

## 研究課題別評価

1. 研究課題名: 生体反応の光制御を目指した人工核酸デバイスの創製

2. 研究者氏名: 浅沼浩之

研究員: 趙 静 (研究期間 H.15.4 ~ H.17.10)

研究補助者: 樫田 啓 (研究期間 H.17.10 ~ H.18.3)

3. 研究のねらい:

一つのタンパク質をコードしている遺伝子は数万から数百万という塩基数から構成されているが、その発現を実際に制御しているのは、RNA ポリメラーゼのプロモーターの様に高々数十から数百塩基よりなるナノサイズのデバイスの機能を持った核酸である。もしこのような天然のバイオデバイスに化学的な“改造”を施せば、人類にとってより合目的に遺伝子発現等の制御可能なシステムを作り上げることが期待できる。そこで本提案研究では、核酸に光応答性分子を組み込んだ光スイッチングデバイス(=人工核酸デバイス)を構築し、遺伝子発現をはじめとする核酸の関与する生体反応の光制御を目指す。具体的には、アゾベンゼンを導入した光応答性 DNA を合成しこれを用いて 1) DNA 二重鎖の形成と解離の光制御、2) 転写反応の光スイッチング、を実現する。

4. 研究成果:

(1) アゾベンゼン導入 DNA による二重鎖形成と解離の光制御

DNA の大きな特徴の一つは相補鎖とのハイブリダイゼーションであり、酵素反応を含め多くの反応・機能が二重鎖形成と深く関わっている。従って、ハイブリダイゼーションが特定波長の光照射のみで制御できれば、DNA が関与する多くの反応を光制御することが可能になる。そこで特定波長の光照射で可逆的に構造異性化するアゾベンゼンを DNA 中に化学的に組み込んで、DNA 二重鎖の形成と解離の光制御を目指した (Scheme 1 参照)。その結果リンカーとして D-threoninol を用いてアゾベンゼンを導入したところ、*trans*-体では二重鎖を安定化し *cis*-体では不安定化することを見出し、UV 光および可視光照射によって二重鎖形成と解離が光制御できることを明らかにした。更に NMR による構造解析から、*trans*-体 *cis*-体いずれの場合でも DNA 二重鎖内にインターカレートしていることも明らかにした。

光制御効率はアゾベンゼンの導入数を増やすこ

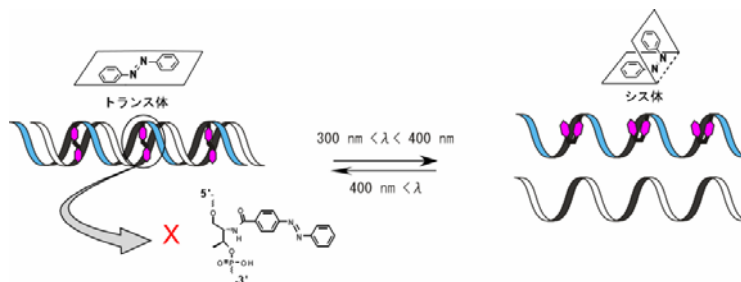


図1. アゾベンゼン導入 DNA による二重鎖形成と解離の光制御

とで飛躍的に向上し、20mer の DNA にアゾベンゼンを 10 残基導入したところ、*trans-cis* 異性化

によって最大 85%の光制御を実現した。非常に興味深いことに、これだけ多数のアゾベンゼンを DNA に組み込んでも *trans* 体の場合には、アゾベンゼンを含まない天然の DNA 二重鎖よりも不安定化せず、むしろ若干安定化することも見出した。またこの場合、配列特異性を失うことも無かった。

#### (2) アゾベンゼン導入 DNA を用いた RNase H 反応の光制御

ハイブリダイゼーションを光照射のみで制御できれば、アンチセンス法を適用することで遺伝子発現の光制御が可能となる。一般にアンチセンス効果は、ターゲットとなる m-RNA とアンチセンス DNA がハイブリダイズした RNA/DNA 二重鎖を、RNase H が切断することに基づくと考えられている。従ってアンチセンス法を適用した遺伝子発現の光制御では、RNaseHによるRNA切断を光制御することが重要である。そこで(1)の成果を活用して、光応答性 DNA をセンス鎖に用いてアンチセンス鎖の放出を光照射でコントロールすることで RNase H による RNA 切断の光制御を目指した。その結果、設計どおり *trans*-体(可視光照射)では RNase H 活性を抑制し、*cis*-体(UV 光照射)で活性を向上させることに成功した。

#### (3) 光応答性 DNA エンザイムによる RNA 切断の光制御

天然の RNase H と同様の機能を持った人工酵素が、RNA 切断機能を持つ DNA エンザイムである。DNA エンザイムに光応答性が付与できれば、(2)と同様にアンチセンス法を利用した遺伝子発現の光制御が可能となる。そこで DNA エンザイムにアゾベンゼンを導入した光応答性 DNA エンザイムの開発を目指した。アゾベンゼンの DNA エンザイム内での導入位置を検討したところ、Loop と Binding arm の境界にアゾベンゼンを導入することで高効率な光制御を実現した。更に興味深いことに、この DNA エンザイムは *trans* 体で Native より触媒活性が向上することも明らかとなった。

#### (4) アゾベンゼン導入プロモーターによる転写・翻訳反応の光制御

上記のアゾベンゼン導入DNAは、融解温度 ( $T_m$ ) 付近では光異性化で二重鎖の形成と解離を起こすが、 $T_m$ より十分低い温度領域では異性化によるアゾベンゼン近傍の局所的構造変化を起こす。この現象を利用すれば、DNA結合性タンパクや酵素のDNAへの結合を直接制御することが期待できる。T7-RNAポリメラーゼはプロモーターと呼ばれる 17 塩基より構成される特別な配列に結合することで転写反応を開始することが知られている。もしプロモーターへのポリメラーゼの結合が光照射により制御できれば、転写反応の光制御が実現する。そこでプロモーターの特定の位置にアゾベンゼンを導入したところ、T7-RNAポリメラーゼによる転写反応がUV光あるいは可視光照射のみで非常に効率よく光制御できることを見出した。更にバイオセンサーによる分析と動力学的パラメータから、図2に示したようなアゾベンゼンの*trans-cis*異性化に伴うRNAポリメラーゼのプロモーターへの結合の差に基づいていることが明らかとなった。

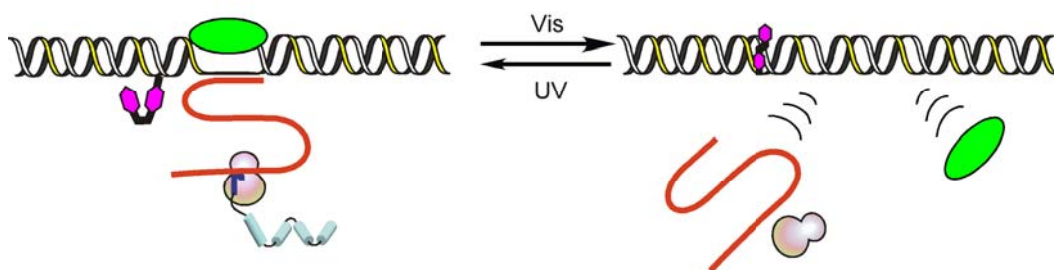


図2 光応答性プロモーターを用いた T7-RNA ポリメラーゼによる転写反応の光制御

#### (5) *in vitro* での GFP 発現の光制御

上記のように T7-プロモーター中にアゾベンゼンを導入することで転写反応の光制御が可能になった。そこで、Green Fluorescent Protein(GFP)をコードしている遺伝子を実際に光応答性プロモーターの下流に導入し、*in vitro* での GFP 生産 (=翻訳) の光制御を検討した。

アゾベンゼンを導入した 1000 mer 程度の DNA の化学合成は実質不可能であり、またアゾベンゼン導入 DNA をプライマーに用いて PCR で増幅するとアゾベンゼンの手前で伸長反応が停止する恐れがある。そこで非天然分子を導入した DNA でもプライマーとして使用することが可能な非対称 PCR 法を用いて non-template 鎖と template 鎖を別々に作り分け、両者をハイブリダイズすることで光応答性プロモーターの下流に GFP をコードしている遺伝子を持つ cDNA を合成した。次に PURESYSYSTEM で GFP を発現させ、UV 光照射あるいは可視光照射による発現量の差を GFP の発する 505nm の蛍光 (470 nm 励起) から定量化した。GFP の発現量はアゾベンゼンを導入していない native の cDNA より減少するものの、UV 光照射により可視光照射と比較して発現量の明確な増大が認められ、光異性化に伴う m-RNA の生成量の変化が GFP の発現量に直接反映されていることが示唆された。以上のように、*in vitro* で遺伝子発現の光制御を達成することが出来た。

#### 5. 自己評価

ほぼ当初の計画通り、光応答性 DNA によるハイブリダイゼーションの光制御と、それを応用した酵素反応の光制御を達成した。更に、このプロジェクトの最終目標として掲げた *in vitro* での遺伝子発現の光制御 (=転写・翻訳の光制御) を幸いにも実現することができた。また本プロジェクトを通じて化学修飾 DNA に関する新たな興味深い性質を多数見出し、別の方向に発展させる見通しも得た。今後は本プロジェクトの基礎成果を活かし、バイオテクノロジーのための新たなツールとして *in vivo* での応用を目指した研究を推進したい。

#### 6. 研究総括の見解

アゾベンゼンを DNA に結合させて核酸構造の光制御を行うという意欲的な研究であり、二重鎖形成、T7 RNA ポリメラーゼによる転写・翻訳反応の *in vitro* での光制御などの所期の目標を達成することが高く評価できる。多数のアゾベンゼン分子を DNA に組み込んでも配列特異性や DNA

としての超分子性を失わないという発見も重要である。なお、in vivo における制御への応用には一層の技術開発が必要であるものの、さらなる展開が期待される。

## 7. 主な論文等

### 原著論文および総説・出版物

- (1) Liu, M.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Azobenzene-tethered T7 promoter for Efficient Photoregulation of Transcription", *J. Am. Chem. Soc. in press*.
- (2) Kashida, H.; Tanaka, M.; Baba, S.; Sakamoto, T.; Kawai, G.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Covalent Incorporation of Methyl Red Dyes into Double-Stranded DNA for Their Ordered Clustering", *Chem. Eur. J.*, **2006**, *12*, 777-784.
- (3) Matsunaga, D.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Photo-regulation of RNA Digestion by RNase H with Azobenzene-Tethered DNA", *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, *126*(37), 11452-11453.
- (4) Kashida, H.; Asanuma, H.; Komiyama, M. "Alternating hetero H-aggregation of different dyes by interstrand stacking from two DNA-dye conjugates", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2004**, *43*(47), 6522-6525.
- (5) Liang, X.; Asanuma, H.; Kashida, H.; Takasu, A.; Sakamoto, T.; Kawai, G.; Komiyama, M. "NMR study on the Photo-responsive DNA Tethering an Azobenzene. Assignment of the Absolute Configuration of Two Diastereomers and Structure Determination of their Duplexes in the *trans*-Form.", *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, *125*, 16408-16415.

他、25 編

### 特許

「光応答性 DNA エンザイム」 特願 2004-55086 浅沼浩之、倉持壮、松永大次郎、小宮山真

### 招待講演

- (1) 「色素と DNA とのコンジュゲーションによる DNA の光機能化」、表面技術学会第 113 回講演大会、平成 18 年 3 月 15 日
- (2) 「生体機能の光制御を目指したアゾベンゼン導入 DNA の設計」、MRS シンポジウム、平成 17 年 12 月 10 日
- (3) 「機能分子との交互コンジュゲーションが広げる DNA の可能性」、SORST ジョイントシンポジウム(4)、平成 17 年 11 月 28 日
- (4) "Photo-regulation of DNA functions by azobenzene-tethered DNA", Annual Spring Meeting of the Polymer Society of Korea, 2004/4/9
- (5) "核酸機能の光制御"、第 51 回応用物理学関連連合講演会、平成 17 年 3 月 30 日

他、2 件