

1T41

核酸結合蛋白質におけるリン酸結合モジュールのシャッフリング

○由良敬郷通子

名大・院・理・生命理学

DNA ポリメラーゼベータ、434Cro 及び Arc リプレッサーには共通のリン酸結合ヘリックス・ターン・ヘリックスモジュール(pbHTH)が存在することを示してきた。このモジュールは類似の立体構造を持っており、C末端側のヘリックスのN末端に存在する主鎖の-NHがDNAのリン酸基と水素結合している。立体構造が類似であること及び機能が類似であることから、このpbHTHモジュールは、モジュールのシャッフリングによって異なる蛋白質に取り込まれたのであろうと考えられる。真核生物由来の蛋白質であるDNAポリメラーゼベータでは、pbHTHモジュールのC末端側境界にイントロンが存在する。今回これらのpbHTHモジュールの共通点を詳細に調べたところ、立体構造と機能の類似性とは別に、3つの共通点が存在することがわかった。1)正電荷を側鎖に持つアミノ酸が多く存在する、2)C末端側ヘリックスの最初の残基の側鎖が小型である、及び3)蛋白質がDNAと結合していないときには、C末端側ヘリックスの最初の主鎖の-NHが蛋白質の他の部分と水素結合していない。

3種のDNA結合蛋白質でモジュールのシャッフリングがみられたことより、核酸と結合する他の蛋白質にも、類似のpbHTHモジュールが存在することが予想される。そこで核酸との複合体が判明していないDNA/RNA結合蛋白質のモジュール構造を自動同定し、pbHTHモジュールと類似の立体構造及び類似の特徴を持つモジュールが存在するかを調べた。その結果、立体構造が類似で上記の条件を満たすモジュールが少なくとも5個存在することがわかった。このことは、pbHTHモジュールが進化の過程で多くのDNA/RNA結合蛋白質にシャッフリングされたことを示唆する。これらの蛋白質は、pbHTHモジュールを用いてDNA/RNAのリン酸基と結合していることが予想される。

K. Yura, M. Go

Shuffling of phosphate-binding modules in nucleic-acid-binding proteins

1T43

3SR法を用いたDNA分子の増殖競争

○山本裕二・鈴木美穂・伏見謙

埼玉大学工学部

“等温PCR”である3SR(Self-Sustained Sequence Replication)法を用いると、*in vitro*分子進化を行わせる自然淘汰型進化リアクターが構築できる。PCRでは、倍加時間は設定された実験条件で決まるが、3SR法では、増殖する分子自身が倍加時間を決める要素があるからである。本研究では、寿命の長いSP6RNAポリメラーゼと、強いRNaseH活性をもつHIV-1逆転写酵素の2つの酵素を使用するよう3SRを改良し、長さの異なるDNAの挿え継ぎ競争実験を行ったが、これは次の3課題に共通の基礎研究である：(1)分子コンピュータ(後述)、(2)DNA・RNAの進化分子工学(設定した環境下で最速比増殖速度をもつ分子の創出)、(3)*in vitro* virus(従来増幅プロセスにRT-PCRが用いられていたlife cycleにシステムとしての整合性のとれる3SR反応を導入する)。同じプライマー対を用いることにより開始段を同等とし、内部の配列はA、G含有率を高くし二次構造を最少にして長さ以外は無意味にした4種類(179, 154, 110, 84bp)のDNAの挿え継ぎ競争実験を行った。長さの短いものは淘汰係数が大きいことが確認できた。

我々の系では、3SR反応の3つのステップにあたるRNAポリメラーゼによる転写、逆転写酵素によるDNA依存DNAポリメラーゼ活性とRNA依存DNAポリメラーゼ/RNaseH活性のうち、最後のステップが律速になる。従って、これらのDNAの配列のうちDNA鎖より24mer短いRNAから、逆転写用20merのプライマーの部分を除いた長さの伸長が、競争実験において比増殖速度に直接影響すると考えられる。

実際、単純化モデルで、実験結果を解析し淘汰係数を求めたところ、比増殖速度(適応度)が、この意味の配列長に反比例することがわかった。また、分子コンピュータへの応用として、両プライマー領域間に60merのランダム配列を導入したDNAのプールから、3SR淘汰により生き残る配列を取得する研究を進めている。この配列は二次構造などの物理化学的干渉が最小限に押さえられた純情報分子と考えられ、数値を配列や長さに変換するのに適した、分子コンピュータの作業用分子となる。

Y. Yamamoto, M. Suzuki, Y. Husimi

3SR serial transfer competition experiment of DNA molecules

1T42

連続培養を用いた人工進化系の個体群動態

○柏木明子・四方哲也・土部裕

阪大・工・応用生物工

生物の多様性につながる遺伝的多様化はどのように起こるのだろうか。このことに対し、我々は人工進化系を用いて研究を行った。人工進化系は以下のような特徴をもつ。進化過程での環境が簡単で、はっきりとわかっている。結果に対する要因が示しやすい。また、実際の生物進化では不可能な繰り返し実験が行えることである。本研究では、一遺伝子に対して変異と選択を繰り返すことにより、一定環境下での分子進化を観察した。そして、人工進化させた塩基配列に対して分子系統樹を作成した。

大腸菌内のグルタミン合成酵素遺伝子にpolymerase chain reaction (PCR)法で変異を導入した。変異の入った遺伝子群をプラスミドpKGNに挿入し、グルタミン合成酵素欠損株に導入した。これによりこの遺伝子だけが異なり、他の遺伝的情報は同じ大腸菌変異体集団を得た。この大腸菌変異体集団をグルタミン合成の基質であるグルタミン酸を窒素源とした最小培地で連続培養を行った。連続培養槽からサンプリングし、再び変異を導入し連続培養を行うということを繰り返した。経時的にサンプリングして得られたシングルコロニーそれぞれからプラスミドDNAを抽出し、塩基配列の決定を行った。それにより、グルタミン合成酵素遺伝子に対する分子系統樹を作成した。さらに、どの配列が全体のどれぐらいの割合を占めるのかという情報から大腸菌の個体群動態を観察した。

得られた個体群動態と分子系統樹によれば、同一環境下において何種類かの異なった配列を持つ株が常に共存した。さらに、集団内に含まれる配列の種類は広がる傾向にあった。ここで得られた実験結果は分子進化が共存を伴って起こる可能性を示唆している。

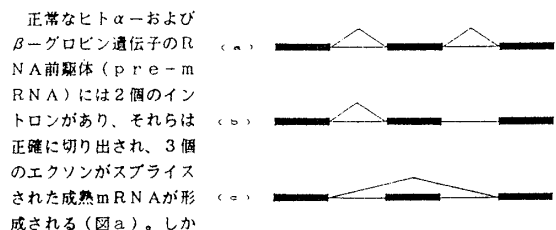
A. Kashiwagi, T. Yomo, I. Urabe

population dynamics in artificial evolution

1T44

ヒト α -および β -グロビン変異体pre-mRNA
スプライシングにおける非スプライシングとエクソン
スキッピングの機構について

北大院・理 飯田 陽一



正常なヒト α -および β -グロビン遺伝子のpre-mRNA前駆体(pre-mRNA)には2個のイントロンがあり、それらは正確に切り出され、3個のエクソンがスプライスされた成熟mRNAが形成される(図a)。しかし、2番目のイントロンの5'スプライス部位が変異した β -グロビンのpre-mRNAでは(図c)、第2エクソン全体が欠落した(第1エクソン)-(第3エクソン)なるmRNAが形成される(エクソン・スキッピング)。一方、2番目のイントロンの5'スプライス部位が変異した α -グロビンでは(図b)、第2イントロンはスプライスされず、(第1エクソン)-(第2エクソン)-(第2イントロン)-(第3エクソン)なるmRNAが形成される(非スプライシング)²⁾。

第2イントロン5'スプライス部位が変異によって消失すると、第1イントロン5'スプライス部位に結合した単一のU1-snRNPに対して第1および第2イントロン3'スプライス信号が競合する。信号強度がI(第2)>I(第1)ならスプライシングは第1イントロン5'スプライス部位から第2イントロン3'スプライス部位まで起こり、エクソン・スキッピングが説明される。もしI(第1)>I(第2)なら第1イントロンのみスプライスされる。以前に報告した数量化法で3'スプライス信号の強度を計算したところ、¹⁾ α -グロビン変異体ではI(第1)>I(第2)、 β -グロビン変異体ではI(第2)>I(第1)となり、非スプライシングおよびエクソン・スキッピングが、第1、第2イントロンの3'スプライス部位の信号強度の大小関係から説明できた。

1) Y. Iida, Bull. Chem. Soc. Jpn., **67**, 2361 (1994).2) R. Tacke et al., Genes & Dev., **5**, 1416 (1991).

Y. Iida: A mechanism for unsplicing and exon skipping