

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

T7 RNA ポリメラーゼによる人工塩基対転写機構の結晶学的および生化学的研究  
(Crystallographic and biochemical studies on unnatural base-pair transcription by  
T7 RNA polymerase)

氏 名 疋田 泰士

生物は複製・転写・翻訳といった遺伝情報伝達のシステムに4文字2対の塩基アデニン、シトシン、グアニン、チミン(ウラシル)を使っている。この文字数を拡張し、第5、第6の塩基(非天然塩基対)を人工的に作り出すことで遺伝情報伝達のシステムを6文字3対にする研究が行われている。例えば、人工塩基対Ds(7-(2-チエニル)-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン)とPa(ピロール-2-カルバルデハイド)やs(2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン)とPaなどが開発されている。Ds-PaペアはPCRで機能し、転写が可能である。s-Paペアは転写が可能で、蛍光性人工塩基sをRNAの部位特異的に導入することができる。しかしながら、これら複製や転写の系において人工塩基がどのように働いているかの構造的な知見は未だ明らかになっていない。本研究では人工塩基対を用いた転写に注目した。

第1章では人工塩基対のシステムを用いて部位特異的に機能性塩基を導入するプロトコルを記述し、tRNA<sup>Phe</sup>に蛍光性人工塩基sを導入する実験と結果を記載した。RNAの特定部位に蛍光プローブを導入する手法は、RNA分子の局所的な構造変化を蛍光強度変化から解析する上で強力なツールとなる。この章では、人工塩基対sとPaを用いて部位特異的にRNAへ蛍光プローブを導入するプロトコルを記述した。このプロトコルは、1. Paを含むDNAの調製、2. 転写による蛍光性塩基sの部位特異的導入、3. 転写産物の精製、4. 転写産物の解析、の4部で構成されている。人工塩基sは強い蛍光を持ち、そのヌクレオシド三リン酸(sTP)は、T7 RNAポリメラーゼによる転写において、鋳型DNAに含まれる人工塩基Paの向かいに部位特異的に導入される。人工塩基sの蛍光強度は周囲の環境によって変化するため、RNA分子の局所的な構造変化を知ることができる。この方法は転写によるRNAへの部位特異的な蛍光ラベル導入プロトコルであり、本プロトコルの人工塩基sを含むRNAの転写・精製は2-3日で行うことができる。通常のT7 RNAポリメラーゼによる転写時に用いる材料以外に必要な、人工塩基Paを含むDNAやsTPは、2011年12月現在、オリゴハウス(Glen Research、日本テクノサービス、ジーンデザイン等)や基盤技術の「人工塩基対システム」の普及・開発に取り組んでいるタグシクス・バイオ株式会社から購入可能である。人工塩基Paを含む鋳型DNAをT7 RNAポリメラーゼで転写することで、人工塩基sを含むtRNA

を作成し、s の蛍光性から、温度上昇や Mg イオン濃度変化に伴う tRNA の局所的な構造変化の影響として蛍光強度の変化を観測した。

第2章では T7 RNA ポリメラーゼの転写伸長複合体構造の X 線結晶構造解析について記述した。T7 RNA ポリメラーゼは転写酵素として広く分子生物学研究において利用されており、人工塩基対システムの研究においても代表的な転写酵素として用いられている。T7 RNA ポリメラーゼ自体の研究も深く行われており、RNA 伸長反応における結晶構造解析では RNA が 1 塩基延びる過程における 4 つの構造が報告されている。この RNA 伸長反応において人工塩基や取り込みの塩基の構造学的基盤の解析をするために、3 種の鋳型 DNA と 3 種の NTP アナログを用いて、転写伸長複合体を形成させ、結晶化し構造解析を行った。反応時に鋳型とマッチする NTP 取り込み時および mismatches する NTP 取り込み時の構造解析、計 6 種類の結果を得た。鋳型とマッチする NTP を取り込む時、解析した電子密度では、取り込まれる NTP の塩基部分に相当する電子密度が「鋳型となる塩基と対形成している場所」と「伸長中の RNA3'末端の塩基にスタックする場所」の 2 箇所が存在していた。一方、鋳型とマッチしない NTP を取り込む時は NTP の塩基部分の電子密度は「伸長中の RNA3'末端の塩基にスタックする場所」のみに存在しており、「鋳型となる塩基と対形成している場所」には電子密度は存在しなかった。これは塩基対形成に水素結合を用いない人工塩基対 Ds と Pa の組み合わせでも同様であった。RNA3'末端に NTP がスタックしている状態では伸長反応が進まないため、「鋳型となる塩基と対形成している場所」に塩基が存在する構造をとらずに「伸長中の RNA3'末端の塩基にスタックする場所」に塩基が存在する構造をとる mismatches の塩基では反応が進みにくく、鋳型にマッチする塩基の選択に寄与していると考えられる。

本研究では人工塩基対を用いた転写の系に着目して、生化学的・結晶学的側面から人工塩基対について議論した。人工塩基対を用いて RNA (DNA) に機能を持たせ、構造と機能解析の研究へ利用する事は今後発展していくとともに、人工塩基対の研究を通して、生命システムにおける塩基の特徴への理解がより深まると考えられる。