

# 論文内容の要旨

## 論文題目

UAG コドン解読分子の操作による遺伝暗号可塑性の研究

A study on the genetic-code flexibility by manipulation of the UAG codon-decoding molecules

氏名 向井 崇人

終止コドンである UAG を解読する因子に着目し、UAG コドン解読分子を操作する事により、遺伝暗号の可塑性とその条件や制約について調べた。UAG コドン解読分子とは、アミノアシル化された tRNA<sub>CUA</sub> 分子や、翻訳終結因子である。遺伝暗号は全ての生物種で保存されているが、細部においては可塑性がある。人為的な遺伝暗号の拡張には、外来性の tRNA とアミノアシル tRNA 合成酵素の変異体を発現させる。これまでに大腸菌、酵母、哺乳類細胞において数十種類の非天然型アミノ酸が UAG コドンに割り当てられてきた。ただし、UAG はあくまでも終止コドンであり、非天然型アミノ酸専用再割当された例はない。

高等な真核細胞における遺伝暗号拡張を妨げる最大の要因は、tRNA の発現である。真核細胞の tRNA は配列内部にプロモーター配列を持つため、多くの場合、外来性の tRNA は真核細胞内では発現しない。本研究ではまず、メタン生成古細菌 *Methanosarcina mazei* の tRNA<sup>PyI</sup> を、U6 プロモーターを用いて、哺乳類細胞において発現させる事に成功した。特殊構造を持つ tRNA<sup>PyI</sup> は、メタン生成古細菌や真正細菌のみならず、真核生物の遺伝暗号をも拡張できる。次に、U6 プロモーターによる真正細菌型 tRNA 発現法を *Drosophila melanogaster* Schneider 2 細胞、*Bombyx mori* BmN4 細胞、*Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five) 細胞においても試し、昆虫細胞の遺伝暗号を拡張することに成功した。

UAG コドンの翻訳は翻訳終結因子と競合し、非天然型アミノ酸を効率よく導入することができない。そこで、大腸菌において UAG コドン を認識する RF-1 (*prfA* 遺伝子) を除去する条件を調べた。RF-1 を除けば RF-2 が残り、UGA と UAA のみが終止コドンになる。UAG コドンを持つ 7 つの必須遺伝子に関して、UAA 終止コドンに置換することで発現を補償させたが、RF-1 欠損を相補できなかった。しかし更にサプレッサー-tRNA を発現させることで、*prfA* のノックアウトに成功した。おそらく C 末端が伸びた異常タンパク質群が、ある程度の活性を維持しているものと思われる。従って、tRNA と *prfA* の変異を合わせ、わずか 9 つの点変異によって UAG コドンが再割当されうる。つまり標準遺伝暗号は非常に変化しやすいが、大腸菌にとって生存上のメリットがなく、実際には集団に根付かない。しかし非天然型アミノ酸が有用であれば、非標準遺伝暗号を持つに至る可能性がある。