

2023 年度年次報告書
生命現象と機能性物質
2023 年度採択研究代表者

橋本 講司

東京大学 大学院総合文化研究科
助教

人工非コード DNA による転写制御システムの構築

研究成果の概要

天然の DNA は A-T および G-C の 2 種類の塩基対で構成されており、遺伝情報は 4 種類の文字で記述されている。以前私が所属していた研究室では、天然の塩基対と同様に複製可能な人工塩基対 X-Y が開発された。これにより、人工塩基 X を持つ GFP 遺伝子や薬剤耐性遺伝子、および対応する人工塩基 Y を持つ tRNA 遺伝子が大腸菌に導入し、その翻訳システムを利用してタンパク質を合成することができた。このように人工塩基にアミノ酸情報を書き込むことで「人工コード DNA」を作り出すことには成功したが、人工塩基とタンパク質の相互作用を通じて生命現象を調節する「人工非コード DNA」の作製はまだ達成されていない。そこで私は、人工塩基に特異的に結合するリプレッサータンパク質を作製することで、非コード DNA 系の代表例である転写制御システムを構築することを目指した。

初年度は「人工非コード DNA」の中核となる人工塩基を含む DNA オリゴの合成に注力した。まず、人工塩基を含まない DNA オリゴ同士をアニーリングさせた。次に、人工塩基のヌクレオチド三リン酸を基質として、DNA ポリメラーゼを用いてギャップ埋めるように伸長し、人工塩基を 1 塩基付加した。最後に、人工塩基のヌクレオチド三リン酸を除去したのち、天然塩基のヌクレオチド三リン酸を添加して DNA ポリメラーゼで伸長することで、狙った人工塩基を含む DNA を合成した。

今後は、この人工オリゴを PCR で増幅したのち、プロモーター領域にクローニングする。そのクローニングの成否を確認するための Cas9 とガイド RNA を用いたアッセイ系の確立にも取り組んだ。具体的には、人工塩基部分を除いてクローニングした部分と相同な配列を持つガイド RNA を合成し、Cas9 と共にインキュベーションした。切断が起きなければ、人工塩基が正しくクローニングできていると結論づけられる。