

二国間交流事業 共同研究報告書

平成 24 年 4 月 13 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者所属・部局 京都大学・エネルギー理工学研究所

職・氏名 (ふりがな) 教授・(もりい たかし) 森井 孝

1. 事業名 相手国 (ベルギー) との共同研究 振興会対応機関 (FWO)
2. 研究課題名 クロスリンク反応性を内在する機能性生体高分子によるケミカルバイオロジーの開拓

3. 全採用期間

平成 22 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 3 月 31 日 (2 年 ヶ月)

4. 経費総額

(1) 本事業により執行した研究経費総額 5,000,000 円

初年度経費 2,500,000 円、 2年度経費 2,500,000 円、 3年度経費 円

(2) 本事業経費以外の国内における研究経費総額 3,000,000 円

5. 研究組織

(1) 日本側参加者（代表者は除く）

氏名 <small>(ふりがな)</small>	所属・職名	研究協力テーマ
すぎやま ひろし 杉山 弘	京都大学理学研究科・教授	選択的 DNA アルキル化反応の設計
やまな かずなり 山名 一成	兵庫県立大学工学研究科・教授	糖部修飾ヌクレオシドの合成
なかた えいじ 中田 栄司	京都大学エネルギー理工学研究所・講師	タンパク質-DNA クロスリンク反応の開発
たいなか かずき 田井中 一貴	京都大学エネルギー理工学研究所・助教	タンパク質-DNA クロスリンク反応の開発
なかの しゅん 仲野 瞬	京都大学エネルギー理工学研究所・研究員	タンパク質-RNA クロスリンク反応の開発
りゅう ふおんふおん Liew Fong Fong	京都大学エネルギー科学研究科・博士課程学生	タンパク質-RNA クロスリンク反応の開発
まつもと かつひこ 松本 桂彦	京都大学エネルギー科学研究科・博士課程学生	タンパク質-DNA クロスリンク反応の開発

(2) 相手国側研究代表者

所属・職名・氏名

Ghent University, Department of Organic Chemistry, Prof. Annemieke Madder

(3) 相手国参加者（代表者は除く）

氏名	所属・職名 (国名)	研究協力テーマ
Jos Van den Begin	Ghent University, Department of Organic Chemistry, Technician	クロスリンク試薬の開発
Lieselotte Carrette	Ghent University, Department of Organic Chemistry, PhD student	タンパク質-DNA クロスリンク反応の開発
Kurt Hoogewijs	Ghent University, Department of Organic Chemistry, PhD student	タンパク質-DNA クロスリンク反応の開発
Vicky Gheerardiyn	Ghent University, Department of Organic Chemistry, PhD student	RNA クロスリンク反応の開発

6. 研究実績概要（全期間を通じた研究の目的・研究計画の実施状況・成果等の概要を簡潔に記載してください。）

生体内での情報伝達や機能発現には生理活性分子、タンパク質、DNA、RNA などの小分子・生体高分子間での非共有結合による相互作用が重要な役割を果たしている。近年のゲノム解析、網羅的なタンパク質相互作用ネットワーク解析、生体高分子の三次元構造解析により、生体高分子間相互作用の網羅的な情報および原子レベルでの生体高分子構造に関する膨大な情報が蓄積されてきた。しかしながら、生体内でのシグナル伝達を例にとっても、その実像を明らかにするためには「生体高分子間・生理活性分子と生体高分子間の相互作用をリアルタイムに解析・制御する技術」が必要である。

本共同研究では、ベルギー Ghent 大学 Madder 教授グループが開発した「生体内でも活性化が可能なクロスリンク官能基」を、我々の開発した「小分子から細胞表面までを標的とすることが可能なリボヌクレオペプチド (RNP)・リセプターおよびセンサー」および「二量体 DNA 結合ペプチド」に導入し、細胞内でのタンパク質間相互作用、DNA-タンパク質相互作用、シグナル伝達に關与する動的な分子間相互作用・DNA-タンパク質相互作用を「共有結合で凍結して観測する」、「共有結合で凍結して制御する」、そして「細胞内の特定の位置でリアルタイムに蛍光変化として観測する」ことが可能なケミカルバイオロジーにおける新しい方法論の開発を目的とした。

行った研究の詳細は以下の通りである。

(1) クロスリンクによる核酸-タンパク質相互作用の解析

森井グループで開発したロイシンジッパータンパク質をモデル化した DNA 特定配列に結合するペプチド (*J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 12575; *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 11137; *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10011; *Biochemistry* **1999**, *38*, 1626; *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 180; *Chem-Eur. J.* **2002**, *22*, 5067) に Madder グループが開発したクロスリンク試薬を導入した。合成したロイシンジッパーペプチドと DNA との複合体形成を確認し、クロスリンク反応の条件を検討した。

1. フラン基を有する非天然型アミノ酸の合成を Madder グループ (ベルギー) で行った。
2. Madder グループ学生 (Lieselotte Carrette) が平成 22 年 4 月より 12 月まで森井グループに滞在し、フラン基を含むペプチドの合成と精製 (HPLC、イオン交換クロマト) を行った。
3. Madder グループ教員 (Annemieke Madder) が森井グループに滞在し、フラン基を有する DNA 結合ペプチドと DNA との複合体形成とクロスリンク反応に関する研究計画を立案した。
4. 森井グループの教員 (森井 孝) が DNA 結合ペプチドと DNA の複合体形成および、クロスリンク反応についての情報収集を International Round Table 2010 にて行った (平成 22 年 8 月 27 日~9 月 4 日リヨン出張)。
5. Madder グループ学生 (Lieselotte Carrette) が森井グループに滞在して、ペプチドと DNA との複合体形成をゲル電気泳動により確認した。また、複合体のクロスリンク反応の条件検討を行った。
6. 森井グループの教員 (森井 孝) および共同研究者 (杉山 弘) が Madder グループに滞在し (平成 23 年 1 月ゲントへの出張)、ペプチドと DNA の分子認識機構を議論した。
7. RRE 配列 RNA に結合する Rev ペプチドにフランを導入し、RNA ペプチド複合体でクロスリンク反応を観測する系を考案し、森井グループの教員 (森井 孝) が RNA サンプルを Madder グループに供与、実験の詳細について議論した。また、Zn フィンガータンパク質にフランを導入し、DNA オリガミ上の特定位置に Zn フィンガータンパク質を共有結合で固定化する方法について議論した (平成 23 年 7 月ゲント出張)。
8. 森井グループの教員 (森井 孝) および共同研究者 (山名一成) が Madder グループに滞在し (平成 23 年 12 月ゲントへの出張)、DNA 塩基の修飾法およびペプチド核酸オリゴマーへのクロスリンク試薬導入を検討について議論した。

(2) クロスリンク活性を有するリボヌクレオペプチドリセプターの開発

森井グループで開発したリボヌクレオペプチド (RNP) リセプターは、RNA を用いたインビトロセレクシ

ョン法を応用する事により、生理活性小分子から細胞表面までのさまざまな標的に対して作製することが可能である。RNP リセプターの分子認識能は標的分子との非共有結合によるものであるが、RNP に Madder グループで開発した Furanyl クロスリンク基を導入することにより RNP と標的との強固な複合体を形成できる。これにより、標的タンパク質等の機能を選択的に不活化する。

1. Madder グループ教員 (Annemieke Madder) が森井グループに滞在し、フラン基を有するリボヌクレオペプチドリセプターの作製に関する研究計画を立案した。
2. 森井グループの教員 (森井 孝) がフラン基を有するリボヌクレオペプチドリセプターに関する予備実験結果を International Round Table 2010 にて発表した (8 月リヨンへの出張)。
3. 森井グループにおいて、フラン基を導入した Rev ペプチドを合成した。
4. 森井グループにおいて、フラン基を導入した Rev ペプチドをもとにして「反応性」Furanyl-RNP を構築した。
5. 森井グループの教員 (森井 孝) および共同研究者 (杉山 弘) が Madder グループに滞在し (1 月 Gent への出張)、RNP リセプターを形成する Rev ペプチド N 末端へのフラン基の導入に関する合成スキームを考案、議論した。
6. 森井グループの教員 (森井 孝) が RNA サンプルを Madder グループに供与、反応性 Furanyl-RNP の作成実験の詳細について議論した (平成 23 年 7 月 Gent 出張)。
7. 森井グループの教員 (森井 孝) および共同研究者 (山名一成) が Madder グループに滞在し (平成 23 年 12 月 Gent への出張)、ペプチドのフランによる修飾法について議論した。
8. Madder グループの学生 (Vicky Gheerardijn) が森井グループに滞在し (平成 24 年 5 月～7 月)、反応性 Furanyl-RNP の機能を解析する (震災のため、平成 24 年度に延期した)。

これらの研究過程で、(1) の 7 項にある実験の予備的な結果として、DNA オリガミ上の特定 DNA 配列に Zn フィンガータンパク質を結合させる系を作成し、論文として発表 (9 項、イ-1)、および日本化学会第 92 春季年会で発表した (9 項、ロ-2)。また、(1) の 8 項にあるペプチド核酸オリゴマーへのクロスリンク試薬導入実験については、その予備的結果を日本化学会第 92 春季年会で発表した (9 項、ロ-1)。(1) の 3 項にある RNP 作製に関する予備実験結果を日本化学会第 92 春季年会で発表した (9 項、ロ-3)。