

リボスイッチは原核生物が持つ 40~200 nt 程度の ncRNA であり、その多くは mRNA の 5' 側非翻訳領域にコードされている。リボスイッチには様々な種類があり、それぞれに対応するリガンド（補酵素、アミノ酸、核酸など）と特異的に結合してその立体構造を変化させ、タンパク質因子を介することなく下流遺伝子の発現を調節する。リボスイッチによる遺伝子の発現調節は原核生物に特異的であるとともに、微生物の病原性にも関連することが知られている。したがって、リボスイッチが機能するしくみを解明することにより、病原性細菌に対する新たな薬剤の開発が期待できる。また、リボスイッチの作動原理に基づいた RNA 分子デバイスへの応用も可能である。本研究では、リボスイッチの調製、生化学的実験および結晶構造解析を行った。

RNA の構造機能解析において、均質な RNA を大量に調製することは重要である。T7 RNA ポリメラーゼを用いた *in vitro* 転写により RNA を調製した場合、5' および 3' 末端に余分なヌクレオチドが付加し、不均質な転写産物が得られる。このような不均質な RNA 混合物は分離することが困難で、生物物理学的な解析にも不向きである。これを克服するために、鋳型 DNA を調製する際、リバースプライマーの 5' 側の二つのヌクレオチドにメチル化した 2'-OH 基を導入し PCR で増幅した。その結果、3' 末端が均一な RNA を調製することが可能となった。さらに、目的 RNA 配列の 5' 側にハンマーヘッド (HH) リボザイムを付加した。HH リボザイムは自己触媒作用によって、リボザイムと目的 RNA との間のリン酸結合を特異的に切断する。これにより RNA の 5' 末端も均一となり、生物物理学的な解析に適した RNA を大量に調製することが可能となった。

以上の方法を利用して、リボスイッチを大量に合成した後、変性 PAGE により分離精製した。本研究では、preQ1 と相互作用するリボスイッチの構造機能解析を推進している。preQ1 は tRNA のアンチコドン一字目に見られる修飾ヌクレオシド（キューオシン: Q）の前駆体である。tRNA グアニトランスグリコシダーゼにより、preQ1 が tRNA のグアニン塩基と置き換わり、さらに他の酵素の働きによって Q に変換される。バクテリアにおいて、preQ1 の合成に関わる遺伝子群はオペロンを形成しており、その 5' 側非翻訳領域に preQ1 と相互作用するリボスイッチがコードされている。preQ1 が細胞内に多量に存在すると、preQ1 と結合したリボスイッチはターミネータを形成する。その結果、転写が終結し遺伝子の発現が抑制される。Q は正確なタンパク質合成に重要であることから、preQ1 リボスイッチと特異的に相互作用し遺伝子の発現を抑制する合成化合物は新たな抗生物質の候補となり得る。共同研究により、preQ1 リボスイッチと相互作用する合成化合物をスクリーニングし 7 種類の薬剤を取得した。これら合成化合物と preQ1 リボスイッチとの複合体の結晶化条件をスクリーニングし、幾つかの結晶が得られている。現在、解析中である。