

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24687018

研究課題名(和文) DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムの分子配置制御を用いた多分子協調反応の解析

研究課題名(英文) Analysis of coordination mechanism of multiple bio-molecules using DNA-origami base molecular nano-layout technology.

研究代表者

多田 隈 尚史 (Tadakuma, Hisashi)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・研究員

研究者番号：10339707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：生体システムでは多数の分子が協調して機能している。しかし、従来は、分子の数や種類、空間配置を自在にコントロールする技術が確立していなかったため、その詳細なメカニズムには未解明の部分が多い。本研究では、DNAの2次元構造物(DNA-tile)上に多数の生体分子を固定した"DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステム"を構築を目指し、第一歩として、RNAポリメラーゼ(RNAP)と基質遺伝子を固定した転写ナノチップを作成した。その結果、特徴的な性質を見出し、生体分子の集積化というアプローチが、機能解析やデバイス応用に有効である事を示唆した。

研究成果の概要(英文)：In the cell, many factors orchestrate complicated but elegant system. However, how multiple biomolecules are coordinated each other remains elusive. Here we created gene nano-chip using DNA-Origami-tile as the skeletal structure and RNA polymerase (RNAP) as the functional module, allowing us a rational design of orthogonal gene expression device. Our approach of integrating biomolecules on DNA-origami-tile base nano-chip might contribute to explore the precise mechanism of fundamental phenomena and also to develop nano-devices.

研究分野：生物物理学

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

生体内では、細胞分裂や転写・翻訳反応など、様々な現象に、多種・多数のモーター蛋白質が関わっている。しかし、従来は、分子の数や種類、空間配置を自在にコントロールする技術がなかった。我々は、自己集合能を持ち、サブナノメートル単位で長さ調節ができ、かつ配列情報を用いて位置情報を持たせることが可能な DNA を 2 次元・3 次元の構造物の骨組みとして用い、機能を持った蛋白質を自在に配置する事で、この壁を破れるのではないかと考えた。手始めに、2 つのキネシンモーター蛋白質の頭部機能ドメインを DNA で接続した 2 種類のハイブリッドナノマシン(DNA-キネシン)を作製し(図 1)、キネシンの頭部間張力に起因する協調性が連続歩行に重要である事を示した(EMBO 2010)。更に、近年開発された DNA のナノ構造物(DNA-tile)を用いて、1~9 個のキネシンを 90x60nm の DNA ナノ構造上にアレイ化し (DNA-tile-kinesin)、キネシンの空間配置を 2 次元に制御する事に成功した。(図 2)。そして、DNA-tile に結合しているキネシンの数に応じて、DNA-tile-kinesin の連続歩行距離が伸びる事を見出した(投稿準備中)。本研究では、この実験系を更に発展させ、多種・多数の分子間の協調メカニズムの解明と遺伝子発現制御デバイスへの応用を目指した。

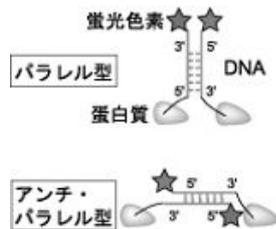


図 1. DNA-キネシン

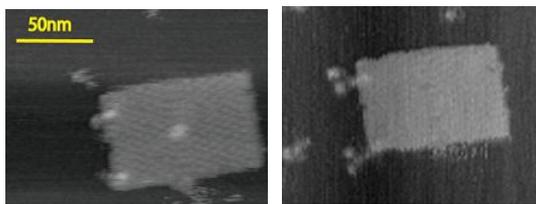


図 2. AFM 像 (長方形 tile に蛋白質が結合
左図:単量体 3ヶ所、右図:2量体 2ヶ所)

2. 研究の目的

活性測定が容易な転写反応を用い、システム全体の振舞と個々の分子の活性をリアルタイムに同時観察する事で、従来詳細に調べる事ができなかった空間配置の影響を明らかにしつつ、多分子協調メカニズムの分子基盤を解明し、その成果応用した遺伝子発現制御デバイスを作成する。また、将来的な制御系への応用を鑑み、内在する小さな RNA 分子で特定の配列を持つ RNA 等に結合できる

RNA 干渉の鍵酵素 (RNA-induced silencing complex (RISC)) の分子機構を詳細に調べる。

3. 研究の方法

(1) 転写ナノデバイスの構築

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、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。我々のナノデバイスでは、T7 RNAP は SNAP 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 3)。

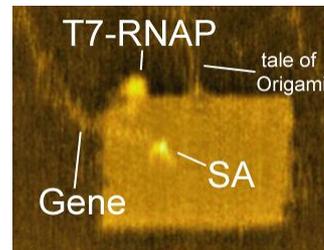


図 3. 転写ナノデバイス(AFM 像)

(2) RNA 干渉の分子メカニズム

ヒトや植物の免疫系をになう RNA 干渉は、ヒト等の高等生物においても様々な制御機構に関わっている。自身が持つ小さな RNA 鎖を用いて特定の配列のみを認識し、結合や切断を行えるので、将来的な人工制御機構構築において有用と考えられる。そこで、RNA 干渉を司る RISC(RNA-induced silencing complex) の形成(岩崎、佐々木ら、Nature 2015)や切断機構の分子機構(Yao ら、MolCell in press)を蛍光 1 分子観察で調べた。

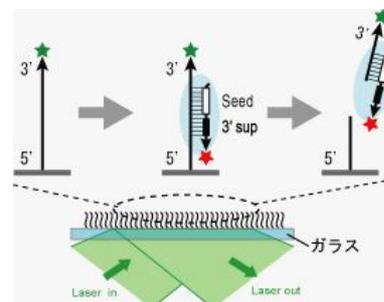


図 4. RNA 干渉の 1 分子観察
(図は切断活性観察)

4. 研究成果

(1) 転写ナノデバイスの構築

作成した転写ナノデバイスの転写活性を測定した所、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 1000nM 程度でありほとんど転写しないのに対して(シールド効果。ちなみに、溶液中に遊離している RNAP と目的遺伝子のみかけの K_m 値は数 nM 程度)、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、1nM 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 50nm 程度であるが、これは、分子密度から換算すると数 μM 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。この優先転写の性質は、我々の研究室で開発された再構成型無細胞翻訳系 PURE system や、細胞抽出液(ウサギ網状赤血球や HeLa 細胞抽出液)でも確認された。また、他のナノデバイス上の遺伝子を転写しない事からも、作成したナノデバイスは直交性を有する事が明らかとなった。

続いて、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できるかどうかを確認した。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-基質間距離の影響を評価する事が可能である。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 5 にデータの一例を示す)。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。

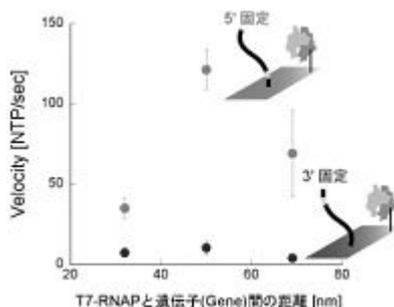


図 5. 因子間距離制御による転写活性設計

遺伝子発現機構は特異性の低い"弱い相互作用"で、何となく、しかし着実に進んでいる。細胞は、"弱い相互作用"の特異性を担保するために、"反応の場"を上手く利用しているよ

うに思われる(例えば、リボソームを組み立てる核小体等、核や細胞質に見られる、様々なマイクロドメイン)。しかし、従来はそのような反応場を人工的に構築し、生化学的・生物物理学的に解析する事は難しかった。本研究で行った DNA ナノ構造を用いた反応場デザインの手法が遺伝子発現機構理解の一助となる事が期待される。

(2) RNA 干渉の分子メカニズム

RISC 形成は、Argonaute 蛋白質に 2 本鎖 RNA が入り (loading)、片方の鎖が抜け (passenger ejection)、成熟 RISC となる。その際、エネルギーが必要と思われる鎖放出の段階には ATP は不要である物の、一見単純に結合するだけの過程に思われる loading の過程には ATP が必要であり、謎であった。近年の研究から、loading の過程には分子シャペロンが寄与しており、それ故 ATP 依存性がある事が明らかになった(Iwasaki et al, 2009 年)。ただ、シャペロンがどのように寄与しているのかは不明であった。しかし、従来の生化学的解析では、中間体の解析が難しく、研究は行き詰まりを示していた。そこで、中間体の解析が得意な 1 分子解析で、人工の RISC を対象に分子シャペロンの寄与機構を解析した。その結果、シャペロンがなくても、2 本鎖 RNA と受渡蛋白質の複合体(Dicer2/R2D2-siRNA 複合体)は Argonaute 蛋白質に結合できる物の、siRNA を受け渡す前に 20 秒程ですぐに離れてしまう一方、シャペロンがあると、長く滞在する相互作用が生じ、その結果、成熟 RISC が生じることがわかった。これは、シャペロンが、2 本鎖 RNA が入れるよう、Argonaute 蛋白質の構造を変化させているからと考えられる。今後は、Argonaute 蛋白質の構造変化と個別シャペロン(HSP70, 90 システム)を同時の相互作用を同時に可視化する事で、RISC 形成機構の詳細が明らかになると期待される。

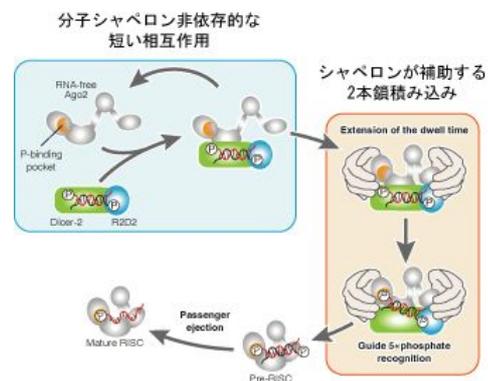


図 6. 分子シャペロンの作用点

一方、RISC による標的切断において、RISC は標的を素早く、正確に切断する必要があるが、この 2 つは相反する性質である。これまでの生化学的、結晶構造学的知見から、RISC

に内包する小さな RNA1 本鎖が 2 つの部分("シード"部分と"その他"部分)に分かれており、役割分担をしている事が示唆されていたが、直接的な証拠に欠けていた。我々は、リアルタイムに標的切断過程を観察することで、RISC はまず"シード"部分で素早く標的に結合し、その後、標的が正しいかどうかを"その他"部分で検証していること(校正機能)が直接的に観察した。一方で標的切断後は 2 つの部分は明瞭な役割分担はなく、切断され 2 つに分断された標的は熱力学的安定性に基づいてランダムに放出されることを明らかにした。

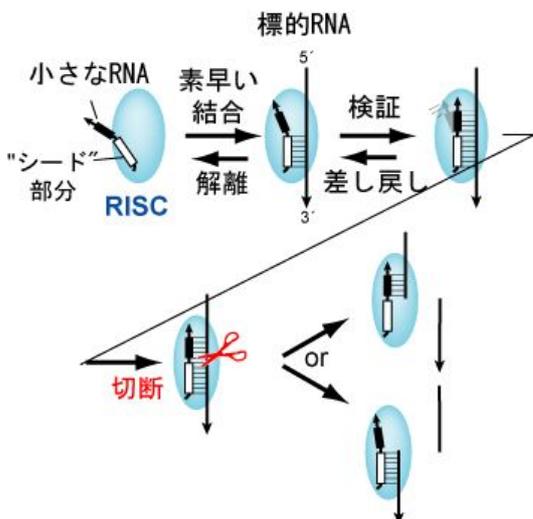


図 7. RISC は 2 つの領域を巧みに使い分けている

5. 主な発表論文等
(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- (1) Sano E, Tashiro S, Tadakuma H, Takei T, Ueda T, Tsumoto K "Type 1 IFN inhibits the growth factor deprived apoptosis of cultured human aortic endothelial cells and protects the cells from chemically induced oxidative cytotoxicity" J Cellular Biochem、査読有、113、2012、3823-3824
- (2) Iwasaki S, Sasaki HM, Sakaguchi Y, Suzuki T, *Tadakuma H, *Tomari Y "Defining fundamental steps in the assembly of Drosophila RNAi enzyme complex" Nature、査読有、521、2015、533-536、doi:10.1038/nature14254
- (3) 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、in press、DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.015

[学会発表](計 22 件)

<2012 年度> 5 件 うち招待講演 0 件

(1) Zhou ZP, Yao C, Shimizu Y, Tadakuma H, Taguchi H, Ito K, Ueda T "Single molecule imaging of the trans-translation entry process via anchoring of the tagged ribosome" 日本 RNA 学会、2012/7/18-20、東北大学百周年記念会館川内萩ホール (宮城県)

(2) Miyazono Y, Endo M, Ueda T, Sugiyama H, Harada Y, Tadakuma H "多分子キネシン間の協調性は運搬物を効率的に長距離輸送するのに重要である" 日本生物物理学会、2012/9/22、名古屋大学・東山キャンパス(愛知県)

(3) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T "DNA ナノ構造を用いた DNA-RNA ポリメラーゼ・ハイブリッドナノマシンの構築と機能評価" 日本生物物理学会、2012/9/24、名古屋大学・東山キャンパス(愛知県)

(4) Kawai T, Caaveiro J, Katagiri T, Tadakuma H, Ueda T, Tsumoto K "Catalytic activity of MsbA reconstituted in nanodisc particles is modulated by remote interactions with the bilayer" 日本生物物理学会、2012/9/24、名古屋大学・東山キャンパス(愛知県)

(5) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T "Construction and functional analysis of DNA origami base DNA-RNAP hybrid nanomachine, Kanazawa Bio-AFM Workshop、2012/11/5-8、Kanazawa, Japan (KKR Hotel Kanazawa)

<2013 年度> 6 件 うち招待講演 2 件

(1) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T "Construction and functional analysis of DNA origami base DNA-RNAP hybrid nanomachine" 日本生物物理学会、2013/10/28-30、国立京都国際会館(京都府)

(2) Tadakuma H "Designing the nano-reaction field: Introduction and application to motor protein research" 日本生物物理学会(招待講演)、2013/10/28-30、国立京都国際会館(京都府)

(3) Niwa T, Tadakuma H, Ito K, Ueda T, Taguchi H "Single-molecule fluorescence imaging of translationally-coupled chaperone action" 日本生物物理学会、2013/10/28-30、国立京都国際会館(京都府)

(4) 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、2013/10/28-31、タワーホール船堀(東京都)

(5) 多田隈 尚史 "ナノ反応場デザインによる DAN モーター蛋白質ハイブリッドの自律運動設計に向けて" 「細胞を創る」研究会 6.0(招待講演)、2013/11/14-15、慶応大学・鶴岡キャンパス

(6) Kawai T, Tadakuma H, Caaveiro JMM, Tsumoto K, Ueda T "High-resolution Thermodynamic Analysis of ABC-Transporter MsbA Reconstituted in Nanodiscs" Biophysical meeting, 2014/2/15-19, Moscone Center (米国・CA)

<2014 年度> 11 件 うち招待講演 1 件

(1) 丹羽達也、多田隈尚史、伊藤耕一、上田卓也、田口英樹 "タンパク質翻訳と共役した分子シャペロン動態の 1 分子蛍光イメージング" 第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014/6/26、ワークピア横浜/横浜産貿ホールマリネリア

(2) 姚春艶、多田隈尚史、佐々木浩、泊幸秀、上田卓也 "RISC 切断過程の蛍光 1 分子解析" 第 16 回日本 RNA 学会、2014/7/23、名古屋市・ウインクあいち

(3) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T "DNA origami を用いた直交性のある転写ナノデバイスの構築"、第 16 回日本 RNA 学会、2014/7/24、名古屋市・ウインクあいち

(4) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T "DNA origami を用いた直交性のある転写ナノデバイスの構築"、第 8 回バイオ関連化学シンポジウム、2014/9/12、岡山大学津島キャンパス

(5) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T "Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami"、第 52 回日本生物物理学会、2014/9/25、札幌コンベンションセンター

(6) 広瀬恵子、巖康敏、多田隈尚史、"Cross-linking the dynein-microtubule complex by DNA origami"、第 52 回日本生物物理学会、2014/9/26、札幌コンベンションセンター

(7) 韓龍雲、津中康央、横田浩章、山田和弘、大西舞、山崎冴果、末武勲、田嶋正二、多田隈尚史、原田慶恵 "Characterization of ATP-dependent chromatin remodeling complexes using fluorescently labeled nucleosome" 第 52 回日本生物物理学会、2014/9/27、札幌コンベンションセンター

(8) Masubuchi T, Tadakuma H, Endo M, Sugiyama H, Harada Y, Ueda T "Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami"、第 87 回日本生化学会、2014/10/18、国立京都国際会館

(9) Sasaki HM, Iwasaki S, Sakaguchi Y, Suzuki T, Tadakuma H, Tomari Y "Defining fundamental steps in the assembly of

Drosophila RNAi enzyme complex"、Cell Symposia "Regulatory RNAs"、2014/10/20, Berkeley (米国・CA)

(10) 増淵岳也、多田隈尚史、遠藤政幸、原田慶恵、杉山弘、上田卓也 "生物遺伝子発現システムを集積化したバイオナノチップの構築に向けて"、計測自動制御学会 システム・情報部門学術講演会 2014 (SSI2014)、2014/11/22、岡山大学 創立五十周年記念館

(11) 多田隈尚史 "DNA ナノ構造を用いたナノ転写チップの構築: ナノ反応場における転写活性"、第 66 回日本細胞生物学大会(招待講演)、2014/6/12、奈良県新公会堂

〔図書〕(計 2 件)

(1) 多田隈尚史、上田卓也、化学同人、化学 vol 68(6)、2013、2 ページ

(2) 多田隈尚史、化学同人、1 分子生物学 12-1 章「細胞質と細胞核内での mRNA の運動」、2014、8 ページ

〔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)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点

研究者番号: 10339707