1M0915

模擬海底熱水環境下での核酸（AMP）の重合

○吉田 歩、今井 栄一、本多 元、羽鳥 晋由、松野 孝一郎（長岡技術科学大学・生物系）

化学進化の場として、海底熱水噴出孔が注目されている。この熱水環境を実験室で再現したものが、進化フローリアクターである。進化フローリアクターは、高温・高圧環境と低温・高圧環境がノズルを介して接続された非平衡な反応システムであり、この反応系では、高温・高圧部で起こった合成反応による生成物を、低温・高圧部に噴出させることにより急激に冷却させ、分解を抑制することを可能としている。

この進化フローリアクターを用いて、アデニル酸（adenosine 5'-monophosphate）の重合を試みた。出発物質として、20mM AMP とピロリン酸の混合溶液（pH 2.0～3.0）を用いており、銅イオン、亜鉛イオンなどの金属イオンを 1mM 添加した。高温・高圧部は 110℃・24MPa、低温・高圧部は 0℃・24MPa でそれぞれ一定とし、連続的に 2 時間以上行なった。実験開始から、一定時間ごとに流路内の物質をサンプリングしておき以下の分析を行った。

採取された試料は、陰イオン交換カラムによる HPLC で分析を行い、生成物として 2 量体、3 量体のそれぞれの標準物質の Retention time に相当する部分にピークが認められた。Phosphodiesterase I、Nuclease P1 による酵素処理でそれぞれのピークの著しい減少を確認した。現在、モノマーからのオリゴマーの生成の他に、Poly(A) の加水分解によって生じたモノマー・オリゴマーを用いて、重合度の伸長についても実験を行っている。

A.Yoshida,E.Imai,H.Honda,K.Hatori,K.Matsuno: Oligomerization of Adenosine Monophosphate in a Simulated Hydrothermal Environment

1M0945

3SR 進化リアクタにおいて DNA 増幅機構が進化する機構とその制御

○小宮 昇一、山本 裕二、伏見 譲（埼玉大・工）

転写反応と逆転写酵素を組み合わせた DNA 分子の等温増幅法である 3SR を用いると自然淘汰型進化リアクタが構築できるが、これを継代植継ぎ実験によりエミュレートした。この進化リアクタに、プロモータプライマー領域と逆転写プライマー領域との間に 60mer の 4 塩基ランダム配列領域を導入した DNA プールを投入すると、逆転写プライマーのみで増幅するヘアピン一本鎖 DNA が進化してくるという現象が毎回起こった。すなわち、3SR 増幅機構から RNA-Z 様増幅機構への進化が観測された（以上、発表済み）。これでは、進化リアクタを機能性分子の創出に用いることができない。そこで、我々は安定な 3SR 進化リアクタの構築ために、増幅機構が進化するメカニズムを解明し、さらに、RNA-Z 様増幅機構を抑える方法を考案した。

進化機構を調べるために、上述と同様のランダム DNA プールを新たに作成し、3SR 回分反応を長時間（3hr）行なった。この反応で増幅してきた配列は、初期に投入したランダムプール DNA と、プロモータプライマーの配列を含むヘアピン一本鎖 DNA であった。このヘアピン一本鎖 DNA は、プロモータプライマーのみで、RNA-Z 様増幅機構により増幅していることが判った。また、このヘアピン一本鎖 DNA はランダムプール（diversity 10^{10} ）から派生するものであろうと解釈できた。この増幅機構における倍加時間は約 5 分で、3SR 増幅機構のもの約 1/3 倍であった。すなわち、3SR 増幅機構をエンコードした分子から RNA-Z 様増幅機構をエンコードした分子への進化が起り得る。また、このヘアピン一本鎖 DNA は、RNA-Z 様増幅機構を効果的に阻害するインヒビター（3' 末端を FITC で修飾したアンチセンス（プロモータ配列）DNA オリゴマー）を反応系にプライマーより過剰量入れることで、増幅されなくなった。3SR 進化リアクタは、このインヒビターにより安定化できることが判った。

S.Komiya, Y.Yamamoto, Y.Husimi: Analysis and control of the evolution of the amplification mechanism in 3SR evolution reactor

1M0930

lac プロモータの細胞型進化分子工学 IV

○斎藤 知明¹、伊藤 洋一郎²、伏見 譲¹（¹埼玉大工、²埼玉大工、現・阪大工）

本研究は大腸菌プロモータの適応度地形の探索及びプロモータ強度最適化を目的としている。大腸菌プロモータ強度を GFP の蛍光強度に変換し、大腸菌を遺伝子型と表現型を対応づけるための袋とみなして、蛍光セルソータによりランダム突然変異集団を高スループットで評価し、淘汰を行う進化実験系を構築した。lac プロモータを出発配列とし、その -10 領域と -35 領域を含む 42 塩基対を変異導入部位とした。このプロモータの下流に GFP 遺伝子を持つプラスミドを構築した。蛍光強度の高い大腸菌を、蛍光セルソータによる評価と培養による増殖を繰り返すことで淘汰した。GFP の過剰発現による大腸菌の死滅を避けるため、プラスミドはコピー数約 50、15 と 5 のレプリコンを切り替えて使用した。さらに高いプロモータ強度を持つ配列を探索するため、コピー数の小さいレプリコンを用いた上に、さらに翻訳効率を減少させた SD 配列を導入した。突然変異率 0.05 で作成した突然変異体集団を用いた淘汰実験より、(1) -10 領域と -35 領域間のスパーサー長は 17 塩基が最もプロモータ強度が高かった。(2) 有利突然変異の変異箇所と変異頻度の傾向は、RNA ポリメラーゼとプロモータとの close-complex 形成または open-complex 形成に関与しているという先行研究と一致する結果が得られた。有利突然変異体の変異を蓄積することで、局所的な適応度地形を探索した。その結果、転写開始反応を見かけの一段階反応で近似した場合、有利突然変異の効果は統計的に累積的であった。この二次突然変異体集団の有利突然変異にコンセンサス配列を組み合わせた新規変異体集団を作成、淘汰実験を行った。その結果、上記と同様に有利突然変異の効果は累積的であった。また、trc プロモータより約 1.2 倍高い変異体を得た。なお、我々の実験系ではレポータとして GFP を利用しているので mRNA 量と GFP の蛍光強度の相関関係を調査している。

T.Saitou, Y.Ito, Y.Husimi: Evolutionary molecular engineering of cell-type for lac promoter IV

1M1000

生命はリボソームから生まれた

○池上 明¹、南 早苗²、重定 南奈子²（¹自宅、²奈良女子大・理・情報科学）

物質系から生命が生まれるための重要な過程として、1) 非生物的に生命形成に必要な有機分子が創り出される過程、2) ほほは平衡な状態にある環境から、生命活動に不可欠な物質やエネルギーを獲得し、それを利用するような非可逆的な系を自から形成する過程、3) 自己複製系が生まれる過程がある。ここでは 2) の代表的な非可逆過程である代謝系が形成される過程について一つのモデルを提出し、その創生、進化の速度を議論する。モデルは有機分子が豊富に存在し、ほほは平衡な状態にある原始の海で、脂質状分子が集合して、熱力学的に安定なリボソームが存在している状態から出発する。リボソームの膜を自由に透過する分子 S1 を S2 に変換する原酵素 E1 が低い確率で形成される。S2 が膜を透過出来ないと、リボソーム内に蓄積され、次の原酵素 E2 が生まれる確率がふえる。同様な過程が膜を自由に透過できる分子 S_n+1 が生まれるまで続き、長い代謝系が形成される。この代謝系を非可逆的に流す原動力は S1 分子の内部エネルギーで、原理的には海水中の全 S1 が無くなるまで続く。ここでは原酵素 E_i が生まれる過程として、S_i を鋳型とする基質誘導型と E_i 自身を鋳型とする自己複製型が想定される。この二つの原酵素形成過程を含んだ代謝系形成理論を基に、種々の条件での代謝系の創生と進化を議論する。この結果は RNA が先か、タンパクが先かの議論とも関係する。

A.Ikegami,S.Minami and N.Shigesada: Origin of life from liposomes