



## 逆転写酵素を用いたリボソーム RNA の塩基配列決定法

1977年にDNAの塩基配列決定法の化学的方法およびDNAポリメラーゼを用いた生化学的方法がいつい報告されて以来、塩基配列の決定された遺伝子の数は膨大なものとなっている。Sangerらによる生化学的方法<sup>1)</sup>、いわゆるジデオキシ法は、その簡便さからDNAの塩基配列決定法の主流になっている。この方法はその原理から、DNAポリメラーゼを逆転写酵素に変えれば当然RNAにも適用可能である。そこで、この試みが各種RNAで行われたが<sup>2-7)</sup>、RNA中に多数存在する修飾塩基で反応が止まりやすく<sup>8)</sup>、原因は不明だが反応がストップし、C、G、A、Tすべてにバンドが現れる部位が多数存在する<sup>6,7)</sup>などの技術的な問題が明らかとなった。また、RNAは不安定で、その取り扱いがDNAに比較して困難であり、DNAのようにクローニングにより増幅して増やすこともできない。さらに、遺伝子の発現、制御などの研究では遺伝子の前後の塩基配列が重要となり、メッセンジャーRNAの塩基配列を決めてもあまり役立たない。このような理由でRNAの逆転写酵素による塩基配列の決定は、ほとんど用いられてこなかった。

いうまでもなく、生物の進化の歴史は遺伝子の塩基配列に記録されている。そこで、生物の系統を研究する研究者は、塩基配列決定法が確立されるとすぐにこの技術を自分たちの研究に取り入れた。とくに、すべての生物が含有するリボソームRNA (rRNA) は、その分析対象として絶好のものと考えられ、5S rRNAの全塩基配列、16S rRNAのRNase T<sub>1</sub>分解物のオリゴヌクレオチド

の塩基配列などがいろいろな生物で比較研究された。ところが、これらの方法は化学的な配列決定法であり、多大な時間と労力のかかるものであった。生物の種類数は莫大であり、より簡便な方法の導入が強く望まれた。

1985年にLaneら<sup>9)</sup>によって報告されたrRNAの逆転写酵素による迅速塩基配列決定法は、適用範囲が広く、簡便でそれほど費用のかからない方法であり、この分野の研究の中心的方法となりつつある。このようにRNAの逆転写酵素によるシーケンシングは、生物の系統進化の研究において初めて頻りに用いられるようになってきた。

この解説では、筆者らの研究を中心に、rRNAの逆転写酵素による塩基配列決定法の利用の実例を、細菌のものを中心として紹介する。

### 方法と実例

RNAの抽出法、逆転写酵素を用いたジデオキシ反応の詳細については、紙面の都合で省略する(詳しいことは富山大学教養学部学生実験マニュアルに書いてあるので興味のある方には、連絡していただければ送付します)。RNAは湿重量100mg程度の細胞を各種の細胞破砕法を用いて破壊後、フェノール法により精製し、DNase処理によりDNAを除去する。この程度の細胞量で約10回のジデオキシ反応に供することができる。

ジデオキシ反応に用いるプライマーDNAは、対象とする分子種および生物種により異なる。これらの選定は、rRNAのデータベースを調べることにより容易に行うことができる。たとえば、酵母、古細菌、大腸菌がすべて同じ塩基配列を持つ最低15塩基からなる部分を選び出し、この塩基配列に相補的な配列のDNAを合成すれば、すべての生物に用いられるプライマーとなる。このような部分は、16S rRNAには3箇所存在している。真正細菌だけに限れば、このような部分は少なくとも10箇所は見いだされる。また、葉緑体あるいはミトコンドリアだけを選択的に塩基配列決定することも容易である。筆者らは、現在約30種のプライマーを保有している。ABI社のDNA合成装置で0.2 μmolスケールで合成すれば約10万回の反応に用いることができる。

精製されたRNAをアガロースゲル上で観察したものを図1に示す。シロツメクサ根粒菌より抽出したRNA

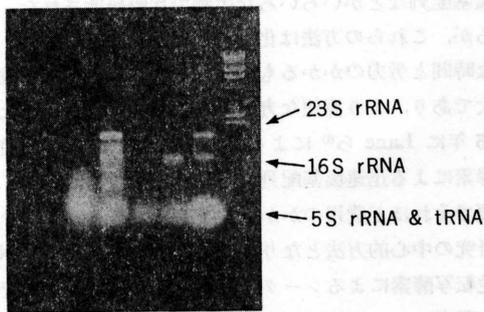


図1 精製されたRNAのアガロース電気泳動

左よりシロツメクサ, ミヤコグサ, カラスノエンドウ, スズメノエンドウ, ムラサキツメクサから分離された根粒菌のRNA. 右端はサイズマーカー(λファージ DNA *Hind*III カット).

では, 16S rRNA はほとんど分解されている. このような結果は, 細胞内でオートリシスを起こしていることが原因であり, このようなRNA をジデオキシ反応に供しても, 良い結果は得られない. また, カラスノエンドウおよびスズメノエンドウ根粒菌では 23S rRNA が分解されているが, このようにリボソームの大サブユニットのRNA は, 原核生物, 真核生物を問わず細胞内で分解されやすい.

逆転写酵素によるジデオキシ反応は, DNA で行われる反応と同様に行われるが, 反応組成が異なる. また, この反応で用いられるラジオアイソトープは  $^{32}\text{P}$  でもよいが,  $^{35}\text{S}$  のほうが半減期が長く経済的であり, また  $^{32}\text{P}$  よりも鮮明な結果を得ることができる.

オートラジオグラフィーの結果を, 図2, 3に示す. 図2のRNA では, 解読の困難な部位はほとんどないが, ポジション (大腸菌を基準にした5'末端からの塩基数) 1207付近に修飾塩基があるため, 反応は止まらないが, 数個のバンドが消失している. また, 図3では, ポジション 966 および 967の修飾塩基のためDNA鎖伸長反応がかなり阻害されている. また, 図3では4レーンすべてにバンドが現れる部位も見られるが, ターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼの使用によりこのような部位の解読が可能になることも観察される.

GUAC

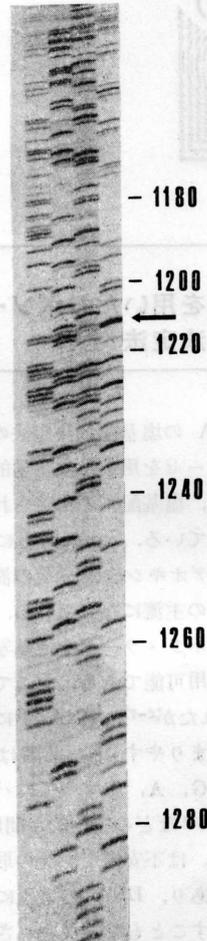


図2 *Bradyrhizobium japonicum* (クズから分離されたもの) のポジション 1200 付近の電気泳動像

矢印部位に修飾塩基があり, 数塩基のバンドが消失している.

#### 塩基配列データの利用 生物の系統の研究

現在, 塩基配列データを三つの目的に使用するよう計画している. 第一に, 当然考えられることであるが, 生物の系統を調査することである. この場合, 高等生物の場合は, すでに他の方法で推定されている系統関係を検証することになる. これに対して微生物の場合は, 真

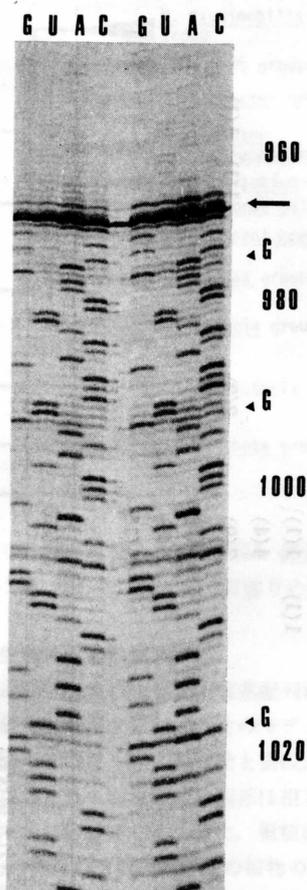


図3 *Thiobacillus* sp. IFO 14570 のポジション 1000 付近の電気泳動像

矢印部位は修飾塩基のある部分。左は反応にターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを使用したもので、右は使用しないもの。

核・原核を問わずその系統関係が十分明らかとなっていないので、これらの結果が分類システムに大きく影響することになるケースも多い。塩基配列データから系統樹を書く場合、進化の速度すなわち突然変異を起こす速さおよび進化のモードの違いを考慮しなければならない。進化の速度の違いは、比較する分子が異なれば当然大きな違いが見られるし、また同じ分子でも生物の系統間にはそれほど大きくはないが若干の差異が見られる。筆者らは 10 種の真正細菌の 16S rRNA の塩基配列を決定

しているが、これらを古細菌のものと比較すると、進化速度が真正細菌間で厳密に等しいとすれば、変異を起こした塩基の数はばらつかないはずであるが、進化速度の遅いものに対して速いものは約 60 塩基ほど（これは全塩基数約 1,500 に対しておよそ 4% になる）変異した塩基の数が多かった。進化のモードの違いとは、生物 X から生物 Y・Z に分岐した場合、A・B 二つの遺伝子について生物 Y での A 遺伝子の進化速度は生物 Z での進化速度より速くなり、逆に B 遺伝子では生物 Y での進化速度は生物 Z での進化速度より遅くなった場合、生物 Y・Z で A・B 遺伝子の進化速度に一定の傾向のない変化が生じており、このようなケースを進化のモードの違いと考える。筆者らが、5S rRNA と 16S rRNA をいくつかの生物間で比較し、塩基配列の違いより  $K_{nuc}$ <sup>9)</sup>（塩基配列の差異を基に実際に起こった 1 座位当たり一定時間に生じた塩基の置換の数を推定した数値）を計算し、5S rRNA と 16S rRNA の相関関係を二次元にプロットしてみると、両分子間にモードの違いがなければ、ある傾きで直線にのるはずであるが、かなりばらついていた。以上のような問題を考慮し、より真実に近い系統関係を表示するためには、比較する塩基の数を多くし、より優れた系統樹作成法を選択する必要がある<sup>10)</sup>。

筆者らは、現在、細菌の 16S rRNA の 5' 末端より 1220~1377 の部位、および植物葉緑体の 5' 末端より 150~350 の部位の塩基配列決定を重点的に行っている。この約 200 塩基という数は、系統を調査するためには、かならずしも十分ではない。細菌について平均値連結法 (UPGMA 法) と近隣結合法 (NJ 法)<sup>11)</sup> を比較した結果を、図 4 に示す。詳細は省略するが、NJ 法は従来考えられている細菌の系統関係とはほぼ一致する結果を与えるが、UPGMA 法の結果は問題点が多い。

#### 微生物の同定法としての利用

筆者らの研究では、2 年間ほどのあいだに約 1,000 株の細菌の 16S rRNA の部分塩基配列を決定し、このデータをコンピュータに保存している。将来は、このデータベースをさらに拡充し、未同定細菌を塩基配列に基づいて同定するようなシステムを作成したいと考えている。データベースに収録されたデータより UPGMA 法でデンドログラムを書いたものが、図 5 である。

表1 マメ科植物における根粒菌の分布

マメ科の亜科名 と連名	分離された根粒菌の種類													
	<i>Rhizobium</i> species					<i>Bradyrhizobium</i> species								
	<i>R. legumi- nosarum</i>	<i>R. meliloti</i> & <i>R. fredii</i>	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	6	7
ジャケツイバラ亜科														
ネムノキ亜科	7(9)	2(3)	1(1)	1(1)	1(1)				1(1)	1(2)	1(1)			
マメ亜科														
連名														
Sophoreae														
Podalyriaceae														
Milliettiaceae														
Dalbergiaceae														
Galegeae	2(3)	3(6)	1(1)											
Cajanaceae	1(2)													
Astragalaceae														
Loteae														
Vicieae	8(17)	1(2)												
Genisteae														
Hydysareae														
Lespedezeae														
Glycinaceae														
Phaseoleae	1(3)													
Trifolieae	3(8)	1(1)	2(3)											
合計	22(42)	14(20)	3(5)	8(8)										
														13(14)

数字は分離された植物の種数、( )内の数字は分離された菌株数。

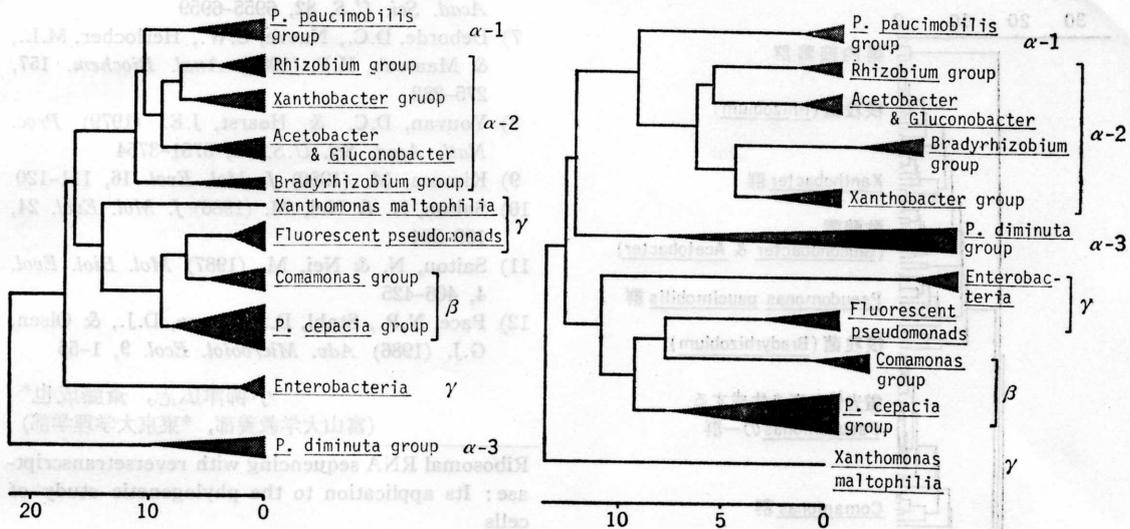


図4 グラム陰性細菌の16S rRNA部分塩基配列のデータを用いて、2種類の系統樹作成法を比較したもの。左、UPGMA法；右、NJ法（目盛りの数字は異なる塩基数）。

微生物の生態的分布の調査

rRNAの逆転写酵素による迅速塩基配列決定を微生物の生態学的研究に利用するため、そのモデルケースとして根粒菌を取り上げた。マメ科植物と根粒菌のあいだには共生関係が作られており、この関係は相互の遺伝子が作用し合いながら形成される。また、根粒菌には宿主特異性があり、特定の根粒菌は特定の植物のみに根粒を形成する。この性質に関する分子生物学的研究が進められ、宿主特異性や根粒形成の過程がしだいに解明されてきた。ところが、いかなる根粒菌がいかなる植物に根粒を形成するかという基本的問題については、細菌の識別が簡単に行われないため、あまり詳しく調査されていなかった。そこで、筆者らは農林水産省生物資源研究所の蒲生卓磨氏と共同で世界中から約150株の根粒菌を収集し、根粒菌のマメ科植物における分布を調査した。表1に、その結果をマメ科の亜科および連ごとに示した。熱帯および亜熱帯産のマメ科植物には、12種の新しい根粒菌が見いだされた。根粒菌の進化と植物の進化を総合して考察すると、根粒形成遺伝子群が、根粒菌間で移動している可能性が強く示唆された。

また、培養のできない微生物の同定についても、このデータベースを用いることにより可能になる。このよう

なケースではたとえば地衣類のようにいくつかの生物が混在しているケースが多く、逆転写酵素による直接シーケンシングが困難な場合もある。このような場合は、クローニングによる方法も考慮しなければならない。16S rRNA塩基配列から培養の不可能な微生物の識別・同定の実際については、Paceら<sup>12)</sup>の解説に詳しく書かれている。現在までのところ、この方法は海産無脊椎動物に共生する化学合成細菌などに適用されているのみだが、今後、微生物生態学の研究で広範に用いられる方法となるであろう。

- 1) Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5463-5467
- 2) Hangenbuechle, O., Santer, M., Steitz, J.A., & Mans, R.J. (1978) *Cell* 13, 551-563
- 3) Hamlyn, P.H., Brownlee, G.G., Cheng, C.-C., Gait, M.J., & Milstein, C. (1978) *Cell* 15, 1067-1075
- 4) Youvan, D.C. & Hearst, J.E. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 1723-1741
- 5) Qu, L.H., Michot, B., & Bachellerie, J.-P. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 5903-5920
- 6) Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., & Pace, N.R. (1985) *Proc. Natl.*

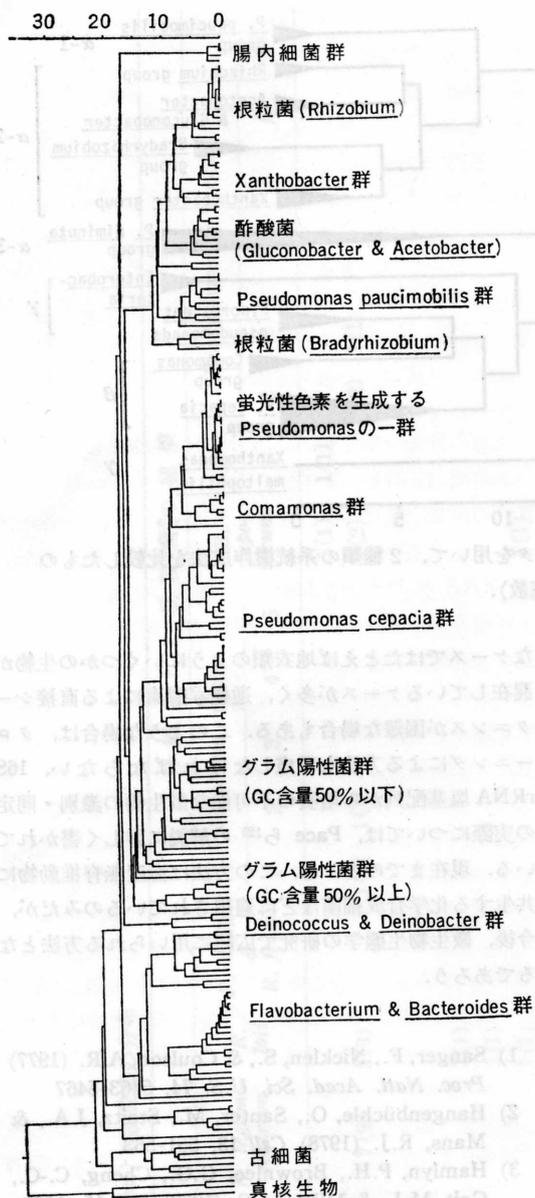


図5 16S rRNAの部分塩基配列に基づくデンドログラム (UPGMA法で作図) 目盛りの数字は異なる塩基数。

*Acad. Sci. U.S.* 82, 6955-6959

- 7) Deborde, D.C., Naeve, C.W., Herlocher, M.L., & Maassab, H.F. (1986) *Anal. Biochem.* 157, 275-282
- 8) Youvan, D.C. & Hearst, J.E. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 76, 3751-3754
- 9) Kimura, M. (1980) *J. Mol. Evol.* 16, 111-120
- 10) Saitou, N. & Nei, M. (1986) *J. Mol. Evol.* 24, 189-204
- 11) Saitou, N. & Nei, M. (1987) *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425
- 12) Pace, N.R., Stahl, D.A., Lane, D.J., & Olsen, G.J. (1986) *Adv. Microbiol. Ecol.* 9, 1-55

小柳津広志, 斎藤成也\*  
(富山大学教養部, \*東京大学理学部)

Ribosomal RNA sequencing with reversetranscriptase: Its application to the phylogenetic study of cells  
Hiroschi Oyaizu and Naruya Saitou\* (College of Liberal Arts, Toyama University, 3190 Gofuku, Toyama 930; \*Department of Anthropology, University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113)

**EGF の立体構造と機能**

**はじめに**  
上皮成長因子 (EGF) は、上皮細胞の増殖と分化を促進するペプチド性のホルモンである。S. Cohen (アメリカ) によって、1962年にマウスの顎下腺から精製された。成熟した雄マウスの顎下腺には幸運にも例外的に多量の EGF が蓄積 (約 0.1 mg/匹) されていて、今日でも良い抽出材料となっている。マウスの EGF はアミノ酸 53 残基、分子量 6 千の単一のポリペプチド鎖であり、分子内に三つの S-S 結合を持った、たいへん安定な分子である。当初、Cohen の精製した EGF は純品と考えられていたが、さらに逆相の HPLC を用いて精製を進めると、N 末端から 1~3 残基が欠けた EGF が混入していることが明らかになった。マウス以外にはヒト、ラット、モルモット、ウサギなどの EGF のアミノ酸配列が分かっている (図1)。

EGF の生理活性は、標的細胞の細胞膜に存在する

