

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成31年度（2019年度）研究進捗評価用〕

平成28年度採択分
平成31年3月11日現在

人工遺伝子スイッチを用いた遺伝子発現の制御と機構の解明

Regulation and mechanistic investigation of gene expression by artificial genetic switches



課題番号：16H06356

杉山 弘 (Sugiyama, Hiroshi)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究の概要

遺伝子発現を特異的に制御する技術開発や、発現機構の解明は重要な研究課題である。研究代表者は、Py-Im ポリアミドという機能分子の人工遺伝子スイッチとしての応用を目指している。加えて、エピジェネティックな遺伝子発現制御の機構について分子間力顕微鏡(AFM)を用いて分子レベルの動的な状態を解析評価する技術の確立を目指している。

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、DNA 配列特異的結合性

1. 研究開始当初の背景

生命科学において遺伝子発現の理解と制御は極めて重要な研究課題である。特に、ヒストンの化学修飾や DNA のシトシンのメチル化は、遺伝子発現のエピジェネティック制御の基礎化学反応であるが、これらの修飾により DNA 自身やヌクレオソームの高次構造が動的にどのような挙動を示しているのかは不明な点が多い。

これまでに、研究代表者は、精力的に遺伝子発現の制御機構の解明を進めており、塩基配列特異性をもつ機能性 Py-Im ポリアミドを用いて、特定遺伝子の発現をオン・オフに制御するシステムを成立させた(オンスイッチについて: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 8700., *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 3843., オフスイッチについて: *Nature Commun.* **2015**, *6*, 6706.)。

また近年、塩基配列だけではなく DNA の構造変化によっても遺伝子発現が制御されていることが明らかになってきたが、我々は独自の一分子観察系である DNA フレームと呼ぶナノ構造体を開発し、グアニン四重鎖構造など DNA の高次構造変化や酵素の挙動や反応を動的に解析する方法の開発に成功している(総説: *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1645., *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1493.)。

2. 研究の目的

本研究は、エピジェネティックな遺伝子発現制御のメカニズムを、申請者らの研究グループが培ってきた独自の分子科学的アプローチ

により総合的に解明し、それを応用しようというものである。

第一に、DNA の配列特異的な結合分子である Py-Im ポリアミド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し、体細胞の初期化や、iPS 細胞を目的とした細胞へ分化させることを目指す。第二に、遺伝子発現制御に連動する DNA 自身やヌクレオソームの高次構造の変化について、これらを一分子レベルで可視化し動的な状態を解析する技術を確立する。

これら2つのアプローチで研究を車の両輪のように進めることにより、エピジェネティックな遺伝子発現制御の機構を分子レベルで解明し、人工遺伝子スイッチの実現を目指すものである。

3. 研究の方法

本研究提案は、(1) Py-Im ポリアミドにエピジェネティックな発現制御機能を付与し、体細胞の初期化や iPS 細胞の分化を誘導可能にする機能性 Py-Im ポリアミドの開発、(2) グアニン四重鎖構造に特異的に結合する機能分子の開発、(3) 遺伝子発現機構の解明に向けて、DNA フレームというナノ構造体と高速原子間力顕微鏡(AFM)を活用する DNA 三重鎖やグアニン四重鎖構造、ヌクレオソーム等の動的な一分子解析、以上の3つの研究目標を設定した。

4. これまでの成果

(1)に関する研究として、プロモドメイン阻害剤(Bi)が PIP とのコンジュゲート分子として、非常に有望であることを見だした。合成した Bi-PIP コンジュゲートを用いて、PIP の配列特異性に誘導された特異的な遺伝子発現の活性化をマイクロアレイと RT-PCR の解析によって確認した。それらの研究成果をまとめて、論文 1 として報告した。

DNA の 6 塩基配列を認識能する分子設計を基盤として、新しく 32 種の Bi-PIP コンジュゲート (A-φ) のライブラリーを合成し、細胞系評価への準備を整えた。これらの Bi-PIP コンジュゲートにおいて、PIP と Bi を繋ぐリンカー部分には PEG を採用し、コンジュゲートの水溶性を高めている。

また、機能性ペプチドと PIP との新しいコンジュゲートの開発にも成功した。実際に、ミトコンドリア膜に特異的に結合するペプチドとのコンジュゲートによって、ミトコンドリア DNA 内の遺伝子発現の特異的な抑制を確認した。それらの研究成果は、論文 2 として報告した。

(2)に関する研究として、G4 構造とその近傍配列を同時に認識して特異的に結合するプローブ分子の開発に成功した。その結合特異性は NMR 測定技術を活用して解析し、Phan, A.T.教授との海外共同研究の成果として論文 3 として報告した。

(3)に関する研究として、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測定技術の改良を進めた。

その結果、京都大学理学部の鹿内教授、西村助教との Holliday junction に関する共同研究が円滑に進んだ。特に、Holliday junction 上の MBP-AtMOC1 系の結合から解離に至る機構の AFM による直接観察と挙動解析に応用することに成功し、研究成果をまとめて論文 4 に報告した。

また、DNA 鎖を折り曲げて数ナノメートルの角筒状の構造体「ナノケージ」を用いる DNA 構造解析法の開発を進めた。共同研究者であるケント大学の Hanbin Mao 教授の光ピンセット技術を用いて、両方向から引っ張ることで、ナノケージ内に導入したグアニン四重鎖構造が解け、再び折り畳まれる過程を 1 分子レベルで測定することに成功した。また、より狭小な空間では G4 構造はより安定化することを見出した。その成果を論文 5 として報告した。

これは、空間の広さを制限することによって生体分子がどれくらい安定化するかを実測した世界で初めての例である。

5. 今後の計画

Bi-PIP コンジュゲートを用いて、初期化・分化誘導遺伝子群を標的とした特異的な遺伝子発現の活性化機能の解析評価を進めており、今後、次世代シーケンサーやマイクロアレイ、RT-PCR による詳細な機能の解析評価を進めた上で、研究成果を報告する予定である。また、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基盤は整っており、本研究期間内で機構の解析を進めていく。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Biomimetic Artificial Epigenetic Code for Targeted Acetylation of Histones. Taniguchi, J.; Feng, Y.; Pandian, G. N.; Hashiya, F.; Hidaka, T.; Hashiya, K.; Park, S.; Bando, T.; Ito, S.; *Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 7108-7115.
2. Creation of a Synthetic Ligand for Mitochondrial DNA Sequence Recognition and Promoter-specific Transcription Suppression. Hidaka, T.; Pandian, G. N.; Taniguchi, J.; Nobeyama, T.; Hashiya, K.; Bando, T.; *Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8444-8447.
3. Simultaneous Binding of Hybrid Molecules Constructed with Dual DNA-Binding Components to a G-Quadruplex and Its Proximal Duplex. Asamitsu, S.; Obata, S.; Phan, A.T.; Hashiya, K.; Bando, T.; *Sugiyama, H. *Chem. Eur. J.* **2018**, *24*, 4428-4435.
4. Holliday Junction Resolvases Mediate Chloroplast Nucleoid Segregation. Kobayashi, Y.; Misumi, O.; Odahara, M.; Ishibashi, K.; Hirono, M.; Hidaka, K.; Endo, M.; Sugiyama, H.; Iwasaki, H.; Kuroiwa, T.; Shikanai, T.; *Nishimura, Y. *Science* **2017**, *356*, 631-634.
5. Confined Space Facilitates G-quadruplex Formation. Shrestha, P.; Jonehe, S.; Emura, T.; Hidaka, K.; Endo, M.; *Sugiyama, H.; Mao, H. *Nature Nanotechnol.* **2017**, *12*, 582-588.

第 70 回日本化学会賞 (平成 29 年度)

「DNA の構造と機能制御に関する研究」

7. ホームページ等

京都大学大学院理学研究科 化学専攻
生物化学研究室 HP

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

杉山 弘 (researchmap)

<https://researchmap.jp/7000009721>