

研究成果報告書

研究テーマ (和文) AB		遺伝子発現を制御する自律分子デバイスの創出			
研究テーマ (欧文) AZ		Construction of autonomous gene expression control device			
研究氏 代表名 者	カカナ CC	姓) タダクマ	名) ヒサシ	研究期間 B	2018 ~ 2019 年
	漢字 CB	多田隈	尚史	報告年度 YR	2019 年
	ローマ字 CZ	TADAKUMA	HISASHI	研究機関名	大阪大学
研究代表者 CD 所属機関・職名		大阪大学蛋白質研究所・助教			
概要 EA (600字~800字程度にまとめてください。)					
<p>遺伝子発現を時空間的に自在に制御できる事は、医療や理学に重要である。遺伝子回路は、合理的な設計を通して、発現をプログラム可能であるので、有用な手法である。しかし、従来の反応拡散系を用いた遺伝子回路は、完全に非特異的相互作用を排除することができず、意図しない反応が起きてしまうという本質的な問題があった。</p> <p>申請者は、生物が、"反応の場"を上手く利用し、混雑した環境でも効率良く反応を進めている事に着目し、人工的な反応場(遺伝子発現制御デバイス:ナノチップ)の構築を目指してきた。ナノメートル精度で分子配置可能な、DNA ナノ構造技術を用い、T7 RNA ポリメラーゼ(RNAP)と標的遺伝子の分子配置の制御によって、遺伝子発現の制御が可能である事、人工細胞内の miRNA プロファイルを検出・演算し、出力を行う事が可能であることを、試験管内で示してきた(Nat.Nano. 2018)。本研究では、このナノチップを細胞内で機能させる事を目的とした。加えて、作られた RNA を効率良く発現する為には、ウィルスが取る戦略を理解する事が参考になるので、その分子機構の一端を hepatitis C virus (HCV) の internal ribosome entry site (IRES) 配列を題材に行った。</p> <p>細胞内では、プロテアーゼや、ヌクレアーゼ等、ナノチップに集積した RNAP や標的遺伝子を壊す因子が多数存在する。そこで、DNA ナノ構造の形状を工夫し、筒状とし、筒内部に RNAP や標的遺伝子を集積化する事で、ゼブラフィッシュの初期杯において、RNA 産生を確認した。また、その過程で、DNA ナノ構造をより自由に設計・構築する為の技術開発も行った。DNA ナノ構造は、長い 1 本鎖 DNA(ssDNA)を足場(scaffold)とし、多数の短い staple 鎖を自己集合させる事で構築されるが、従来は、scaffold ssDNA としてファージ由来の物を利用しており、構築や精製が困難であった。そこで、PCR ベースの手法を確立した。一方で、HCV IRES に関しては、従来考えられてきたモデルとは違う方式で、リボソームに結合し、自身の遺伝子を効率よく発現させる仕組みの一端が示唆された。</p> <p>本研究で、DNA ナノ構造の構築の自由度が広がり、また、細胞内で機能する事も示された。また一方、HCV IRES の仕組みから、ナノチップが作製する RNA を効率的に発現させる為のヒントが得られた。今後、これらの成果を組み合わせ、また、試験管内で機能したセンサーも組み込む事で、自由自在な遺伝子発現の制御が期待される。</p>					
キーワード FA	遺伝子発現	RNA	DNA ナノ構造		

(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}	HCV IRES Captures an Actively Translating 80S Ribosome							
	著者名 ^{GA}	Yokoyama, T., Machida, K., Iwasaki, W., Shigeta, T., Nishimoto, M., Takahashi, M., Sakamoto, A., Yonemochi, M., Harada, Y., Shigematsu, H., Shirouzu, M., *Tadokoro, I., *Imataka, H., and *Ito, T.		雑誌名 ^{GC}	Molecular Cell				
	ページ ^{GF}	1205~1214	発行年 ^{GE}	2	0	1	9	巻号 ^{GD}	74
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}			雑誌名 ^{GC}					
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}			雑誌名 ^{GC}					
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
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}

Gene expression control is quite important for medicine and science. Especially, genetic circuits are useful tools because of their program ability. However, the conventional diffusion-reaction based genetic circuits have intrinsic drawbacks, as it is difficult to avoid the cross-talk completely, limiting the versatile power of genetic circuit. In contrast, in the natural system, related factors are integrated on the scaffold, and the formed "reaction field" efficiently performs the gene expression even in the crowded environment. Inspired by these facts, we have made artificial reaction field by using DNA origami technology, where nano-layout of factors are possible. Integrating T7 RNA polymerase (RNAP) and target gene, we made transcription nano-chip capable of precise gene expression, and sensing/computing the miRNA profile of artificial cell and producing the output (Nat. Nano. 2018). Here, in this project, we constructed the nano-chip function in vivo. Besides, to understand the efficient gene expression of virus, we examine the molecular mechanism of internal ribosome entry site (IRES) from hepatitis C virus (HCV). There are several factors in the cell (e.g. protease and nuclease) that make damage to the integrated RNAP and target gene on the nano-chip. To protect from these factors, we used cage structure, and integrated the RNAP and target gene inside the cage. With this cage, we succeeded in RNA production in zebrafish embryo. Also, we developed the technique to expand the design ability of DNA origami. DNA origami is made of long single stranded DNA (ssDNA, termed "scaffold") and hundreds of short staple strands. In the conventional way, phage-derived scaffold ssDNAs have mainly used. But the construction and purification of such scaffold ssDNAs are laborious and time-consuming. Instead, we established the PCR-based methods, allowing us the design ability of sequence and reduce the preparation time. For HCV IRES, we found new pathway of the IRES entry on Ribosome, ensuring the efficient gene expression of the downstream gene. In this study, we expand the versatile power of DNA origami technology, and also showed that the nano-chip can function in vivo. Furthermore, we obtained hint for the efficient gene expression from HCV IRES mechanism. Combining these results, we imagine the construction of versatile gene expression control device in the near future.