

論文試験の結果の要旨

氏名 足田 泰士

本論文は序章、第 1 章、第 2 章、総合討論の 4 章から構成されている。

序論では、本論文で行った研究の背景と目的を記載している。まず、人工塩基対に関して概説し、複製転写翻訳における人工塩基対の歴史と背景を解説している。転写酵素 T7 RNA ポリメラーゼの構造に関する研究の歴史と重要性を踏まえ、本論文の主対象となっている、人工塩基対の系における転写について、構造基盤の理解のためには X 線結晶構造解析が重要であることを提起している。

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系を記述し、tRNA^{Phe} に蛍光性人工塩基 s (2-アミノ-6-(2-チエニル)プリン)を導入する実験と結果を記載している。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り、この章では、人工塩基対 s と Pa (ピロール-2-カルバルデハイド)を用いて部位特異的に RNA へ蛍光プローブを導入している。この章は、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。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 の蛍光強度の変化を観測し、Mg イオン濃度や温度変化による tRNA の局所的な構造変化について考察している。

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述べている。人工塩基を含め、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、計 6 種類の構造を決定している。解析した電子密度マップにおいて、正しい塩基が取り込まれるときは、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 箇所に存在していることを示している。一方、ミスマッチ塩基が取り込まれる時は、取り込まれる

NTP の塩基部分に相当する電子密度が「伸長中の RNA3'末端の塩基にスタックする場所」のみに存在していることを示している。その結果から転写伸長反応における新規構造を発見し、既存の転写メカニズムを改良した新たなメカニズムを提唱している。

総合討論において、第1章で行った人工塩基対の転写と第2章での人工塩基対の転写における転写伸長複合体の構造解析の二つの結果を踏まえた議論を展開している。解析した、天然の塩基を用いた転写時の構造と人工塩基を用いた転写時の構造を基に、人工塩基周辺に着目し、タンパク質側のアミノ酸残基の位置関係を比較している。その結果、人工塩基の形が、タンパク質側の側鎖に影響を与えないような人工塩基が、転写において天然の塩基と同様に振舞うために必要であることを示唆している。また、これらのことが新たな人工塩基の設計へとつながることを述べている。

本論分に記載された一連の研究は、新たな転写反応メカニズムの発見、人工塩基対転写の構造基盤の解析という二つの側面を持つ。これらの結果は人工塩基対のシステムを構築する基盤となるとともに、人工塩基対の研究を通して生物本来の持つ普遍的なメカニズムの理解を深め得る事を示している。以上のことから本研究は当該分野の発展に向けて大きな意義を持つと評価する。また、論文提出者は当該分野における包括的知識と議論の能力を十分に有していると判断する。論文は全体にわたり、平易で明快な文章により記述されている。

なお、本論文の第1章は横山茂之(東京大学教授)、平尾一郎(理化学研究所チームリーダー)、木本路子(理化学研究所研究員)らとの共同研究であるが、論文提出者が主体となって実験および考察を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める。