B733

高温等温核酸増幅を用いた自然淘汰型進化リアクターの構築

○小島 進也、小池 充烈、永安 弘樹、伏見 譲（埼玉大・工）

本研究は、等温核酸増幅法である 3 S R (Self-Sustained Sequence Replication) 法及びRNA-Z法を用いて、DNA分子の自然淘汰型進化リアクター（比増殖速度を適応度とする）を構築することを目的としている。これを実現するためにフローリアクターを作製中であるが、ここでは継代植継ぎ実験で模擬した研究を報告する。反応に用いるDNAプールは4塩基ランダム配列領域を導入しているため、3SR法を低温の等温で用いたときはミスハイブリダイゼーションやセルフプライミングが起りやすく、結果として非特異的な産物が生じることがある。さらに3SR増幅機構からRNA-Z増幅機構へ進化する現象も観察されている（発表済み）。そこで系の温度を37℃から50℃に上昇させることにした。耐熱性RNAポリメラーゼと1.4Mトレハロースを使用することで50℃での等温核酸増幅に成功した。トレハロース1.4M未満では3SR反応の二本鎖産物の生成率が悪い。ここで見出された系を、50℃における最適のプロモータ配列を探索するために用いた。T7プロモータ配列（17mer）に4塩基ランダム配列領域を導入したDNAプール（diversity：4¹⁷≒10¹⁰を理論上全て含む）を用いてRNA-Z法による継代植継ぎ実験を行った。7ラウンドの植継ぎの後の勝ち残った配列は、コンセンサス配列からハミング距離3以内にあり、またそれは37℃の最適化T7プロモータ配列（R.R.Breaker, et al, 1994）からハミング距離が1だけ離れたものであった。T7プロモータ配列の適応度地形は単峰性でありピーク位置は温度依存（あるいはトレハロース依存）であることが示唆された。

S.Kojima, M.Koiike, H.Nagayasu and Y.Husimi：Construction of a Natural-Selection-type Evolution Reactor Based on Isothermal DNA Amplification at High Temperature

B735

ホヤ新奇Gタンパク質の発現調節領域の検索

川島 一夫、○岩佐 達郎（室蘭工大・材料物性）

我々はホヤ幼生より新奇なGタンパク質遺伝子をクローニングし、それをHrGnと名付けた。HrGnは予想されるアミノ酸配列の同源性から、Giクラスに属するGタンパク質と考えられるが、そのC末端アミノ酸配列はGiクラスGタンパク質αサブユニットに保存されている百日咳毒素の基質となるCysを欠いているだけでなく、これまで報告されていない全く新奇なものであった。Gタンパク質αサブユニットのC末端部位は受容体との相互作用部位であることが知られており、このことより、HrGnは新奇な受容体と共役していることが期待できる。このHrGnの生理機能を探るために変異HrGn遺伝子を用いることを考えた。この場合、非特異的発現を押さえるためにHrGnの発現調節領域を用いることが望ましいので、HrGnの発現調節部位を検索することにした。まず、HrGn遺伝子上流6Kbpをクローニングし、全配列を明らかにした。次に、上流3.1KbpとGFPの融合遺伝子を作成し、ホヤ卵に顕微注入してGFPの発現を観察したところ、上流3.1KbpにHrGnの部位特異的発現をコントロールする部位の含まれていることが分かった。そこで、上流配列を種々の長さには削除したものを作製した。その結果、HrGnの翻訳開始コドンであるATGを1としてHrGn遺伝子上流-2kbp～+55bpまでの長さの異なる13クローンを得ることができた。これらをマボヤ卵に注入して調べたところ、上流1511bpと1017bpの間の配列内に発現調節部位があると結論できた。この間を更に詳細に検討して、上流1257bp～1017bpの間にまで絞り込むことができた。得られたHrGn発現調節領域の下流に種々の変異HrGn遺伝子をつなぎ、ホヤ卵で部位特異的に発現させることにより、HrGnの生理機能を解明できるものと期待される。

K. Kawashima and T. Iwasa：Promoter Sequence of the Novel G Protein Alpha-Subunit Gene of Ascidian Embryo

B734

RNAポリメラーゼの分子メモリー機能を使った転写活性化の存在とその意義

○須佐 太樹¹、久堀 智子^{1,2}、永井 宏樹^{1,2}、嶋本 伸雄¹（¹国立遺伝研、²エール大）

大腸菌RNAポリメラーゼの転写開始機構はこれまで直列の経路が想定されてきたが、当研究室において実際にはそれが分岐していることを見いだした。分岐の結果、均質なRNAポリメラーゼ分子から活性型と不活性型（moribund）という、少なくとも2種類の構造の異なる複合体がプロモーター配列に依存した比率で形成される。さらに、活性型と不活性型の変換は転写因子GreA, GreBの存在下で可逆的になり、反応条件によって活性型と不活性型の比率が変化する。以上の結果から、大腸菌RNAポリメラーゼは複数の安定構造を記憶できる「分子メモリー機能」を有していると考えられる。分子メモリー機能を使えば、環境変化に応じて活性型RNAポリメラーゼの比率を増加させる（転写を活性化させる）ことが可能である。この「分子メモリー機能による転写活性化」が生体内で使われているか検証するために、我々はメモリー機能に関与する*greA*, *greB* 遺伝子を破壊した大腸菌変異株を調製し、野生株と変異株における遺伝子発現パターンをDNA array およびNorthern解析で比較した。その結果、*atpC* (*uncC*)、*cspA*、*rpsA*などの遺伝子の転写量が*greA*, *greB* 遺伝子破壊によって減少することがわかった。in vitro転写実験により、これらのプロモーターからの転写量はGreA, GreB依存に増加すること、および活性型の他に不活性型のRNAポリメラーゼも形成されることが明らかになった。以上から、実際に大腸菌の中でRNAポリメラーゼの分子メモリー機能が使われていると考えられる。分子メモリー機能による転写制御は、反応速度の調節による制御と比べて、1）転写不活性状態を長く維持できる、2）律速段階の変化を伴う環境変化の影響を受けない、などのメリットがある。このようなメリットのために、分子メモリー機能は進化の過程で淘汰されず生き残ってきたのかもしれない。

M.Susa, T.Kubori, H.Nagai and N.Shimamoto：Use of memory function by RNA polymerase in transcription regulation and its physiological significance

B736

大腸菌多世代培養による自然突然変異率の測定と解析

○三浦 崇、福士 洋祐、西垣 功一（埼玉大・工）

我々はすでにゲノム解析技術 Genome profiling (GP) により、変異原物質の変異原性強度を高感度に測定する方法 (Genome profiling-based mutation assay:GPMA) を開発した (生物物理学会第39回年会)。この方法ではゲノム塩基配列に生じた低頻度突然変異を数10kbの塩基配列決定に相当する解析により直接観測することになる。我々はこの方法により、以下の知見を得た。1) 自然突然変異によるゲノムの変異は世代を経るごとに増大する。2) 自然突然変異率は必ずしも一定ではない。現在、さらに多くの多世代培養データを収集中であるが、一方で、これらの結果を説明する理論モデルを「全個体ヒストリー記述方式」を採用し構築中である。このモデルでは各大腸菌はゲノムに蓄積した変異量と、それに応じて変化する倍加速度、変異率といったパラメーターで表されるような増殖と変異を繰り返す。増殖は、個体数一定という淘汰圧の下で多世代にわたり行った。このシミュレーションから、上述の現象を説明するパラメーターを求めて、考察する。

T.Miura,Y.Fukushi and K.Nishigaki：Measurement and analysis of the spontaneous mutation rate by multi-generation culture of E.coli