

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21603008

研究課題名（和文） ポリアミドー転写活性化因子融合分子による特定遺伝子活性化法の開発

研究課題名（英文） Development of specific gene activation method using polyamide-transcription factor conjugates

研究代表者

遠藤 政幸 (ENDO MASAYUKI)

京都大学・物質－細胞統合システム拠点・准教授

研究者番号：70335389

研究成果の概要（和文）：塩基配列特異的な合成分子ピロールイミダゾールポリアミドを用いた遺伝子発現の制御を検討した。一方で、エピジェネティック制御の機構解明のため、ヌクレオソームや関連酵素を1分子で可視化する技術開発を検討した。ヌクレオソームの挙動を直接観察するため、DNA ナノ構造体を用いて、酵素の1分子観察系を構築した。この結果、機能化したポリアミドの配列特異性を DNA ナノ構造体上で1分子で可視化することに成功した。また、DNA ナノ構造体内で高速原子間力顕微鏡を用いて、動的に酵素反応を1分子で観察する系を確立した。この系を用いて、DNA ナノ構造体にヌクレオソームをトラップし、動的に直接観察することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We tried to investigate the regulation of gene expression using synthetic pyrrole-imidazole polyamide. For the investigation of the mechanism of epigenetic regulation, we developed the imaging method for nucleosome and related enzymes. For direct visualization of the nucleosome, we constructed the single molecule observation system using the designed DNA nanostructures. We successfully visualized the sequence-selectivity of functionalized polyamide in the designed DNA nanostructure. We also constructed the single-molecule observation system for the behavior of enzymes using high-speed atomic force microscopy. Using this system, we successfully captured the nucleosome to the DNA nanoscaffold, and observed its behavior at the single-molecule level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：ケミカルバイオロジー

キーワード：エピジェネティック制御、DNA ナノ構造、ヌクレオソーム、原子間力顕微鏡、ポリアミド

1. 研究開始当初の背景

特定遺伝子の活性化は、細胞増殖の維持や

分化の制御等を肯定的に行なうために非常に重要である。本研究では、近年明らかに

されつつある、ヒストンのアセチル化やメチル化などの修飾によるクロマチン構造の制御による遺伝子の活性化及びプロモーター部位の脱メチル化による活性化の機構（エピジェネティック制御）に立脚し、化学生物学的な手法（ケミカルバイオロジー）でこの機構の解明を行う。具体的には特定の DNA 配列を認識し結合するピロールイミダゾールポリアミドを用いて、エピジェネティックな活性化に寄与する分子を結合した融合分子を合成する。これを用いて、特定のターゲット遺伝子の活性化を狙い、これらの分子が細胞中で機能することをその遺伝子の発現と細胞応答から検討する。また、エピジェネティック制御の機構解明のため、ヌクレオソームや関連酵素を 1 分子で可視化する技術を確認する。

## 2. 研究の目的

近年、ヒストンのアセチル化やメチル化などの修飾によるヌクレオソーム構造の制御と遺伝子の活性化及びプロモーター部位の脱メチル化による遺伝子の活性化（エピジェネティック制御）が注目されてきている。また、特定の遺伝子をターゲットとする手法の開発が盛んにおこなわれている。本研究では、塩基配列特異的な合成分子ピロールイミダゾールポリアミドを用いて、遺伝子活性化の制御を目指した。その目的のために、ケミカルバイオロジーの手法によって遺伝子の活性化の機構の解明と手法の開発を検討した。第一に、酵素やヌクレオソームの動的な観察系の確立と反応機構の解明を検討した。第二にポリアミドの配列特異性を検討する 1 分子観察系の検討を行った。この知見をもとに、特定の DNA 配列を認識し結合するピロールイミダゾールポリアミドを用いて、エピジェネティックな活性化に寄与する分子

を導入した融合分子を設計する。

## 3. 研究の方法

(1) 生体分子の挙動を可視化するため、1 分子観察系を確立する。DNA オリガミ法を用いて、DNA ナノ構造体を設計し、基質となる 2 本鎖 DNA を DNA ナノ構造体に導入し、酵素を加えることで高速原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて動的な挙動を直接 1 分子観察し解析する。この系を用いて、再構成したヌクレオソームを DNA ナノ構造体に導入し、ヒストン修飾酵素によるヌクレオソーム構造の変化を 1 分子観察し、その機構を解析する。

(2) 機能化したポリアミドを設計合成し、DNA ナノ構造体に特異的な配列を導入して、その結合を見ることで塩基配列特異性を 1 分子レベルで観察する。

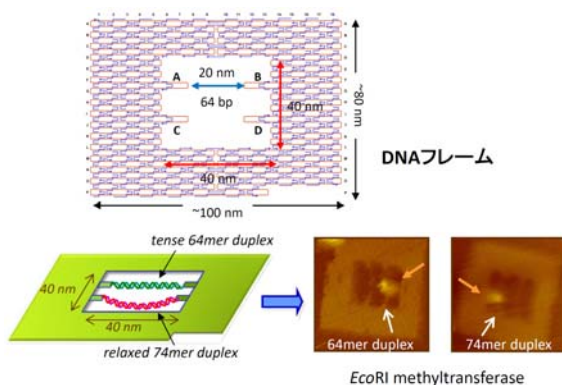
## 4. 研究成果

(1) 高速原子間力顕微鏡による酵素反応の可視化

DNA 修飾酵素と修復酵素の反応を直接観察できる系の構築を行った。EcoRI メチル転移酵素は、緩んだ 2 本鎖 DNA (74 塩基対) がちょうど長さの 2 本鎖 DNA (64 塩基対)

生体分子の 1 分子の運動の可視化は、分子の挙動やその反応を解析でき、分子の持つ固有の振る舞いを見ることが可能となる。本研究では、DNA オリガミ法によって 100x80 nm の長方形構造内に 40x40 nm の中空構造をもつ DNA ナノ構造体「DNA フレーム」構造を設計・構築し、その内部に基質となる 2 本の 2 本鎖 DNA を導入して、酵素反応の 1 分子観察を行った(図 1)。メチル転移酵素(M. EcoRI)は DNA 鎖を折り曲げて adenine の N6 位をメチル化するため、張った状態の 64 塩基対と緩んだ状態の 74 塩基対では、反応性の違いが表れると考えられる。これら異なる張力の 2 本鎖 DNA に対して、M. EcoRI の結合の挙動

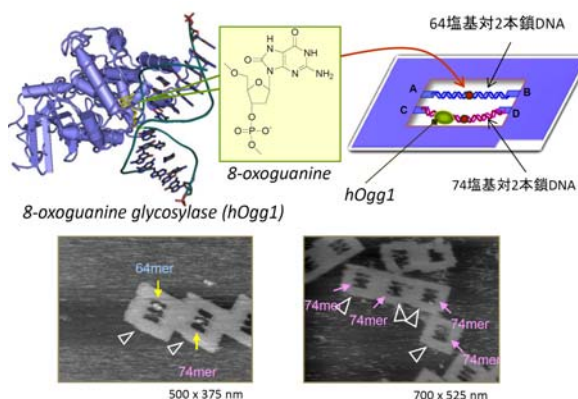
を高速 AFM によって解析した(図 1A)。AFM による直接観察とメチル化反応効率を解析した結果、74 塩基対の配列がよりメチル化されやすいことが明らかとなった。このことから、DNA ナノ構造体によって 2 本鎖 DNA の持つ張力を変えることで酵素反応を制御できることが示され、酵素の挙動の 1 分子解析も可能となった。( *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 1592–1597 ).



**図 1** ナノ構造上での酵素反応の制御と 1 分子解析。(A) 観察に用いた DNA フレーム構造と 2 本鎖 DNA(64 と 74 塩基対)を導入した DNA フレーム。M. EcoRI が 2 本鎖 DNA に結合した DNA フレームの AFM イメージ。

この系を使用し DNA 修復酵素(8-oxoguanine glycosylase 及び pyrimidine dimer glycosylase) の 1 分子観察と反応の制御を行った。これらの酵素は DNA 鎖を折り曲げることで修復反応を行うため、同様に 64 塩基対と緩んだ状態の 74 塩基対の 2 本鎖 DNA を DNA フレーム内に導入し、反応の制御と修復酵素の反応の挙動を解析した。還元による酵素の捕捉と切断反応(図 2)の反応効率を解析した結果、74 塩基対の配列がより反応しやすく、ナノ構造体によって酵素反応を制御できることが示された。また、高速 AFM によって、酵素 1 分子の挙動が可視化でき、DNA への結合、DNA 上での運動、触媒反応、DNA からの解離といった一連の酵素反応の 1 分子観察が可能となっ

た。( *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 9412–9416).



**図 2** 修復酵素 hOgg1 の構造と中央に基質を持つ 2 本鎖 DNA を導入した DNA フレーム。還元による酵素の捕捉(左)と切断反応(右)の AFM イメージ。

また、DNA 組み換え酵素の反応系を 1 分子観察するため、DNA 構造体に DNA 組み換えのための DNA 配列を導入して、組み換え反応が観察できる系の構築を行った。高速 AFM によって DNA 組み換え酵素が動的に 1 分子観察ができ、その組み換え反応を直接観察することが可能となった。

## (2) 機能性ポリアミドの設計と配列選択性の 1 分子観察

また、ポリアミド誘導体の配列特異性を検討するため、5 個のウエルをもつ DNA 構造体を構築し、その中に特異的な配列とミスマッチ配列を導入した。合成した PI ポリアミドにはビオチンを結合してあり、反応後ストレプトアビジンでラベルが可能である(図 3A)。長鎖の 2 本鎖 DNA を基質として使用すると、特異的な塩基配列の位置に対してアルキル化がおり、ストレプトアビジンでラベルできた。5 個の異なる配列を持つ DNA 構造体に対して、アルキル化分子とビオチンを結合したポリアミドは、特異的な配列により選択的(88%)に結合し、アルキル化反応をすること

が1分子で確かめられた。(J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 4654-4660)

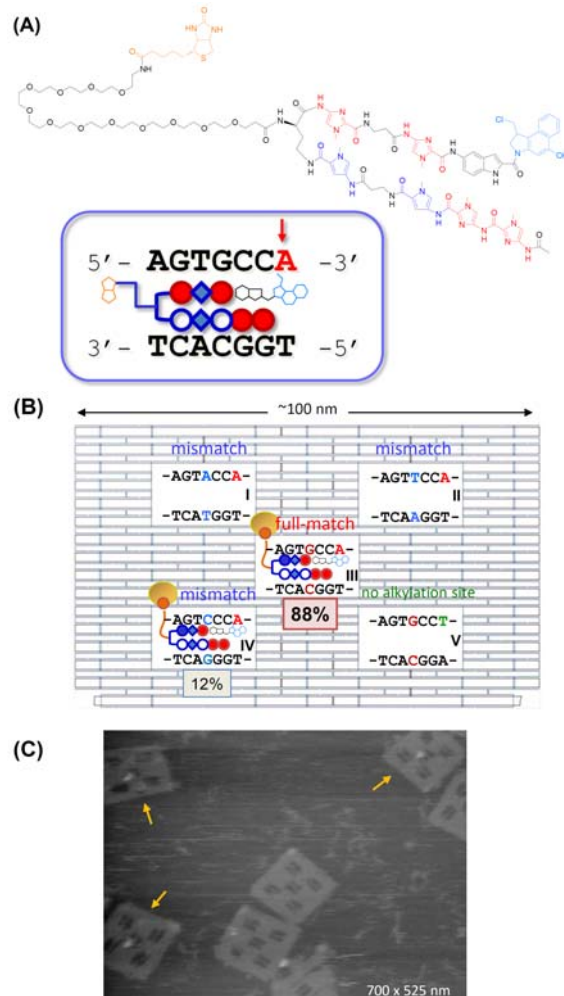


図3 DNA 配列特異的な結合の1分子観察。(A) アルキル化剤とピオチンで機能化したポリアミドとその認識配列及びアルキル化サイト。(B) 5個の空間を持つ DNA に導入した配列と結合したサイト。中央が完全な認識配列。(C)アルキル化後ストレプトアビジンでのラベリングした AFM イメージ。中央の空間に結合している。

### (3)ヌクレオソームの1分子観察

この1分子観察系を用いて、再構成したヌクレオソームの1分子観察を試みた。ヒストン8量体を結合するための2本鎖DNAの両端にDNAフレームに結合させるための相補的な1本鎖DNA配列を付加し、再構成したヌクレオ

ソームをDNAフレームに2か所で結合し導入した。高速AFMによってこの構造体を観察すると、ヌクレオソームが構造を保ったままDNAフレーム内に支持された複合体が観察できた。しかしながら、安定に長時間観察するには支持するためのDNAナノ構造体のさらなる検討が必要である。

### 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 20 件)

1. M. Endo, R. Miyazaki, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Transcription Regulation System Mediated by Mechanical Operation of DNA Nanostructure." *J. Am. Chem. Soc.* 134, 2852-2855 (2012). 査読有 (DOI: 10.1021/ja2074856)
2. T. Yoshidome, M. Endo, G. Kashiwazaki, K. Hidaka, T. Bando, H. Sugiyama, "Sequence-Selective Single-Molecule Alkylation with a Pyrrole-Imidazole Polyamide Visualized in a DNA Nanoscaffold." *J. Am. Chem. Soc.* 134, 4654-4660 (2012). 査読有 (DOI: 10.1021/ja209023u)
3. S. F. J. Wickham, J. Bath, Y. Katsuda, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, A. J. Turberfield, "A DNA-based molecular motor that can navigate a network of tracks." *Nature Nanotechnology*, 7, 169-173 (2012). 査読有 (DOI: 10.1038/NNANO.2011.253)
4. A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, "Single-Molecule Analysis Using DNA Origami." *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 874-890 (2012). 査読有 (doi: 10.1002/anie.201102113)
5. E. Nakata, L. -F. Fong, C. Uwatoko, S. Kiyonaka, Y. Mori, Y. Katsuda, M. Endo, H. Sugiyama, T. Morii, "Zinc finger proteins as the adaptor for locating proteins at specific addresses of DNA origami." *Angew. Chem. Int. Ed.* 51, 2421-2424 (2012). 査読有 (DOI: 10.1002/anie.201108199)
6. A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, "Structure and Functional Analysis of Proteins by High-Speed Atomic Force Microscopy."

- Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 87, 5-55 (2012). 査読有(DOI: 10.1016/B978-0-12-398312-1.00002-0)
7. A. Rajendran, M. Endo, H. Sugiyama, DNA Origami: Synthesis and Self-Assembly. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 48, 12.9.1-12.9.18 (2012). 査読有 (DOI: 10.1002/0471142700.nc1209s48)
  8. A. Rajendran, M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Photo-cross-linking- assisted thermal stability of DNA origami structures and its application for higher-temperature self-assembly." *J. Am. Chem. Soc.* 133, 14488-14491 (2011). 査読有(DOI: 10.1021/ja204546h)
  9. M. Endo, Y. Yang, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Programmed placement of gold nanoparticles onto a slit-type DNA origami scaffold." *Chem. Commun.* 47, 10743-10745 (2011). 査読有(DOI: 10.1039/C1CC13984C)
  10. S. F. J. Wickham, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, J. Bath, H. Sugiyama, A. J. Turberfield, "Direct observation of stepwise movement of a synthetic molecular transporter." *Nature Nanotechnology*, 6, 166-169 (2011). 査読有 (DOI: 10.1038/NNANO.2010.284)
  11. M. Endo, T. Sugita, A. Rajendran, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Two-dimensional DNA origami assemblies using a four-way connector." *Chem. Commun.* 47, 3213-3215 (2011). 査読有(DOI: 10.1039/c0cc05306f)
  12. A. Rajendran, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Programmed Two-Dimensional Self-Assembly of Multiple DNA Origami Jigsaw Pieces." *ACS Nano*, 5, 665-671 (2011). 査読有(DOI: 10.1021/nn1031627)
  13. M. Endo, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Direct AFM Observation of an Opening Event of a DNA Cuboid Constructed via a Prism Structure." *Org. Biomol. Chem.* 9, 2075-2077 (2011). 査読有(DOI: 10.1039/c0ob01093f)
  14. M. Endo, H. Sugiyama, "Recent Progress in DNA origami technology." *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 45, 12.8.1-12.8.19 (2011). 査読有(DOI: 10.1002/0471142700.nc1208s45)
  15. M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Regulation of DNA Methylation Using Different Tensions of Double Strands Constructed in a Defined DNA Nanostructure." *J. Am. Chem. Soc.* 132, 1592-1597 (2010). 査読有(DOI: 10.1021/ja907649w)
  16. M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, "A versatile DNA nanochip for direct analysis of DNA base-excision repair." *Angew. Chem. Int. Ed.* 49, 9412-9416 (2010). 査読有(DOI: 10.1002/anie.201003604)
  17. Y. Sannohe, M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Visualization of Dynamic Conformational Switching of the G-Quadruplex in a DNA Nanostructure." *J. Am. Chem. Soc.* 132, 16311-16313 (2010). 査読有(DOI: 10.1021/ja1058907)
  18. M. Endo, T. Sugita, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, "Programmed-Assembly System Using DNA Jigsaw Pieces." *Chem. Eur. J.* 16, 5362-5368 (2010). 査読有(DOI: 10.1002/chem.200903057)
  19. M. Endo, K. Hidaka, T. Kato, K. Namba, H. Sugiyama, "DNA Prism Structures Constructed by Folding of Multiple Rectangular Arms." *J. Am. Chem. Soc.* 131, 15570-15571 (2009). 査読有(DOI: 10.1021/ja904252e)
  20. M. Endo, H. Sugiyama, "Chemical Approaches to DNA Nanotechnology." *ChemBioChem*, 10, 2420-2443 (2009). 査読有 (doi:10.1002/cbic.200900286)
- [学会発表] (計 18 件)
1. 遠藤政幸、宮崎亮次、江村智子、日高久美、杉山弘「DNA ナノ構造変換を利用した転写の制御」日本化学会第 92 春季年会(2012)、横浜、2012 年 3 月 28 日
  2. 遠藤政幸「DNA ナノ構造体の生体反応への応用」創剤フォーラム若手研究会シンポジウム、京都大学薬学部、京都、2011 年 11 月 19 日
  3. M. Endo, AFM-based Imaging of the Movement of Biomolecules in the Designed DNA Nanostructures. 5th Annual Symposium on Nanobiotechnology, Seoul NanoHealth 2011, Yonsei University, Seoul, Korea, Nov. 17, 2011
  4. M. Endo, Designed DNA Nanostructures for Assembly, Functionalization, and Visualization. POSTECH AMS Symposium on Nanotechnology, Pohang University of Science and Technology, Pohang, Korea, Nov. 16, 2011.
  5. M. Endo, Y. Katsuda, K. Ou, K. Hidaka, H. Sugiyama, Direct Observation of DNA

- recombination in the DNA nanoscaffold. The 38<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, Sapporo, Nov. 9, 2011.
6. 遠藤政幸 「DNA ナノマシンの1分子運動の可視化」第84回 日本生化学会大会シンポジウム「分子ロボティクス」、京都 2011年9月21日
  7. 遠藤政幸、勝田陽介、日高久美、S. Wickham, J. Bath, A. D. Turberfield, 杉山弘「DNA オリガミ上での DNA 分子の移動の精密な操作」ケミカルバイオロジー学会 第6回年会、東京、2011年5月25日
  8. M. Endo, A. Rajendran, T. Sugita, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, Programmed assembly of DNA nanostructures using designed DNAorigami tiles. 8th Conference on the Foundations of Nanoscience 2011, Snowbird, UT, USA, April 11-15, 2011.
  9. 遠藤政幸 「DNA オリガミ法によるナノ構造体の作製と生体分子の動的挙動の1分子観察」単分子エレクトロニクスの現状認識と近未来実現へ向けての中核体制構築、国際高等研究所、京都、2011年2月25日
  10. M. Endo, K. Tatsumi, K. Terushima, Y. Katsuda, K. Hidaka, H. Sugiyama, Direct Observation of Single Molecular Behavior of T7 RNA Polymerase on the Defined DNA Nanostructure. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM), Hawaii, Dec. 15-20, 2010.
  11. M. Endo, Visualization of single molecular movement in the designed DNA nano-space. The SSI 2010 International Symposium, Kyoto, Nov. 24, 2010.
  12. M. Endo, Y. Katsuda, K. Hidaka, S. F. J. Wickham, J. Bath, A. J. Turberfield, H. Sugiyama, Direct observation of stepwise movement of DNA nanomachine walking along the track constructed on a DNA origami scaffold. The 37th Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, Yokohama, Nov. 12, 2010.
  13. M. Endo, Visualization of single molecular movement on the DNA origami scaffold using high-speed AFM. The 8th iCeMS International Symposium, Kyoto, Nov. 9, 2010.
  14. 遠藤政幸、勝田陽介、日高久美、杉山 弘 「DNA 修復反応を観察する DNA ナノチップの開発」ケミカルバイオロジー学会 第5回年会、横浜、2010年5月19日
  15. M. Endo, H. Sugiyama, Programmed self-assembly of DNA jigsaw pieces. 7th Conference on the Foundations of Nanoscience 2010 (FNANO10), Snowbird, UT, USA, April 27-30, 2010.
  16. 遠藤 政幸、日高 久美、杉山 弘「2次元 DNA オリガミ構造の折りたたみによる3次元ナノ構造の構築」日本化学会第90春季年会、大阪、2010年3月29日
  17. M. Endo, H. Sugiyama, Preparation of DNA scaffolds for the 3D-nanostructure construction. The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry and 36th Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2009, Takayama, Oct. 1, 2009.
  18. M. Endo, Design and Construction of DNA Nanostructure for Integration of Molecules. The 5th iCeMS International Symposium, Kyoto, July 27, 2009.
- [図書] (計5件)
1. 遠藤 政幸、杉山 弘 DNA オリガミによる1分子観察系の構築実験医学 2012年増刊号、印刷中 (2012).
  2. 遠藤 政幸、杉山 弘 DNA オリガミ構造体と1分子観察への応用 化学工業, Vol. 63, No. 2, 36-41 (2012).
  3. 遠藤 政幸、杉山 弘 「DNA オリガミによるメゾスケール多次元構造の構築とナノ空間での機能発現」有機合成化学協会誌, Vol. 69, No. 12, 1352-1362 (2011).
  4. 遠藤 政幸、杉山 弘 「DNA オリガミ法による多次元構造体の構築と高次機能化」未来材料, Vol. 11, No. 5, 2-10 (2011).
  5. 遠藤 政幸、杉山 弘 「DNA ナノ構造の設計・構築とその応用」BIO INDUSTRY, Vol. 27, No. 10, 48-54 (2010).
6. 研究組織  
(1) 研究代表者 遠藤 政幸 (ENDO MASAYUKI)  
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授  
研究者番号：70335389