

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分
平成27年3月11日現在

分子科学的アプローチによる遺伝子発現の制御と
機構の解明

Control and elucidation of gene expression at a molecular level

課題番号：24225005

杉山 弘 (SUGIYAMA HIROSHI)

京都大学・大学院理学研究科・教授



研究の概要

エピジェネティックな遺伝子発現を活性化する機能性 Py-Im ポリアミドのコンセプトと、1分子の動態を直接可視化する AFM を用いる DNA フレーム技術を組み合わせることによって、DNA 構造と機能に基づく化学的なアプローチで遺伝子発現のメカニズムを解明する。

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：遺伝子発現制御、DNA ナノ構造体、SAHA Py-Im ポリアミド

1. 研究開始当初の背景

生命科学において遺伝子発現の制御は極めて重要な研究課題である。とりわけ、細胞の初期化や分化に関わるエピジェネティックな遺伝子発現の制御が注目されている。遺伝子発現の制御機構において、ヒストンの化学修飾の制御やシトシンの脱メチル化などの遺伝子発現の制御機構は、生命科学の根本でありその解明が必要不可欠である。しかしながら、これらの遺伝子発現に関与する分子が動的にどのような挙動を示すのかについての情報は得られていない。

2. 研究の目的

本研究提案では、遺伝子発現の制御や反応機構をエピジェネティックな観点から捉えなおす。つまり、従来の単なる DNA 配列のみを考えた遺伝子発現ではなく、DNA の構造変化を誘起するヌクレオソーム構造や染色体末端のテロメア構造など、より構造依存的な遺伝子発現を考慮して、それに適した DNA 結合分子を分子設計し、細胞内で遺伝子発現の制御を行い、その遺伝子発現の機構を分子レベルで解析する。

3. 研究の方法

(1) DNA の配列特異的な結合分子にエピジェネティックな遺伝子発現の活性化機能を付与することによって、有用な特定遺伝子発現の制御法を開発する。

(2) 遺伝子制御に関連する酵素や化学反応を直接可視化し解析する AFM を用いる DNA フレーム技術を開発する。

4. これまでの成果

**細胞の初期化に関連する遺伝子を活性化
する SAHA Py-Im ポリアミドの開発**

Py-Im ポリアミドの遺伝子発現制御分子としての機能の有用性を実証するために、細胞の多能性に関連する遺伝子を活性化する機能分子の開発を行ない成功した。

我々の研究している Py-Im ポリアミドは、優れた配列特異的 DNA 結合性と核膜内への集積性を有している。従って、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤である SAHA を Py-Im ポリアミドと連結させたコンジュゲートの合成によって、特定の DNA 遺伝子配列近傍に SAHA を運搬することを可能にした。

本研究の遂行により、32 種類の HDAC 阻害能を有する SAHA Py-Im ポリアミドのライブラリーを構築し、DNA 配列特異性を基盤とした特定遺伝子の活性化を試みた。実際に、マウス胎生線維芽細胞 (MEF) を用いる実験系において、特定の SAHA Py-Im ポリアミドが Sox2 や Nanog などの多能性に関連する遺伝子群の発現を上昇させていることを確認した (Sci. Rep. 2012, Angew. Chem. Int. Ed. 2013 (hot paper))。最近では、ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) に対しても同様の活性化機能を有する SAHA Py-Im ポリアミドも見出した (Sci. Rep., 2014)。興味深いことに、DNA マイクロアレイの結果から、これらの機能分子の配列特異性毎に異なる遺伝子の発現が活性化していることが示されている。

高速原子間力顕微鏡による1分子の動的 可視化技術の開発

我々は、DNA ナノ構造体上に機能性分子をプログラムに基づいて配置し、そのナノ構造体上でのタンパク質などの1分子の動的な解析、距離と空間を制御した状態での相互作用の解析研究を進めた。特に、DNA のナノ構造変化を誘起するヌクレオソーム構造や転写開始領域で存在する G-四重鎖構造に対して、高速原子間力顕微鏡 (AFM) を活用することで、高次構造の変化やタンパク質との相互作用を直接可視化する技術を確認することに成功し、本研究の円滑な推進に貢献している。

実際に、AFM により、鋳型 DNA を 2 か所で結合した DNA ナノ構造体上での基本転写因子との複合体構造を構築し、T7 RNA ポリメラーゼによる転写を動的に観察することに成功した (*Angew. Chem. Int. Ed.*, 2012)。また、CG 繰り返し配列の 2 本鎖 DNA は塩濃度によって右巻きらせんの B 型 DNA から左巻きの Z 型の DNA 構造をとることが知られている。この B-Z 転移を可視化するため、(5-methyl-CG)₆ 繰り返し配列をナノフレーム内に導入することで、B-Z 構造転移のナノ構造内での可視化に成功した (*J. Am. Chem. Soc.*, 2013)。また、特定の波長の光により構造を異性化させる置換基を導入した DNA ナノ構造体を構築し、光による構造と機能を制御する技術の開発も進めた (*J. Am. Chem. Soc.*, 2012, 2014)。最近では、DNA 組み換え酵素 Cre の 1 分子の挙動と反応を DNA ナノフレームを用いて解析に成功した (*J. Am. Chem. Soc.*, 2014)。

DNA ナノ構造体と AFM による 1 分子の動的な計測方法の確立によって、世界に先駆ける研究成果を論文化することに成功しており、国内外の研究者との共同研究を介して高い研究成果を出している。

5. 今後の計画

HDAC 阻害能を持つ SAHA、および、HAT 活性化能を持つ CTB、それぞれの機能性 Py-Im ポリアミドコンジュゲートについてハイスループットスクリーニングで特異的な遺伝子活性化能の応用を目指し、DNA の配列情報に基づいた人工転写因子として汎用化を進める。

また、構築した 1 分子観測系を用いて、(1) ヒストンの修飾によるクロマチン構造の制御機構、(2) 転写装置とヌクレオソームとの相互作用、(3) プロモーター部位の脱メチル化と遺伝子活性化の機構について機能分子との相互作用を含めた解析と動的な挙動について解析を進める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Distinct DNA-based Epigenetic Switches Trigger Transcriptional Activation of Silent Genes in Human Dermal Fibroblasts. Pandian, G. N.; Taniguchi, J.; Junetha, S.; Sato, S.; Han, L.; Saha, A.; Anandhkumar, C.; Bando, T.; Nagase, H.; Thangavel, V.; Taylor, R. D.; Sugiyama, H. *Sci. Rep.* 2014, 4, 3843.
2. A Synthetic Small Molecule Enforces Targeted Transcriptional Activation of Germ Cell Genes in a Human Somatic Cell. Han, L.; Pandian, G. N.; Junetha, S.; Sato, S.; Anandhkumar, C.; Taniguchi, J.; Saha, A.; Bando, T.; Nagase, H.; Sugiyama, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 13410-13413. (Hot Paper)
3. Single-Molecule Imaging of Dynamic Motions of Biomolecules in DNA Origami Nanostructures Using High-Speed Atomic Force Microscopy. Endo, M.; Sugiyama, H. *Acc. Chem. Res.* 2014, 47, 1645-1653.
4. DNA Origami Based Visualization System for Studying Site-Specific Recombination Events. Suzuki, Y.; Endo, M.; Katsuda, Y.; Ou, K.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 211-218.
5. Direct and Real-Time Observation of Rotary Movement of a DNA Nanomechanical Device. Rajendran, A.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 1117-1123.
6. Photo-Controllable DNA Origami Nanostructures Assembling into Predesigned Multiorientational Patterns. Yang, Y.; Endo, M.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 20645-20653.
7. Single-Molecule Visualization of the Hybridization and Dissociation of Photoresponsive Oligonucleotides and Their Reversible Switching Behavior in a DNA Nanostructure. Endo, M.; Yang, Y.; Suzuki, Y.; Hidaka, K.; Sugiyama, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 10518-10522.
8. Direct Visualization of the Movement of a Single T7 RNA Polymerase and Transcription on a DNA Nanostructure. Endo, M.; Tatsumi, K.; Terushima, K.; Katsuda, Y.; Hidaka, K.; Harada, Y.; Sugiyama, H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012, 51, 8778-8782.
9. Dynamic Assembly/Disassembly Processes of Photoresponsive DNA Origami Nanostructures Directly Visualized on a Lipid Membrane Surface. Suzuki, Y.; Endo, M.; Yang, Y.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 1714-1717.

ホームページ等

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/>