究所 所長（教授）
委員	有富 正治	旭化成工業(株) ライフサイエンス基礎研究所 主査
	小久保利雄	日本チバガイギー(株) 国際科学研究所 プロジェクトリーダー
	永里 善彦	(株)旭リサーチセンター 取締役（主席研究員）
	中村 吉宏	工業技術院 生命研生物反応工学部長
	橋本 昭栄	サントリー(株) 研究センター 研究企画部 主任研究員
	松下 肇	日本たばこ産業(株) 生命科学研究所 副所長
	三沢 悟	(株)日鉱共石 医薬・バイオ研究所 研究員
	三石 安	工業技術院 生命研生物反応工学部酵素開発研究室 主研
	森川 實	中外製薬(株) 探索研究所 主席研究員
	湯川 英明	三菱油化(株) 筑波総合研究所 生物化学研究室長
オブザーバー	傘木 和俊	工業技術院生体機能応用技術専門官
	小山 芳典	工業技術院生体機能応用技術企画官付
	仲山 賢一	基礎産業局 生物化学産業課 安全専門職
	萩尾 正治	基礎産業局 生物化学産業課 企画調査係長

討議事項：

- 1) 訪問先候補（案）
- 2) 日程（案）
- 3) 事前送付和文（案）
- 4) 携行資料（案）：資料の内容「日本における進化分子工学の研究開発動向」

訪問先の受け入れ状況を表 2 に示す。

トピックス：訪問先のアポ取り付け

筆者と三石主研は、この間、精力的に訪問先のアポ取り付け作業を進めた。ミズーリ大学は、JETRO からの連絡である。マサチューセッツ総合病院の Dr. Ellington はインディアナ大学に転出しており、連絡がとれず困っていたところ、Dr. Ellington と交友がある愛媛大学遠藤教授から連絡していただくことができた。

表 2. 訪問先の受け入れ状況

訪問先候補	研究担当者	受け入れ	訪問日
アフィマックス研究所	Dr. W. J. Dower	不可	
ギリードサイエンス社	Dr. J. J. Toole	OK	12 月 2 日
カリフォルニア工科大学	Dr. F. H. Arnold	OK	12 月 3 日
スクリプス研究所	Dr. G. F. Joyce	不可	
コロラド大学 (ネクサジェン社)	Dr. L. Gold	OK	12 月 1 日
ミズーリ大学	Dr. G. F. Smith	OK	11 月 30 日
マサチューセッツ総合病院 ⇒インディアナ大学	Dr. A. Ellington	OK	11 月 29 日

2-4. 第 2 回加速型生物機能構築技術に関する調査 国際協力推進委員会

日時：平成 5 年 10 月 29 日（金）13:30～15:30

場所：旭リサーチセンター

1) 調査団の構成

前出の調査委員会名簿の三浦委員長が団長に、委員が団員となった。さらに、団員の追加：南 伸司 工業技術院 産技室 企画調査係長
随 行 齋藤 次朗 JETRO 機械技術部 技術課 課長代理

2) 日程

訪問先と旅行日程を表 3 に示す。

調査は 1 日 1 機関とした。次の各氏の分担で訪問機関の事前調査を行うことにした。この分担は後述の報告書作成まで継続した。

インディアナ大学	小林、三石、中村
ミズーリ大学	有富、森川
ネクサジェン社	三石、小久保
ギリードサイエンス社	橋本、松下
カリフォルニア工科大学	三沢

表 3. 訪問先と日程(機内日本 アメニティ トラベル作成を改変)

日 程	月・日	曜 日	発着都市名	現 地 時 間	利用 交通機関	摘 要
1	11/27	土	東京(成田)発 シカゴ着 シカゴ発 ワシントン D.C.着	10:00 12:10 08:30 10:11 12:55	JL-010 AA-792	成田空港 集合 空路 シカゴ乗り継ぎにて ワシントンへ 着後、ホテルへ 〈ワシントン泊〉
2	11/28	日	ワシントン D.C.発 インディアナポリス着	13:40 15:21	US-029	終日 : 打合せ 資料準備 〈インディアナポリス泊〉
3	11/29	月	インディアナポリス発 シカゴ着 シカゴ発 セントルイス着	14:37 14:45 15:30 16:43	バス UA-1819 UA-1675	午前 : インディアナ大学訪問 空路 セントルイスへ 〈セントルイス泊〉
4	11/30	火	セントルイス発 デンバー着	15:23 16:50	バス TW-421	午前 : ミズーリ大学訪問 空路 デンバーへ 〈デンバー泊〉
5	12/1	水	デンバー ↓ ボルダー ↓ デンバー発 サンフランシスコ着	16:30 18:03	バス UA-295	午前 : ネクサジェン社訪問 空路 サンフランシスコへ 〈サンフランシスコ泊〉
6	12/2	木	サンフランシスコ ↓ フォスターシティ サンフランシスコ発 ロサンゼルス着 ↓ パサディナ	18:30 19:51	バス UA-1729 バス	午前 : 資料準備 午後 : キリードサイエンス社訪問 空路 パサディナへ 〈パサディナ泊〉
7	12/3	金	パサディナ滞在		バス	終日 : カリフォルニア工科大学訪問 〈パサディナ泊〉
8	12/4	土	ロサンゼルス発	11:40	JL-061	空路 帰国の途へ 〈機内泊〉
9	12/5	日	東京(成田)着	15:55		着後、通関後解散

3) 事前送付和文（案）

下記の事前送付和文案が承認された。この英訳版を訪問機関に事前送付した。

事前送付和文（案）

1. 調査の目的

1990年以降、米国を中心として、進化分子工学に関する研究は急速に進展している。バイオテクノロジーは、優れた生物機能の基礎的解明と産業的利用のための多くの技術を含んでいるが、進化分子工学は、従来の遺伝子工学、タンパク質工学による生物機能の増幅、改良の限界を突破し、新規な優れた生物機能を創出する技術として期待を集めている。

日本においても、エクソン置換による酵素機能の付与をはじめとして、多くの研究成果が出始めている。現在、通産省工業技術院では、これらの研究成果に立脚して、「加速型生物機能構築技術」（通称、タイムマシーンバイオ）の開発を目指したF/Sを検討している。このF/Sを実施するに当たって、基礎的な情報として日本国内の研究状況のほか、米国における研究状況を把握する必要がある。

そこで米国における進化分子工学の研究開発状況を調べることにした。調査団は、日本の研究開発状況も紹介したい。今回の調査団が、進化分子工学の研究開発に関する相互理解の機会となると同時に、両者にとって有意義であることを希望する。

2. 質問項目

- 1) 貴機関における進化分子工学に対する基本的考え方
(バイオテクノロジーの中での位置、将来展望など)
- 2) 貴機関における進化分子工学の研究状況
 - ①研究課題／内容
 - ②予算規模／組織
 - ③研究形態
 - ④これまでの成果及び今後の計画
- 3) 貴機関の研究と関連する又は類似の研究が行われている場合、その状況
- 4) 進化分子工学の実用化の状況
 - ①特許状況
 - ②製品化の状況

4) 訪問先への提出資料

- ① 調査の目的 (Statement of Purpose)
- ② 質問事項 (Questionnaires)
- ③ 日本における進化分子工学の研究開発動向

(New Technology Japan (JETRO 機関誌) 特集号)

④ 各企業および研究所のパンフレット

5) 調査報告書の作成分担

調査報告書の目次及び執筆分担並びに作成日程案を検討した。

6) 旅行説明

旅行業者：(株)ジャパンアメニティトラベルから出発等の説明があった。

3. 調査実施

1) 概要

トピックス：バスの中で訪問先勉強会

前述の通り、訪問機関は1日I機関とした。ホテルから訪問機関へ移動するバス車中において、その日の訪問機関の概要について、分担者からメンバーに事前調査の結果が情報共有された。居眠りしたい時間帯であったが、皆熱心に、分担者の報告に耳を傾けた。

訪問機関の調査に当たっては、一方通行にならないように、双方からプレゼンテーションを行った。日本側からは、団長挨拶、調査の目的等について筆者の説明、団員の自己紹介（企業の紹介を含む）を行った。提出資料として、“The Present Research and Development of Evolutionary Molecular Engineering in Japan”を情報提供した。訪問機関側からは、組織の概要説明、研究開発内容の説明及び予め送付した質問事項への回答等が行われた。また三浦団長は、ギリードサイエンス社とカリフォルニア工科大学において、“Approach to Design and Synthesis of Protein”と題して講演を行った。

トピックス：一日 24 時間

11月29日（月）から5日間は、毎日同じようなスケジュールで進めた。即ち、前日に飛行機で現地入りし、翌朝ホテルからバスで訪問機関に移動し、意見交換の後、空港に向い、翌日の訪問機関の所在地に移動した。

アメリカ大陸を東海岸から西海岸まで横断する旅行日程だったため、一日が25時間というスケジュールになった。仕事が忙しい時に、よく「一日が25時間あったらいいのに」と思ったものだが、実際にその状況に身を置いてみると、かなりハードなスケジュールだったと思う。

2) 調査内容

訪問機関での調査は、表4. 訪問機関調査票に従って行った。

表 4. 訪問機関調査票

1. 訪問機関名
2. 訪問日時
3. 所在地
4. 出席者
5. 調査結果
 - 1) 訪問先概要
 - 2) 相手側説明の内容
 - 3) 質疑応答の内容
 - ① 進化分子工学に対する基本的考え方
 - ② 進化分子工学の研究状況
 - (イ) 研究課題/内容
 - (ロ) 予算規模/組織
 - (ハ) 研究形態
 - (ニ) これまでの成果及び今後の計画
 - ③ 類似研究の状況
 - ④ 進化分子工学の実用化の状況
 - (イ) 特許の状況
 - (ロ) 製品化の状況

4. 調査結果

訪問機関の調査結果を、研究対象の分子種と手法にまとめて表 5 に示す。

表 5. 訪問機関の研究対象分子種と手法（文献 11 の表を改変）

訪 問 機 関	研 究 者	分 子 種	手 法
インディアナ大学	Dr. Ellington	RNA オリゴヌクレオチド	Aptamer 技術
ミズーリ大学	Dr. Smith	ペプチド	Phage display 法
ネクセン社	Dr. Gold	RNA オリゴヌクレオチド	SELEX 法
ギリートサイエンス社	Dr. Toole	DNA オリゴヌクレオチド	Aptamer 技術
カリフォルニア工科大学	Dr. Arnold	タンパク質	Sequential mutagenesis 法

調査のまとめ：我が国において加速型生物機能構築技術を開発するに当たって、Aptamer 技術、SELEX 法、Phage display 法及び Sequential mutagenesis 法は、いずれも要素技術として不可欠の手法であることが明確になった。今回の調査は、これらの手法の創始者または先駆的な成果をあげている研究者を訪問することができ、今後我が国において、加速型生物機能構築技術研究開発を先導研究として展開する上で極めて有益な情報を得ることができた。

トピックス：訪問先がノーベル賞

訪問先の Dr. Arnold と Dr. Smith は、生物の進化を参考にしてタンパク質を改良する方法を考案したことが評価され、2018 年ノーベル化学賞を受賞した。我々の米国調査から四半世紀後の受賞となるが、訪問機関の選択が適切だったことが証明されたと言えよう。

【米国における先駆的手法の解説】

1) Aptamer 技術¹²⁾と SELEX 法¹³⁾（両者は同じ内容）

1990 年に、核酸を対象にした進化分子工学のキーテクノロジーとなる Aptamer 技術を Ellington と Szostack が、SELEX 法を Gold らが、それぞれほぼ同時に報告した。核酸レベルの進化実験システムを図 5 に示す。

これらの報告により、進化分子工学は新しいスクリーニング手法として一躍注目を集めた。訪問した二つのベンチャー企業では、これらの技術の応用により、医薬品開発への実用化直前の状況であった。

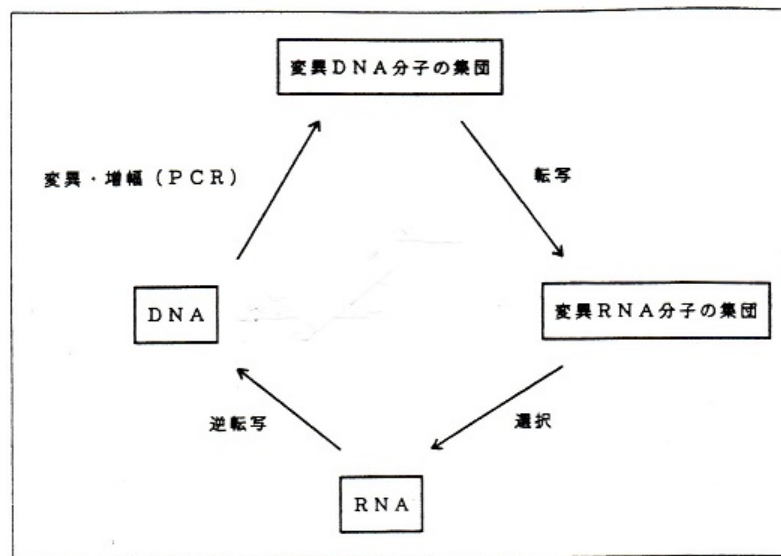


図 5. 核酸の進化実験システム
(文献 10)の図を改変)

2) Phage display 法¹⁴⁾

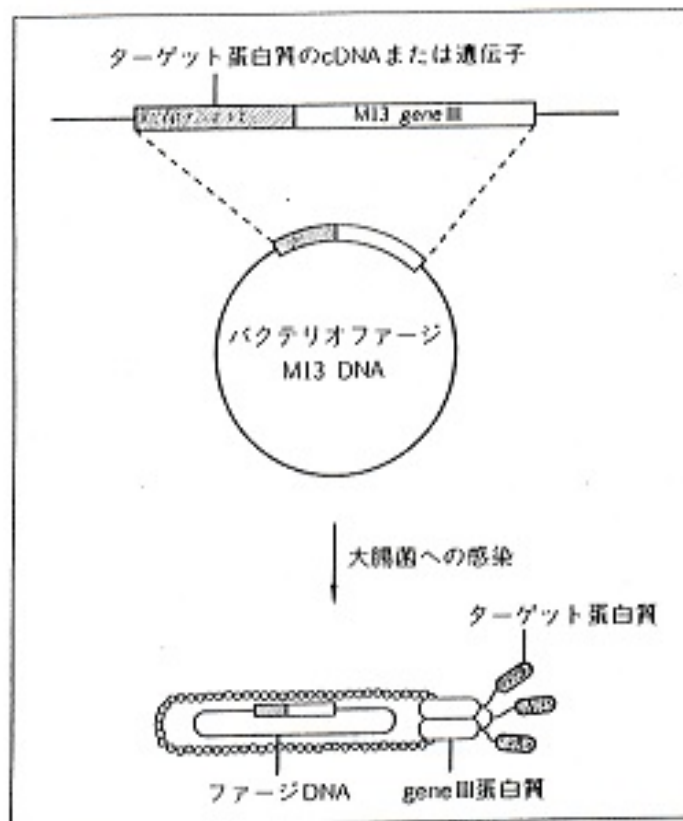


図 6. Phage display 法³⁾

M13 などの繊維状ファージのコート蛋白質 (gene III 蛋白質) の遺伝子に進化実験系の対象となるペプチドあるいは蛋白質の遺伝子を結合して発現させることにより、ファージ粒子の表面にこれらを呈示させる (図 6)。

3) Sequential mutagenesis 法

Arnold らは、subtilisin E 遺伝子に PCR 法を用いてランダム変異を導入し、発現した変異酵素の中から有機溶媒 (60%ジメチルホルムアミド、DMF) 中で活性が増強されていたものを選択した。進化サイクルを 10 回繰り返した後に得られた変異酵素は、60% DMF 中での酵素活性が野生型酵素に比べて顕著に増大していた (図 7)。

その後、Arnold らは、ニトロベンジルエステラーゼの遺伝子に PCR でランダム変異を導入し枯草菌で発現させ、有機溶媒中でも生育する菌体を選択し、その中の酵素遺伝子にまた変異を導入するサイクルを繰り返すことにより、有機溶媒耐性を 50~60 倍向上させることに成功した¹⁶⁾。

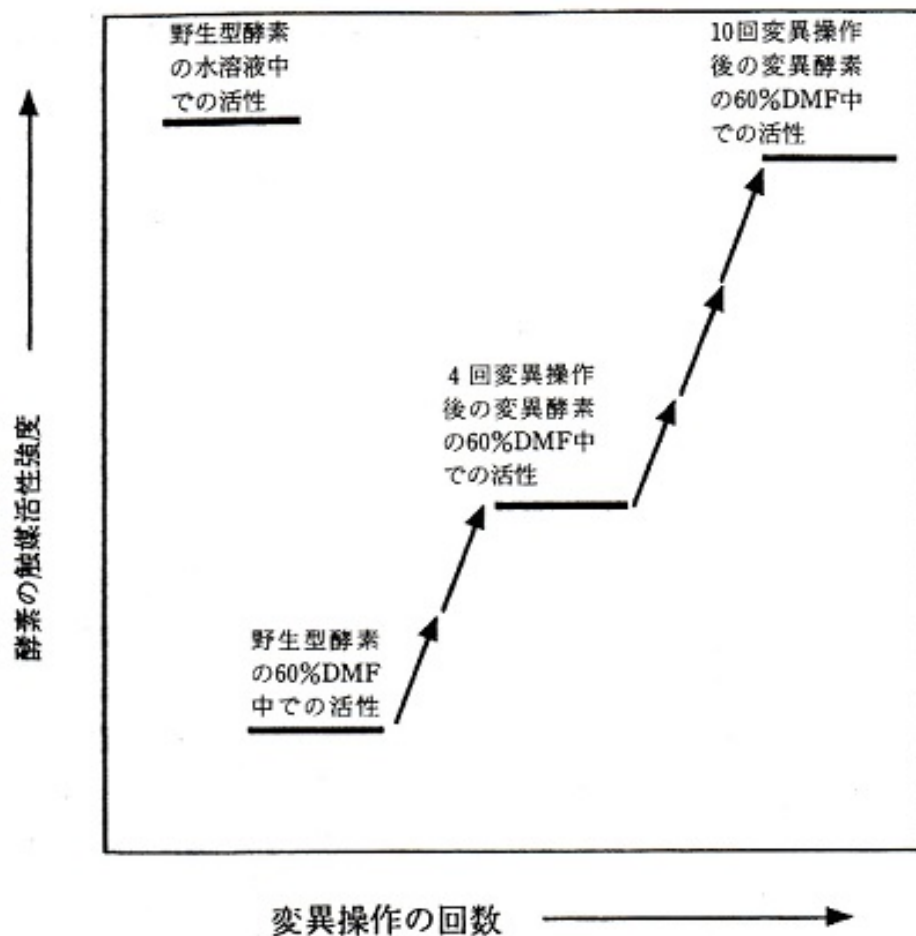


図 7. 進化サイクルを適用した枯草菌タンパク質分解酵素(subtilisin E)の有機溶媒耐性化(文献 15)の図を改変)

5. 訪問先の写真



インディアナ大学構内

前列中央 三浦団長

その右 Dr. Ellington

その右 筆者



ミズーリ大学構内

左から6番目 Dr. Smith



ネクサジェン社前

前列右から3番目 Dr. Gold



ギリードサイエンス社前

右から5番目 Dr. Toole



カリフォルニア工科大学構内

前列中央 Dr. Arnold



カリフォルニア工科大学で講演する

三浦団長

6. 調査報告書

調査報告書作成に向けた JETRO の会議の前に、調査団メンバーによる打合せ会を開催した。

6-1. 「加速型生物機能構築技術」米国調査打合せ会

日時：平成 5 年 12 月 24 日（金）15:00～17:00

場所：生命工学工業技術研究所所議室

議事：報告書のとりまとめ方について

前述の訪問機関毎の担当者から、米国調査の概要をまとめたペーパーが提出され、説明があった。

その後、生命研内の関連研究室を見学し、懇親会を開催した。

6-2. 第 3 回加速型生物機能構築技術に関する調査 国際協力推進委員会

日時：平成 6 年 1 月 26 日（水）14:00～16:00

場所：旭リサーチセンター

議題：①調査報告書の取りまとめについて

JETRO から報告書案が次の通り提案された。

報告書タイトル：日本と米国における加速型生物機能構築技術調査研究の現状と研究協力の可能性

内容：

はしがき

「加速型生物機能構築技術に関する調査」国際協力推進委員会名簿

I. フィジビリティ調査事業の概要

II. 我が国における加速型生物機能構築技術の調査研究の現状と動向

III. 加速型生物機能構築技術の調査研究の現状と動向についての米国調査結果

IV. 加速型生物機能構築技術に関する今後の国際研究協力の可能性

②海外調査の成果と今後の活動について

訪問機関の調査に基づいて、加速型生物機能構築技術の今後の課題がまとめられた。

6-3. 調査報告書の完成 ¹⁾

1994 年（平成 6 年）3 月 JETRO 機械技術部により調査報告書が完成した。

第3章 平成6年度先導研究事業

本章では、PJの勉強会から先導研究までの経緯を記述する。

1. 勉強会の実施

トピックス：PJ誕生のノウハウ

PJを誕生させるノウハウの一つに、助走期間の必要性が挙げられる。いきなりPJ要求を本省なり本院に持ち込んでも採用される可能性は殆どない。事前の取り組みとして、PJに関する勉強会等を開催する必要がある。その後、先導研究（フィージビリティ・スタディ（FS））を経て、晴れてPJの予算要求に至る。

【平成3年度】(財)バイオインダストリー協会において、バイオテクノロジー応用新規産業化技術の開発に関する調査（バイオケミカルプロセス）が実施された。

【平成4年度】勉強会は筆者が担当部長になる前の研究企画官時代から、産技室主催で開始され、筆者も出席した。参加者は、第1回の記録によれば、産技室2名、その他14名 計16名となっている。

第1回 平成4年8月31日（於 通産省本館 6F 基礎産業局第2会議室）

講師：伏見 譲 教授
埼玉大学 工学部 機能材料工学科
演題：進化分子工学の始まり
講師：大嶋 泰郎 教授
東京工業大学 生命理工学部 生命理工学科
演題：酵素の改変 ―生物進化工学の可能性―

第2回 平成4年9月16日（於 通産省別館 10F 第5共用会議室）

講師：卜部 格 教授
大阪大学 工学部 応用生物工学科
演題：配列空間の構造からみた酵素進化の戦略

第3回 平成4年10月8日（於 通産省本館 17F 第5共用会議室）

講師：三浦 謹一郎 教授
学習院大学 生命分子科学研究所
演題：タンパク質合成系の進化

第4回 平成4年10月28日（於 通産省本館 17F 第5共用会議室）

講師：横田 雅夫 助教授

長岡科学技術大学 生物系

演題：PCB 分解系の機能と進化―日米共同研究への取り組みも含めて

【平成5年度】勉強会実施状況（筆者が生物反応工学部長に就任以降）

第1回 平成5年7月23日

講師：太田 朋子 国立遺伝学研究所教授

演題：生物進化機構

第2回 平成5年9月10日

講師：郷 通子 名古屋大学理学部教授

演題：モジュール機構

第3回 平成5年9月27日

講師：遠藤 弥重太 愛媛大学工学部教授

演題：試験管内選択法

第4回 平成5年10月15日

講師：芝 清隆 巖研究所細胞生物部

演題：エクソンシャフリング法

2. 先導研究要求

1) 企画書準備

筆者が部長就任してから間もなく、産技室三好開発官から、本PJ先導研究要求の企画書案作成の指示が出された。そこで、勉強会の講演内容及び文献調査等から、生命研の研究者の協力も得て、次の内容の本PJ構想を練り上げた。

【企画書案】

1. 研究開発の目的
2. 研究開発の内容・項目
3. 先導研究の必要性
4. 平成6年度概算要求額
5. 産業・社会への波及効果

2) 先導研究要求書

平成5年6月ごろ、以下の内容で先導研究要求書が完成した。

【先導研究要求書（概要）】

タイトル：平成6年度「産業科学技術研究開発制度」新規課題提案書

提出者：筆者の所属、氏名、連絡先

1. 課題の属する分野 バイオテクノロジー
2. 課題の名称 加速型生物機能構築技術（タイムマシンバイオ）
3. 研究開発の目的及び内容（第1章記載の通り）
4. 「産業科学技術分野において研究開発が期待される課題」か否か
5. 先導研究の必要性
模倣すべき生物進化機構の分子レベルでの調査研究及び検討対象の課題整理。
6. 予想される先導研究の期間 3年
7. 先導研究に必要な予算 6千万円
8. 研究項目
 - (1) 生物進化機構の解明に関する調査研究
 - (2) 進化事件系の構築に関する基礎的研究開発
9. 研究の進め方
 - (1) 大学等の専門家による、生物進化の基礎的分野の調査研究
 - (2) 国立研究所等による、基盤的知識を得るための基礎的研究開発
 - (3) 民間団体による、文献調査等による調査研究
10. 当該研究開発が産業・社会等に及ぼす効果
進化実験系の構築により、優れた生物機能の合目的な創出が可能となる。
11. 当該課題の属する分野での課題の位置づけ
当該課題は、遺伝子工学及びタンパク質工学の限界を超え、進化実験系の確立により、未知の生物機能を創出することを可能とし、分野の基幹技術となる。
12. 国内外における類似の研究に関する状況
近年米国を中心に、我が国を含め研究が活発化しているが、この学問領域は、まさに産まれたばかりという状況であり、多くの未解決の課題を残している。
13. 国際的な連携の可能性及び予想される連携の形態
平成5年度勉強会に外資系の日本法人も参加しており、国際連携の可能性は高い。また米国において急速に注目を集めており、国際研究協力の可能性もある。
14. その他特記されるべき事項

軽部先生へのご説明

当時、通産省におけるバイオテクノロジー分野のアドバイザー的存在の、東京大学先端研軽部征男教授に、本PJについてご説明しご指導いただいた。

トピックス：軽部先生へのご説明

第1回目：平成5年8月6日 於 東大先端研軽部研究室

産技室三好開発官、生命研三石主研及び筆者がご説明に伺った。既に先導研究要求書が、通産省内において承認されつつある時期で、軽部先生の評価が極めて重要であった。本PJそのものについては、必ずしもゴーサインをいただけたという状況ではないものの、先導研究の実施にはご理解をいただけた。

第2回目：平成6年6月9日 於 都内レストラン

産技室松崎開発官、生命研三石主研及び筆者がご説明した。時期が後先になるが、後述する平成7年度本PJ要求が工技院内で承認されるか否かという重要な時期での面談であった。こちら側から本PJの意義をご説明したが、本PJ要求に肯定的なご意見はいただけなかった。

第3回目：平成6年7月1日 於 都内レストラン

工技院内での本PJ要求の採択期限が迫る中で、再度軽部先生にご説明する機会を持った。三石主研が熱心に説明した結果、本PJの意義をご理解いただけることができた。このことは、本PJの平成7年度新規要求の方針確定に向けた大きな後押しとなった。三石主研の貢献度は高く評価される。

3. 先導研究実施

先導研究は、新エネルギー・産業技術研究開発機構（NEDO）から㈱旭リサーチセンターへの委託の形式で実施された。先導研究の記録は、NEDOと㈱旭リサーチセンターが連名で作成した「先導研究報告書¹⁷⁾」にほとんど掲載されているが、当該報告書が筆者の手元になかったため、NEDOから入手し、その内容を引用する形で以下記述する。

3-1. 調査委員会設置¹⁷⁾

㈱旭リサーチセンターは、外部専門家、学識経験者によって構成される調査委員会を設置し、文献等による調査、海外調査及び大学への再委託業務により本技術の研究開発に必要なデータ収集及び本技術に関する審議、検討を行った。調査委員会は全体委員会において審議するとともに、分子進化、進化実験系構築技術及び進化実験系・評価技術の各ワーキンググループに別れ、各々の分野を担当した。平成6年10月から平成7年3月までの間に、調査委員会3回、各ワーキンググループ委員会2回を開催した。委員名簿を表6に示す。

表 6. 加速型生物機能構築技術(先導研究)調査委員会 委員名簿¹⁷⁾

* 引用資料の関係からフォントに差が生じた

委員長：三浦 謹一郎 学習院大学 理学部 教授 生命分子科学研究所 所長

分子進化ワーキンググループ

主 査：三浦 謹一郎 学習院大学 理学部 教授 生命分子科学研究所 所長

委 員：郷 通子 名古屋大学 理学部 生物学科 教授

五條堀 孝 国立遺伝学研究所 遺伝情報センター長・教授

正木 春彦 東京大学 農学部 応用生物学専攻 助教授

西 義介 日本たばこ産業(株) 生命科学研究所 研究担当調査役

熊谷 善博 住友電気工業(株) バイオメディカル研究部 主席研究員

進化実験系構築技術ワーキンググループ

主 査：大島 泰郎 東京工業大学 生命理工学部 生命理学科 教授

委 員：今中 忠行 大阪大学 工学部 応用生物工学科 教授

遠藤 弥重太 愛媛大学 工学部 応用化学科 教授

小林 達彦 京都大学 農学部 農芸化学科 講師

芝 清隆 癌研究所 細胞生物部 主任研究員

古川 謙介 九州大学 農学部 農芸化学科 講師

小野沢 孝 旭化成工業(株) 基礎研究所 研究員

川上 泰 (財)産業創造研究所 生物工学研究部長

新海 暁男 協和醗酵工業(株) 東京研究所 研究員

鈴木 節士 武田薬品工業(株) 生産技術研究所 研究調査役

丹羽 真一郎 住友電気工業(株) 大阪研究所 バイオメディカル研究部
主席研究員

柳川 弘志 (株)三菱化学 生命科学研究所 生体分子工学研究室長

八巻 俊文 三井東圧化学(株) ライフサイエンス研究所 研究員

進化実験系評価技術ワーキンググループ

主 査：伏見 譲 埼玉大学 工学部 機能材料工学科 教授
委 員：卜部 格 大阪大学 工学部 応用生物工学科 教授
小久保 利雄 日本チバガイギー(株) 国際科学研究所 グループリーダー
三沢 悟 (株)ジャパンエナジー 医薬・バイオ研究所 研究員

幹事会委員：三浦主査、大島主査、伏見主査、熊谷委員、小久保委員、西委員、丹羽委員、
柳川委員、生命研協力委員

協力委員

山岸 明彦 東京工業大学 生命理工学部 生命理学科 助手
中村 吉宏 生命工学工業技術研究所 生物反応工学部長
三石 安 生命工学工業技術研究所 生物反応工学部 酵素開発研究室 主研
巖倉 正寛 生命工学工業技術研究所 生体物質部 生体高分子研究室 主研
西川 諭 生命工学工業技術研究所 分子生物部 分子遺伝学研究室長
多比良 和誠 生命工学工業技術研究所 分子生物部 分子遺伝学研究室 主研
松井 郁夫 生命工学工業技術研究所 分子生物部 タンパク質工学研究室 主研
宮崎 健太郎 生命工学工業技術研究所 生物反応工学部 酵素開発研究室 研究員

オブザーバー

松崎 忠男 通商産業省 工業技術院 総務部 産業科学技術研究開発室
生体機能応用技術企画官
原 正之 通商産業省 工業技術院 総務部 産業科学技術研究開発室
生体機能応用技術企画官付
横瀬 栄二 通商産業省 工業技術院 総務部 産業科学技術研究開発室
生体機能応用技術企画専門職
松尾 武士 通商産業省 基礎産業局 生物化学産業課
斉田 要 通商産業省 基礎産業局 生物化学産業課 研究開発担当専門職
松尾 次雄 バイオテクノロジー開発技術研究組合 専務理事
草木 稔篤 バイオテクノロジー開発技術研究組合 技術部長
新階 央 NEDO 産業技術研究開発部 課長代理
太田 秀幸 NEDO 産業技術研究開発部 課長代理
木瀬 昇一 NEDO 産業技術研究開発部 主査

事務局

永里 善彦	(株)旭リサーチセンター
小林 宣男	(株)旭リサーチセンター
伊原木 俊夫	(株)旭リサーチセンター
吉田 名三衣	(株)旭リサーチセンター
福岡 恭子	(株)旭リサーチセンター

トピックス:委員人選の失敗

委員人選の反省：産技室傘木氏から「委員が多すぎる、後で困る」との助言をいただいたが、本分野の第一人者すべてを委員に委嘱した。結果として翌年からの本 PJ メンバーに入らなかった先生方に陳謝する事態となった。

3-2. 先導研究の実施結果

トピックス:PJの基本骨格

先導研究の実施に当たって、極めて重要なポイントがある。平成 5 年 10 月 筆者は、本分野の第一人者である埼玉大学伏見教授と、名古屋で開催された「生物物理学会」会場の休憩室にて面談し、進化分子工学の課題について詳細にご教示いただき、本 PJ の基本骨格を固めることができた。

先導研究実施結果の要約は次の通りである¹⁷⁾。

〔1〕分子進化機構に関する研究及び特許動向調査、及び進化実験系に応用すべき分子進化機構の提起

〔1-1〕内外の研究動向及び特許動向調査の結果を報告した。

〔1-2〕進化実験系に応用すべき分子進化機構として、点突然変異の発生、構造単位の入替えによる新しいタンパク質の創製、環境に適応して起る適応変異、変異遺伝情報のタンパク質への発現及びタンパク合成系の進化機構等の応用について提案した。

〔2〕進化実験系構築技術に関する研究動向調査及び研究開発課題の提起

〔2-1〕特許動向調査の結果を報告した。

〔2-2〕① 効率的変異発生技術、② 遺伝子型と表現型の対応付け技術、③ 変異表現形質の選択技術、④ 変異体の立体構造解析技術に関する研究開発の現状と開発課題を示した。

① 効率的変異発生技術

点突然変異発生技術は既に数多くの方法が確立利用されており、導入制

御法や導入効率の向上が課題となっている。領域単位での変異発生技術は新規な機能性タンパク質創出を可能にするキーテクノロジーとなり、2～3の手法が検討されているが、現在までにランダム・エクソンシャフリング法は構築されておらず今後の重要な開発課題である。翻訳後修飾による変異導入技術は、これまで進化工学的検討は全くなされておらず今後課題を検討していく状態にある。

② 遺伝子型と表現型の対応付け技術

生体の持つ翻訳系を利用した対応付けとして、(i)変異遺伝子の集団を細胞内で発現させる方法、(ii)ファージ粒子の表面にペプチドとして提示させるファージ提示法、(iii)生物個体を利用した対応付け手法及び(iv)生体外タンパク質合成系、一方生体系とは別に化学合成系として、(v)化学合成による遺伝子型と高分子を対応付ける人工暗号付ライブラリー合成系、(vi)選択用に表現型分子のみの多様な集団を基板上に合成する等のオペレーショナルな対応付け等、各手法の開発の現状と今後の課題を示した。ファージ提示法や合成系は既に確立された技術であり、今後はその改良、応用の段階にある。一方、生体系での高精度の対応付け技術及び高効率、安定な生体外タンパク質合成系の構築が今後の重要課題である。

③ 変異表現形質の選択技術

生体内選択系としてこれまでの好熱菌のプラスミド系を用いた耐熱性酵素の選択から染色体内組換え系を用いた選択方法の開発が今後の課題である。生体外選択系では、結合性・親和性による選択以外に、酵素の触媒機能を選択するためのリガンドの設計・創製が重要な課題である。

④ 変異体の立体構造解析技術

マクロレベルの構造解析と原子レベルの構造解析の各手法の現状と今後の開発課題を示した。より強力な超伝導磁石や新しい測定手法の開発により、微量試料での測定や、構造の揺らぎの大きいタンパク質の原子レベルでの立体構造解析が可能になるものと期待された。

[3] 進化実験系解析・評価技術に関する研究動向調査及び研究開発課題の提起

[3-1] 内外の研究開発動向の調査結果を報告した。

[3-2] ① 進化実験系における配列空間適応歩行の理論的解析、② 進化実験系における適応歩行の効率化に関する研究開発の現状と開発課題を示した。

① 適応歩行の解析技術

進化実験系における適応歩行概念の一般化を図るため、適応度の地形の分類とその理論的解析、局所的な最適点をもつ地形（凸凹地形）における

適応歩行方法の開発等が課題である。

②適応度の地形の実測手法

進化実験系における適応歩行を効率的に行うためにはまず適応度の地形を認識する必要があることから、適応度を示す尺度として触媒活性、基質特異性、安定性等の諸性質を選び、地形の特徴を明らかにする手法の開発が重要である。

③適応歩行の効率化手法

適応歩行の概念を実験系に適用することを目的に、ランダム変異と適応度との関係を検討し、適応度の地形に基づいた最適なランダム変異・選択システムの開発が課題である。

〔4〕 海外調査

- 〔4-1〕 米国大学関係（マサチューセッツ工科大学、ブランダイス大学、ハーバード大学）の調査結果を報告した。
- 〔4-2〕 米国ベンチャー企業（プロテイン・エンジニアリング社、レプリジェン社、クリエイティブ・バイオモレキュール社、キュビスト社）の調査結果を報告した。
- 〔4-3〕 ドイツの分子生物工学研究所の調査結果を報告した。
- 〔4-4〕 平成7年2月に開催されたマイアミバイオテクノロジー冬期シンポジウム、遺伝子工学の進歩「タンパク質工学と構造生物学」の概要を報告した。

〔5〕 大学への委託調査

- 〔5-1〕 進化実験系構築技術の具体例(1) 変異表現形質選択技術の調査および安定で効率的な生体外タンパク質合成系の検討結果を報告した。
- 〔5-2〕 進化実験系構築技術の具体例(2) 好熱菌を利用した耐熱性タンパク質の選択系を検討した結果を報告した。
- 〔5-3〕 進化実験系解析・評価技術の具体例として、ウイルス型及び細胞型の進化リアクターを試作し、適応度の地形の実測・評価手法を検討した結果を報告した。

〔6〕 先導研究において本調査研究と並行して行われた生命工学工業技術研究所の基礎的、予備的研究の概要

- 〔6-1〕 変異の発生手法に関する基礎的研究開発として、遺伝子の重複融合による多機能酵素の開発及び α -アミラーゼをモデル分子とした領域指定ランダム変異導入法の検討概要を報告した。
- 〔6-2〕 変異表現形質の選択・評価手法に関する基礎的研究開発として、リボ

ザイム機能の選択手法に関する予備的検討及びヘミセルラーゼの基質特異性変異種の選択手法の予備的検討の概要を報告した。

〔7〕 まとめと今後の展望:本調査の最終目標である、プロジェクト基本計画の骨格となる研究開発課題、望ましい研究開発体制及び成果の展望等の提言

〔7-1〕 研究開発目標を、生物進化機構の分子レベルにおける知見に基づいて、実験室内に人工的な変異、選択のシステム(進化実験系)を構築し、タンパク質等を対象に目的とする優れた生物機能を創出するバイオテクノロジーの新しい基幹技術確立することとした。

研究開発の第1期では、新規変異発生技術、遺伝子型と表現型の対応付け技術及び効率的選択技術等、進化実験を構築するための要素技術の開発並びに進化実験系における適応歩行の解析技術、効率化技術等の解析・評価技術の基礎的な開発を行い、第2期では、これらの技術確立するとともに、タンパク質の安定性、機能及び創製の各目的用途別の進化実験系モデルシステムを開発することとし、各課題の概要を示した。

〔7-2〕 研究開発体制として、速やかな立ち上げ及び円滑・効率的な研究遂行がプロジェクト目標達成の鍵となることから、「分散型共同研究」を基本とすることが望ましいとした。またプロジェクトを一元的に運営する「プロジェクト運営委員会(仮称)」の設置、内外の大学との密接な連携、研究者間の情報交換の円滑化を提言した。さらに、中間評価及び最終評価における評価の視点を提言した。

〔7-3〕 本プロジェクトの成果の展望として、進化実験系モデルシステムの自動化、微小化により進化実験装置が開発され、タンパク質の安全性・機能の向上や全く新規な生物機能の創出が可能となり、物質生産、環境保全、エネルギー・情報及び医療福祉等の広範な産業分野におけるバイオテクノロジーの飛躍的活用が期待されることを示した。

第4章 平成7年度プロジェクトの開始

1. 概算要求に向けて

トピックス：官房ヒアリング

日付は定かではないが、恐らく平成6年7月ごろ、産技室傘木技官からFAXが届いた。「本ペーパー（2枚）にて本日官房ヒアリングを実施しました。概ね好意的な受け止めでした。」というコメント付きで、官房ヒアリング説明資料が送信された。

平成6年8月25日、産技審（産技室の外部諮問会議）の部会が開催され、加速型生物機能構築技術の平成7年度概算要求は承認された。

2. 委託先決定

平成7年4月、NEDO主催による本PJの公募説明会が開催された。企業はバイオ組合の組合員となり、組合が応募した。大学、国研は個々に応募した。7月28日及び8月22日に応募案件に関するNEDO評価委員会が開催され、バイオ組合が委託先として決定し、生命研及び大学関係者も採択された。

3. 研究開発体制

研究開発体制を図8に示す。

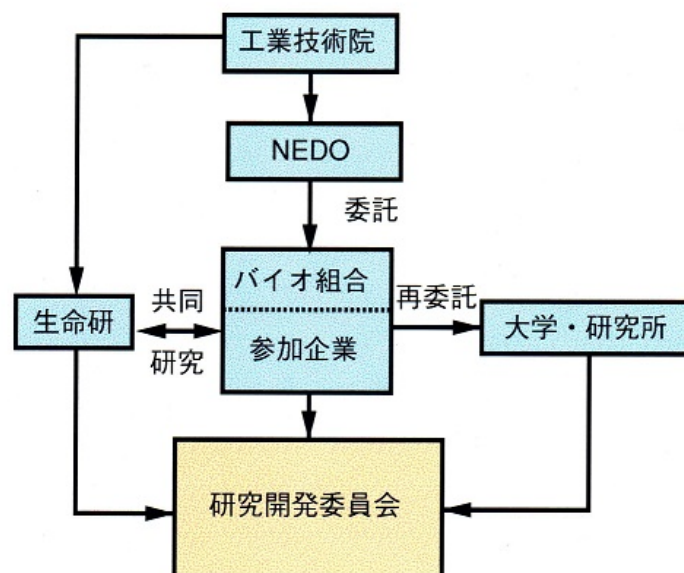


図8. 研究開発体制

予算は工業技術院から NEDO に渡り、NEDO からバイオ組合に委託される。一方 NEDO から生命研に直接予算が渡り、生命研とバイオ組合は共同研究を実施する。バイオ組合から大学・研究所に再委託され、各メンバーは研究開発委員会を構成した。委員長には東京薬科大大島泰郎教授が就任した(委員会名簿は次章参照)。

4. 本PJ 第1期の成果

筆者が関与したPJ 第1期の成果を、筆者の総説¹⁰⁾から以下に引用する。

4-1. 新規変異発生技術

(株)海洋バイオテクノロジー研究所(以下「MBI」)の原山らは、カテコール2,3-酸素添加酵素を持つと考えられる培養系から抽出したゲノムDNAから、直接新規の酵素配列を取得するカセットPCR法を開発した¹⁸⁾(図9)。

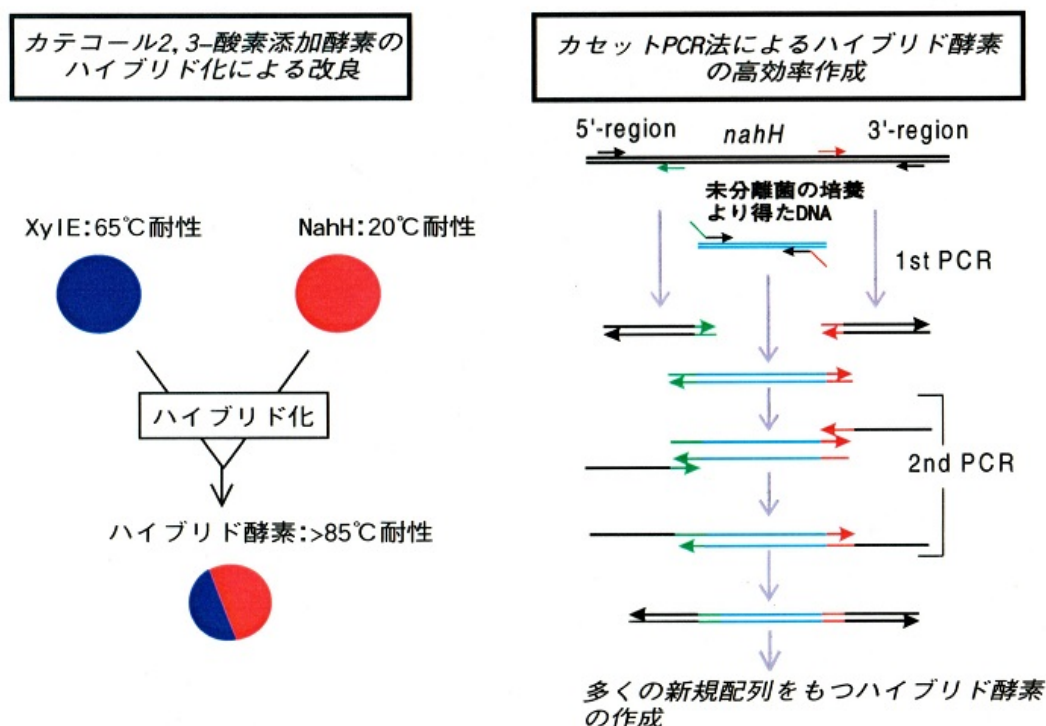


図9. カセットPCR法(MBI 提供)

生命工学工業技術研究所(以下「生命研」)の巖倉は、ジヒドロ葉酸還元酵素分子内での部分構造のシャフリングを試み、世界で初めて酵素活性を維持したままでトポロジー（二次構造単位の順番）変異体を作製した¹⁹⁾(図 10)。

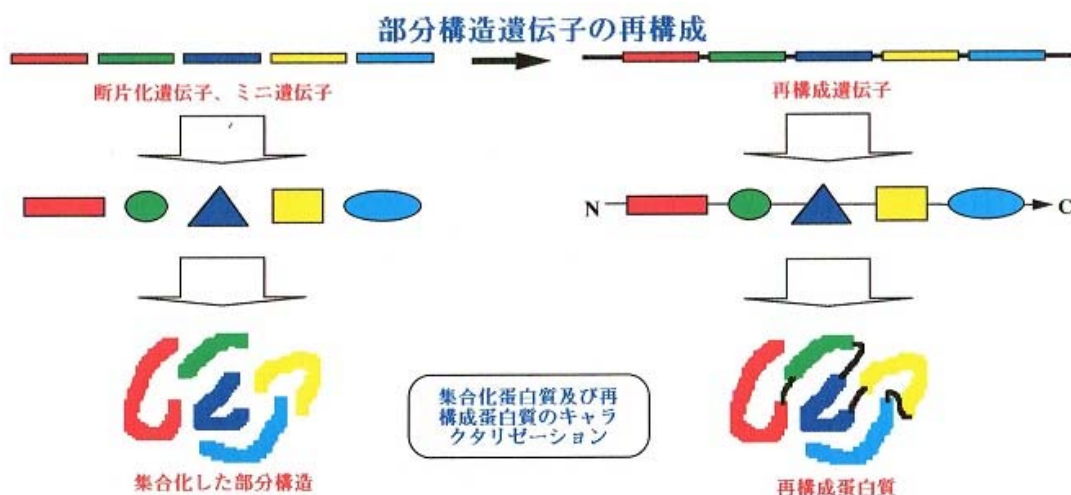


図 10. 構造単位再構成技術(生命研提供)

4-2. 遺伝子型と表現型の対応付け技術

住友電気工業(株)（以下「SEI」）の丹羽らは、ファージ呈示法より効率的な細菌呈示法の開発に取り組み、細菌発現系によるランダムなモチーフ（アミノ酸 10 個の機能単位）のライブラリー生成に成功した²⁰⁾（図 11）。

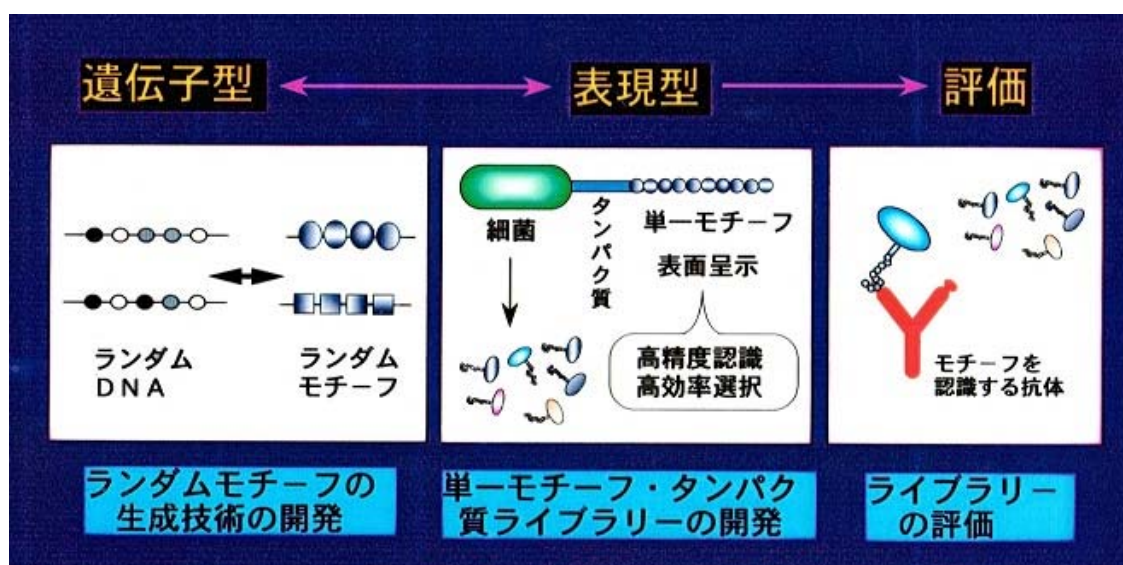


図 11. 細菌発現系によるランダムモチーフのライブラリー生成(SEI 提供)

4-3. 効率的選択技術

日本たばこ産業(株) (以下「JT」) の西らは、これまで報告の少ないアミド結合切断を触媒する抗体を効率的に選択するため、遷移状態アナログとしてホスホン産アミド化合物を合成し、これを選択用リガンドとする選択系を構築した²⁰⁾ (図 12)。

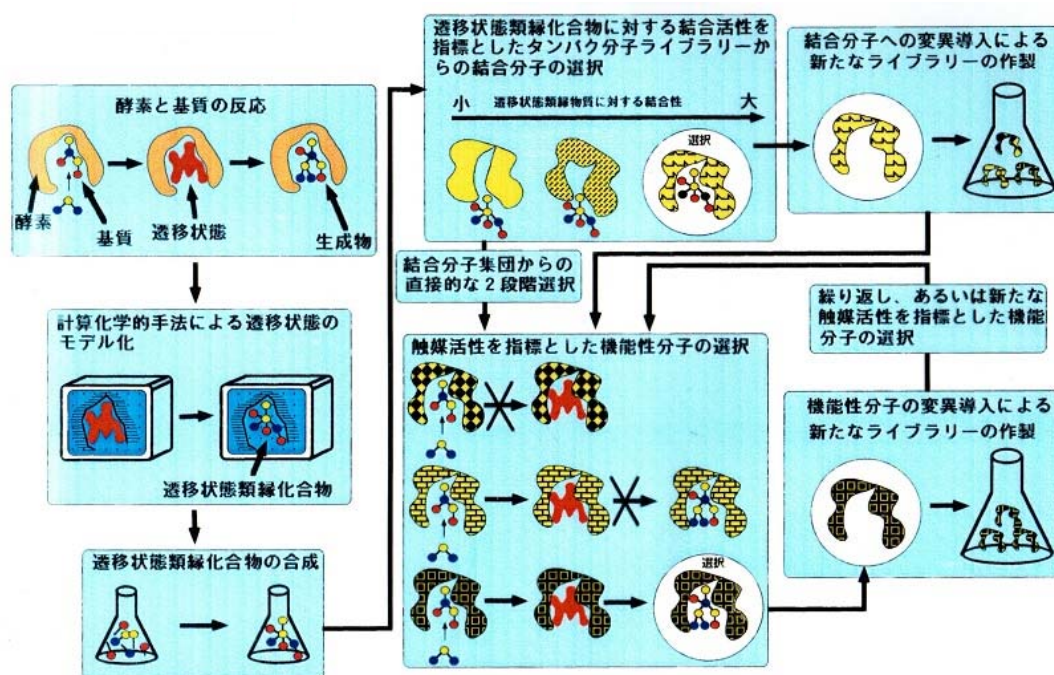


図 12, 効率的選択技術の開発(触媒機能選択系の構築)(JT 提供)

生命研の多比良らは、ジヒドロ葉酸還元酵素の翻訳系をリボザイム活性により制御できる発現ベクターを設計し、高活性リボザイムの生体内選択を可能とした²¹⁾ (図 13 左)。

生命研三石らは、グリコシダーゼ選択用リガンドとして、従来調整が極めて困難であった、分子量1万以上の糖鎖断片の調整方法について検討し、重合度4~36の範囲で完全に構造の定まったキシログルカン断片の調整に成功した²²⁾ (図 13 右)。

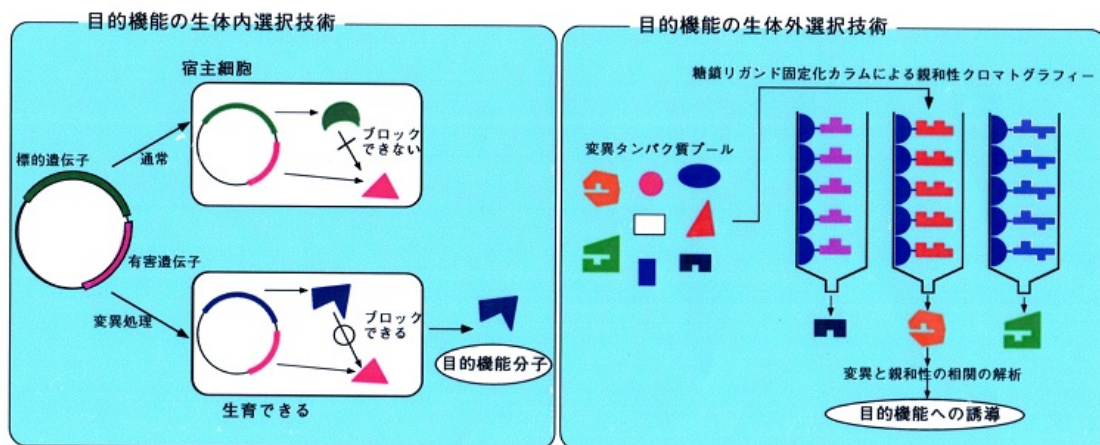


図 13. 生体内選択系(左)及び生体外選択系(右)の構築(生命研提供)

4-4. 適応歩行の効率化技術

日本チバガイギー(株)の小久保らは、ランダム変異と選択の繰り返しによりプロリルエンドペプチダーゼ (PEP) の耐熱性を 60 倍高めることに成功していたが、本 PJ において、耐熱性 PEP 変異体に導入されていたアミノ酸置換を解析し、適応歩行の過程を明確に視覚化した²³⁾ (図 14)。

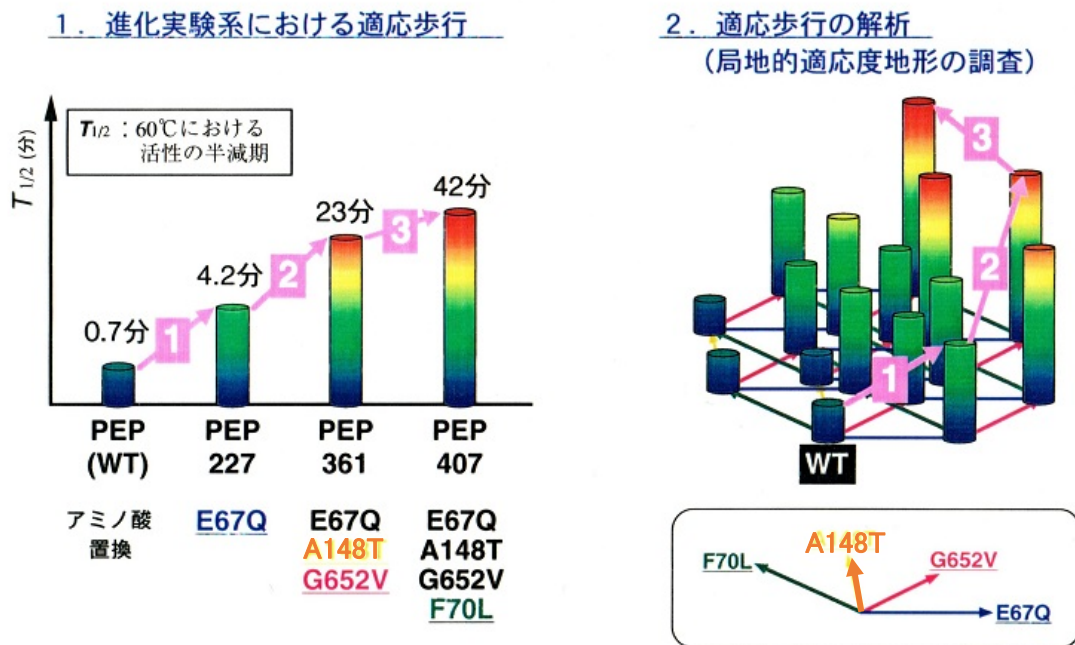


図 14. PEP 耐熱化の適応歩行(日本チバガイギー提供)

第5章 プロジェクト第2期の成果

本章は筆者がPJに関与していなかった期間の成果を内容とするため、NEDO から入手した「事業原簿」（PJ 全体を詳細に説明した文書）²⁵⁾から適宜引用する形で記述する。

1. 研究開発体制

第2期の研究開発体制は、基本的に前章の図7と同じだが、より詳細な研究開発体制図を図15に示す。

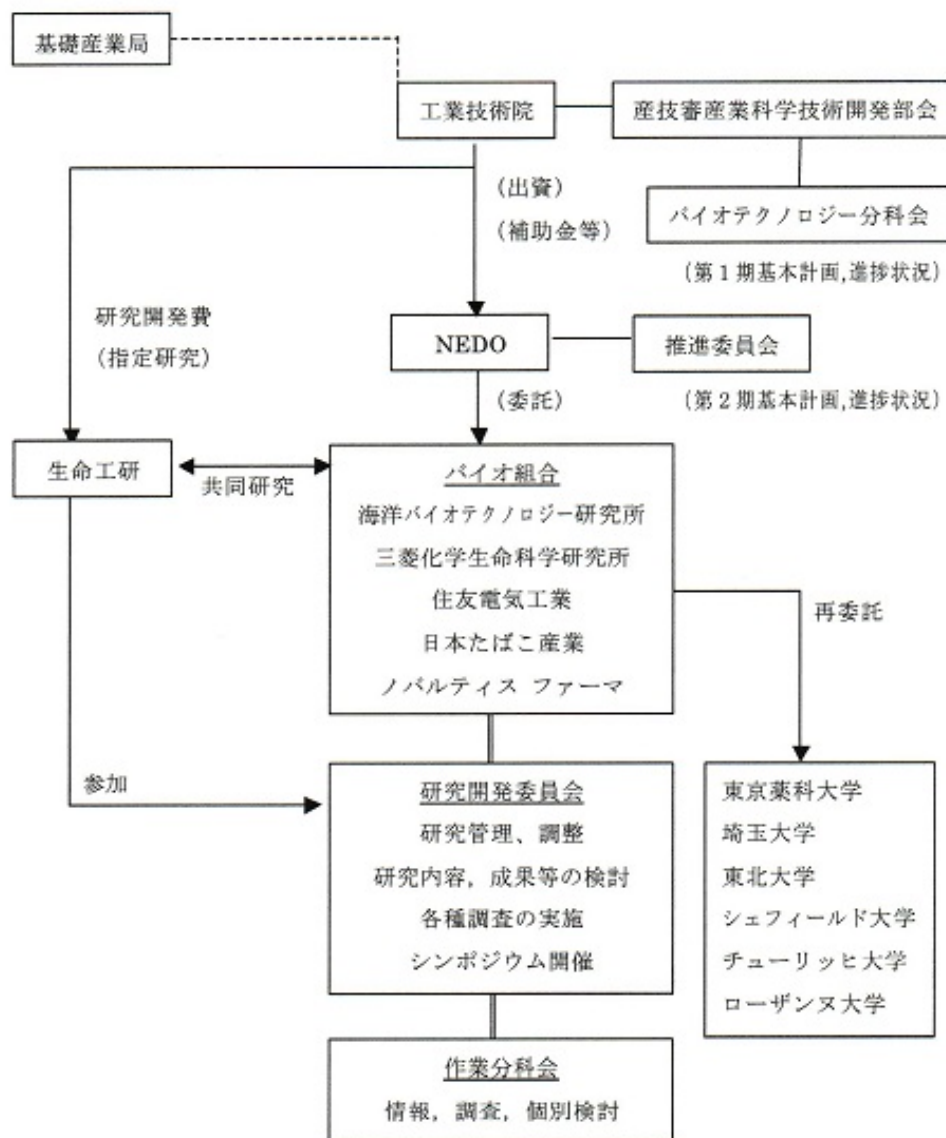


図15. 第2期の研究開発体制図²⁵⁾

チバガイギー社とサンド社が1996年に合併してノバルティス社が設立された。これに伴い日本チバガイギー社もサンド薬品社と合併してノバルティスファーマ社が設立され、組合員となった。

2. 研究開発実施体制

第2期の研究開発も、引き続き NEDO からの委託事業としてバイオ組合が実施した。具体的には、バイオ組合の組合員企業5社が持ち帰って実施する部分と、産総研と協同して実施する部分を有する。表7に研究開発テーマ及び研究開発項目ごとの担当企業等を示す。

表 7. 研究開発テーマ／研究開発項目ごとの担当企業等²⁵⁾

研究開発 テーマ	研究開発項目	担当企業等 研究開発責任者
1. モデル酵素 等の創製に よる進化実 験系構築技 術	①変異発生技術：DNA シャフリング 技術 「難分解性物質検出・分解用酵素等 の開発」	㈱海洋バイオテクノロジー研究所： 原山重明
	②変異発生技術：2段階変異技術 「バイオリクター用高機能酵素等 の開発」	産業技術総合研究所 巖倉正寛
	③変異発生技術：単位領域の組み合 わせ技術 「内分泌かく乱物質（環境ホルモン 等）除去用酵素等の開発」	㈱三菱化学学生命科学研究所 柳川弘志
	④遺伝子型と表現型の対応付け技 術：ペプチドライブラリー呈示技 術 「微量物質検出・分離用酵素等の開 発」	住友電気工業㈱ 平井洋平
	⑤効率的選択技術：多角的構造解析 技術 「生体内作動性酵素等の開発」	日本たばこ産業株 西 義介
	⑥解析・評価技術：適応歩行技術 「適応歩行の技術を利用した高性能 酵素等の開発」	ノバルティスファーマ㈱ 芝中安彦
2. 進化実験系 システムの 構築技術	モデル酵素等による最適進化実験系 システム技術	㈱海洋バイオテクノロジー研究所 原山重明
3. 総合調査研 究	再委託研究の管理	バイオテクノロジー開発技術研究 組合 木原哲昭

再委託研究

東京薬科大学：大島教授
好熱菌を利用した蛋白質進化実験系における変異体選択技術の開発
埼玉大学工学部：伏見教授
高機能性生体高分子の進化的設計法
東北大学大学院工学研究科：熊谷教授
生体外選択系による高機能・新機能抗体の開発と応用
シェフィールド大学：Dr. David Rice
医療応用のための新規な触媒抗体の開発
チューリッヒ大学：Prof. P. Christen
酵素の定向分子進化
ローザンヌ大学：Dr. Igor Fisch
試験管内進化による高親和性ペプチド分子の分離

研究開発委員会名簿を表 8 に、研究開発委員会等の開催実績を表 9 に示す。

表8. 研究開発委員会²⁵⁾

〔委員長〕	
大 島 泰 郎	東京薬科大学 生命科学部 学部長
〔委 員〕	
伏 見 譲	埼玉大学工学部 機能材料工学科 教授
遠 藤 弥 重 太	愛媛大学工学部 応用化学科 教授
熊 谷 泉	東北大学大学院 工学研究科 教授
巖 倉 正 寛	独立行政法人産業技術総合研究所 生物機能工学研究部門 総括研究員
原 山 重 明	㈱海洋バイオテクノロジー研究所 釜石研究所所長
柳 川 弘 志	㈱三菱化学生命科学研究所 トランスレイショナル研究部 連携研究員
平 井 洋 平	住友電気工業㈱ 大阪研究所 EPM開発室 主席
西 義 介	日本たばこ産業㈱ 生命分子工学研究プロジェクトチーム 調査役
芝 中 安 彦	ノバルティスファーマ㈱ 筑波研究所 グループリーダー
木 原 哲 昭	バイオテクノロジー開発技術研究組合 技術部担当部長

表 9. 研究開発委員会等の開催実績 ²⁵⁾

年月日	会議名 (研究開発委員会)	内容
H11. 10. 14	11年度第1回	研究計画検討
H12. 2. 18	11年度第2回	研究成果検討
H12. 10. 19	12年度第1回	研究計画検討
H13. 2. 23	12年度第2回	研究成果検討
H13. 10. 19	13年度第1回	研究計画検討
H14. 2. 22	13年度第2回	研究成果検討
(作業分科会)		
H11. 7. 1～2	11年度第1回	研究計画検討および見学会
H12. 7. 6～7	12年度第1回	研究計画検討および見学会
H13. 7. 5～6	13年度第1回	研究計画検討および見学会

3. プロジェクト第2期の成果

プロジェクト第2期の特筆すべき成果を、表7の研究開発項目に沿って「事業原簿 ²⁵⁾」から引用する。

①DNAシャフリング技術開発

新しいDNAシャフリング法の開発、新規DNAシャフリング法の検証、環境汚染物質分解酵素の改良を行い、カセットPCR法、2種類のファミリーシャフリング法の開発、カテコール-2,3-酸素添加酵素の基質特異性、耐熱性の改善に成功し、さらにフェノール分解酵素、ビフェニル分解酵素を用い、それぞれトリクロロエチレン、ポリ塩化ビフェニルの分解能力を向上させた。

②2段階変異技術の開発

配列空間探索による蛋白質デザインを提唱し、高活性・抗酸化能の付与、補酵素特異性を完全に転換することに成功すると共に、配向制御した新しい固定化反応の開発とキャプチャー反応の導入により固定化効率80%以上を達成した。このような成果は、天然由来蛋白質を生体外利用のために必要とされる改良を確実に実行することができる方法を提供するとともに、長寿命特性、好悪運殺菌処理特性、など食品や医薬品製造プロセスにおいて要望されながらなかなか達成困難であった問題点の解消に大きく貢献するものと考えられる。

③単位領域の組み合わせ技術の開発

相同配列をもたない任意のDNA断片を連結できるRandom Multi-recombinant PCR (RM-PCR)法を確立し、ヒト・エストロゲン受容体リガンド結合ドメイン (hER LBD) を用いた人工選択的スプライシングDNAライブラリーの構築に成功した。また、試験管内において遺伝子と蛋白質を対応付ける技術であるin vitro virus法を確立し、これに上記ライブラリーを適用してin vitro virus

のライブラリーを構築し、内分泌攪乱物質の一種と考えられているビスフェノールAの結合蛋白質を取得するための条件検討を行った。さらに、RM-PCR法を用い、hER LBD由来の10個のビルディングブロックと蛋白質のフォールディングの観点から興味深いカメレオン配列、G-peptide、バルナーゼの β -ターン領域をランダムに組み合わせたランダムシャッフリングライブラリーを構築した。

④ペプチドライブラリー呈示技術の開発

第1期に開発したランダムペプチドライブラリーのベクターを改良するとともに、スクリーニングの方法について最適化を行った。その結果、高効率かつ高発現型の新規ランダムペプチドライブラリーを構築できた。このライブラリーは、操作の簡便性、呈示ペプチドの量とともに従来用いられて来たものより遥かに高性能であり、これを用いて重金属イオン結合モチーフの取得や細胞に対してシグナル導入活性を持った細胞応答誘導ペプチドの単離に成功した。また、確立した技術の中心要素である発現ベクターは、それ自体で既知の活性ペプチドモチーフに任意の割合で変異を導入した類似ペプチド群の調製にも有用であった。

⑤多角的構造解析技術の開発

(1/1)Phe Ψ (C00)Gly) 分解分子の解析を行い、選択用プローブ分子内の遷移状態類似部分と水素結合をして、相互作用する残基が存在すること、選択用プローブ分子と結合するが酵素活性のないアダプター分子ではこのような特異配列は見られない。NMR とBiaCore の解析で、酵素分子ではアダプター分子に比べ、基質に対して、on/off の速度が遅いことなどを明らかにした。また、基質に対する結合性を下げる選択用分子に対するパニングにより、活性が1/20の変異体の取得に成功した。抗体分子の超可変領域に変異をコンビナトリアルに導入した変異集団の中から、選択用プローブに対する結合性に優性と考えられる変異を選択する系を開発した。さらに、顆粒球コロニー刺激因子G-CSF（骨髄に作用して白血球数を増加させる）誘導性のトランスデューサー分子を用いて、この分子に結合する新規分子の発現クローニングに成功し、この分子が免疫系の中でも、単球、マクロファージ細胞上に特有に出現し、トランスデューサー分子との結合により、細胞にG-CSF の誘導性を引き起こすことを明らかにした。

⑥適応歩行技術の開発

高機能性蛋白質実用化研究として、プロリルエンドペプチダーゼ（PEP）の耐熱性変異体のスクリーニングを行い、60℃における活性の半減期が野生型の

約2,000倍を示す変異体を得た。また、進化分子工学の実用化研究として、変異交配法（Mutation scrambling法）における多重置換体スクリーニング効率をさらに高めることを目指したバイアスをかけた変異交配法（Biased mutation scrambling法）を考案し、その有効性を確認した。同時に、乳酸酸化酵素の耐熱性、比活性の改変をモデルに、2つ以上の特性を同時に改変することを目指した多次元適応歩行法を考案し、その有効性を検証した。その結果、従来の耐熱性変異体よりも10倍高い比活性を有し、同程度の耐熱性を有する変異体や、65℃における耐熱性が野生型の4倍程度で、比活性が1.3倍の変異体を得ることができた。また、*Acinetobacter calcoaceticus*由来のグルコース脱水素酵素Bをモデルとし、本手法による変異体探索を実施した。その結果、グルコースへの反応性は野生型の約30%を保持する一方で、マルトースへの反応性が野生型の数%にまで低下した変異体の取得に成功した。

⑦モデル酵素等による最適進化実験系システム技術の開発

進化実験系システムの確立及び実用化に向けた検討を行い、スパーサーにより連結したランダムペプチドのファージディスプレイシステムの構築、蛍光蛋白質を発現する大腸菌の表面にランダムペプチドを呈示させ、フローサイトメーターで抗原結合細胞を選択するシステムの構築、フェナントレン結合ペプチドの取得、酵素阻害性ペプチドの取得、さらに、酵素活性を持つペプチドの取得に成功した。

第2期における対外発表等

論文発表	106 件（うち Nature, Proc. Natl. Acad. Sci. USA など国際専門誌への掲載 68 件）
口頭発表	249 件
特許出願	（第1期から通算）日本 27 件、外国 5 件 合計 32 件
新聞等報道	28 件

トピックス：NEDO 事後評価

NEDO において実施された、本 PJ 事後評価の総合評価は次の通りである²⁵⁾。蛋白質の時代と言われる状況下、機能性蛋白質創製の次世代最先端技術である新規かつ複数の進化分子工学手法を開発した成果と意義は大きく、国家プロジェクトとして推進した先見性は高く評価できる。実際に産業応用可能な蛋白質の創製に繋がった結果も得られ、成果のライセンス・アウトの事例もある。プロジェクト終了後も一部の実施機関では、継続して研究への取り組みが行われており、今後は幅広い企業にこの技術が導入され、普及することを望む。

4. 本PJの研究開発成果

NEDOの事後評価では研究開発成果について次のように評価された²⁵⁾。

「新しい進化分子工学を用いた基盤技術の開発という意味では、世界に誇れる新発明を複数個生み出している。また、それらに関する基本特許も申請され、学会などを通じてインパクトの高い論文も複数発表され、広報活動も適切に行われている。個々の研究成果の中には、世界的水準を抜きん出たものも認められ、ライセンス契約などの段階に進んでいるものもあり、成果が普及され、社会に還元されつつある。従って、目標の達成度及び成果については概ね良好であったと判断する。ただし、特許の取得にはさらなる努力が必要と思われる。さらに、本プロジェクトで開発された新規技術と従来技術との組み合わせを多用することによって、全く新しい機能を持つ蛋白質がより多く創製されることを期待する。」

本PJの波及効果として、筆者の一番印象に残ったことは、本PJの進行に伴って、「進化分子工学」あるいは「分子進化工学」という分野が、関連学会において一つの領域を形成したことである。学会において、それらの名称で、シンポジウムが開かれたり、口頭発表やポスター発表の分野となったりした。さらに、バイオ企業においても、進化分子工学的手法による酵素の改変等が普遍的技術として普及した。

おわりに

30年ほど前の時代におけるナショプロ誕生の一つの典型例として、加速型生物機能構築技術（タイムマシンバイオ）プロジェクトの誕生経緯を記録しておく意義があるのではないかと思いますと執筆した。その後の時代の変遷を経て、ナショプロ誕生の経緯がかなり変貌しているのは事実であり、ナショプロに関わる読者の参考にはならないかもしれないが、ナショプロ誕生を目指し、関係者が一丸となって情熱を傾け、奮闘した経緯を、情報共有していただければ幸いである。文中の多くの部分が、議事録の掲載のようになってしまったが、本PJ誕生の経緯を生々しく再現する方法としてご理解いただければ幸いである。

本PJに参加した研究者は、皆誠意をもってPJ研究推進に取り組んだと認識している。研究者にとって、ナショプロへの参加意義は、5年なり7年なりのある程度長期間、安定した研究環境のもとで、ナショプロの目標達成に向けた研究に従事する中で、基礎的研究にも取り組むことができ、優れた学会発表、論文投稿も可能となることである。本稿読者の研究者の方々が、ナショプロに参加する意義を、ナショプロ誕生秘話から少しでも感じとっていただければ望外の喜びである。

参考文献

- 1) 伏見 譲 (1993) 蛋白質 核酸 酵素, **38** : 1338~1344
- 2) Joyce, G. F. (1993) 日経サイエンス, **23** : 65~75
- 3) 小久保利雄・三沢 悟・西川 諭 (1994) 蛋白質 核酸 酵素, **39** : 2821~2825
- 4) 寺部真人 (1996) 蛋白質 核酸 酵素, **41** : 166~169
- 5) 巖倉正寛・三石 安・中村吉宏 (1996) バイオサイエンスとインダストリー, **54** : 706~711
- 6) Mills, D. R., *et al.* (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58** : 217~224
- 7) Eigen, M. and W. Cardiner (1964) *Pure and Appl. Chem.*, **56** : 967~978
- 8) Husimi, Y. (1989) *Adv. Biophys.*, **25** : 1~43
- 9) 岸田純之助 (1994) *Techno Current*, **135** : 1~17
- 10) 中村吉宏 (1997) BRIN テクノニュース, **61** : 1~4
- 11) 日本貿易振興会 (ジェトロ) (1994) 「日本と米国における加速型生物機能構築技術調査研究の現状と研究協力の可能性」
- 12) Ellington, A. D. and J.W. Szostak (1990) *Nature*, **346** : 818~822
- 13) Tuerk, C. and L. Gold (1990) *Science*, **249** : 505~510
- 14) Smith, G. P. (1985) *Science*, **228** : 1315~1317
- 15) Arnold, F. H. (1993) *FASEB*, **7** : 744~749
- 16) Moore, J. C. and F. H. Arnold (1996) *Nature Biotechnology*, **14** : 458~467
- 17) 新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) / (株) 旭リサーチセンター (1995) 平成 6 年度調査報告書「加速型生物機能構築技術の先導研究」報告書管理番号 010007660
- 18) 奥田明子・大西浩平・原山重明 (1996) 平成 8 年度日本生物工学会大会講演要旨集、p. 223
- 19) Iwakura, M. (1996) *Protein Sci.*, **5**, suppl. 1 : 68
- 20) 丹羽慎一郎ら (1996) 第 14 回バイオテクノロジーシンポジウム予稿集 (バイオテクノロジー開発技術研究組合) , p. 292~296
- 21) 西義介ら (1996) 同上, p. 297~302
- 22) Hujita, S., *et al* (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** : 391~396
- 23) Mitsuishi, Y. (1996) Abstracts, New Frontiers in Screening for Microbial Biocatalysts, Symposium, Netherland, P. 48
- 24) 内山秀文・副島豊美・稲岡哲也・小久保利雄 (1996) 日本生物部物理学会第 34 回大会講演予稿集、p. S208
- 25) 新エネルギー・産業技術総合開発機構バイオテクノロジー開発室 (2002) 「加速型生物機能構築技術 (タイムマシンバイオ)」事業原簿

謝辞

本PJスタートの前々年度、平成5年度に実施した米国調査に関し、報告書の引用をご承認していただいた、JETRO 機械技術部の方々、また平成6年度に実施した先導研究の報告書を提供していただいた NEDO 広報部の方々及び(株)旭リサーチセンターの方々、並びに本PJの「事後評価報告書」を提供していただいた NEDO 評価部の方々、更にこれらの資料の入手についてアドバイスしていただいた、産総研戦略企画部生命工学研究領域の方々に、心から感謝申し上げます。

略歴 中村 吉宏 (Nakamura Yoshihiro)

1966年（昭和41年）3月	東京大学農学部農芸化学科卒業 (1984年（昭和59年）3月 農学博士（東京大学）)
1966年（昭和41年）4月	通産省工業技術院発酵研究所（後の微生物工業技術研究所）入所
1984年（昭和59年）4月	同所微生物管理室長
1986年（昭和61年）4月	同所特許微生物寄託センター長
1989年（平成元年）4月	同所研究企画官
1993年（平成5年）1月	通産省工業技術院生命工学工業技術研究所生物反応工学部長
1997年（平成9年）4月	岡山県理事・岡山県工業技術センター所長
1999年（平成11年）4月	通産省工業技術院生命工学工業技術研究所主任研究官
2001年（平成13年）4月	独立行政法人産業技術総合研究所第六事業所管理監 兼産学官連携コーディネータ
2001年（平成13年）6月 ～2003年（平成15年）3月	東京工業大学客員教授（フロンティア創造共同研究センター）
2003年（平成15年）4月	独立行政法人産業技術総合研究所研究コーディネータ 兼産学官連携コーディネータ（ライフサイエンス担当）
2004年（平成16年）3月	同所定年退職
2004年（平成16年）4月 ～	社団法人日本画像医療システム工業会常務理事、独立行政法人産業技術総合研究所招聘研究員、幹細胞評価基盤技術研究組合専務理事等を歴任
2012年（平成24年）4月	産総研名誉リサーチャー
2019年（令和元年）7月 ～現在に至る	幹細胞評価基盤技術研究組合退職

受理日:令和4年7月17日 一部変更:令和4年8月10日