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 R N A − Z 法を用いて、D N A 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 D N A プールは 4 塩基ランダム配列領域を導入しているため、3 S R 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 3 S R 増幅機構から R N A − 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 3 7 ℃ から 5 0 ℃ に上昇させることにした。耐熱性 R N A ポリメラーゼと 1 . 4 M トレハロースを使用することで 5 0 ℃ での等温核酸増幅に成功した。トレハロース 1 . 4 M 未満では 3 S R 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、5 0 ℃ 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。T 7 プロモータ配列（1 7 m e r）に 4 塩基ランダム配列領域を導入した D N A プール（diversity：4¹⁷ ≒ 1 0¹⁰ を理論上全て含む）を用いて R N A − 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 3 7 ℃ の最適化 T 7 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。T 7 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.Koike, 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 6 Kbp 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）転写不活性价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