

3E0945

ポリrRNA構造から見た16S rRNAの起源
○保丸正憲、大西耕二（新潟大学・理）

Bacillus subtilis (BS) の *rnrD*オペロンや *rnrB*オペロンに含まれるrRNA遺伝子クラスター(ポリrRNA領域)は原始ペプチド合成装置のレリックであり(ポリrRNA学説)、様々な基本的な遺伝子 mRNAやM1-RNAの起源となってい(Ohnishi 1993, Ohnishi et al. 1995, 1998a,b)。一方、Blochら(1984)はリボソームRNA中にrRNA様の短い断片が含まれていることを示している。そこで本研究では、rRNA中に、BSのポリrRNA領域(*rnrD*オペロン, *rnrB*オペロン)と相同な領域が存在するか否かを解析した。

BS *rnrD*及び*rnrB*オペロン中のポリrRNA域を、BS, *Lactobacillus casei* (LC), *Escherichia coli* (EC), 等の16S rRNA遺伝子とドットマトリックス法 (HarrPlot)により詳細に比較、解析したところ、*rnrD*ポリrRNA域の *tRNA^{Gly}* - *tRNA^{Cys}* - *tRNA^{Leu}*領域(塩基番号 1384~1664域)に対して、BSの 16S rRNA(塩基番号 171~428域)及びLCの16S rRNA(164~420域)の並列を得た。ここでポリrRNA域と16S rRNAの並列において、BS16S rRNAが 54.4%, LC 16S rRNAが 51.4%, ECが 45.5%の塩基一致を示し、二項分布理論による同程度以上の偶然一致確率(Pnuc)はそれぞれPnuc(134,246) = 0.64 × 10⁻²², Pnuc(126,245) = 0.71 × 10⁻¹⁸, Pnuc(106,233) = 0.95 × 10⁻¹¹であり、これらが相同関係にあると結論できる。よって16S rRNAは *rnrD*オペロン型の原始ポリrRNA構造に起源したといえる。この結論は *rnrD*型rRNA遺伝子クラスターが mRNAの起源する以前の古い構造であるというポリrRNA学説の主張と一致する。BS *rnrB*の16S rRNA遺伝子のこの領域のさらには上流(16S rRNA遺伝子の5'側を含む)にもいくつかのrRNA相同域が存在する可能性が示された。

またこの並列結果に基き、16S rRNA中のrRNA相同領域の二次構造と、対応するrRNAのクローバーリーフ構造とを比較したところ、Dループ相同領域とアンチコドンループ相同領域の間の塩基対合が16S rRNAの現実の二次構造において一つのシステムを形成しているという興味深い傾向が見られた。この傾向は、16S rRNAの上記の3つのrRNA相同領域全てにおいて確認された。一方、*tRNA^{Gly}* - *tRNA^{Cys}* - *tRNA^{Leu}*のDループとアンチコドンループとの間においても、16S rRNA中の両ループに対応する相同領域間で見られるような塩基配列相補性の傾向が有る程度認められ、それが16S rRNAでのシステム形成の進化に利用された可能性があり、さらに検討を要する。

S. Hokari, K. Ohnishi : The origin of 16S rRNA, as viewed from poly-rRNA structure.

3E1015

金属キレートに結合する I 本鎖 DNA の in vitro selection
Eli Pharad, ○有山剛史、横田雄尚、伏見謙
(埼玉大学・工学部)

進化分子工学の一手法である in vitro selection や in vitro evolution を用いて、ランダム配列プールから出発して、多種多様な機能性 DNA 分子や RNA 分子が驚くほど速やかに創出されてきた。Schuster らのシミュレーション理論によれば、RNA 配列空間上の大域的適応度地形(彼らの場合は、2 次構造形成能の地形)に関連して、配列空間の一領域による立体構造形状空間の被覆や、配列空間をバーコレートする中立経路のネットワークが存在する。一方、機能性核酸の機能の主役が、むしろ核酸に結合している金属イオンであるとする知見も多い。そこで、本研究では、Ni キレートと親和性をもつ I 本鎖 DNA の in vitro selection 法による取得を通して、ランダムプールからの速やかな進化の要因となる大域的適応度地形の探査を目指す。

淘汰対象となる分子は中央 60-mer がランダム配列、両端に PCR プライマー領域 20-mer をもつ I 本鎖 DNA である。この分子の(-)鎖の 5' 端にはビオチンを付加した。この 10¹² 種の初期ランダムプールに対し次のような淘汰をおこなった。まずアビジン固定化カラムを用いて I 本鎖 DNA とした。この試料を SB 緩衝液に溶かし、0.2 OD の DNA を Ni-NTA 固定化カラムに投入し 1 時間静置した後、カラムを SB 緩衝液で洗い Ni-NTA と親和性を持たない配列を除いた。0.5M のイミダゾールを用いて溶出することにより Ni-NTA と親和性をもつ I 本鎖 DNA 候補を回収し、PCR 法により増幅した。この I 本鎖化 - 評価 - 増幅の淘汰サイクルを繰り返した。3 サイクルの淘汰後に得られた DNA の配列を 9 クローン決定した。そのうち一つの配列がランダムプールの配列と比較して、Ni-NTA 固定化カラムに対して親和性を示すことが確認された。

P. Eli, T. Ariyama, K. Yokota, Y. Husimi: In vitro selection of ssDNA that has an affinity for metal-chelate.

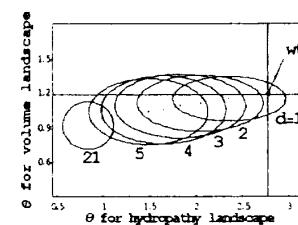
3E1000

適応度地形理論から見た遺伝コード表の Mutational Robustness と蛋白質の進化可能性
○伏見謙、浦田賢、相田拓洋(埼玉大工)

蛋白質分子の塩基配列空間上の適応度地形が富士山型に近ければ、それはダーウィンの漸進的高速進化をしやすいといえる。この10年間、アミノ酸配列空間上で、蛋白質の物理化学的性質を適応度とする局所地形が富士山型に近いという知見が蓄積してきた。そこで、遺伝コード表の起源と進化をこの観点から見なおしてみたい。遺伝コード表は、各コドンを5箇3次元配列空間上の点とし、各点に対応するアミノ酸の物理化学的性質(例:疎水性値)を「適応度」とした。適応度地形を表現しているとみなせる。ここでは、各 letter の寄与の加算性に基づく富士山型地形(理想地形)理論を用いて、この適応度地形の滑らかさを解析した。ここで配列空間の各点の「適応度」として、各点がコードするアミノ酸の①疎水性値(Kyteら, 1982), ②分子容、③αヘリックス傾向指数、④βシート傾向指数、の4つを採り上げた。我々の理想地形理論では、あるコドン N_iN_jN_k の適応度を $W(N_iN_jN_k) = W_0 + w_1(N_i) + w_2(N_j) + w_3(N_k)$ で表す。ここで、 W_0 は最大適応度であり、 i を固定したときの $w_i(x)$ の分布は i -th letter の寛容度関数を表す。分析の結果を表1に示す。 θ は地形の平均勾配(理想地形あてはめ値)と凸凹(理想と実在の差のrms値)の比。 r は理想と実在の相関係数(棄却率は 0.001 以下)。これは各適応度地形が富士山型地形に近いこと、すなわち比較的滑らかであることを意味し、從来から知られていた遺伝コード表の mutational robustness を定量的に表現したことになる。しかも重要なことは、現実の遺伝コード表が、互いに無関係な4種の適応度地形が矛盾無く富士山型地形を成すよう構成されている点である。現在の20種のアミノ酸とそのコドンはこのような要請を満たすように選ばれることにより、少數(4種?)のアミノ酸に対する原始コード表から進化してきた可能性がある。図1は、疎水性地形の θ と分子容地形の θ が、現在の遺伝コード表(wt)を混ぜ返す(dが混ぜ返しの回数)によって富士山型地形を表す値から凸凹型地形の値へ変化してゆく様子を示す。各横円は各 d における変異コード表の θ の分布である。

疎水性	分子容	α -helix	β -sheet
r	0.92	0.78	0.61
θ	2.8	1.2	0.92

表1.



Y. Husimi, S. Urata, T. Aita: Mutational robustness of the genetic code and evolvability of proteins: An analysis based on a theory of fitness landscape.

3E1030

等温増幅を用いたDNA分子の試験管内進化
○山本裕二、伏見謙(埼玉大・工)

DNA分子の等温増幅法であるSelf-Sustained Sequence Replication(3SR)を用いると、DNA分子の試験管内進化を行わせる自然淘汰型進化リアクタを構築できる。ランダム配列を導入したDNAのプールをこのリアクタで淘汰することによって得られる配列は、二次構造などの物理化学的干渉が最小限に抑えられていると考えられる。これは、数値を配列や長さにエンコードすることのできる純情報分子として分子コンピュータの作業分子となる。

プロモータプライマーと逆転写プライマーとの領域間に60merのランダム配列を導入したDNAのプールに対して、3SR法耐代植継ぎ実験を行った。耐代植継ぎは、自然淘汰型進化リアクタをエミュレートする。この実験で進化してきたDNA産物を配列決定した結果、3SR法とは異なったCooperative Amplification of Templates by Cross-Hybridization(CATCH)増幅機構で増幅していることが判った。すなわち、3SR機構よりCATCH機構への増幅機構の自律的進化が観察された。ここで、突然変異and/or組換えによる最初のCATCH型テンプレートの出現機構と、それと3SR型テンプレートとの淘汰機構が問題となる。CATCHは、(-), (-)テンプレート間のハイブリダイゼーション反応を含むため、この淘汰は濃度依存であると考えられる。一方、上記の出現機構の問題に答えるために、安定な二次構造を取りにくいA, C, Tの3種の塩基からなる60merのランダムプールに対して、3SR耐代植継ぎ実験を行った。この場合も、異なった長さと配列を持つDNA産物が得られ、3SR→CATCHという増幅機構の進化が起こった。

この他、SP6RNAポリメラーゼのプロモータの最適化など分子コンピュータに用いることができる配列を得るために試みと、多くの情報を担うためには必要な長いテンプレートの耐代植継ぎにおける安定性について述べる。

Y. Yamamoto, Y. Husimi: In vitro evolution of DNA molecules using isothermal amplification.