

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650045

研究課題名(和文) やわらかいナノデバイスの作製：DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムを用いて

研究課題名(英文) Construction of soft nano-device using DNA-protein hybrid nano-system

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：手のひらにのるような、検査・治療機器を作成するためには、非常に小型の検出・診断・合成装置が必要である。蛋白質はナノメートルサイズの高効率な分子機械であるので、これらをナノシステム化、アセンブル化できれば、高性能な機器を構築できると考えられる。本研究では、第一歩として、転写システムを集積化した遺伝子ナノチップを作成し、特徴的な性質を持つ事を明らかにした。今後、制御系を組込むことで、自律的に機能するナノデバイスの構築が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Toward the handheld device, downsizing of the subcomponent system is the key. For such purpose, integration of proteins, which is an efficient nano-machine, is a prominent approach. For the first step, we integrated RNA polymerase (RNAP) and gene on the DNA-origami base nano-chip, allowing us to rationally design the orthogonal gene nano-chip.

研究分野：生物物理

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

小さな検査・治療装置を作る為には、反応系を小さくする必要がある。従来、マイクロ管路や微小な反応カプセルを作る事でその実現がマイクロメートルスケールで図られてきた。しかし、反応場を更に小さくし、サブマイクロメートルスケールにしていくと、反応場に存在する分子の絶対数が減少する事に起因する問題が顕著になってくる(システム構成要素の欠如や、協調的な反応における反応効率低下)。しかし、従来の濃度による制御では、副反応の進行や反応間のバランスが崩れるといった問題が生じる。そのため、これを解決する新しいアプローチが求められていた。

2. 研究の目的

我々は、この問題に対して、因子を近接して精密配置することで問題を解決できるのではないかと考え、転写系をモデルにこのアプローチの有効性を探った。近接化する事で、実効濃度を高くしつつ、全体の濃度を下げるという事が可能となり、また、分子を精密配置する事で、反応間のバランスも制御できるのではないかと考えられた。具体的には、近年開発された DNA ナノ構造体を足場として、RNA ポリメラーゼ(RNAP)や遺伝子といった転写に関わる因子群をナノメートル精度で配置し、アプローチの有効性を検証した。

3. 研究の方法

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。

実際、我々の実験から、活性測定が容易なキネシンモーター蛋白質を DNA origami 上の特定の場所に結合させると、設計通りの構造が得られる事がわかっている。

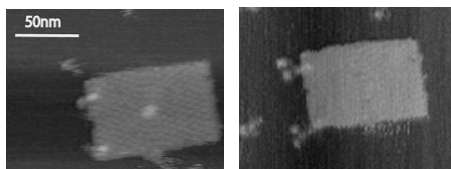


図 1. AFM 像(長方形 tile に蛋白質が結合
左図:単量体 3ヶ所、右図:2量体 2ヶ所

本研究では、この方法を発展させ、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 ナノ構造体に固定し、また、基質遺伝子は avidin-biotin 反応を介して固定した(図 2)。

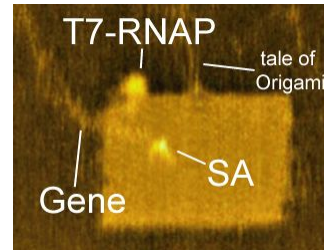


図 2. 転写ナノデバイス(AFM 像)

4. 研究成果

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 μ M 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 3 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。

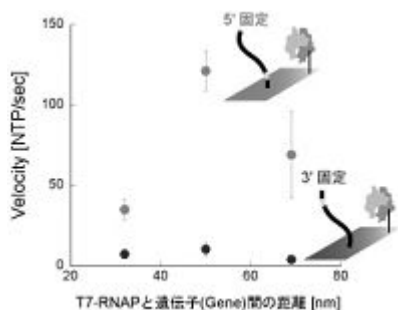


図3. 因子間距離制御による転写活性設計

本研究で作成したナノシステムは、分子の精密配置によって、高効率で反応が進行し、またかつ、開放系であるが、閉鎖系のように振舞うユニークな反応系へと発展する可能性がある。この事によって、反応場をナノメートルサイズへと小さくしても生物反応を効率的に進行させる事が可能となり、手のひらにのるような様々な装置への展開が期待される。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 12 件)

<2013 年度> 5 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) 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)

(4) 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

(5) 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> 7 件 うち招待講演 1 件

(1) 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

(2) 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

(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 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

(4) 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

(5) 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

(6) 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

(7) 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

〔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〕

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