

令和元年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19351

研究課題名(和文) ナノ開口による転写反応の分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanism of transcription reaction by zero-mode waveguides

研究代表者

原田 慶恵 (Harada, Yoshie)

大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：10202269

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)：転写は遺伝子発現の最初の機構であり、非常に重要である。本研究では、リアルタイムの転写可視化を目指して、その基盤技術である、ナノ開口法の改良を行った。その結果、基板作製手順や、表面処理の最適化を行い、基板間のバラつきを抑えることに成功した。また、転写では、レール(DNA)が3次元で折れ曲がるので、その上を運動する酵素(RNAポリメラーゼ)や、制御因子の3次元的な空間配置や、その結果引き起こされる相互作用の強弱が重要であるが、DNAナノ構造を用いることで、ナノメートル精度で転写関連因子の空間配置を制御する基盤技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質や核酸など生体分子間の相互作用は、生命現象の基本であり、本研究で確立した方法は、これらの分子機構を理解する上で有用である。本研究では、精製した因子を用いているが、作製したナノ開口チップには、細胞抽出液や細胞そのものを載せる事も可能であり、将来的には、1分子レベルの高感度検出が可能な利点を生かし、臨床検査などへの展開も期待される。

研究成果の概要(英文)：Transcription is the first step of gene expression. To visualize the real-time process of transcription, we established the method using Zero-mode waveguides (ZMWs). We optimized the fabrication process and glass surface modification, which allowed us to minimize the fluctuation of ZMW-chip quality. In addition, it is important to control the precise three-dimensional (3D) layout of transcription factors, e.g. RNA polymerase (RNAP), as the 3D layout on the flexible DNA affects the interaction of RNAP and regulatory factors. Therefore, using DNA origami technology, we established new approach to control the molecular layout at nano-meter resolution. These methods should contribute to future elucidation of transcription mechanism.

研究分野：生物物理学

キーワード：ナノバイオロジー

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 蛍光 1 分子イメージング技術は、生体分子の機能を解析する有効な手法である。しかし、従来、主に用いられてきた全反射照明による蛍光 1 分子観察は、溶液中の蛍光分子の濃度がおよそ 50 nM までの実験にしか用いることができないという問題がある。2003 年に W. W. Webb らは数~数十 μM という高濃度条件下でも蛍光 1 分子観察が原理的に可能な、近接場光を利用したナノ開口 (zero-mode waveguides) という手法を開発した。ナノ開口を用いることで、全反射蛍光顕微鏡では解析できない、親和性が高くないタンパク質-タンパク質分子間やタンパク質-核酸分子間の結合解離の詳細な解析が可能になる。

(2) ナノ開口法は有用であるが、ナノ開口の作製には、高価な電子線描画装置が必要なことなどから、一部の対象を除き、あまり普及していない。

(3) また、従来、ナノ開口基板の底に分子を固定化する際は、(位置制御することなく)、固定化していたので、必ずしもナノ開口の中心部に固定化されるわけではなく、基板を形成する遮蔽金属(アルミニウム)の傍に固定される分子もあった。金属近傍に固定化された分子は、蛍光色素が金属と相互作用し、増強や消光といった現象を引き起こすため、観察シグナル強度が、ナノ開口の孔ごとにバラつく原因となっている。ナノ開口では、直径を小さくするに従って、観察可能な蛍光分子の濃度が向上するので、今後の研究に向けては、直径を小さくできる事が望ましい。しかし、ナノ開口の直径を小さくすると、金属近傍に固定化される分子の割合が増えるので、何らかの手段で、分子を孔の中心部に固定化する必要がある。

(4) 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 オリガミ法が Paul Rothemund によって 2006 年に開発され、急速に発展している。特に、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、ナノ開口内での分子の固定場所を制御できると期待される。

2. 研究の目的

(1) 我々は、これまでに、電子線描画装置を用いて、直径約 100 nm のナノ開口基板作製手法を確立し、Holliday 構造 DNA 結合タンパク質である RuvB タンパク質と DNA の相互作用の解析を行ってきた。しかし、1 枚 1 枚を手作りで行っていたために、ナノ開口基板の製造効率、均一性や再現性に難があった。本研究では、石英ウェハを用いた半導体プロセスを用いる事で、均一なチップを大量に作製する手法の確立を目的とした。

(2) また、DNA オリガミは、分子をナノメートル精度で、空間配置させるのに、有用な手段であるが、転写に係る因子(RNAP や標的遺伝子)を DNA オリガミ上に固定した例がなく、ナノ開口と組み合わせる前に、まずは、DNA オリガミ上に転写系を固定化する事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 4 インチ(10 cm)の石英ウェハを、通常の半導体プロセス装置で処理した。レジストをスピコートで塗布した後(図 1a)、電子線描画装置で開口パターン(例えば、100 nm の円形状)を描画し、現像すると、描画パターンの形状部分のみが、柱となって残る(例えば、直径 100 nm の円柱。図 1b)。次に、アルミを蒸着した後に(図 1c)、レジスト部分を化学的に溶かすと(リフトオフ操作)、ナノ開口が完成する(図 1d)。本研究では、大量のチップを迅速に作製するため、電子線描画は、1 筆書きで図形を描画する通常方式ではなく、CP(Character Projection)方式と呼ばれる、図形マスクを投影して、パターンを描画する方式を用いた。作業は、京都大学ナノテクノロジーハブ拠点で行った。

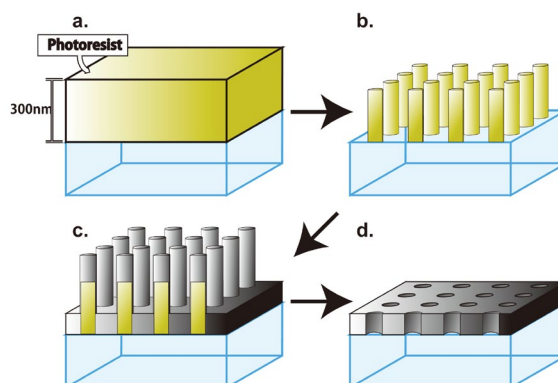


図 1. ナノ開口の作製手順

(2) DNA オリガミ上に転写系を固定化するため、まずは、活性が高い、T7 フェージ由来の RNAP と標的遺伝子を固定した(転写ナノチップ。図 2)。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 ナノ構造に固定化した(共有結合)。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。

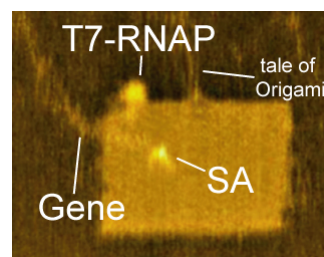


図 2. 転写ナノチップ

4. 研究成果

(1) 電子線描画条件を最適化することで、安定して、ナノ開口チップを得る事が可能となった。また、1枚の4インチウェハから、1 cm 角のナノ開口チップを 50 枚近く得る事が可能になり、チップ製作のスループットが向上した。さらに、ナノ開口の表面は、ガラスやアルミからなるが、これらの表面に観察対象分子などが非特異的に吸着すると、観察に支障がでる。そこで、ガラス表面を polyethylene glycol (PEG) で、アルミ表面を polyvinylphosphonic acid (PVPA) で同時に修飾する条件を検討し、非特異吸着が抑えられることを確認した。これらの結果、均一なチップを大量に作製する手法の確立に成功した。

(2) 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 RNA ポリメラーゼの間の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。また、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、反応効率が向上している事がわかった。更に、この距離依存性を利用し、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。ヒトのような真核の転写系では、RNAP に様々な制御因子が相互作用する事で、転写過程が制御されているが、親和性が高くなく、通常の全反射蛍光顕微鏡では、観察が困難である。今後、真核の転写系を DNA オリガミに固定化し、ナノ開口と組み合わせる事で、真核転写の分子機構解明に寄与すると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Shingo Sotoma S, Daiki Terada, Takuya F. Segawa, Ryuji Igarashi, Yoshie Harada and Masahiro Shirakawa

Enrichment of ODMR-active nitrogen-vacancy centres in five-nanometre-sized detonationsynthesized nanodiamonds: Nanoprobes for temperature, angle and position.

Scientific Reports、査読有、vol. 8、2018、5463

DOI: 10.1038/s41598-018-23635-5

2. Takeya Masubuchi, Masayuki Endo, Ryo Iizuka, Ayaka Iguchi, Dong Hyun Yoon, Tetsushi Sekiguchi, Hao Qi, Ryosuke Iinuma, Yuya Miyazono, Shuichi Shoji, Takashi Funatsu, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Takuya Ueda and Hisashi Tadakuma

Construction of integrated gene logic-chip.

Nature Nanotechnology、査読有、vol. 13、2018、pp. 933-940

DOI: 10.1038/s41565-018-0202-3

3. Daiki Terada, Shingo Sotoma, Yoshie Harada, Ryuji Igarashi and Masahiro Shirakawa
One-Pot Synthesis of Highly Dispersible Fluorescent Nanodiamonds for Bioconjugation.

Bioconj Chem.、査読有、vol. 29、2018、pp. 2786-2792

DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00412

4. Sotaro Fujii, Misa Masanari-Fujii, Shinya Kobayashi, Chiaki Kato, Masayoshi Nishiyama, Yoshie Harada, Satoshi Wakai and Yoshihiro Sambongi

Commonly stabilized cytochromes c from deep-sea Shewanella and Pseudomonas.

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry、査読有、vol. 82、2018、pp. 792-799

DOI: /10.1080/09168451.2018.1448255

5. Yasuko Osakada, Tuyoshi Fukaminato, Yuma Ichinose, Mamoru Fujitsuka, Yoshie Harada and Tetsuro Majima
Live Cell Imaging Using Photoswitchable Diarylethene-Doped Fluorescent Polymer Dots.
Chemistry - An Asian Journal、査読有、vol. 12、2017、pp. 2660~2665
DOI: 10.1002/asia.201701038

〔学会発表〕（計 10 件）

1. Yoshie Harada "Studies on Biomolecules Using Single-Molecule Imaging Technique"、Deutsch-Japan Kolloquien 2019 (招待講演) (国際学会)、2019 年 2 月
2. Kimiko Nakao, Hisashi Tadakuma, Yong-Woon Han, Yoshie Harada "Quantitative analysis of biomolecular complexes using Zero-Mode Waveguides (ZMW)"、第 56 回日本生物物理学会年会、2018 年 9 月
3. Kodai Fukumoto, Yuya Miyazono, Hisashi Tadakuma, Yoshie Harada "Poly-lysine tag increase the binding rate of SNAPf-fused protein to DNA origami"、第 56 回日本生物物理学会年会、2018 年 9 月
4. Kimiko Nakao, Hisashi Tadakuma, Yong-Woon Han, Kodai Fukumoto, Yoshie Harada "High-throughput fabrication of Zero-Mode Waveguide (ZMW) and its application to observation of bio-molecules"、第 55 回日本生物物理学会、2017 年 9 月
5. Takeya Masubuchi, Hisashi Tadakuma, Masayuki Endo, Ryo Iizuka, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, Takashi Funatsu, Takuya Ueda "Rational design of orthogonal gene transcription nano device on DNA origami"、第 19 回日本 RNA 学会、2017 年 7 月

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

大阪大学 蛋白質研究所 原田慶恵研 研究テーマ
<https://www.ccc.osaka-u.ac.jp/protein/nanobiology/research/>

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：多田隈 尚史
ローマ字氏名：Hisashi Tadakuma

研究協力者氏名：中尾 公子
ローマ字氏名：Kimiko Nakao

研究協力者氏名：韓 龍雲
ローマ字氏名：Yong-Woon Han

研究協力者氏名：福本 紘大
ローマ字氏名：Kodai Fukumoto

研究協力者氏名：増淵 岳也
ローマ字氏名：Takeya Masubuchi