

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22390

研究課題名(和文)自由自在な遺伝子発現を実現する転写ナノチップの創成

研究課題名(英文)Construction of autonomous transcription nano-chip

研究代表者

多田 隈 尚史 (TADAKUMA, HISASHI)

東京大学・定量生命科学研究所・協力研究員

研究者番号：10339707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAワクチンの大成功は、核酸の体内デリバリーの有用性を改めて示した。しかし、より精緻な制御をするためには、核酸をデリバリーするだけでなく、その場で状況に合わせて、RNAを作成し、細胞の機能を制御する技術の確立が肝要である。本研究は、転写ナノチップ作製を通して、その具現化を目指し、ナノチップが個体内に長時間壊れずに安定に維持される技術を確立した。また、作成・導入されたRNAから、効率的に蛋白質が作成される機構についても明らかにし、今後の基盤を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RNAワクチンの成功が示すように、核酸を体の中にデリバリーできれば、様々に有用です。しかし、従来は、個々に合わせて、あるいは、同じ人でも症状にあわせた対処をする事が困難でした。必要な場所と時間に必要な核酸を作成できれば、これらのような事が可能となります。本研究は、その基礎研究として、RNAを個体内で作成する技術、また、作成・導入されたRNAが、細胞の機能にどのように影響を与えるのかを調べ、今後の基盤を得ました。

研究成果の概要(英文)：Great success of RNA vaccine clearly shows the power and potential of nucleic acids delivery. However, for more sophisticated regulation, on-site RNA production and regulation of its function is the key. Here we focused to construct transcription nano-chip. We established the method to maintain the nano-chip intact in vivo for long time. Also, we elucidate the molecular mechanism to produce protein efficiently from RNA. These results should be the basis for future study.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子計測(SMD) 核酸 蛋白質 分子機械 マイクロ・ナノデバイス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現を自由自在に制御する為には、環境を検知し、演算し、出力を行うような、自律的なナノデバイスが有用である。従来、遺伝子を膜でくるみ、細胞に届けるドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いる事で、遺伝子を体内に届け、制御された遺伝子発現が図られてきた。COVID-19のRNAワクチンは、そのようなDDSを用いた核酸の体内デリバリーの有用性を改めて示した。しかし、従来の技術は、膜でくるんだ時点で細胞に届けるものが決定されているが、受け取る側の細胞は、同種の細胞でも個々に性質がかなり違い、内容物や内包量を最適化する必要があった。すなわち、画一的な内包物を体内デリバリーする従来の手法では、精密な遺伝子発現の制御は難しい。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、遺伝子発現のプログラムが可能な、自律的なナノデバイスを創出することで問題を解決できるのではないかと考え、既に構築している転写系を発展させる事でこのアプローチの有用性を探った。環境を検知するセンサー、プログラム可能な演算処理部、並びに、出力部を1つのナノチップに集積する事により、環境に応じて、出力内容や量、タイミングを変更する事が可能となり、個々の細胞に対して、個別に、かつまた、状況に応じた遺伝子発現制御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。また、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)、急速に様々な分野に応用されている。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。

申請者らは、これまでに、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。取り扱いが容易で高活性なT7 RNAPと標的遺伝子をナノチップに集積化し、1分子のチップで動作可能な事を確認している。また、T7 RNAPと標的遺伝子の間の距離を制御し、RNAPと標的遺伝子の衝突頻度を合理設計する事で、転写量の制御が可能な事を示してきた。更に、標的遺伝子にセンサー配列を組み込むことによって、様々なシグナル(miRNA、蛋白質、pH、イオン強度、光、低分子化合物)に反応し、on/off制御、あるいは、論理演算が可能な事を示してきた。

本研究では、このアプローチを発展させ、細胞内・個体内で、機能する転写ナノチップの構築を試みた。細胞内には、ナノチップの骨組みであるDNAナノ構造を壊す、DNaseや、集積化された蛋白質を壊すprotease、などが存在し、ナノチップの機能を阻害すると考えられる。そこで、本研究では、先行研究で用いたシート状のDNAナノ構造ではなく、筒状のcage構造を用いる事とした。このcage構造にRNAPや標的遺伝子を集積化した(図1)。また、転写ナノチップが産出したRNAは、コードRNA、あるいは、非コードRNAとして機能する。その際、産出RNAの機能性を高めるには、産出RNAの塩基配列が、どのように機能に影響を与えるのかを詳細に評価する必要がある。そこで、遺伝情報を蛋白質配列に変換するコドン表に着目した研究も行った。分担者の三嶋は、近年、次世代シーケンサーを用いて、mRNAのコドン配列が、どのようにmRNAの安定性に影響を与えるのかを検討しており、レポーターmRNAのライブラリを調整し、ゼブラフィッシュ初期杯内での安定性と蛋白質発現に関する相関を検証した。

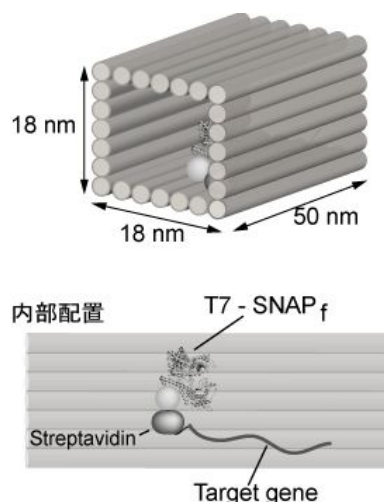


図1. 転写ナノチップ

4. 研究成果

作成した転写ナノチップの転写活性をゼブラフィッシュ初期杯内で測定した所、転写活性は確認できたものの、課題も見つかった。そこで、下記の2点に注力した研究を行った。(1)壊れにくいDNAナノ構造の構築、(2)産出RNAの機能向上。

(1) 壊れにくいDNA ナノ構造の構築

ゼブラフィッシュ初期胚における転写は、1時間程度であれば、問題はないが、長時間の転写には難があった。これは、ナノチップの骨組みであるDNAナノ構造が、細胞・個体内のDNase等によって壊れてしまうからだと考えられた。そこで、まず、試験管内の実験を行った所、細胞内の環境に近いと考えられる10% FBS(Fetal Bovine Serum、ウシ胎児血清)内においては、1-2時間程度で壊れてしまう事がわかった。複数の方法を比較検討した結果、UV照射でチミン-ダイマーを人工的に形成させ、これによって、DNAナノ構造内の未接続部分を架橋(共有結合)させる方法を用いることで、安定性がかなり向上する事がわかった。具体的には、温度(90度)、水素イオン濃度(pH4)、塩濃度(MgやNa不含)といった、かなり厳しい条件でも、DNAナノ構造が、半日から、条件によっては、1週間程度、壊れずに構造が保たれる事が確認できた。また、個体内での安定性を確認する為、マウスに注射器で導入した所、架橋していないDNAナノ構造は1-2時間程度で壊れるのに対して、架橋した場合は、24時間以上、DNAナノ構造が壊れずに残ることが分かった。

また、DNAナノ構造は、1本の長い1本鎖DNA(scaffold)と、多数(~200本)の短いオリゴDNA(staple)からなるが、上記のチミンダイマーによる架橋場所を合理設計するためには、DNA合成機で自在に配列を設計可能なstapleに加え、長いscaffoldも自在に配列を変更できる事が望ましい。しかし、従来は、ファージの1本鎖ゲノムが主に材料として用いられてきたため、配列変更や調整に時間がかかった(ゲノム構築後、大腸菌に感染させ、ファージゲノムを回収する必要がある)。この為、試験管内で迅速に配列変更や調整ができる方法を模索した所、PCRをベースとした方法を用いて、4k bp程度までのscaffoldであれば、高正確性を保持したまま、自在な配列のscaffoldを調整できる事がわかった。この設計したscaffoldは、DNAナノ構造の形成効率の向上にも寄与しており、今後の基盤となる。

(2) 産出RNAの機能向上

ナノチップが算出したRNAは、そのままRNAとして機能したり、あるいは、蛋白質の鋳型mRNAとして機能する。鋳型mRNAに関しては、近年の研究から、mRNAの3塩基を蛋白質の1アミノ酸情報へと変換する"コドン"情報が、mRNAの安定性にも寄与している事が明らかになりつつあり、ナノチップが産出したRNAからの蛋白質発現効率を高める為には、どのようなコドンがRNA安定性や蛋白質発現に影響を与えるのかを、網羅的に評価する必要がある。まず、特定のコドンの繰り返し配列をGFPの3'末端に挿入したレポータープラスミドを全コドンに対応する種類構築し、in vitro転写によりレポーターmRNAのライブラリを調整した。次に、このmRNAをゼブラフィッシュ受精卵に顕微注入し、RNA-seqによって解析することで、61センスコドンがmRNAの安定性に及ぼす影響を数値化した。その結果、発現の上昇に貢献すると考えられる一群のコドンと、逆に発現を阻害すると考えられる一群のコドンを定義することができた。今後、このコドンと発現量の相関情報を用いることで、転写ナノチップによる遺伝子発現制御の効率向上が期待される。

本研究の成果は、今後の自律的な転写ナノチップ構築の基盤となる。昨今の困難な状況におけるRNAワクチンの大成功は、核酸の体内デリバリーの有用性を改めて示した。しかし、より精緻な制御をするためには、核酸をデリバリーするだけでなく、その場の状況を検知し、演算した結果によって、作成するRNAの種類や量、タイミングを調整する事で、細胞の機能を制御する技術の確立が肝要である。本研究の自律的な転写ナノチップは、その核となる技術と期待され、今後、理学研究や医学応用だけでなく、工業生産への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Duic I, Tadakuma H, Harada Y, Yamaue R, Deguchi K, Suzuki Y, Yoshimura SH, Kato H, Takeyasu K,	4. 巻 48
2. 論文標題 Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 11664-11674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkaa935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Takeshi, Machida Kodai, Iwasaki Wakana, Shigeta Tomoaki, Nishimoto Madoka, Takahashi Mari, Sakamoto Ayako, Yonemochi Mayumi, Harada Yoshie, Shigematsu Hideki, Shirouzu Mikako, Tadakuma Hisashi, Imataka Hiroaki, Ito Takuhiro	4. 巻 74
2. 論文標題 HCV IRES Captures an Actively Translating 80S Ribosome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 1205 ~ 1214.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.04.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tadakuma Hisashi and Kitagawa Daiju	4. 巻 12
2. 論文標題 Overview of the “biophysics in nano-space” session at the 57th annual meeting of the	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biophysical Reviews	6. 最初と最後の頁 283-285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12551-020-00646-z	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 福本 紘大, 宮園 侑也, 多田隈 尚史, 原田 慶恵
2. 発表標題 DNAオリガミを用いたキネシン-1の空間配置が輸送複合体の協調運動に与える影響の解析
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福本 紘大, 宮園 侑也, 多田隈 尚史, 原田 慶恵
2. 発表標題 キネシン分子の空間配置が輸送複合体の運動に与える影響の評価
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Y. Mishima, S. Kimura, S. Iwasaki
2. 発表標題 Defining codon-mediated mRNA decay and No-go decay in zebrafish embryos
3. 学会等名 EMBL meeting Protein synthesis and Translational Control (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shimaa A. Abdellatef, Hisashi Tadakuma, Yuichi Kondo, Kangmin Yan, Rofia Boudria, Kodai Fukumoto, Takashi Fujiwara, Hideo Higuchi, and Keiko Hirose
2. 発表標題 Oscillatory movement of a dynein-microtubule complex crosslinked with DNA-origami
3. 学会等名 64th Annual Meeting of Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 永沼 政広, 多田隈 尚史, 泊 幸秀
2. 発表標題 Dicer-2による二本鎖RNAプロセッシングの一分子解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Kodai Fukumoto, Yuya Miyazono, Hisashi Tadakuma, Yoshie Harada
2. 発表標題 Reconstitution of kinesin-based transport complex using DNA origami
3. 学会等名 CBI学会2019年大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 多田隈尚史
2. 発表標題 How nano-space affects biological phenomena
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Abdellatef Shima A., 多田隈 尚史, 近藤 雄一, 巖 康敏, 樋口 秀男, 広瀬 恵子
2. 発表標題 ダイニン・微小管・DNA折り紙複合体の振動的運動
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 福本 紘大, 宮園 侑也, 多田隈 尚史, 原田 慶恵
2. 発表標題 DNAオリガミの分子配置技術を用いたキネシン分子の協調性評価
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 多田隈尚史
2. 発表標題 集積型遺伝子チップを用いた、転写の理解と制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Yuichiro Mishima
2. 発表標題 Defining codon-mediated mRNA decay and No-go decay in zebrafish embryos
3. 学会等名 EMBL Protein Synthesis and Translational Control（国際学会）
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 永沼 政広, 多田隈 尚史, 泊 幸秀
2. 発表標題 Dicer-2による二本鎖RNAプロセッシングの一分子解析
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Peixun Han, Yuichi Shichino, Mari Mito, Shungo Adachi, Satoshi Hashimoto, Tsuyoshi Udagawa, Kenji Kohno, Yuichiro Mishima, Toshifumi Inada, and Shintaro Iwasaki
2. 発表標題 Genome-wide Survey of Queued Ribosomes
3. 学会等名 第21回日本RNA学会年会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 多田隈尚史
2. 発表標題 Protein integrated nano-chip for transcription analysis and regulation
3. 学会等名 第19回 日本蛋白質科学会年会 / 第71回 日本細胞生物学会大会 合同年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	三嶋 雄一郎	京都産業大学・生命科学部・准教授	
	(MISHIMA YUICHIRO)		
	(00557069)	(34304)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------