

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 6 月 6 日現在

機関番号：13302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22655051

研究課題名（和文） 自律的な光駆動型 DNA 分子計算系の開発と応用

研究課題名（英文） Development about photo-triggered autonomous DNA computing

研究代表者

藤本 健造 (FUJIMOTO KENZO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号：90293894

研究成果の概要（和文）：光駆動型 DNA 分子計算システムを用いて、標的遺伝子としてコドン 12 の点変異 (GGT → GTT) によりガン原性を獲得する Kras 遺伝子の転写反応をリアルタイム PCR により評価し、変異型遺伝子のみを選択的に増幅できることが示された。自律的な光駆動型 DNA 分子計算による高選択的かつ高感度な遺伝子増幅・検出が可能であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We demonstrate that normal K-ras gene suppressed selectively by photo-triggered autonomous DNA computing and calculated survival rate by real time clamp PCR. BxPC-3 and Capan-1 were suppressed by photo-triggered autonomous DNA Ccamp respectively 86%, 47%.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,000,000	480,000	3,480,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA、光ライゲーション、光クロスリンク

1. 研究開始当初の背景

酵素を用いた遺伝子操作とは異なる手法論として光を用いた遺伝子操作法を提案し、光で DNA 同士をつなげる技術や、DNA を切断する基本技術の開発を行ってきた。またこの光 DNA 操作技術の応用として、論理演算の基礎となる「AND ゲート」（A と B の両方共に 1 である場合のみ結果は 1 となる）や「OR ゲート」（A か B のどちらかが 1 であれば結果は 1 となる）などの基本回路を組み合わせた光ロジック計算を行っていた。さらに 2008 年に、この「光 DNA 操作」を利用した光駆動型 DNA マシンを創製し、2 進数を正確に計算することに成功していた。

2. 研究の目的

光遺伝子操作法と光駆動型 DNA ロジック計算を組み合わせることで、「自律的な光駆動型 DNA 分子計算システム」の構築を目指す。さらに、光駆動型 DNA 分子計算を用いて系内にある遺伝子群の中から入力（光の波長で定義）に従った DNA 情報の編集を行ない、無細胞タンパク質合成システムと組み合わせることで、これまでにない光で生産管理（必要な時に必要な量生産する）可能なタンパク質合成システムを構築することができると考えている。そこで、情報を持つ分子が自分自身で情報を操作できるこの光駆動型 DNA 分子計算システムは、遠隔操作、局所操作といった光操作固有の特性を活用した新しいバイオ分子生産システム構築に向け鍵となる技術になるのではと期待される。「細胞を治療

する」を指向し、光駆動型 DNA 計算システムを組み込むことで光による生命プログラムの遠隔操作が可能かを本課題において探求していこうと考えている。具体的には無細胞翻訳系と光駆動型 DNA 分子計算システムを組み合わせることでタンパク質生産システムの光制御を試みる。また多色励起による複数のタンパク質生産プログラムの制御を指向した様々な波長に反応する分子素子の開発も同時に行うこととした。また、病気を予防するためには、自らの遺伝的な罹患リスクを認識した上で、日々の健康管理を行うことが必要である。本研究課題は遺伝的罹患リスク診断を、専門の医療機関ではなく、ドラッグストアのような、日常性の高い場所でも行えるようなシステムの開発を目指している。

従来の遺伝子診断では、医療機関で遺伝子を網羅的に調べていた。得られた莫大なデータをコンピュータで解析するのだが、データが莫大であるため解析に時間がかかる。また、遺伝子を網羅的に調べることにより、患者が知られたくない体質まで調べられてしまう不安がある。また、コンピュータに残った体質データは、ウイルス感染などによるデータ流出が懸念される。遺伝子を調べる際に酵素などの経験が必要とするものを用いていたため、誰にでも行える診断ではなかった。

これらの問題点を解決するためには

1. 従来のコンピュータに変わるデータが残らないような解析システム
2. 網羅的ではなく、ピンポイントでの遺伝子診断。
3. 酵素などの経験が必要とするものを用いない遺伝子診断

が必要である。

そこでより実用的なバイオコンピューティングを組み込んだ遺伝子解析システムの開発を提案する。本システムは光ライゲーションを用いたバイオコンピューティングを応用することで遺伝子情報の中から欲しい情報(体質)のみを抽出し、知られたくない情報は診断結果に現れない。また必要な遺伝子のみをピンポイントで診断するため、迅速な診断が可能である。さらに、経験が必要とする酵素などの代わりに誰にでも扱いやすい光で遺伝子を扱うため、診断を簡単な操作で行える。そのためドラッグストアのような日常的な場所で診断が可能である。この日常的な場所で診断を行える、迅速でプライバシーにも配慮されたシステムは遺伝的な罹患リスクの診断を身近なものにし、個人々人に対応した適切な健康管理を実現できる。

3. 研究の方法

今まで人工的に合成したモデル配列を用いての実験しか行えなかった。実用的な DNA コ

ンピューティングを組み込んだバイオ診断システムに結びつけるためには、生物由来の遺伝子を用いた検証を行う必要がある。バイオコンピューティングは光ライゲーションを用いたものであり、より実用的なバイオ診断システムを目指すためには光ライゲーションより速く反応が進む光クロスリンク反応で診断システムを構築する必要がある。さらに生物由来の遺伝子は少量しか得られないため、信号の増幅が可能なシステムを構築しなければならない。

そこでまず、(1) 生物由来の遺伝子を得るための実験系の構築、(2) 生体由来遺伝子への光クロスリンク反応の検証、(3) 信号の増幅系の確立、を目的とし研究を進めた。それらを踏まえて良い結果が得られる様であれば、これまでに開発した光によるロジック計算(*ChemBioChem* 8, 1520, (2007))や光 DNA マシン(*J. Am. Chem. Soc.* 130, 10050, (2008))では、DNA 配列に計算を容易にするため規格化された配列として正規直交配列でシステムを活用している。このシステムを利用して光 DNA 分子計算により光架橋性ヌクレオシド含有の人工核酸あるいは天然配列のみからなる核酸が出力となる様、配列をデザインし、一方で *in vitro* 遺伝子発現系に GFP をコードしたプラスミド DNA を添加し、GFP 発現系を構築しておく。366 nm の光によって駆動された自律的な計算により光架橋性人工核酸が発現するとプロモータ領域で光架橋される為、架橋部位より下流は転写されず、GFP タンパク質は合成されない。一方、天然配列のみからなる核酸が発現すると GFP 遺伝子からの mRNA 合成が阻害されることなく開始されると期待される。光照射による GFP タンパク質の発現量の変化を GFP の蛍光強度から定量し、遺伝子発現制御効果を評価する。また基盤となる光操作の可逆性も利用し 312 nm の光照射により情報を初期化できるかどうかをも併せて評価を行うこととした。また前実験で用いた GFP 以外に様々なタンパク質をコードした DNA ライブラリーを作成し、次に自律的に計算する為の光応答性(連結、開裂)ODN を用意する。その際、1年目に作成予定の光応答性分子を活用する。次に同じく自律的に計算する為に必要な論理演算 (AND, OR, NOT) の為の演算因子 ODN を用意する。そして 3種類の波長 (366 nm, 400 nm, 450 nm) を組み合わせ各システムに照射し無細胞翻訳システムの中でどの様なタンパク質が結果的に翻訳されるかを解析しタンパク質生産の制御に関して評価を行なう。また光照射時間とタンパク質の生産量の相関解析を行なうこととした。

4. 研究成果

(1) 生物由来の遺伝子を得るための実験系の構築

細胞培養実験に必要な設備を設置し、ヒト由来ガン細胞および大腸菌の培養を行なった。ガン細胞、大腸菌とも正常に培養できることを確認し、また遺伝子 DNA および mRNA の抽出が可能であることを確認した。生体由来の遺伝子を自前で得る実験系を確立した。

(2)-1 細胞から抽出した遺伝子とのクロスリンク反応

ヒト膵臓癌由来株細胞である CAPAN-2 細胞、BXP-3 細胞から mRNA を抽出し、光クロスリンク反応を試みた。反応後のサンプルを RT-PCR により増幅し、アガロースゲル電気泳動により解析することで、光クロスリンク反応の有無を確認した。また、この光クロスリンクによる遺伝子発現制御効果についても検討した。構築したガン細胞培養系により培養したヒト膵臓がん細胞 (CAPAN-2、BXP-3) から mRNA を抽出することに成功した。また、これに対して相補的な ^{CNV}K 含有オリゴ DNA を添加し、光照射 (366 nm) を行なうことで、mRNA 由来の RT-PCR 増幅産物が減少したことから、生体由来 mRNA へのクロスリンク反応が可能であることが確認された。

(2)-2 無細胞発現系を用いた光によるタンパク質発現調節

蛍光タンパク質である GFP をバイオコンピューティングのアウトプットとすることを想定し、GFP の発現を可逆的光クロスリンク反応で制御することを目的に実験を行なった。^{CNV}K 含有プライマー-DNA を用いた PCR により ^{CNV}K 修飾 T7 プロモーターを含む GFP 発現ベクターを調製した。GFP を発現するには RNA ポリメラーゼが T7 プロモーター領域を 1 本鎖にほどく必要があるが、これを可逆的に光クロスリンクすることで、光照射による GFP 発現の可逆的 OFF/ON 制御が期待される。このベクターを無細胞転写翻訳系に添加し、光による GFP 発現の可逆的 OFF/ON 制御を検証した。T7 プロモーター部位を持つ直鎖状発現テンプレートの作成、直鎖状発現テンプレートのクロスリンク反応に成功した。生物由来の遺伝子 DNA に対して、光クロスリンク反応が適用可能であることが確認できた。

(3) 光クロスリンク反応による高選択的遺伝子増幅

自律的な光駆動型 DNA 分子計算を開発において本年度 (最終年度) は駆動型 DNA 分子計算システムの評価系として、標的遺伝子としてコドン 12 の点変異 (GGT → GTT) によりガン原性を獲得する Kras 遺伝子の転写反応をリアルタイム PCR により評価した。遺伝子中の 1 塩基のみの違いを検出することは、精度の高い遺伝子診断法を確立する上で重要である。さらに、検体中にわずかに含まれる (0.1%以下) 1 塩基変異遺伝子

を検出できれば、疾患の高精度かつ高感度な診断が可能になると考えられる。そこでまず光クロスリンク反応を用いた 1 塩基変異検出の選択性を評価した。正常遺伝子にのみ光クロスリンクし、変異型遺伝子には光クロスリンクしないように設計した光クロスリンクオリゴ DNA を合成し、遺伝子に光クロスリンクを行い、PCR による増幅をおこなうことで、変異型遺伝子のみを増幅・検出できると考えた。即ち本システムは論理回路としては NOT 回路を用いており、入力した光駆動型 DNA が架橋した遺伝子は転写されない系であるがん原遺伝子である変異型 K-ras 遺伝子を持つ膵臓ガン由来細胞 (Capan-2) および正常型 K-ras 遺伝子を持つ膵臓ガン由来細胞 (BxPC-3) から遺伝子 DNA を抽出した。変異部位近傍に光クロスリンク可能な ^{CNV}K を含む合成オリゴ DNA を添加し、K-ras 遺伝子との光クロスリンクを行った後、PCR による増幅を行った。アガロースゲル電気泳動により PCR 増副産物の確認を行った結果、光クロスリンクを行うことで正常型 K-ras 遺伝子を持つ BxPC-3 の場合のみ、遺伝子増幅が大きく抑制された。一方、1 変異型 K-ras 遺伝子をもつ Capan-2 の場合には、光照射による遺伝子増幅の抑制は見られず、変異型遺伝子のみを選択的に増幅できることが示された。以上から、自律的な光駆動型 DNA 分子計算による高選択的かつ高感度な遺伝子増幅・検出が可能であることが示された。

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 8 件)

① Miho Tagawa, Koh-ichiroh Shohda, Kenzo Fujimoto and Akira Suyama, *Stabilization of DNA nanostructures by photo-cross-linking*, Soft Matter 7 (2011) 10931-10934 査読有

② Minhaz Uddin Ahmed, Yoshinaga Yoshimura, M. Mosharraf Hossain, Eiichi Tamiya and Kenzo Fujimoto, *Construction of branched DNA for SNP determination on glass-chip using photochemical ligation*, BioChip J. 5 (2011) 206 - 221 査読有

③ Takashi Sakamoto, Yu-ki Shimizu, Jun Sasaki, Hikaru Hayakawa and Kenzo Fujimoto, *Signal turn-on probe for nucleic acid detection based on 19F nuclear magnetic resonance*, Bioorg. Med. Chem. Lett 21 (2011) 303 - 206 査読有

④ Kenzo Fujimoto, Kaoru Konishi-Hiratsuka, Takashi Sakamoto and Yoshinaga Yoshimura, *Site-Specific Photochemical RNA Editing*, Chemical Communications, 46 (2010) 7545 - 7548 査読有

⑤ Kenzo Fujimoto, Takashi Sakamoto, Kaoru Konishi-Hiratsuka and Yoshinaga Yoshimura, *The Site-Specific Cytosine to the Uracil Transition Using Reversible DNA Photocrosslinking*, ChemBioChem 11 (2010) 1661 - 1664 査読有

[学会発表] (計 22 件)

① Fujimoto Kenzo, D Development of Photochemical DNA and RNA Manipulation, 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, December 13, 2011, Pacifico YOKOHAMA (神奈川県)

② 藤本健造, 酵素を使わずに化学の力でDNAを操る, 日本化学会東北支部主催会員増強のための講演会, 2011年11月25日, 東北大学(宮城県)

③ Fujimoto Kenzo, Development of Phototriggered DNA and RNA Manipulation, 5th Pacific Symposium on Radical Chemistry, September 27, 2011, Shirahama, (和歌山県)

④ 藤本健造, 光化学的な新規遺伝子操作法の開発とその応用, 日本化学会中国四国支部 愛媛地区化学講演会, 2011年9月14日, 愛媛大学(愛媛県)

⑤ Nakamura Shigetaka, Ogasakawa Shinzi and Fujimoto Kenzo, Photochemical DNA manipulation toward for DNA computing, 17th International Conference on. DNA Computing and Molecular Programming, September 22 2011, LA, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 健造 (FUJITMOTO KENZO)

北陸先端科学技術大学院大学・マテリアルサイエンス研究科・教授

研究者番号: 90293894