

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (特設分野研究)

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0068

研究課題名(和文) 分子間距離で紐解く、遺伝子発現反応場の再構成

研究課題名(英文) Elucidating molecular layout effects in gene expression

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内は非常に混雑した環境であるが、遺伝子発現は非常に効率良く、かつ精緻に行われている。これは、関連因子が集積した"ナノ反応場"が形成され、特定の反応が効率的に進む一方、他の因子を排除する効果等が合わさっているからだと考えられる。本研究では、ナノ分子配置が可能なDNAナノ構造上に、転写関連因子を集積化した、人工ナノ反応場(転写ナノチップ)を作製し、反応場において、分子配置や分子間距離がどのように転写反応に影響するのかを評価可能な実験系を確立した。また、ナノチップが自律デバイスとして機能する事を実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、従来の反応拡散系を基にした反応系ではなく、反応に関与する因子をDNAナノ構造の上に集積化した反応系(ナノ反応場)を構築し、転写反応を題材にその特徴的な性質を明らかにした。転写は遺伝子発現の最初の機構であり、その分子機構がわかれば、遺伝子発現の制御が可能になる。また、作製したナノチップは、環境を検知・演算し、出力を行う自律デバイスとして機能する事が可能であるので、細胞や人工細胞の運命制御が可能となり、医療や有用物質生産に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cellular environment is very crowding. However, gene expression occurs precisely and efficiently. In the cell, related factors are integrated onto the scaffold, and form the "Nano reaction field", which allows the efficient process of specific reaction while excluding unintended factors. Here, we reconstituted prototype of transcription nano reaction field, transcription nano-chip, by integrating RNA polymerase (RNAP) and target gene onto DNA origami scaffold. Using transcription nano-chip, we evaluated how the molecular layout and inter-molecular distance affect the transcription. Furthermore, we proofed the concept of autonomous transcription nano-chip functioning in an artificial cell.

研究分野：生物物理

キーワード：1分子計測(SMD) DNAデバイス 遺伝子発現 転写

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内は非常に混雑した環境であるが、遺伝子発現は非常に効率良く、かつ精緻に行われている。これは、関連因子が集積した"ナノ反応場"が形成され、特定の反応が効率的に進む一方、他の因子を排除する効果等が合わさっているからだと考えられる。

(2) 合成生物学は、生物と工学が融合した領域であり、"生物"に"工学的手法"を導入したり、あるいは、逆に、"工学"に"生物に触発された手法"が適用されたりしている。合成生物学では、システムを要素にわけ、再構成することで、生物システムの理解や制御を目指しているが、鍵となるのは、遺伝子発現の制御である。遺伝子発現は、酵素(例えば、DNA から RNA を作る RNA ポリメラーゼ (RNAP))と標的遺伝子(例えば、DNA)が相互作用することによって起きる。2000年に Jim Collins らは、酵素と標的遺伝子が溶液を自由に漂いながら相互作用を行う、反応拡散系を基にした遺伝子回路を作製する事で、シグナル依存的な、遺伝子発現のオン・オフ制御を行い、合成生物学の1分野を開いた。しかし、反応拡散系では、意図しない非特異的な相互作用があり、直交性がある(相互作用しない)部品を構築する必要性や、個々の部品の量や活性の最適化をする必要があり、遺伝子回路の複雑度に限界があった。

(3) 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、2006年にアメリカの Paul Rothemund によって、簡便に任意の3次元構造を構築可能な DNA オリガミ法が開発され、急速に発展している。1本の長い1本鎖 DNA(scaffold)と、多数の短い1本鎖 DNA(staple strand)から形成される DNA オリガミは、特定 DNA 配列の場所が、ナノ構造中において一意に決まる事から、特定 DNA 配列に結合させた"目的分子"をナノ構造中の特定場所に結合させる事が可能である。そこで、DNA オリガミを用いれば、人工的なナノ反応場を構築し、関連因子を集積化する事による影響を評価可能になると期待される。

(4) また、人工的なナノ反応場を用いる事で、効率的にかつ、他の反応系と混線せずに遺伝子発現を行う事が可能になれば、従来の反応拡散系を基にした遺伝子回路の欠点を克服できると期待された。

## 2. 研究の目的

(1) 生物の効率的な遺伝子発現の理解には、ナノ反応場(ナノチップ)を再構成し、その性質を理解する事が肝要である。本研究では、DNA オリガミの上に、もっとも単純な転写系(RNAP と標的遺伝子)を集積させ、ナノメートル精度で DNA オリガミ上の分子配置を制御する事で、酵素と基質が近接化した際の影響を評価する事を目的とした。

(2) また、DNA オリガミ上に形成された人工ナノ反応場(ナノチップ)に、環境を検知するセンサーと、得られた情報を演算する機能を付加すれば、1つのチップで、検出・演算・出力が完結する自律遺伝子発現回路チップが実現すると考えられるので、その実証を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) DNA オリガミ上に転写系を固定化した人工ナノ反応場(転写ナノチップ)を作製する為、まずは、活性が高い、T7 ファージ由来の RNAP と標的遺伝子を固定した(図1)。T7 RNAP に SNAPf タンパク質を融合させ、DNA オリガミ上の特定場所に化学結合させた SNAP リガンドを介して RNAP を DNA オリガミに共有結合で固定化した。また、標的遺伝子は、avidin-biotin 法で結合させた。DNA オリガミでは、分子の配置をナノメートル精度で制御する事が可能であるので、RNAP や標的遺伝子の固定場所を変更し、RNAP-標的遺伝子間の分子間距離を変化させ、転写活性を測定する事で、分子配置が酵素活性にどのような影響を与えるのかを評価した。DNA オリガミは、まずは単純なシート状の四角い形状(縦横が、90 x 60 nm、厚さは2 nm)を用いた。

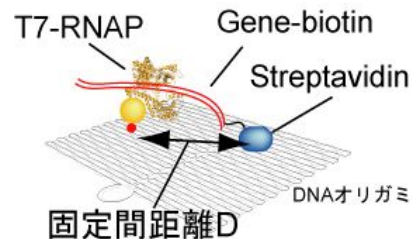


図1. 転写ナノチップ

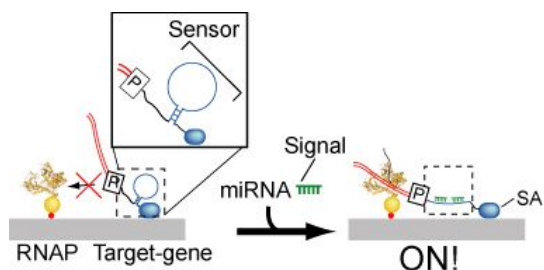


図2. 転写ナノチップのシグナルによる活性化

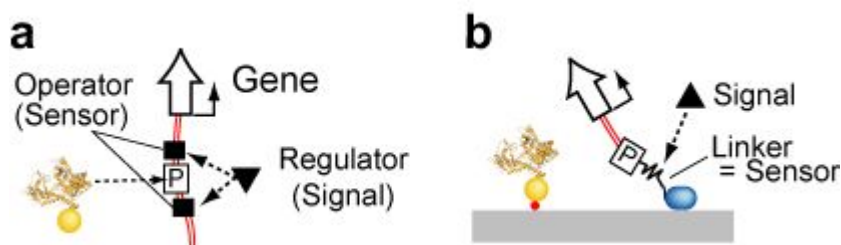
(2) 自律デバイスを実証する為に、酵素(RNAP)が認識するプロモーター部分と、標的遺伝子の

固定部間のリンカー部分に着目した。外部シグナルに応じて、リンカー部分の実効距離を変化するセンサー(スイッチ)を導入し、プロモーターに酵素が衝突頻度を制御した。この事で、転写活性をオン・オフさせた(図 2)。また、複数のスイッチを導入する事で、演算機能を持たせた。

#### 4. 研究成果

(1) DNA オリガミ上に転写系を固定した転写ナノチップを用いた解析から、転写活性は、標的遺伝子と RNAP の間の固定間距離に依存する事がわかった。しかし、当初予想されたように、距離が近いほど、活性が高いわけではなく、ほどよく距離が離れていた方が、転写活性が高かった(固定間距離依存性にピークがあった)。また、標的遺伝子のプロモーターと固定端の間のリンカー部分の長さによって、ピーク位置が変化した。すなわち、固定間距離とリンカー長の 2 つのパラメーターを変える事で、転写活性を合理設計可能な事がわかった(合理設計性)。更に、分子が近接した状況では、固定した標的遺伝子の実効濃度が向上し(50 nm の固定間距離の場合に 2 $\mu$ M 以上の実効濃度)、反応効率が向上している一方、外部の溶液を漂う遺伝子の転写活性は低い事がわかった(直交性)。すなわち、転写ナノチップには、人工ナノ反応場として期待される性質が備わっており、効率よく遺伝子発現を実現できる事がわかった。

(2) 転写ナノチップにおいて、転写活性に距離依存性がある事を利用し、シグナルの有無で RNAP と標的遺伝子の実効分子間距離を変化させる事で、検出・演算・出力を自律的に行う、分子デバイス作製に成功した。そして、人工細胞内の microRNA 入力プロファイルに応じて、多様な出力 RNA を産生する遺伝子発現システムを実現した。この際、集積型ナノチップでは、様々なシグナル(小さな RNA、低分子化合物(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)、核酸結合蛋白質(LacI) and UV 光)に反応できる事が、特徴である事を見出した。これは、酵素と標的遺伝子が溶液内を自由に運動し、相互作用する反応拡散系では、転写制御因子がプロモーター(酵素結合部位)近傍の制御部位に結合する事で、転写が制御されるが、それ故、制御部位は、酵素の基質である必要があり(例えば、RNAP では、2 本鎖 DNA。図 3a)、シグナルの種類も限られていた(例えば、核酸結合蛋白質)。一方、集積型ナノチップでは、センサー部位と酵素基質部位が完全に分離している(図 3b)、センサー部位の材料として様々な物が使用可能であり、センサー設計の自由度が向上した。すなわち、本研究によって、転写活性を合理設計可能で、かつ、様々なシグナルに応答可能な自律転写ナノデバイスの基盤が確立した。



**図 3. a, 反応拡散系における制御。b, 集積型ナノチップにおける制御。後者では、センサー部分と酵素基質部分が分離しているので、様々なシグナルに反応できる**

(3) 本研究では、酵素と標的遺伝子のみ単純な反応系においても、空間配置や、ナノ空間の性質が転写反応に影響を与える事が明らかになった。一方、ヒトのような、高等生物における転写反応では、様々な因子が関与することで、より複雑な制御が行われている。今後、ヒトのような真核の転写系を集積化する事で、より複雑な転写系において、ナノ反応場の性質がどのように遺伝子発現に影響を与えているのかが評価可能になるとと思われる。そして、遺伝子毎に発現量が異なる理由が明らかになると期待される。

(4) 本研究は、試験管内や、人工細胞に見立てた油中水滴において、1 チップレベルで転写ナノチップの動作を確認したが、今後、細胞や個体内での動作が確認できれば、細胞や人工細胞の運命制御を通して、医療や有用物質生産に有効であると期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

1. 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  
Construction of integrated gene logic-chip.

Nature Nanotechnology、査読有、vol. 13、2018、pp. 933-940  
DOI: 10.1038/s41565-018-0202-3

2. Tsuboyama K, \*Tadakuma H, \*Tomari Y  
Conformational Activation of Argonaute by Distinct yet Coordinated Actions of the Hsp70 and Hsp90 Chaperone Systems.  
Molecular Cell、査読有、vol. 70、2018、pp. 722-729  
DOI: 10.1016/j.molcel.2018.04.010

3. Sasaki H, Tadakuma H, \*Tomari Y  
Single-Molecule Analysis for RISC Assembly and Target Cleavage.  
Methods Mol Biol、査読無、vol. 1680、2017、pp. 145-164  
DOI: 10.1007/978-1-4939-7339-2\_10

4. Watanabe M, Iwakawa HO, Tadakuma H, \*Tomari Y  
Biochemical and single-molecule analyses of the RNA silencing suppressing activity of CrPV-1A.  
Nucleic Acids Research、査読有、vol. 45、2017、pp. 10837-10844  
DOI: 10.1093/nar/gkx748

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 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 and Tadakuma H "Integrated gene logic-chip functioning in an artificial cell."、The 2nd Joint Australia-Japan/Japan-Australia Joint RNA meeting (国際学会)、2018年11月

2. 多田隈尚史 "集積型遺伝子チップの構築"、第56回日本生物物理学会(招待講演)、2018年9月

3. 多田隈尚史 "DNA オリガミを用いた反応場制御"、第394回情報計算化学生物(CBI)学会 学術講演会(招待講演)、2018年5月

4. 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

5. 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

〔図書〕(計 1 件)

1. 藤原慶、多田隈尚史、化学同人、現代化学 No.548、2016年、2ページ

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: プログラム可能な遺伝子発現システム

発明者: 多田隈尚史、増淵岳也、原田慶恵

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2018/044292

出願年: 平成30年

国内外の別: 国際

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：増淵 岳也

ローマ字氏名：MASUBUCHI, Takeya

研究協力者氏名：中尾 公子

ローマ字氏名：NAKAO, Kimiko

研究協力者氏名：福本 紘大

ローマ字氏名：FUKUMOTO, Kodai

研究協力者氏名：泊 幸秀

ローマ字氏名：TOMARI, Yukihide

研究協力者氏名：坪山 幸太郎

ローマ字氏名：TSUBOYAMA, Kotaro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。