

## 論文の内容の要旨

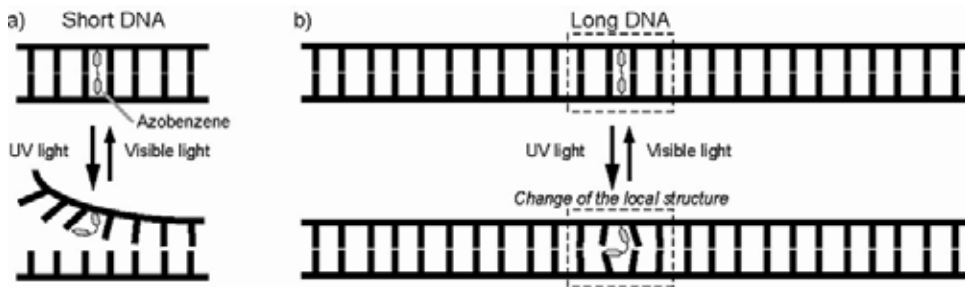
論文題目 「アゾベンゼン導入 DNA を用いた酵素反応の光制御」

氏名 劉 明哲

### 【緒言】

ヒトゲノムプロジェクトが終了し、ポストゲノム時代における重要なテーマの一つとして、遺伝子ならびにその下流の生体分子が関与する酵素反応または細胞機能を人工的に制御する研究が挙げられる。当研究室ではこれまでにアゾベンゼン導入DNAを開発し、DNA分子に新たな光応答性を付与することに成功している。更に、光応答性DNAを用いることで、DNAポリメラーゼ伸長反応の光制御、RNase HによるRNA切断反応の光制御に成功している。これらはいずれもFig. 1aに示すDNA二重鎖の形成と解離の光制御という方法論に基づいている。短いDNA側鎖にアゾベンゼンを導入した場合、UV光を照射するとDNA二重鎖が解離される。本研究では「DNAの局所構造の変化を可逆的に光制御する」というこれまでとは異なる方法論 (Fig. 1b) に基づいてアゾベンゼン導入DNAによる酵素反応の光制御を目指した。Fig. 1bに示すように、長いアゾベンゼン導入DNAを用いた場合、UV光を照射してもDNA二重鎖の解離は起こらず、アゾベンゼン周辺のDNA局所構造が変化する。そこで、私はDNAの中の酵素が特異的に結合する部位にアゾベンゼンを導入し、酵素とDNAとの相互作用を光で可逆的に制御することを目指した。

まず、ファージRNA polymerase (RNAP)による転写反応に着目し、DNAの転写調節部位(promoter)にアゾベンゼンを導入し、RNAPとpromoterとの相互作用を光で可逆的に制御することでRNA合成を効率的に光制御することを目指した。



**Fig. 1** The two strategies of photocontrol of enzyme reaction based on controlling DNA hybridization (a) and the change of DNA local structure (b).

## I. T7 RNAP による転写反応の光制御

まず、T7ファージ RNAPによる転写反応の光制御を試みた。T7 promoterは17塩基対からなっており、二つの機能性部位を有する。酵素認識部位(-17~-4位)とTATA部位(-4~-1位)である。特に-11位から-7位の間塩基対がRNAP中のSpecificity loopによって最も強く認識されることが知られている(Scheme 1)。転写の際にはTATA部位のDNA二重鎖はRNAPによって解離され、RNA合成が始まる。そこで、私はこのように機能の異なる酵素認識部位(Loop binding region)とTATA部位(Unwinding region)にそれぞれアゾベンゼンを導入し、転写反応の光制御効果を調べた。

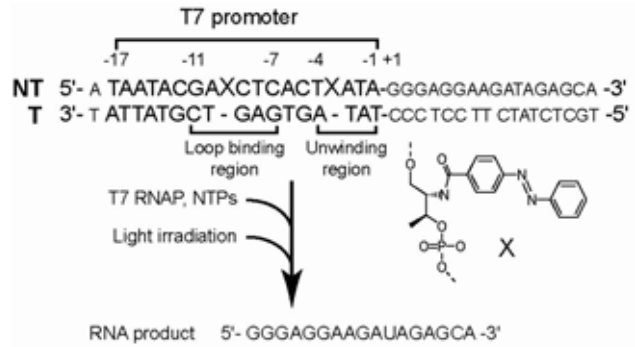
### 1. 実験方法

用いた実験系をScheme 1に示す。T7 promoter配列を含む35 merのDNAを鋳型DNAとして用いた。転写後、主産物として17 merのRNAが生成する。アゾベンゼン残基(X)が導入されたDNA、反応基質であるNTPs、RNAPを含む反応溶液に対して光照射し、その後、37°Cで2hインキュベーションした。可視光またはUV照射条件下における反応産物RNAをそれぞれ電気泳動で定量化し、比較することで光制御効果を評価した。

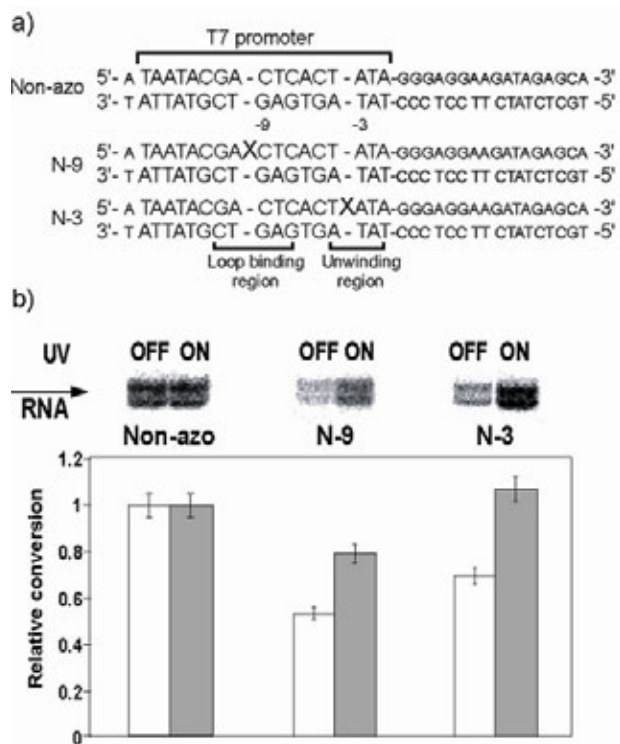
### 2. 一分子のアゾベンゼンを導入した修飾promoterを用いた転写反応の光制御

まず、酵素認識部位またはTATA部位に一分子のアゾベンゼンを導入したpromoterを用いて、転写反応の光制御効果を調べた。T7 promoterの酵素認識部位のNontemplate strand

(NT)の-9位と-10位の間アゾベンゼンを一分子導入したN-9 promoterを用いて光制御実験を行った結果、転写反応が光制御されることが分かった(Fig. 2)。暗条件下(UV OFF)とUV照射条件下(UV ON)における転写産物の量に明らかな差が現れた。グラフに示すように、暗条件下と比べて、UV照



**Scheme 1** Transcription reaction by T7 RNA polymerase with azobenzene-tethered T7 promoter at 37°C. NT = Nontemplate strand, T = Template strand

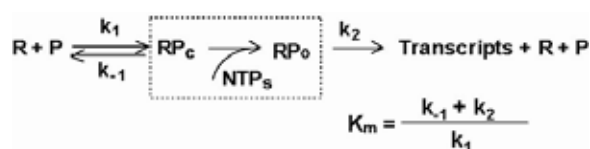


**Fig. 2** Transcription reaction by T7 RNA polymerase with various T7 promoters either under UV irradiation (UV ON) or under dark (UV OFF). (a) Sequences of T7 promoters. (b) PAGE patterns of main products of RNA either under UV irradiation or under dark (upper panel) and its quantitative plots (lower panel, white bar: under dark conditions; gray bar: after UV irradiation).

射により転写産物RNAが1.5倍増加した。TATA部位にアゾベンゼンを導入したN-3 promoterを用いた場合でも、UV照射による1.5倍の加速効果が見られた。しかし、アゾベンゼンを導入していない Non-azo promoterを用いた場合は、上記のような暗条件下とUV照射条件下における転写産物の量の差は全く見られなかった。従って、N-9, N-3 promoterに見られる光制御効果はT7 promoter中のアゾベンゼンのtrans-cis異性化によるものであることが明らかとなった。

### 3. 速度論的解析

一分子アゾベンゼン導入T7 promoterを用いることで、転写反応の光制御効果が確認された。光制御メカニズムを解明するために、Scheme 2 に示すモデルを適用し、N-9 と N-3 promoterを用いた場合の異なる光照射条件における $K_m$ ,  $k_{cat}$ を求めた。速度パラメーターをTable 1 に示す。N-9 を用いた場合は暗条件下と比べ、UV



**Scheme 2** Kinetic model for runoff *in vitro* transcription by T7 RNAP used in this study. R: RNAP; P: promoter.

光照射条件における $k_{cat}$ の値がほとんど変わらないのに対し、 $K_m$ の値は2倍ほど減少した。一方、N-3を用いた場合は暗条件下と比べ、UV光照射条件下における $K_m$ の値はほとんど変化せず、 $k_{cat}$ が2倍近くに上昇した。これらの結果から、酵素認識部位における光制御効果は主に異なる光照射条件下におけるpromoterに対するRNAPの親和性の差( $K_m$ )によるもので、TATA部位における光制御効果は主にNTPsの取り込み速度の差( $k_{cat}$ )によるものであることが示唆された。

**Table 1.** Kinetic parameters for N-9 promoter and N-3 promoter (Scheme 1) under either UV irradiation or dark conditions.

| Promoter | Light condition | $K_m / 10^{-6} \text{ M}$ | $k_{cat} / \text{s}^{-1}$ | $k_{cat} / K_m / 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ |
|----------|-----------------|---------------------------|---------------------------|--|
| N-9      | UV OFF          | 4.13                      | 0.22                      | 0.053  |
|          | UV ON           | 2.26                      | 0.21                      | 0.093  |
| N-3      | UV OFF          | 0.19                      | 0.24                      | 1.29   |
|          | UV ON           | 0.14                      | 0.37                      | 2.64   |

### 4. 二分子アゾベンゼン導入promoterによる高効率な光制御

以上のように、酵素認識部位とTATA部位に導入したアゾベンゼンは、転写反応の際にそれぞれ違う役割を果たしている。しかし、いずれのアゾベンゼンもcis体で転写反応を加速する(UV ON)。そこで、更に高効率な光制御効果を目指して、私は酵素認識部位とTATA部位にそれぞれ一分子ずつ計二分子のアゾベンゼンを導入したN-9-3 promoter (Fig. 3a)を設計し、これを用いて光制御反応を行った。Fig. 3b上の泳動バンドが示すように二分子アゾベンゼンによる相乗効果が現れ、非常に明確な光制御が実現できた。暗条件下(UV OFF)では、産物RNAがほとんど生成されていないのに対し、UV照射後には転写反応が著しく加速された。一分子アゾベンゼン導入N-9, N-3 promoterを用

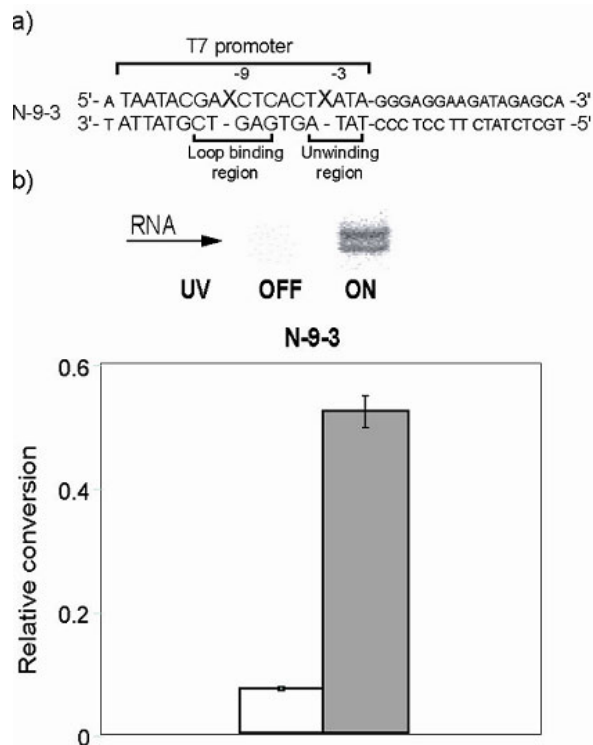
いた場合、UV 照射による加速効果は 1.5 倍程度しかなかったのに対し、N-9-3 promoter を用いることで転写反応が 7.5 倍加速された。これは二分子アゾベンゼンの協同触媒作用によるものと考えられる。

### 5. 転写反応の光スイッチング

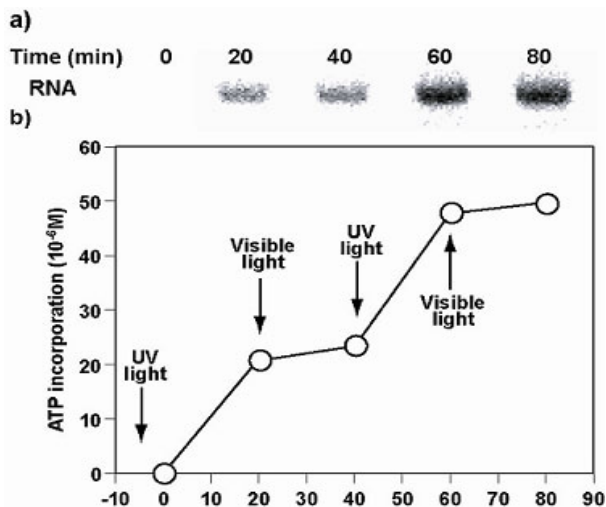
転写反応プロセスの可逆的な光スイッチングが可能かをN-9-3 promoter (Fig. 3a)を用いて調べた(Fig. 4)。UV光を1分間照射した後、反応を開始させるとRNAが効率よく生成され、転写がONになる。反応が20分進行したところで今度は可視光を1分間照射すると産物RNAの増加はほとんど見られず、転写がOFFになる。40分のタイミングでUV光を照射すると転写が再びONに転じる。このようなON/OFF/ON/OFFスイッチングは可逆的で何度も繰り返すことが可能であることが確認された。以上のように、二分子アゾベンゼンを導入した光応答性T7 promoterを用いて転写反応の光スイッチングに成功した。

### II. SP6 RNAP による転写反応の光制御

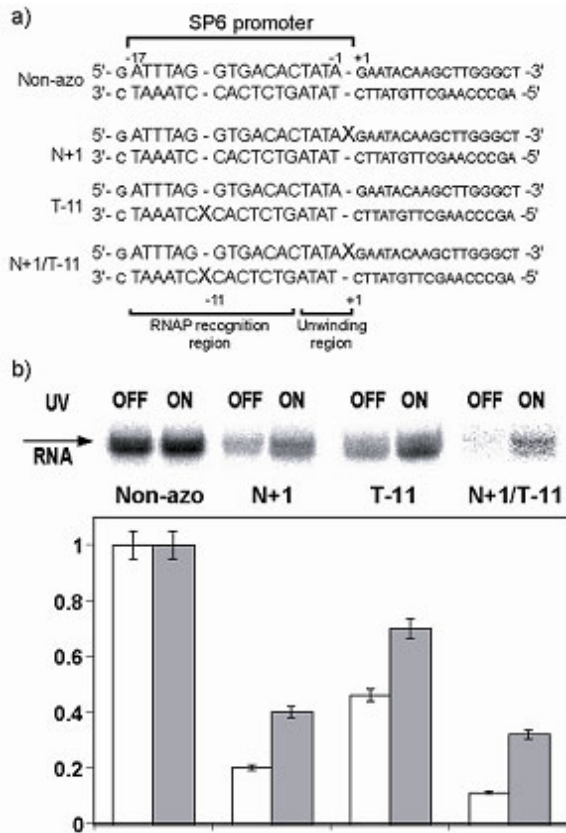
「DNA の局所構造の変化を可逆的に光制御する」という本研究の戦略の汎用性を確認するために、T7 RNAP と同じファミリーでありながら T7 promoter と異なる配列を有する SP6 promoter を導入し、SP6 RNAP による転写反応の光制御を検討した。その結果、SP6 RNAP による転写反応系においても、効率的な光制御が実現できた。Fig. 5 に示すように、一分子アゾベンゼン (X) を導入した N+1 promoter と T-11 promoter を用いた場合、共に光制御効果が得られた。暗条件下(UV OFF)と比べて 1.4 ~ 1.8 倍程度の UV 照射(UV ON)による加速効果が得られた。これに対し、同位置



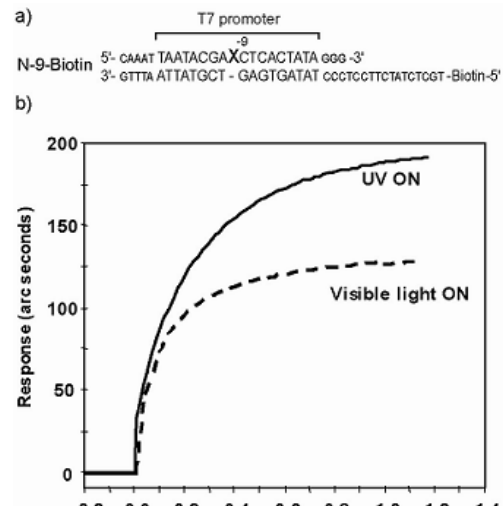
**Fig. 3** Transcription reaction by T7 RNA polymerase with two-azobenzene-tethered T7 promoter either under UV irradiation (UV ON) or under dark (UV OFF). (a) Sequence of two-azobenzene-tethered T7 promoter (N-9-3). (b) PAGE patterns of main products of RNA either under UV irradiation or under dark (upper panel) and its quantitative plots (lower panel, white bar: under dark conditions; gray bar: after UV irradiation).



**Fig. 4** Light-switching of transcription by irradiation with UV light and visible light with N-9-3 promoter (see Fig. 3a). PAGE patterns (a) of the transcript, and quantitative plots (b) are depicted. UV and visible light irradiation was carried out for 1 min at 20 min, 40 min and 60 min after incubation started.



**Fig. 5** Transcription reaction by SP6 RNA polymerase with various SP6 promoters either under UV irradiation (UV ON) or under dark (UV OFF). (a) Sequences of SP6 promoters. (b) PAGE patterns of RNA either under UV irradiation or under dark (upper panel) and its quantitative plots (lower panel).



**Fig. 6** Real time monitoring of the binding of T7 RNAP to azobenzene-tethered T7 promoter using biosensor. (a) Sequence of promoter (N-9-Biotin). (b) Binding curves of T7 RNAP binding to N-9-Biotin. Equivalent amount of T7 RNAP was added to the N-9-Biotin after irradiating UV or visible light at 30 .

にアゾベンゼンを二分子導入した N+1/T-11 promoter を用いた場合は T7 転写反応系の時と同じような相乗効果が現れた。暗条件下と比べて UV 照射を行うことで転写反応は 3 倍加速された。

### III. バイオセンサーを用いた光応答性 T7 promoter への T7 RNAP の結合の直接観察

「アゾベンゼンの光異性化による DNA 局所構造の変化に伴う promoter への RNAP の結合と解離の制御」を直接観測するために、SPR バイオセンサーの一種である IAsys を用いて、UV 或いは可視光照射後におけるアゾベンゼン導入 T7 promoter への RNAP の結合過程をリアルタイムで観測した。-9 位にアゾベンゼンを導入した N-9-Biotin promoter (Fig. 6a) をアビジン基板上に固定化した後、RNAP を加えて結合の経時変化を追った。Fig. 6b に示すように、RNAP の N-9-Biotin への結合量は、可視光照射後よりも UV 照射後の方が多かった。この実験では転写反応の基質である NTPs を加えていないので、ここで得られた結果から、より広範なアゾベンゼン導入 DNA とタンパク (酵素) との相互作用の光制御も可能であることが示唆された。

### 【結論】

「DNA の局所構造を可逆的に光制御する」ことにより、ファージ RNAP による転写反応のほぼ完全な ON/OFF 光スイッチングに成功した。本研究で開発された光応答性 promoter は、遺伝子治療や光スイッチング ナノデバイスなどへの応用が期待される。