

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14485

研究課題名(和文) DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムによるやわらかいナノデバイスの作製

研究課題名(英文) Construction of DNA origami base gene transcription nano chip

研究代表者

多田 隈 尚史 (Tadakuma, Hisashi)

大阪大学・たんぱく質研究所・助教

研究者番号：10339707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：手のひらにのるような、検査・治療装置作る為には、非常に小型の検出・診断・合成装置が必要である。蛋白質はナノメートルサイズの高効率な分子機械であるので、これらを集積化し、ナノシステムを構築できれば、小型な構成能装置を構築できると考えられる。本研究では、転写システムを集積化した転写ナノチップを作製し、1チップレベルで高効率なナノデバイスを合理設計できる事を明らかにした、今後、制御系を組み込む事で、自律動作するナノデバイスの構築が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Toward the handheld device, downsizing the subcomponent system is the key. Here, we made an orthogonal self-contained device by integrating an enzyme, T7 RNA polymerase, and multiple target gene substrates onto a DNA origami-based nano-chip. Our nano-chip allowed us to rationally design the gene expression at single chip level, suggesting that the integrated approach may provide a basis for gene expression system of handheld devices.

研究分野：生物物理

キーワード：1分子計測・操作 ナノマシン 蛋白質 核酸

### 1. 研究開始当初の背景

小さな検査・治療装置を作る為には、反応系を小さくする必要がある。従来、マイクロ管路や微小な反応カプセルを作る事でその実現がマイクロメートルスケールで図られてきた。しかし、反応場を更に小さくし、サブマイクロメートルスケールにしていくと、反応場に存在する分子の絶対数が減少する事に起因する問題が顕著になってくる(システム構成要素の欠如や、反応が環境に依存する)。しかし、従来の濃度による制御では、これらの問題の解決が難しい。そのため、これを解決する新しいアプローチが求められていた。

### 2. 研究の目的

我々は、この問題に対して、因子を近接して精密配置をした、ナノチップを作製することで問題を解決できるのではないかと考え、転写系をモデルにこのアプローチの有効性を探った。近接化する事で、実効濃度を高くする事が可能となり、高い反応効率が期待される。また、分子を精密配置する事で、合理的な反応設計が可能になる。これらの性質により、1チップで動作可能で、また、環境の影響を受けにくいナノチップの作製が可能になると考えられた。具体的には、近年開発されたDNAナノ構造体を足場として、RNAポリメラーゼ(RNAP)や遺伝子といった転写に関わる因子群をナノメートル精度で配置し、アプローチの有効性を検証した。

### 3. 研究の方法

DNAナノ構造は1982年にアメリカのNed Seemanによって提唱され、発展を続けてきたが、近年、簡便に任意の3次元構造を構築可能なDNA origami法が開発され(Rothemund 2006)、急速に発展している。DNAナノ構造には、様々な構造を容易に設計構築可能である事に加えて、蛋白質や核酸といった生体分子だけではなく、金属やポリマーといった様々な物質をナノメートル精度で分子配置可能であるという特徴がある。

本研究では、この方法を発展させ、シート状の四角いDNAナノ構造(90x60x2 nm)を用いて転写ナノデバイス(転写ナノチップ)を構築した。モデルのRNAPとしては、T7 RNAPを用いた。T7 RNAPは1つのサブユニットからなる高活性の酵素であり、生化学的評価が容易だと期待された。我々のナノチップでは、T7 RNAPはSNAPf蛋白質とその特異的リガンドを介して、DNAナノ構造物に固定し、また、基質遺伝子はavidin-biotin反応を介して固定した(図1)。

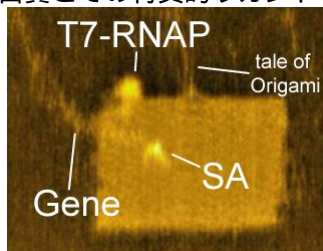


図1. 転写ナノデバイス(AFM像)

### 4. 研究成果

作成した転写ナノチップの転写活性を測定した所、3つの特徴的な性質を見出した(直交性、合理設計性、完結性)。

#### 直交性

溶液を漂っている外部遺伝子に対する見かけの $K_m$ 値が1720 nMでありほとんど転写しないのに対して(シールド効果。溶液中に遊離しているRNAPと目的遺伝子のみかけの $K_m$ 値は1.3 nM)、DNAナノ構造に固定した内部遺伝子は、きわめて高効率に転写する事がわかった(近接効果)。競合実験で、この性質を確認した所、1 nMのナノデバイス(と内部遺伝子濃度)に対して、外来遺伝子が2000倍濃い条件でも、内部遺伝子の方を3倍程度優先的に転写していた。これは、DNAナノ構造が持つ負電荷等により、外来性遺伝子に対する親和性が低下する一方、近接効果により、内部遺伝子の転写頻度が向上している事に起因すると考えられる。実際、上記の競合実験では、酵素-基質間の距離が50 nm程度であるが、これは、分子密度から換算すると数 $\mu$ m程度の濃度相当であり、活性上も計算上も高い実効濃度を達成している事がわかった(図2)。

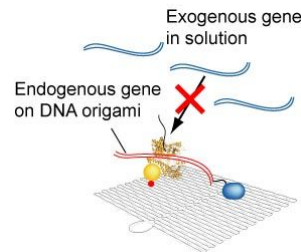


図2. ナノチップは自身の遺伝子を優先転写

#### 合理設計性

酵素(RNAP)と基質(遺伝子)の距離を変えて、転写活性を合理設計可能な事を確認した。DNAナノ構造では、ナノメートル精度で精密分子配置する事が可能であるので、固定場所を変える事で容易に酵素-基質間距離を変える事が可能であり、転写開始に必要な、RNAPとプロモーター部位の衝突頻度を設計可能であると考えられる。実験の結果、転写活性は、基質遺伝子の物理的性質でほぼ説明できる事が明らかになった(DNAをworm-like chain modelと仮定)。その結果、固定場所とリンカー(固定端からプロモーターまでの距離)を変える事で、転写活性を合理設計できる事がわかった(図3)。これらの性質は、従来、経験則的に転写発現量の異なる遺伝子配列や因子を用いて行われていた遺伝子発現系の構築が、因子間距離という比較的制御しやすいパラメーターによって、合理設計可能である事を示している。

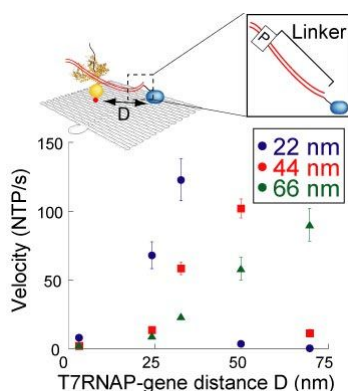


図3. 転写活性は合理設計可能

#### 完結性

転写ナノチップが1分子レベルで動作するかどうかを明らかにするために、water-in-oil (w/o) dropletsの中で活性を確認した。具体的には、転写-翻訳共役型の無細胞翻訳系 PURE system と一緒に、転写ナノチップを封入し、チップ濃度を下げていった。比較対象として、溶液を漂う RNAP-溶液を漂う PCR 産物の反応系 (DNA 開始反応) と、mRNA の反応系 (mRNA 開始反応) を行った所、ナノチップは、1 分子遺伝子レベルで動作することがわかった。また、その酵素活性は、溶液を漂う 100 nM の RNAP と等価であり、我々の測定条件下では、1 チップが  $10^4$ - $10^5$  個の RNAP と同等な活性がある事がわかった。これらの性質は、ナノチップが高活性であり、また、1 分子レベルで動作することを示している。

本研究で作成したナノシステムは、分子の精密配置によって、高効率で反応が進行し、またかつ、開放系であるが、閉鎖系のように振舞うユニークな反応系へと発展する可能性がある。この事によって、反応場をナノメートルサイズへと小さくしても生物反応を効率的に進行させる事が可能となり、手のひらにのるような様々な装置への展開が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. \*Tadakuma H, Masubuchi T, Ueda T. RNA Study Using DNA Nanotechnology. (review), Prog Mol Biol Transl Sci., 査読無、vol.139、2016、pp. 121-163  
doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.11.004.

2. Yao C, Sasaki HM, Ueda T, \*Tomari Y, \*Tadakuma H. Single-molecule analysis of the target cleavage reaction by Drosophila RNAi enzyme complex. Molecular Cell, 査読有、vol. 59、2015、pp. 125-132.

[学会発表](計 10 件)

<2016 年度> 7 件 うち招待講演 2 件

(1) 多田隈尚史、「転写ナノチップを用いた、転写機構の機能解析」、第 39 回 日本分子生物学会年会(招待講演)、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(2) 多田隈尚史、「Construction of DNA origami base gene transcription nano chip」、第 54 回 日本生物物理学会年会(招待講演)、2016 年 11 月 26 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

(3) Han YW, Yamamoto R, Nakao K, Tadakuma H, Harada Y. "Holliday junction DNA facilitates RuvA-RuvB complex formation"、第 54 回 日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 26 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

(4) Masubuchi T, Endo M, Iizuka R, Iguchi A, Yoon DH, Sekiguchi T, Qi H, Iinuma R, Miyazono Y, Shoji S, Funatsu T, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T, Tadakuma H. "A single integrated gene nano-chip functioning in an artificial cell"、第 54 回 日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 26 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

(5) Kinoshita M, Okabe K, Tadakuma H, Harada Y. 「神経分化時における神経細胞内温度イメージング」、第 54 回 日本生物物理学会年会、2016 年 11 月 26 日、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

(6) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Iizuka R, Sugiyama H, Harada Y, Funatsu T, Ueda T. "Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami"、CBI 学会 2016 年大会、2016 年 10 月 25 日-27 日、タワーホール船堀(東京都・江戸川区)

(7) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Iizuka R, Sugiyama H, Harada Y, Funatsu T, Ueda T. "Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami"、RNA2016(国際学会)、2016 年 6 月 29 日、京都国際会館(京都府・京都市)

<2015 年度> 3 件

(1) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T. "Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami"、BMB2015 第 38 回日本分子生物学学会、第 88 回日本生化学大会、2015 年 12 月 01 日-04 日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(2) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T. "Construction and functional analysis of DNA origami base DNA-RNAP hybrid nanomachine"、CBI 学会 2015 年大会、2015 年 10 月 27 日-29 日、タワーホール船堀(東京

都・江戸川区)

(3) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T. "Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami", 第53回 日本生物物理学会年会、2015年9月13日-15日、金沢大学角間キャンパス(石川県・金沢市)

〔図書〕(計 2 件)

(1) 藤原慶、多田隈尚史、化学同人、現代化学 No.548、2016、p36-37

(2) 多田隈尚史、情報計算法学生物学会(CBI学会)出版、「DNA分子デザインのすべて ~ BIOMOD 虎の巻」、2016、6,8,45,47,51,6485,93節

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多田隈 尚史 (TADAKUMA HISASHI)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：10339707