

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB		設計された DNA ナノ空間中での反応制御と 1 分子の動的な観察			
研究テーマ (欧文) AZ		Reaction control and single molecular observation in a designed DNA nanospace			
研究氏 代表 者	カタカナ CC	姓) エンドウ	名) マサユキ	研究期間 B	2011 ~ 2012 年
	漢字 CB	遠藤	政幸	報告年度 YR	2011 年
	ローマ字 CZ	ENDO	MASAYUKI	研究機関名	京都大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		京都大学物質－細胞統合システム拠点・准教授			
概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)					
<p>1 分子レベルでの分子の精密な配列化と機能化及びイメージングはナノテクノロジーの中心課題であり、技術的な重要性は近年増大している。本研究では、DNA オリガミ法を用いて、塩基配列のプログラムに従って小分子やタンパクを 2 次元空間に自在に配置する系の構築、転写の発現を制御する系の構築、及び、設計したナノ構造上での転写の 1 分子の挙動を高速原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて直接観察する系の構築を検討した。</p> <p>第一に、DNA ナノ構造上に対する機能化のため、配列特異的なピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドの配列特異性の 1 分子解析を行った。DNA ナノ構造体上に導入した 2 本鎖 DNA へのアルキル化反応によって、その特異性を見た。合成した PI ポリアミドにはビオチンを結合してあり、反応後ストレプトアビジンでラベルが可能である。この結果、特異的な塩基配列に対してアルキル化がおり、ストレプトアビジンでラベルできることが明らかとなった。</p> <p>第二に、DNA ナノ構造の変換を利用した転写の発現系の構築を行った。6 本の 2 本鎖 DNA からなるチューブ構造体の内部に転写の鋳型となる 2 本鎖 DNA を導入し、配列特異的な 1 本鎖 DNA によって、この構造を開環できるようにした。この機構で開環できることがわかり、それに伴って転写の活性化が可能であった。</p> <p>第三に、転写を 1 分子レベルで実時間観察する系の構築を目指し、設計した DNA ナノ構造体の上で RNA ポリメラーゼ 1 分子の動的な挙動の観察を行った。T7 RNA ポリメラーゼが転写する鋳型 DNA を 2 次元 DNA ナノ構造体に固定し、RNA ポリメラーゼを加え、転写に関する一連の様子を実時間観測した。RNA ポリメラーゼをナノ構造体に加え、高速 AFM で観察すると、鋳型 DNA 上を RNA ポリメラーゼがスライディングする様子が観測された。また、DNA 構造上で RNA が合成されることが明らかとなり、ヌクレオシド 3 リン酸存在下で、RNA ポリメラーゼが転写を行う一連の様子を高速 AFM によって解析できた。以上のように、設計した DNA ナノ構造体を用いて、転写を動的に 1 分子で観察する系の構築に成功した。</p>					
キーワード FA	DNA ナノ構造	機能性分子	1 分子イメージング	高速原子間力顕微鏡	

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	Transcription regulation system mediated by mechanical operation of a DNA nanostructure.							
	著者名 ^{GA}	M. Endo, R. Miyazaki, T. Emura, K. Hidaka, H. Sugiyama	雑誌名 ^{GC}	J. Am. Chem. Soc.					
	ページ ^{GF}	2852~2855	発行年 ^{GE}	2	0	1	2	巻号 ^{GD}	134(6)
雑誌	論文標題 ^{GB}	Sequence-selective single-molecule alkylation with a pyrrole-imidazole polyamide visualized in a DNA nanoscaffold.							
	著者名 ^{GA}	T. Yoshidome, M. Endo, G. Kashiwazaki, K. Hidaka, T. Bando, H. Sugiyama	雑誌名 ^{GC}	J. Am. Chem. Soc.					
	ページ ^{GF}	4654~4660	発行年 ^{GE}	2	0	1	2	巻号 ^{GD}	134(10)
雑誌	論文標題 ^{GB}	Direct visualization of the movement of a single T7 RNA polymerase and transcription on a DNA nanostructure.							
	著者名 ^{GA}	M. Endo, K. Tatsumi, K. Terushima, Y. Katsuda, K. Hidaka, Y. Harada, H. Sugiyama	雑誌名 ^{GC}	Angew. Chem. Int. Ed.					
	ページ ^{GF}	8778~8782	発行年 ^{GE}	2	0	1	2	巻号 ^{GD}	51(45)
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

Single-molecule imaging of the biological events and their precise regulation using specific molecules have been increasing importance in the field of nanotechnology. We created a method for selective attachment of functional molecules to the DNA nanostructures, and constructed a transcription regulation system controlled by programmed DNA sequences. Also, we designed a single-molecule observation system for visualization of the transcription using high-speed atomic force microscopy.

First, we examined a strategy for visualizing sequence-selective alkylation of target double-stranded DNA (dsDNA) using a synthetic pyrrole-imidazole (PI) polyamide in a designed DNA origami scaffold. Doubly functionalized PI polyamide was designed by introduction of an alkylating agent and biotin for sequence-selective alkylation at the target sequence and subsequent streptavidin labeling, respectively. A designed DNA origami scaffold carrying five different dsDNAs in its cavities was used for the detailed analysis of the sequence-selectivity and alkylation. The PI polyamide discriminated the one mismatched nucleotide at the single-molecule level, and alkylation anchored the PI polyamide to the target dsDNA.

Second, we designed and constructed a transcription regulation system initiated by DNA nanostructure changes. Using the toehold system, specific DNA strands induced the opening of the tubular structure. A transcription product from the purified tube-attached dsDNA template was observed by addition of DNA strands that were specific for opening the tubular structure. This system can be used for the transcription switch controlled by specific DNA strands.

Third, single-molecule movement of T7 RNA polymerase (RNAP) and its transcription were directly visualized using a template dsDNA attached to the DNA origami scaffold. A 1.0 kbp template dsDNA containing T7 promoter was attached to the designed observation scaffold at two positions. RNAP sliding on the template dsDNA was imaged by high-speed AFM. In the presence of NTP, RNAP moved in one direction from the promoter region, and the RNA synthesis occurred on this observation system.