

平成 29 年度 修士論文

# マイクロ液滴界面を利用した RNA 転写可能な DNA

## マイクロ構造体の構築

Construction of DNA microstructure capable of RNA transcription  
using a microdroplet interface.

渡邊 理佐

16M31320

情報理工学院  
情報工学系  
知能情報コース

主査教員 瀧ノ上 正浩

副査教員 山村 雅幸

副査教員 小長谷 明彦

提出年月日：平成 30 年 2 月 7 日

# 概要

細胞核において遺伝子発現は、クロマチン構造の物理的 DNA 凝縮を含む様々な因子によって、動的な制御が行われている。また、DNA を化学的な材料として、様々な構造形成を行う DNA ナノテクノロジーは、近年発展し続けている。しかし、クロマチン構造の DNA 凝縮による遺伝子発現制御のような、細胞核内の遺伝子発現制御の原理に基づいた応用技術を化学合成 DNA で開発することは発展途上である。本研究は、細胞核内の DNA 物理的凝縮状態を模倣した RNA 発現系の構築を行なうことを目的とした。そのために、RNA 転写配列を持ちゲル構造の DNA マイクロ構造体を作製し、DNA マイクロ構造体からの RNA 発現の検出を行なった。

DNA マイクロ構造体は、カチオン性脂質膜をもつ油中水滴のなかで、RNA 転写配列を有する Y 字分岐 DNA を自己組織化させることで、ゲルの構造を持つ DNA マイクロ構造体を油中水滴内に作製した。このとき、DNA モチーフの大きさの違いによって、油中水滴界面での DNA ゲルの形成の様子が異なることから、DNA モチーフの形や大きさによって形成される構造を制御できる可能性を示した。そして、油中水滴界面の脂質膜を除去して水溶液中に取り出すことにより、DNA だけで構成されたマイクロ構造体を得られた。RNA ポリメラーゼを含む溶液中にこの DNA マイクロ構造体を入れ、インキュベートすることにより、構造体から RNA が転写されたことを確認した。DNA マイクロ構造体からの RNA の発現では、溶液中の DNA マイクロ構造体の個数が発現量に影響を及ぼすことが分かった。DNA マイクロ構造体の個数が多いときに、RNA の発現量が多くなることが分かった。

この DNA マイクロ構造体はゲル構造のため、膨潤度によりゲルを収縮させることができる。ゲルの収縮によって DNA がさらに凝縮した状態になるため、遺伝子発現制御に利用できると考えられる。そのため、本研究で構築した DNA マイクロ構造体は、DNA マイクロ構造体の収縮によって RNA 発現量を制御する系への応用することで、クロマチンの DNA 凝縮状態をゲル構造で模倣した遺伝子発現制御系として使用できることを期待している。

# 目次

第1章	序論 .....	1
1.1.	細胞核内での DNA 構造 .....	1
1.2.	DNA ナノテクノロジー .....	3
1.2.1.	DNA.....	3
1.2.2.	DNA 構造体.....	4
1.2.3.	DNA ナノテクノロジーの現状 .....	6
1.3.	先行研究 .....	6
1.4.	研究目的 .....	7
1.5.	論文構成 .....	7
第2章	DNA マイクロ構造体の構築 .....	8
2.1.	概要 .....	8
2.2.	材料と方法 .....	8
2.2.1.	Y モチーフ DNA の塩基配列設計方法.....	8
2.2.2.	油中水滴内での DNA マイクロ構造体の作製方法 .....	13
2.2.3.	油中水滴内からの DNA マイクロ構造体の取り出し方法 .....	16
2.3.	結果と考察 .....	18
2.3.1.	Y モチーフ DNA の塩基配列設計.....	18
2.3.2.	油中水滴内での DNA マイクロ構造体の作製 .....	18
2.3.3.	油中水滴内からの DNA マイクロ構造体の取り出し .....	22
第3章	DNA マイクロ構造体からの RNA の転写.....	23
3.1.	概要 .....	23
3.2.	材料と方法 .....	23
3.2.1.	Y モチーフ DNA からの RNA 転写.....	23
3.2.2.	Molecular beacon プローブの配列設計方法 .....	24
3.2.3.	Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度の測定方法 .....	27
3.2.4.	Molecular beacon プローブと RNA との 2 本鎖構造の融解温度の測定方法 ...	27
3.2.5.	油中水滴リアクタを用いた DNA マイクロ構造体からの RNA の転写方法 ..	28

3.2.6.	チューブ内での DNA マイクロ構造体からの RNA の転写方法 .....	30
3.3.	結果と考察 .....	33
3.3.1.	Y モチーフ DNA からの RNA 転写 .....	33
3.3.2.	Molecular beacon プローブの配列設計 .....	34
3.3.3.	Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度 .....	37
3.3.4.	Molecular beacon プローブと RNA の 2 本鎖構造の融解温度 .....	37
3.3.5.	油中水滴リアクタを用いた DNA マイクロ構造体からの RNA の転写 .....	39
3.3.6.	チューブ内での DNA マイクロ構造体からの RNA の転写 .....	41
第 4 章	結論 .....	44
	謝辞 .....	46
	参考文献 .....	47

# 第1章

## 序論

### 1.1. 細胞核内での DNA 構造

細胞核内において、DNA はヒストンという球状のタンパク質に巻き付きヌクレオソームを形成する。そして、このヌクレオソームが規則正しく集まりクロマチンを形成する。このように、細胞核内において DNA は折りたたまれている（図 1.1、[1]）。DNA の折りたたみを行う、クロマチンにはユークロマチンとヘテロクロマチンの2つの状態がある。ユークロマチンでは DNA が緩んだ状態で、遺伝子は転写が活発に行われている。それに対して、ヘテロクロマチンでは DNA が凝集した状態で、DNA 凝縮によって、遺伝子発現に関与するタンパク質分子が DNA から立体的に排除されるため、遺伝子発現が抑制されている。このように、遺伝子発現は、DNA 塩基配列の遺伝情報によるナノスケールの制御に加えて、DNA の物理的凝縮のようなマイクロスケールの動的な制御が行われている。近年、生きた細胞核内における DNA は、不規則に折りたたまれてクロマチンドメインと呼ばれる塊を形成していることが報告された [2]。彼らは、光学顕微鏡の分解能を超える超解像蛍光顕微鏡を構築することにより、クロマチンドメインが細胞核内でダイナミックに動く様子を初めて観察した（図 1.2）。しかし、ユークロマチンとヘテロクロマチンのように DNA の物理的凝縮がどのように変わるのかは、まだ明らかにされていない。DNA の物理的凝縮の原理が解明されることによって、細胞核内での遺伝子発現の制御や、DNA の物理的凝縮の変化によって起こる細胞異常などの理解がさらに進むと期待される。

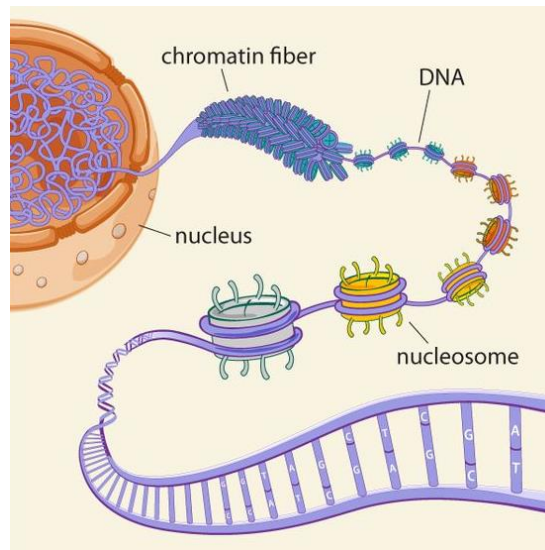


図 1.1 細胞核内での DNA 構造 [1].

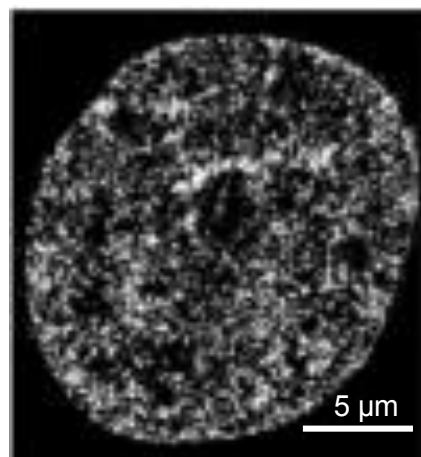


図 1.2 超解像蛍光顕微鏡で観察したクロマチン像.  
白い塊がクロマチンドメイン. [2]

## 1.2. DNA ナノテクノロジー

DNA ナノテクノロジーとは、DNA を化学的な材料として用いて、様々な構造形成を行う技術である。

### 1.2.1. DNA

DNA は糖・塩基・リン酸がヌクレオチドと呼ばれるひとまとまりの単位となり、このヌクレオチドが長く連なった分子である。1 本鎖 DNA とよばれる。DNA の塩基には A(アデニン)、T(チミン)、G(グアニン)、C(シトシン)の 4 種類ある。DNA には向きがあり、端が 5'末端と 3'末端に区別されていて、配列は 5'末端から読んでいく。A には T のみが、C には G のみが結合する。塩基配列に依存して自発的に DNA 分子同士が結合し、二次構造を形成する。DNA の二次構造とは、相補的な塩基が結合することにより形成される構造である。塩基配列によって結合の強さと部位を変えられることから、塩基配列を設計することにより、DNA 構造を簡単に設計することができる。

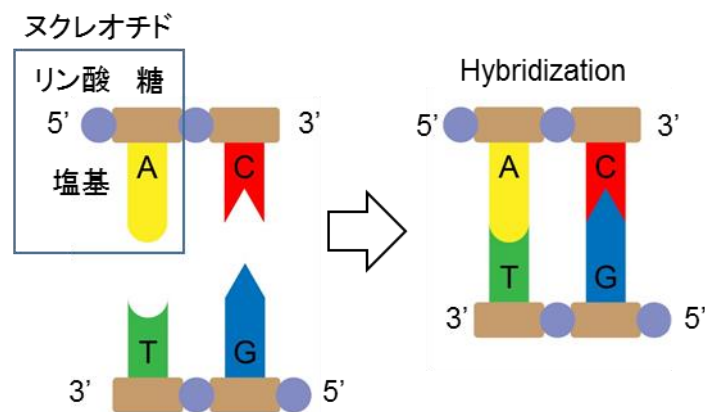


図 1.3 DNA の模式図.

## 1.2.2. DNA 構造体

### (a) DNA モチーフ

DNA は基本的に線状または環状である。DNA を材料として 2 次元もしくは 3 次元の複雑な構造を構築するために、複数本の DNA を結合させて小さな 2 次元のユニットを作製し、これを次々に結合させていく方法がある。この 2 次元ユニットのことを DNA モチーフと呼び、1 本の DNA をいくつかの領域に分け、それぞれが異なる DNA のどの領域と結合することを指定することにより、2 次元に広がった構造を形成する。DNA モチーフの各末端には粘着末端と呼ばれる自己相補配列の 1 本鎖部分を持ち、粘着末端を介して DNA モチーフ同士の結合が可能である。3 本の DNA を特定の領域 (図 1.4 の同じ色の領域) 同士が結合するように設計することにより、Y 字分岐構造 (Y-DNA) を形成することが報告されている [3]。

### (b) DNA タイル

DNA モチーフを作製し、DNA モチーフの末端が結合することによって 2 次元構造を構築する。Y 字分岐構造の DNA モチーフ (Y-DNA) の末端が結合することによる、六角形の 2 次元格子の構築が報告されている (図 1.5、[4])。

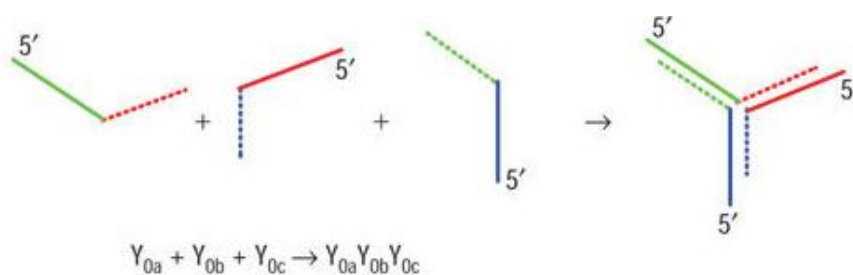


図 1.4 Y-DNA の作製方法. [3]

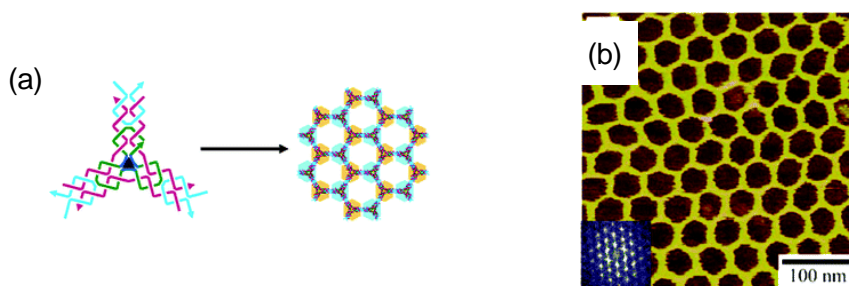


図 1.5 (a).DNA タイルの模式図. (b) DNA タイルの原子間力顕微鏡画像. [4]



### (c) DNA ハイドロゲル

DNA モチーフが 3 次元的に結合し、ネットワーク構造をとることで DNA ゲルが構築される。X 字分岐構造の DNA モチーフの末端が結合することによる、DNA ゲルの構築が報告されている。(図 1.6、[5])

また、このグループでは、遺伝子を DNA ゲルの骨格の一部として組み込むことによって、タンパク質生成 DNA ゲルを作製した。このゲルからのタンパク質生成効率は、溶液ベースのシステムより約 300 倍高いことが報告されている。ゲルを構築したことによって、遺伝子の局所濃度が高くなること、遺伝子の接近によるより速い酵素代謝が高い効率の要因だと考えられている。(図 1.7、[6])

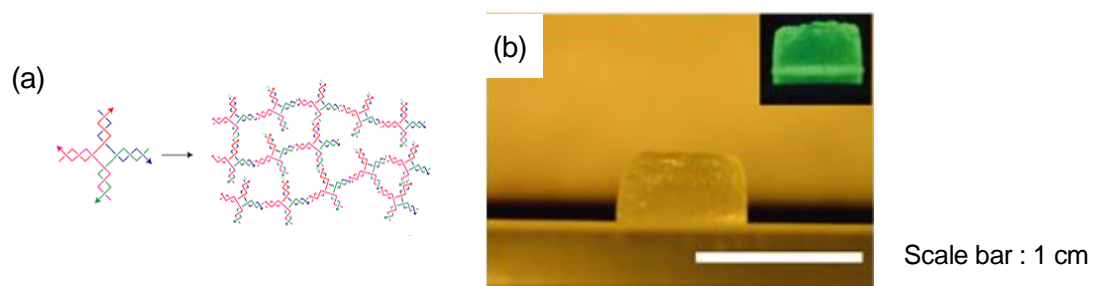


図 1.6 (a) DNA ゲルの模式図. (b) DNA ゲル. [5]

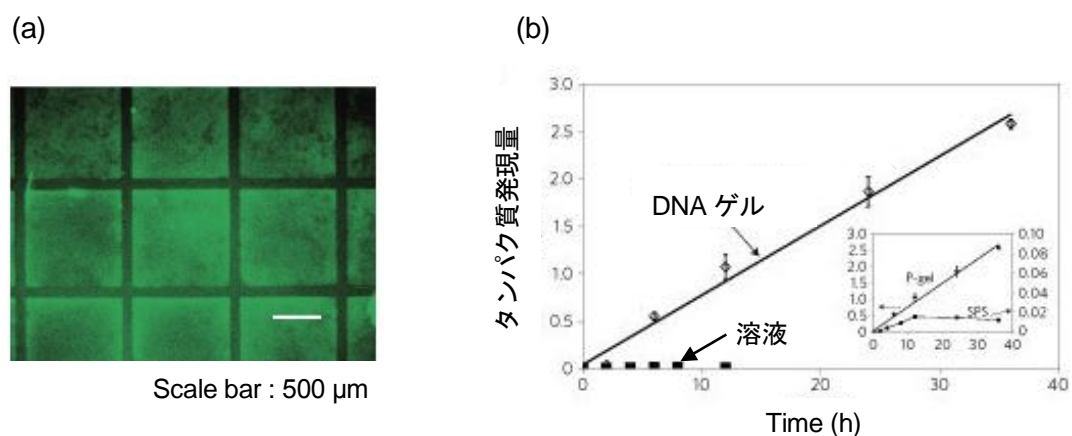


図 1.7 (a) タンパク質生成ゲル. (b) タンパク質発現の時間依存. [6]

### 1.2.3. DNA ナノテクノロジーの現状

DNA を材料として、構造体の作製や作製した構造体から機能を発現させる技術は発展している。しかし、クロマチン構造の DNA 凝縮による遺伝子発現制御のような、細胞核内の遺伝子発現制御の原理に基づいた応用技術を化学合成 DNA で開発することは発展途上である。

## 1.3. 先行研究

所属研究室では、カチオン性脂質を用いた油中水滴内に Y モチーフ DNA を封入し温度操作を行うことにより、油中水滴内の界面を基板としたゲル構造の DNA マイクロ構造体が構築されることが分かった [7]。また、脂質膜を除去することにより油中水滴内に構築した DNA マイクロ構造体を水溶液中に取り出した。DNA マイクロ構造体の作製方法については第 2 章で述べる。水溶液中に取り出した DNA マイクロ構造体はゲル構造を持つため、膨潤度により構造体が収縮することが確認された。DNA マイクロ構造体の収縮によって DNA がさらに凝縮した状態になるため、DNA マイクロ構造体はクロマチンの DNA 凝縮状態を模倣することができ、遺伝子発現制御に活用できると考えられる。しかし、RNA の発現やその制御が可能な DNA マイクロ構造体は実現されていない。

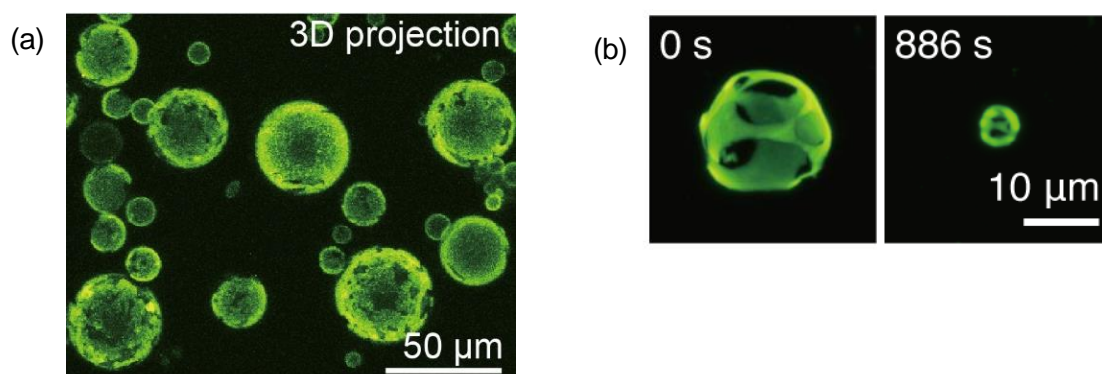


図 1.8 (a) 油中水滴内の DNA マイクロ構造体. (b) DNA マイクロ構造体の収縮. [7]

## 1.4. 研究目的

本研究の目的は、細胞核内の DNA 物理的凝縮状態を模倣した RNA 発現系を化学合成 DNA で構築することである。本研究では、RNA 転写配列を持ちゲル構造の DNA マイクロ構造体の構築を行い、DNA マイクロ構造体からの RNA 発現と検出を行った。

## 1.5. 論文構成

本論文は全 4 章から構成される。第 1 章では、序章として、細胞核内での DNA 構造、DNA ナノテクノロジーの現状、先行研究について述べた。第 2 章では、DNA 凝縮状態をゲル構造で模倣した、RNA 転写配列を持つ DNA マイクロ構造体の構築方法について説明し、構造体の構築に必要な DNA の配列設計と、実際に構築した DNA マイクロ構造体の実験方法と結果を述べる。第 3 章では、DNA マイクロ構造体からの転写された RNA の方法を説明し、DNA マイクロ構造体からの RNA の転写の実験方法と結果を述べる。最後に第 4 章で結論と考察を述べる。

## 第2章

# DNA マイクロ構造体の構築

### 2.1. 概要

RNA 転写配列を持つ DNA マイクロ構造体を作製するために、RNA 転写配列を持ち Y 字分岐構造を形成する Y モチーフ DNA (YDNA-R) を設計した。そして、カチオン性脂質を用いた油中水滴内に Y モチーフ DNA を封入し温度操作を行い、油中水滴内に DNA マイクロ構造体を作製した。油中水滴内の DNA マイクロ構造体を脂質膜を除去することにより、水溶液内に取り出した。DNA ゲルだけで構成されたマイクロ構造体を得られた。

### 2.2. 材料と方法

#### 2.2.1. Y モチーフ DNA の塩基配列設計方法

3 本の 1 本鎖 DNA が結合することにより Y 字分岐構造を形成し、RNA 転写配列を持つ Y モチーフ DNA (YDNA-R) を設計した (図 2.1、表 2.1)。RNA 転写配列を持つ Y モチーフ DNA (YDNA-R) を形成する 3 本の 1 本鎖 DNA をそれぞれ YR-1R、Y-2、YR-3R' とよぶ。Y モチーフ DNA の各末端には自己相補配列の 1 本鎖部分 (粘着末端) を持ち、粘着末端を介してモチーフ同士の結合が可能である。Y モチーフ DNA 同士が結合していくことによりネットワーク構造になり、DNA がハイドロゲルを形成する (図 2.3)。YDNA-R は、これまでに所属研究室で使用していた Y モチーフ DNA (YDNA) (図 2.2、表 2.2) に、プロモータ配列と転写される配列を追加したものである。Y モチーフ DNA (YDNA) を形成する 3 本の 1 本鎖 DNA をそれぞれ Y-1、Y-2、Y-3 と呼ぶ。プロモータ配列とは、RNA を転写する酵素が転写部位を認識するための配列である。本研究では、転写酵素に T7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼを用いて転写を行うため、T7 プロモータ配列を用いた。

設計した 3 本の塩基配列が確かに Y 字分岐構造を形成するかを確認するために、DNA の結合の安定性を計算し、二次構造の予測を行った。結合の安定性の指標として、塩基配列・反応温度・DNA の濃度から計算できるギブスの自由エネルギー  $\Delta G$  と融解温度  $T_m$  を使用した。

ギブスの自由エネルギーは次の式で表され、小さいほど DNA の結合が安定である。

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

$\Delta H$  はエンタルピー、 $\Delta S$  はエントロピーである。

融解温度とは、2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA の割合が 1:1 となる温度（融解曲線の転移点）のことである（図 2.4）。次の式で表され、温度が高いほど DNA の結合が安定である。

$$T_m = \frac{\Delta H}{R \ln(C/2) + \Delta S}$$

$R$  は気体定数、 $C$  は DNA の濃度である。

エンタルピーとエントロピーは Nearest-Neighbor 法（最近接法）で求める。Nearest-Neighbor 法は、塩基対の水素結合のエネルギーではなく、隣り合う塩基対の間に働くスタッキング相互作用が DNA の結合の安定化に支配的であることをモデル化した方法である。隣り合う塩基対を 2 つずつペアにして、対応する既知のエンタルピーとエントロピーのパラメータを選び、足し合わせることによって、全体のエンタルピーとエントロピーを計算できる（図 2.5）。

この 2 つの指標を用いて、結合の安定性から二次構造の予測を行うためのソフトウェアとして Nucleic Acid Package (NUPACK) [8]（エラー！参照元が見つかりません。）がある。NUPACK は、カリフォルニア工科大学の Robert Dirks 博士らによって開発されたソフトウェアで、web 上での使用が可能である。塩基配列、反応温度、DNA 濃度、塩濃度を入力すると、ギブスの自由エネルギーと融解温度を指標として、安定な二次構造を出力する。設計した 3 本の DNA がそれぞれ安定に形成する二次構造を NUPACK を使用して調べた。設計条件は、反応温度は 95°C から 20°C まで 5°C きざみ、DNA 濃度は 10  $\mu$ M、塩濃度 ( $[Na^+]$ ) は 350 mM とした。設計した DNA の合成は、OPC 精製でユーロフィンジェノミクス株式会社 に委託した。

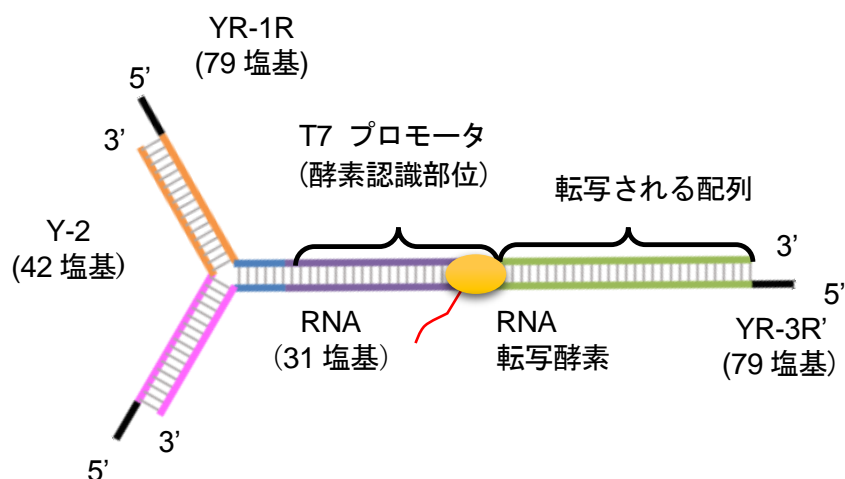


図 2.1 RNA 転写配列を持つ Y モチーフ DNA (YDNA-R). 3 本の 1 本鎖 DNA、YR-1R、Y-2、YR-3R' から形成される。塩基配列は表 2.1 に示した。

表 2.1 RNA 転写配列を持つ Y モチーフ DNA の塩基配列。

YR-1R	5'- GCT CGA GC C AGT GAG GAC GGA AGT TTG TCG TTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CAA AAG AGT TAG GAT GGG AGC TGG A -3'
Y-2	5'- GCTCGAGC CAACCACGCCTGTCCA TTACTTCGTCCTCACTG -3'
YR-3R'	5'- GCT CGA GCT CCA GCT CCC ATC CTA ACT CTT TTG TCT CCC TAT AGT GAG TCG TAT TA A CGA CTT TGG ACA GGC GTG GTT G -3'

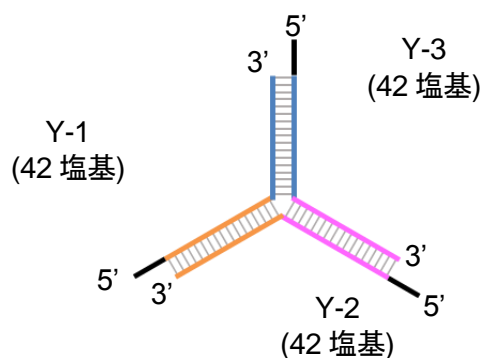


図 2.2 Y モチーフ DNA (YDNA). 3 本の 1 本鎖 DNA、Y-1、Y-2、Y-3 から形成される。塩基配列は表 2.2 に示した。

表 2.2 Y モチーフ DNA の塩基配列。

Y-1	5' - GCTCGAGC CAGTGAGGACGGAAGT TTGTCGTAGCATCGCACC -3'
Y-2	5' - GCTCGAGC CAACCACGCCTGTCCA TTACTTCGTCCTCACTG -3'
Y-3	5' - GCTCGAGC GGTGCGATGCTACGAC TTGGACAGGCGTGTTG -3'

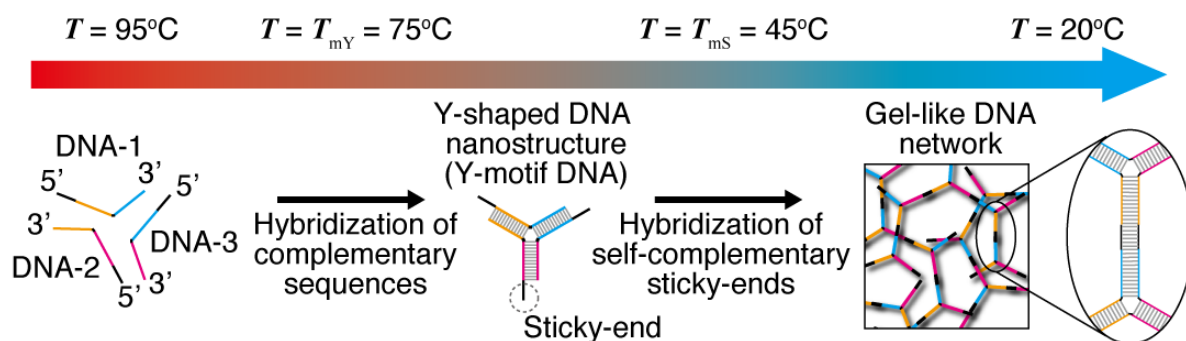


図 2.3 Y モチーフ DNA のゲル化.

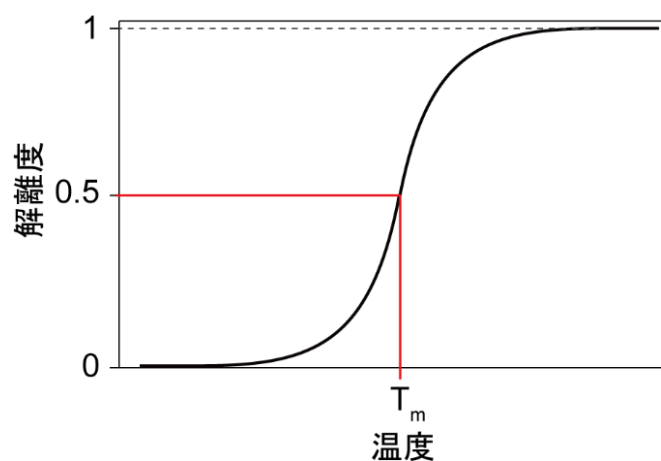


図 2.4 融解曲線. 2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA の割合が 1:1 になるとき (解離度 0.5) の温度が融解温度 ( $T_m$ ) である.

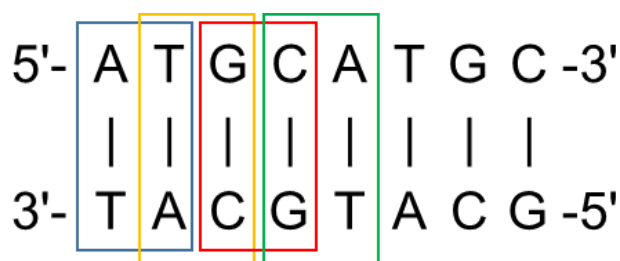


図 2.5 Nearest-Neighbor 法. 四角で囲ったように、隣り合う塩基対を 2 つずつペアにして、対応する既知のエンタルピーとエントロピーのパラメータを選ぶ.



Analysis Design Utilities Downloads

Input Results Demos Help

Nucleic acid type: ☐ RNA ☒ DNA

反応温度 — Temperature:  °C Compute melt: ☐

Number of strand species:  Maximum complex size:  strands

**Strand species**

A:  Concentration:  nM

B:  Concentration:  nM

C:  Concentration:  nM

DNA 濃度

塩基配列

図 2.7 NUPACK 入力画面

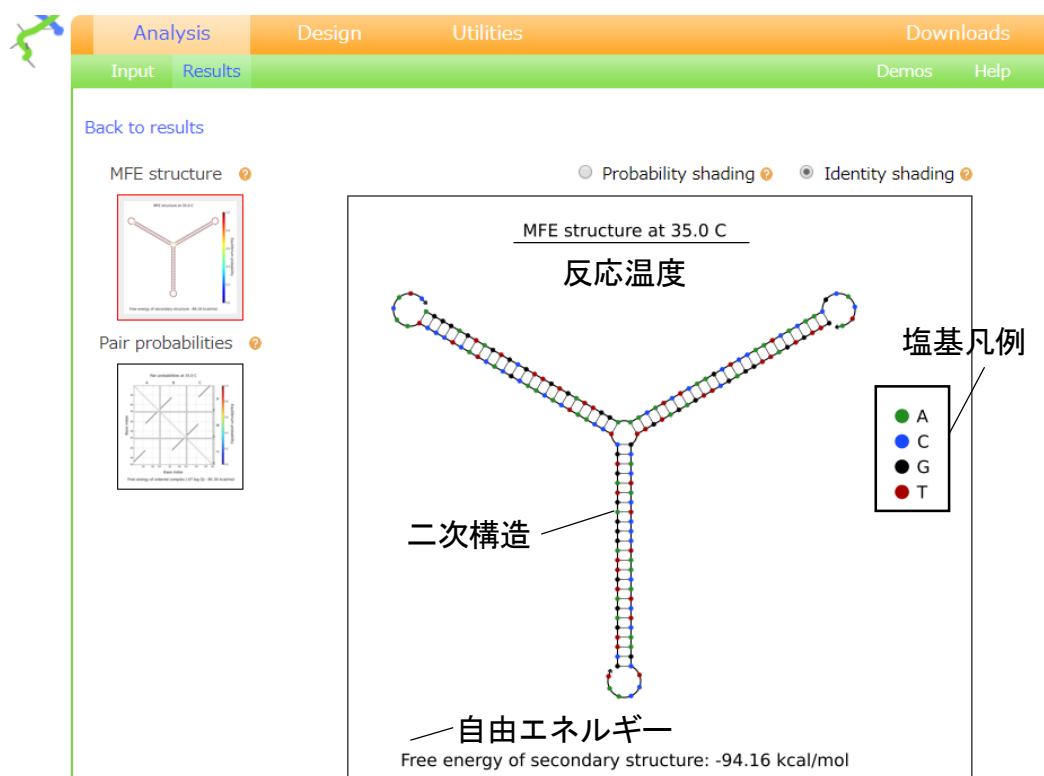


図 2.6 NUPACK 出力画面



### 2.2.2. 油中水滴内での DNA マイクロ構造体の作製方法

本研究では、Y モチーフ DNA 封入したカチオン性脂質膜をもつ油中水滴型エマルションを作製し、油中水滴内の界面を基板として DNA マイクロ構造体を作製した (図 2.12)。エマルションとは、分離している 2 つの液体に界面活性剤を加えることにより、一方の液体が小滴となって他方の液体に分散している状態のことである。なかでも、油中水滴型エマルションとは、油相に水滴が分散している状態のことである。本研究では、油中水滴型エマルションの油相にはミネラルオイル (ナカライテスク) を使用し、水相には DNA 溶液を用いた。また、界面活性剤には、カチオン性脂質の 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP, Avanti Polar Lipids, Inc) と中性脂質の 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC, Avanti Polar Lipids, Inc) を混合して使用した。クロロホルム (超脱水, 和光純薬工業株式会社) とメタノール (超脱水, 和光純薬工業株式会社) をクロロホルム:メタノール = 2:1 の割合で混合した有機溶剤に DOTAP と DOPC をそれぞれ溶かした。有機溶剤に溶かした DOTAP と DOPC をダーラム管 (ダーラム 9, マルエム) に入れ、ドラフト内で弱風を当て有機溶剤を揮発させ、ダーラム管の底に脂質フィルムを作製した (図 2.8)。残留した有機溶剤を完全に揮発させるために、真空デシケータ内に 1-12 時間放置した。脂質の濃度が 2 mM になるように、脂質フィルムにミネラルオイルを加えた。35°C の水を張った超音波洗浄器 (アズワン、図 2.10) を用いて 1 時間超音波を当て、脂質をミネラルオイルに溶かし、2 mM 脂質を含むミネラルオイルを作製した。

10  $\mu$ M Y モチーフ DNA と、Buffer [20 mM Tris·HCl pH 8.0 (ライフテクノロジーズジャパン), 350 mM NaCl (和光純薬工業株式会社), 1 $\times$ SYBR Gold (ライフテクノロジーズジャパン)] を混合し 10  $\mu$ M DNA 溶液を作製した。Buffer には、DNA の観察のために蛍光色素 (SYBR Gold) を加えた。

チューブ (0.2 mL, Fast Gene) に 2 mM 脂質を含むミネラルオイルを 50  $\mu$ L 入れ、次に 10  $\mu$ M DNA 溶液を 2  $\mu$ L を加えた。この溶液をサーマルサイクラー (T-Gradient, Biometra、図 2.9) を用いて温度を 95°C まで上げた。95°C に達したら、タッピングを 40-50 回行い油中水滴型エマルションを作製した。95°C から 20°C まで 0.01°C/s で冷却した。(図 2.11)

このとき、油中水滴の界面にはカチオン性脂質と中性脂質による脂質膜が形成されてお

り、DNA は負に帯電しているため、電気的な性質によって DNA は脂質膜に吸着する。同時に、Y モチーフ DNA は冷却により、ネットワーク構造を形成しゲル化する。このように、油中水滴の界面を基板として、ゲルの性質を持つ中空な DNA マイクロ構造体を作製した。(図 2.12)

油中水滴内に作製した DNA マイクロ構造体は、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus IX81 with FV1000, OLYMPUS) を使用して蛍光観察を行った。高さを等間隔で変化させて取得した共焦点レーザー顕微鏡画像をソフトウェア (FV10ASW 4.0, OLYMPUS) を用いて、3次元画像を構築した。

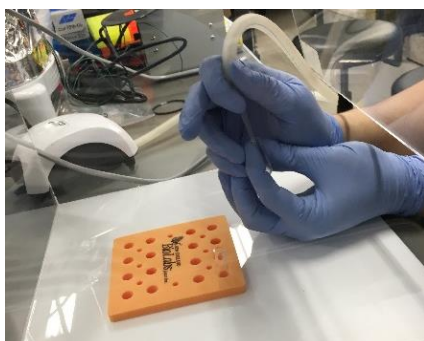


図 2.8 有機溶剤を揮発させて脂質フィルムを作製.



図 2.10 超音波洗浄器.



図 2.9 サーマルサイクラー.

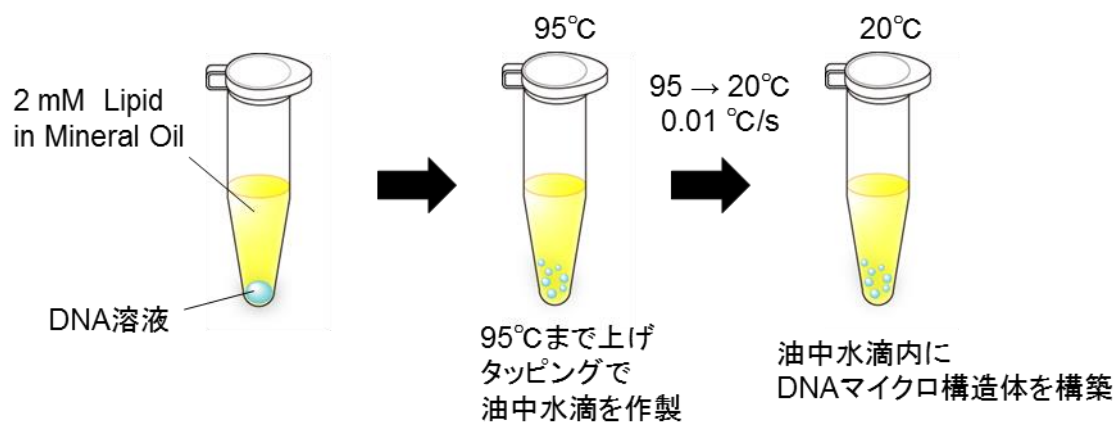


図 2.11 DNA マイクロ構造体の作製実験手順.

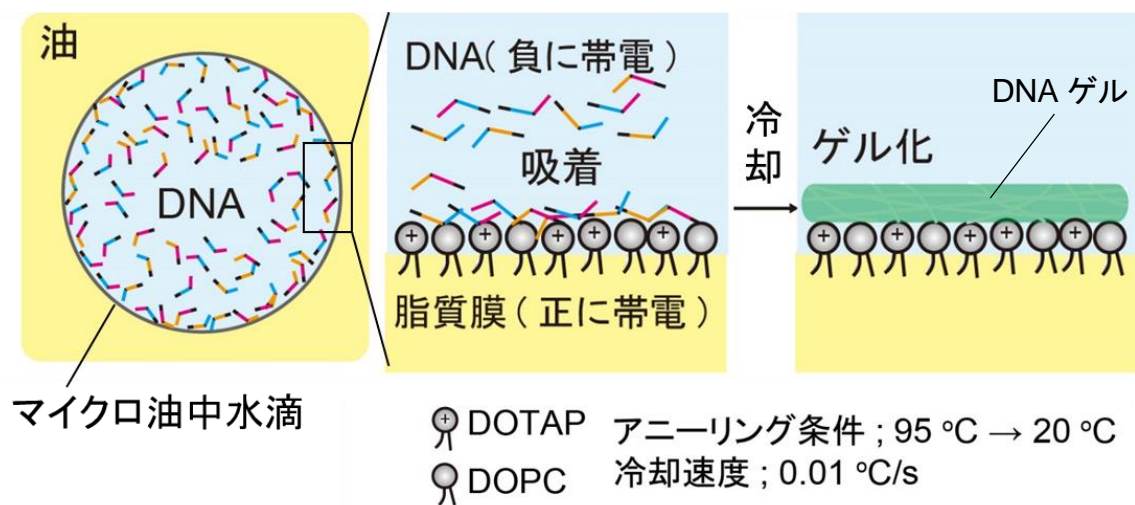


図 2.12 DNA マイクロ構造体の作製時の油中水滴内での様子.

### 2.2.3. 油中水滴内からの DNA マイクロ構造体の取り出し方法

前項で作製した、油中水滴内に DNA マイクロ構造体が構築された油中水滴型エマルションが入ったチューブ (0.2 mL, Fast Gene) を 1 時間静置して、油中水滴をチューブの底に沈降させた。上澄みの脂質を含むミネラルオイルを 40  $\mu$ L 取り除き、ミネラルオイルを 40  $\mu$ L 加え、ピペッティングをしてよくかき混ぜた。この操作を 3 回行った。その後、1 時間静置して油中水滴をチューブの底に沈降させ、ミネラルオイルを完全に取り除いた (40-45  $\mu$ L)。そこに Buffer [20 mM Tris·HCl (pH 8.0) (ライフテクノロジーズジャパン) , 350 mM NaCl (和光純薬工業株式会社) , 1 $\times$ SYBR Gold (ライフテクノロジーズジャパン) ] を 10  $\mu$ L 加えてピペッティングをしてよくかき混ぜた。この溶液を Buffer が 10  $\mu$ L 入っている別のチューブに全量移し、ピペッティングをしてよくかき混ぜた。このチューブの蓋を開き、底に画鋸で穴を開けて、チューブの上部を指で圧力をかけ新しい別のチューブに溶液を移した。(図 2.13)

このように、油中水滴内の DNA マイクロ構造体を脂質膜を除去することにより、水溶液内に取り出した (図 2.14)。これは DNA ゲルだけで構成されたマイクロ構造体である。DNA マイクロ構造体は、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus IX81 with FV1000, OLYMPUS) を使用して蛍光観察を行った。高さを等間隔で変化させて取得した共焦点レーザー顕微鏡画像をソフトウェア (FV10 ASW 4.0, OLYMPUS) を用いて、3 次元画像を構築した。

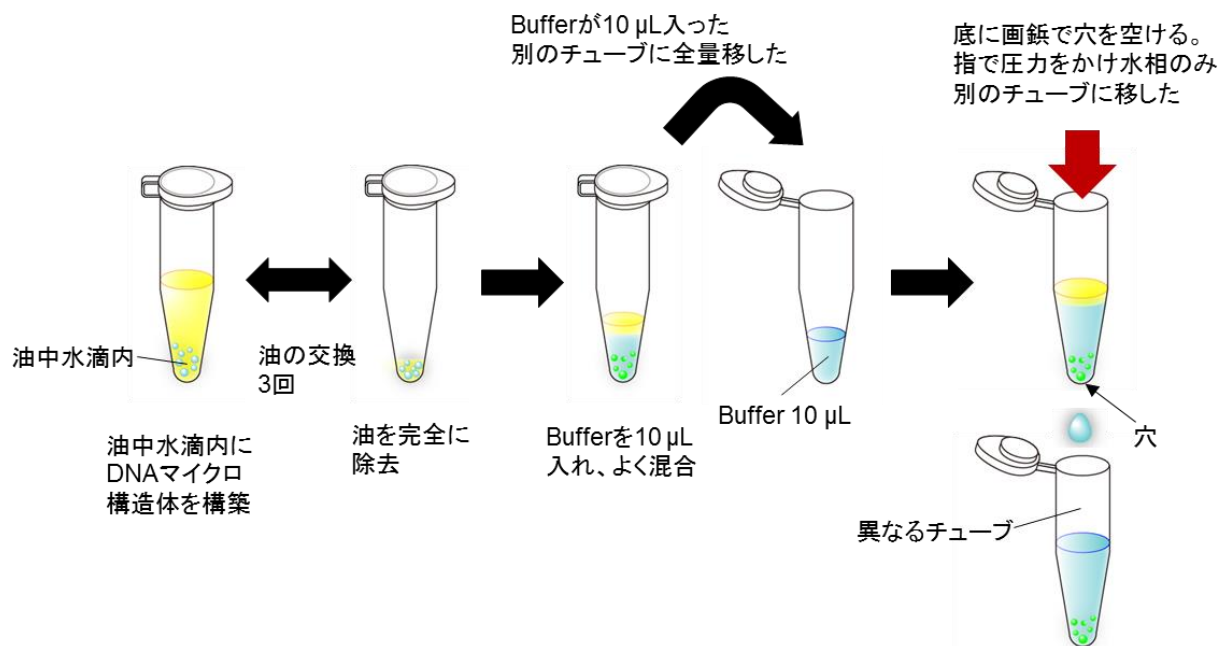


図 2.13 DNA マイクロ構造体の取り出し実験手順.

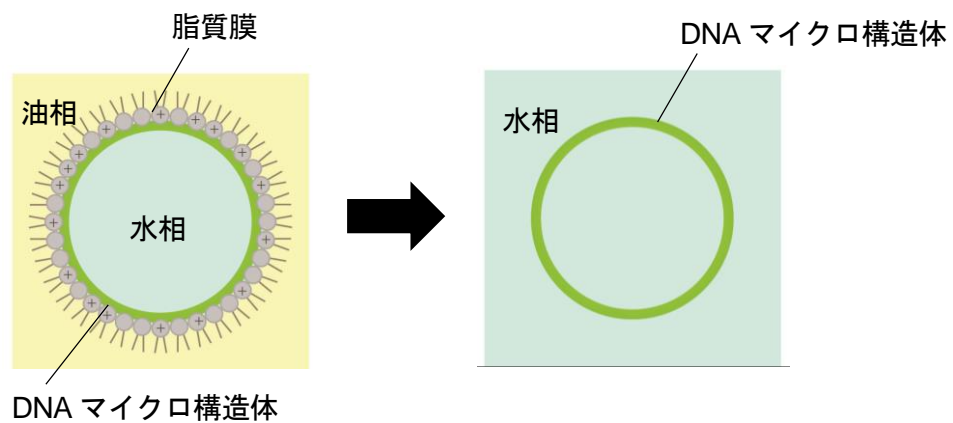


図 2.14 DNA マイクロ構造体の取り出し模式図.

## 2.3. 結果と考察

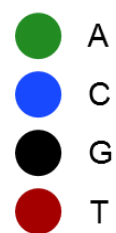
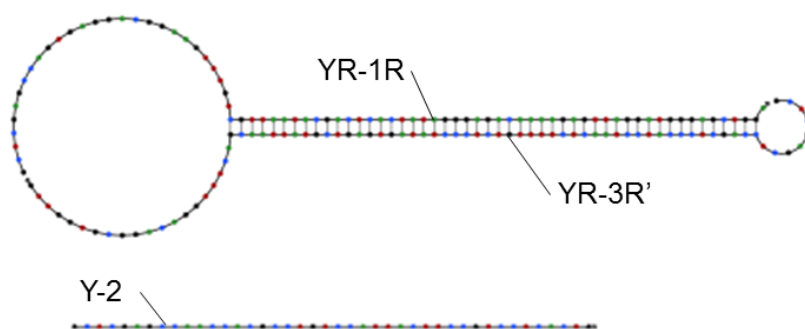
### 2.3.1. Y モチーフ DNA の塩基配列設計

二次構造予測の結果をまとめたものが図 2.15 である。90℃以上は結合が起こらなかった。85℃, 80℃では、YR-1R と YR-3R'で設計した箇所のみが安定に結合が起こり、Y-2 は結合が起こらなかった (図 2.15 a)。75℃では、YR-1R と Y-2 と YR-3R'が設計した箇所のみで安定に結合が起こり、Y 字分岐構造を形成された。同時に、YR-1R と YR-3R'で設計した箇所のみでの安定な結合と、結合が起こらない Y-2 が混在していた (図 2.15 b)。70℃以下では、設計した箇所のみで安定に結合が起こり、Y 字分岐構造を形成された (図 2.15 c)。以上より、設計した 3 本の DNA で Y 字分岐構造が安定に形成されることが分かった。

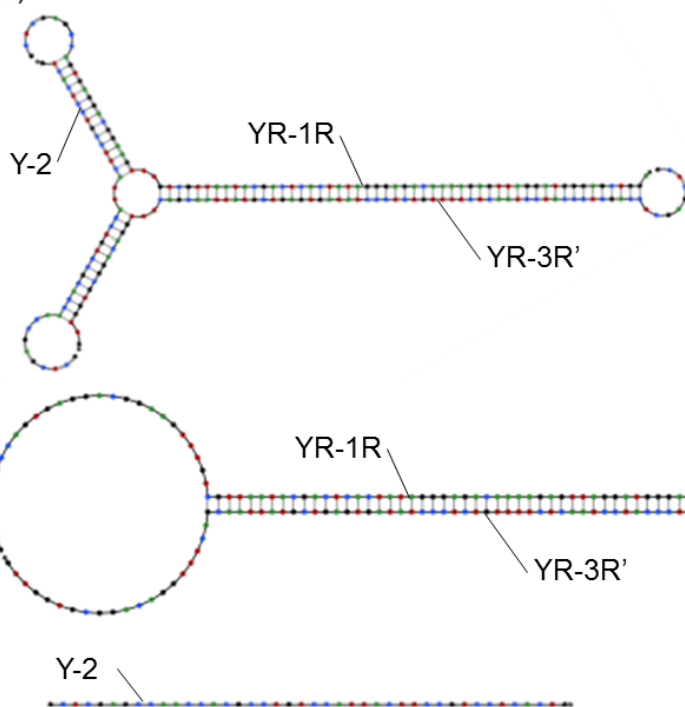
### 2.3.2. 油中水滴内での DNA マイクロ構造体の作製

転写配列をもつ Y モチーフ DNA (YDNA-R) のみでは、脂質膜に DNA 凝集体が吸着した状態で、油中水滴内に構造体が構築されなかった (図 2.16 a)。そこで、これまでに所属研究室で使用していた Y モチーフ DNA (YDNA) と YDNA-R を混合した。様々な混合割合を検討した (図 2.16)。その結果の 2 つのモチーフを混合することにより、YDNA:YDNA-R=85:15 の割合で、RNA 転写配列を持つ DNA マイクロ構造体が作製できることが分かった (図 2.16 c、図 2.17)。DNA モチーフの大きさの違いによって、油中水滴界面での DNA ゲル形成の様子が異なることから、DNA モチーフの形や大きさによって形成される構造を制御できることが考えられる。

(a) 85°C, 80°C



(b) 75°C



(c) 70°C, 65°C, ... , 20°C

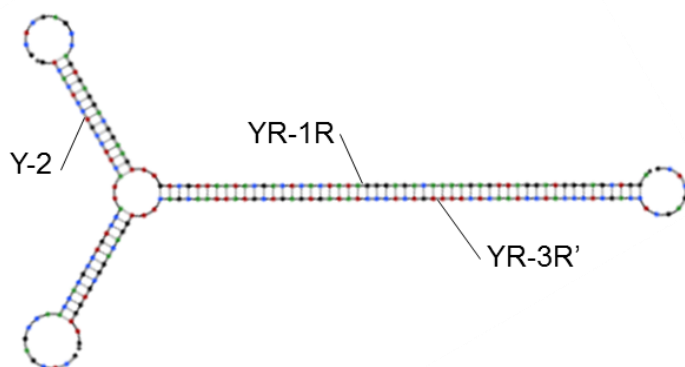


図 2.15 各温度での最安定構造. (a) 85°C, 80°C. (b) 75°C. (c) 70°C, 65°C, ... , 20°C.

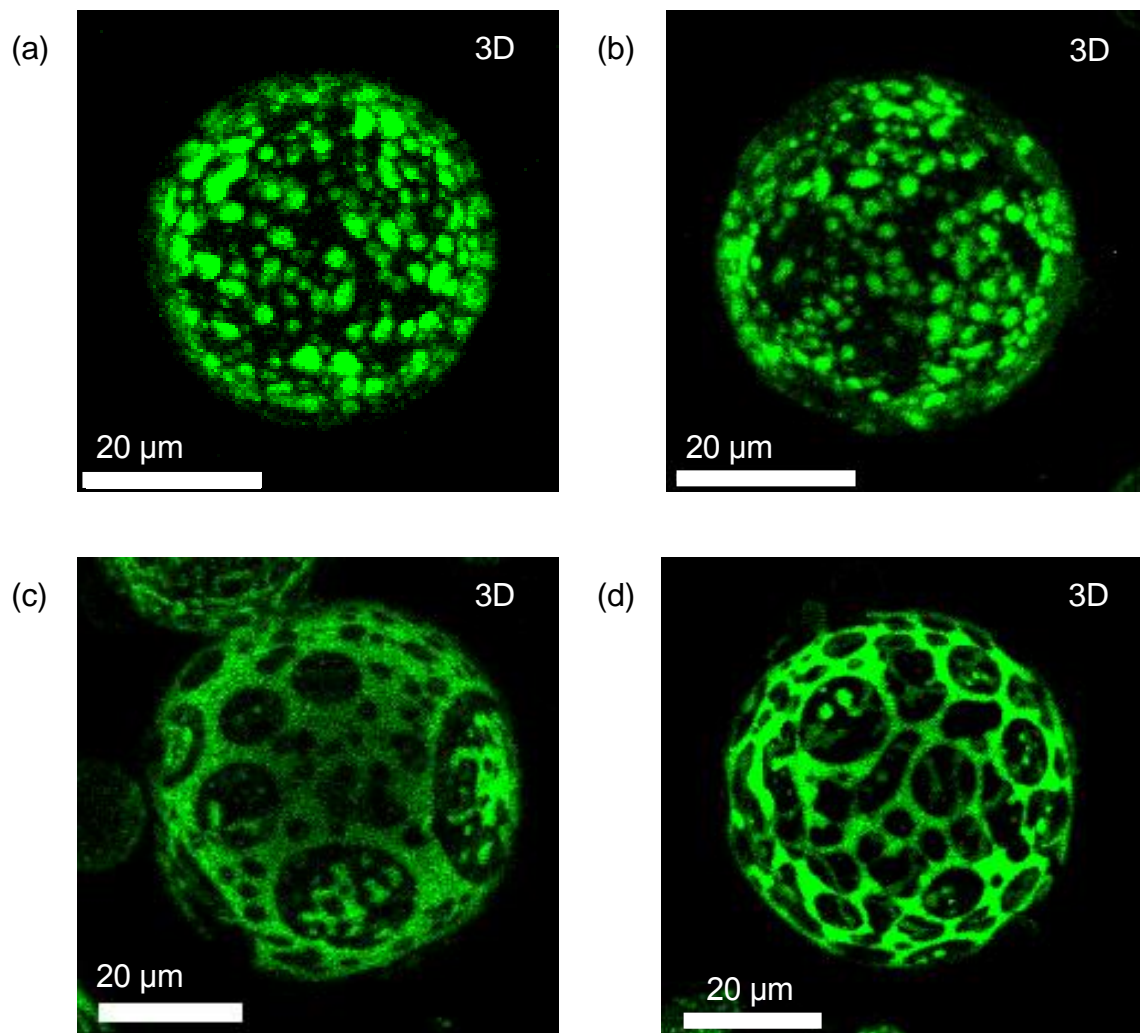


図 2.16 YDNA と YDNA-R の混合割合を変化させたときの油中水滴内の DNA の様子.  
 (a) YDNA:YDNA-R = 0:100. (b) YDNA:YDNA-R = 50:50. (c) YDNA:YDNA-R = 85:15. (d) YDNA:YDNA-R = 100:0. (DNA 濃度 : 10  $\mu$ M)



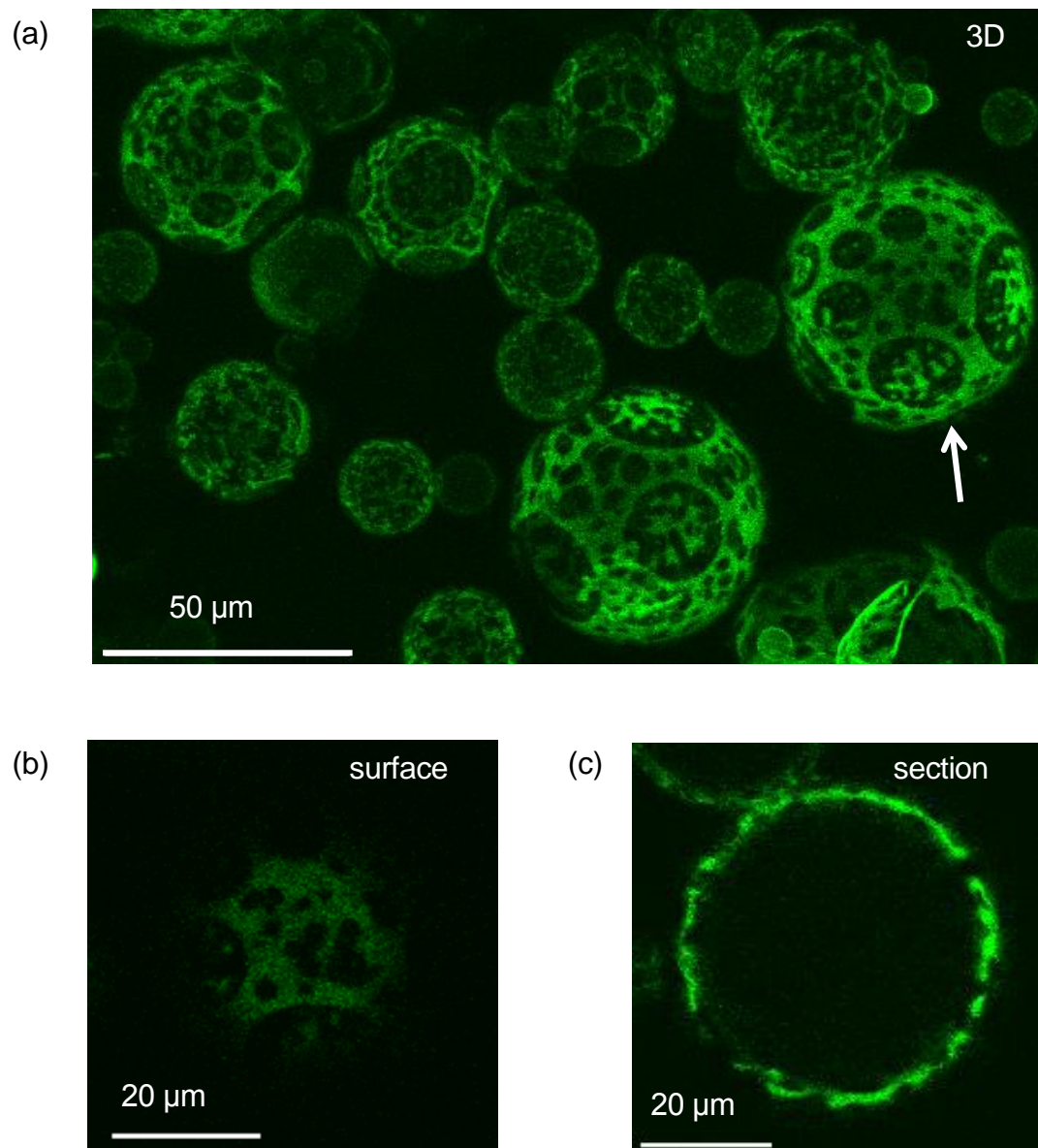


図 2.17 (a) 油中水滴内での RNA 転写配列を持つ DNA マイクロ構造体 (YDNA:YDNA-R = 85:15). (b) (a)の矢印の構造体の表面. (c) (a)の矢印の構造体の断面.

### 2.3.3. 油中水滴内からの DNA マイクロ構造体の取り出し

油中水滴内に作製した DNA マイクロ構造体（作製条件：DNA 濃度は  $10\ \mu\text{M}$ 、YDNA:YDNA-R = 85:15）を水溶液中に取り出した。DNA ゲルだけで構成されたマイクロ構造体を得られた（図 2.18）。

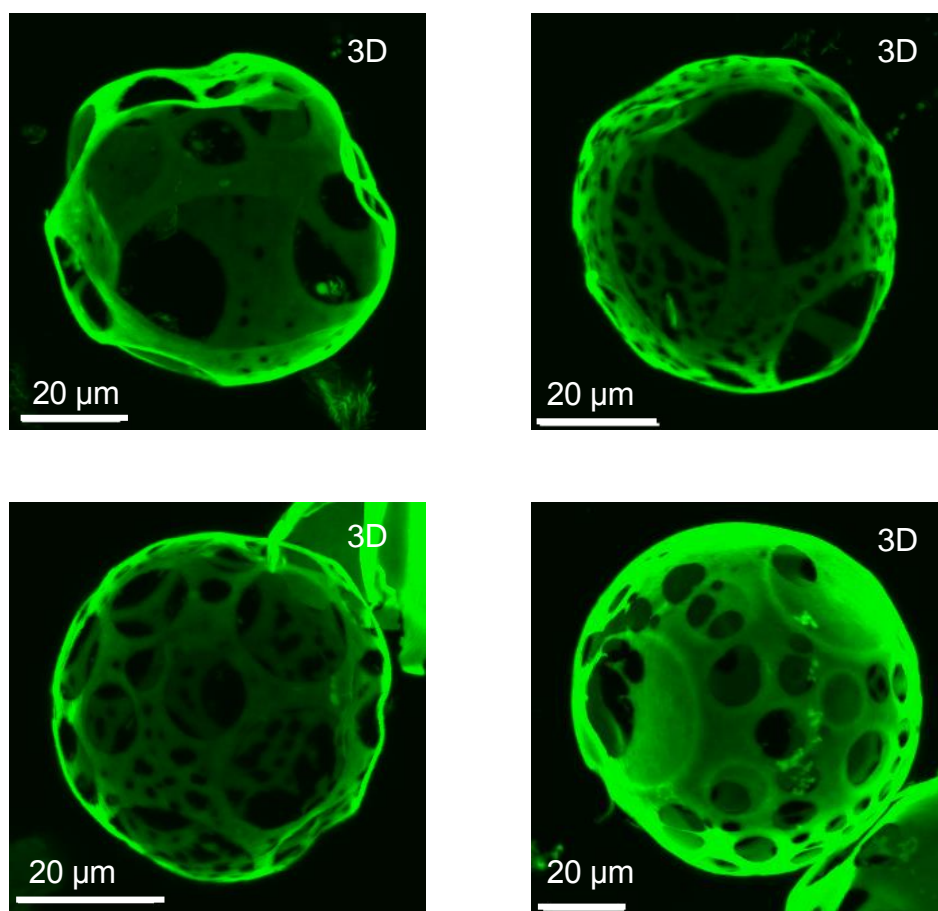


図 2.18 DNA マイクロ構造体 (YDNA:YDNA-R = 85:15、DNA 濃度 :  $10\ \mu\text{M}$ ).

## 第3章

# DNA マイクロ構造体からの RNA の転写

### 3.1. 概要

前章で作製した DNA マイクロ構造体から RNA を転写させ検出した。まず、設計した RNA 転写配列をもつ Y モチーフ DNA から RNA が転写されるかを確認した。次に、RNA を検出するための Molecular beacon プローブの配列を設計した。そして、DNA マイクロ構造体から RNA を転写させ、Molecular beacon プローブを用いて RNA を検出した。

### 3.2. 材料と方法

#### 3.2.1. Y モチーフ DNA からの RNA 転写

DNA マイクロ構造体からの RNA 転写の前に、設計した Y モチーフ DNA から RNA が転写されるかを変性アクリルアミドゲル電気泳動で確認した。

RNA の合成キットとして、ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit (東洋紡績製) [25 mM rNTPs mixture, 10× Basal reaction buffer, RNase inhibitor (40U/μl), Thermo T7 RNA polymerase (50U/μl)] を使用した。熱安定性が高い RNA 合成酵素 Thermo T7 RNA Polymerase をベースにした RNA 合成キットである。Thermo T7 RNA Polymerase の至適温度は 37-42℃である。

RNA 転写部位もつ YR-1R と YR-3R' を 1.5 μM ずつ Buffer [20 mM Tris·HCl pH 8.0 (ライフテクノロジーズジャパン), 350 mM NaCl (和光純薬工業株式会社)] に加た溶液を、サーマルサイクラー (T-Gradient, Biometra) を用いて、95℃から 20℃まで 0.01℃/s で冷却し 2 本鎖を形成させ Template DNA とした。ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit [25 mM rNTPs mixture : 4 μL, 10×Basal reaction buffer : 2 μL, RNase inhibitor (40U/μl) : 0.5 μL, Thermo T7 RNA polymerase(50U/μl) : 1 μL] に 0.15 μM Template DNA (YR-1R と YR-3R' を結合) を加えて、超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) で全量を 20 μL に調整し、転写溶液を作製

した。これをサーモブロック（日伸理化）を用いて、37℃で15分間と30分間インキュベートし転写を行った。この溶液の半量に、DNase（RQ1 RNase-Free Dnase、プロメガ）を等量加えて、サーモブロック（日伸理化）を用いて37℃で30分間インキュベートしDNAを分解した。次に、DNaseを加えた溶液とDNaseを加えていない溶液の両方に尿素（和光純薬工業株式会社）を加えて95℃で3分間加熱し、熱変性を行った。この溶液を10%アクリルアミドゲルに泳動した（電流：40 mA、泳動時間：1時間）。

10%アクリルアミドゲルは、10%(w/v)%-アクリルアミド/ビス混合液 [ 40(w/v)%-アクリルアミド/ビス混合液(29:1)（ナカライテスク）を使用 ]、8M 尿素（和光純薬工業株式会社）、1×TBE Buffer [ TBE Buffer(10×)（ナカライテスク）を使用 ] を混合した溶液に、重合開始剤にペルオキシ二硫酸アンモニウム（APS、和光純薬工業株式会社）を、重合促進剤にN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン（TEMED、和光純薬工業株式会社）を加えて作製した。

### 3.2.2. Molecular beacon プローブの配列設計方法

RNA 検出はMolecular beacon プローブを用いた。Molecular beacon プローブは1本鎖DNAで、DNAの5'末端に蛍光色素（6-Carboxyfluorescein、FAM）、3'末端に消光分子（Black Hole Quencher 1、BHQ1）を修飾しており、閉じたヘアピン構造をとっている（図 3.1）。ヘアピン構造のときは消光分子が蛍光色素の発光を抑制して光らない。RNAが存在するとMolecular beacon プローブはRNAと結合する。このとき、消光分子と蛍光色素が離れるため発光を抑制が解除され発光する。このようにして、蛍光強度でRNA転写量を測定した。

Molecular beacon プローブは1本鎖DNAで、RNAと結合する配列で設計した。配列設計の条件は、Molecular beacon プローブのみの時、20-40℃(観察する温度)ではヘアピン構造を形成すること、RNAとMolecular beacon プローブの2本鎖の融解温度がMolecular beacon プローブの分子内構造より高くなることとした。また、転写されるRNAが31塩基のため、ヘアピン構造（図 3.2）のループ部分は23塩基、22塩基に、ステム部分は8塩基、7塩基、6塩基に、ループ部分とステム部分がいずれかの塩基数になるよう組み合わせて設計した。

配列設計の方法について述べる。転写されるRNA（31塩基）に相補的なDNAが31-28塩基のとき、RNAに安定に結合する塩基配列を融解温度から決めた。1本鎖DNAがヘアピン構造を形成するには、両末端から数塩基の配列が相補的になる（ステム部分を形成す

る)。このような配列を設計するために、一方の末端から数塩基と相補的な配列を他方の末端に加える。そのために、転写される RNA (31 塩基) に相補的な DNA が 31-28 塩基のとき、末端から 8-6 塩基の配列が安定に結合するのが、5'末端と 3'末端のどちらかからなのかを融解温度から決めた。以上より、RNA に安定に結合し、ヘアピン構造のステム部分が安定に結合する配列が分かった。RNA に安定に結合し、ヘアピン構造のステム部分が安定に結合する配列を組み合わせ、ヘアピン構造のループ部分が、23 塩基、22 塩基、ステム部分が、8 塩基、7 塩基、6 塩基になるように Molecular beacon プローブの配列を設計した。設計した Molecular beacon プローブが Molecular beacon プローブのみのとき、20-40℃（観察する温度）ではヘアピン構造を形成するかどうかを NUPACK [8]を使用して調べた。また、設計した Molecular beacon プローブと RNA が 20-40℃（観察する温度）で 2 本鎖を形成するかを NUPACK を使用して調べた。安定に期待する二次構造を形成する Molecular beacon プローブの配列を用いて、Molecular beacon プローブと RNA の 2 本鎖の融解温度と、Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度を DINAMelt [9]（図 3.3）を使用して計算した。融解温度を指標として、Molecular beacon プローブの配列に決めた。

DINAMelt はレンセラー工科大学の Nicholas R. Markham 博士らによって開発されたソフトウェアで、web 上での利用が可能である。詳細な熱力学的解析が可能である。塩基配列・反応温度・濃度を入力すると、安定な二次構造のギブスの自由エネルギー、エンタルピー、エントロピー、融解温度、熱容量を出力する。設計した DNA の合成は、HPLC 精製でユーロフィンジェノミクス株式会社に委託した。

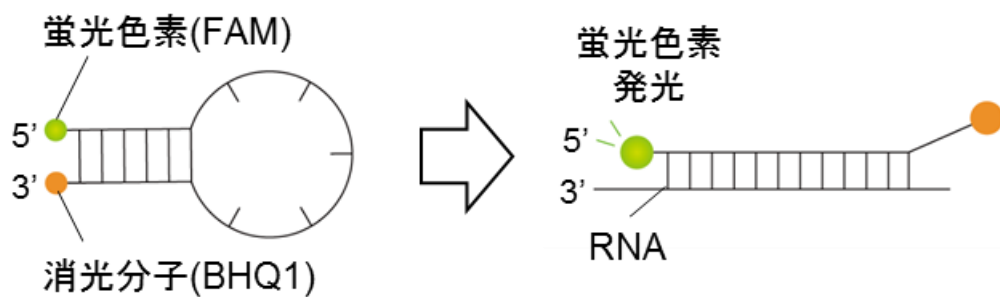


図 3.1 Molecular beacon プローブの模式図.

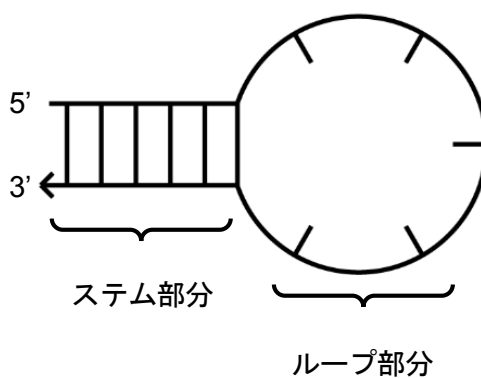


図 3.2 ヘアピン構造 各部分の名称.

図 3.3 DINAMelt の入力画面.

### 3.2.3. Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度の測定方法

Molecular beacon プローブは1本鎖のとき5'末端に修飾した蛍光色素 (FAM) が発光し、分子内構造を形成するときは消光分子 (Black Hole Quencher 1、BHQ1) が蛍光色素の発光を抑制して光らない。よって、蛍光強度から融解曲線が得られる。

35 mM NaCl (和光純薬工業株式会社)、1× Basal reaction buffer (ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit、東洋紡績製)、0.5 μM Molecular beacon プローブ DNA を混合した溶液を作製し、リアルタイム PCR 解析システム装置(CFX Connect、Bio-Rad)を用いて 95℃から 20℃まで 0.5℃/s 刻みで蛍光強度を測定し融解曲線を得た。融解曲線から融解温度を求めた。

### 3.2.4. Molecular beacon プローブと RNA との2本鎖構造の

#### 融解温度の測定方法

Molecular beacon プローブと RNA が2本鎖を形成すると、Molecular beacon プローブの5'末端に修飾した蛍光色素 (FAM) が発光する。よって、蛍光強度から融解曲線が得られる。

YR-1R と YR-3R'を 1.5 μM ずつ Buffer [20 mM Tris·HCl pH 8.0 (ライフテクノロジーズジャパン) , 350 mM NaCl (和光純薬工業株式会社) ]に加えた溶液をサーマルサイクラー (T-Gradient, Biometra) を用いて、95℃から 20℃まで 0.01℃/s で冷却し2本鎖を形成させ Template DNA とした。ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit [25 mM rNTPs mixture : 4 μL, 10×Basal reaction buffer : 2 μL, RNase inhibitor (40U/μl) : 0.5 μL, Thermo T7 RNA polymerase(50U/μl) : 1 μL ]に 0.15 μM Template DNA を加えて、超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) で全量を 20 μL に調整し、転写溶液を作製した。この転写溶液をサーモブロック (日伸理化) を用いて 37℃で 15 分間インキュベートして RNA を転写した。この溶液の半量に、DNase (RQ1 RNase-Free Dnase、プロメガ) を等量加えて、サーモブロック (日伸理化) を用いて 37℃で 30 分間インキュベートし DNA を分解し、RNA 溶液を作製した。この RNA 溶液の半量に、26.25 mM NaCl (和光純薬工業株式会社) 0.75× Basal reaction buffer (ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit、東洋紡績製)、0.5 μM Molecular beacon プローブ DNA を混合した溶液を作製した。全量は 20 μL である。NaCl と Basal reaction buffer

は、Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度の測定したときと同じ濃度に調節した。この溶液をリアルタイム PCR 解析システム装置 (CFX Connect、Bio-Rad) を用いて 95°C から 20°C まで 0.5°C/s 刻みで蛍光強度を測定し融解曲線を得た。融解曲線から融解温度を求めた。

### 3.2.5. 油中水滴リアクタを用いた DNA マイクロ構造体からの

#### RNA の転写方法

DNA マイクロ構造体からの RNA の転写を測定するために、DNA マイクロ構造体と転写溶液を油中水滴リアクタに封じ込め、油中水滴内で RNA の転写を行い、顕微鏡観察をした (図 3.4)。

10  $\mu$ M の Y モチーフ DNA (YDNA:YDNA-R = 85:15) に、Buffer [20 mM Tris-HCl pH 8.0 (ライフテクノロジーズジャパン) , 350 mM NaCl (和光純薬工業株式会社) , 10  $\mu$ g/mL DAPI (同仁化学) ] を加えて 10  $\mu$ M DNA 溶液を作製した。この DNA 溶液を用いて、第 2 章の方法で、油中水滴内に DNA マイクロ構造体を構築し水溶液中に取り出し、DNA マイクロ構造体溶液を作製した。

油中水滴リアクタの油相には 1% Span80 を含むミネラルオイルを用いた。油中水滴リアクタの水相には、ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit [25 mM rNTPs mixture : 2  $\mu$ L, 10 $\times$ Basal reaction buffer : 1  $\mu$ L, RNase inhibitor (40U/ $\mu$ L) : 0.25  $\mu$ L, Thermo T7 RNA polymerase(50U/ $\mu$ L) : 0.5  $\mu$ L] に DNA マイクロ構造体溶液を 2.5  $\mu$ L を加えて、超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) で全量を 10  $\mu$ L に調整した転写溶液を用いた。チューブ (2.0 mL, BM 機器) に 1% Span80 を含むミネラルオイルを 200  $\mu$ L 入れ、次に転写溶液を 10  $\mu$ L を加えた。タッピングを 4 回して油中水滴を作製した。5  $\mu$ L カバーガラスに取り出し、温度コントローラを設置した顕微鏡にのせて 40°C で温めながら観察を行った。(図 3.5)

共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus IX81 with FV1000, OLYMPUS) を使用して、蛍光観察で DNA の観察を行い、微分干渉観察で油中水滴を観察した。高さを等間隔で変化させて取得した共焦点レーザー顕微鏡画像をソフトウェア (FV10 ASW 4.0, OLYMPUS) を用いて、3 次元画像を構築した。



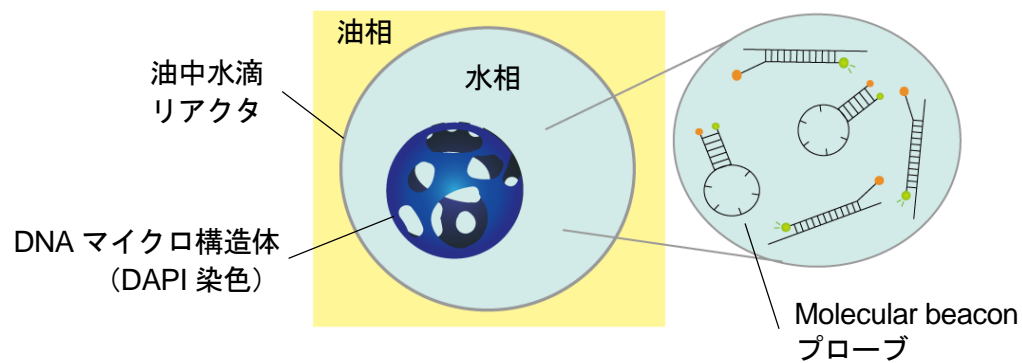


図 3.4 実験の模式図.

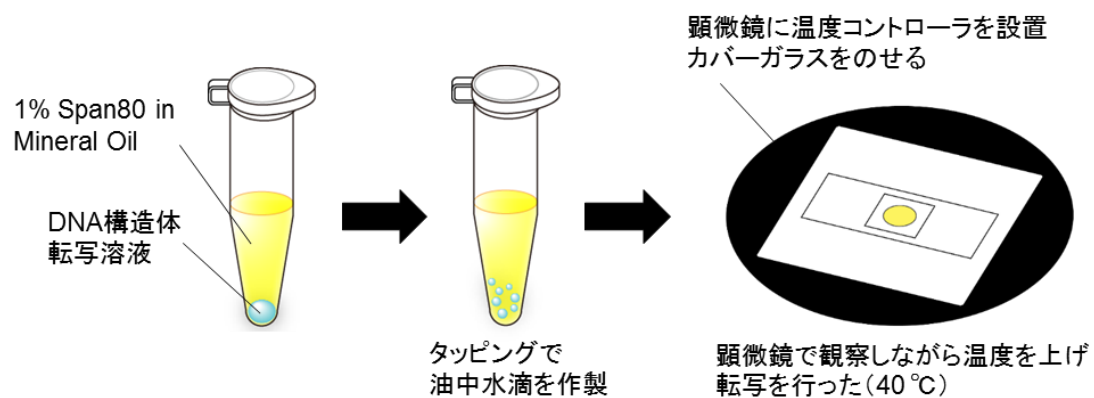


図 3.5 実験手順.

### 3.2.6. チューブ内での DNA マイクロ構造体からの RNA の転写方法

3.2.5 の結果より、DNA マイクロ構造体を取り出した水溶液内には、DNA マイクロ構造体と構造体の構築に使用されなかった DNA が混在していることが分かった。DNA マイクロ構造体溶液の濃縮を行い、DNA マイクロ構造体が多く含まれる溶液と上澄み溶液に分けた (図 3.6)。DNA マイクロ構造体濃縮溶液と上澄み溶液に転写溶液を加えて転写を行った。

DNA マイクロ構造体溶液の濃縮方法について述べる。15  $\mu$ M の Y モチーフ DNA (YDNA:YDNA-R = 85:15) に、Buffer [20 mM Tris·HCl pH 8.0 (ライフテクノロジー ジャパン), 350 mM NaCl (和光純薬工業株式会社), 10  $\mu$ g/mL DAPI (同仁化学)] を加えて 15  $\mu$ M DNA 溶液を作製した。この DNA 溶液を用いて、第 2 章の方法で、油中水滴内に DNA マイクロ構造体を構築し水溶液中に取り出し、DNA マイクロ構造体溶液を作製した。DNA マイクロ構造体溶液は全量が 20  $\mu$ L である。そこに Buffer を 60  $\mu$ L 加えピペティングでよく混ぜた。2 時間静置して DNA マイクロ構造体を底に沈降させた。上澄みを 60  $\mu$ L 取り除き、別のチューブに移した。そこに、Buffer を 80  $\mu$ L 加え遠心機 (日立) に 15000 rpm で 30 分間かけた。この溶液の上澄みを上澄み溶液として使用した。残った 20  $\mu$ L に Buffer を 80  $\mu$ L 加え、1 時間静置して DNA マイクロ構造体を底に沈降させた。上澄みを 60  $\mu$ L 取り除いた。残った 20  $\mu$ L に DNA マイクロ構造体は濃縮された (DNA マイクロ構造体濃縮溶液)。 (図 3.6)

次に、DNA マイクロ構造体濃縮溶液と上澄み溶液からの RNA の転写方法について述べる。次の 4 条件で転写溶液をチューブ (0.2ml low 8 連チューブ/ホワイト、Bio-Rad) 内に作製した。ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit [25 mM rNTPs mixture : 4  $\mu$ L, 10×Basal reaction buffer : 2  $\mu$ L, RNase inhibitor (40U/ $\mu$ L) : 0.5  $\mu$ L, Thermo T7 RNA polymerase(50U/ $\mu$ L) : 1 $\mu$ L] (ScriptMAX 酵素あり溶液と呼ぶ) に DNA マイクロ構造体濃縮溶液を 2  $\mu$ L 加えて、超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) で全量を 20 $\mu$ L に調整した転写溶液、ScriptMAX® Thermo T7 Transcription Kit [25 mM rNTPs mixture : 4  $\mu$ L, 10×Basal reaction buffer : 2  $\mu$ L, RNase inhibitor (40U/ $\mu$ L) : 0.5  $\mu$ L, Thermo T7 RNA polymerase(50U/ $\mu$ L) : 0  $\mu$ L] (ScriptMAX 酵素なし溶液と呼ぶ) に DNA マイクロ構造体濃縮溶液を 2  $\mu$ L 加えて、超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) で全量を 20 $\mu$ L に調整した転写溶液、ScriptMAX 酵素あり溶液に上澄み溶液を 2  $\mu$ L 加えて、超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) で全量を 20 $\mu$ L に調整した転写溶液、

ScriptMAX 酵素なし溶液に上澄み溶液を 2  $\mu$ L 加えて、超純水 (Direct-Q UV, Merck Millipore) で全量を 20  $\mu$ L に調整した転写溶液、それぞれ作製した。これらの転写溶液を、リアルタイム PCR 解析システム装置 (CFX Connect, Bio-Rad) を用いて 37°C で 1 時間インキュベートしながら、1 分ごとに 1 時間蛍光強度を測定した。その後、リアルタイム PCR 解析システム装置から取り出し、溶液中の DNA マイクロ構造体の個数を共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus IX81 with FV1000, OLYMPUS) で観察しながら数えた。

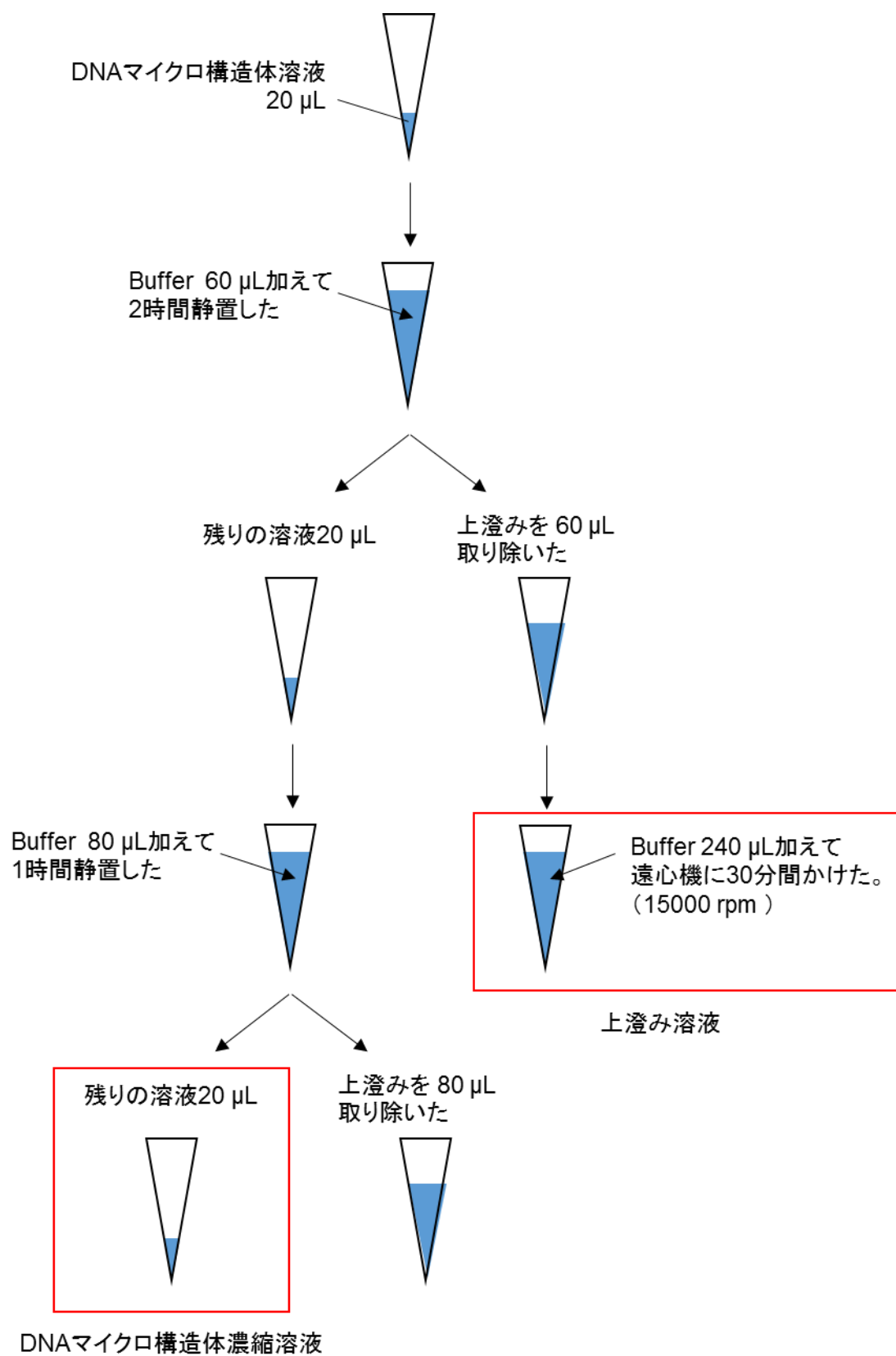


図 3.6 DNA マイクロ構造体溶液の濃縮方法.

### 3.3. 結果と考察

#### 3.3.1. Yモチーフ DNA からの RNA 転写

電気泳動の結果は図 3.7 である。設計した DNA から転写される RNA は 31 塩基のため、Lane 2,3,6,7 の 40 塩基にでているバンドが RNA だと考えられる。設計した Y モチーフ DNA から RNA が転写されることが分かった。

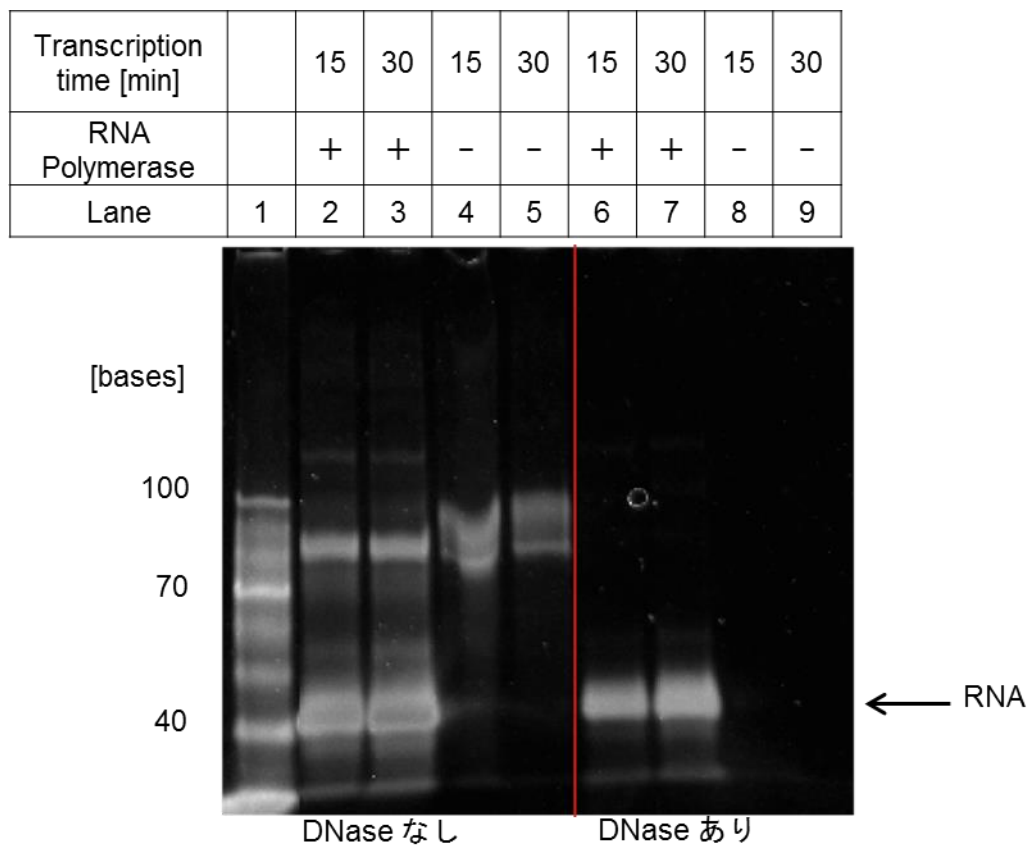


図 3.7 電気泳動結果. Lane 1 は 10bp DNA Step Ladder (プロメガ) .

### 3.3.2. Molecular beacon プローブの配列設計

#### (a) RNA と相補的な DNA との結合安定性

転写される RNA の配列は次である。

5'- GGG AGA CAA AAG AGU UAG GAU GGG AGC UGG A -3'

この RNA に相補的な DNA 配列 (31 塩基) は次のようになる。

5'- TCC AGC TCC CAT CCT AAC TCT TTT GTC TCC C -3' [\*]

5'- → ← -3'

この配列を 31-28 塩基に変化させた DNA が RNA と 2 本鎖を形成するときの融解温度を計算した。結果は表 3.1 である。表 3.1 の列名と行名は配列[\*]の末端の位置を何塩基矢印の方向 に移動させるかを表している。列名は 5'末端を行名は 3'末端を移動させる塩基数を表している。たとえば、列名 1 塩基と行名 2 塩基では次の配列の DNA が RNA と 2 本鎖を形成するときの融解温度を示す。

5'- CCA GCT CCC ATC CTA ACT CTT TTG TCT CC -3'

表 3.1 より 31-28 塩基にすると、5'末端の位置を移動させると融解温度が最も高くなることが分かった。よって、31-28 塩基で RNA に安定に結合する塩基配列は配列[\*]の 5'末端の位置を移動させた表 3.2 の配列である。

表 3.1 融解温度 [°C]

5'末端 3'末端	0	1	2	3	
3	65.1	64.2	62.6	61.8	28塩基
2	65.5	64.7	63.1	62.4	29塩基
1	66.9	66.1	64.7	64.0	30塩基
0	68.2	67.5	66.1	65.6	31塩基

表 3.2 RNA に安定に結合する塩基配列

31 塩基	5'- TCC AGC TCC CAT CCT AAC TCT TTT GTC TCC C -3'
30 塩基	5'- CCA GCT CCC ATC CTA ACT CTT TTG TCT CCC -3'
29 塩基	5'- CAG CTC CCA TCC TAA CTC TTT TGT CTC CC -3'
28 塩基	5'- AGC TCC CAT CCT AAC TCT TTT GTC TCC C -3'

## (b) ステム部分の結合安定性

表 3.2 の 4 種類の配列をもとにして、次にヘアピン構造のステム部分の安定性の設計を行った。末端から 8-6 塩基の配列が相補鎖と 2 本鎖を形成するときの融解温度を計算した。結果は、5' 末端側の配列をステム部分とする場合の融解温度は表 3.3、3' 末端側の配列をステム部分とする場合の融解温度は表 3.4 である。5'末端の 8-6 塩基の配列が相補鎖と 2 本鎖を形成するときの融解温度が最も高くなることが分かった。プローブ配列は 5'末端から 8-6 塩基の配列の相補鎖を 3'末端に加えてステム部分を安定に形成する。

## (c) 2 本鎖構造とヘアピン構造の融解温度の関係

(a), (b)より、RNA に安定に結合し、ヘアピン構造のステム部分が安定に結合する塩基配列が分かった。これを利用して、ヘアピン構造のループ部分は 23 塩基、22 塩基に、ステム部分は 8 塩基、7 塩基、6 塩基に、ループ部分とステム部分がいずれかの塩基数になるよう組み合わせて Molecular beacon プローブの配列を設計した。設計した配列は表 3.5 である。

NUPACK を使用して、20-40°C で P1, P2, P3, P4, P5, P6 がヘアピン構造を安定に形成し、RNA があるときは 2 本鎖を形成することがわかった。

次に DINAMelt [9]を使用して、P1, P2, P3, P4, P5, P6 のヘアピン構造と RNA との 2 本鎖の融解温度を計算した。結果は表 3.6 である。融解温度の関係が、ヘアピン構造 < 2 本鎖となるのは、P2, P4, P5, P6 である。ヘアピン構造融解温度が高いと RNA が存在しても 2 本鎖を形成しない可能性があるので、P2, P4, P5, P6 の中で融解温度が低いものを選ぶ。最も低いのは P4 だが、P4 の 5'末端の塩基は C であり、結合する RNA の塩基は G である。蛍光色素は G の塩基が近いと発光が弱くなる。そのため、2 番目に融解温度が低い P6 を Molecular beacon プローブの配列に選び、DNA の 5'末端に蛍光色素の 6-Carboxyfluorescein (FAM) を、3'末端に消光分子の Black Hole Quencher 1 (BHQ1) を修飾した。以上より設計した Molecular beacon プローブは次の配列 (P6) になる。下線部が RNA と結合する箇所、赤色の配列は相補的になっておりステム部分を形成する。

5'- [FAM] AGC TCC CAT CCT AAC TCT TTT GTC TCC CGG AGC T [BHQ1] -3'

表 3.3 5' 末端側の配列をステム部分とする場合の融解温度 [°C].

基準配列長 ステム部	31塩基	30塩基	29塩基	28塩基
6塩基	3.0	4.5	-0.5	1.4
7塩基	13.5	13.5	14.8	15.4
8塩基	21.0	25.2	25.2	24.4

表 3.4 3' 末端側の配列をステム部分とする場合の融解温度 [°C].

基準配列長 ステム部	31塩基
6塩基	-2.2
7塩基	12.1
8塩基	20.3

表 3.5 Molecular beacon プローブの候補配列.

P1	5'- <u>TCC AGC TCC</u> CAT CCT AAC TCT TTT GTC TCC <u>C</u> GA GCT GGA -3'
P2	5'- <u>CCA GCT CCC</u> ATC CTA ACT CTT TTG TCT CCC <u>GAG</u> CTG G -3'
P3	5'- <u>CCA GCT CCC</u> ATC CTA ACT CTT TTG TCT CCC <u>GGA</u> GCT GG -3'
P4	5'- <u>CAG CTC</u> CCA TCC TAA CTC TTT TGT CTC <u>CC</u> G AGC TG -3'
P5	5'- <u>CAG CTC C</u> CA TCC TAA CTC TTT TGT CTC <u>CC</u> G GAG CTG -3'
P6	5'- <u>AGC TCC</u> CAT CCT AAC TCT TTT GTC TCC <u>C</u> GG AGC T -3'

表 3.6 Molecular beacon プローブの候補配列融解温度 [°C].

	ヘアピン構造	2 本鎖構造
P1	65.7	64.2
P2	59.9	63.5
P3	64.7	63.5
P4	54.8	62.0
P5	61.8	62.0
P6	57.7	61.2



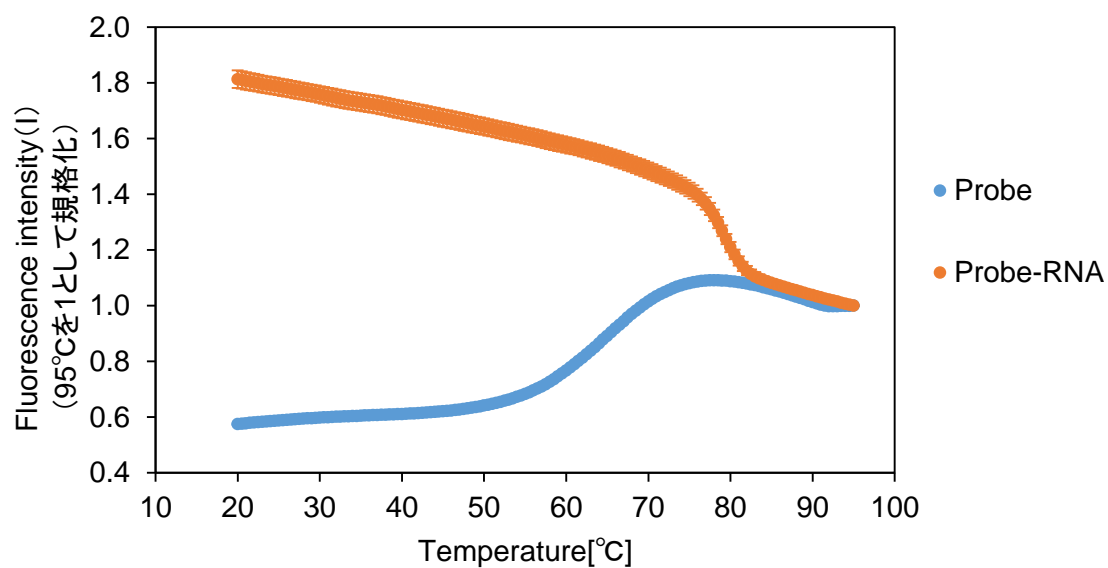
### 3.3.3. Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度

図 3.8(a)の融解曲線 (● Probe) が得られた。融解曲線の転移点を融解曲線の 1 階微分から求めた (図 3.8(b))。融解温度は融解曲線の転移点の温度である。よって、Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度が 65°C であることが分かった (図 3.8(b)の  $T_{mP}$ )。配列設計の際、Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度は 57.7°C だと計算でされた。配列設計のときに Basal reaction buffer の塩濃度を融解温度の計算に入れていなかった。実験では、Basal reaction buffer の塩が Molecular beacon プローブの分子内構造をより安定にしたため、実験から求めた融解温度と配列設計のときに求めた融解温度に違いがでたと考えられる。また、高温で蛍光強度が下がっているのは、蛍光色素に温度依存性があるためである。

### 3.3.4. Molecular beacon プローブと RNA の 2 本鎖構造の融解温度

図 3.8(a)の融解曲線 (● Probe-RNA) が得られた。融解曲線の転移点を融解曲線の 1 階微分から求めた。(図 3.8(b)) 融解温度は融解曲線の転移点の温度である。よって、Molecular beacon プローブと RNA の 2 本鎖構造の融解温度が 79°C であることが分かった (図 3.8(b)の  $T_{mP-R}$ )。また、Molecular beacon プローブと RNA の二本鎖構造の融解温度は Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度より高く、Molecular beacon プローブは RNA があると結合することが分かった。

(a)



(b)

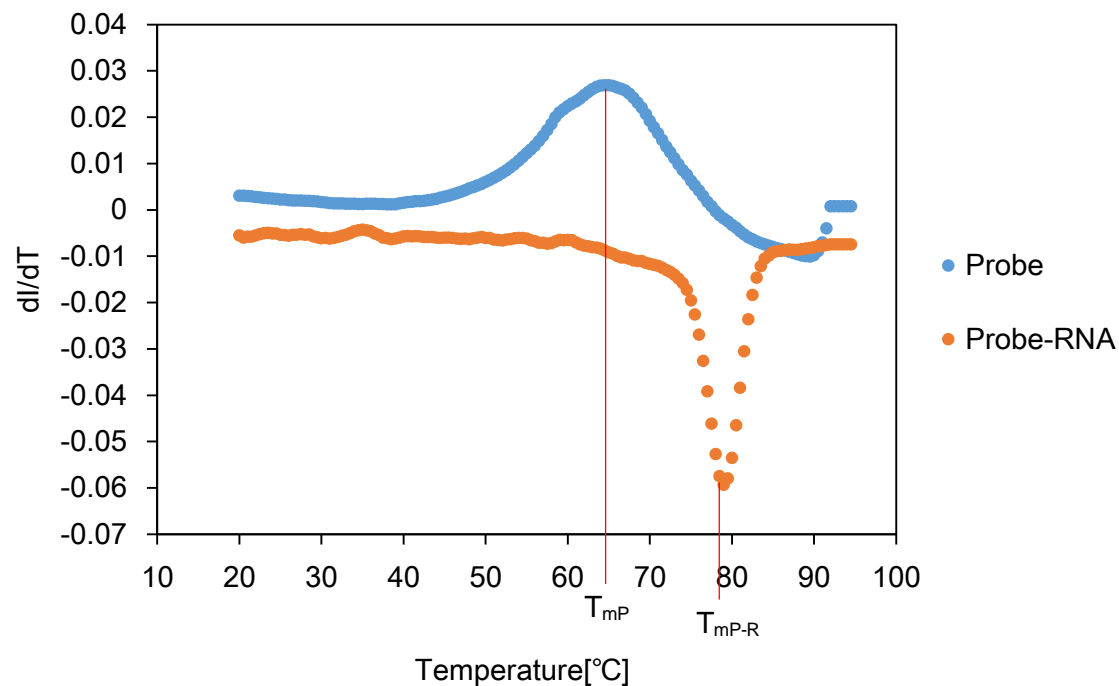


図 3.8 (a) 融解曲線. Probe : Molecular beacon プローブの分子内構造の融解曲線. Probe-RNA : Molecular beacon プローブと RNA の二本鎖構造の融解曲線. (b) (a)の融解曲線を温度で 1 階微分した結果.  $T_{mP}$  : Molecular beacon プローブの分子内構造の融解温度.  $T_{mP-R}$  : Molecular beacon プローブと RNA の二本鎖構造の融解温度.

### 3.3.5. 油中水滴リアクタを用いた DNA マイクロ構造体からの

#### RNA の転写

結果は図 3.9 である。図 3.9 は、温度コントローラの温度を上げる前に油中水滴型エマルジョンの様子を観察したもので、蛍光観察で取得した DNA の画像と、微分干渉法で取得した油中水滴の画像を重ね合わせたものである。青色発光 (DAPI) は DNA マイクロ構造体で、緑色発光 (FAM) は Molecular beacon プローブである。温度コントローラの温度を上げる前から、Molecular beacon プローブに修飾している蛍光色素の FAM が発光していた。水相を Molecular beacon プローブ溶液のみにして油中水滴を作製したところ、緑色発光 (FAM) は観察されなかった (図 3.10、蛍光観察で取得した画像と、微分干渉法で取得した油中水滴の画像を重ね合わせたものである)。Molecular beacon プローブのみ場合、ヘアピン構造が形成されていることが分かった。よって、DNA マイクロ構造体の作製時、マイクロ構造体の構築に使われなかった DNA が残っており、転写の鋳型になる DNA が Molecular beacon プローブと結合して、Molecular beacon プローブの FAM が発光したと考えられる。マイクロ構造体の構築に使われなかった DNA が残っているため、この方法では DNA マイクロ構造体からのみの RNA の転写量を測定するのが難しいと考えられる。

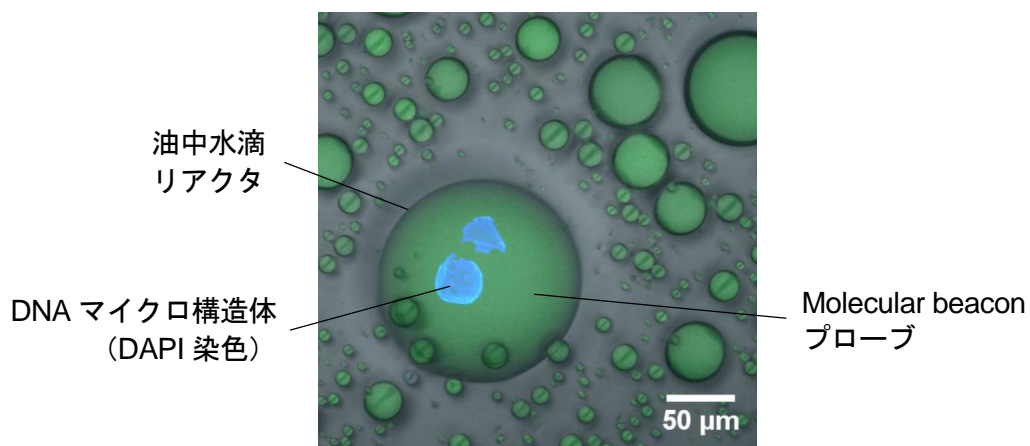


図 3.9 温度を上げる前の油中水滴内の様子. 青色発光は DNA マイクロ構造体、緑色発光は Molecular beacon プローブと DNA の 2 本鎖形成による発光.

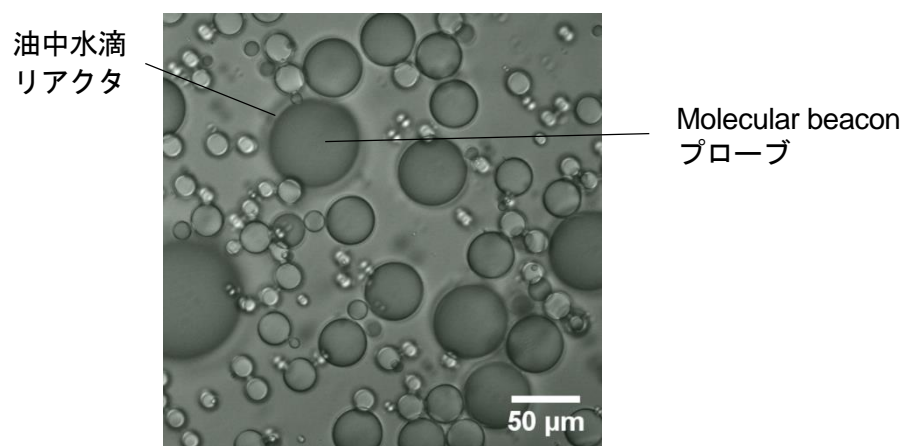


図 3.10 水相が Molecular beacon プローブのみの油中水滴内の様子. 蛍光色素の発光がないことから、Molecular beacon プローブはヘアピン構造を形成している.

### 3.3.6. チューブ内での DNA マイクロ構造体からの RNA の転写

図 3.11 は溶液中の構造体の個数が 202 個のときの実験結果である。DNA マイクロ構造体濃縮溶液と上澄み溶液の蛍光強度が上がっていることから、RNA が転写されたことが分かった。このとき、DNA マイクロ構造体濃縮溶液の蛍光強度の方が強いため、DNA マイクロ構造体から RNA が転写されていると考えられる。そのため、DNA マイクロ構造体溶液と上澄み溶液の蛍光強度の差を、DNA マイクロ構造体から RNA の転写量だと見積もった (図 3.12)。

DNA マイクロ構造体濃縮溶液と上澄み溶液から転写を行ったときの蛍光強度を、転写溶液中の DNA マイクロ構造体の個数ごとに平均と標準偏差を求めて差を取った [DNA マイクロ構造体濃縮溶液の蛍光強度の平均 (標準偏差) - 上澄み溶液の蛍光強度の平均 (標準偏差)] (図 3.13)。転写溶液中の DNA マイクロ構造体の個数が多いと蛍光強度が大きかった。DNA マイクロ構造体の個数が発現量に影響を及ぼすことが分かった。DNA マイクロ構造体の個数が多いと (161-240 個)、RNA の発現量が多いことが分かった。

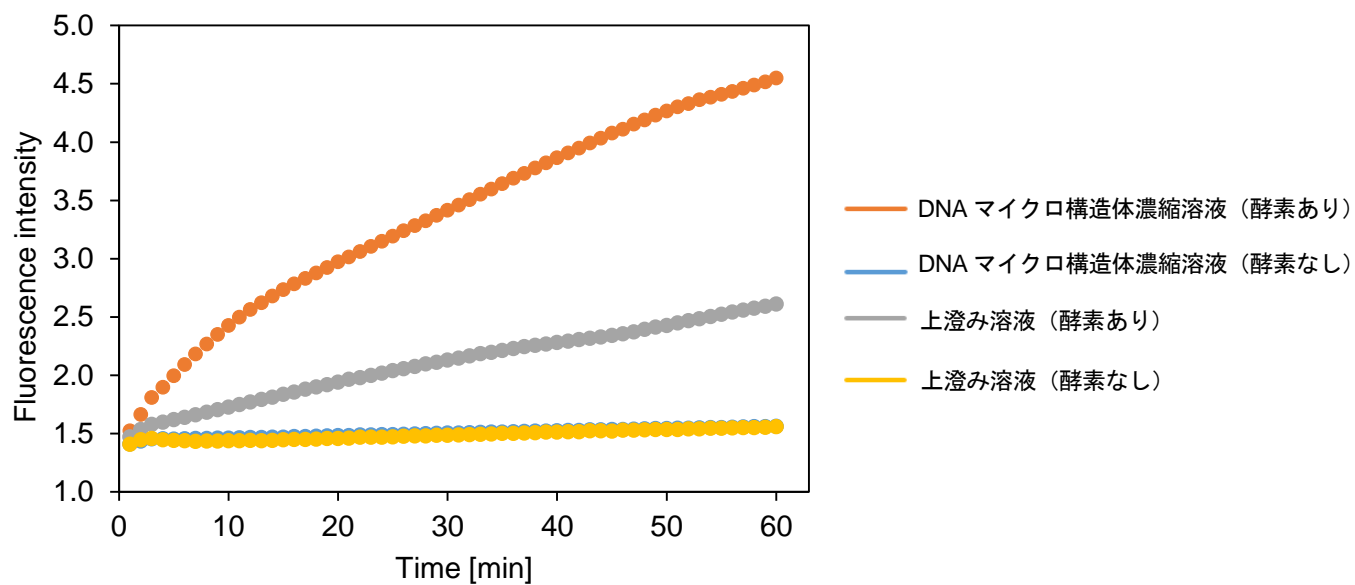


図 3.11 各条件での蛍光強度.

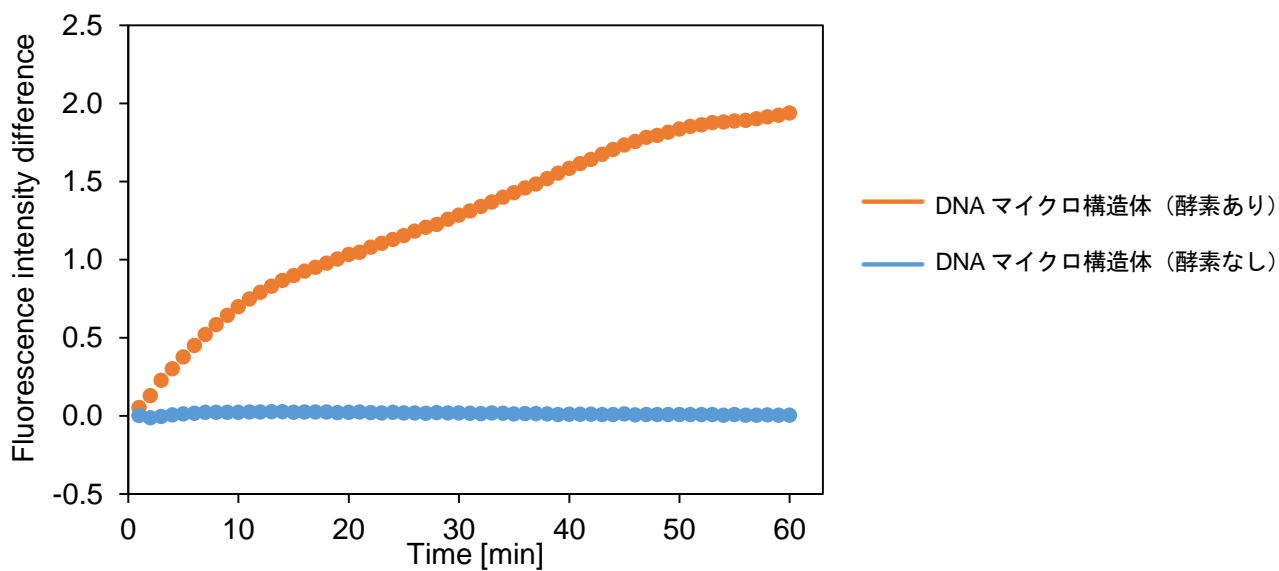


図 3.12 DNA マイクロ構造体からの RNA 転写量.

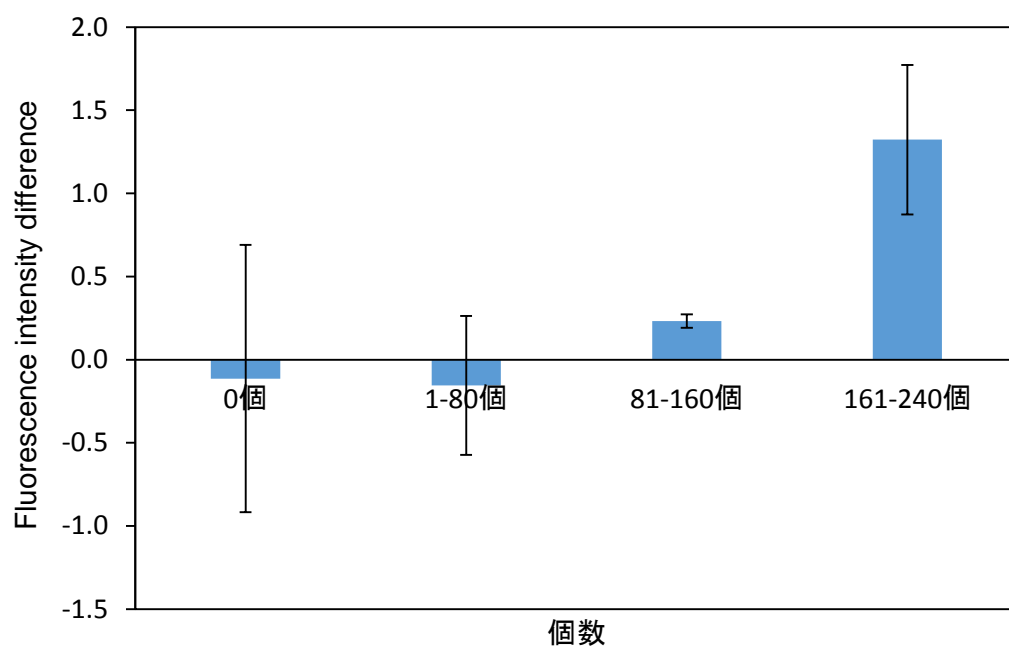


図 3.13 DNA マイクロ構造体の個数と蛍光強度の関係.  
エラーバーは標準偏差.

## 第4章

### 結論

本研究では、RNA 転写配列を持ちゲル構造の DNA マイクロ構造体を作製し、DNA マイクロ構造体からの RNA の発現を検出することにより、細胞核内の DNA 物理的凝縮状態を模倣した RNA 発現系の構築を行なった。DNA マイクロ構造体を作製では、DNA モチーフの大きさの違いによって、油中水滴界面での DNA ゲルの形成の様子が異なることから、DNA モチーフの形や大きさによって形成される構造を制御できる可能性を示した。DNA マイクロ構造体からの RNA の発現では、DNA マイクロ構造体の個数が発現量に影響を及ぼすことが分かった。DNA マイクロ構造体の個数が多いとき (161-240 個) に、RNA の発現量が多かった。この DNA マイクロ構造体はゲル構造のため、膨潤度によりゲルを収縮させることができる。ゲルの収縮によって DNA がさらに凝縮した状態になるため、遺伝子発現制御に利用できると考えられる。そのため、本研究で構築した DNA マイクロ構造体は、DNA マイクロ構造体の収縮によって RNA 発現量を制御する系への応用が期待される。

本研究では、ゲルの性質をもつ DNA マイクロ構造体から RNA の転写を検出することができた。RNA の発現では、DNA マイクロ構造体の個数が発現量に影響を及ぼすことが分かった。タンパク質生成 DNA ゲルを構築した D. Luo ら [6]は、このゲルからのタンパク質生成量は、ゲルから転写される RNA の発現量に影響すること報告した。そして、タンパク質生成量に DNA ゲルの個数が影響を及ぼすことを明らかにしていた。DNA ゲルの個数が 400 個のとき、タンパク質生成量が急に多くなっていた。また、DNA ゲルの個数が過剰の場合 (800 個)、タンパク質生成量が急に少なくなっていた (図 4.1)。本研究では、DNA マイクロ構造体の個数が多いとき、RNA の転写量が小さくなることはなかった。しかし、DNA マイクロ構造体の個数が 161-240 個のとき、RNA の転写量は急に多くなっていた。そのため、DNA マイクロ構造体の個数が多いときに、RNA の発現量が多くなるのは、DNA マイクロ構造体の個数の増加により、溶液中の RNA 転写配列の濃度が高くなることに加えて、溶液中の DNA マイクロ構造体の密度が影響すると考えられる。



本研究では、DNA マイクロ構造体からの RNA の転写を検出することができたが、DNA マイクロ構造体を収縮させて RNA の転写量を制御することまでは進まなかった。今後は、DNA マイクロ構造体の収縮によって RNA 発現量を制御できる系へ応用させることで、細胞核内での DNA の物理的凝縮の原理の解明や、DNA の物理的凝縮の変化によって起こる細胞異常などの理解がさらに進むと期待される。さらには、細胞核を模倣した分子ロボットの構築などへも応用できると考えられる。

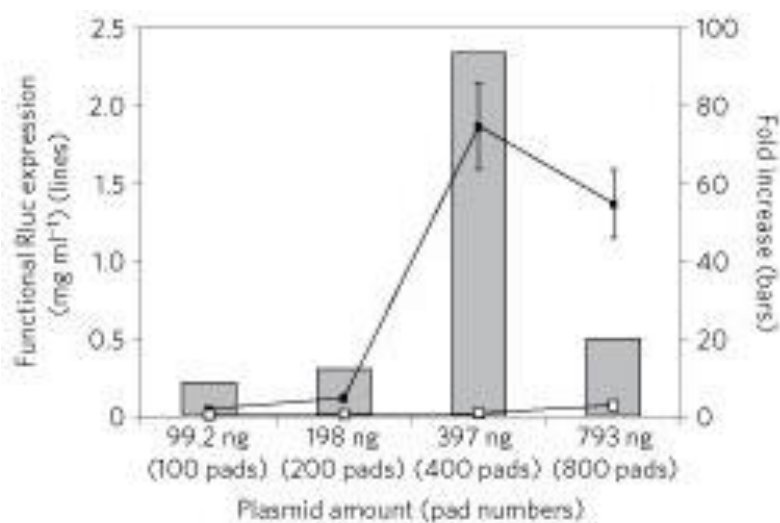


図 4.1 タンパク質生成量と DNA ゲルの個数の関係 [6].

## 謝辞

修士課程に2年間、本研究を進めるにあたって、指導教員である瀧ノ上正浩准教授にご指導いただきました。基礎的な知識や実験、研究の進め方、発表の仕方など様々なことを教えていただきました。実験に躓くことが多かったですが、その度に親身に相談にのっていただき、進めていくことができました。また、学会や研究会で発表する機会を多く与えていただきました。2年間ありがとうございました。

森田雅宗博士には、実験のやり方を基礎的なことから研究テーマに関することまで教えていただきました。また、発表資料の作成や発表の仕方についてもご指導いただきました。森田さんのご指導があったからこそ実験を進めていくことができました。ありがとうございました。

瀧ノ上研究室の皆様には、研究のことやそれ以外のことで、相談にのっていただき、様々な場面で助けていただきました。ありがとうございました。

修士課程の2年間、たくさんの方々にお世話になりました。皆様本当にありがとうございました。

## 参考文献

- [1] H. Bridger, “Epigenomics approach illuminates the dark corners of the genome,” Broad Communications, (2010). Available: <https://www.broadinstitute.org/news/1504>.
- [2] Tadasu Nozaki, Ryosuke Imai, Mai Tanbo, Ryosuke Nagashima, Sachiko Tamura, Tomomi Tani, Yasumasa Joti, Masaru Tomita, Kayo Hibino, Masato T.Kanemaki, Kerstin S.Wendt, Yasushi Okada, Takeharu Nagai and Kazuhiro Maeshima, “Dynamic Organization of Chromatin Domains Revealed by Super-Resolution Live-Cell Imaging,” Molecular Cell, (2017), Pages 282-293.
- [3] Yougen Li, Yolanda D. Tseng, Sang Y. Kwon, Leo d'Espaux, J. Scott Bunch, Paul L. McEuen and Dan Luo, “Controlled assembly of dendrimer-like DNA,” Nature Materials 3, 38-42 (2004) .
- [4] Yu He, Yi Chen,Haipeng Liu, Alexander E. Ribbe and Chengde Mao, “Self-Assembly of Hexagonal DNA Two-Dimensional (2D) Arrays,” J. Am. Chem. Soc., 2005, 127 (35), pp 12202-12203.
- [5] Soong Ho Um, Jong Bum Lee, Nokyoung Park, Sang Yeon Kwon, Christopher C. Umbach and Dan Luo, “Enzyme-catalysed assembly of DNA hydrogel,” Nature Materials 5, 797-801 (2006).
- [6] Nokyoung Park, Soong Ho Um, Hisakage Funabashi, Jianfeng Xu and Dan Luo, “A cell-free protein-producing gel,” Nature Materials 8, 432-437 (2009).
- [7] Masamune Morita, Shin-ichiro M. Nomura, Satoshi Murata, Miho Yanagisawa and Masahiro Takinoue, “Formation of DNA micro-skeleton structures in water-in-oil microdroplets,” microTAS2017, (2017).
- [8] “NUPACK,” Caltech., Available: <http://www.nupack.org/>.
- [9] “DINAMelt,” The RNA Institute, Available: <http://unafold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt>.
- [10] 分子ロボティクス研究会, “DNA 分子デザインのすべて BIOMOD 虎の巻,” 情報計算化学生物学会 (CBI 学会) 出版, 2016.

- [11] 小宮健, 瀧ノ上正浩, 田中文昭, 浜田省吾, 村田智, “DNA ナノエンジニアリング,”  
近代科学, 2011.